

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Veronika Plisková

Souvislost abiotického stresu s NADP-dependentními enzymy v rostlinách
Connection between abiotic stress and NADP-dependent enzymes in plants

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Veronika Doubnerová Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 3. 6. 2011

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Veronice Doubnerové, PhD. za veškeré rady čas, a trpělivost, které mi při sestavování této práce věnovala.

Také bych ráda poděkovala RNDr. Václavu Červenému, PhD. z katedry Analytické chemie PŘF UK v Praze za odbornou pomoc při analytických stanoveních.

Seznam použitých zkratk

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AES	atomová emisní spektrometrie
C ₃ -rostliny	rostliny, jejichž prvním fotosyntetickým produktem je tříuhlíkatá látka (3-fosfoglycerát)
C ₄ -rostliny	rostliny, jejichž prvním fotosyntetickým produktem je čtyřuhlíkatá látka (oxalacetát)
CAM	metabolismus rostlin z čeledi tlusticovitých (z angl. Crassulacean acid metabolism)
DTT	dithiothreitol
EC	EC number (=Enzyme Commission number) číselné klasifikační schéma pro enzymy
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
g	tíhové zrychlení ($g=9,807 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$)
G6PDH	glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, (EC 1.1.1.49)
GOGAT	glutamátsynthasa (EC 1.4.1.7 nebo EC 1.4.1.14)
GS	glutaminsynthetasa (EC 6.3.1.2)
GS/GOGAT cyklus	glutaminsynthetasový/glutamátsynthasový cyklus
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ (NADPH)	nikotinamidadenindinulkeotidfosfát (redukovaný)
NADP-ICDH	NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasa (dekarboxylační) (EC 1.1.1.42)
NADP-ME	NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40)
PVP	polyvinylpolypyrrolidon
SDH	šikimátdehydrogenasa (EC 1.1.1.25)
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethan

Abstrakt

Solný stres se projevuje omezením růstu rostliny způsobeným snížením vodního potenciálu v listech, zavřenými průduchy a tím limitovanou fotosyntézou poskytující NADPH. Ten je však nepostradatelným koenzymem celé řady biosyntetických procesů (např. biosyntézy osmoticky aktivních látek zmírňujících účinky stresu) a antioxidačního systému.

V této práci bylo zjišťováno, zda se enzymy poskytující NADPH: glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (G6PDH), NADP-isocitrátdehydrogenasa (NADP-ICDH), NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát-dekarboxylační) (NADP-ME) a šikimátdehydrogenasa (SDH) podílejí na obranných reakcích vůči 100 mM NaCl. V experimentech byly použity tři různé modelové rostliny: *Pisum sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L. a *Cucumis sativa* L.

Zatímco v listech stresovaných rostlin hrachu a fazole došlo spíše k poklesu aktivit sledovaných NADP-dependentních (především G6PDH a NADP-ICDH), v listech okurky bylo 9. a 11. den působení stresu zjištěno zvýšení aktivity všech studovaných enzymů.

Současně byl v rostlinách vystavených působení solného stresu stanoven obsah Na⁺ iontů pomocí metody atomové emisní spektrometrie.

Abstract

Salt stress in plants is accompanied with decreased growth caused by lowered leaf water potential, closed stomata and thus reduced photosynthesis producing NADPH. However, NADPH is indispensable coenzyme for biosynthetic processes (e.g. biosynthesis of osmotically active compounds decreasing influence of stress) and for antioxidant system.

In this study it was examined, whether NADP-dependent enzymes: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH), NADP-malic enzyme (NADP-ME) and NADP-shikimate dehydrogenase (SDH), producing NADPH are involved in plant defence response against 100 mM NaCl. Three different model plants were used: *Pisum sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L. and *Cucumis sativa* L.

While in leaves of pea and bean plants salt stress caused rather decreased activities of particular NADP-dependent enzymes (especially of G6PDH and NADP-ICDH), in leaves of cucumber 9th and 11th day of stress condition were found increased activities of all studied enzymes.

Simultaneously the Na⁺ content in salt-stressed plants was analysed by atomic emission spectrometry.

Klíčová slova

Solný stres

NADPH

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (G6PDH)

NADP-isocitrátdehydrogenasa (NADP-ICDH)

NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát-dekarboxylační) (NADP-ME)

Šikimátdehydrogenasa (SDH)

Key words

Salt stress

NADPH

Glucose-6-phosphate dehydrogenase

NADP-isocitrate dehydrogenase

NADP-malic enzyme (decarboxylating)

Shikimate dehydrogenase

Obsah

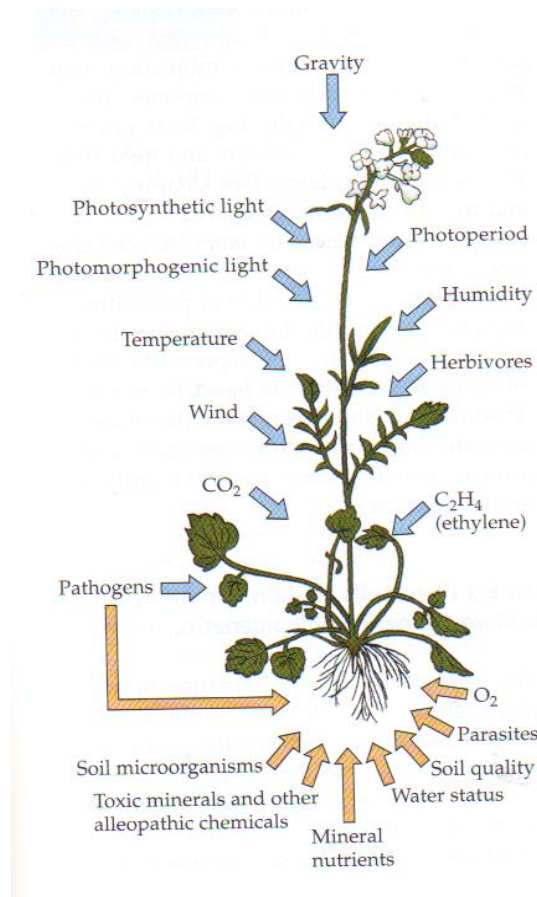
1	Úvod.....	3
1.1	Stres.....	3
1.2	NADPH.....	5
1.3	Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa.....	5
1.3.1	Funkce a výskyt.....	5
1.3.2	Souvislost s abiotickým stresem	7
1.4	NADP-isocitrátdehydrogenasa.....	7
1.4.1	Funkce a výskyt.....	7
1.4.2	Souvislost se stresem.....	8
1.5	NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)	9
1.5.1	Funkce a výskyt.....	9
1.5.2	Souvislost se stresem.....	10
1.6	Šikimátdehydrogenasa	11
1.6.1	Funkce a výskyt.....	11
1.6.2	Souvislost se stresem.....	13
2	Cíl práce	14
3	METODY.....	15
3.1	Použité chemikálie	15
3.2	Použité přístroje	15
3.3	Rostlinný materiál	15
3.4	Příprava vzorků pro stanovení enzymové aktivity	17
3.5	Příprava vzorků pro stanovení Na ⁺ iontů	17
3.6	Stanovení aktivity enzymů.....	17
3.6.1	Stanovení aktivity NADP-ICDH.....	17
3.6.2	Stanovení aktivity NADP-ME	17
3.6.3	Stanovení aktivity G6PDH.....	18

3.6.4	Stanovení aktivity SDH.....	18
3.7	Stanovení koncentrace Na ⁺ iontů v rostlinných extraktech.....	18
4	Výsledky	19
4.1	Návrh modelového systému.....	19
4.1.1	Výběr modelových rostlin.....	19
4.1.2	Optimalizace experimentálních podmínek.....	19
4.2	Vliv solného stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů.....	20
4.2.1	Vliv solného stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů v listech keříčkové fazole.....	21
4.2.2	Vliv solného stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů v listech hrachu setého.....	22
4.2.3	Vliv solného stresu na aktivitu NADP-ME v listech okurky seté.....	24
4.3	Stanovení koncentrace Na ⁺ v rostlinách vystavených solnému stresu.....	26
5	Diskuse.....	27
6	Závěr	30
7	Seznam použité literatury.....	31

1 Úvod

1.1 Stres

Stres je funkční stav, ke kterému dochází při vystavení organismu mimořádným podmínkám. Rostliny jako přisedlé organismy se nemohou vyhnout působení stresu, vyvinuly proto řadu metabolických cest, jak stresu čelit. Jsou to reakce na tzv. stresor neboli stresový podnět. Stresory můžeme rozdělit na biotické a abiotické. Biotickým stresem rozumíme různé infekce působené patogenními mikroorganismy (viry, viroidy, bakteriemi, houbami, hlísty) nebo stres působený herbivorními organismy či vzájemným ovlivňováním rostlin. Abiotický stres pak představuje vystavení různým fyzikálním a chemickým vlivům. Mezi fyzikální stresory rostlin patří vysoká nebo nízká teplota, mechanické účinky větru a nadměrné záření, mezi chemické přebytek či nedostatek vody nebo minerálů, nedostatek živin či kyslíku, těžké kovy v půdě a toxické plyny ve vzduchu viz obr. 1., str. 4. Výsledek působení stresoru závisí na délce a intenzitě vystavení organismu těmto podmínkám a na adaptačních schopnostech daného organismu. Rostlina se snaží buď stresu úplně vyvarovat většinou mechanickými bariérami např. silná kutikula listů, v tomto případě mluvíme o mechanismech avoidance, případně rostlina stres tzv. toleruje mechanismy aktivní odolnosti.^[1]



obr. 1: Signály vnějšího prostředí (fyzikální, chemické a biologické) ovlivňující růst a vývoj rostliny^[3]

Sucho, vysoká koncentrace soli i chlad ovlivňují vodní rovnováhu v rostlině. Tyto stresory vedou k uzavírání průduchů, a tím ke snížení fotosyntetické účinnosti. Současně se zvyšuje rychlost respirace. Stres ovlivňující vodní rovnováhu stejně jako biotický stres, nadměrné záření, vysoká koncentrace ozonu a těžké kovy, způsobuje oxidativní poškození. Tvoří se reaktivní formy kyslíku jako je peroxid vodíku, superoxidové anionty, hydroxidové radikály a perhydroxylové radikály. Tyto látky mohou v případě biotického stresu limitovat patogen přímo v místě vstupu infekce, ve všech typech oxidativního stresu indukují signální kaskády, které iniciují obranné odpovědi. Na druhou stranu reaktivní formy kyslíku současně silně poškozují lipidové součásti buňky, nukleové kyseliny a proteiny. Rostlina chrání vlastní struktury antioxidačním systémem askorbát-glutathionového cyklu.^[2] V rostlinách vystavených solnému stresu také dochází k biosyntéze osmoticky aktivních látek jako je např. prolin, glycinbetain, mannitol, pinitol, které regulují osmotický tlak buněk. Aby mohla rostlina přijímat vodu, musí být její vodní

potenciál nižší než vodní potenciál v okolní půdě, rostlina tedy musí vytvořit potenciálový gradient, aby mohla voda proudit z prostředí do rostliny.^[3]

1.2 NADPH

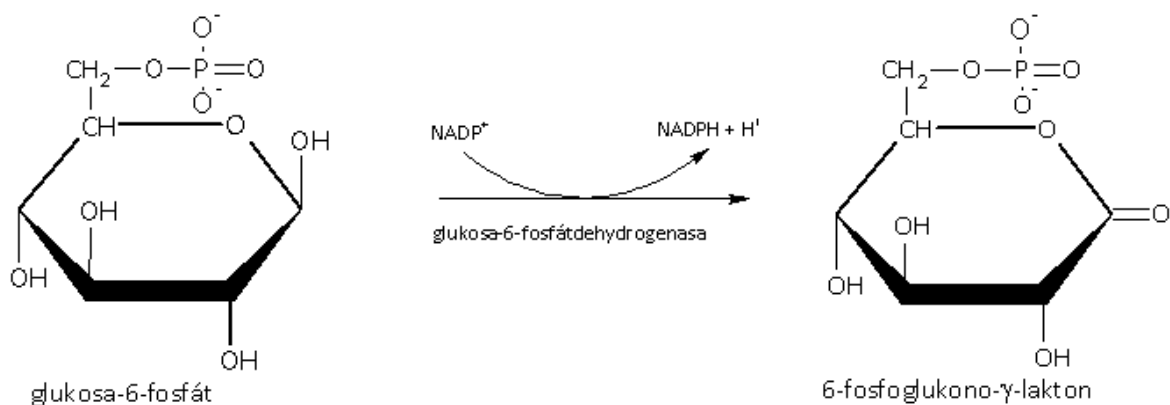
NADPH neboli nikotinamidadeninukleotidfosfát je významný koenzym mnoha enzymů. Má dvě formy oxidovanou NADP^+ a redukovanou $\text{NADPH} + \text{H}^+$, je schopen reverzibilně vázat vodík na C-4 pyridinového kruhu, který tím ztrácí aromatickou povahu a kladný náboj.^[4]

NADPH je rostlinou buňkou získáván především fotosyntézou. V nefotosyntetických částech rostlin a ve tmě též reakcemi katalyzovanými NADP-dependentními enzymy, jednak v oxidační fázi pentosafosfátového cyklu glukosa-6-fosfátdehydrogenasou (EC 1.1.1.49) a 6-fosfoglukonátdehydrogenasou (EC 1.1.1.44) a dále pak NADP-isocitrátdehydrogenasou (EC 1.1.1.42), NADP-glutamátdehydrogenasou (EC 1.4.1.4), NADP-malátdehydrogenasou (oxalacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40) a mnoha dalšími enzymy. Tyto reakce mohou být důležité také za stresových podmínek, kdy je fotosyntéza a tím i tvorba NADPH snížena. NADPH je využíván v mnoha biosyntetických drahách, při syntéze mastných kyselin, osmoticky aktivních látek (např. prolinu a mannitolu) a v šikimátové cestě vedoucí k syntéze aromatických aminokyselin a fenylypropanoidů (flavonoidů, ligninu). NADPH je dále spotřebováváno jako substrát NADPH-oxidasy produkující aktivní formy kyslíku při oxidativním stresu. Také se jedná o důležitý koenzym v antioxidačním askorbát-glutathionovém cyklu, kde je koenzymem glutathionreduktasy (EC 1.8.1.7) a monodehydroaskorbátreduktasy (EC 1.6.5.4).^[3]

1.3 Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

1.3.1 Funkce a výskyt

Systematický název: D-glukosa-6-fosfát: NADP^+ oxidoreduktasa (dále jen G6PDH)
Jedná se o enzym katalyzující přeměnu glukosa-6-fosfátu na 6-fosfoglukono- γ -lakton, během které dochází k redukci NADP^+ na $\text{NADPH} + \text{H}^+$.



Přítomnost G6PDH byla prokázána ve všech typech buněk, prokaryotických, eukaryotických – bakterií, rostlin, živočichů a hub.^[5] V buňce je G6PDH lokalizována v cytosolu, plastidech a sekundární buněčné stěně, což je struktura mezi buněčnou stěnou a cytoplazmatickou membránou některých rostlinných buněk.^[6]

Pro G6PDH izolovanou z rostlin petržele zahradní (*Petroselinum hortense* L.) byly stanoveny optimální pH hodnoty v intervalu 7-9.^[7] Relativní molekulová hmotnost byla stanovena 73 200 pro enzym izolovaný z koriandru setého (*Coriandrum sativum* L.) u tohoto enzymu bylo stanoveno pH optimum 8,5 a optimální teplota 30°C.^[8]

Reakce, kterou G6PDH katalyzuje je úvodní krok oxidační fáze pentosafosfátové cesty. Produktem oxidační fáze je ribosa-5-fosfát, která postupuje do druhé fáze ve které dochází k regeneraci hexos z pentos. Touto metabolickou dráhou je v rostlinách zpracováváno 20-30% sacharidů.^[4] Oxidační pentosafosfátový cyklus probíhá ve tmě v chloroplastech a jeho úkolem je získat NADPH pro biosyntézy. K aktivaci enzymu tedy dochází ve tmě. Naopak světlo a vysoký poměr NADPH/NADP⁺ G6PDH inhibuje.^[9]

Při měření aktivity G6PDH v plodech broskve bylo zjištěno, že aktivita cytosolové a plastidové G6PDH stoupá v období zrání. To naznačuje, že je tento enzym pravděpodobně významný pro regulaci syntézy antokyanu.^[6]

Při porovnávání aktivity G6PDH v 15 plodinách bylo zjištěno, že v semenech má G6PDH nejvyšší aktivitu v merlíku, pinii a máku. V listech byla z 21 druhů rostlin nejvyšší aktivita naměřena u hrachu, leknínu, růžičkové kapusty a okurky.^[10]

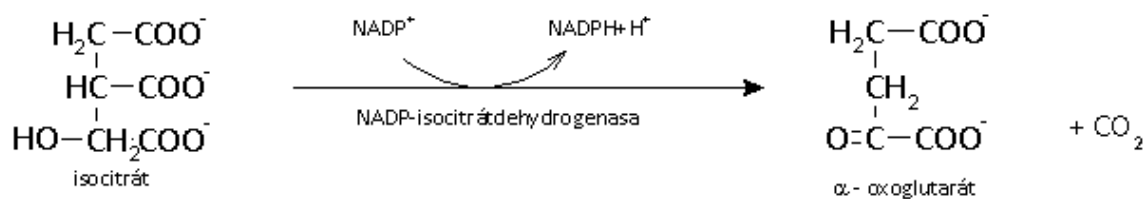
1.3.2 Souvislost s abiotickým stresem

Aktivita G6PDH po vystavení solnému stresu byla sledována u rostlin fazole (*Phaseolus vulgaris* L.), rostliny byly stresovány 50, 100, 150, 200 a 400 mM roztokem NaCl, přičemž nejvyšší aktivita G6PDH byla zjištěna u 100 mM roztoku.^[11] Zvýšení aktivity bylo zjištěno také u rostlin olivovníku (*Olea europaea* L.)^[12] a ostřice (*Carex moorcroftii* L.).^[13]

1.4 NADP-isocitrátdehydrogenasa

1.4.1 Funkce a výskyt

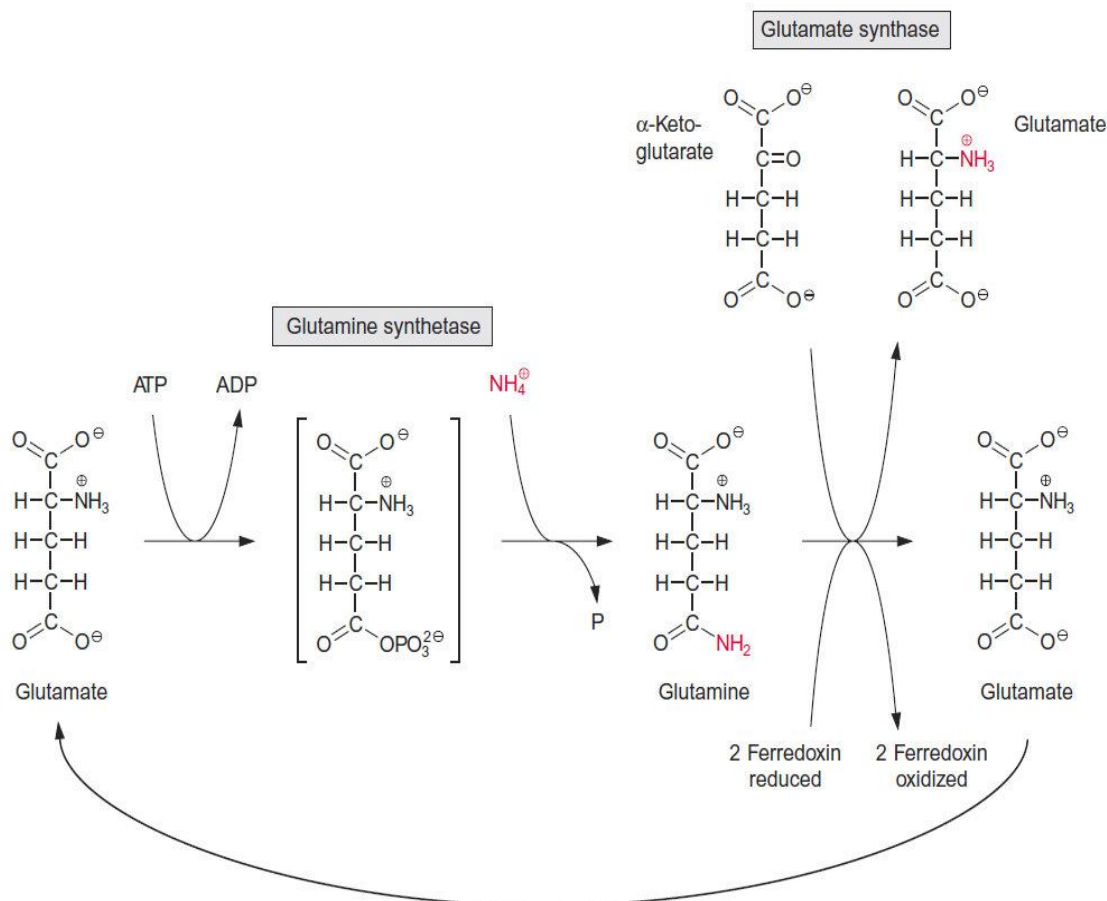
Systematický název: Isocitrát: NADP⁺ oxidoreduktasa (dekarboxylační) (dále jen NADP-ICDH) Tento enzym katalyzuje přeměnu isocitrátu na α -oxoglutarát, při současné redukci NADP⁺ na NADPH+H⁺ a v přítomnosti Mg²⁺ iontů jako kofaktoru.^[4]



Přítomnost enzymu byla prokázána v prokaryotických i eukaryotických buňkách, vyskytuje se v bakteriích, rostlinách, houbách a živočiších včetně člověka.^[5] V buňce je NADP-ICDH lokalizována v mitochondriích, chloroplastech, cytoplazmě a peroxizomech.^[14] Z rostlin tabáku byly izolovány 2 isoformy, první se vyskytuje v cytosolu, druhá pak v chloroplastech a mitochondriích.^[15]

NADP-ICDH se vyskytuje ve formě dimeru složeného ze dvou stejných podjednotek o relativních molekulových hmotnostech 48 500 u *Nicotiana tabacum* L.^[14] a 41 000 u *Pisum sativum* L.^[15]. Optimální podmínky byly stanoveny po izolaci z kukuřice seté (*Zea mays* L.) na pH optimum 7,4 a teplotu 25°C.

Zatímco NAD-dependentní isocitrátdehydrogenasa katalyzuje výše uvedenou reakci s koenzymem NAD⁺ v mitochondriích, kde je součástí citrátového cyklu, NADP-ICDH katalyzuje uvedenou reakci především v cytosolu. Produkt této reakce α -oxoglutarát je dále pomocí glutaminsynthetasy (GS, EC 6.1.1.3) a glutamátsynthasy (GOGAT, EC 1.4.11.14) v tzv. GS/GOGAT cyklu lokalizovaného v chloroplastech přeměněn na glutamát^[2] viz obr. 2 str. 8.



obr. 2: Glutaminsynthetasový/glutamátsynthetasový (GS/GOGAT) cyklus, u kterého se předpokládá, že je hlavní součástí asimilace amonných iontů v rostlinách^[2]

Hodnoty aktivity NADP-ICDH byly porovnávány u různých rostlin. Při měření aktivity v 15 druzích semen byla nejvyšší aktivity zjištěna v semenech máku, merlíku a čočky, z 29 plodů, kořenů a hlíz měla nejvyšší aktivitu petržel, červená ředkev a celer, mezi 21 zkoumanými listy a stonky byla pak nejvyšší aktivita naměřena u hrachu, kapusty a okurky.^[10]

1.4.2 Souvislost se stresem

Souvislost snížené aktivity NADP-ICDH se stresem vyvolaným suchem byla sledována v čtyřtýdenních rostlinách hrachu setého (*Pisum sativum* L.).^[16]

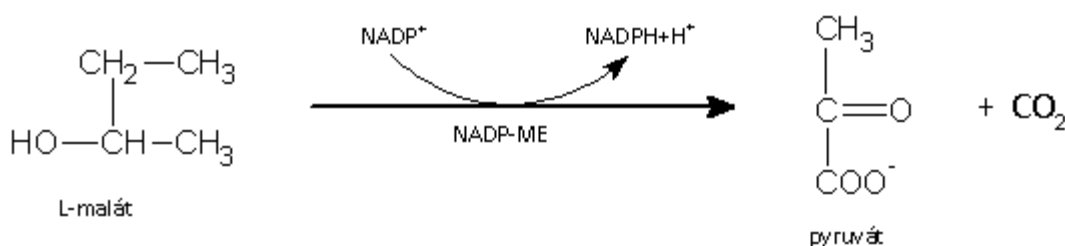
Zvýšená aktivita NADP-ICDH byla zjištěna při vystavení olivovníku (*Olea europaea* L.) solnému stresu.^[12] Zvýšená aktivita byla také zjištěna u 11 dní starých rostlin

keříčkové fazole (*Phaseolus vulgaris* L.) po působení stresu v podobě kadmnatých iontů (CdSO_4).^[17]

1.5 NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)

1.5.1 Funkce a výskyt

Systematický název: L-malát: NADP⁺ oxidoreduktasa (dále jen NADP-ME) Enzym katalyzující oxidační dekarboxylaci L-malátu na pyruvát za účasti koenzymu NADP⁺, který je redukován na NADPH + H⁺, a kofaktoru v podobě Mg²⁺ iontů.^[5]



NADP-ME byla dříve označována jako tzv. „jablečný enzym“^[18] NADP-ME byla nalezena ve všech typech organismů, u bakterií, člověka i v rostlinách.^[5]

Dosud bylo v rostlinách izolováno celkem sedm isoform, které můžeme dělit podle místa výskytu a funkce. Rozlišujeme fotosyntetické a nefotosyntetické isoformy.

Fotosyntetické isoformy:

1. $\text{C}_{4(1)}$ -NADP-ME, která se nachází v chloroplastech buněk pochev cévních svazků C_4 rostlin a
2. $\text{CAM}_{(1)}$ - NADP-ME přítomná v cytosolu CAM rostlin.

Nefotosyntetické isoformy:

3. $\text{C}_{4(2)}$ -NADP-ME, nacházející se v plastidech C_4 rostlin,
4. $\text{C}_{4(3)}$ -NADP-ME je isoforma obsažená v cytosolu C_4 rostlin a podílí se na vývoji listu, obraně při poranění a osvětlení.
5. $\text{C}_{3(1)}$ -NADP-ME nacházející se v cytosolu C_3 rostlin, poskytuje NADPH pro biosyntézu ligninu a flavonoidů. Byla nalezena v buňkách plodů rajčat a hroznového vína, kde se podílí na tvorbě pyruvátu a/nebo NADPH pro buněčné dýchání v období zrání.
6. $\text{C}_{3(2)}$ -NADP-ME izolovaná z plastidů buněk kořenů i listů C_3 rostlin

7. CAM₍₂₎-NADP-ME^[19]

Relativní molekulová hmotnost NADP-ME z C₃, C₄ i CAM rostlin se pohybuje v rozsahu 62-72 000.^[19] Optimální teplota NADP-ME byla stanovena na 25-30°C, pH optimum je pak v rozmezí 7-8; neutrální pH okolo 7,0-7,4 bylo zjištěno zejména pro C₃ (např. *Nicotiana tabacum*) a CAM rostliny, alkaličtější pH 7,4-8,0 pak bylo nalezeno pro C₄ rostliny (např. pro zelené listy kukuřice pH 8,0).^[5]

NADP-ME je důležitou součástí mnoha metabolických drah. Klíčovou roli má především ve fotosyntéze C₄ rostlin. V těchto rostlinách je fotosyntéza umožněna i v podmínkách sucha, horka a vysokých slunečních intenzit. To je dáno tím, že dochází k prefixaci CO₂ v mesofylových buňkách, vzniká C₄-dikarboxylová kyselina, která je transportována do buněk pochev cévních svazků. V chloroplastech těchto buněk dochází k dekarboxylaci a k poskytování CO₂ pro Calvinův cyklus přímo v místě jeho působení. Produkt této reakce, pyruvát, je transportován zpět do mesofylových buněk.^[18]

Nefotosyntetický NADP-ME se podílí na regulaci buněčného pH. V případě, že hodnota pH v buňce klesne do kyselé oblasti začne NADP-ME přeměňovat L-malát na méně kyselý pyruvát a tím zvýší pH.^[20] Mezi další funkce NADP-ME patří poskytování NADPH pro biosyntézy a poskytování pyruvátu pro respiraci.^[5] Významnou úlohu má NADP-ME také při zraní plodů.^[21]

Měřením aktivity NADP-ME v 13 různých semenech bylo zjištěno, že aktivita tohoto enzymu je největší u lískových ořechů, fazolí mandlí a čočky. Z 29 plodů, kořenů a hlíz měla nejvyšší aktivitu NADP-ME červená ředkev a celer. Z 21 listů a stonků různých rostlin měla pak nejvyšší aktivitu okurka, kapusta, česnek, fazole a hrách.^[10]

1.5.2 Souvislost se stresem

Změny aktivity NADP-ME byly studovány u rostlin olivovníku (*Olea europaea* L.), rostliny byly ve stáří 5-8 týdnů vystaveny solnému stresu 200 mM NaCl, přičemž bylo zjištěno zvýšení aktivity NADP-ME.^[12] Nárůst aktivity tohoto enzymu byl rovněž nalezen u rostlin rýže seté (*Oryza sativa* L.), stresované 100 mM a 125 mM NaCl.^[11] Dále bylo zjištěno zvýšení aktivity NADP-ME u rostlin keříčkové fazole (*Phaseolus vulgaris* L.) po aplikaci CdSO₄.^[17]

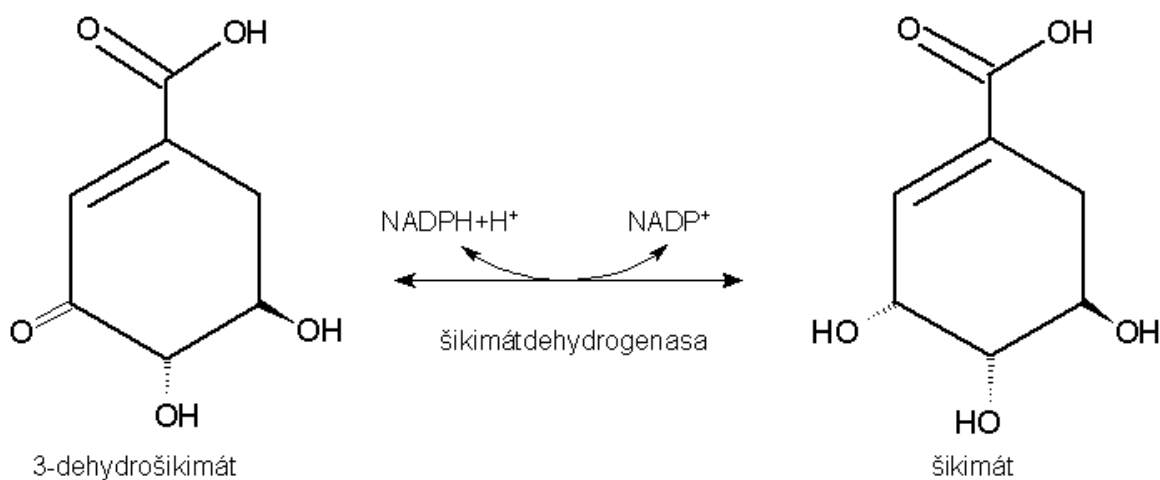
Zvýšená aktivita NADP-ME byla zjištěna v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) v podmínkách biotického stresu způsobeného virovou infekcí.^[22] Zvýšené aktivitě NADP-ME odpovídalo i zvýšené množství proteinu tohoto enzymu zjištěné imunochemicky pomocí protilátek a zvýšené množství mRNA pro cytosolovou isoformu, zatímco mRNA pro chloroplastovou isoformu ovlivněna nebylo.^[23]

Nárůst aktivity NADP-ME byl zjištěn také v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) pěstovaných v prostředí nedostatku vody. Po zalití se aktivita NADP-ME vrátila na úroveň kontrolních rostlin.^[24]

1.6 Šikimátdehydrogenasa

1.6.1 Funkce a výskyt

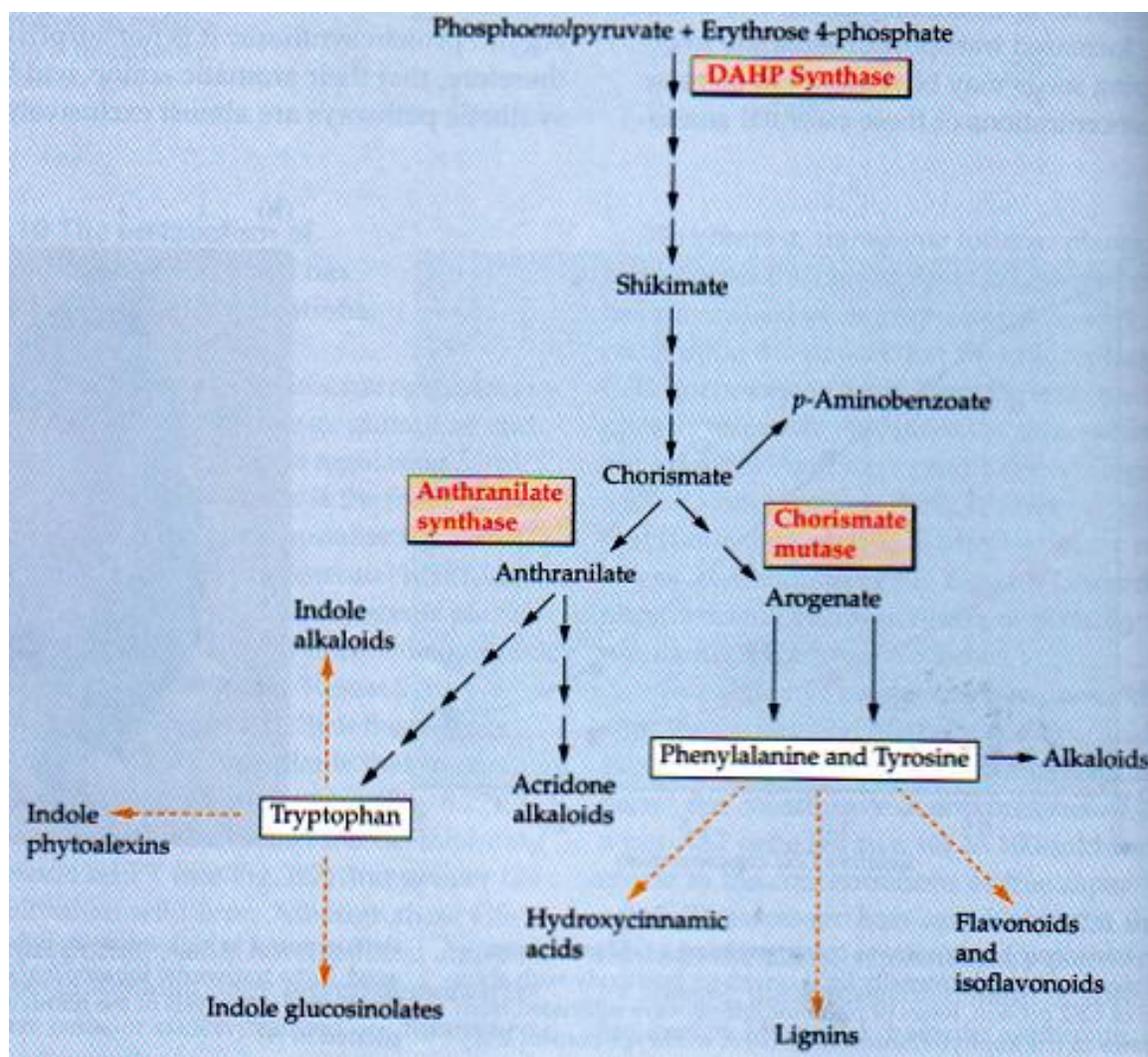
Systematický název: šikimát: NADP⁺ 3-oxioreduktasa (dále jen SDH). Katalyzuje reverzibilní přeměnu 3-dehydrošikimátu na šikimát pomocí koenzymu NADPH (NADP⁺).^[5]



SDH byla izolována z bakterií i rostlin, nenachází se však v živočišných buňkách.^[25] V buňce je SDH lokalizována v cytoplazmě a plastidech, především v chloroplastech.^[26]

Relativní molekulová hmotnost byla stanovena na 57 000 v enzymu izolovaného z hrachu setého dřeňového (*Pisum sativum* L.)^[27] a 73 000 pro enzym izolovaný z rostlin rajčat *Solanum lycopersicum*, pro tento enzym bylo stanoveno také pH optimum na pH 9.^[28] Stejná hodnota pH optima byl zjištěna i pro enzym izolovaný z rostlin tabáku *Nicotiana tabacum* L.^[26]

Výše uvedená reakce je součástí šikimátové cesty, která spojuje metabolismus sacharidů a biosyntézu aromatických aminokyselin. Jedná se o sedm reakcí, během kterých z fosfoenolpyruvátu a erytroza-4-fosfátu postupně vzniká šikimát a dále chorismát, což je prekurzor vzniku aromatických aminokyselin, ligninů, flavonoidů, indolu a alkaloidů viz obr. 3.^[25]



obr. 3: Úloha šikimátu v syntéze aminokyselin (tryptofanu, fenylalaninu a tyrosinu) a dalších látek (ligninů, flavonoidů, alkaloidů a látek odvozených od kyseliny hydroxyskořicové)^[3]

Aktivita SDH byla testována v semenech 15-ti různých rostlin, nejvyšší aktivita byla naměřena u hrachu, pinie, máku a fazole. Z 29 testovaných plodů, kořenů a hlíz byla nejvyšší aktivita zjištěna u petržele, cukety a červené ředkve. Mezi 21 porovnávanými listy a stonky měly nejvyšší aktivitu leknín, okurka a hrách.^[10]

1.6.2 Souvislost se stresem

Aktivita SDH byla sledována po aplikaci methyljasmonátu a kyseliny salicylové na kořeny rostlin ženšenu pravého (*Panax ginseng* L.). U obou látek bylo pozorováno zvýšení aktivity SDH.^[29]

2 Cíl práce

1. Zjistit, zda v rostlinách fazole, hrachu a okurky pěstovaných v prostředí NaCl je zvýšená koncentrace Na^+ iontů.
2. Zjistit, zda solný stres souvisí s aktivitou NADP-dependentních enzymů: G6PDH, NADP-ICDH, NADP-ME, SDH.

3 METODY

3.1 Použité chemikálie

2-amino-2-methyl-1-propanol, Sigma, USA

DTT, Sigma, USA

EDTA, Lachema, ČR

D-Glukosa-6-fosfát sodný, Sigma, USA

D, L-Isocitrát trisodný, Sigma, USA

L-malát sodný, Sigma, USA

MgCl₂, Sigma, USA

NADP⁺, Sigma, USA

Na⁺ (1,000±0,002 g/l), Analytika, ČR

NaCl, Lachema, ČR

PVP, Sigma, USA

Šikimát sodný, Sigma, USA

Tris (hydroxymethyl) aminomethan, Sigma, USA

3.2 Použité přístroje

Spektrofotometr Helios, Thermo Spectronic, USA

Centrifuga UNIVERSAL 32R, Hettich Zentrifugen, Německo

Analytické váhy XE Series 100A, Denver Instrument Company, USA

pH metr UB-10, Denver Instrument Company, USA

AAS spektrometr AAS 3, Zeiss Jena, Německo

3.3 Rostlinný materiál

Jako první byly pěstovány rostliny keříčkové fazole (*Phaseolus vulgaris* L., Golddikat (Wachs)), semena byla klíčena na buničité vatě po dobu tří dnů, následně byla

21 sazenice (o výšce 2-4 cm) zasazena do 3 nádob o objemu 3,5 l obsahujících půdu, kde byla pěstována dalších 15 dní. Doba osvětlení byla 15 hodin přirozeného denního světla a teplota se pohybovala kolem 23°C. Rostliny, vysoké 30-40 cm, byly vystaveny stresu 100 ml 50 mM NaCl aplikované v každodenní záливce od 18 dne stáří.

Pro následující sadu experimentů byly pěstovány rostliny keříčkové fazole (*Phaseolus vulgaris* L., Golddikat (Wachs)), hrachu setého dřevného (*Pisum sativum* L., convar. Medullare) a okurky seté (*Cucumis sativus* L. convar. Jogger F1) semena byla klíčena v minipařeništi na buničité vatě, kde byly rostliny pěstovány po celou dobu pokusu. Okolní teplota byla 22°C a doba osvětlení se pohybovala okolo 10 hodin přirozeného denního světla. Rostliny byly umístěny do dvou sadbovacích desek. Každá deska obsahovala šest sadbovacích míst, objem jednoho byl 100 ml. Jedna sadbovací deska obsahovala vždy 3 sadbovací místa obsahující hrách setý a 3 obsahující keříčkové fazole (okurku setou). Sadbovací desky pak byly rozděleny na 2 různé podložky a jedna byla zalévána 100 mM roztokem NaCl a druhá vodou. Počty rostlin a jejich stáří v období vystavení stresovým podmínkám jsou uvedeny v tabulce 1. Stresovými podmínkami rozumíme záливku 25 ml 100 mM NaCl na jedno sadbovací místo denně. K analýze pak byly použity vrchní listy těchto rostlin.

tabulka 1: Souhrn provedených experimentů

experiment		stáří rostlin [den]	počet rostlin
číslo	popis		
1	půda/buničitá vata	21	14/14
2	fazole stres NaCl	22-35	24
3	hrách stres NaCl	22-35	26
4	hrách stres NaCl	20-30	24
5	okurka stres NaCl	20-30	22

3.4 Příprava vzorků pro stanovení enzymové aktivity

Vrchní listy byly z rostlin odstříženy a následně homogenizovány s extrakčním pufrům v třecí misce pomocí tloučku. Jako extrakční pufr byl použit pufr, který obsahoval 100 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM DTT, 1 mM EDTA a 5 mM MgCl₂; vždy byly použity 3 ml pufru na 1g čerstvé hmoty vzorku. Po homogenizaci byl přidán 0,02 g PVP na 1 ml roztoku. Vzorky byly centrifugovány při 4°C, po dobu 15 minut, při 16 600 x g. Následně byl odebrán supernatant, který byl dále označen jako rostlinný extrakt a použit pro stanovení aktivity jednotlivých enzymů.

3.5 Příprava vzorků pro stanovení Na⁺ iontů

Vrchní listy byly odebrány také pro stanovení Na⁺ iontů v rostlinném extraktu. Homogenizace 1 g listů však byla prováděna pouze s 3 ml destilované vody. Vzorky byly centrifugovány při 4°C, po dobu 15 minut, při 16 600 x g. Následně byl odebrán supernatant, který byl dále označen jako rostlinný extrakt v destilované vodě, skladován při -25°C a před stanovením opět centrifugován při 4°C, po dobu 15 minut, při 16 600 x g.

3.6 Stanovení aktivity enzymů

Aktivita enzymů byla stanovována spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm. Na základě rozdílu absorbance oxidované a redukované formy koenzymu NADP⁺, který je největší při vlnové délce 340 nm. Měření trvalo vždy 5 minut a 50 sekund.

3.6.1 Stanovení aktivity NADP-ICDH

Aktivita NADP-ICDH byla měřena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr, pH=7,4; 2 mM isocitrát; 2 mM MgCl₂ a 0,2 mM NADP⁺. Reakce byla iniciována 50 μl rostlinného extraktu.

3.6.2 Stanovení aktivity NADP-ME

Aktivita NADP-ME byla měřena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pufru s pH = 7,4; 10 mM L-malátu; 2 mM MgCl₂ a 0,2 mM NADP⁺. Reakce byla iniciována 50 μl rostlinného extraktu.

3.6.3 Stanovení aktivity G6PDH

Aktivita G6PDH byla měřena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pufru s pH = 7,6; 10 mM D-glukosa-6-fosfát; 2 mM MgCl₂ a 0,2 mM NADP⁺. Reakce byla iniciována 50 µl rostlinného extraktu.

3.6.4 Stanovení aktivity SDH

Aktivita SDH byla měřena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol-NaOH pufr s pH = 9,0; 10 mM šikimát; a 0,2 mM NADP⁺. Reakce byla iniciována 50 µl rostlinného extraktu.

3.7 Stanovení koncentrace Na⁺ iontů v rostlinných extraktech

Koncentrace sodných iontů byly stanoveny v rostlinných extraktech v destilované vodě (příprava viz kapitola 3.5.2) pomocí atomové emisní spektrometrie (AES) s využitím spektrometru AAS 3 (Zeiss Jena, Německo). K určení koncentrace Na⁺ byla použita metoda standardního přídávku, kdy se porovnává signál získaný pro samotný vzorek se signálem téhož vzorku se známým množstvím přidaného standardu. Nespornou výhodou použité metody stanovení je, že v obou analyzovaných roztocích je přítomna stejná matrice; její vliv je tudíž minimalizován. Získané hodnoty intenzit emitovaného záření byly vyneseny do grafu a následně byla vypočítána koncentrace Na⁺ iontů ve vzorku v g/l a mol/l. Všechna stanovení byla prováděna ve třech opakováních pro každý vzorek a byla odhadnuta střední hodnota pomocí průměru a ta byla následně přepočítána na koncentraci.

4 Výsledky

4.1 Návrh modelového systému

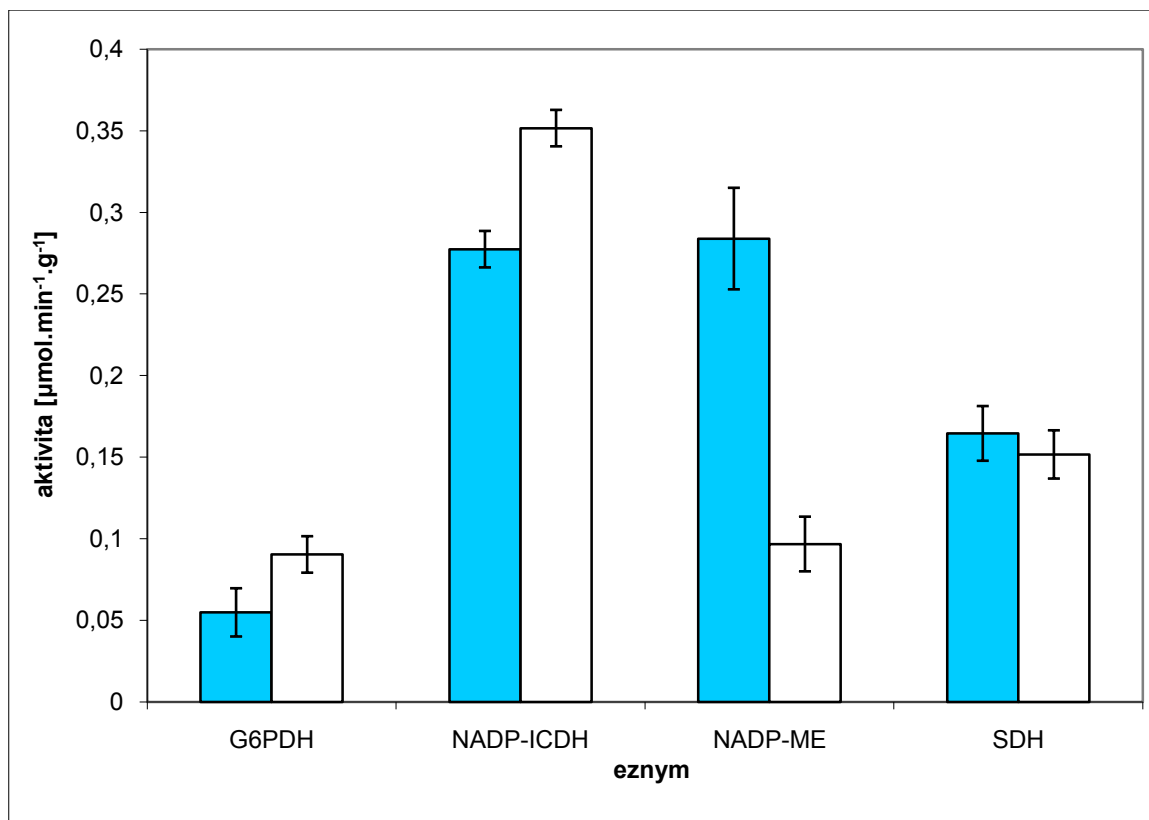
V této práci byla sledována aktivita významných NADP-dependentních enzymů (G6PDH, NADP-ICDH, NADP-ME a SDH) v souvislosti se stresem vyvolaným vysokou koncentrací NaCl. Postupně byly vybrány 3 různé modelové rostliny, aplikovány různé koncentrace NaCl, optimalizována délka působení stresoru i experimentální podmínky a zjištěna koncentrace Na⁺ v rostlinách.

4.1.1 Výběr modelových rostlin

Aktivita G6PDH, NADP-ICDH, NADP-ME a SDH byla stanovována v následujících rostlinách vystavených solnému stresu: v keříčkové fazoli (*Phaseolus vulgaris* L., Golddukat (Wachs)), v hrachu setém dřeňovém (*Pisum sativum* L. convar. Medullare) a v okurce seté (*Cucumis sativum* L. convar. Jogger F1). Výběr rostlin se řídil předchozími experimenty prováděnými v rámci bakalářské práce T. Koval'ové. Zvolené rostliny vykazovaly ve skupině 21 studovaných rostlin nejvyšší aktivitu NADP-dependentních enzymů v listech.^[10]

4.1.2 Optimalizace experimentálních podmínek

Rostliny byly nejprve pěstovány v půdě v 3,5 l nádobách po 6-8 rostlinách, poté na buničité vatě v minipařeništi (obsahujícím 6 sadbovacích míst po 100 ml) po 3-4 rostlinách v jednom sadbovacím místě. Pro experiment bylo použito 14 rostlin pěstovaných v půdě a 14 rostlin pěstovaných na buničité vatě. Bylo zjištěno, že pěstování na buničité vatě nezpůsobuje významné snížení aktivity G6PDH, NADP-ICDH a SDH v mladých (3-4 týdenních) rostlinách fazole (obr. 4, str. 20). Naopak aktivita zvolených enzymů v rostlinách pěstovaných na buničité vatě byla s rostlinami pěstovanými v půdě srovnatelná s výjimkou NADP-ME, jejíž aktivita byla v rostlinách pěstovaných na buničité vatě 2,9-krát nižší než aktivita v rostlinách pěstovaných v půdě.



obr. 4: Porovnání aktivity G6PDH, NADP-ICDH, NADP-ME a SDH v listech 3-týdenních rostlin fazole pěstovaných v půdě ■ a pěstovaných na buničité vatě □

Také pro působení solného stresu byly zvoleny 3-4 týdenní rostliny. Z literární rešerše bylo zjištěno, že nejčastěji používanou koncentrací NaCl k vyvolání solného stresu je 25-400 mM NaCl přidávaný buď v zálivce, nebo jako součást živného média, případně hydroponie.^{[12],[30],[31]} Ve všech experimentech této bakalářské práce byla použita koncentrace NaCl v zálivce 100 mM. Nižší 50 mM koncentrace neměla v rostlinách fazole pěstovaných v půdě na aktivitu vybraných NADP-dependentních enzymů významnější vliv (není znázorněno graficky), proto již dále nebyla použita.

Délka experimentu byla ovlivněna stářím a odolností rostliny, u rostlin pěstovaných na buničité vatě v minipařeništi se pohybovala kolem 2 týdnů.

4.2 Vliv solného stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů

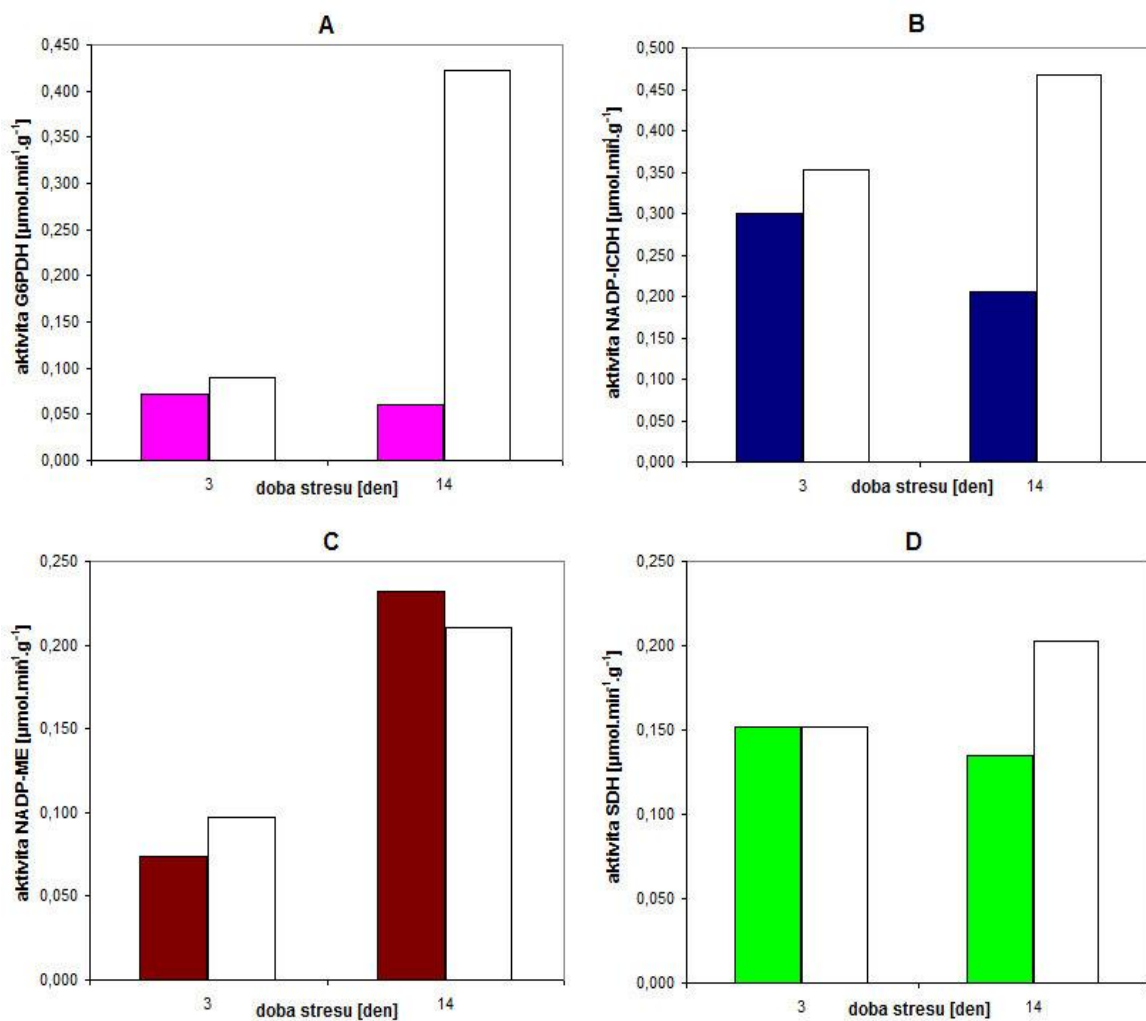
Celkem byly provedeny 4 experimenty sledování působení solného stresu na aktivitu G6PDH, NADP-ICDH, NADP-ME a SDH v rostlinách. V prvních dvou pokusech bylo solnému stresu vystaveno 24 rostlin keříčkové fazole a 26 rostlin hrachu setého po dobu čtrnácti dnů. Ve třetím a čtvrtém pokusu byly stresovány opět rostliny hrachu (24

roślin) a nově vybrané rostliny okurky (22) po dobu jedenácti dnů. Všechny rostliny byly pěstovány na buničité vatě v minipařeništi. Vždy polovina rostlin představovala rostliny kontrolní, zalévané vodou, polovina skupinu rostlin stresovaných, které byly zalévány 100 mM NaCl. Zálivka byla aplikována v objemu 25 ml 100 mM NaCl, případně u kontrolních rostlin 25 ml vody na každou 100 ml nádobku, a to každý nebo každý druhý den. Aktivita enzymů byla měřena ve zvolených intervalech působení stresových podmínek (viz obr. 5-8, str. 22-25).

4.2.1 Vliv solného stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů v listech keříčkové fazole

Na obr. 5 str. 22 jsou znázorněny aktivity jednotlivých enzymů v listech fazole v průběhu vystavení solnému stresu. Aktivita NADP-ICDH, G6PDH a SDH ve stresovaných rostlinách v průběhu pokusu klesala oproti aktivitě kontrolních rostlin, čtrnáctý den již významně, patrně z důvodu vyčerpání rostliny. Aktivita NADP-ICDH třetí den poklesla o 32% a čtrnáctý den o 56% v porovnání s aktivitou tohoto enzymu v kontrolních rostlinách. Pokles byl zaznamenán také v aktivitě G6PDH stresovaných rostlin, a to třetí den o 15% a čtrnáctý den o 86% v porovnání s kontrolními rostlinami. Aktivita SDH stresovaných rostlin byla čtrnáctý den o 33% nižší než kontrola. Jediný enzym, jehož aktivita byla čtrnáctý den působení solného stresu mírně vyšší (o 10%) než aktivita v kontrolních rostlinách byla NADP-ME.

Během pokusu byl pozorován nárůst aktivity NADP-dependentních enzymů v kontrolních rostlinách, pravděpodobně související s vývojem rostliny. Nejvíce se během čtrnácti dnů zvýšila aktivita G6PDH, a to o 370 %.



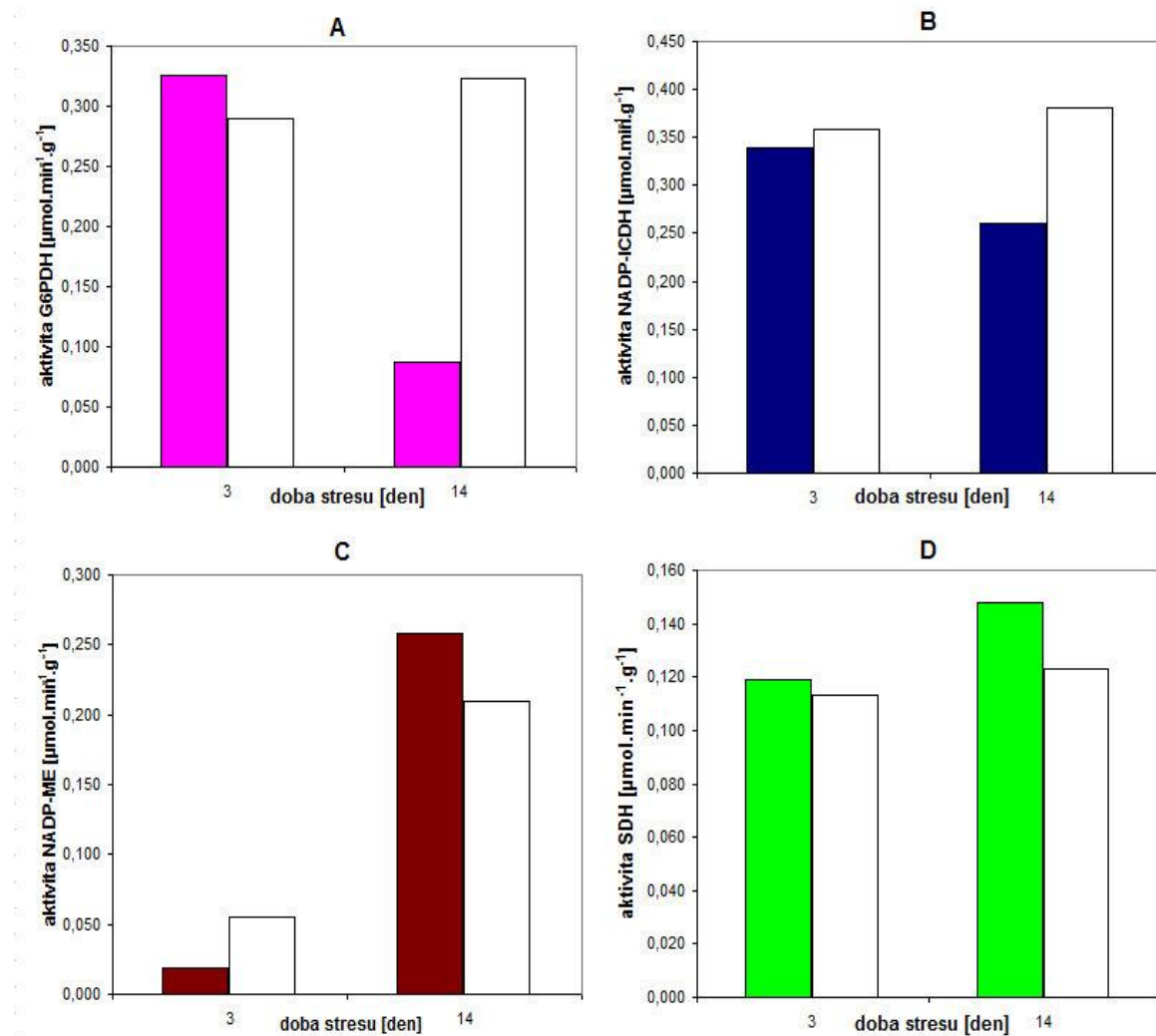
obr. 5: Aktivita G6PDH (A, ■), NADP-ICDH (B, ■), NADP-ME (C, ■) a SDH (D, ■) v listech fazole vztahena na čerstvou hmotnost v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám (100 mM NaCl v zálivce) (■/■/■/■ stresované rostliny, □-kontrola)

4.2.2 Vliv solného stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů v listech hrachu setého

Obrázek 6 str. 23 znázorňuje aktivity NADP-dependentních enzymů v listech hrachu setého v průběhu čtrnáctidenního působení stresových podmínek. Čtrnáctý den pokusu byl stejně jako v případě rostlin fazole zaznamenán pokles aktivity NADP-ICDH (o 30%) a G6PDH (o 70%) oproti kontrolním rostlinám. Naopak aktivita NADP-ME a SDH byla čtrnáctý den stresu v listech hrachu zvýšena (v obou případech o 20%).

Během vývoje kontrolních rostlin hrachu se významně zvýšila aktivita NADP-ME (14-krát). Vzhledem k tomu, že aktivita NADP-ME a SDH byla čtrnáctý den zvýšena, i

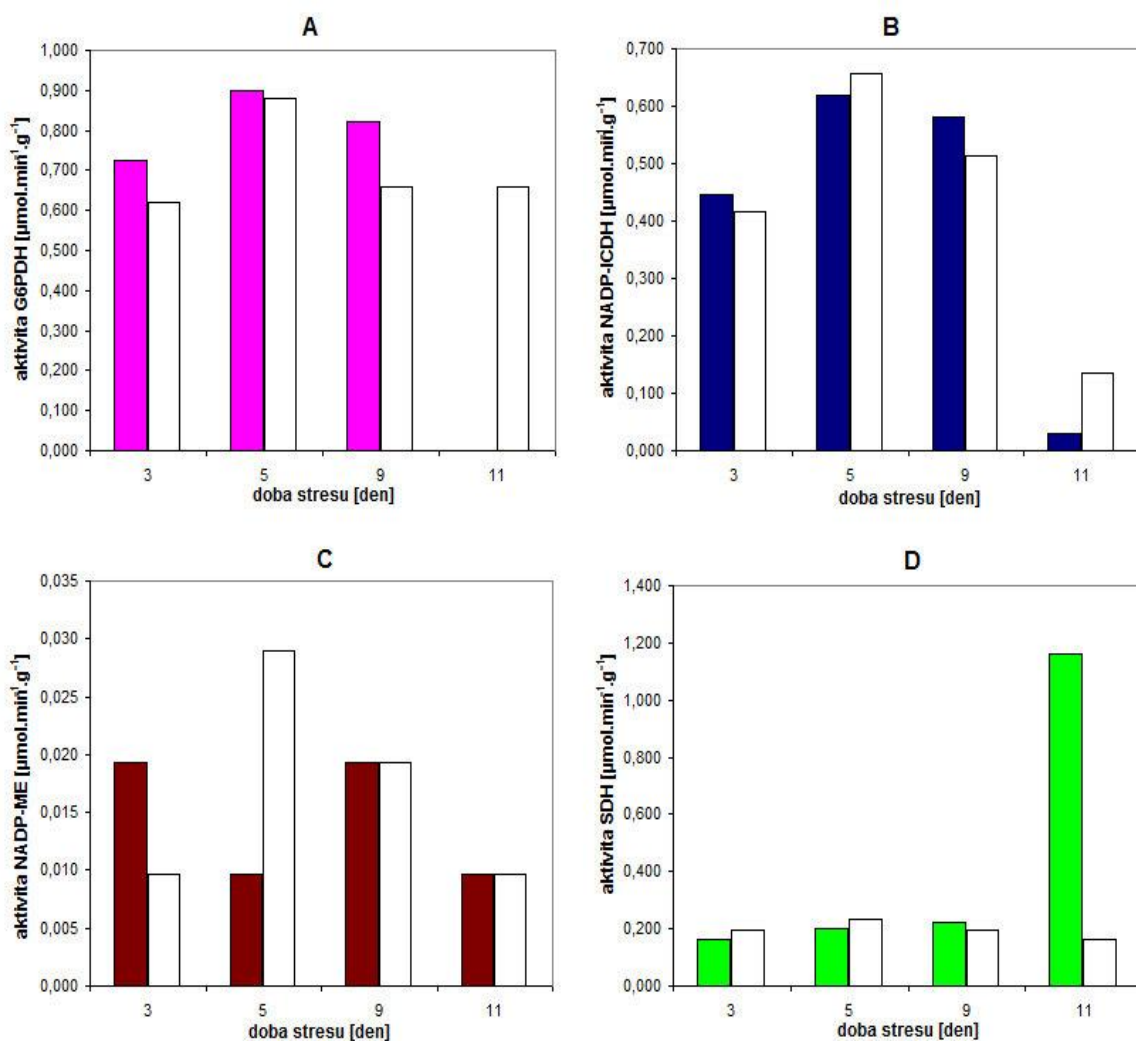
když mírně a rovněž G6PDH byla třetí den solného stresu zvýšena (o 12 %), byl pokus opakován s podrobnějšími intervaly odběru.



obr. 6: Aktivita G6PDH (A, ■), NADP-ICDH (B, ■), NADP-ME (C, ■) a SDH (D, ■) v listech hrachu vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám (100 mM NaCl v zálivce) (■-stresované rostliny, □-kontrola)

V následujícím pokusu byla aktivita NADP-dependentních enzymů měřena v listech hrachu zalévaného 100 mM NaCl třetí, pátý, devátý a jedenáctý den působení solného stresu. Obrázek 7 str. 24 znázorňuje aktivity enzymů hrachu setého v jednotlivých odběrových dnech. Ani v tomto podrobnějším experimentu se neprokázalo, že by se NADP-dependentní enzymy významně podílely na obranné odpovědi mladých rostlin hrachu. Na konci pokusu opět došlo k výraznému poklesu aktivity NADP-ICDH (o 95%) a G6PDH (neměřitelná hodnota) stejně jako v předchozím experimentu s těmito rostlinami

(obr. 6 str. 23). Třetí den stresových podmínek bylo zjištěno přechodné zvýšení aktivity NADP-ME (o 90%) a G6PDH (o 14%), devátý den pak aktivity G6PDH (o 20%) a NADP-ICDH (o 10%). Výjimku tvořila SDH, jejíž aktivita se 11. den v listech rostlin hrachu vystavenému stresu sedmkrát zvýšila oproti kontrolním rostlinám. Také v předchozím experimentu byla aktivita SDH po 2 týdnech působení stresu zvýšena, i když pouze o 20%.



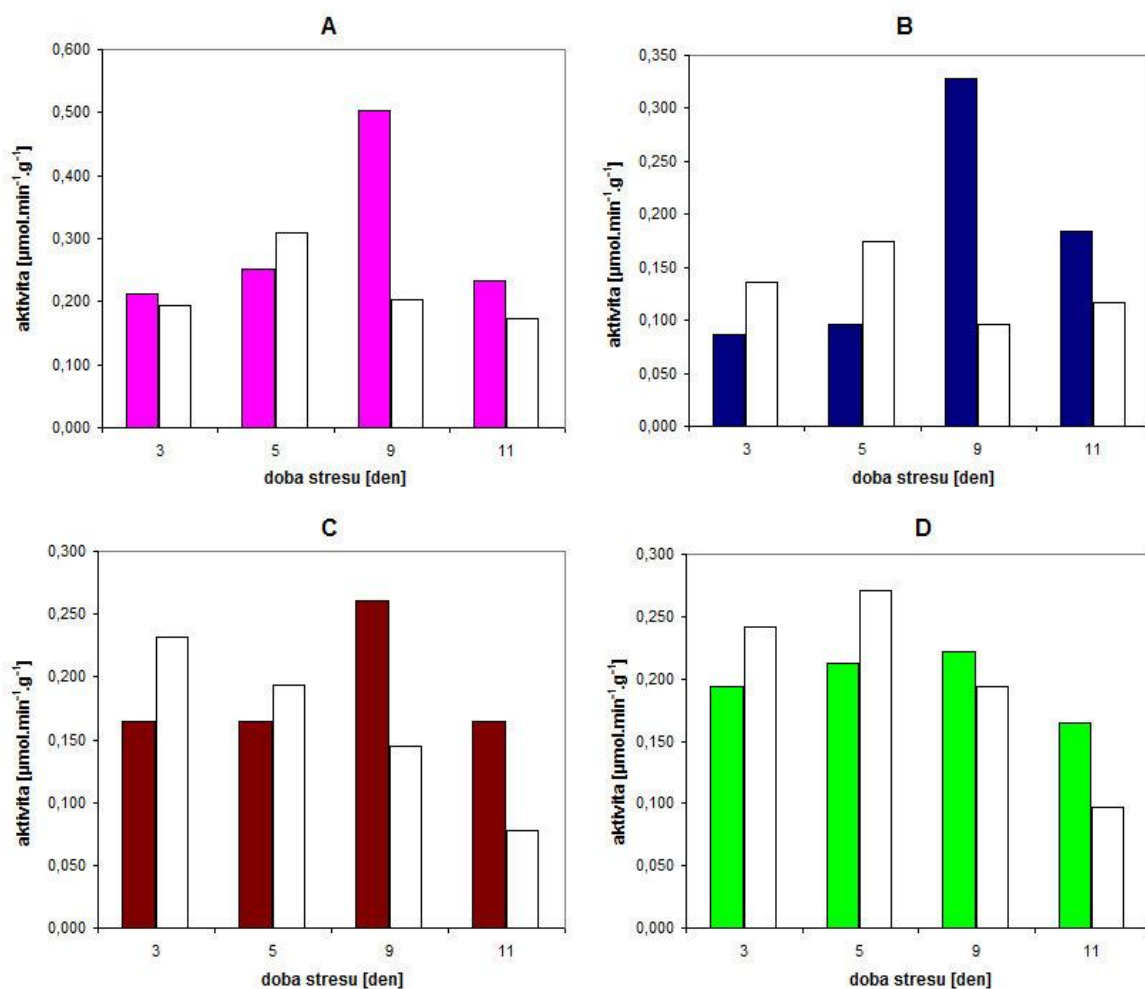
obr. 7: Aktivita G6PDH (A, ■), NADP-ICDH (B, ■), NADP-ME (C, ■) a SDH (D, ■) v listech hrachu vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám (100 mM NaCl v zálivce) (■-stresované rostliny, □-kontrola)

4.2.3 Vliv solného stresu na aktivitu NADP-ME v listech okurky seté

Na základě vyhodnocení hrachu setého jako ne příliš vhodného modelu pro sledování vlivu solného stresu na NADP-dependentní enzymy, byla vybrána další rostlina-

okurka setá. Na obr. 8 je graficky znázorněna aktivita NADP-ICDH, G6PDH, NADP-ME a SDH v listech okurky seté ve vybraných dnech působení stresových podmínek. První týden pokusu aktivita NADP-dependentních enzymů zvýšena nebyla. U všech sledovaných enzymů dokonce došlo k mírnému poklesu aktivity oproti kontrolním rostlinám. Devátý den však došlo k významnému zvýšení aktivity NADP-ICDH (o 240 %), G6PDH (o 148%), NADP-ME (o 80%) a SDH o 15%). Zvýšená aktivita ve stresovaných rostlinách přetrvávala i jedenáctý den, kdy byla aktivita NADP-ICDH zvýšena o (o 58 %), G6PDH (o 33%), NADP-ME (o 113%) a SDH o 69%).

Kontrolní 3-4 týdenních rostliny okurky nevykazovaly během vývoje zvýšení aktivity některých NADP-dependentních enzymů, jak tomu bylo v případě rostlin fazole (obr. 5, str. 22).



obr. 8: Aktivita G6PDH (A, ■), NADP-ICDH (B, ■), NADP-ME (C, ■) a SDH (D, ■) v listech okurky vztahovaná na čerstvou hmotnost v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám (100 mM NaCl v zálivce) (■-stresované rostliny, □-kontrola)

4.3 Stanovení koncentrace Na⁺ v rostlinách vystavených solnému stresu

Skutečná koncentrace Na⁺ v listech rostlin byla stanovena metodou AES na spektrometru AAS 3 (Zeiss Jena, Německo) ve spolupráci s katedrou analytické chemie. V tabulce 2 jsou uvedeny koncentrace sodíku v rostlinách fazole, hrachu a okurky naměřené ve vzorcích listů odebraných devátý, respektive u fazole patnáctý den působení 100 mM NaCl. Z tabulky je patrné, že koncentrace Na⁺ v rostlinách okurky a fazole byla vyšší ve stresovaných než v kontrolních rostlinách. Ve stresovaných rostlinách fazole, byla koncentrace Na⁺ 4-krát vyšší než koncentrace v kontrolních vzorcích. Naopak u rostlin hrachu byla koncentrace sodíku ve stresovaných rostlinách nižší než v kontrolních.

tabulka 2: Koncentrace Na⁺ v listech kontrolních (zalévaných vodou) a stresovaných rostlin (vystavených působení 100 mM NaCl v zálivce). Rostliny okurky a hrachu byly stresovány po dobu devíti dnů a rostliny fazole po dobu patnácti dnů.

rostlina	stres/ kontrola	koncentrace Na [g/l]	koncentrace Na [mol/l]
okurka	stres	5,83	0,254
	kontrola	5,25	0,228
hrách	stres	12,4	0,540
	kontrola	20,7	0,901
fazole	stres	23	1,000
	kontrola	5,54	0,241

5 Diskuse

Stoupající počet obyvatel země klade stále vyšší nároky na zemědělskou produkci (v roce 2050 se odhaduje nárůst na 9 miliard lidí).^[34] Zemědělská produkce je však ovlivněna kvalitou půdy a klimatickými podmínkami. Častými problémy, který způsobují snížení výnosů, jsou nedostatek vody a zasolené půdy. Rostliny si vyvinuly řadu mechanismů, jak čelit těmto nepříznivým podmínkám. Hledání nových modelových systémů, na kterých by mohly být zkoumány obranné odpovědi rostlin vůči stresu, je vzhledem k velké variabilitě rostlinných druhů důležitou součástí objasňování mechanismů rezistence rostlin. Velmi často se využívají rostliny se známým genomem (housesníček, rýže), nebo rostliny rostoucí v extrémních podmínkách, např. halofytní rostliny jako je kosmatec křišťálový nebo rostliny rodu *Flaveria*. Kosmatec křišťálový v důsledku solného stresu přechází z metabolismu C_3 na v těchto podmínkách výhodnější metabolismus CAM.^[32] Rostliny rodu *Flaveria* se dělí na více typů C_3 , C_4 -podobné, C_{3-4} přechodné, které se vyvinuly jako adaptace na nepříznivé podmínky vnějšího prostředí.^[33]

V této práci jsem se zabývala třemi hospodářsky využitelnými rostlinami, fazolí (*Phaseolus vulgaris* L.), hrachem setým (*Pisum sativum* L.) a okurkou setou (*Cucumis sativa* L.) v souvislosti s obrannými odpověďmi vůči abiotickému stresu v podobě vysoké koncentraci soli. Rostliny byly vybrány podle studie porovnávající aktivitu G6PDH, NADP-ICDH, NADP-ME a SDH v listech 21 různých rostlin.^[10]

V experimentech byl aplikován 100 mM NaCl v zálivce. Tato koncentrace byla zvolena na základě rešerše, ze které vyplývá, že k indukci solného stresu u rostlin se využívá 25-400 mM koncentrace NaCl. Některé přístupy využívají pěstování rostlin v živných médiích, či hydroponiích obsahujících sůl^[12] další (která byla využita i v této práci) v aplikaci soli v zálivce^[30] a některé přístupy spočívají v ponoření kořenů rostliny extrahované z půdy do roztoku soli.^[31] Pěstování rostlin v půdě a aplikace zálivkou se nejvíce podobá přirozenému působení stresu, i když kvantifikace skutečné koncentrace stresoru, který se dostal k rostlině je obtížnější. V této práci bylo zjištěno, že rostliny mohou být pěstovány namísto v půdě i na buničité vatě, aniž by se výrazně snížila aktivita zvolených NADP-dependetntních enzymů (obr. 4, str. 20). Jako metoda detekce sodných iontů přímo v rostlinách byla zvolena metoda AES. Jedná se o velmi citlivou metodu,

kteřou bylo v horních listech rostlin okurky 9. den stresu (v maximu zvýšení aktivit sledovaných enzymů) zjištěno 1,1-násobné zvýšení koncentrace Na⁺ iontů a v listech fazole 4,2-násobné zvýšení (tabulka 2, str. 25.). U rostlin hrachu zvýšení Na⁺ iontů v horních listech pozorováno nebylo, tudíž je možné, že rostlina stresor z těchto listů eliminovala. Pro další experimenty by proto bylo vhodné stanovovat koncentraci Na⁺ iontů především v kořenech. Rovněž skutečnost, že v listech hrachu zvýšená koncentrace Na⁺ iontů zjištěna nebyla, může být důvodem malých změn aktivit NADP-dependentních enzymů (viz dále). Tudíž by bylo možné ještě koncentraci NaCl zvýšit.

Solný stres představuje pro rostlinu aktivaci mnoha metabolických změn. Jedná se jak o změny typické pro všechny typy oxidativního stresu (snížená aktivita fotosyntézy, zvýšená respirace, syntéza reaktivních forem kyslíku, modifikace fosforylačního stavu proteinů, iniciace signálních kaskád vedoucích ke změně genové exprese) tak o změny specifické pro stres ovlivňující vodní rovnováhu (např. biosyntéza osmoticky aktivních látek především oligosacharidů rafinosové řady, sacharosy, threhalosy, manitolu a prolinu).^{[3], [35]} Pokles turgoru v rostlinných buňkách iniciuje uzavírání průduchů, což má za následek pokles fotosyntézy. V takovýchto rostlinách pak prudce klesá NADPH, klíčový faktor ovlivňující buněčný růst, proliferaci i detoxifikaci.^[21] NADPH je substrátem mnoha biosyntetických reakcí, podílí se na regulaci redoxního stavu buňky i na antioxidačních obranných mechanismech. Kromě fotosyntézy může být NADPH poskytováno NADP-dependentními enzymy.

Cílem této práce bylo najít takový modelový systém rostlina-stres vysokou koncentrací soli, ve kterém by solný stres ovlivnil aktivitu NADP-dependentních enzymů (G6PDH, NADP-ICDH, NADP-ME a SDH). Reverzibilní reakce katalyzovaná SDH probíhá přirozeně ve směru spotřeby NADPH jako součást jedné z nejvytíženějších biosyntetických drah vedoucí k biosyntéze nejen aminokyselin (fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu), ale i fenylypropanoidů např. flavonoidů a ligninu, látek využitelných v chránění rostliny před stresem. V této studii byl sledován NADP-dependentní směr. V prvním experimentu prováděného s rostlinami fazole byla aktivita SHD a NADP-ME v listech čtrnáctý den solného stresu oproti kontrolním nestresovaným rostlinám mírně zvýšena (obr. 5 CD, str. 22), zatímco aktivita G6PDH a NADP-ICDH významně poklesla (obr. 5 AB, str. 22), pravděpodobně již z důvodu vyčerpání rostliny. Kromě toho v rostlinách fazole docházelo ke zvyšování aktivity NADP-dependentních enzymů v kontrolních

roślinách, především G6PDH, ale i ostatních sledovaných enzymů. To může souviset s tím, že 3-4 týdenní rostliny se stále ještě vyvíjejí a NADPH poskytované G6PDH by mohlo sloužit k biosyntéze mastných kyselin vyvíjejících se membrán. Tím se komplikuje porovnávání se stresovanými rostlinami, tudíž takto mladé rostliny fazole nebyly vhodným modelovým systémem.

Další rostlinou studovanou v souvislosti se solným stresem byly rostliny hrachu. U nich se v kontrolních rostlinách během vývoje zvyšovala aktivita pouze G6PDH. Také v tomto experimentu byl zaznamenán pokles G6PDH a NADP-ICDH v listech stresovaných rostlin čtrnáctý den solného stresu (obr. 6, str. 23) Na druhou stranu aktivita NADP-ME a SDH byla čtrnáctý den mírně zvýšena, stejně jako aktivita G6PDH třetí den, a proto byl pokus ještě jednou opakován s podrobnějšími intervaly měření. Ani podrobné sledování (třetí, pátý, devátý a jedenáctý den) však nepřineslo zjištění významných rozdílů v aktivitách NADP-dependentních enzymů (obr. 7, str. 24). Jedinou výjimku tvořila zvýšená aktivita SDH jedenáctý den solného stresu. Jedním z důvodů, proč NADP-enzymy hrachu na solný stres zvýšenou aktivitou neodpovídaly, může být nižší koncentrace Na^+ iontů ve vrchních listech, než v kontrolních rostlinách zjištěná metodou AES (tabulka 2, str. 25).

Naproti tomu v rostlinách okurky, u kterých byla ve skupině stresovaných rostlin zjištěna vyšší koncentrace Na^+ iontů, došlo k významnému zvýšení aktivity devátý den vystavení stresovým podmínkám a to u G6PDH o 148%, u NADP-IDCH o 240%, u NADP-ME o 80% a u SDH o 15% (obr. 8, str. 25). Zvýšení aktivity těchto enzymů může souviset se zvýšenou potřebou syntézy NADPH pro biosyntézu osmoticky aktivních látek, např. prolinu, mastných kyselin pro opravy poškozených membrán, stejně jako zvýšenou potřebou NADPH pro antioxidační askorbát-glutathionový cyklus.^[35]

Nejvhodnějším modelovým systémem byly proto vybrány rostliny okurky *Cucumis sativa* L. convar. Jogger F1) 3-4 týdenní a starší, pěstované na buničité vatě v minipařeništi a stresor v podobě 100 mM a vyšší koncentrace NaCl přidávaná v zálivce. Interval pro odběr vzorků by měl být nižší vzhledem k tomu, že druhý týden už rostliny mohou být vyčerpané. Sodné ionty by měly být stanovovány i v kořenech rostlin, neboť z vrchních listů zřejmě mohou být eliminovány (tabulka 2, str. 25). Experiment s rostlinami okurky však bude nutné ještě opakovat a vyhodnotit statisticky.

6 Závěr

- 1) Rostliny fazole, okurky a hrachu zalévané 100 mM roztokem NaCl se lišily v množství Na^+ iontů přijatých rostlinou; v listech fazole došlo ke čtyřnásobnému zvýšení, v listech okurky pouze o 10%, v listech hrachu nebylo zvýšení zjištěno.
- 2) Aktivita NADP-dependentních enzymů je stresem v uvedených pokusech ovlivněna jen mírně; ke zvýšení aktivity G6PDH, NADP-ICDH, NADP-ME a SDH došlo devátý a jedenáctý den solného stresu v rostlinách okurky.

7 Seznam použité literatury

- [1] Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, L., Šebánek, J. a kol.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha (1998)
- [2] Heldt, H. W., Piechulla, B., Heldt, F.: Plant Biochemistry, Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo (2011)
- [3] Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L.: Biochemisý & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland (2000)
- [4] Vodrážka, Z.: Biochemie, Academia, Praha (2007)
- [5] www.bernda-enzymes.org (1.3.2011)
- [6] Kong, W. F., Chen, J. Y., Hou, Z. X., Wen, P. F., Zhan, J. Ch., Pan, Q. H., Huang, W. D.: J. Plant Physiol. 164, 934-944 (2007)
- [7] Çorban, T. A. K., Çiftçi, M., Küfreviođlu, Ö.: Prep. Biochem. Biotechnol. 32, 173-187 (2002)
- [8] Demir, H., Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfreviođlu, İ.: J. Food Biochem., 28, 155-168 (2004)
- [9] Leblová, S., Barthová, J.: Energetický metabolismus rostlin, Státní pedagogické nakladatelství, Praha (1970)
- [10] Kovaľová, T.: Porovnání relativního zastoupení NADP-dependenních enzymů v rostlinách: Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 21-30 (2010)
- [11] Liu, Y., Wu, R., Wan, Q., Xie, G., BiPlant, Y.: Cell Physiol. 48, 511–522 (2007)
- [12] Valderama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M. V., Chaki, M., Pedrajas, J. R., Fernández-Ocaña, A., del Río, L. A., Barroso, J. B.: Plant Cell Environ. 29, 1449-1459 (2006)

- [13] Li, J., Chen, G., Wang, X., Zhang, Y., Jia, H., Bi, Y.: *Physiol. Plantarum* 141, 239-250 (2011)
- [14] Gálvez, S., Bismuth, E., Sarda, C., Gadal, P.: *Plant Physiol* 105, 593-600 (1994)
- [15] Chen, R., Le Maréchal, P., Vidal, J., Jacquot, J. P., Gadal, P.: *Eur. J. Biochem.* 175, 565-572 (1988)
- [16] Gálvez, L., Gonzalez, E., Arrese-Igor, C.: *J. Exp. Bot.* 56, 2551-2561 (2005)
- [17] Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J.: *Plant Physiol. Bioch.* 43, 437-444 (2005)
- [18] Leblová, S., Sofrová, D.: *Biochemie fotosynthesy*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha (1982)
- [19] Drincovich, M. F., Casati, P., Andreo, C. S.: *FEBS Lett.* 490, 1-6 (2001)
- [20] Kulichikhin, K. Y., Chirkova, T. V., Fagestedt, K. V.: *Russ. J. Plant. Physl.* 56, 377-388 (2008)
- [21] Mateos, R. M., Bonilla-Valverde, D., del Río, L. A., Palma, J. M., Corpas, F. J.: *Physiol. Plantarum* 135, 130-139 (2009)
- [22] Ryšlavá, H., Müller, K., Semoradová, S., Synková, H., Čeřovská, N.: *Photosynthetica* 41, 357-363 (2003)
- [23] Doubnerová, V., Müller, K., Čeřovská, N., Synková, H., Spoustová, P., Ryšlavá, H.: *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3583-3593 (2009)
- [24] Medzinská, L.: *Vliv sucha na metabolismus rostlin tabáku (Nicotiana tabacum L.):* Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 46-77, (2010)
- [25] Herrmann, K. M., Weaver, L. M.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 50, 473-503 (1999)
- [26] Ding, L., Hofius, D., Hajirezaei, M. R., Fernie, A. R., Boernke, F., Sonnewald, U., *J. Exp. Bot.* 58, 2053-2067 (2007)
- [27] Balinsky, D., Davies, D. D.: *Biochem. J.* 80, 292-296 (1961)

- [28] Lourenco, E. J., Neves, V. A.: *Phytochemistry* 23, 497-499 (1984)
- [29] Ali, M. B., Hahn, E. J., Paek, K. Y.: *Molecules* 23, 607-621 (2007)
- [30] Huang, J., Zhang, H., Wang, J., Yang, J.: *Mol. Biol. Rep.* 30, 223-227 (2003)
- [31] Chi, W., Yang, J., Wu, N., Zhang, F.: *Biosci. Biotech. Bioch.* 68, 1865-1874 (2004)
- [32] Winter, K., Holtum, A. M.: *Planta* 222, 201-209 (2005)
- [33] Lai, B. L., Wang, L., Nelson, T. M.: *Plant Physiol.* 128, 125-139 (2002)
- [34] Kajala, K., Covshoff, S., Karki, S., Woodfield, H., Tolley, B., Dionora, M., Moqul, R., Mabilanan, A., Danila, F., Hibberd, J., Quick, W.: *J. Exp. Bot.* [doi:10.1093/jxb/err022](https://doi.org/10.1093/jxb/err022), 1-10 (2011)
- [35] Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: *Plant Sci.* 180, 575-583 (2011)

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