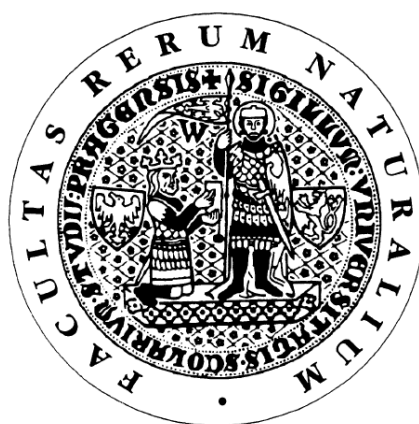


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Diplomová práce



Vliv složení kultivačního média na metabolismus
rostlin tabáku

Influence of cultivation medium composition on metabolism of
tobacco plants

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.
Konzultant: RNDr. Veronika Doubnerová, PhD.

Praha 2010

Kateřina Minářů

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

V Praze dne

.....
Kateřina Minářů

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. a konzultantce RNDr. Veronice Doubnerové, PhD. za trpělivost a pomoc při experimentální části práce i při jejím vypracování. Dále bych také ráda poděkovala RNDr. Heleně Synkové, CSc. a Mgr. Petře Spoustové z Ústavu experimentální botaniky AV ČR (ÚEB AV ČR) za poskytnutí rostlinného materiálu. Děkuji také mé rodině za podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Fosfoenolpyruvát karboxylasa (EC 4.1.1.31; PEPC) plní v rostlinách důležité funkce, propojuje metabolismus sacharidů a aminokyselin. PEPC je regulována na mnoha úrovních, včetně fosforylace serinového zbytku blízko N-konce. Cílem této práce bylo zjistit, jak ovlivní složení kultivačního média aktivitu PEPC a metabolicky souvisejících enzymů NADP-dependentní malátdehydrogenasy (dekarboxylační) (EC 1.1.1.40; NADP-ME) a pyruvát, fosfátdikinasy (EC 2.7.9.1; PPK) a také enzymů podílejících se na metabolismu dusíku, tedy nitrátreduktasy (EC 1.7.1.1; NR), glutaminsynthetasy (EC 6.3.1.2; GS), glutamát-synthasy (EC 1.4.1.14; GOGAT), NAD-glutamátdehydrogenasy (EC 1.4.1.2; NAD-GDH) a NADP-glutamátdehydrogenasy (EC 1.4.1.4; NADP-GDH).

Rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1) byly pěstované *in vitro* v Murashige-Skoogově agaru a ovlivněny přítomností 2% sacharosy, sníženým obsahem dusíkatých látek nebo fosfátu a limitovaným přístupem CO₂.

Sacharosa přidaná do Murashige-Skoogova média způsobila zvýšení aktivity enzymů PEPC, NADP-ME a také všech sledovaných enzymů souvisejících s příjmem a metabolismem dusíku – NR, GS, GOGAT, NAD-GDH a NADP-GDH.

Snížený obsah dusíkatých látek a fosfátu v kultivačním médiu snížil aktivitu většiny sledovaných enzymů. Aktivita byla také ovlivněna dostupností CO₂. U rostlin s limitovaným přístupem CO₂ byla nižší aktivita PEPC, NR, GS a GOGAT a vyšší aktivita NADP-ME, NAD-GDH a NADP-GDH oproti rostlinám s neomezeným přístupem CO₂.

Tato práce ukázala, že změny v dostupnosti dusíkatých látek, fosfátu a CO₂/sacharosy ovlivnila aktivitu sledovaných enzymů významným způsobem.

Abstract

Phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31; PEPC) plays many roles in plants; it connects the metabolism of saccharides and amino acids. PEPC is regulated at many levels including phosphorylation of serine residue near N-terminus. The aim was to find out, if the composition of cultivation medium affects the activity of PEPC and metabolically related enzymes such as NADP-malic enzyme (EC 1.1.1.40), pyruvate, phosphate dikinase (EC 2.7.9.1; PPDK) and enzymes participating in nitrogen assimilation, thus nitrate reductase (EC 1.7.1.1; NR), glutamine synthetase (EC 6.3.1.2; GS), glutamate synthase (EC 1.4.1.14; GOGAT), NAD-glutamate dehydrogenase (1.4.1.2; NAD-GDH) and NADP-glutamate dehydrogenase (1.4.1.4; NADP-GDH).

Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1) were grown *in vitro* in Murashige-Skoog agar. The effect of the presence of 2% sucrose, reduced content of nitrogen compounds or phosphate and limited supply of CO₂ was followed.

Sucrose added to Murashige-Skoog medium caused the increase of enzyme activity of PEPC, NADP-ME and most of enzymes related to nitrogen uptake and metabolism – NR, GS, GOGAT, NAD-GDH and NADP-GDH.

Reduced content of nitrogen compounds and phosphate in cultivation medium decreased activity of all monitored enzymes. Enzyme activities were also affected by the availability of CO₂. Lower activity of PEPC, NR, GS and GOGAT and higher activity of NADP-ME, NAD-GDH and NADP-GDH were found in plants with limited supply of CO₂ compared to unaffected plants.

This work showed that the availability of nitrogen compounds, phosphate and CO₂/sucrose significantly affected studied enzymes.

Seznam použitých zkratek

AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
C ₃ rostlina	rostlina, u které je první fotosyntetický produkt tříuhlíkatá sloučenina (3-fosfoglycerát)
C ₄ rostlina	rostlina, u které je první fotosyntetický produkt čtyřuhlíkatá sloučenina (oxalacetát)
CAM	Crassulacean acid metabolism
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraacetát
g	tíhové zrychlení (g = 9,80665)
M _r	relativní molekulová hmotnost
mRNA	informační ribonukleová kyselina
NADP (NADPH)	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaný)
NADP-ME	NADP dependentní malátdehydrogenasa
NNEDD	N-(1-naftyl)ethylendiamindihydrochlorid
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEP	fosfoenolpyruvát
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
Pk+LDH	pyruvátkinasa a laktátdehydrogenasa
P _i	anorganický fosfát
PPDK	pyruvát, fosfátdikinasa
PVP	polyvinylpolypyrrolidon
SDS	dodecylsulfát sodný
SR1	kultivar Petit Havana SR1
SR1+S	rostliny tabáku pěstované s přídavkem sacharosy
SR1-S	rostliny tabáku pěstované bez přídavku sacharosy
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Obsah

1. ÚVOD	9
1.1 FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASA (PEPC, EC 4.1.1.31).....	9
1.1.1 Výskyt PEPC	9
1.1.2 Funkce PEPC	10
1.1.2.1 Funkce PEPC v C4 a CAM rostlinách	10
1.1.2.2 Funkce PEPC v C3 rostlinách.....	11
1.1.3 Mechanismus reakce PEPC	12
1.1.4 Regulace aktivity PEPC	13
1.1.4.1 Přítomnost dusíkatých látek.....	14
1.1.4.1.1 Nitrátreduktasa	17
1.1.4.1.2 Nitritreduktasa	18
1.1.4.1.3 Glutaminsynthetasa	18
1.1.4.1.4 Glutamátsynthasa.....	19
1.1.4.1.5 Glutamátdehydrogenasa.....	20
1.1.4.2 Přítomnost fosforu.....	21
1.1.4.3 Přítomnost železa	21
1.1.4.4 Stres rostlin	22
1.2 NADP-MALÁTDEHYDROGENASA (NADP-ME, EC 1.1.1.40).....	22
1.3 PYRUVÁT, FOSFÁTDIKINASA (PPDK, EC 2.7.9.1)	24
2. CÍL PRÁCE	26
3. MATERIÁL	27
3.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL	27
3.2 CHEMIKÁLIE	27
3.3 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE	28
4. METODY	28
4.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ Z ROSTLINNÉHO MATERIÁLU	28
4.1.1 Pěstování rostlin tabáku	28
4.1.2 Odběr vzorků	29
4.1.3 Příprava rostlinného extraktu	30
4.2 STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ	30
4.2.1 Stanovení aktivity PEPC	30
4.2.2 Stanovení aktivity NADP-ME.....	30
4.2.3 Stanovení aktivity PPDK	30
4.2.4 Stanovení aktivity NR	31
4.2.5 Stanovení aktivity GS	31
4.2.6 Stanovení aktivity NADH-GOGAT	32
4.2.7 Stanovení aktivity NAD ⁺ / NADP ⁺ GDH	32
4.3 ELEKTROFORETICKÉ METODY	33
4.3.1 Příprava vzorků pro elektroforetické separace	33
4.3.2 Elektroforéza v prostředí SDS	34
4.3.3 Detekce proteinů po SDS elektroforéze	34
4.3.4 Nativní elektroforéza.....	34
4.3.5 Detekce aktivity NADP-ME v polyakrylamidovém gelu	35
4.3.6 Detekce aktivity NR v polyakrylamidovém gelu	35
4.3.7 Detekce aktivity NAD(P)-GDH v polyakrylamidovém gelu	35
4.4 STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN.....	35
5. VÝSLEDKY	37

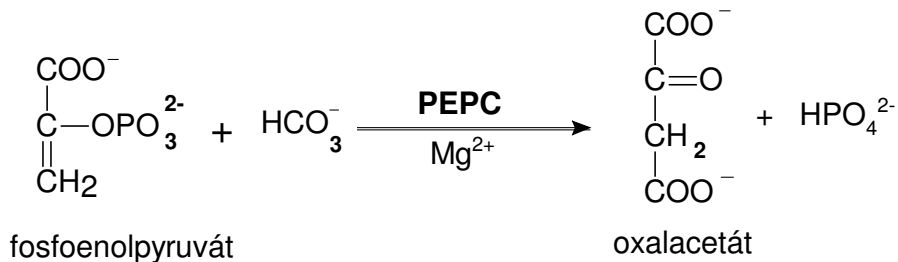
5.1 OPTIMALIZACE STANOVENÍ ENZYMOVÝCH AKTIVIT	37
5.1.1 Nitrátreduktasa.....	37
5.1.2 Glutaminsynthetasa.....	39
5.1.3 Glutamátsynthasa.....	39
5.2 POROVNÁNÍ AKTIVITY SLEDOVANÝCH ENZYMŮ V ROSTLINÁCH TABÁKU PĚSTOVANÝCH V KULTIVAČNÍM MÉDIU SE SACHAROSOU A BEZ SACHAROSY.....	40
5.2.1 Aktivita PEPC v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy	41
5.2.1.1 Aktivita PEPC v různých částech rostlin.....	41
5.2.1.2 Regulace PEPC v různých částech rostlin.....	42
5.2.2 Aktivita NADP-ME v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy.....	45
5.2.3 Aktivita PPDK v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy.....	47
5.2.4 Aktivita NR v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy	47
5.2.5 Aktivita NAD(P)-GDH v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy.....	49
5.2.6 Obsah bílkovin.....	52
5.2.7 Elektroforetická separace v prostředí SDS	52
5.3 VLIV DOSTUPNOSTI DUSÍKATÝCH LÁTEK A FOSFÁTU V KULTIVAČNÍM MÉDIU NA AKTIVITU SLEDOVANÝCH ENZYMŮ V ROSTLINÁCH TABÁKU.....	53
5.3.1 Aktivita PEPC v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů.....	55
5.3.1.1 Aktivita PEPC ve sledovaných rostlinách.....	55
5.3.1.2 Regulace PEPC v jednotlivých sledovaných skupinách	56
5.3.2 Aktivita NADP-ME v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů.....	58
5.3.3 Aktivita PPDK v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů.....	59
5.3.4 Aktivita NR v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů	60
5.3.5 Aktivita GS v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů	60
5.3.6 Aktivita GOGAT v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů.....	61
5.3.7 Aktivita NAD(P)-GDH v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů.....	62
5.3.8 Obsah bílkovin.....	64
5.3.9 Elektroforetická separace v prostředí SDS.....	65
6. DISKUSE	67
7. SOUHRN	70
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	71

1. ÚVOD

1.1 FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASA (PEPC, EC 4.1.1.31)

Systematický název je fosfát : oxalacetát karboxylasa (fosforylační).

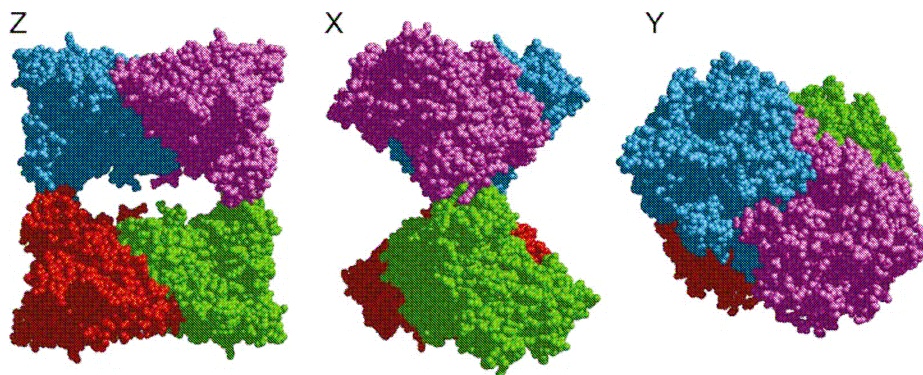
PEPC katalyzuje v přítomnosti HCO_3^- ireverzibilní karboxylaci fosfoenolpyruvátu (PEP) na oxalacetát a anorganický fosfát s využitím Mg^{2+} nebo Mn^{2+} iontů jako kofaktorů [1] :



1.1.1 Výskyt PEPC

PEPC je cytoplazmatický enzym přítomný ve vyšších rostlinách, řasách, sinicích, bakteriích a prvocích, avšak nepřítomný u živočichů, hub a kvasinek. [1]

Primární struktura PEPC byla poprvé odvozena v roce 1984 z genu *ppc E.coli*. [2] Molekula PEPC je obvykle složena ze čtyřech stejných podjednotek, obr.1. Velikost PEPC polypeptidu je ale rozmanitá a významně závisí na druhu organismu: přibližné množství aminokyselinových zbytků je 870 (100kDa), 970 (110 kDa), 1010 (116 kDa) a 1150 (134 kDa) PEPC z bakterií, cévnatých rostlin, sinic a prvoků. [2] [3]



Obr.1 : Prostorový model C4-PEPC kukuřice, ve kterém jsou čtyři identické podjednotky zbarveny modře, fialově, červeně a zeleně. Modely jsou otočeny o 90° kolem osy – X (horizontálně), Y (vertikálně) a Z (kolmo). [2]

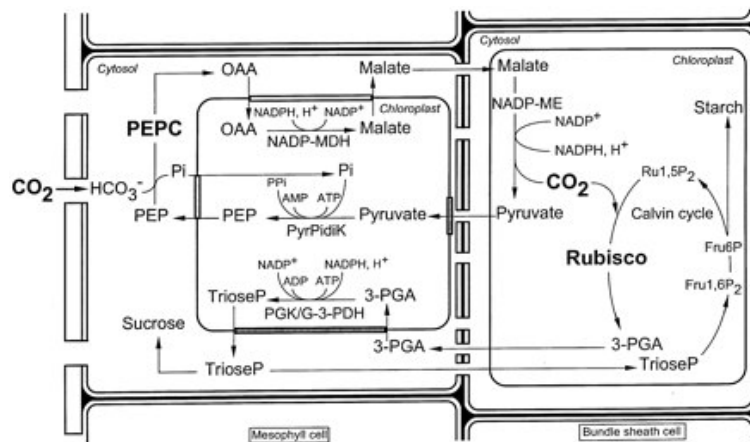
1.1.2 Funkce PEPC

PEPC má v rostlinách mnoho fyziologických funkcí, např. v C4 a CAM rostlinách ve fotosyntéze a v C3 rostlinách plní anaplerotické funkce.

1.1.2.1 Funkce PEPC v C4 a CAM rostlinách

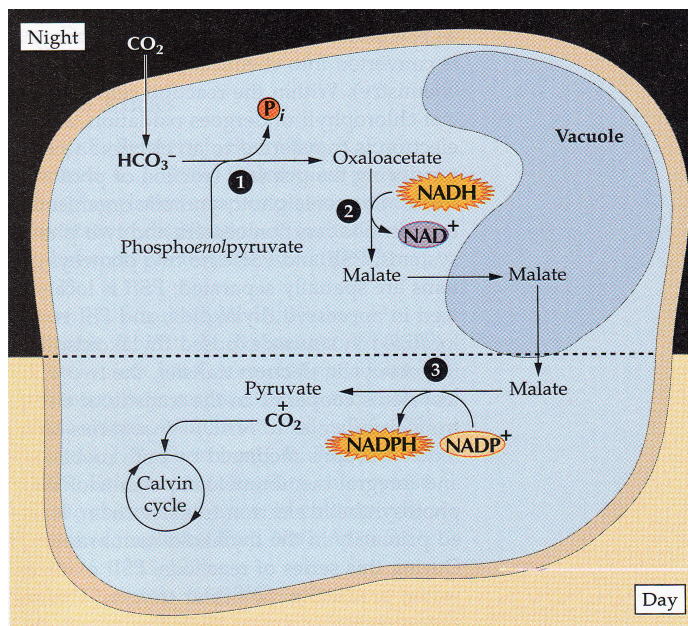
V C4 a CAM rostlinách je reakce katalyzovaná PEPC součástí fotosyntézy, kde PEPC katalyzuje primární fixaci atmosferického CO₂ v mezofylových buňkách a tedy i vznik čtyřuhlíkatého meziprojektu – oxalacetátu. [4] [5] [6] [7] [8]

Z oxalacetátu vzniká aspartát nebo malát, který přechází z mezofylových buněk do buněk pochvy cévního svazku, kde specifické enzymy jako NADP-dependentní malátdehydrogenasa (dekarboxylační), NAD-dependentní malátdehydrogenasa (dekarboxylační) a nebo fosfoenolpyruvátkarboxykinasa dekarboxylují čtyřuhlíkatý metabolit za vzniku CO₂. CO₂, který se hromadí v buňkách pochev cévních svazků, vstupuje do Calvinova cyklu, obr.2. [9] [10]



Obr.2 : Fixace CO₂ pomocí PEPC. [6]

V CAM rostlinách je funkce PEPC podobná jako v C4 rostlinách, i když k primární fixaci CO₂ dochází během noci a ve vakuolách hromadí malát (obr.3, str.11). Tento mechanismus minimalizuje ztráty vody v pouštních rostlinách, které otevírají průduchy pouze během noci. [11]



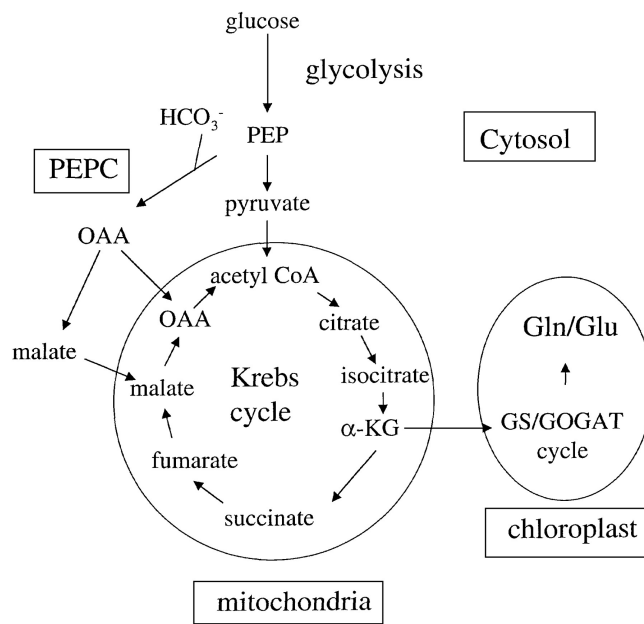
Obr.3 : Primární fixace a asimilace CO_2 v CAM rostlinách (1. PEPC, 2. NAD-dependenční malátdehydrogenasa a 3. NADP-dependenční malátdehydrogenasa (dekarboxylační)). [12]

1.1.2.2 Funkce PEPC v C3 rostlinách

Funkce PEPC v C3 rostlinách jsou velmi rozmanité a to především doplňování intermediátů do citrátového cyklu, tvorba NADPH, fixace respirovaného CO_2 , malátové kvašení, asimilace dusíku a biosyntéza aminokyselin, udržení stálého pH a udržení elektroneutality [2] [4] [5] [6] [11] [13]

Důležitou funkcí rostlinné PEPC je tedy anaplerotická funkce, což je doplňování intermediátů do citrátového cyklu. Hlavní úlohou PEPC je doplňování oxalacetátu, který může být redukován na malát nebo transaminován na aspartát a rostlina tak získá čtyřuhlíkatý skelet pro další metabolismus. [14]

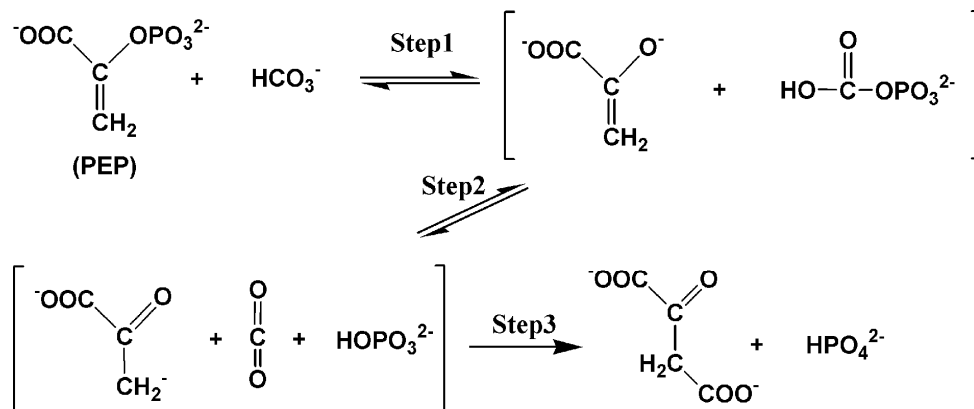
PEPC poskytuje intermediáty citrátového cyklu, když jsou vyčerpány a α -ketoglutarát je využitý pro syntézu aminokyselin v chloroplastech přes GS/GOGAT cyklus (obr.4, str.12). [6]



Obr.4 : Anaplerotická funkce PEPC – doplňování intermediátů do citrátového cyklu. [6]

1.1.3 Mechanismus reakce PEPC

Reakce katalyzovaná PEPC je exergonická a obvykle je striktně ireverzibilní. Skutečným substrátem však není CO_2 , ale hydrogenuhlíčitany ion. Z kinetické analýzy a rozboru je reakce rozdělena do několika kroků, tzv. tříkrokový reakční mechanismus, obr.5. V prvním kroku se tvoří částečně reverzibilní reakcí z fosfoenolpyruvátu a hydrogenuhlíčitany aniontu enolátový anion pyruvátu a karboxyfosfát. Ve druhém kroku se izomerací enolátového aniontu a štěpením karboxyfosfátu tvoří CO_2 a anorganický fosfát. V konečném kroku ireverzibilní karboxylací vzniká oxalacetát a anorganický fosfát. [2] [15]



Obr.5 : Tříkrokový mechanismus reakce katalyzované PEPC. [2]

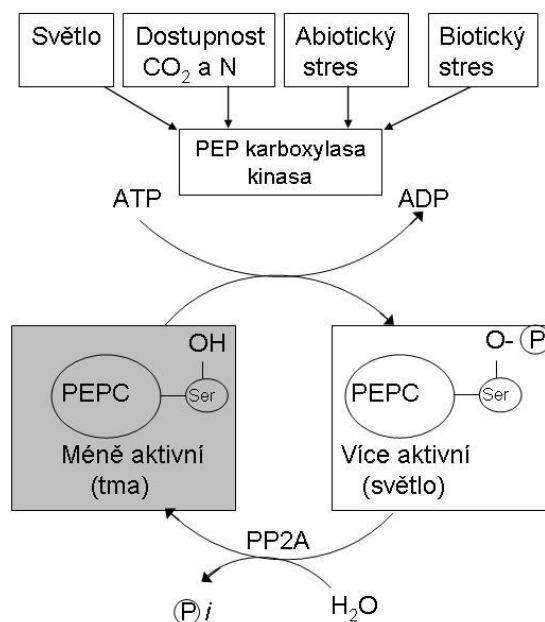
1.1.4 Regulace aktivity PEPC

Regulace aktivity PEPC je velmi složitý mechanismus, který zahrnuje regulaci mnoha enzymů, metabolitů a signalizačních drah. [2]

Aktivita PEPC ve vyšších rostlinách je regulovaná na mnoha úrovních:

- dostupností substrátů PEP a hydrogenuhličitanového anionu a kofaktoru iontů Mg^{2+}
- pH cytoplazmy
- působením efektorů – aktivátorů (glukosa-6-fosfát) a inhibitorů (L-malát)
- reverzibilní fosforylací serinového zbytku blízko N konce molekuly PEPC

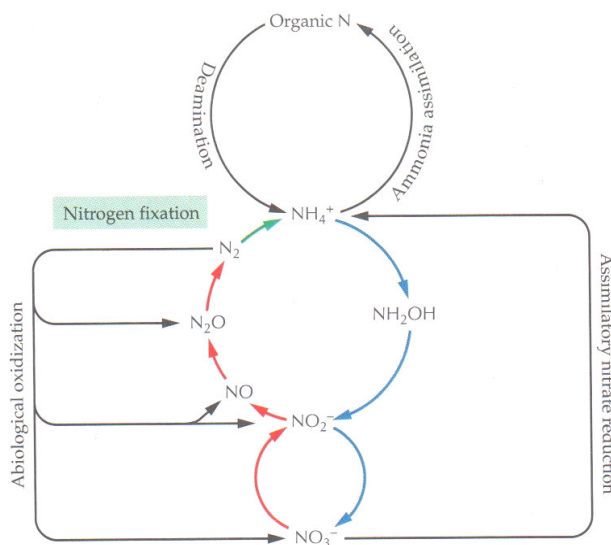
Tato fosforylace je katalyzována specifickou PEPC kinasou, obr.6. PEPC kinasa je nejmenší známou proteinkinasou o molekulové hmotnosti asi 30 kDa. [16] Při této fosforylací, která znamená zvýšení aktivity, se PEPC stane méně citlivá k vlivu inhibitoru malátu a více citlivá k aktivátoru glukosa-6-fosfátu. [17] [18] [19] Aktivitu PEPC a její fosforylací ovlivňuje také dostupnost dusíkatých látek a stresové podmínky, obr.6. [19]



Obr.6 : Regulační faktory fosforylace PEPC pomocí specifické PEPC kinasy. Defosforylací PEPC katalyzuje fosfatasa 2A (PP2A). [19]

1.1.4.1 Přítomnost dusíkatých látek

Dusík je pro rostliny důležitou živinou, proto je také hlavním faktorem ovlivňujícím produktivitu rostlin. Slouží k syntéze nukleotidů a aminokyselin, ze kterých poté rostlina tvoří nukleové kyseliny a proteiny, k syntéze fosfolipidů a k biosyntéze mnoha sekundárních metabolitů, které mají různé funkce např. v signalizaci a adaptaci rostlin. [20] Všeobecně organické sloučeniny dusíku plní v rostlinách řadu funkcí (stavební, metabolickou, transportní i zásobní). [21] Rostliny mohou dusík přijímat v podobě dusičnanu nebo amonných iontů, případně dalších dusíkatých látek. Zatímco dusičnanové ionty mohou být u některých rostlinných druhů skladovány ve vakuole, tudíž nejsou pro rostlinu toxické, amonné ionty ve vysoké koncentraci pro rostlinu toxické být mohou, a proto jsou rychle metabolizovány na organické dusíkaté sloučeniny. [20] [22] [24] Různé rostlinné druhy nebo kultivary odpovídají na přítomnost amonných iontů v půdě různě, např. jejich růst mohou inhibovat, stimulovat, případně neovlivňovat. [22] Koloběh dusíku v přírodě je na obrázku 7.



Obr.7 : Koloběh dusíku. Organické dusíkaté sloučeniny se do okolního prostředí dostávají v podobě produktů rozkladu živých organismů, případně jsou vylučovány některými živočichy. Mikroorganismy z těchto látek uvolňují dusík v podobě NH_4^+ iontů. Rostliny a mikroorganismy přijímají dusičnanové ionty, které redukují až na NH_4^+ ionty. Ty mohou být dále asimilovány do organických sloučenin obsahujících dusík. Mnoho biologických procesů, které mění oxidační stav dusíku jsou katalyzovány výhradně prokaryotickými organismy. Ty zahrnují nitrifikaci (ve které je NH_4^+ nebo dusitan oxidován a uvolněná energie je využita k fixaci anorganického uhlíku), denitrifikaci (ve které dusík slouží jako konečný elektronový akceptor a je redukován během anaerobní respirace) a fixaci dusíku (ve které je plynný N_2 redukován na NH_4^+). [12]

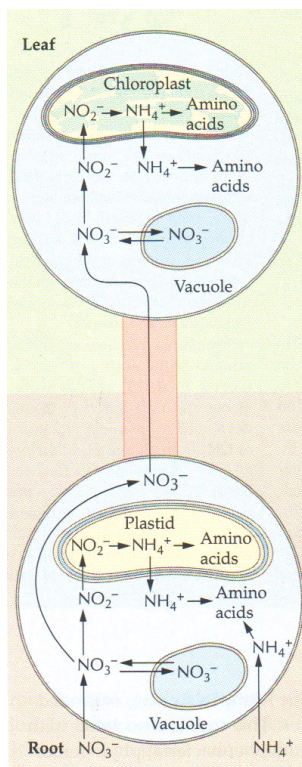
Při nedostatku dusíku jsou rostliny zakrslé a často mají zdřevnatělé stonky. U mnoha rostlin je prvním příznakem chlorosa a opad starších listů, kdy dochází k přesunu dusíku do mladších částí rostliny. [23]

V půdě, která není příliš kyselá nebo zaplavená vodou, je anorganický dusík přítomen převážně jako NO_3^- , protože NH_4^+ je snadno oxidován bakteriemi na dusičnanové ionty. Amonná forma může převládat v půdách s nízkým pH nebo v půdách s nízkým obsahem kyslíku. [24]

Dusičnanové aniony musí být redukovány na amonné ionty, protože dusík může být metabolicky využitý jen když je v redukované formě. [24]

Příjem dusičnanových iontů kořeny rostlin a jejich následná redukce a asimilace představují hlavní způsob, kterým je anorganický dusík přeměňován na organický.

Dusičnan je do buněk transportován aktivním transportním systémem a po vstupu do rostliny je NO_3^- redukován buď přímo v kořenech, nebo až v listech. [21] [25]



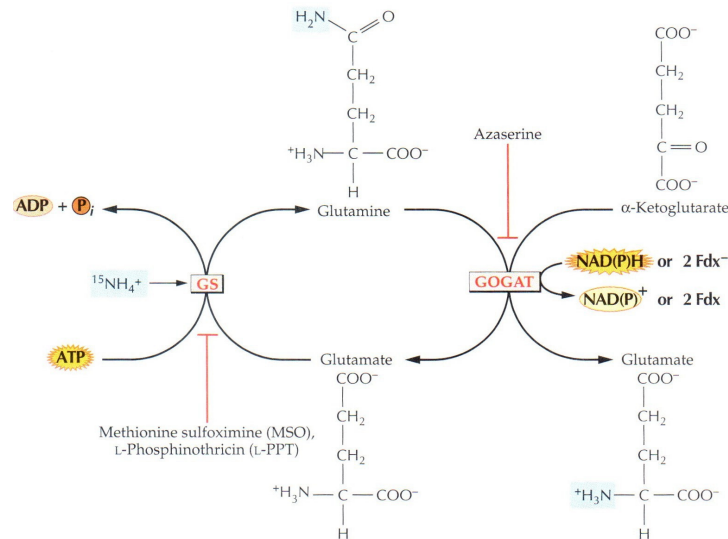
Obr.8 : Přehled příjmu dusíku v rostlinách. Kořeny mohou přijímat NO_3^- , NH_4^+ a další dusíkaté sloučeniny z půdy. Aby mohl být NO_3^- využitý k syntéze aminů a amidů, musí být redukován na NO_2^- a poté na NH_4^+ . Dusičnanového anion je redukován v cytosolu a uchovávan ve vakuolách. Tyto procesy se mohou vyskytovat jak v kořenech, tak i v listech. [12]

V kořenech i listech má redukce nitrátu dva stupně (obr.8, str.15).

V prvním se v cytosolu redukuje dusičnanový ion na dusitanový působením nitrátreduktasy (NR, EC 1.7.1.1).

V druhém je v chloroplastech (plastidech) dusitan redukován na NH_4^+ pomocí nitritreduktasy (NiR, EC 1.7.7.1), které dodává elektrony feredoxin. [23] [26]

Výsledný NH_4^+ je pak asimilován do organické formy jako L-glutamát a L-glutamin. [27] Zabudování amoniaku do aminokyselin probíhá pomocí enzymového systému glutaminsynthetasa, EC 6.3.1.2/ glutamátsynthasa, EC 1.4.1.14 (dále je GS/GOGAT), který katalyzuje sled reakcí na obrázku 9. [21] Pomocí GS/GOGAT vznikají 2 molekuly L-glutamátu. Ten může být dále přeměňován na kyselinu asparagovou, alanin, asparagin a další amidy a aminokyseliny. [28]



Obr.9 : Zabudování amoniaku do aminokyselin pomocí GS/GOGAT cyklu (glutamínsynthetasa, EC 6.3.1.2/ glutamátsynthasa, EC 1.4.1.14). [12]

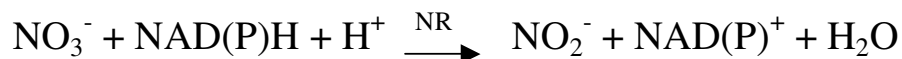
Při určitých fyziologických podmínkách mohou být NH_4^+ ionty vázány NADH-glutamátdehydrogenasa (NADH-GDH, 1.4.1.2) přímo za vzniku L-glutamátu, pomocí aminace 2-oxoglutarátu.

Cytosolová GS a GDH jsou indukované během stárnutí listů, zatímco chloroplastová GS a NR jsou v průběhu stárnutí potlačeny. [29]

1.1.4.1.1 Nitrátreduktasa

Systematický název: nitrit: NAD⁺ oxidoreduktasa

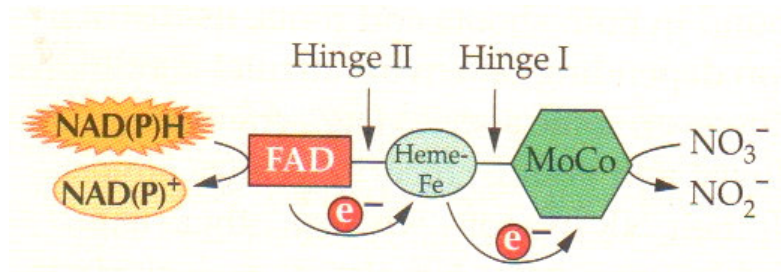
NR je cytosolový enzym katalyzující v rostlinách, houbách a řasách redukci dusičnanových iontů na dusitanové. [30] Většina forem rostlinné NR využívá jako reductant NADH, případně NADPH, který je reakcí v přeměňován na NAD(P)⁺; vodíkový proton je reakcí spotřebován. [12] [21]



Nitrátreduktasa má vazebná místa pro NAD(P)H a pro dusičnan. Obsahuje tři kofaktory – FAD, hem-Fe a molybdenový kofaktor, které tvoří redoxní centra pro přenos elektronů (obr.11, str.18). Jedná se o komplex methaloenzymu, který tvoří homodimeru (obr.10) a homotetrameru. [12]



Obr.10 : Struktura homodimeru NR. Každý monomer obsahuje 3 hlavní domény vázající molybdenový kofaktor, FAD a hem. Kofaktor FAD je znázorněn modře, hem fialově a molybdenový kofaktor černě. Rozhraní mezi dvěma monomery je žluté. [12]

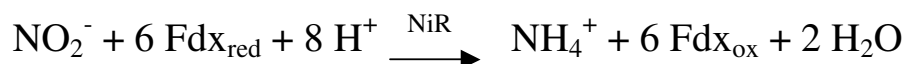


Obr.11: Kofaktory nitrátreduktasy – FAD, hem a molybdenový kofaktor (MoCo). FAD váže elektrony přijaté od NADP(H), ty jsou dále přeneseny pomocí hemu na MoCo, který tyto elektrony přenáší na dusičnan. V obrázku jsou rovněž znázorněna místa oddělující funkční domény (hinge I, II). [12]

1.1.4.1.2 Nitritreduktasa

Systematický název: ferredoxin:amonium oxidoreduktasa

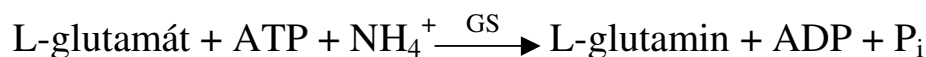
NiR je enzym, který katalyzuje šestielektronovou redukci dusitanu na amoniak pomocí redukovaného ferredoxinu jako zdroje elektronů. Ferredoxin-dependentní NiR byly izolovány a charakterizovány z několika vyšších rostlin, řas a sinic a bylo zjištěno, že se jedná o monomerní protein s relativní molekulou hmotností přibližně 63 000, který jako prostheticou skupinu obsahuje jednu skupinu Fe₄S₄ a jeden sirohlem, který slouží jako vazné místo pro dusitan.[31] Sirohem je Fe isobakteriochlorin, jako prostheticá skupina přítomný výhradně u sulfit- a nitritreduktas. [32]



1.1.4.1.3 Glutaminsythesa

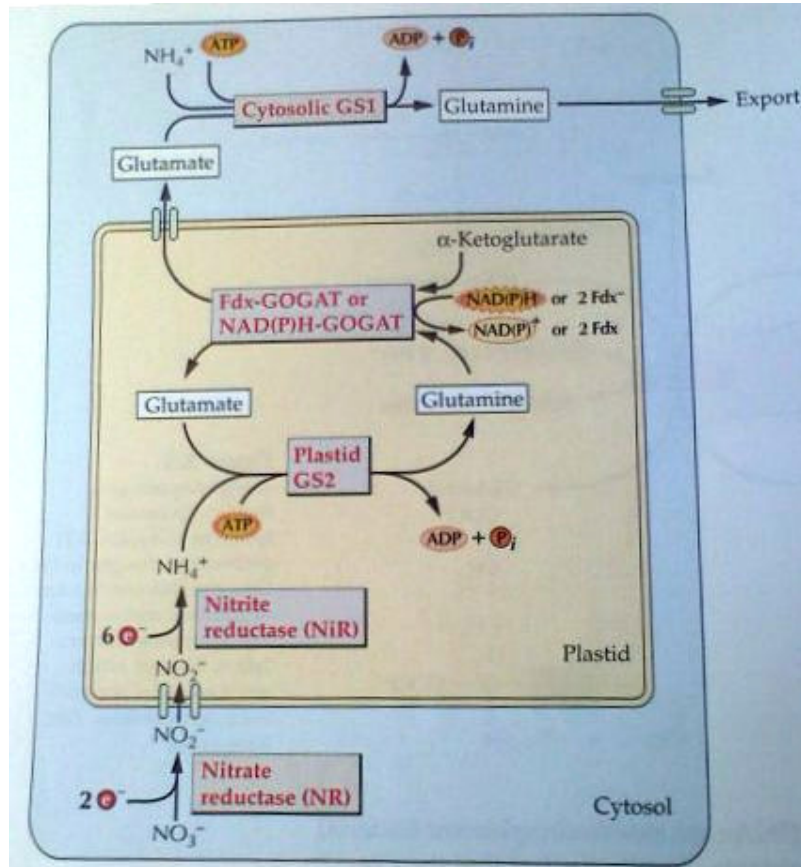
Systematický název: L-glutamát:amonium ligasa (ADP-tvořící)

GS je klíčový enzym asimilace dusíku, který katalyzuje syntézu glutaminu z L-glutamátu a amonných iontů. [33] [34]



V listech je GS lokalizovaná jak v cytoplazmě, tak v chloroplastech/plastidech a to ve většině vyšších rostlin (obr.12, str.19), kromě jehličnanů. [33] [35] [36] [37]

V kořenech byly nalezeny pouze cytosolové formy, ale u hrachu a vojtěšky byly identifikovány i plastidové formy. [38]



Obr.12 : Isoenzymy glutaminsynthetasy ve dvou formách a to jako GS1 (cytosolová) a GS2 (plastidová). [12]

1.1.4.1.4 Glutamátsynthasa

Systematický název: L-glutamát:NAD⁺ oxidoreduktasa (transaminační)

GOGAT katalyzuje reakci, při které glutamin přeměňuje na glutamát.



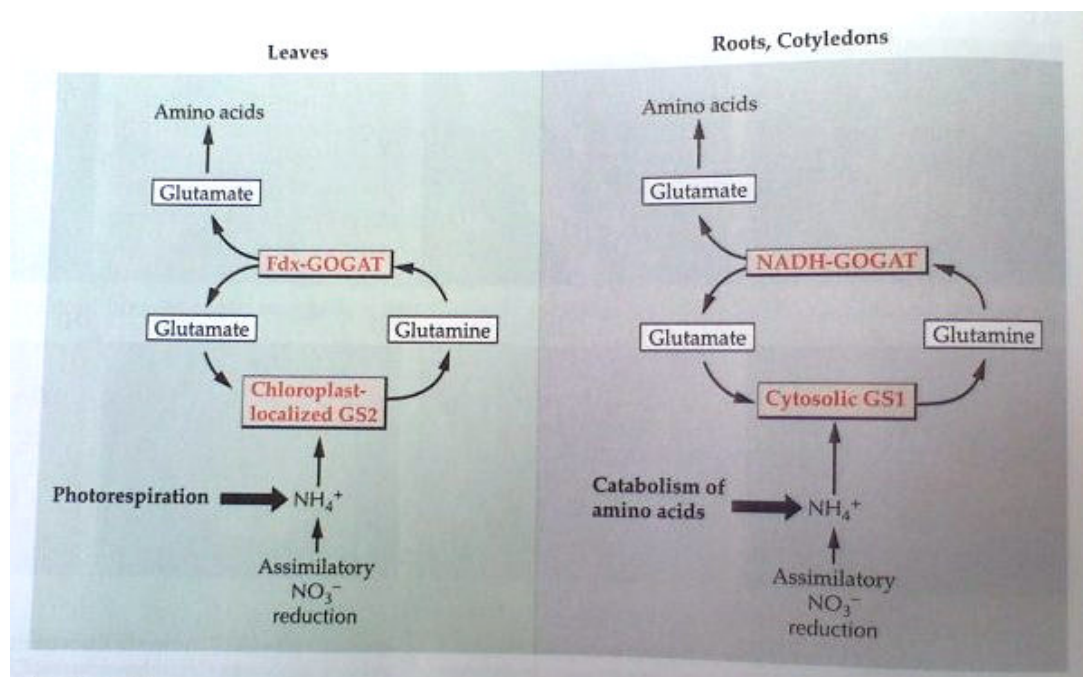
Tento enzym je v rostlinách přítomný ve 2 odlišných formách, jedna užívá redukovaný ferredoxin (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1) a druhá potřebuje jako donor elektronu pyridinový nukletid (NAD(P)H-GOGAT, EC 1.4.1.14) (obr.13, str.20). Obě izoformy se od sebe liší v molekulové hmotnosti, složení podjednotek, enzymové kinetice, redukční specifitě a metabolické funkci. [35] [39] [40]

Fd-GOGAT je přítomný v chloroplastu fotosyntetických pletiv, kde je schopný využít sluneční energii přímo jako zásobu reduktantů. [35] Je ale také přítomný v nefotosyntetických kořenech. Fd-GOGAT byl nalezený ve vyšších rostlinách, řasách a sinicích [39] Je to monomerní Fe-S protein s molekulovou hmotností okolo 150 kDa. [40]

NADH-GOGAT je enzym přítomný v plastidech a lokalizovaný převážně v nefotosyntetických buňkách. [35] Tento Fe-S flavoprotein existuje jako monomer s molekulovou hmotností přibližně 225-230 kDa. [40]

Přítomnost NADPH-GOGAT ve vyšších rostlinách dosud nebyla zjištěna. [35] [39]

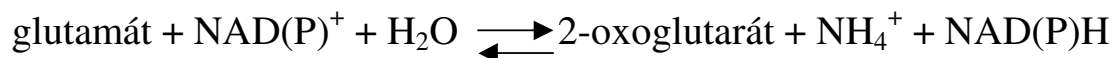
V bakteriích je tento Fe-S protein složený ze 4 dimerů s velkými a malými podjednotkami s molekulovou hmotností 135-175 kDa a 51-55 kDa. [39]



Obr.13 : NADH-GOGAT a Fdx-GOGAT mají různé fyziologické role v rostlinném metabolismu. [12]

1.1.4.1.5 Glutamátdehydrogenasa

GDH je mitochondriální enzym, který katalyzuje reverzibilní reakci, při které se redukuje aminací 2-oxoglutarát na glutamát. [41] GDH je lokalizovaná v mitochondriích a příležitostně v cytoplazmě. [35]



Její funkce zůstává zatím nejasná. [42]

Před rokem 1974 byla GDH považována za hlavní enzym při asimilaci amoniaku ve vyšších rostlinách, ale po tomto roce byla tato funkce přisouzena GS/GOGAT cyklu. [43] Její role je pravděpodobně důležitá za nefyziologických podmínek.

1.1.4.2 Přítomnost fosforu

Fosfor patří mezi základní prvky pro rostlinný růst a metabolismus. Molekulární mechanismy regulující příjem a využití fosfátu rostlinami jsou zatím známy jen velmi málo. U mnoha druhů rostlin způsobuje deficit fosfátu několikanásobné zvýšení rychlosti transportu fosfátu do buňky, čemuž předchází indukce přenašeče s vysokou afinitou k fosfátu. Rostliny reagují na nedostatek fosforu specifickými mechanismy, které zvyšují dostupnost fosfátu i rychlost jeho příjmu. Některé z těchto mechanismů mohou být důsledkem aktivace specifických genů nebo díky metabolické regulaci. [44]

Metabolickou adaptací na nedostatek fosfátu je syntéza organických kyselin, které mohou být sekretovány kořeny a okyselovat okolí rostliny. Při tomto procesu má důležitou roli PEPC.

Zajímavý je účinek fosforu na PEPC, protože P_i je konečným produktem reakce katalyzované PEPC. [45] Zvýšená aktivita díky deficitu fosfátu byla nalezena v mnoha rostlinných druzích, např. v *Lupinus albus* L. [46]

1.1.4.3 Přítomnost železa

Železo je nezbytné pro syntézu chlorofylu a tvoří součást hemových skupin cytochromů. Rostlinami je nejčastěji přijímáno ve formě komplexů. Bakterie, houby a některé skupiny rostlin při deficitu železa vylučují do půdy látky, které tvoří komplexy s Fe^{3+} . Listy rostlin se silným deficitem železa vykazují snížený obsah chlorofylu, který koreluje se sníženým obsahem enzymu Rubisco. [44]

Železo může být chelátováno molekulami vylučovanými z kořenů rostlin nebo redukováno Fe(III)chelát reduktasou v kyselém prostředí, to nastává u H^+ -ATPasy nebo organických kyselin. Zvýšená syntéza organických kyselin často koreluje se zvýšenou aktivitou PEPC. [47] [48]

1.1.4.4 Stres rostlin

Stres rostlin je stav pod vlivem stresových faktorů, kdy stresové faktory neboli stresory působí na rostlinu nepříznivými vnějšími vlivy. Protože rostliny žijí přisedlým způsobem života, nemohou se vyhnout nepříznivému působení negativních vlivů a tedy i fyziologie stresu je u rostlin komplikovanější než u živočichů. Proto se u rostlin vyvinuly specifické způsoby odolnosti proti stresovým faktorům a proti stresu. [24] [44]

Stresové faktory jsou biotické nebo abiotické. Mezi abiotické stresové faktory patří například extrémní teploty, nedostatek vody a kyslíku, nadbytek iontů solí a snížení pH v půdě, toxické kovy a organické látky v půdě a toxické plyny ve vzduchu. Mezi biotické stresory patří herbivorní živočichové (spásání), patogenní mikroorganismy (viry, bakterie, houby) a vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitismus).

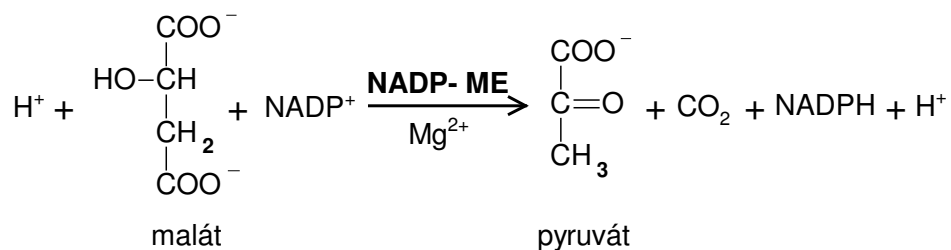
Vliv stresorů na aktivitu PEPC byl studován v různých rostlinných druzích. Expres PEPC se zvyšuje například suchem, chladem a přítomností vyšší koncentrace NaCl a LiCl. Naopak hypoxie nepodporuje jakoukoliv indukci exprese PEPC. [49]

V naší laboratoři byl sledován vliv virové infekce PVY^{NTN} (Y virus bramboru, kmen NTN) a PVA (A virus bramboru) rostlin *Nicotiana tabacum* L. na aktivitu PEPC. Virus PVY^{NTN} způsobil výraznější zvýšení než mírnější PVA virus. [50] [51] [52]

1.2 NADP-MALÁTDEHYDROGENASA (NADP-ME, EC 1.1.1.40)

Systematický název je L-malát : NADP⁺ oxidoreduktasa dekarboxylační

V přítomnosti koenzymu NADP⁺ a kofaktorů Mg²⁺ nebo Mn²⁺ katalyzuje dekarboxylaci L-malátu za vzniku pyruvátu, CO₂ a NADPH [53]:



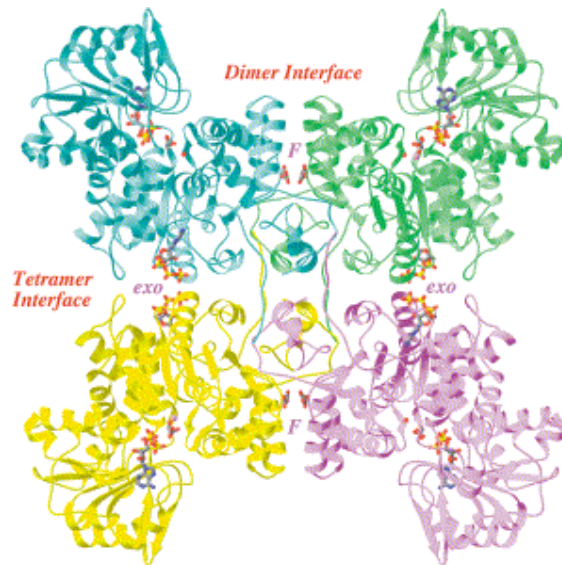
NADP-ME je velmi rozšířený enzym, který byl nalezený jak v prokaryotických a eukaryotických organismech, tak v živočišných tkáních a rostlinných pletivech. [53] Funkce jednotlivých isoform se liší. Zatímco u živočichů zejména souvisí s produkcí

NADPH a biosyntézou mastných kyselin v játrech a tukové tkáni, v listech C₄ a CAM rostlin má NADP-ME klíčovou roli ve fotosyntéze, viz. kapitola 1.1.2.1 obrázek 2 a 3. Mezi funkce nefotosyntetické isoformy NADP-ME patří udržování intracelulárního pH, poskytování NADPH a pyruvátu pro biosyntetické procesy. V poslední době je nefotosyntetický NADP-ME rovněž studován v souvislosti s obrannými odpověďmi rostlin.

V rostlinách je NADP-ME kódován malými genovými rodinami. V modelových C₃ rostlinách se známým genomem (*Arabidopsis thaliana* a *Oryza sativa* L.) byly nalezeny geny pro 3 cytosolové a jednu plastidovou isoformu. [54] [55] V rostlinách tabáku pak byly charakterizovány dvě rekombinantní isoformy NADP-ME, cytosolová a chloroplastová a další, pravděpodobně plastidová isoforma. Exprese genů je vývojově a orgánově specifická, podobně jako se liší jejich regulace a transkripce v odpovědi na stresové podněty. [54] [55] [56] [57]

Regulace nefotosyntetických isoform je způsobena převážně makroergickými sloučeninami, acetyl-CoA, intermediáty citrátového cyklu, atd. U fotosyntetických isoform NADP-ME dochází k regulaci inhibicí nadbytkem substrátu L-malátu, přítomností aktivátorů a inhibitorů (sukcinát, α -oxoglutarát, oxaloacetát a fruktosa-1,6-bisfosfát) a dále může být NADP-ME regulován pH.

Nejvíce aktivní forma NADP-ME je tetramer (obr.14, str.24), kde je velikost monomeru 62-68 kDa a velikost tetrameru 220-280 kDa. [53]



Obr.14 : Struktura tetrameru lidského NADP-ME. Monomery jsou barevně rozlišeny – modrozelená, zelená, žlutá a purpurová. [58]

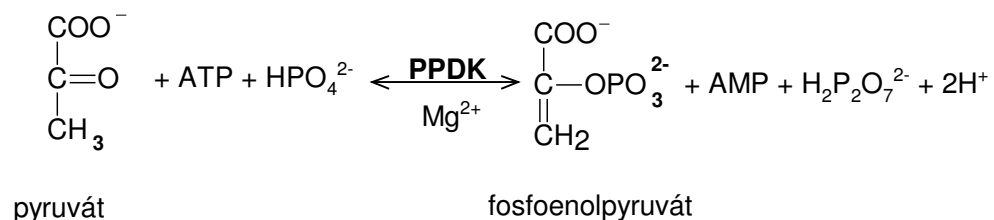
Fotosyntetické isoformy NADP-ME jsou zapojeny do metabolismu v chloroplastech (C₄ rostliny) nebo cytosolu (CAM rostliny), zatímco plastidové nefotosyntetické isoformy hrají roli v rostlinných obranných odpovědích a biosyntéze lipidů. [59] [19]

U nefotosyntetických isoform je regulace NADP-ME zatím prostudována méně. [19]

1.3 PYRUVÁT, FOSFÁTDIKINASA (PPDK, EC 2.7.9.1)

Systematický název je ATP : pyruvát, fosfát fosfotransferasa.

PPDK katalyzuje reverzibilní přeměnu pyruvátu, ATP a Pi na fosfoenolpyruvát (PEP), AMP a PPi [60]:

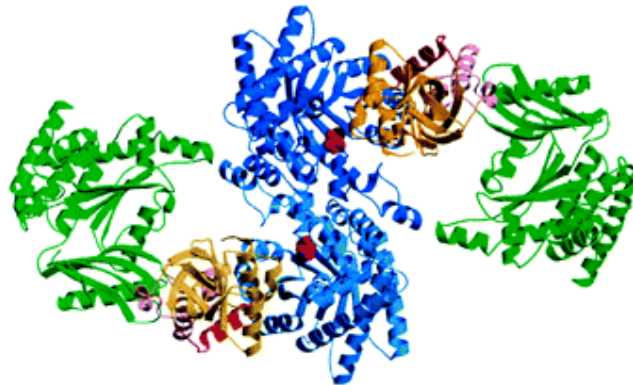


PPDK je enzym, který byl nalezen v mnoha organismech, v bakteriích, prvocích i rostlinách, avšak nevyskytuje se u živočichů. V listech C₄ a CAM rostlin, kde se PPDK

vyskytuje ve větším množství, je tento enzym zodpovědný za regeneraci PEP - primárního akceptoru CO₂. [61] PPDK je také přítomna v C₃ rostlinách, kde ale její funkce nebyla úplně objasněna, pravděpodobně z důvodu nízkého zastoupení ve většině orgánů C₃ rostlin. [62] [63] Patrně nejvyšší obsah PPDK v C₃ rostlinách mají semena a střední žilky. V semenech se PPDK účastní biosyntézy škrobu a ovlivňuje vzájemné přeměny aminokyselin, v žilkách se předpokládá, že poskytuje PEP pro šikimátovou cestu biosyntézy ligninu. [64] Jak v C₃, tak v C₄ rostlinách se PPDK vyskytuje jak v cytoplasmě, tak v chloroplastech. [65] Překvapivě jsou obě tyto isoformy kódovány pouze jedním genem. [64] [66]

Vzhledem k tomu, že PPDK ovlivňuje rychlost celého C₄ cyklu, je aktivita tohoto enzymu posttranslačně regulována reversibilní tmou indukovanou fosforylací threonylového zbytku v aktivním místě PPDK pomocí tzv. regulačního proteinu PPDK (RP). Tento regulační protein katalyzuje jak inaktivaci PPDK fosforylací, tak aktivaci defosforylací. [62] [63] RP je také přítomný v C₃ rostlinách, kde má podobným způsobem v závislosti na světle reguluje chloroplastovou isoformu PPDK. [67]

Aktivní PPDK je tetramer, složený ze 4 identických podjednotek o velikosti 94-97 k Da, obr.15. [61] [62] [67]



Obr.15 : Struktura tetrameru PPDK z kukuřice získaná rentgeno-strukturní analýzou. [68]

2. CÍL PRÁCE

1. Zjistit vliv složek kultivačního média na aktivitu a stupeň fosforylace PEPC v rostlinách tabáku a to v závislosti na:

- a) zdroji uhlíku
- b) na přítomnosti dusíkatých látek (KNO_3 , NH_4NO_3)
- c) na přítomnosti fosfátu (KH_2PO_4)

2. V uvedeném experimentálním modelu zjistit aktivitu metabolicky souvisejících enzymů – NADP-malátdehydrogenasy dekarboxylační (NADP-ME) a pyruvát, fosfátdikinasu (PPDK).

3. Ve sledovaných rostlinách zjistit aktivitu enzymů, které se podílejí na asimilaci dusíku – nitrátreduktasa (NR), nitritreduktasa (NiR), glutaminsynthetasa (GS), glutamátsynthasa (GOGAT), glutamátdehydrogenasa (GDH)

3. MATERIÁL

3.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL

Rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1 pěstované „in vitro“ v Murashige-Skoogově agaru v kultivačních boxech – laskavě poskytnuté RNDr. Helenou Synkovou, CSc. Ústav experimentální botaniky AV ČR (ÚEB AV ČR)

3.2 CHEMIKÁLIE

Akrylamid, Sigma, USA

Alkalická fosfatasa z hovězí intestinální mukosy (P6774), Sigma, USA

ATP, Sigma, USA

BSA, sérový albumin

Bradfordovo činidlo, Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R 250, G 250, Sigma, USA

DTT, Sigma, USA

Fosfoenolpyruvát sodný, Sigma, USA

L-malát sodný, Sigma, USA

NADH, Sigma, USA

NADPH, Sigma, USA

NAD⁺, Sigma, USA

Nitroblue tetrazolium chlorid, Sigma, USA

Oxaloacetát sodný, Sigma, USA

Phenazin methosulfát, Sigma, USA

Pyruvát sodný, Sigma, USA

PVP, Sigma, USA

SDS, Serva, Německo

TEMED, Serva, Německo

Tris (hydroxymethyl) aminomethan, Serva, Německo

Ostatní chemikálie, Lachema, ČR

3.3 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE

Analytické váhy 100 A, Denver Instrument Company, USA

Centrifuga, Hettich Universal 32 R, Německo

Elektroforetická souprava, Biometra, Německo

Mísíč gradientu, Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie

pH metr, Denver instrument Company, USA

Spektrofotometr Helios α , Thermo Spectronic, USA

Spektrofotometr Ultrospec 2 100, Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie

4. METODY

4.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ Z ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

4.1.1 Pěstování rostlin tabáku

Semena rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 byly vysazeny do sterilních Petriho misek obsahujících agar s Murashige-Skoogovým médiem s 2 % sacharosou. Po třech týdnech byly sazenice tabáku přemístěny do kultivačních nádob (Magenta GA-7, Diesenhofen, Německo) opatřených filtrem o průměru 10 mm a velikosti pórů 0,22 μm (obr.16, str.29), takže měly k dispozici limitované množství oxidu uhličitého. V další skupině byly rostliny pěstovány v kultivačních nádobách s přístupem CO_2 . Kultivačním médiem byl Murashige-Skoogův agar s přítomností či nepřítomností dodatečného zdroje uhlíku (2 % sacharosy) a modifikovaným množstvím zdroje dusíku a fosfátu. Zatímco kontrolní rostliny obsahovaly v Murashige-Skoogovu agaru koncentraci 18,7 mM KNO_3 ; 20,6 mM NH_4NO_3 ; 1,25 mM KH_2PO_4 , rostliny stresované nedostatkem dusíkatých látek obsahovaly 0,94 mM KNO_3 ; 1,03 mM NH_4NO_3 ; 1,25 mM KH_2PO_4 a pro kompenzaci K^+ iontů 2,99 mM KCl . Rostliny stresované nedostatkem fosfátu 18,7 mM KNO_3 ; 20,6 mM NH_4NO_3 ; 0,125 mM KH_2PO_4 a pro kompenzaci K^+ iontů 2,99 mM KCl . Rostliny byly pěstovány podle postupu Semorádová et al. [69], a to v kultivačních boxech při fotoperiodickém režimu a teplotě 16 hodin světlo 25°C (osvětlení 100-120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$),

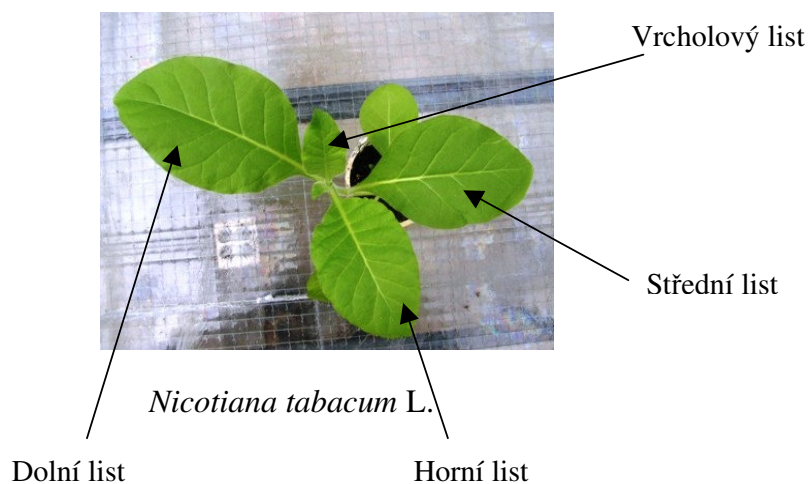
8 hodin tma 20°C. Relativní vlhkost uvnitř uzavřených kultivačních nádob byla více jak 90%; koncentrace CO₂ v kultivační místnosti 350 μmol (CO₂) . mol⁻¹ (vzduchu).



Obr.16 : Kultivační nádoba s rostlinou *Nicotiana tabacum* L., cv.Petit Havana pěstovanou v Murashige-Skoogovu agaru.

4.1.2 Odběr vzorků

Ze sterilních kultivačních nádob byly odebrány vzorky z různých částí rostlin. V případě že se rostliny vyvíjely dobře, byly listy odebrány zvlášť podle velikosti a umístění na stonku jako vrcholové, horní, střední a dolní listy (obr.17), avšak v případě, že rostliny byly zakrslé s nízkým stonkem, s listy podobně velkými, nebyly rozlišovány na další podskupiny. Současně byly u rostlin odebrány kořeny. Po odebrání a zvážení byly vzorky ihned zmrazeny v tekutém dusíku a poté uchovány v mrazícím boxu při - 80 °C.



Obr.17 :Vzorový obrázek jednotlivých pater rostliny tabáku.

4.1.3 Příprava rostlinného extraktu

Vzorek jsem homogenizovala ve třecí misce s trojnásobkem extrakčního pufru, který obsahoval 100 mM Tris HCl (pH = 7,8), 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 20 % (w/v) glycerolu. K 1 ml homogenizovaného vzorku jsem přidala 0,02 g PVP a nechala centrifugovat 15 minut při 16 600 x g a 4°C. [52] Ke stanovení aktivity enzymů jsem používala supernatant.

4.2 STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ

4.2.1 Stanovení aktivity PEPC

Aktivitu PEPC jsem měřila spektrofotometricky při 340 nm po dobu 5 minut v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 M Tris-HCl pH 8,1; 5 mM NaHCO₃; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADH; 2 mM PEP. Reakci jsem startovala 20 µl vzorku. [52]

Další stanovení enzymové aktivity PEPC jsem měřila při subsaturační koncentraci PEP (0,2 mmol/l) a pH 8,1 a také případně při nižším, fyziologickém pH 7.3. Také jsem sledovala vliv 5 mmol/l aktivátoru glukosa-6-fosfátu a 10 mmol/l inhibitoru L-malátu na aktivitu PEPC.

Dále jsem sledovala vliv alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC při pH 7,1. K extraktu jsem přidala inhibitory proteas a 150 U alkalické fosfatasy na 1 ml rostlinného extraktu a poté nechala 1 hodinu inkubovat při 21°C. Ke kontrolnímu vzorku jsem místo alkalické fosfatasy přidala stejný objem destilované vody. Poté jsem stanovovala aktivitu PEPC výše zmíněnou metodou, pouze použitý pufr byl 100 M Tris-HCl pH 8,1.

4.2.2 Stanovení aktivity NADP-ME

Aktivitu NADP-ME jsem měřila spektrofotometricky při 340 nm po dobu 5 minut v 1 ml reakční směsi. Reakční směs obsahovala 100 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM malát; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP. Reakci jsem startovala 50 µl rostlinného extraktu. [52]

4.2.3 Stanovení aktivity PPDK

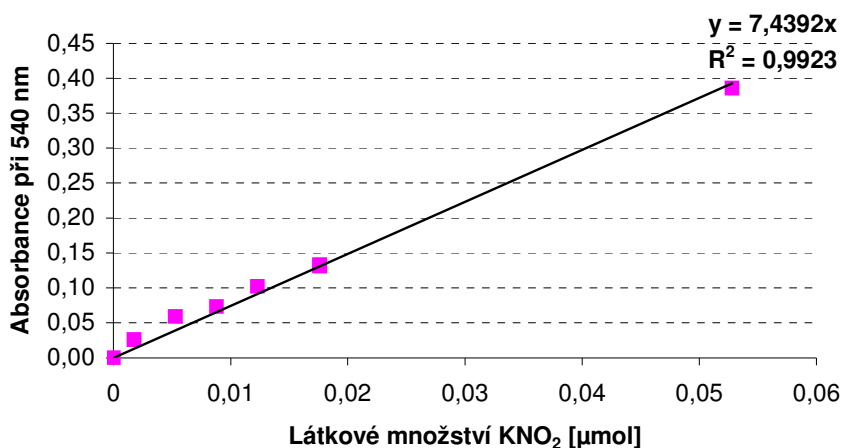
Aktivitu PPDK jsem měřila spektrofotometricky při 340 nm po dobu 5 minut v 1 ml reakční směsi. Reakční směs obsahovala 100 M Tris-HCl pH 8,1; 10 mM MgCl₂;

5 mM NaHCO₃; 2 mM pyruvát; 1 mM ATP; 2 mM K₂HPO₄; 0,2 mM NADH. Reakci jsem startovala 50 µl rostlinného extraktu. [52]

4.2.4 Stanovení aktivity NR

Aktivitu NR jsem měřila modifikovanou metodou podle Debouba et al. [70] a Manchenko [71] v 1 ml reakční směsi obsahující 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,4; 10 mM EDTA; 0,15 mM NADH; 0,1 M KNO₃ a 100 µl rostlinného extraktu. Reakci jsem nechala probíhat 30 minut a současně jsem připravila referentní vzorek obsahující pouze 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,4; 10 mM EDTA a 100 µl rostlinného extraktu. Po 30-ti minutách byla reakce zastavena 100 µl 5,8 mM sulfanilamidu a 100 µl 0,8 mM NNEDD. Reakcí vznikajících dusitanových iontů se sulfanilamidem se tvoří diazoniový ion, který po reakci se sloučeninou NNEDD poskytuje růžovo-fialové azobarvivo, jehož intenzitu jsem měřila při 540 nm proti slepému pokusu.

Pro výpočet aktivity nitrátoreduktasy jsem použila kalibrační přímku, obr.18.



Obr.18 : Kalibrační přímka závislosti absorbance azobarviva, které vzniká reakcí dusičnanu, sulfanilamidu a NNEDD, při 540 nm na látkovém množství KNO₂.

4.2.5 Stanovení aktivity GS

Aktivitu GS jsem měřila spektrofotometricky modifikovanou metodou podle Manchenko [71] při 340 nm proti slepému pokusu v 1 ml reakční směsi po dobu 5 minut. Reakční směs v 1 ml obsahovala 100 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 10 mM L-glutamát; 2,5 mM ATP; 10 mM NH₄Cl; 0,3 mM NADH; 1 mM PEP a 6,6 U PK a 13,5 U LDH. Reakcí katalyzovanou GS vzniká ADP, který potom spřaženou reakcí s PK

poskytuje pyruvát, jenž je substrátem pro LDH, NADH-dependentní enzym. Vznikající NAD^+ stanovované spektrofotometricky při 340 nm odpovídá aktivitě GS. Současně jsem zpracovávala slepý vzorek, o jehož případnou aktivitu byl výsledek redukován. Slepý vzorek obsahoval 100 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,3 mM NADH. Reakci jsem startovala 100 μl rostlinného extraktu.

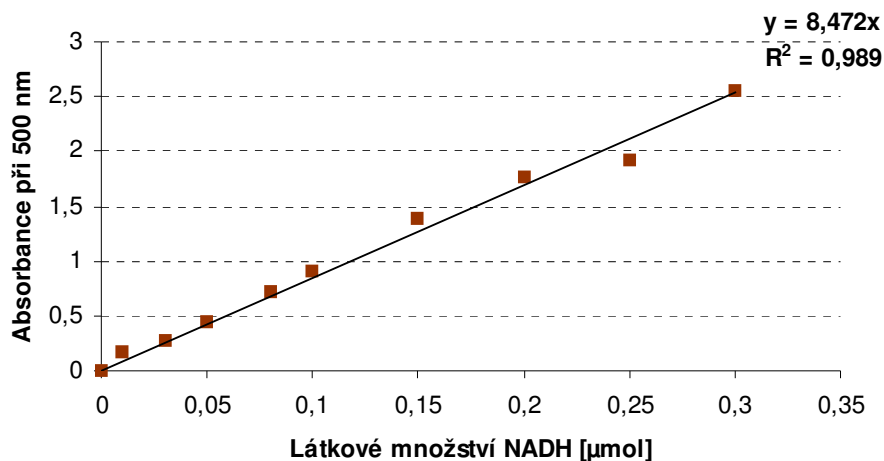
4.2.6 Stanovení aktivity NADH-GOGAT

Aktivitu GOGAT jsem měřila spektrofotometricky sledováním vznikajícího NAD^+ pomocí změny absorbance při 340 nm po dobu 5 minut v 1 ml reakční směsi. Reakční směs obsahovala 100 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM α -ketoglutarát; 5 mM L-glutamin; 0,3 mM NADH. Referentní vzorek, o jehož případnou aktivitu byl výsledek redukován, obsahoval 100 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM α -ketoglutarát; 0,3 mM NADH. Reakci jsem startovala 100 μl rostlinného extraktu.

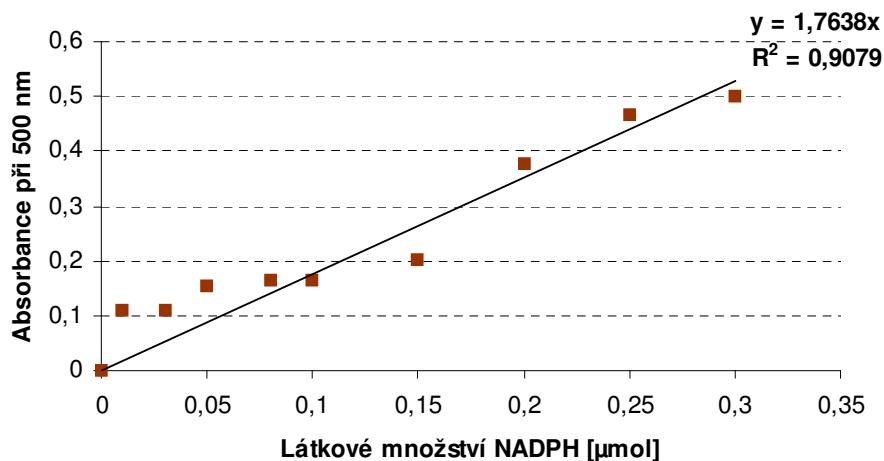
4.2.7 Stanovení aktivity $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ GDH

Aktivitu $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ GDH jsem měřila spektrofotometricky sledováním nárůstu absorbance při 500 nm proti slepému pokusu v 1 ml reakční směsi. Reakční směs obsahovala 100 mM Tris-HCl pH 7,1; 10 mM L-glutamát; 0,2 mM $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$. K této směsi jsem přidala 200 μl barvy (směs 5 mg/ml jodonitrotetrazoliové violeti s 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ N-methylfenazonium methylsulfátem) a reakci startovala přidáním 100 μl rostlinného extraktu. Vznikající NAD(P)H poskytuje se směsí jodonitrotetrazoliové violeti s N-methylfenazonium methylsulfátem červené zbarvení s absorpčním maximem odpovídajícím 500 nm. Reakci jsem zastavila přidáním 0,1 M HCl po 20-ti minutách. Referentní vzorek obsahoval 100 mM Tris-HCl pH 7,1; 0,2 mM $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ a 100 μl rostlinného extraktu.

Pro výpočet aktivity NAD^+ a NADP^+ GDH jsem použila kalibrační přímky, obr.19 a 20 (str.33).



Obr.19 : Kalibrační přímka závislosti absorbance formazanu vzniklého z NADH, PMS a oxidované formy tetrazoliové soli při 500 nm na látkovém množství NADH.



Obr.20 : Kalibrační přímka závislosti absorbance formazanu vzniklého z NADPH, PMS a oxidované formy tetrazoliové soli při 500 nm na látkovém množství NADPH.

4.3 ELEKTROFORETICKÉ METODY

4.3.1 Příprava vzorků pro elektroforetické separace

Pro SDS elektroforézu se použily rostlinné extrakty připravené podle 4.1.3. K těmto extraktům jsem přidala vzorkový pufr v poměru 1:1. Vzorkový pufr obsahoval 0,13 M Tris-HCl pufr pH 6,8; 100 mM DTT; 70 mM SDS; 20 % glycerol; 0,005 % bromfenolovou modř. Takto připravenou směs jsem vařila 5 minut na vodní lázni při 100°C. Pro nativní elektroforézu jsem opět použila extrakty připravené podle 4.1.3 v 20 % (w/v) sacharose.

4.3.2 Elektroforéza v prostředí SDS

SDS elektroforézu jsem provedla podle Laemmliho. [72] Pro gelovou elektroforézu v SDS prostředí jsem použila gradientový polyakrylamidový gel, 10 %- 15 % gel separační a 5 % zaostřovací gel. Gradient byl vytvořen pomocí mísiče gradientu Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie.

10 % separační gel obsahoval 1,7 ml 30% akrylamidu; 1,3 ml 1,5M Tris-HCl pufru pH 8,8; 0,05 ml 10% SDS; 0,05 ml 10% peroxodisíranu amonného; 0,002 ml TEMED a 1,9 ml destilované vody.

15 % separační gel obsahoval 2,5 ml 30% akrylamidu; 1,3 ml 1,5M Tris-HCl pufru pH 8,8; 0,05 ml 10% SDS; 0,05 ml 10% peroxodisíranu amonného; 0,002 ml TEMED a 1,1 ml destilované vody.

Zaostřovací gel byl připraven z 0,33 ml 30% akrylamidu; 0,25 ml 1M Tris-HCl pufru pH 6,8; 0,02 ml 10% SDS; 0,02 ml 10% peroxodisíranu amonného; 0,004 ml TEMED a 1,4 ml destilované vody.

Elektrodový pufr obsahoval 18,8 g glycinu, 3 g Tris a 1 g SDS v 1000 ml destilované vody. Počáteční napětí bylo 70 V a po dosažení rozhraní mezi gely 140 V.

4.3.3 Detekce proteinů po SDS elektroforéze

Gel po SDS elektroforéze jsem vložila do barvicí lázně, která obsahovala 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250, 425 ml ethanolu, 50 ml methanolu, 100 ml kys.octové a 425 ml destilované vody.

Poté jsem gel vložila do odbarvovací lázně, která obsahovala kys.octovou, ethanol a destilovanou vodu v poměru 2:5:13.

4.3.4 Nativní elektroforéza

Nativní elektroforézu jsem provedla podle Lee a Lee. [73] Pro nativní elektroforézu jsem použila gradientový polyakrylamidový gel, 6 % a 12 % gel jako separační a 3 % zaostřovací gel.

6 % separační gel obsahoval 1 ml 30% akrylamidu; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru pH 8,8; 0,05 ml 10% glycerolu; 0,05 ml 10% peroxodisíranu amonného; 0,004 ml TEMED a 2,6 ml destilované vody.

12 % separační gel byl připraven z 2 ml 30% akrylamidu; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru pH 8,8; 0,05 ml 10% glycerolu; 0,05 ml 10% peroxodisíranu amonného; 0,002 ml TEMED a 1,6 ml destilované vody.

Zaostřovací gel obsahoval 0,2 ml 30% akrylamidu; 0,25 ml 1M Tris-HCl pufru pH 6,8; 0,02 ml 10% glycerolu; 0,02 ml 10% peroxodisíranu amonného; 0,004 ml TEMED a 1,5 ml destilované vody.

Elektrodový pufr obsahoval 18,8 g glycinu a 3 g Tris a 10 ml 10 % glycerolu v 1000 ml destilované vody. Počáteční napětí bylo 70 V a po dosažení rozhraní mezi gely 140 V.

4.3.5 Detekce aktivity NADP-ME v polyakrylamidovém gelu

Gel po nativní elektroforéze jsem vložila do reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM L-malát, 10 mM MgCl₂, 2 mM NADP a barvu (0,1 mg/ml nitroblue tetrazolium a 5 µg/ml phenazin methosulfate). [74]

4.3.6 Detekce aktivity NR v polyakrylamidovém gelu

Gel po nativní elektroforéze jsem vložila do 10 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 10 mM EDTA, 7,5 mM NADH a 40 mM KNO₃. Gel jsem nechala v reakční směsi přes noc a poté přidala 1000 µl 5,8 mM sulfanilamidu a 1000 µl 0,8 mM NNEDD. [70] [71]

4.3.7 Detekce aktivity NAD(P)-GDH v polyakrylamidovém gelu

Gel po nativní elektroforéze jsem vložila do reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pH 7,1, 10 mM L-glutamát, 0,2 mM NAD⁺/NADP⁺ a barvu (0,1 mg/ml nitroblue tetrazolium a 5 µg/ml phenazin methosulfate). [71]

4.4 STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN

Obsah bílkovin jsem stanovila pomocí metody podle Bradfordové. [75] Tato metoda je založena na změně absorpčního maxima ze 465 nm na 595 nm barvy Coomassie Brilliant Blue G 250 po vytvoření komplexu s proteinem.

K 10 µl rostlinného extraktu jsem přidala 23,3 µl destilované vody a 1 ml Bradfordova činidla. Tuto směs jsem promíchala a nechala 20 minut reagovat, poté jsem

změřila absorbanci proti slepému vzorku (destilované vodě) při 595 nm. Jako standard jsem použila hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 1,4; 1; 0,5 a 0,25 mg/ml.

5. VÝSLEDKY

Experimentální rostliny tabáku byly vypěstovány „in vitro“ v kultivačních nádobách s použitím Murashige-Skoogova agaru s přítomností či nepřítomností dodatečného zdroje uhlíku, v některých pokusech byla snížena koncentrace dusíkatých sloučenin (KNO_3 a NH_4NO_3) nebo fosfátu (KH_2PO_4).

Z listů a kořenů rostlin tabáku jsem připravila extrakty podle postupu uvedeném 4.1.3 a dále změřila aktivitu enzymů (kapitola 4.2), která je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

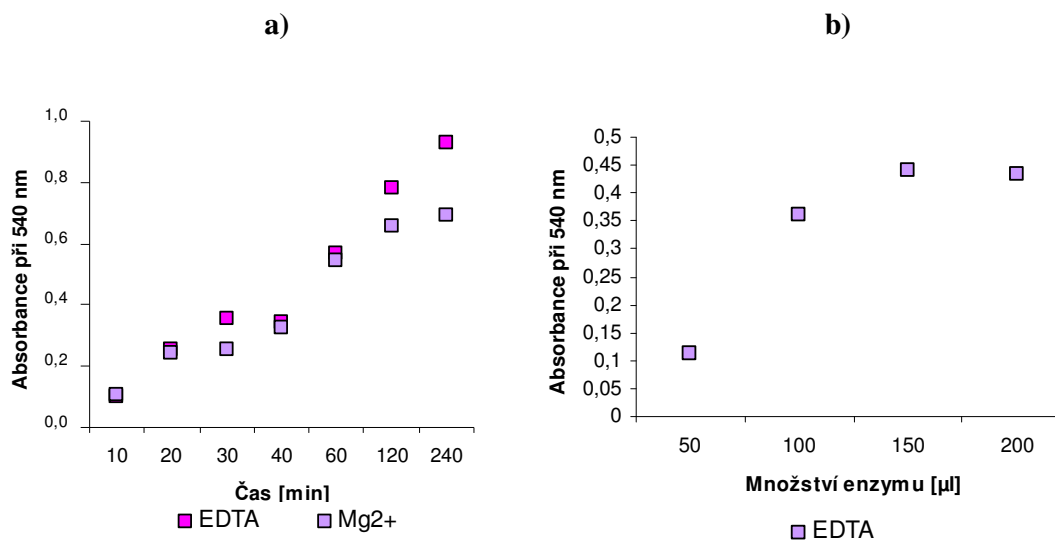
5.1 OPTIMALIZACE STANOVENÍ ENZYMŮVÝCH AKTIVIT

Metody stanovení aktivity PEPC, PPK a NADP-ME v tabáku již byly v naší laboratoři zavedeny [52], avšak stanovení aktivity enzymů spojených s metabolismem dusíku (stanovení aktivity nitrátreduktasy, glutamínsynthetasy a glutamátsynthasy) bylo třeba před vlastním provedením pokusu pro rostliny tabáku optimalizovat. Především bylo potřeba zjistit, jaké množství substrátu, rostlinného extraktu, případně kofaktoru bude pro provedení enzymové reakce potřeba a jak dlouho bude muset tato reakce probíhat, protože v některých rostlinách nebo jejich částech nemusí být aktivita daného enzymu vysoká. Pro všechna stanovení byly použity listy tabáku rostlin pěstovaných v Murashige-Skoogovu médiu v kultivačních nádobách s přístupem CO_2 .

5.1.1 Nitrátreduktasa

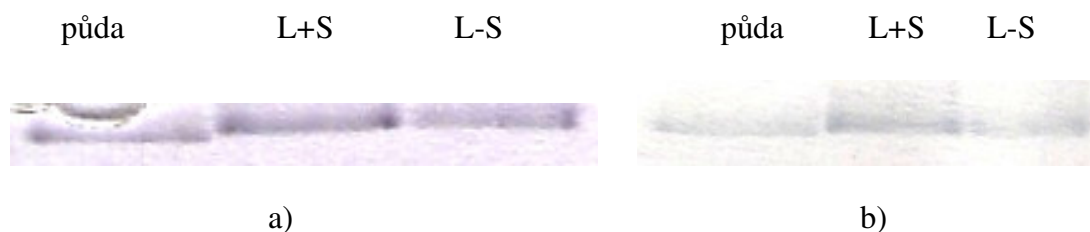
Pro optimalizaci stanovení aktivity nitrátreduktasy jsem zjišťovala závislost množství produktu vzniklého reakcí katalyzovanou NR a vyjádřené jako absorbance na čase, na množství enzymu a na přítomnosti EDTA a hořečnatých iontů. Obrázek 21 a), str.38 znázorňuje závislost množství produktu vyjádřené absorbancí při 340 nm na čase a na přítomnosti EDTA a hořečnatých iontů. Je patrné, že absorbance s narůstajícím časem roste, a to hlavně v přítomnosti EDTA. Pro další měření byl tedy použit EDTA a čas inkubace enzymu se substrátem 60 minut, kdy byla absorbance NR šestinásobná, v porovnání s měřením po 10 minutách. Na obrázku 21 b), str.38 je závislost množství produktu vytvořeného reakcí katalyzované NR vyjádřené jako absorbance při 540 nm na množství enzymu. Se vzrůstajícím množstvím enzymu roste i absorbance NR, není však

velký rozdíl mezi 150 a 200 μl enzymu a již se 100 μl rostlinného extraktu je absorbance NR dostatečná, proto byl pro další pokusy použit tento objem.



Obr.21 : Závislost množství produktu vytvořeného reakcí katalyzovanou nitrátreduktasou vyjádřené jako absorbance azobarviva při 540 nm na čase v přítomnosti EDTA nebo hořečnatých iontů (a) a na množství enzymu (b).

Dále jsem detekovala aktivitu NR v polyakrylamidovém gelu, podle kapitoly 4.3.6. Na obrázku 22 je porovnání detekce aktivity NR, kde byl v reakční směsi 100 mM KNO_3 a 10 mM KNO_3 . Aktivita NR byla detekovaná ve formě jednoho proužku. Z obrázku je patrná větší intenzita proužku u detekce v reakční směsi s 100 mM KNO_3 . Proto jsem pro další postup používala reakční směs, která obsahovala 100mM KNO_3 .



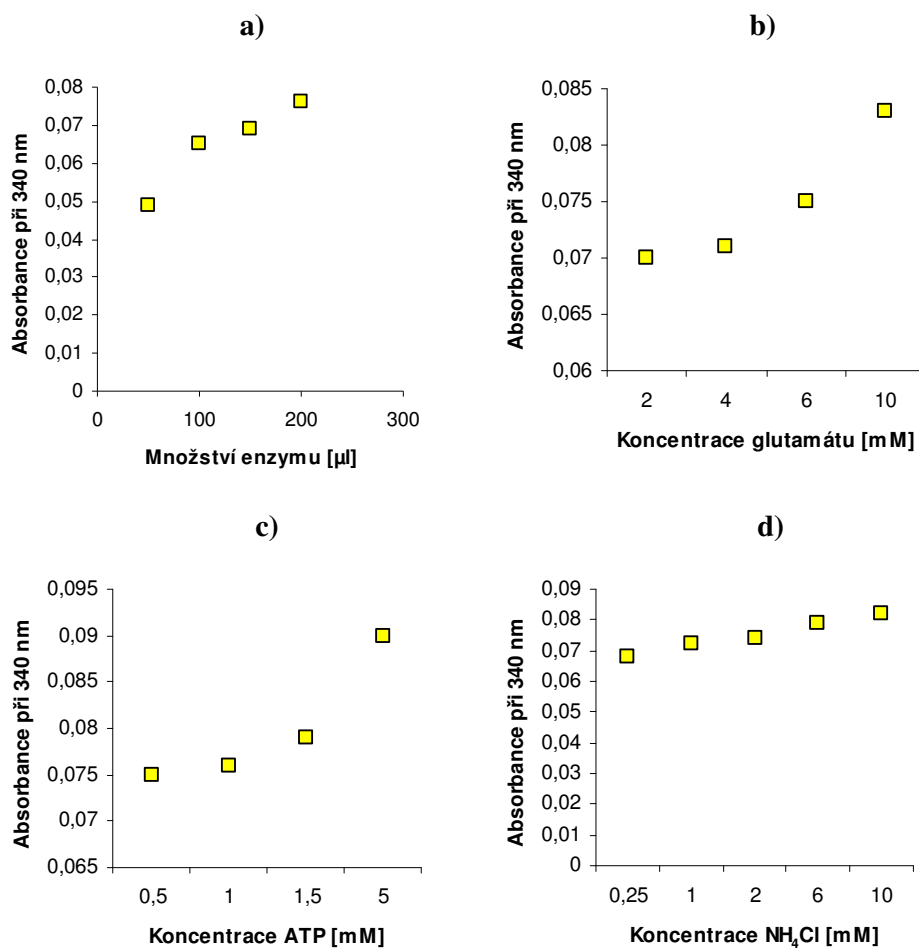
Obr.22 : Specifická detekce NR v 10-15% polyakrylamidovém gelu po nativní gradientové elektroforetické separaci rostlinného extraktu z listů tabáku pěstovaného v půdě (půda), extraktu z listů tabáku pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou (L+S) a bez sacharosy (L-S).

a) Reakční směs s 100 mM KNO_3

b) Reakční směs s 10 mM KNO_3

5.1.2 Glutaminsynthetasa

Pro optimalizaci stanovení aktivity glutaminsynthetasy jsem sledovala závislost absorbance při 340 nm, tedy vytvořeného NADH za katalýzy GS a spřažených reakcí katalyzovaných Pk a LDH, na množství použitého enzymového extraktu a na koncentraci substrátů glutamátu, ATP a NH_4Cl (obr.23 a,b,c,d). Pro další měření používala koncentrace substrátů 10 mM L-glutamát, 2,5 mM ATP a 10 mM NH_4Cl .

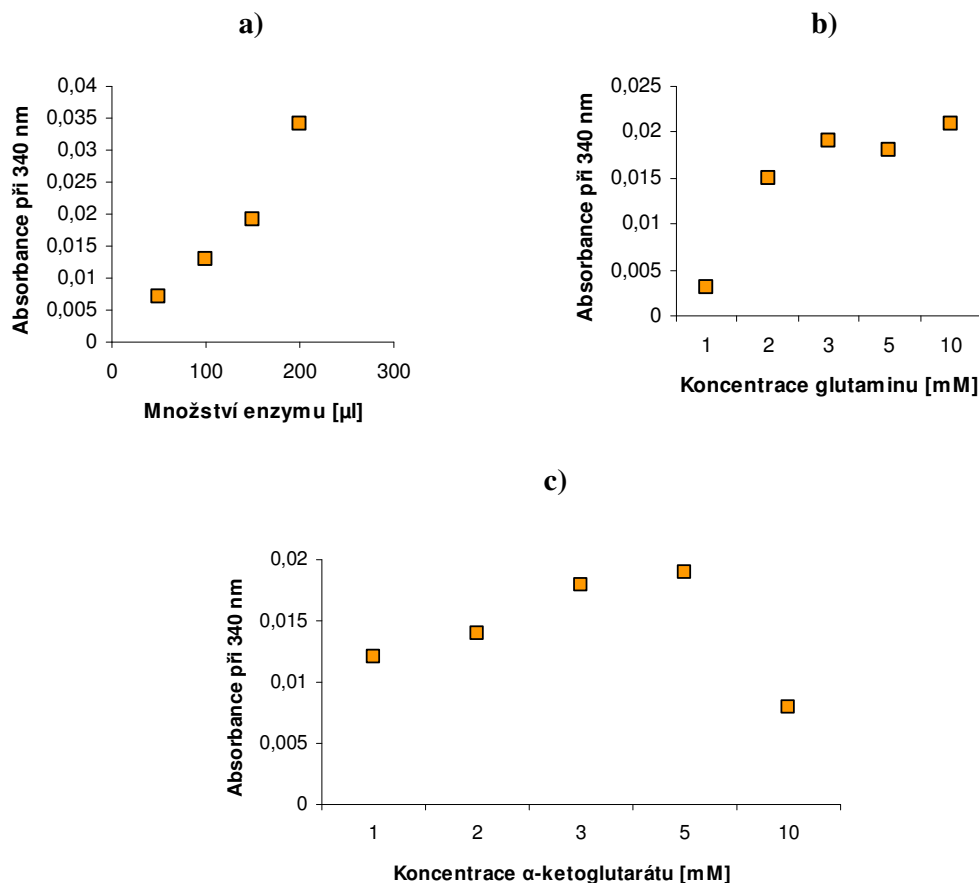


Obr.23 : Závislost množství produktu vytvořeného reakcí katalyzovanou GS vyjádřené jako absorbance při 340 nm na množství enzymu (a) a závislost rychlosti reakce katalyzované glutaminsynthetasou na koncentraci L-glutamátu (b), ATP (c) a NH_4Cl (d).

5.1.3 Glutamátsynthasa

Pro optimalizaci stanovení aktivity GOGAT jsem sledovala závislost absorbance na množství enzymu a na koncentraci substrátů glutaminu a α -ketoglutarátu. Na obrázku 24 a), str.40 je závislost absorbance GOGAT při 340 nm na množství enzymu, kde se

zvyšujícím se množstvím enzymu roste i absorbance. Na obrázcích 24 b),c) je závislost absorbance GOGAT při 340 nm na koncentraci substrátů L-glutaminu a α -ketoglutarátu. Z těchto grafů je patrné zvýšení absorbance GOGAT se zvyšující se koncentrací substrátů. Pouze v případě substrátu α -ketoglutarátu došlo při 10 mM koncentraci ke snížení absorbance GOGAT, pravděpodobně z důvodu inhibice nadbytkem substrátu. Proto jsem pro další měření přidávala 100 μ l rostlinného extraktu a výsledné koncentrace substrátů byly 5 mM L-glutamin a 5 mM α -ketoglutarát.



Obr.24 : Závislost množství produktu vytvořeného reakcí katalyzovanou GOGAT na množství enzymu (a) vyjádřené jako absorbance při 340 nm a závislost rychlosti reakce katalyzované glutamát-syntasou na koncentraci L-glutaminu (b) a α -ketoglutarátu (c).

5.2 POROVNÁNÍ AKTIVITY SLEDOVANÝCH ENZYMŮ V ROSTLINÁCH TABÁKU PĚSTOVANÝCH V KULTIVAČNÍM MÉDIU SE SACHAROSOU A BEZ SACHAROSY

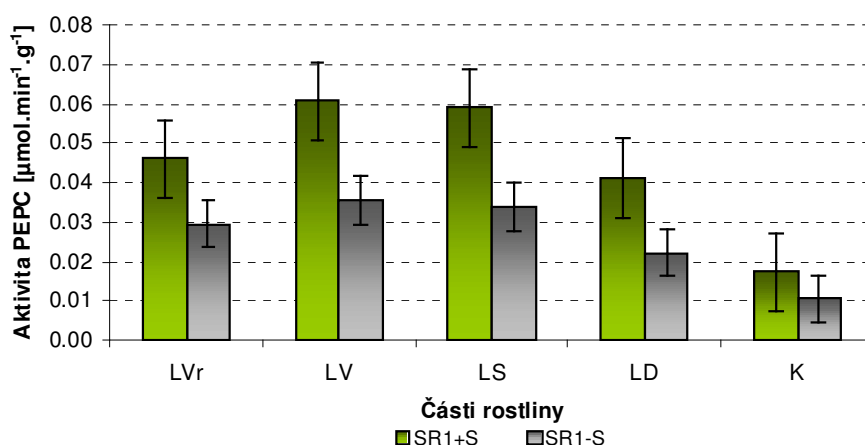
Pro tento pokus bylo použito 81 experimentálních rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana, SR1) pěstovaných v kultivačních nádobách v Murashige-Skoogovu agaru, přičemž polovina kultivačních nádob v médiu navíc obsahovala 2%

sacharosu. Z rostlin pěstovaných v přítomnosti sacharosu (dále jen +S rostlin) a z rostlin kontrolních pěstovaných bez sacharosu (dále jen –S rostlin) byly odebrány směsné vzorky. Jednalo se o listy odebírané zvlášť ve 4 skupinách podle jejich pozice na stonku a o vzorky kořenů. Podmínky pěstování rostlin, uchovávání vzorků a postup přípravy rostlinných extraktů jsou uvedeny v kapitole 4.1. V rostlinných extraktech jednotlivých vzorků byla sledována aktivita PEPC, NADP-ME, PPK a NR. V případě PEPC byla rovněž studována regulace tohoto enzymu v rostlinách pěstovaných s dodatečným zdrojem C (v +S rostlinách).

5.2.1 Aktivita PEPC v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosu

5.2.1.1 Aktivita PEPC v různých částech rostlin

Vzhledem k tomu, že aktivita enzymu většinou není ve všech částech rostliny stejná, byl vliv sacharosu v kultivačním médiu na aktivitu PEPC sledován v jednotlivých částech rostlin tabáku, obr.25. Výsledky jsou vztaženy na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu a jsou uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Aktivita PEPC byla vyšší v +S rostlinách (zelené sloupce) než v rostlinách kontrolních pěstovaných bez sacharosu (šedé sloupce). Vyšší aktivita byla zjištěna v prvních dospělých a středních listech a nižší v kořenech obou skupin rostlin.



Obr.25 : Aktivita PEPC v různých částech rostliny. Aktivita byla měřena při saturační 2 mM koncentraci PEP a optimálním pH 8,1 ve vrchních listech (LVr), prvních dospělých listech (LV), středních listech (LS), dolních listech (LD) a kořenech (K) rostlin pěstovaných se sacharosou (+S) a bez sacharosu (-S).

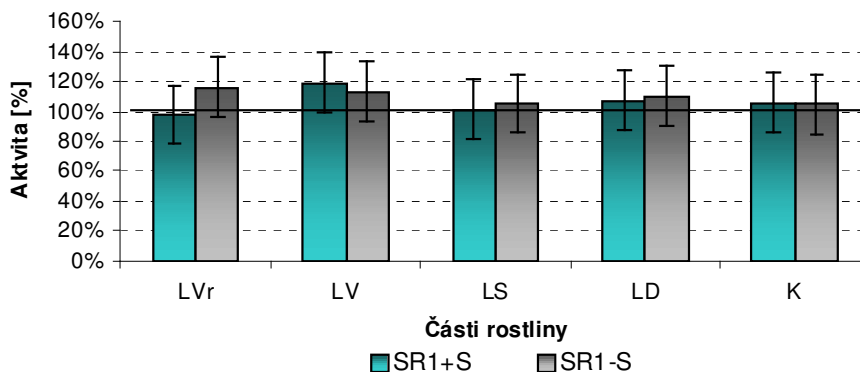
5.2.1.2 Regulace PEPC v různých částech rostlin

Aktivita PEPC je v tabáku regulovaná fosforylací serinového zbytku blízko N konce, čímž jsou ovlivněny kinetické parametry PEPC. V tomto pokusu byl sledován vliv fosforylace na +S a -S rostliny prostřednictvím působení alkalické fosfatasy, sledování vlivu aktivátoru glukosa-6-fosfátu a inhibitoru L-malátu. Měření bylo provedeno při optimálním pH 8,1 a fyziologickém pH 7,1 a při saturační (2mM) a subsaturační (0,2 mM) koncentraci PEP.

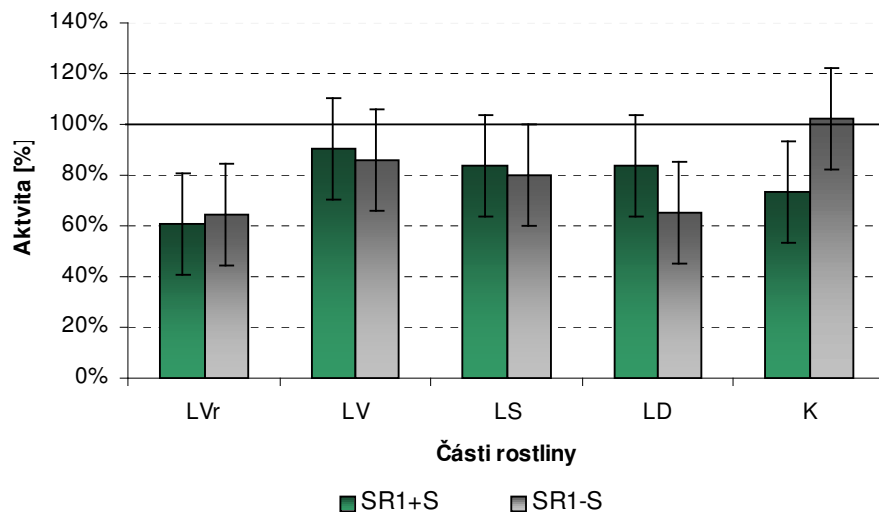
Na obrázcích 26 a 27 (str.43) je porovnání vlivu aktivátoru glukosa-6-fosfátu a inhibitoru L-malátu na aktivitu PEPC v +S a -S rostlinách. V tomto případě byla aktivita měřena při saturační koncentraci PEP a optimálním pH. Porovnání je vyjádřeno v procentech, kdy 100% je vždy aktivita PEPC v daném vzorku bez přítomnosti aktivátoru nebo inhibitoru.

Z obrázku 26 je patrné mírné zvýšení aktivity PEPC vlivem aktivátoru glukosa-6-fosfátu, a to například u vrchních listů +S rostlin se jedná o nárůst aktivity PEPC na 119% a u -S rostlin na 113%. Rozdíl mezi rostlinami pěstovanými se sacharosou a bez sacharosy nebyl patrný.

Na obrázku 27, str.43 je viditelný mírný pokles aktivity PEPC působený inhibitorem L-malátem, a to u vrchních listů +S rostlin na 90% a -S u rostlin na 86%. Výrazný rozdíl mezi rostlinami pěstovanými se sacharosou a bez sacharosy při těchto podmínkách opět nebyl zaznamenán.



Obr.26 : Vliv aktivátoru glukosa-6-P na aktivitu PEPC měřenou při saturační 2 mM koncentraci PEP a optimálním pH 8,1 ve vrchních listech (LVr), prvních dospělých listech (LV), středních listech (LS), dolních listech (LD) a kořenech (K) rostlin pěstovaných se sacharosou (+S) a bez sacharosy (-S). 100% odpovídá aktivitě PEPC v daném vzorku bez přítomnosti glukosa-6-P.

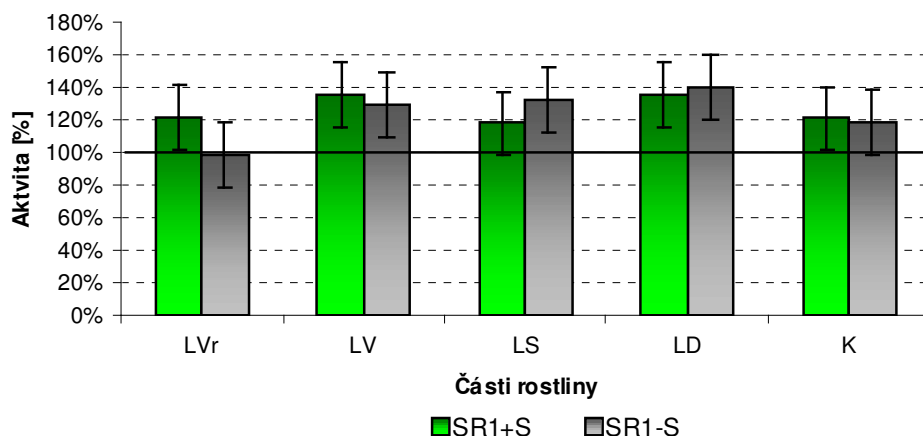


Obr.27 : Vliv inhibitoru L-malátu na aktivitu PEPC měřenou při saturační 2 mM koncentraci PEP a optimálním pH 8,1 ve vrchních listech (LVr), prvních dospělých listech (LV), středních listech (LS), dolních listech (LD) a kořenech (K) rostlin pěstovaných se sacharosou (+S) a bez sacharosy (-S). 100% odpovídá aktivitě PEPC v daném vzorku bez přítomnosti L-malátu.

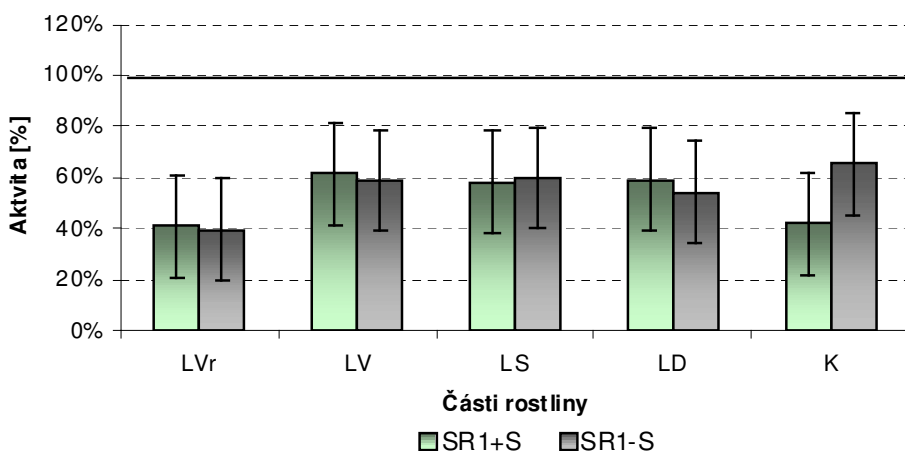
Vzhledem k tomu, že při optimálních podmínkách nebyl u obou skupin rostlin vliv regulátorů na aktivitu PEPC výrazný, byl rovněž sledován jejich vliv při fyziologických podmínkách. Na obrázcích 28 a 29, str. 44 je porovnání vlivu glukosa-6-P a L-malátu na aktivitu PEPC při subsaturační koncentraci fosfoenolpyruvátu v +S a -S rostlinách. Srovnání je vyjádřeno v procentech, 100% odpovídá aktivitě PEPC v daném vzorku měřené při subsaturační koncentraci PEP bez přítomnosti aktivátoru nebo inhibitoru.

Na obrázku č.28 (str.44) je patrné významné zvýšení aktivity PEPC vlivem aktivátoru glukosa-6-fosfátu při subsaturační koncentraci PEP (0,2 mM). Toto zvýšení je významnější než u saturační koncentrace PEP (obr.26, str.42) U vrchních listů +S rostlin se jedná o aktivaci na 135% a u -S rostlin na 129%. Mezi rostlinami pěstovanými se sacharosou a bez sacharosy nebyly v aktivaci glukosa-6-P zjištěny rozdíly.

Na obrázku 29 (str.44) je při subsaturační koncentraci PEP (0,2 mM) viditelné významné snížení aktivity PEPC vlivem inhibitoru L-malátu, a to ve vrchních listech +S rostlin na 61% a -S rostlin na 60%. Opět zde nebyly nalezeny rozdíly mezi +S a -S rostlinami. Aktivita PEPC v subsaturační koncentraci PEP byla vlivem L-malátu více snížena než v případě saturační koncentrace PEP (obr.27).



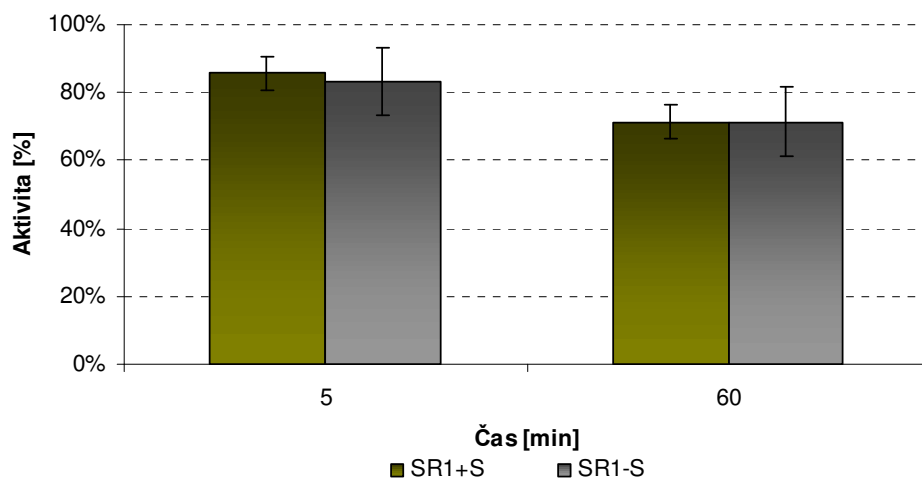
Obr.28 : Vliv glukosa-6-P na aktivitu PEPC měřenou při subsaturační 0,2 mM koncentraci PEP a pH 8,1 ve vrchních listech (LVr), prvních dospělých listech (LV), středních listech (LS), dolních listech (LD) a kořenech (K) rostlin pěstovaných se sacharosou (+S) a bez sacharosy (-S). 100% odpovídá aktivitě PEPC daného vzorku bez přítomnosti glukosa-6-P.



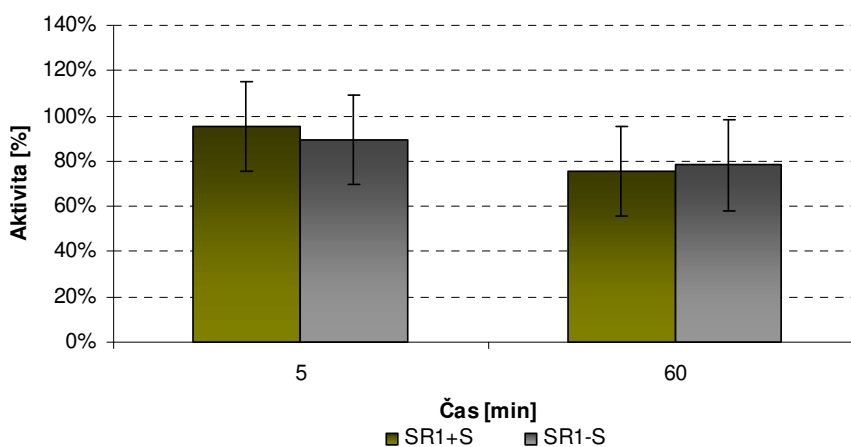
Obr.29 : Vliv L-malátu na aktivitu PEPC měřenou při subsaturační 0,2 mM koncentraci PEP a pH 8,1 ve vrchních listech (LVr), prvních dospělých listech (LV), středních listech (LS), dolních listech (LD) a kořenech (K) rostlin pěstovaných se sacharosou (+S) a bez sacharosy (-S). 100% odpovídá aktivitě PEPC daného vzorku bez přítomnosti L-malátu.

Fosforylace PEPC byla dále studována sledováním vlivu působení alkalické fosfatasy v pH 7,1 a 8,1. Na rostlinné extrakty působila alkalická fosfatasa podle kapitoly 4.2.1. Současně byl vždy proveden kontrolní pokus obsahující místo AP destilovanou vodu a inhibitory proteas. Obrázky 30 a 31 (str.45) znázorňují aktivitu PEPC po působení alkalické fosfatasy v rostlinných extraktech vrcholových listů +S a -S rostlin. Z obrázků je patrné snížení aktivity v čase v důsledku defosforylace, avšak nebyl zjištěn rozdíl mezi

roślinami pěstovanými se sacharosou a bez sacharosy. Větší snížení bylo zaznamenáno při pH 7,1.



Obr.30 : Aktivita PEPC po působení alkalické fosfatasy při pH 7,1 ve vrcholových listech tabáku pěstovaném se sacharosou (+S) a bez sacharosy (-S).

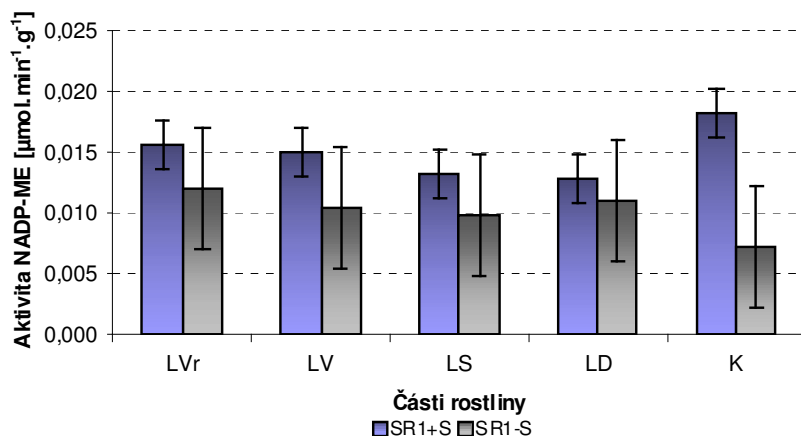


Obr.31 : Aktivita PEPC po působení alkalické fosfatasy při pH 8,1 ve vrcholových listech tabáku pěstovaném se sacharosou (+S) a bez sacharosy (-S).

5.2.2 Aktivita NADP-ME v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy

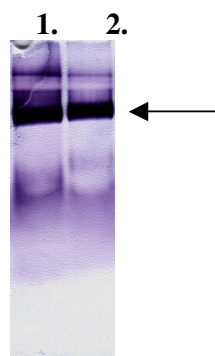
Dalším enzymem, který jsem sledovala v +S a -S rostlinách tabáku byl NADP-ME. Na obrázku 32 je znázorněn vliv sacharosy v kultivačním médiu na aktivitu NADP-ME v jednotlivých částech rostliny. Výsledky jsou vztaženy na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu a jsou uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

Z obrázku 32 je patrné největší zvýšení aktivity NADP-ME v kořenech +S rostlin. Aktivita NADP-ME zde byla 1,5x vyšší než v -S rostlinách. Také v ostatních částech +S rostlin bylo zjištěno zvýšení aktivity NADP-ME oproti kontrolním -S rostlinám.



Obr.32 : Aktivita NADP-ME vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v jednotlivých částech: ve vrchních listech (LVr), prvních dospělých listech (LV), středních listech (LS), dolních listech (LD) a kořenech (K) rostlin tabáku pěstovaného s přidavkem (+S) a bez (-S) přidavku sacharosy.

V horních listech rostlin tabáku pěstovaných s přidavkem sacharosy a bez sacharosy jsem zjišťovala aktivitu NADP-ME (obr.33). Z obrázku je patrný proužek, který byl výraznější u listů se sacharosou. Dále je viditelný i agregát s vyšší molekulovou hmotností, který byl opět výraznější u listů se sacharosou.

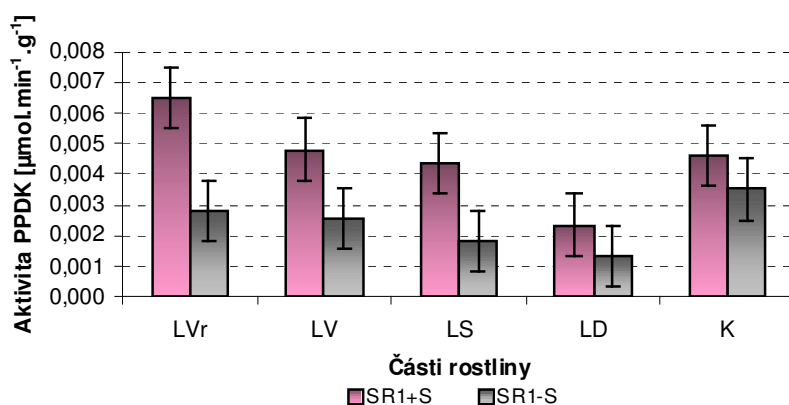


Obr.33 : Detekce aktivity NADP-ME po gradientové nativní elektroforéze v 6 až 12 % polyakrylamidovém gelu. Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu (25μl).
 1. dráha – horní listy pěstované se sacharosou
 2. dráha – horní listy pěstované bez sacharosy

5.2.3 Aktivita PPDK v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosu

Na obrázku 34 je znázorněn vliv dodatečného zdroje C v kultivačním médiu v podobě sacharosu na aktivitu PPDK v různých částech rostliny. Výsledky jsou opět uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

Nejvyšší aktivita PPDK byla zjištěna ve vrchních listech +S rostlin, kde byla přibližně 1,33-krát vyšší oproti -S rostlinám. Další zvýšení v +S rostlinách oproti -S rostlinám bylo patrné i u prvních plně vyvinutých listů (o 90%) a středních listů (o 140%).

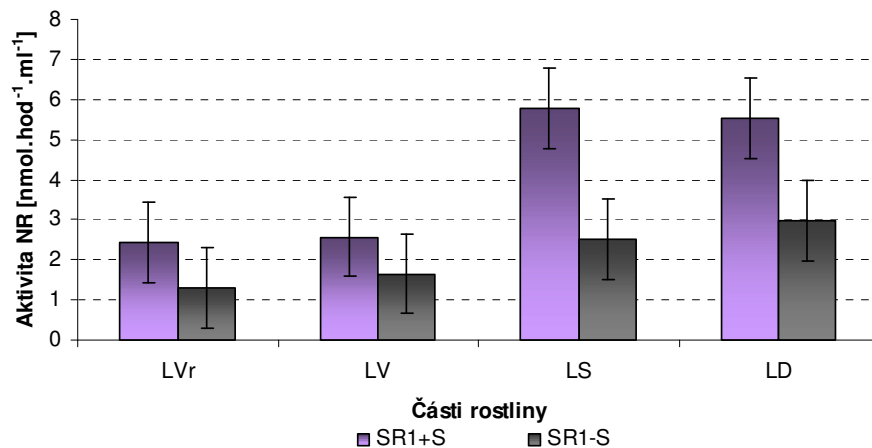


Obr.34 : Aktivita PPDK vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v jednotlivých částech: ve vrchních listech (LVr), prvních dospělých listech (LV), středních listech (LS), dolních listech (LD) a kořenech (K) rostlin tabáku pěstovaných se sacharosou (+S) a bez sacharosu (-S).

5.2.4 Aktivita NR v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosu

Dalším sledovaným enzymem byla nitrátreduktasa. Na obrázku 35 (str.48) je uveden vliv sacharosu v kultivačním médiu na aktivitu NR v jednotlivých částech rostliny. Aktivita NR byla stanovena optimalizovanou metodou dle Debouba et al. [70] a Manchenko [71] (viz kapitoly 4.2.4 a 5.1.1) výsledky byly pomocí kalibračního grafu vztaženy na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu a jsou uvedeny v $\text{nmol}\cdot\text{hod}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$.

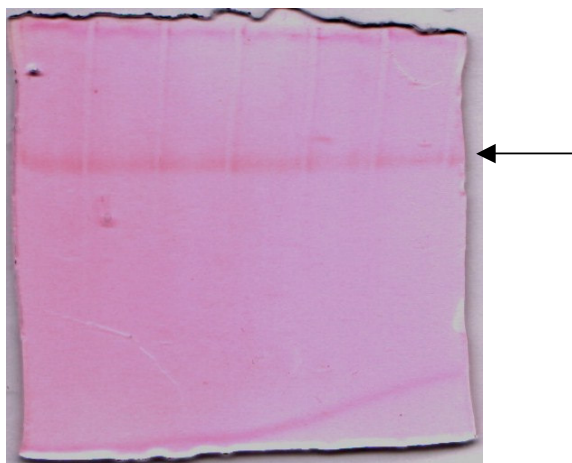
Ve všech sledovaných částech rostlin tabáku byla zjištěna vyšší aktivita NR v +S rostlinách. Jednalo se především o střední listy, kde byla aktivita NR 1,3-krát vyšší než v -S rostlinách, ale také v dolních listech +S rostlin bylo zvýšení aktivity NR signifikantní



Obr.35 : Aktivita NR vztážená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v jednotlivých částech: ve vrchních listech (LVr), prvních dospělých listech (LV), středních listech (LS), dolních listech (LD) a kořenech (K) rostlin tabáku pěstovaných se sacharosou (+S) a bez sacharosy (-S).

Na obrázku 36 (str.49) je detekce aktivity nitrátoreduktasy v gelu v nedenuroujícíím prostředí (podle kapitoly 4.3.6) pro rostliny pěstované s přídavkem sacharosy a bez sacharosy. Na tomto gelu byl detekován jeden proužek, ale nebyl patrný rozdíl v intenzitě proužku.

1. 2. 3. 4. 5. 6.



Obr.36 : Detekce aktivity NR v 6 % polyakrylamidovém gelu po elektroforetické separaci v nednaturujícím prostředí. Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu (25 μ l).

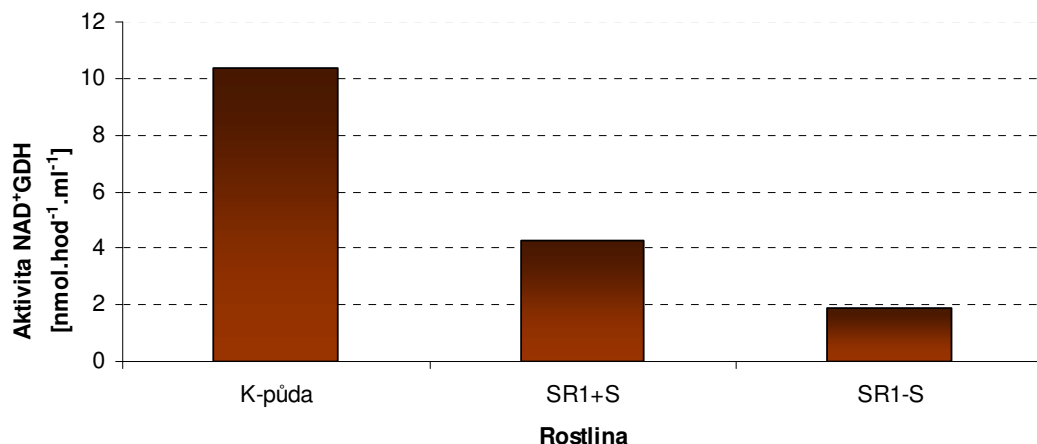
1.-3. dráha – horní listy pěstované se sacharosou

4.-6. dráha – horní listy pěstované bez sacharosy

5.2.5 Aktivita NAD(P)-GDH v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy

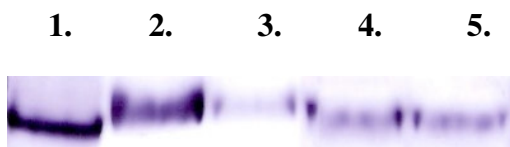
Dalšími enzymy souvisejícími s metabolismem dusíku, jejichž aktivitu jsem stanovovala na základě barevné reakce NAD(P)H s jodonitrotetrazoliové violeti s phenazin methosulfátem jsou NAD-GDH a NADP-GDH. Výsledky byly pomocí kalibračního grafu (viz metody 4.2.7) vztaženy na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu a jsou uvedeny v nmol.hod⁻¹.ml⁻¹.

Na obrázcích 37 a 39 (str.50 a 51) je znázorněno porovnání aktivity NAD-GDH a NADP-GDH kontrolní rostliny tabáku pěstované v půdě s rostlinami pěstovanými v otevřených kultivačních nádobách s médiem obsahujícím sacharosou a bez sacharosy. Nejvyšší aktivita NAD-GDH byla zjištěna v kontrolní rostlině, ale i v SR1+S rostlinách byla aktivita vyšší oproti SR1-S.



Obr.37 : Porovnání aktivity NAD⁺GDH v listech kontrolní rostliny pěstované v půdě a v listech rostlin pěstovaných v kultivačních nádobách s přidavkem (SR1+S) a bez přidavku sacharosy (SR1-S)

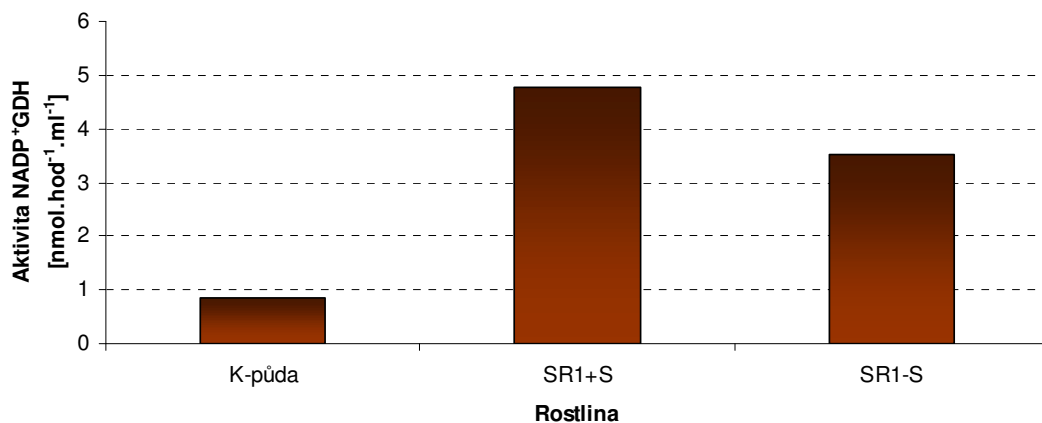
Dále jsem specificky detekovala aktivitu NAD-GDH v gradientovém gelu po separaci v nednaturujícím prostředí, podle kapitoly 4.3.7. Na obrázku 38 je srovnání listů a kořenů rostlin pěstovaných se sacharosou a bez sacharosy a jako kontrolní rostlina zde byla použita semena merlíku chilského. Z obrázku je patrný jeden proužek, který byl nejvýraznější u semen merlíku chilského a kořenů tabáku pěstovaného se sacharosou.



Obr.38 : Detekce aktivity NAD-GDH v 6-12 % gradientovém gelu po elektroforetické separaci v nednaturujícím prostředí. Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu (25μl).

1. dráha – extrakt ze semen merlíku chilského
2. dráha – extrakt z kořenů tabáku pěstovaného se sacharosou
3. dráha – extrakt kořenů tabáku pěstovaného bez sacharosy
4. dráha – extrakt listů tabáku pěstovaného se sacharosou
5. dráha – extrakt listů tabáku pěstovaného bez sacharosy

V případě NADP-GDH byla zjištěna nízká aktivita tohoto enzymu v listech kontrolní rostliny pěstované v půdě. Nejvyšší aktivita NADP-ME byla nalezena v listech SR1+S rostlin pěstovaných s přidavkem sacharosy.



Obr.39 : Porovnání aktivity NADP-GDH v listech kontrolní rostliny pěstované v půdě a v rostlin pěstovaných v kultivačních nádobách s přídavkem (SR1+S) a bez přídavku sacharosy (SR1-S)

Na obrázku 40 je znázorněno srovnání aktivity NADP-GDH detekované v gradientovém gelu kontrolní rostliny pěstované v půdě s listy z rostlin pěstovaných v kultivačních nádobách s přídavkem sacharosy nebo bez přídavku sacharosy. Na tomto gelu byl přítomný jeden proužek. Byly potvrzeny výsledky ze spektrofotometrického stanovení, kde byla nalezena nízká aktivita u kontrolních rostlin pěstovaných v půdě a zvýšená aktivita u listů rostlin tabáku pěstovaných se sacharosou.

1. 2. 3.



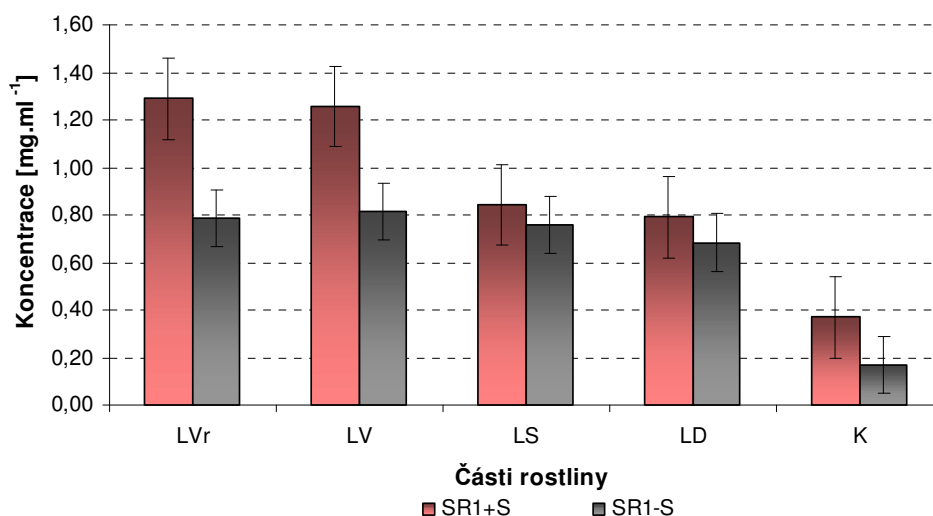
Obr.40 : Detekce aktivity NADP-GDH v 6-12 % gradientovém gelu po elektroforetické separaci v nedenaturujícím prostředí. Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu (25 μ l).

1. dráha – kontrolní rostliny tabáku pěstované v půdě
2. dráha – listy rostlin tabáku pěstovaných se sacharosou
3. dráha – listy rostlin tabáku pěstovaných bez sacharosy

5.2.6 Obsah bílkovin

Obsah rozpustných bílkovin v rostlinách tabáku pěstovaných se sacharosou a bez sacharosy jsem zjistila pomocí stanovení podle Bradfordové.

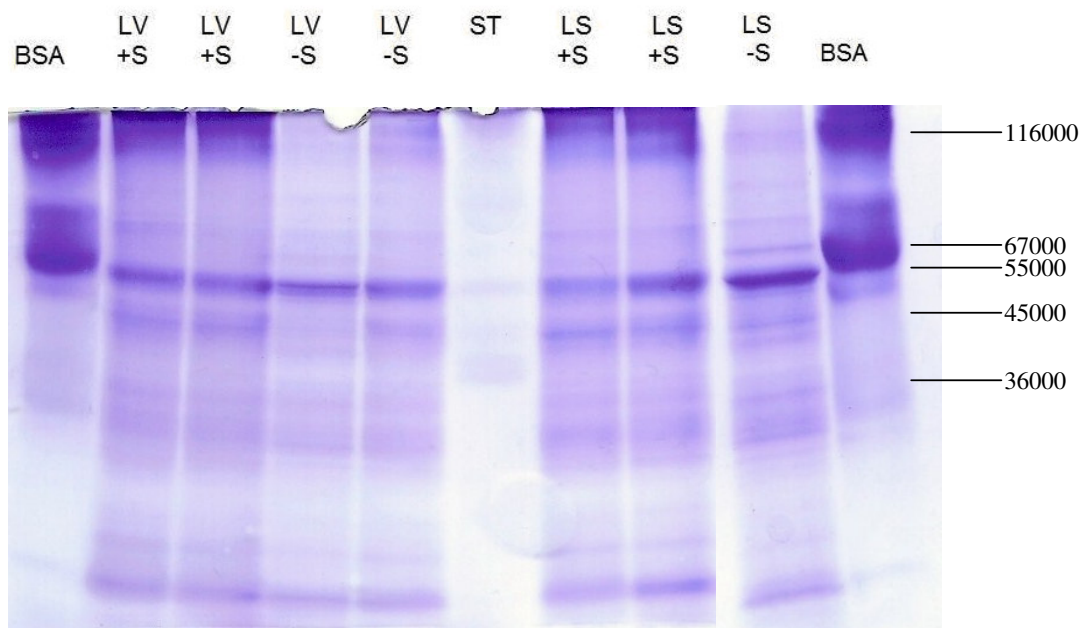
Rostliny s přidavkem sacharosy (SR1+S rostliny) obsahovaly více bílkovin než rostliny bez sacharosy (SR1-S). V rostlinách SR1-S nebyly v různých listech zjištěny rozdíly v množství bílkovin. V rostlinách SR1+S bylo nejvíce bílkovin v horních a vrchních listech. V kořenech bylo bílkovin zjištěno méně (obr. 41).



Obr.41 : Množství bílkovin v jednotlivých částech: ve vrchních listech (LVr), prvních dospělých listech (LV), středních listech (LS), dolních listech (LD) a kořenech (K) rostlin tabáku pěstovaných se sacharosou (SR1+S) a bez sacharosy (SR1-S).

5.2.7 Elektroforetická separace v prostředí SDS

Na obrázku 42 (str.53) je dokumentován výsledek separace rostlinných extraktů pomocí SDS elektroforézy v 10% polyakrylamidovém gelu a gradientové SDS elektroforézy v 10% až 15% polyakrylamidovém gelu. Porovnáním výsledku separace proteinů SR1+S a SR1-S rostlin nebyly zjištěny kvalitativní rozdíly.



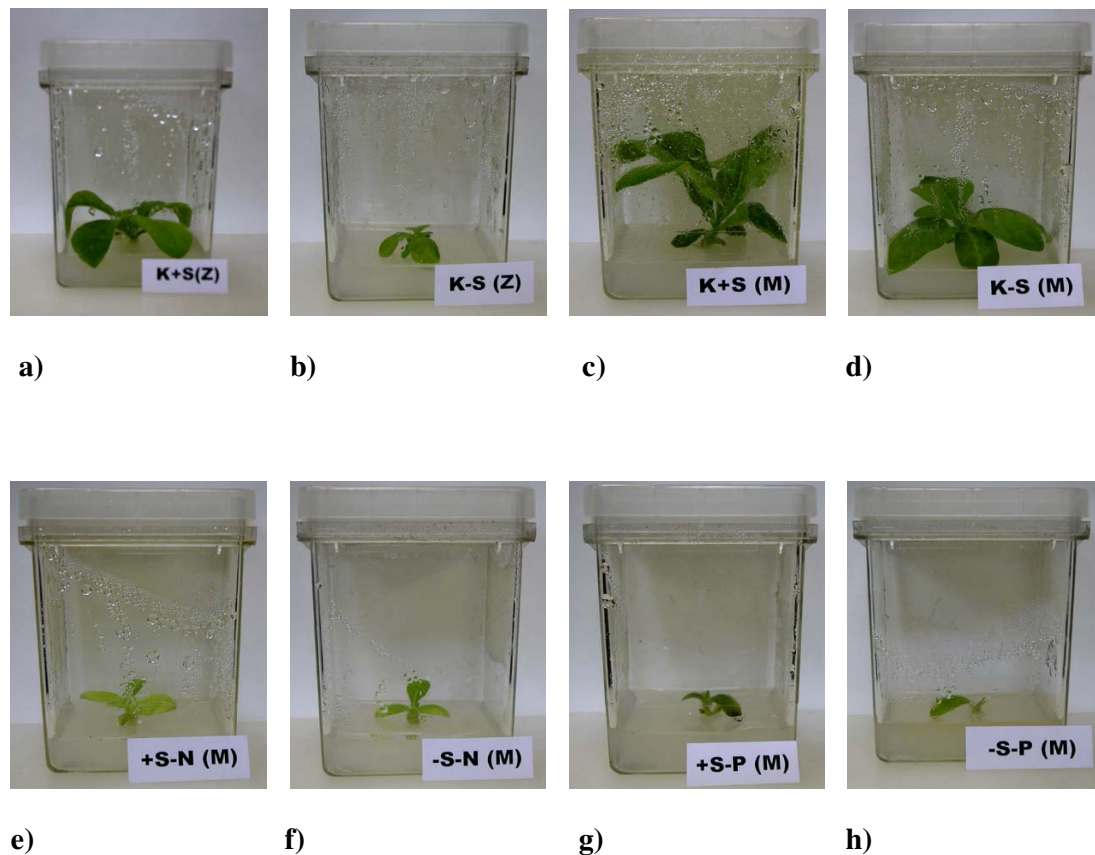
Obr.42 : SDS elektroforetická separace extraktů rostlin pěstovaných se sacharosou (+S) a bez sacharosy (-S) vrchních (LV) a středních (LS) listů v prostředí 10 % až 15% gradientu polyakrylamidovém gelu. Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu (25 μ l).

5.3 VLIV DOSTUPNOSTI DUSÍKATÝCH LÁTEK A FOSFÁTU V KULTIVAČNÍM MÉDIU NA AKTIVITU SLEDOVANÝCH ENZYMŮ V ROSTLINÁCH TABÁKU

Pro tento pokus bylo použito 68 experimentálních rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana, SR1) pěstovaných v kultivačních nádobách v Murashige-Skoogově agaru, které byly rozděleny do osmi skupin:

- a) rostliny pěstované se sacharosou a limitovaným přístupem CO₂ (KZ+S)
- b) rostliny pěstované bez sacharosy a limitovaným přístupem CO₂ (KZ-S)
- c) rostliny pěstované se sacharosou a s přístupem CO₂ (KM+S)
- d) rostliny pěstované bez sacharosy a s přístupem CO₂ (KM-S)
- e) rostliny pěstované se sníženým obsahem dusíkatých látek, pěstované se sacharosou a s přístupem CO₂ (M-N+S)
- f) rostliny pěstované se sníženým obsahem dusíkatých látek, pěstované bez sacharosy a s přístupem CO₂ (M-N-S)
- g) rostliny pěstované se sníženým obsahem fosfátu, pěstované se sacharosou a s přístupem CO₂ (M-P+S)
- h) rostliny pěstované se sníženým obsahem fosfátu, pěstované bez sacharosy a s přístupem CO₂ (M-P-S) obr.43, str.54

Z těchto rostlin byly odebrány směsné vzorky a připraveny rostlinné extrakty podle kapitoly 4.1.3. Poté byla sledována aktivita a regulace PEPC a dále aktivita NADP-ME, PPKK, NR, GS, GOGAT, NAD-GDH a NADP-GDH.

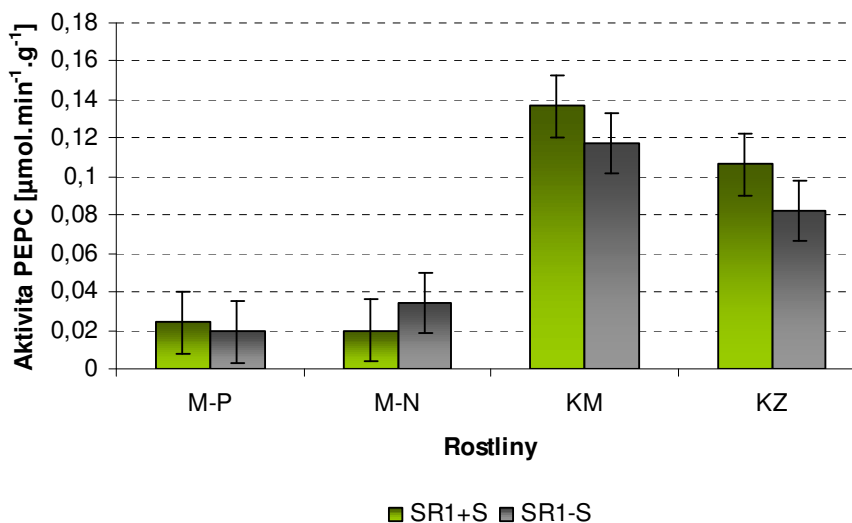


Obr.43 : Rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv.Petit Havana pěstované v kultivačních nádobách v Murashige-Skoogově agaru. a) Rostlina pěstovaná se sacharosou a s limitovaným přístupem CO₂ (KZ+S), b) Rostlina pěstovaná bez sacharosy a s limitovaným přístupem CO₂ (KZ-S), c) Rostlina pěstovaná se sacharosou a s přístupem CO₂ (KM+S), d) Rostlina pěstovaná bez sacharosy a s přístupem CO₂ (KM-S), e) Rostlina pěstovaná se sníženým obsahem dusíkatých látek, pěstovaná se sacharosou a s přístupem CO₂ (M-N+S), f) Rostlina pěstovaná se sníženým obsahem dusíkatých látek, pěstovaná bez sacharosy a s přístupem CO₂ (M-N-S), g) Rostlina pěstovaná se sníženým obsahem fosfátu, pěstovaná se sacharosou a s přístupem CO₂ (M-P+S), h) Rostlina pěstovaná se sníženým obsahem fosfátu, pěstovaná bez sacharosy a s přístupem CO₂ (M-P-S).

5.3.1 Aktivita PEPC v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů

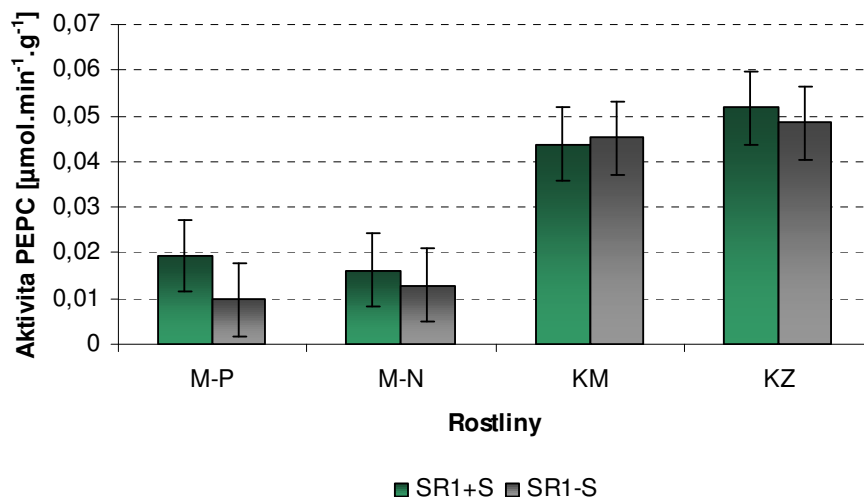
5.3.1.1 Aktivita PEPC ve sledovaných rostlinách

Na obrázku 44 je znázorněna aktivita PEPC při optimálním pH 8,1 a saturační koncentraci PEP pro všechny měřené skupiny rostlin pěstovaných se sacharosou (zelené sloupce) a bez sacharosy (šedé sloupce). Nejvyšší aktivita PEPC byla zaznamenána u rostlin s přístupem CO₂. Snížená dostupnost CO₂ znamenala mírné snížení aktivity PEPC. Dvacetinásobné snížení koncentrace KNO₃ a NH₄NO₃ znamenalo podstatné snížení aktivity PEPC, dále byla zjištěna mírně zvýšená aktivita v listech rostlin pěstovaných se sacharosou oproti rostlinám bez sacharosy. Také snížení koncentrace fosfátů v kultivačním médiu znamenalo výrazné snížení aktivity PEPC.



Obr.44 : Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost měřená při saturační koncentraci PEP (2 mM) a optimálním pH 8,1 v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO₂ (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO₂ (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosy (SR1+S), nebo bez sacharosy (SR1-S).

Aktivita PEPC při pH 7,3 a saturační koncentraci PEP je uvedena na obrázku 45, str.56. Rostliny pěstované v přítomnosti sacharosy znázorňují zelené sloupce a bez sacharosy šedé sloupce. Nebyly zaznamenány rozdíly mezi rostlinami se sacharosou a bez sacharosy. Nejvyšší aktivita byla v rostlinách s limitovaným přístupem CO₂.

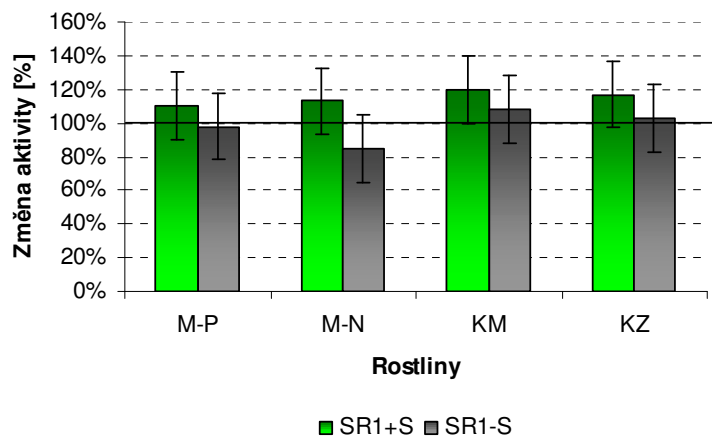


Obr.45 : Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost měřená při saturační koncentraci PEP (2 mM) a fyziologickém pH 7,3 v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO₂ (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO₂ (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosy (SR1+S), nebo bez sacharosy (SR1-S).

5.3.1.2 Regulace PEPC v jednotlivých sledovaných skupinách

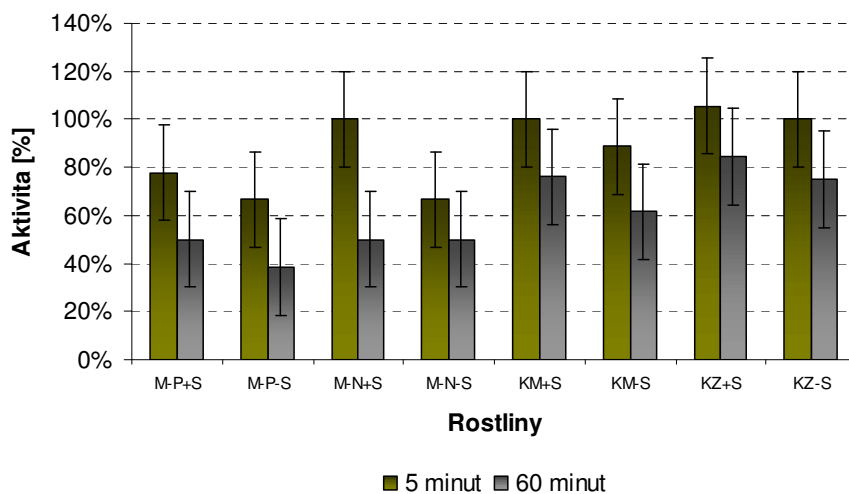
V tomto pokusu jsem také sledovala vliv fosforylace PEPC působením alkalické fosfatasy a vliv aktivace toho enzymu působením glukosa-6-fosfátu.

Na obrázku 46 (str.57) je patrné zvýšení aktivity PEPC vlivem aktivátoru glukosa-6-fosfátu při saturační koncentraci PEP a optimálním pH u jednotlivých měřených skupin rostlin tabáku. Toto zvýšení bylo u rostlin s přístupem CO₂ pěstovaných se sacharosou 120 % a bez sacharosy na 108 %.



Obr.46 : Vliv aktivátoru glukosa-6-P na aktivitu PEPC měřenou při saturační 2 mM koncentraci PEP a optimálním pH 8,1 v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO₂ (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO₂ (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosu (SR1+S), nebo bez sacharosu (SR1-S). 100% odpovídá aktivitě PEPC v daném vzorku bez přítomnosti glukosa-6-P.

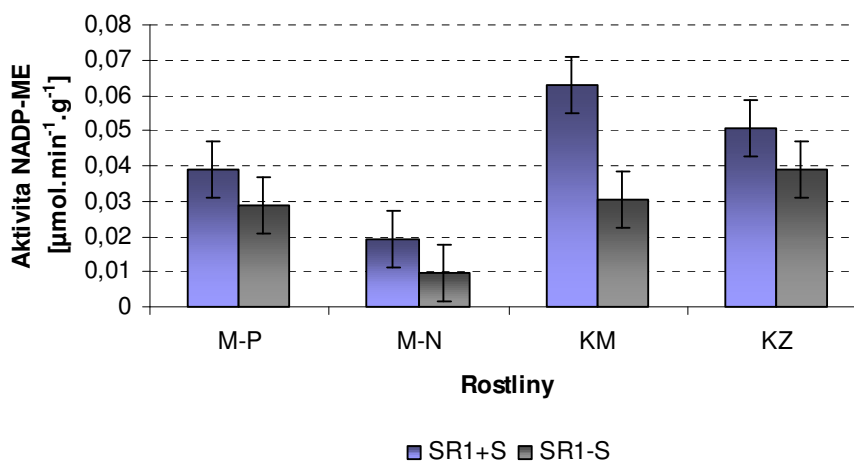
Na obrázku 47 je znázorněn vliv fosforylace působením alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC u jednotlivých měřených skupin tabáku vyjádřen v procentech. Z tohoto obrázku je patné snížení aktivity působením alkalické fosfatasy v čase. Pokles je větší v rostlinách se sníženým obsahem dusíkatých látek a fosfátu v kultivačním médiu, obr.47.



Obr.47 : Změna aktivity PEPC po působení alkalické fosfatasy při pH 8,1 a saturační 2 mM koncentraci PEP v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO₂ (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO₂ (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosu (SR1+S), nebo bez sacharosu (SR1-S) po 5 a 60 minutách.

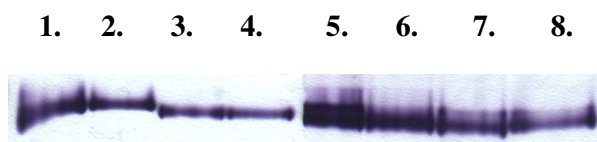
5.3.2 Aktivita NADP-ME v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů

Dalším sledovaným enzymem byl NADP-ME. Na obrázku 48 je znázorněn vliv sacharosy v kultivačním médiu na aktivitu NADP-ME v jednotlivých skupinách rostlin tabáku. Výsledky jsou vztaženy na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu a jsou uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Největší rozdíl aktivit mezi rostlinami pěstovanými se sacharosou a bez sacharosy byl v kontrolních rostlinách tabáku s přístupem CO_2 , který byl dvojnásobný. Nedostatek živin způsobil snížení aktivity NADP-ME.



Obr.48 : Aktivita NADP-ME vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO_2 (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO_2 (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosy (SR1+S), nebo bez sacharosy (SR1-S).

Nejvyšší aktivita NADP-ME v gradientovém gelu po elektroforetické separaci v nedenaturujícím prostředí byla zjištěna u rostlin s přístupem CO_2 , intenzivní proužek v dráze č. 5, obr.49, str.59.



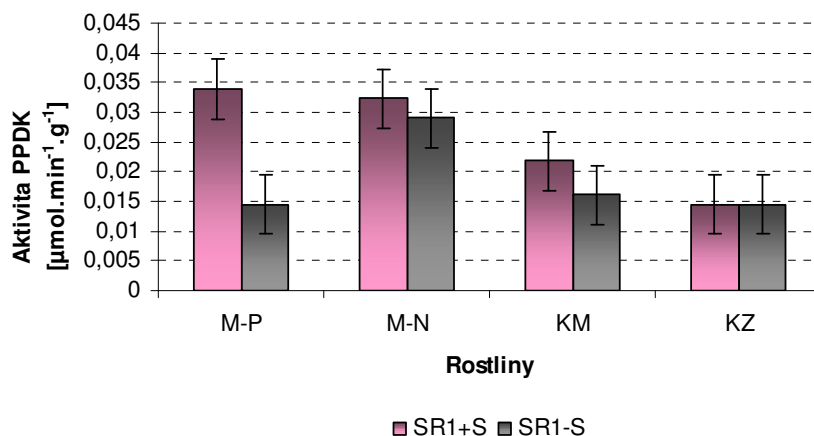
Obr.49 : Detekce aktivity NADP-ME po gradientové nativní elektroforéze v 6 až 12 % polyakrylamidovém gelu. Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu (25 μ l).

1. dráha – Rostlina se sníženým obsahem fosfátu se sacharosou (M-P+S)
2. dráha – Rostlina se sníženým obsahem fosfátu bez sacharosy (M-P-S)
3. dráha – Rostlina se sníženým obsahem dusíkatých látek se sacharosou (M-N+S)
4. dráha – Rostlina se sníženým obsahem dusíkatých látek bez sacharosy (M-N-S)
5. dráha – Rostlina se sacharosou s přístupem CO₂ (KM+S)
6. dráha – Rostlina se sacharosou s limitovaným přístupem CO₂(KZ+S)
7. dráha – Rostlina bez sacharosy s přístupem CO₂ (KM-S)
8. dráha – Rostlina bez sacharosy s limitovaným přístupem CO₂(KZ-S)

5.3.3 Aktivita PPDK v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů

Na obrázku 50 je znázorněn vliv sacharosy na aktivitu PPDK ve všech sledovaných skupinách. Výsledky jsou opět uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

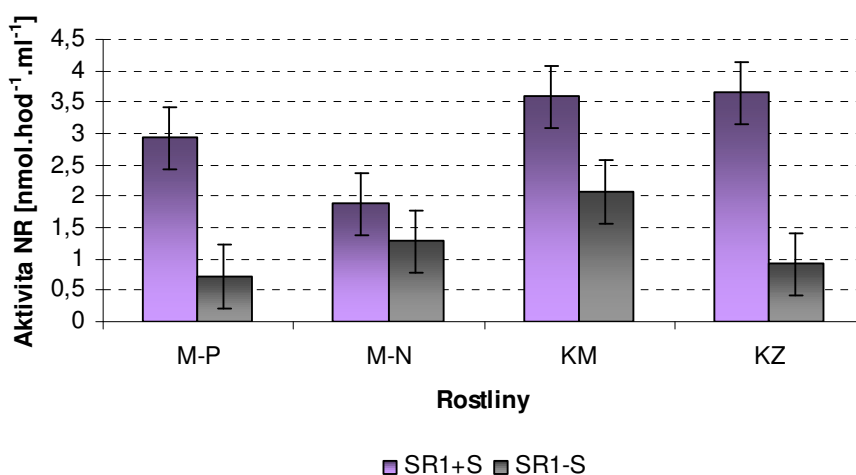
Nedostatek dusíkatých látek v kultivačním médiu působil zvýšení aktivity PPDK a to v případě rostlin pěstovaných se sacharosou i bez. Největší rozdíl aktivit mezi rostlinami pěstovanými v přítomnosti sacharosy a bez sacharosy byl u skupiny rostlin pěstovaných se sníženým obsahem fosfátu, kde byl více než dvojnásobný. Aktivita PPDK v rostlinách se sacharosou byla vyšší u rostlin M-P a M-N než u rostlin KM a KZ.



Obr.50 : Aktivita PPDK vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO₂ (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO₂ (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosy (SR1+S), nebo bez sacharosy (SR1-S).

5.3.4 Aktivita NR v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů

Aktivita NR v jednotlivých porovnávaných skupinách rostlin tabáku je na obrázku 51. Výsledky jsou vztaženy na čerstvou hmotnost a vyjádřeny v $\text{nmol.hod}^{-1}.\text{ml}^{-1}$. Největší rozdíl aktivit mezi rostlinami pěstovanými v přítomnosti sacharosy a bez sacharosy byl u skupiny rostlin pěstovaných se sníženým obsahem fosfátu, který byl skoro trojnásobný. Ale i v dalších skupinách byl výrazný rozdíl mezi rostlinami se sacharosou a bez sacharosy. Nejvyšší aktivita NR byla v SR1+S rostlinách pěstovaných s limitovaným přístupem CO_2 .

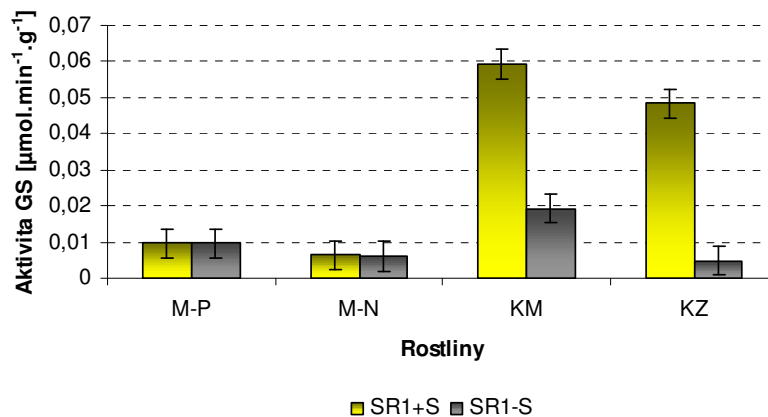


Obr.51 : Aktivita NR vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO_2 (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO_2 (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosy (SR1+S), nebo bez sacharosy (SR1-S).

5.3.5 Aktivita GS v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů

Na obrázku 52 (str.61) je vliv sacharosy na aktivitu GS ve všech sledovaných skupinách. Výsledky jsou vztaženy na čerstvou hmotnost a opět uvedeny v $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$.

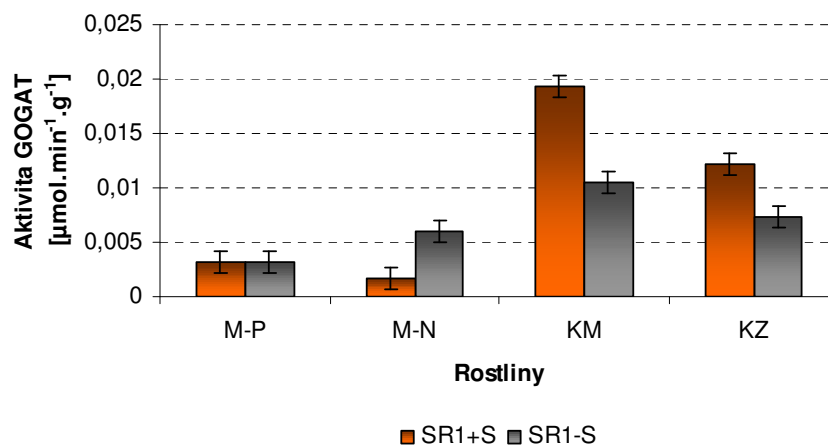
Nedostatek dusíkatých látek i fosfátu v kultivačním médiu znamená výrazné snížení aktivity GS, a to jak v přítomnosti sacharosy i bez ní. Pro ostatní rostliny byla podstatná přítomnost sacharosy.



Obr.52 : Aktivita GS vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO_2 (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO_2 (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosu (SR1+S), nebo bez sacharosu (SR1-S).

5.3.6 Aktivita GOGAT v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů

Na obrázku 53 je vliv sacharosu na aktivitu GOGAT ve všech sledovaných skupinách. Výsledky jsou vztaženy na čerstvou hmotnost a uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Snížená přítomnost dusíkatých látek a fosfátů v kultivačním médiu znamenala snížení aktivity GOGAT. Byl zjištěn též rozdíl mezi rostlinami s limitovaným a neomezeným přístupem CO_2 , zvláště v přítomnosti sacharosu.



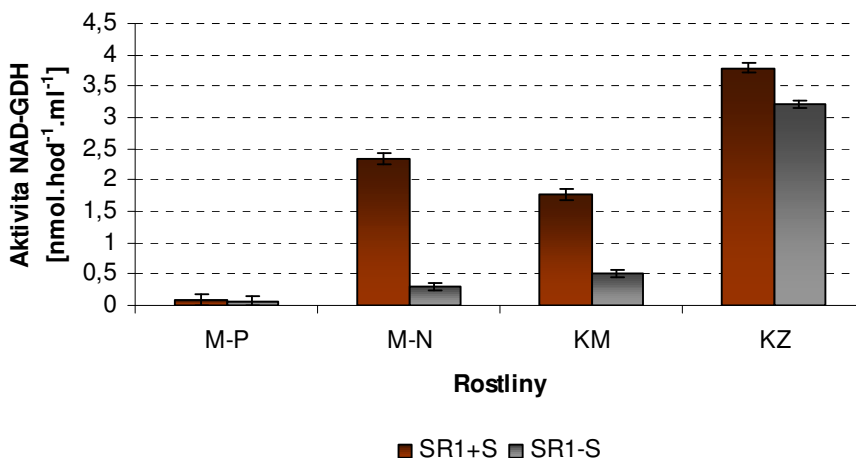
Obr.53 : Aktivita GOGAT vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO_2 (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO_2 (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosu (SR1+S), nebo bez sacharosu (SR1-S).

5.3.7 Aktivita NAD(P)-GDH v rostlinách tabáku pěstovaných s limitovaným množstvím nitrátů a fosfátů

Dalšími sledovanými enzymy byly NAD-GDH a NADP-GDH.

Na obrázcích 54 a 56 (str.63) jsou znázorněny aktivity NAD-GDH a NADP-GDH v jednotlivých experimentálních skupinách rostlin tabáku. Výsledky jsou vztaženy na čerstvou hmotnost a vyjádřeny v $\text{nmol.hod}^{-1}.\text{ml}^{-1}$.

Nejvyšší aktivita NAD-GDH byla zjištěna v listech rostlin pěstovaných s limitovaným přístupem CO_2 . Naopak velmi nízká aktivita NAD-GDH byla pozorována u skupiny rostlin pěstovaných se sníženým obsahem fosfátu. Největší rozdíl aktivity mezi rostlinami pěstovanými se sacharosou a bez sacharosy byl zjištěn u rostlin pěstovaných se sníženým obsahem dusíkatých látek.



Obr.54 : Aktivita NAD-GDH vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO_2 (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO_2 (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosy (SR1+S), nebo bez sacharosy (SR1-S).

Aktivita NAD-GDH v 6 - 12 % gradientovém gelu specificky detekovaná po elektroforetické separaci v nedenuroující prostředí je znázorněna na obrázku 55 (str.63). Nalezená vyšší aktivita NAD-GDH v listech rostlin KM a KZ a nižší aktivita u rostlin M-P a M-N odpovídá výsledku měření aktivity spektrofotometricky.

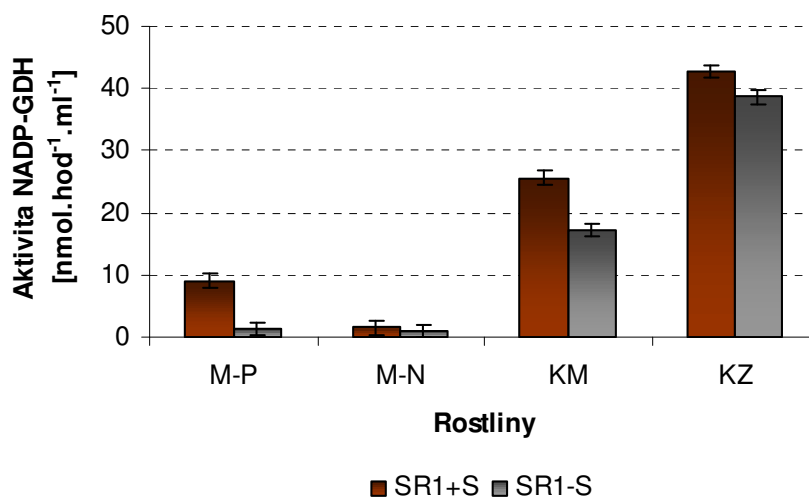
1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.



Obr.55 : Detekce aktivity NAD-GDH v 6-12 % gradientovém gelu po elektroforetické separaci v nedenuroujícím prostředí. Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu (25 μ l).

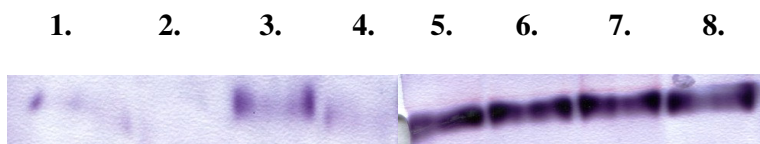
1. dráha – Rostlina se sníženým obsahem dusíkatých látek se sacharosou (M-P+S)
2. dráha – Rostlina se sníženým obsahem dusíkatých látek bez sacharosy (M-P-S)
3. dráha – Rostlina se sníženým obsahem fosfátu se sacharosou (M-N+S)
4. dráha – Rostlina se sníženým obsahem fosfátu bez sacharosy (M-N-S)
5. dráha – Rostlina se sacharosou s přístupem CO₂ (KM+S)
6. dráha – Rostlina se sacharosou s limitovaným přístupem CO₂ (KZ+S)
7. dráha – Rostlina bez sacharosy s přístupem CO₂ (KM-S)
8. dráha – Rostlina bez sacharosy s limitovaným přístupem CO₂ (KZ-S)

Nejvyšší aktivita NADP-GDH byla stanovena opět u rostlin pěstovaných s limitovaným přístupem CO₂ a největší rozdíl aktivit mezi rostlinami se sacharosou a bez sacharosy byl nalezen u rostlin pěstovaných se sníženým obsahem fosfátu. Nejnížší aktivita NADP-GDH byla v rostlinách pěstovaných se sníženým obsahem dusíkatých látek.



Obr.56 : Aktivita NADP-GDH vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO₂ (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO₂ (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosy (SR1+S), nebo bez sacharosy (SR1-S).

Dále jsem zjišťovala aktivitu NADP-GDH v gradientovém gelu po elektroforéze v nedenaturujícím prostředí. Na obrázku 57 je srovnání všech experimentálních skupin. Výsledek opět odpovídá spektrofotometrickému stanovení aktivity, kde byla zjištěna vyšší aktivita u rostlin KM a KZ a nižší aktivita u rostlin M-P a M-N.



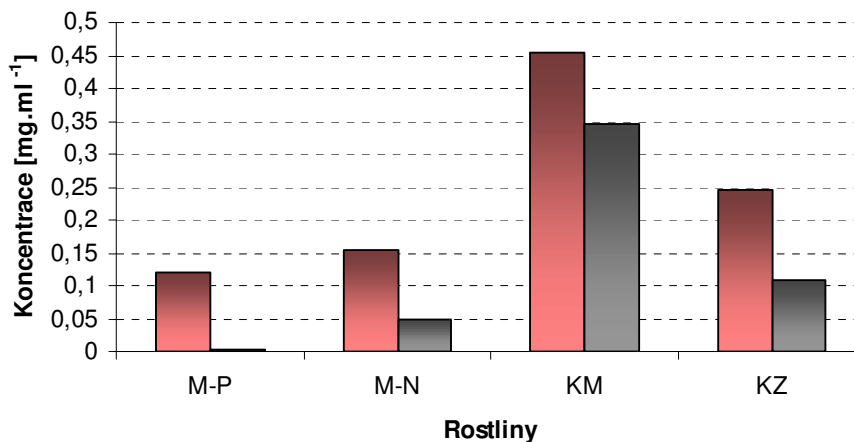
Obr.57 : Detekce aktivity NADP-GDH v 6-12 % gradientovém gelu po elektroforéze v nedenaturujícím prostředí. Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu (25 μ l).

1. dráha – Rostlina stresovaná nedostatkem dusíkatých látek se sacharosou (M-P+S)
2. dráha – Rostlina stresovaná nedostatkem dusíkatých látek bez sacharosy (M-P-S)
3. dráha – Rostlina stresovaná nedostatkem fosfátu se sacharosou (M-N+S)
4. dráha – Rostlina stresovaná nedostatkem fosfátu bez sacharosy (M-N-S)
5. dráha – Kontrolní rostlina se sacharosou s přístupem CO₂ (KM+S)
6. dráha – Kontrolní rostlina se sacharosou bez přístupu CO₂ (KZ+S)
7. dráha – Kontrolní rostlina bez sacharosy s přístupem CO₂ (KM-S)
8. dráha – Kontrolní rostlina bez sacharosy bez přístupu CO₂ (KZ-S)

5.3.8 Obsah bílkovin

V rostlinných extraktech všech osmi sledovaných skupin jsem stanovila obsah rozpustných bílkovin pomocí stanovení podle Bradfordové (obr.58, str.65).

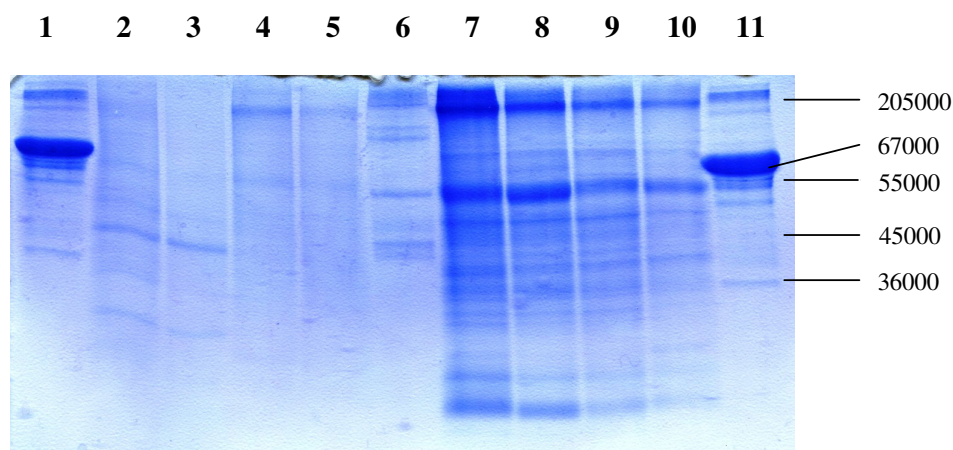
Nejvíce bílkovin bylo zjištěno v listech rostlin pěstovaných v Murashige-Skoogově médiu s neomezeným přístupem CO₂. Listy rostlin pěstovaných s přidavkem sacharosy obsahovaly více bílkovin než rostliny pěstované bez sacharosy. Největší rozdíl v množství rozpustných bílkovin mezi rostlinami pěstovanými se sacharosou a bez sacharosy byl nalezen u rostlin pěstovaných se sníženým obsahem fosfátu.



Obr.58 : Množství rozpustných bílkovin v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO₂ (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO₂ (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosa (SR1+S), nebo bez sacharosa (SR1-S).

5.3.9 Elektroforetická separace v prostředí SDS

Zastoupení celkových proteinů v extraktech rostlin jednotlivých experimentálních skupin bylo sledováno SDS-elektroforetickou separací v gradientu 10 – 15 % polyakrylamidového gelu (obr.59, str.66). Z obrázku je patrný silný proužek v drahách 7-10, který odpovídá relativní molekulové hmotnosti 55 000, jedná se o velkou podjednotku RubisCo. V drahách 2-5 jsou odpovídající proužky velmi slabé. V drahách s extrakty z rostlin s nízkým obsahem fosfátu (dráha 2 a 3) je protein odpovídající molekulové hmotnosti přibližně 40 000, který u rostlin s nízkým obsahem dusíkatých látek viditelný není. V drahách 7-10 jsou přítomny nízkomolekulární proteiny, které jsou u rostlin pěstovaných se sacharosou více zastoupeny. V extraktech rostlin pěstovaných s nízkým obsahem fosfátu a dusíkatých látek (dráha 2-5) tyto proteiny nejsou patrné.



Obr.59 : Elektroforetická separace v SDS prostředí v gradientu 10 % až 15% polyakrylamidovém gelu. Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu (25 μ l).

1. dráha – BSA (50 μ g)
2. dráha – Rostlina se sníženým obsahem fosfátu se sacharosou (M-P+S).
3. dráha – Rostlina se sníženým obsahem fosfátu bez sacharosy (M-P-S)
4. dráha – Rostlina se sníženým obsahem dusíkatých látek se sacharosou (M-N+S)
5. dráha – Rostlina se sníženým obsahem dusíkatých látek bez sacharosy (M-N-S)
6. dráha – Komerční standard
7. dráha – Rostlina se sacharosou s přístupem CO₂ (KM+S)
8. dráha – Rostlina se sacharosou s limitovaným přístupem CO₂(KZ+S)
9. dráha – Rostlina bez sacharosy s přístupem CO₂ (KM-S)
10. dráha – Rostlina bez sacharosy s limitovaným přístupem CO₂(KZ-S)
11. dráha – BSA (50 μ g)

6. DISKUSE

Metabolismus rostlin je značně ovlivněn dostupností živin a dalšími fyziologickými podmínkami. V této práci jsem pro sledování vlivu dostupnosti živin používala rostliny tabáku pěstované v Murashige-Skoogově médiu, kde lze měnit koncentraci použitých složek.

Cílem diplomové práce bylo zjistit, jakým způsobem ovlivní složení kultivačního média aktivitu enzymů dlouhodobě studovaných v naší laboratoři v souvislosti se stresem rostlin. [19] [50] [51] [52] [82] Jedná se především o PEPC, dále NADP-ME a PPDK.

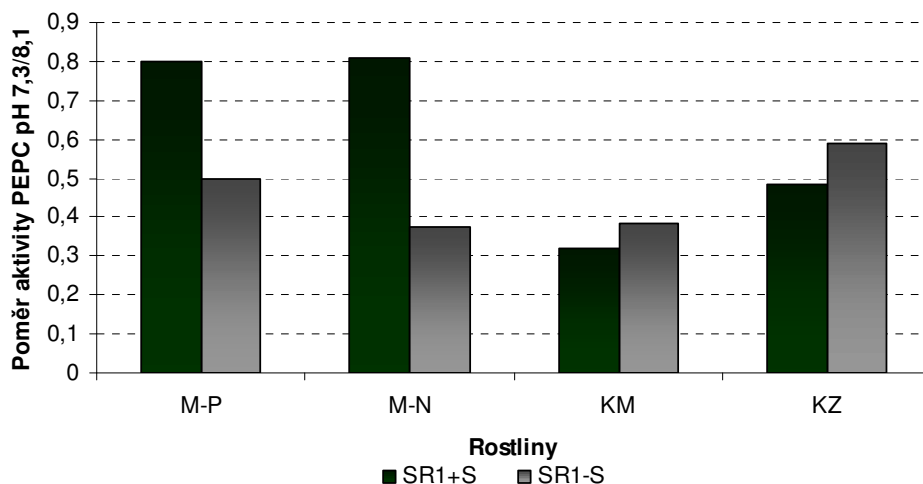
Vzhledem k tomu, že PEPC úzce souvisí s příjmem a s metabolismem dusíku a zároveň propojuje metabolismus sacharidů a aminokyselin, byla sledována také aktivita enzymů podílejících se na příjmu a metabolismu dusíkatých látek, jmenovitě NR, GS, GOGAT a GDH.

Součástí kultivačního média je často dodatečný zdroj uhlíku v podobě 2 % sacharosy. Zjišťovala jsem tedy nejprve vliv přidané sacharosy do kultivačního média na sledované enzymy. Z hlediska zdrojů uhlíku jsem ještě sledovala skupiny rostlin s limitovaným množstvím CO₂ a neomezeným přístupem CO₂.

Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že aktivitu PEPC všechny tyto faktory ovlivňují. Přítomnost sacharosy v kultivačním médiu znamená vyšší aktivitu PEPC než její přítomnosti. Limitovaná dostupnost CO₂ představuje nižší aktivitu PEPC než neomezený přístup CO₂. Více než zdroj uhlíku ovlivnila aktivitu PEPC dostupnost dusíkatých látek v kultivačním médiu. Dvacetinásobné snížení koncentrace KNO₃ a NH₄NO₃ znamenalo podstatné snížení aktivity PEPC. Tento výsledek je ve shodě s jinými autory. [76] [78] Desetinásobné snížení koncentrace fosfátu znamenalo též podstatné snížení aktivity PEPC. Tento výsledek je překvapivý, protože nedostatek fosfátu v řadě experimentálních modelů vedl naopak ke zvýšení aktivity PEPC. [5] [77] To se však týká především kořenů, v této práci byla PEPC sledována pouze v listech a přepokládá se další výzkum.

Pokusila jsem se také sledovat změny ve fosforylaci PEPC v závislosti na složení kultivačního média rostlin tabáku. Fosforylace molekuly PEPC mění některé její vlastnosti. Ke sledování fosforylace se často využívá inhibice malátem [2], avšak v případě rostlin tabáku je tato metoda nevhodná. [50] [51] Další možností je sledovat poměr aktivit PEPC

při optimálním (8,1) a fyziologickém (7,3) pH, obr.60. [79] [80] [81]



Obr.60 : Poměr aktivit PEPC měřených při pH 7,3 a 8,1 v listech rostlin pěstovaných v otevřených kultivačních nádobách v podmínkách nedostatku fosfátů (M-P) nebo nitrátů (M-N) v porovnání s rostlinami s přístupem CO₂ (KM) a rostlinami pěstovanými v kultivačních nádobách s limitovaným přístupem CO₂ (KZ), a to buď v přítomnosti sacharosy (SR1+S), nebo bez sacharosy (SR1-S).

Zdá se, že enzym je více fosforylován právě v případech nedostatku dusíkatých látek a fosfátu, ale pouze při současném dodatečném zdroji uhlíku – sacharose. Pravděpodobně se tak rostlina snaží zvýšit aktivitu PEPC tímto způsobem, ale důležitá je právě přítomnost sacharosy jako zdroje energie a uhlíkatých skeletů pro další metabolismus. Tomuto výsledku odpovídá i obrázek 47, uvádějící změnu aktivity PEPC po působení alkalické fosfatasy. Pokles aktivity PEPC je vyšší v případě nízkých koncentrací dusíkatých látek a fosfátu v kultivačním médiu, avšak i v případě nepřítomnosti sacharosy.

Další vlastnost, kterou ovlivňuje fosforylace molekuly PEPC je aktivace glukosa-6-fosfátem. Z mých výsledků nevyplývá významný rozdíl. Aktivace byla velmi nízká a to především z důvodu špatně zvolených podmínek, bylo by vhodnější použít fyziologické pH a subsaturační koncentraci substrátu PEP. [82]

Aktivita NADP-ME v jednotlivých sledovaných skupinách rostlin tabáku (obr.48) měla podobný charakter jako PEPC (obr.44), avšak aktivita PPDK v těchto rostlinách byla nejvyšší v rostlinách ovlivněných nedostatkem dusíkatých látek či fosfátů v kultivačním médiu. Aktivita je za fyziologických podmínek v C3 rostlinách nízká, avšak je možné, že za podmínek stresu se význam tohoto enzymu zvyšuje.

Klíčovým enzymem příjmu dusíku rostlinami je nitrátreduktasa. Její aktivita byla rovněž ovlivněna všemi sledovanými parametry v kultivačním médiu. V přítomnosti sacharosy byla vždy aktivita NR vyšší než v rostlinách pěstovaných bez sacharosy. Byla důležitá i přítomnost CO₂. Za sníženého množství fosfátu a nepřítomnosti sacharosy byla aktivita NR nejnižší.

Sníženou koncentrací fosfátu a dusíkatých látek byla negativně ovlivněna GS, jejíž aktivita nebyla zvýšena ani v přítomnosti sacharosy (obr.52). Limitované množství CO₂ také znamenalo nízkou aktivitu GS, avšak v přítomnosti sacharosy byla aktivita GS výrazně zvýšena. Obdobná situace platí pro GOGAT.

Aktivita NAD i NADP dependentní GDH byla nejvyšší v rostlinách tabáku s limitovaným množstvím CO₂, nižší pak v rostlinách s neomezeným přístupem CO₂. Sacharosa měla ve všech případech pozitivní vliv na aktivitu NAD(P)-GDH. Nedostatek fosfátu a dusíkatých látek snížil aktivitu obou typů GDH.

Z uvedených výsledků vyplývá, že složení kultivačního média ovlivňuje metabolismus velmi výrazně. Je pravděpodobné, že budou ovlivněny i další, v této práci nesledované části metabolismu. Vzhledem k tomu, že enzymy PEPC, NADP-ME i PPKK zvyšují aktivitu v případě stresových podmínek, domnívám se, že by bylo užitečné sledovat rovněž vliv složení kultivačního média na metabolismus rostlin tabáku za těchto podmínek.

7. SOUHRN

1. Sacharosa přidaná do Murashige-Skoogova média *in vitro* pěstovaných rostlin tabáku způsobila zvýšení aktivity enzymů PEPC, NADP-ME a většiny enzymů souvisejících s příjmem a metabolismem dusíku – NR, GS, GOGAT i NAD-GDH a NADP-GDH.
2. Aktivita sledovaných enzymů byla ovlivněna dostupností CO₂. Byla zjištěna snížená aktivita PEPC, NR, GS a GOGAT v rostlinách, které měly k dispozici limitované množství CO₂. Zatímco aktivita NADP-ME, NAD-GDH a NADP-GDH byla v těchto rostlinách vyšší oproti rostlinám s neomezeným přístupem CO₂.
3. Snížená koncentrace dusíkatých látek (NH₄NO₃, KNO₃) v kultivačním médiu způsobila snížení aktivity sledovaných enzymů s výjimkou PPKK.
4. Také snížená koncentrace fosfátů způsobila výrazný pokles v aktivitě sledovaných enzymů, který byl v některých případech kompenzován přítomností sacharosy (PPDK, NR).

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Kai,Y.; Matsumura,H.; Izui,K. : Arch.Biochem.Biophys. 414, 170-179 (2003)
- [2] Izui,K., Matsumura,H., Furumoto,T., Kai,Y. : Annu. Rev. Plant Biol. 55, 69-84 (2004)
- [3] Svensson,P., Bläsing,O.E., Westhoff,P. : Arch.Biochem.Biophys. 414, 180-188 (2003)
- [4] Miyao,M., Fukayama,H. : Arch.Biochem.Biophys. 414, 197-203 (2003)
- [5] Toyota,K., Koizumi,N., Sato,F. : J. Exp. Bot. 384, 961-969 (2003)
- [6] Jeanneau,M., Vidal,J., Gouseet-Dupont,A., Lebouteiller,B., Hodges,M., Gerentes,D., Perez,P. : J. Exp. Bot. 53, 1837-1845 (2002)
- [7] Fukayama,H., Tamai,T., Taniguchi,Y., Sullivan,S., Miyao,M., Nimmo,H.G. : Plant J. 47, 258-268 (2006)
- [8] Ting, I.P., Osmond, C.B. : Plant Physiol. 51, 448-453 (1973)
- [9] Voet D., Voet J. : Biochemie, Victoria Publishing (1995)
- [10] Slack,C.R., Hatch,M.D. : Biochem. J. 103, 660-665 (1967)
- [11] Andreo,C.S., Gonzales,D.H., Iglesias,A.A. : FEBS Lett. 213, 1-8 (1987)
- [12] Buchanan,B., Gruissem,W., Jones,R. : Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Wiley (2002)
- [13] Fukayama, H., Tamai, T., Taniguchi, Y., Sullivan, S., Miyao, M., Nimmo, H.G. : Plant J. 47, 258-268 (2006)
- [14] Škřetová,D. : Studium regulace fosfoenolpyruvátkarboxylasy ve vyšších rostlinách. Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie (2010)
- [15] Chollet,R., Vidal,J., O'Leary,M.H. : Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 273-98 (1996)
- [16] Nimmo,H.G. : Arch. Bioch. Biophys. 414, 189-196 (2003)
- [17] Fukayama,H., Tamai,T., Taniguchi,Y., Sullivan,S., Miyao,M., Nimmo,H.G. : Plant J. 47, 258-268 (2006)
- [18] Foyer,Ch.H., Valadier,M.H., Migge,A., Becker,T.W. : Plant Physiol. 117, 283-292 (1998)
- [19] Ryšlavá,H., Doubnerová,V. : Chem. listy (v tisku)
- [20] Tschoep,H., Gibon,Y., Carillo,P., Armengaud,P., Szecowka,M., Nunes-Nesi,A., Fernie,A.R., Koehl,K., Stitt,M. : Plant Cell Environ. 32, 300-318 (2009)

- [21] Zehnálek,J., Adam,V., Kizek,R. : Chem. Listy 100, 508-514 (2006)
- [22] Lasa,B., Frechilla,S., Aparicio-Tejo,P.M., Lamsfus,C. : Plant Physiol. Bioch. 40, 969-976 (2002)
- [23] Šetlík,Seidlová,Šantrůček (unpublished) : Fyziologie rostlin – 5. Enzymové reakce fotosyntézy
- [24] Luštinec,J., Žárský,V. : Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Karolinum, Praha (2003)
- [25] Gastal,F., Lemaire,G. : J. Exp. Bot. 53, 789-799 (2002)
- [26] Valadier,M., Yoshida,A., Grandjean,O., Morin,H., Kronenberger,J., Boutet,S., Raballand,A., Hase,T., Yoneyama,T., Suzuki,A. : FEBS J. 275, 3193-3206 (2008)
- [27] Oliveira,I.C., Brenner,E., Chiu,J., Hsieh,M., Kouranov,A., Lam,H., Shin,M.J., Coruzzi,G. : Braz. J. Med. Biol. Res. 34, 567-575 (2001)
- [28] Masclaux-Daubresse,C., Reisdorf-Cren,M., Pageau,K., Lelandais,M., Grandjean,O., Kronenberger,J., Valadier,M., Feraud,M., Jouglet,t., Suzuki,A : Plant Physiol. 140, 444-456 (2006)
- [29] Masclaux-Daubresse,C., Carrayol,E. : Planta 221, 580-588 (2005)
- [30] Skipper,L., Campbell,W.H., Mertens,J.A., Lowe,D.J. : J. Biol. Chem. 276, 26995-27002 (2001)
- [31] Hirasawa,M., Dose,M.M., Kleis-SanFrancisco,S., Hurley,J.K., Tollin,G., Knaff,D.B. : Arch. Biochem. Biophys. 354, 95-101 (1998)
- [32] Kuznetsova,S., Knaff,D.B., Hirasawa,M., Lagoutte,B., Sétif,P. : Biochemistry 43, 510-517 (2004)
- [33] Ishiyama,K., Inoue,E., Watanabe-Takahashi,A., Obara,M., Yamaya,T., Takahashi,H. : J. Biol. Chem. 279, 16598-16605 (2004)
- [34] Gawronski,J.D., Benson,D.R. : Anal. Biochem. 327, 114-118 (2004)
- [35] Forde,B.G., Lea,P.J. : J. Exp. Bot. 58, 2339-2358 (2007)
- [36] Oliveira,I.C., Coruzzi,G.M. : Plant Physiol. 121, 301-309 (1999)
- [37] Ishiyama,K., Inoue,E., Yamaya,T., Takahashi,H. : Plant Cell Physiol. 47, 299-303 (2006)
- [38] Zhang,Ch., Peng,S., Peng,X., Chavez,A.Q., Bennett,J. : Plant Sci. 125, 163-170 (1997)
- [39] Suzuki,A., Rothstein,S. : Eur. J. Biochem. 243, 708-718 (1997)

- [40] Blanco,L., Reddy,P., Silvente,S., Bucciarelli,B., Khandual,S., Alvarado-Affantranger,X., Sánchez,F., Miller,S., Vance,C., Lara-Flores,M. : *Plant Cell Environ.* 31, 454-472 (2008)
- [41] Meers,J.L., Tempest,D.W., Brown,C.M. : *J. Gen. Microbiol.* 64, 187-194 (1970)
- [42] Wang,Z., Yuan,Y., Ou,J., Lin,Q., Zhang,Ch. : *J. Plant Physiol.* 164, 695-701 (2007)
- [43] Purnell,M.P., Botella,J.R. : *Plant Physiol.* 143, 530-539 (2007)
- [44] Procházka,S., Macháčková,I., Krekule,J., Šebánek,J. : *Fyziologie rostlin.* Academia, Praha (1998)
- [45] Murmu,J., Chinthapalli,B., Raghavendra,A.S. : *J. Exp. Bot.* 54, 2661-2668 (2003)
- [46] Penaloza,E., Munoz,G., Slavo-Garrido,H., Silva,H., Corcuera,L.J. : *J. Exp. Bot.* 56, 145-153 (2004)
- [47] Ksouri,R., Debez,A., Mahmoudi,H., Ouerghi,Z., Gharsalli,M., Lachaal,M. : *Plant Physiol. Bioch.* 45, 315-322 (2007)
- [48] De Nisi,P., Zocchi,G. : *J. Exp. Bot.* 51, 1903-1909 (2000)
- [49] Gonzáles,M.C., Sánchez,R., Cejudo,F.J. : *Planta* 216, 985-992 (2003)
- [50] Müller,K. : Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in tobacco plants during potyviral infection. Dizertační práce PšF UK Praha, katedra biochemie (2008)
- [51] Müller,K., Dubnerová,V., Synková,H., Čerovská,N., Ryšlavá,H. : *Biol. Chem.* 390, 245-251 (2009)
- [52] Ryšlavá,H., Müller,K., Semorádová,Š., Synková,H., Čerovská,N. : *Photosynthetica* 41, 357-363 (2003)
- [53] Edwards,G.E.; Andreo,C.S. : *Phytochem.* 31, 1845 – 1857 (1992)
- [54] Wheeler,M.C.G., Tronconi,M.A., Drincovich,M.F., Andreo,C.S, Flügge,U., Maurino,V.G. : *Plant Physiol.* 139, 39-51 (2005)
- [55] Chi,W., Zhou,J., Zhang,F., Wu,N. : *Acta Bot. Sin.* 46, 873-882 (2004)
- [56] Müller,G.L., Drincovich, M.F., Andreo,S., Lara,M.V. : *Plant Cell Physiol.* 49, 469-480 (2008)
- [57] Wheeler,M.C., Arias,C.L., Tronconi,M.A., Maurino,V.G., Andreo,C.S, Drincovich,M.F. : *Plant Mol. Biol.* 67, 231-242 (2008)
- [58] Yang,Z., Lanks,Ch.W., Tong,L. : *Structure* 10, 951-960 (2002)
- [59] Tronconi,M.A., Fahnenstich,H., Weehler,M.C.G., Andreo,C.S., Flügge,U., Drincovich,M.F., Maurino,V.G. : *Plant Physiol.* 146, 1540-1552 (2008)

- [60] Parsley,K., Hibberd,J.M. : *Plant Mol. Biol.* 62, 339-349 (2006)
- [61] Moons,A; Valcke,R.; Van Montagu,M. : *Plant J.* 15, 89 – 98 (1998)
- [62] 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.; Chollet,R. : *Plant Physiol.* 128, 1368 – 1378 (2002)
- [63] Burnell,J.N., Chastain,Ch.J. : *Biochem. Bioph. Res. Co.* 345, 675-680 (2006)
- [64] Taylor,L., Nunes-Nesi,A., Parsley,K., Leiss,A., Leach,G., Coates,S., Wingler,A..., Fernie,A.R., Hibberd,J.M. : *Plant J.* 62, 641-652 (2010)
- [65] Chastain,Ch.J., Heck,J.W., Colquhoun,T.A., Voge,D.G., Gu,X. : *Planta* 224, 924-934 (2006)
- [66] Ohta,S., Ishida,Y., Usami,S. : *Transgenic Res.* 13, 475-485 (2004)
- [67] Chastain,Ch.J., Xu,W., Parsley,K., Sarath,G., Hibberd,J.M., Chollet,R. : *Plant J.* 53, 854-863 (2008)
- [68] Nakanishi,T., Nakatsu,T., Matsuoka,M., Sakata,K., Kato,H. : *Biochemistry* 44, 1136-1144 (2005)
- [69] Semorádová,Š., Synková,H., Pospíšilová,J. : *Photosynthetica* 40, 605-614 (2002)
- [70] Debouba,M., Gouia,H., Suzuki,A., Ghorbel,M.H. : *J. Plant Physiol.* 163, 1247-1258 (2006)
- [71] Manchenko,G.P. : *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*, CRC Press (1994)
- [72] Laemmli,U.K. : *Nature* 227, 680-685 (1970)
- [73] Lee,D.H., Lee,C.B. : *Plant Sci.* 159, 75–85 (2000)
- [74] Maurino,V.G., Saigo,M., Andreo,G.S, Drincovich,M.F. : *Plant Mol. Biol.* 45, 409-420 (2001)
- [75] Bradford,M.M. : *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
- [76] Sugiharto,B., Sugiyama,T. : *Plant Physiol.* 98, 1403-1408 (1992)
- [77] Gregory,A.L., Hurley,B.A., Tran,H.T., Valentine,A.J., She.Y.M., Knowles,V.L., Plaxton,W.C. : *Biochem. J.* 420, 57-65 (2009)
- [78] Murchie,E.H., Ferrario-Méry,S., Valadier,M., Foyer,C.H. : *J. Exp. Bot.* 51, 1349-1356 (2000)
- [79] Tripodi,K.E., Turner,W.L., Gennidakis,S., Plaxton,W.C. : *Plant Physiol.*139, 969-978 (2005)

- [80] Osuna,L., Gonzalez,M., Cejudo,F.J., Vidal,J., Echevarria,C. : Plant Physiol. 111, 551-558 (1996)
- [81] Feria,A., Alvarez,R., Cochereau,L., Vidal,J., García-Maurino,S., Echevarria,C. : Plant Physiol. 148, 761-774 (2008)
- [82] Miedzińska,L. : Vliv sucha na metabolismus rostlin tabáku. Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie (2010)

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka