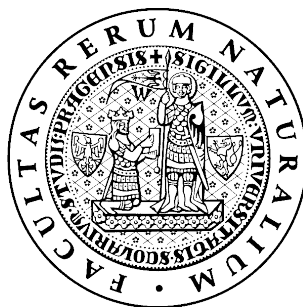


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv dusíkatých látek v kultivačním médiu na aktivitu
fosfoenolpyruvátkarboxylasy a metabolicky souvisejících enzymů
v rostlinách tabáku**

The effect of nitrogen compounds in cultivation medium on the activity of
phosphoenolpyruvate carboxylase in tobacco plants

Diplomová práce

Školitelka: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultantka: RNDr. Veronika Doubnerová, PhD.

Praha 2012

Bc. Květa Garčková

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc., RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. a konzultantce RNDr. Veronice Doubnerové, PhD. za rady a zkušenosti, které mi poskytovaly při vypracování a sepisování této práce. Dále kolektivu laboratoře Biochemie rostlin za příjemné prostředí a spolupráci, nejvíce však Bc. Martinu Fialovi za jeho postřehy a optimistické smýšlení. A v neposlední řadě mým blízkým, rodičům, Květoslavě a Josefovi Garčekomým, za celoživotní obětavost a oporu a příteli, Pavlu Misarovi, za podporu nejen při závěru studia.

Prohlášení

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

V Praze dne

Květa Garčková

ABSTRACT

The metabolism of plants grown in the cultivation medium is influenced by its composition and availability of CO₂. In this project the effect of cultivation medium on the activity phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31), NADP-malic enzyme (NADP-ME, EC 1.1.1.40), pyruvate, phosphate dikinase (PPDK, EC 2.7.9.1) and enzymes of nitrogen metabolism: nitrate reductase (NR, EC 1.7.1.1), glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2), glutamate synthase (GOGAT, EC 1.4.1.13) and glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2) was studied.

The tobacco plant *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 were grown *in vitro* in containers fitted with a filter, which caused limited access of CO₂. The cultivation medium was modified Murashige-Skoog agar with decreased amounts of phosphate, nitrate, ammonium, or with casein as source of nitrogen and with or without of 1.5% sucrose as additional carbon source

Activity of PEPC was higher in plants grown in medium in the presence of sucrose. Reduced concentrations of phosphates, nitrates or NH₄⁺ ions or when casein was the only source of N in medium caused decreased activity of PEPC. Under these conditions, also activity of NADP-ME and of enzymes of nitrogen metabolism: NR, GS decreased. Activity of all enzymes was also negatively affected by limited CO₂. On the other hand activity of PPDK was higher in plants grown under limited availability of phosphates, nitrates or NH₄⁺ ions. Similarly, activity of GOGAT and activity of NAD⁺/NADP⁺-GDH were higher in plants grown in medium with reduced concentrations of nitrates. The results show that the decreased amount of N and P in Murashige-Skoog medium negatively affected PEPC activity and activity of nitrogen metabolism enzymes, which correlates with decreased mass of roots and shoots of plants. Other enzymes, especially PPDK, participate in metabolic adaptations to nitrate, NH₄⁺ ions or phosphate deficiency.

Key words: PEPC, NADP-ME, PPDK, NR, GS, GOGAT, GDH, nitrogen assimilation

In Czech – ABSTRAKT

Metabolismus rostlin pěstovaných v kultivačním médiu je ovlivněn jeho složením a také přístupem CO₂. V tomto projektu byl sledován vliv kultivačního média na aktivitu fosfoenolpyruvátkarboxylasy (PEPC, EC 4.1.1.31), NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační) (NADP-ME, EC 1.1.1.40), pyruvát, fosfátdikinasy (PPDK, EC 2.7.9.1) a enzymů metabolismu dusíku: nitrátreduktasy (NR, EC 1.7.1.1), glutaminsynthetasy (GS, EC 6.3.1.2), glutamátsynthasy (GOGAT, EC 1.4.1.13) a glutamátdehydrogenasy (GDH, EC 1.4.1.2).

Rostliny tabáku *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1, byly pěstované *in vitro* v kultivačních nádobkách opatřených filtrem, který zajistil limitovaný přístup CO₂. Kultivačním médiem byl modifikovaný Murashige-Skoogův agar s přítomností či bez přítomnosti 1,5% sacharosu jako dodatečného zdroje uhlíku a se sníženým množstvím zdroje fosfátů, amonných iontů, dusičnanů, nebo s přidáním kaseinem.

Sacharosa v kultivačním médiu znamenala vyšší aktivitu PEPC než v rostlinách pěstovaných bez sacharosu. Snížená koncentrace fosfátů, nitrátů, amonných iontů nebo přítomnost kaseinu jako výhradního zdroje dusíku v kultivačním médiu však způsobila snížení aktivity PEPC v listech i kořenech rostlin tabáku. Za těchto podmínek poklesla i aktivita NADP-ME a aktivity enzymů metabolismu dusíku: NR, GS. Limitovaný přístup CO₂ vedl k nižší aktivitě všech studovaných enzymů. Na druhou stranu PPDK měla v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím fosfátů, dusičnanů nebo amonných iontů naopak vyšší aktivitu. Stejně tak aktivita enzymů GOGAT a NAD⁺/NADP⁺-GDH byla vyšší v rostlinách se sníženou koncentrací dusičnanů. Z uvedených výsledků vyplývá, že snížené množství dusíkatých látek v kultivačním médiu negativně ovlivňuje aktivitu PEPC a enzymů metabolismu dusíku, což koreluje s hmotností kořenů i nadzemních částí rostliny. Jiné enzymy, především PPDK, zvýšením své aktivity mění metabolismus a reagují tak na sníženou dostupnost dusičnanů, amonných iontů a fosfátu.

Klíčová slova: PEPC, NADP-ME, PPDK, NR, GS, GOGAT, GDH, asimilace dusíku

SEZNAM ZKRATEK

3D	trojdimenzionální, trojrozměrný
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosintrifosfát
Bis	N,N'-metylen-bis(akrylamid)
BSA	hovězí sérový albumin
C₃ rostliny	rostliny, které mají jako první produkt 3-uhlíkatý 3-fosfoglycerát
C₄ rostliny	rostliny, které mají jako první produkt 4-uhlíkatý oxalacetát
C	rostliny pěstované s limitovaným přístupem CO ₂
CAM rostliny	z angl. Crassulacean acid metabolism
CoA	koenzym A
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAD	flavinadenindinukleotid
g	tíhové zrychlení ($g = 9,80665 \text{ m.s}^{-2}$)
GDH	glutamátdehydrogenasa
GOGAT	glutamátsynthasa
GS	glutaminsynthetasa
LDH	laktátdehydrogenasa
N	rostliny pěstované se sníženým množstvím amonných iontů a zároveň se sníženým množstvím dusičnanů (dále označováno jako snížené množství dusíkatých látek)
N1	rostliny pěstované se sníženým množstvím amonných iontů
N2	rostliny pěstované se sníženým množstvím dusičnanů
N3	rostliny pěstované s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku
NAD(H)	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NAD MDH	NAD dependentní malátdehydrogenasa

NADP(H)	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaný)
NADP-ME	NADP dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)
NNEDD	N-(1-naftyl)ethylendiamidihydrochlorid
NR	nitrátreduktasa
OAA	oxalacetát
P	rostliny pěstované se sníženým množstvím fosfátů
PEP	fosfoenolpyruvát
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových kationtů
P_i	anorganický fosfát
PEPCK	fosfoenolpyruvátkarboxylasa kinasa
PK	pyruvátkinasa
PMS	phenazin methosulfát
PPDK	pyruvát, fosfátdikinasa
PP2A	protein fosfatasa 2A
PVP	polyvinylpyrrolidon
RPM	z angl. revolutions per minute, počet otáček za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
+S	rostliny tabáku pěstované v kultivačním mediu v přítomnosti 1,5% sacharosy
-S	rostliny tabáku pěstované v kultivačním mediu bez přítomnosti 1,5% sacharosy
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

OBSAH

1. TEORETICKÝ ÚVOD	4
1.1. PROPOJENÍ METABOLISMU UHLÍKU A DUSÍKU	4
1.1.1. Přítomnosti dusíku a fosforu.....	5
1.2. FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASA	5
1.2.1. Výskyt a struktura PEPC	6
1.2.2. Funkce PEPC.....	7
1.2.3. Mechanismus reakce katalyzované PEPC	8
1.2.4. Regulace aktivity PEPC.....	8
1.3. NADP-DEPENDENTNÍ MALÁTDEHYDROGENASA (OXALACETÁT- DEKARBOXYLAČNÍ)	10
1.3.1. Výskyt a vlastnosti NADP-ME	10
1.3.2. Funkce NADP-ME	11
1.3.3. Regulace NADP-ME	11
1.4. PYRUVÁT, FOSFÁTDIKINASA	11
1.4.1. Výskyt a struktura PDK	11
1.4.2. Funkce PDK	12
1.4.3. Regulace aktivity PDK.....	12
1.5. ENZYMY METABOLISMU DUSÍKU	13
1.5.1. Asimilace dusíku	13
1.5.2. Nitrátreduktasa	13
1.5.3. Nitritreduktasa	14
1.5.4. Glutaminsynthetasa	14
1.5.5. Glutamátsynthasa.....	15
1.5.6. Glutamátdehydrogenasa	16
2. CÍLE PRÁCE	18
3. MATERIÁL	19
3.1. CHEMIKÁLIE	19
3.2. PŘÍSTROJE A POMŮCKY	21
3.3. ROSTLINNÝ MATERIÁL	21
4. METODY	22
4.1. PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU	22
4.1.1. Pěstování rostlin tabáku <i>Nicotiana tabacum</i> L.	22
4.1.2. Odběr vzorků	23
4.2. PŘÍPRAVA EXTRAKTU Z ROSTLINNÉHO MATERIÁLU.....	24
4.3. MĚŘENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY.....	24
4.3.1. Měření aktivity PEPC.....	24
4.3.2. Měření aktivity NADP-ME	24
4.3.3. Měření aktivity PDK	25
4.3.4. Měření aktivity NR.....	25
4.3.5. Měření aktivity GS	26
4.3.6. Měření aktivity GOGAT	26
4.3.7. Měření aktivity NAD ⁺ /NADP ⁺ -GDH	27
4.4. STANOVENÍ MNOŽSTVÍ BÍLKOVIN.....	28
4.4.1. Stanovení množství bílkovin metodou dle Bradfordové.....	28
4.4.2. Stanovení množství bílkovin metodou dle Lowryho	28
4.5. ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE PROTEINŮ.....	29
4.5.1. Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS	29

4.5.2.	Detekce proteinů po elektroforetické separaci v prostředí SDS pomocí Coomassie Brilliant Blue	30
4.5.3.	Detekce proteinů po elektroforetické separaci v prostředí SDS pomocí dusičnanu stříbrného	30
4.5.4.	Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v nedenaturujícím prostředí	31
4.5.5.	Detekce NADP-ME v polyakrylamidovém gelu po elektroforetické separaci v nedenaturujícím prostředí.....	31
4.5.6.	Detekce NAD ⁺ /NADP ⁺ -GDH v polyakrylamidovém gelu po elektroforetické separaci v nedenaturujícím prostředí.....	31
5.	VÝSLEDKY	33
5.1.	VLIV DOSTUPNOSTI FOSFÁTŮ A DUSÍKATÝCH LÁTEK V KULTIVAČNÍM MÉDIU NA AKTIVITU ENZYMŮ V ROSTLINÁCH TABÁKU	33
5.1.1.	Vzhled rostlin tabáku v jednotlivých skupinách.....	33
5.1.2.	Aktivita PEPC	35
5.1.3.	Aktivita NADP-ME.....	35
5.1.4.	Aktivita PPK.....	36
5.1.5.	Aktivita NR	37
5.1.6.	Aktivita GS.....	37
5.1.7.	Aktivita GOGAT	38
5.1.8.	Stanovení bílkovin dle Bradfordové	39
5.1.9.	Elektroforetická separace proteinů v extraktech z rostliny tabáku	40
5.1.10.	Detekce proteinů pomocí dusičnanu stříbrného po elektroforetické separaci v gradientu polyakrylamidového gelu v prostředí SDS	41
5.2.	VLIV DOSTUPNOSTI AMONNÝCH IONTŮ A DUSIČNANŮ V KULTIVAČNÍM MÉDIU NA AKTIVITU ENZYMŮ V ROSTLINÁCH TABÁKU	43
5.2.1.	Vzhled rostlin tabáku v jednotlivých skupinách.....	43
5.2.2.	Aktivita PEPC	45
5.2.2.1.	Aktivita PEPC za optimálních podmínek.....	45
5.2.2.2.	Aktivita PEPC za suboptimálních podmínek	45
5.2.3.	Aktivita NADP-ME.....	46
5.2.4.	Aktivita PPK.....	47
5.2.5.	Aktivita NR	48
5.2.6.	Aktivita GS.....	49
5.2.7.	Aktivita GOGAT	50
5.2.8.	Aktivita NAD ⁺ -GDH	50
5.2.9.	Aktivita NADP ⁺ -GDH.....	51
5.2.10.	Stanovení bílkovin dle Bradfordové	52
5.2.11.	Elektroforetická separace proteinů v gradientu polyakrylamidového gelu v prostředí SDS ..	53
5.2.12.	Detekce NADP-ME po elektroforetické separaci v gradientu polyakrylamidového gelu v nedenaturujícím prostředí.....	55
5.2.13.	Detekce NAD ⁺ /NADP ⁺ -GDH po elektroforetické separaci v gradientu polyakrylamidového gelu v nedenaturujícím prostředí.....	56
5.3.	VLIV DOSTUPNOSTI DUSIČNANŮ A KASEINU V KULTIVAČNÍM MÉDIU NA AKTIVITU ENZYMŮ V ROSTLINÁCH TABÁKU.....	57
5.3.1.	Vzhled rostlin tabáku v jednotlivých skupinách.....	57
5.3.2.	Aktivita PEPC	59
5.3.2.1.	Aktivita PEPC za optimálních podmínek.....	59
5.3.2.2.	Aktivita PEPC za suboptimálních podmínek	59
5.3.3.	Aktivita NADP-ME.....	60
5.3.4.	Aktivita PPK.....	61
5.3.5.	Aktivita NR	62

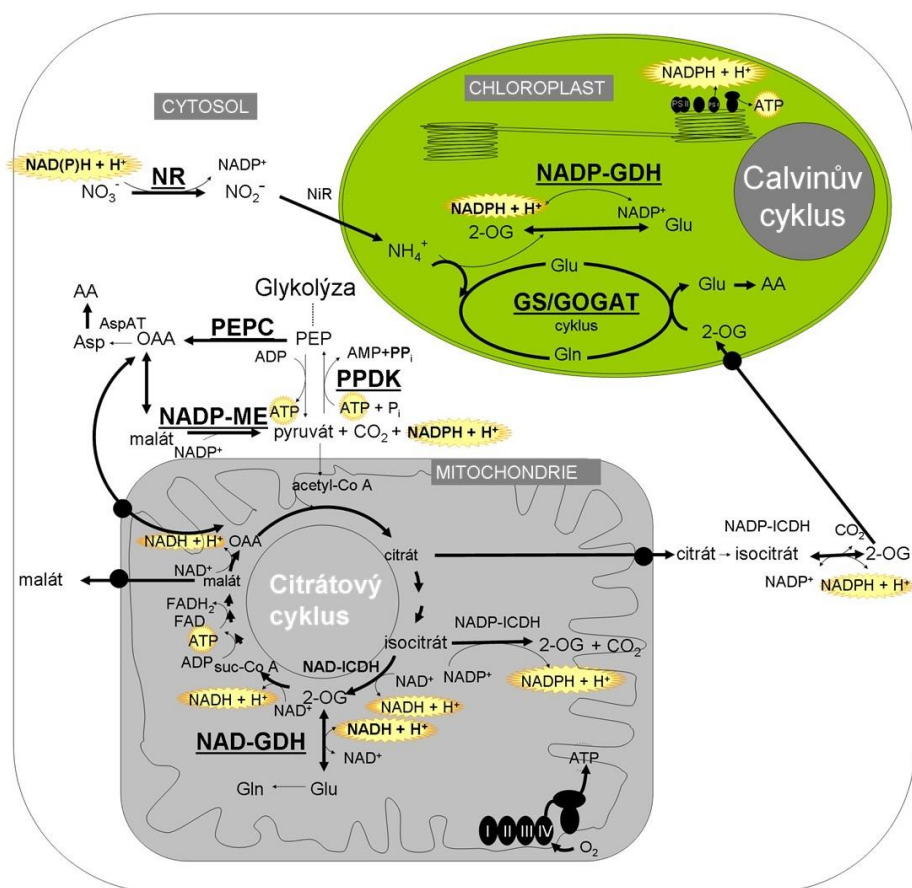
5.3.6.	Aktivita GS	62
5.3.7.	Aktivita GOGAT	63
5.3.8.	Aktivita NAD ⁺ -GDH	64
5.3.9.	Aktivita NADP ⁺ -GDH.....	65
5.3.10.	Stanovení bílkovin dle Lowryho	65
5.3.11.	Elektroforetická separace proteinů v gradientu polyakrylamidového gelu v prostředí SDS .	66
5.3.12.	Detekce NADP-ME po elektroforetické separaci v gradientu polyakrylamidového gelu v nedenuroujícíím prostředí.....	67
5.3.13.	Detekce NAD ⁺ -GDH po elektroforetické separaci v gradientu polyakrylamidového gelu v nedenuroujícíím prostředí.....	68
6.	DISKUZE.....	70
7.	ZÁVĚR.....	75
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. PROPOJENÍ METABOLISMU UHLÍKU A DUSÍKU

Rostliny jako fotoautotrofní organismy získávají energii ve formě ATP a redukční ekvivalenty NADPH fotosyntézou. ATP a NADPH jsou dále využity při fixaci CO_2 v Calvinově cyklu, kde vznikají sacharidy, které mohou sloužit k výstavbě buněčných struktur, jako zásobní nebo transportní sacharidy do nefotosyntetických orgánů, ale také jako prekuzory pro další biosyntézy.

ATP a NADPH je rovněž třeba při syntéze aminokyselin. Na syntéze uhlíkové kostry se podílí fosfoenolpyruvátcarboxylasa (PEPC), která tak propojuje metabolismus aminokyselin a sacharidů (viz. obr. 1., str. 4). Amonné ionty jsou vázány do aminokyselin za katalýzy enzymového komplexu glutaminsynthetasa/glutamátsynthasa (GS/GOGAT) [1, 2, 3, 4, 5].



Obr. 1.: Propojení metabolismu uhlíku a dusíku (převzato a upraveno z [6]); PEPC - fosfoenolpyruvátcarboxylasa, NADP-ME - malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační), PPDK - pyruvát, fosfát dikinasa, NR - nitrát reduktasa, GS - glutaminsynthetasa, GOGAT - glutamátsynthasa, GDH - glutamátdehydrogenasa

1.1.1. Přítomnosti dusíku a fosforu

Minerální výživa je pro rostlinu velmi důležitá. Bez asimilace iontů z půdy by neměla některé základní stavební prvky pro tvorbu makromolekul [7]. Patří mezi ně dusík, fosfor, síra a draslík. Tyto prvky jsou pro rostlinu důležité i z hlediska jejího růstu. Zatímco dusík, fosfor a síra jsou součástí významných primárních a sekundárních organických sloučenin, tak draslík je důležitý pro enzymové reakce, kde slouží jako kofaktor, nebo pro protonový transport v rostlinách [8].

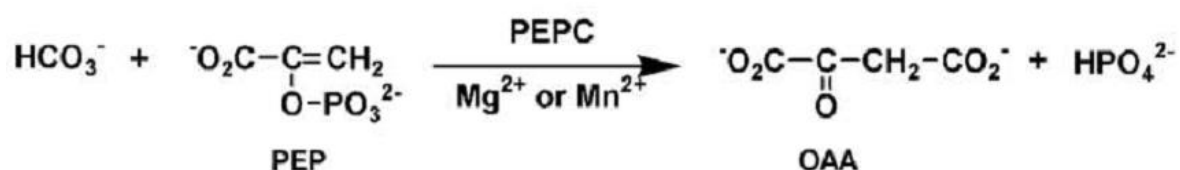
Deficit jednoho ze zmíněných prvků může ovlivnit metabolismus rostliny. A to i s následným dopadem na kvalitu zemědělských produktů, výnos, skladování, nebo z hlediska odolnosti rostliny proti škůdcům a patogenům [8].

Dusík je hlavní limitující faktor pro růst a vývoj rostlin [9, 10]. Většina rostlin získává dusík z půdy [10]. Dusík je důležitý pro syntézu nukleových kyselin, proteinů, fosfolipidů a sekundárních metabolitů. Rostlina může přijímat dusík ve vícero podobách: jako dusičnany, jako amonné ionty nebo i ve sloučeninách obsahující dusík. Tyto sloučeniny jsou štěpeny pomocí enzymů, které rostlina vylučuje do půdy [8]. Při deficitu dusíku v rostlině dochází k poklesu syntézy chlorofylu a dochází ke žloutnutí listů [7].

Fosfor je součástí mnoha důležitých struktur, např. fosfolipidů v membránách buněk, fosfosacharidů, bílkovin, nebo nukleových kyselin. Fosfor je i důležitou součástí při přenosu signálu na mezibuněčné i vnitrobuněčné úrovni. Největší význam má ale fosfor v reakcích, které souvisejí s výměnou energie. Při deficitu fosforu se rostlina adaptuje na nižší koncentrace a zajistí chod téměř beze změn, syntetizují se látky neobsahující fosfor [7].

1.2. FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASA

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (systematický název: Fosfát:oxalacetát karboxylyasa (fosforylační), EC 4.1.1.31. dále jen PEPC) v přítomnosti hydrogenuhličitanového aniontu (HCO_3^-) jako substrátu a dvojmocných iontů (Mg_2^+) katalyzuje ireverzibilní β -karboxylaci fosfoenolpyruvátu (PEP) za vzniku oxalacetátu (OAA) a P_i [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19]:



1.2.1. Výskyt a struktura PEPC

PEPC je cytosolový enzym vyskytující ve všech fotosyntetických organismech, zahrnující vyšší rostliny, zelené řasy a mikroorganismy, avšak nebyl nalezen v živočiších a v hubách [5, 11, 12, 13, 14, 15, 19, 20].

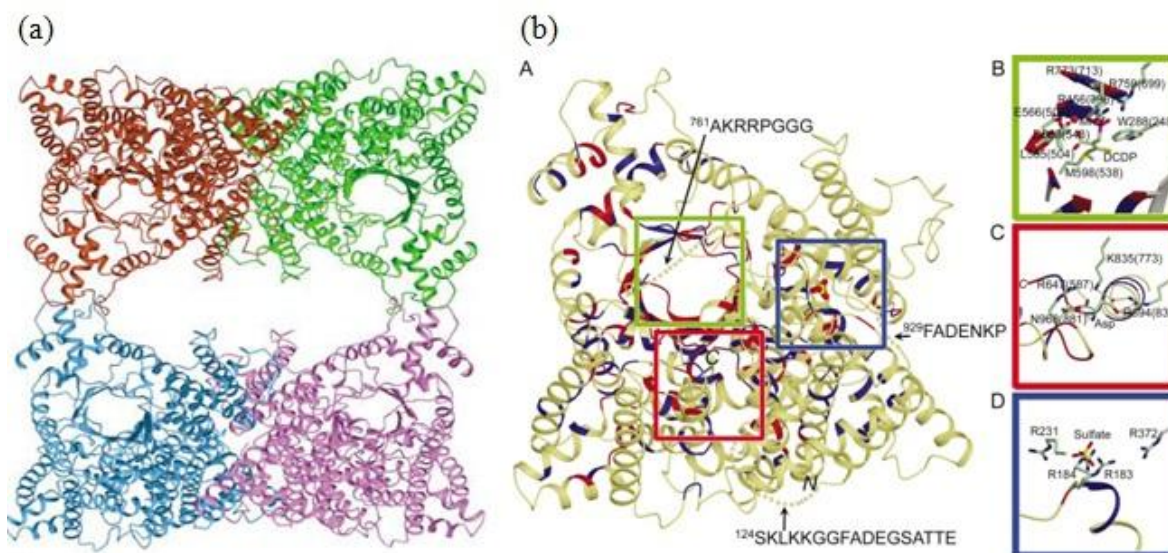
Primární struktura PEPC byla zjištěna až v roce 1984 a to z *E. coli*. Po 20 letech výzkumů, v roce 2004 bylo známo okolo 50-60 sekvencí získaných, jak z rostlin, tak bakterií, a to včetně izoform enzymu v daném organismu [12, 20].

V roce 1999 byla získána první 3D struktura PEPC z *E. coli* pomocí krystalizace. Avšak tato krystalová struktura zahrnovala i inhibitor PEPC, aspartát, proto se předpokládalo, že byl enzym v inaktivním stavu. K porovnání byla provedena krystalizace i s PEPC z kukuřice, ta neobsahovala žádný inhibitor [12].

PEPC je kódována malou genovou rodinou a je exprimována do různých pletiv rostlin [12, 15].

PEPC je složena ze 4 identických podjednotek, je to homotetramer (viz. obr. 2. (a), str. 6). Molekulová hmotnost jedné podjednotky se pohybuje v rozmezí 95 - 110 kDa. Velikost podjednotky závisí na druhu organismů, např. u rostlin (110 kDa), u bakterií (100 kDa) a u prvoků (134 kDa) [2, 12, 16, 17, 18, 19, 20].

Monomer PEPC kukuřice se skládá z 8 β -skládaných listů, kteří se stáčíjí do útvaru soudku, a z 42 α helixů (viz. obr. 2. (b), str. 6). Sekundární struktura monomeru je tvořena z 65% α helixů a 5% β -skládanými listy [12].



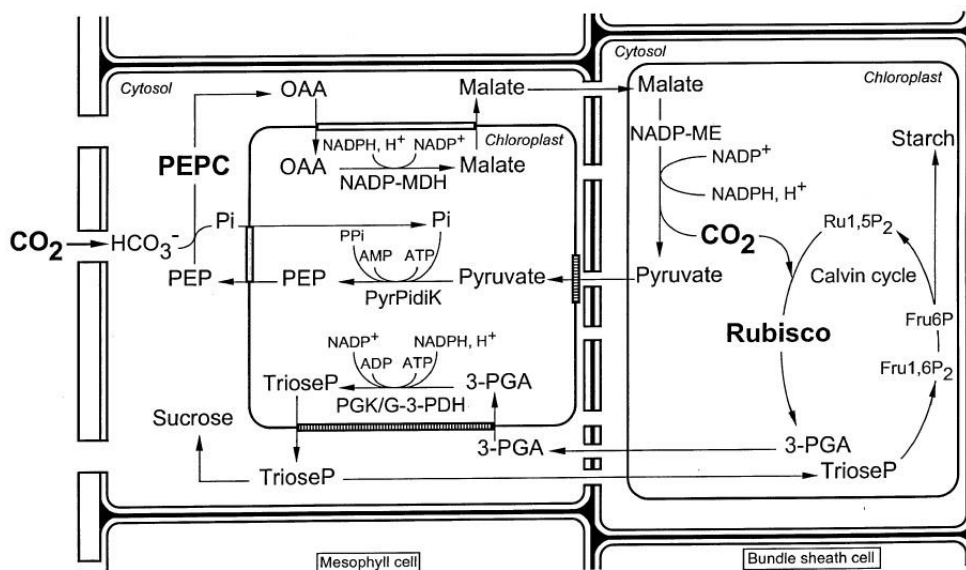
Obr. 2.: (a) Struktura PEPC kukuřice: 4 identické podjednotky jsou barevně odlišeny a uspořádány v dimer-dimerů (převzato z [20]). (b) Struktura monomeru PEPC kukuřice (A), vyznačené místo pro vazbu Mn_2^+ v monomeru PEPC *E. coli* (B), vyznačené místo pro

vazbu aspartátu v monomeru PEPC *E. coli* (C), vyznačené místo pro vazbu sulfátu v monomeru PEPC kukuřice (D) (převzato z [12]).

1.2.2. Funkce PEPC

PEPC zastává v rostlinách různé funkce, které jsou rozděleny mezi několik izoform s různými katalytickými a regulačními vlastnostmi [12, 20].

V C₄ a CAM rostlinách plní PEPC fotosyntetickou funkci. Je jedním z klíčových enzymů tzv. C₄ cyklu. V cytosolu mezofylových buněk C₄ rostlin typu NADP-ME PEPC katalyzuje primární fixaci CO₂ za vzniku OAA [15, 17, 19, 21]. Z OAA vzniká další reakcí malát, který je transportován do buněk pochev cévních svazků, kde je dekarboxylován na pyruvát. Uvolněný CO₂ je zde fixován za katalýzy ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasou/oxygenasou a vstupuje tak do Calvinova cyklu (viz obr. 3., str. 7). Předností enzymu PEPC je, že dokáže využít nižší koncentrace CO₂ [2, 11, 14]. V CAM rostlinách je funkce PEPC velmi podobná. Nepochází zde k prostorovému, nýbrž k časovému oddělení karboxylační a dekarboxylační reakce. Primární fixace CO₂ probíhá v noci, kdy okolní teplota není příliš vysoká. Malát je uložen ve vakuole a je pak použit k sekundární fixaci, která probíhá ve dne [11].

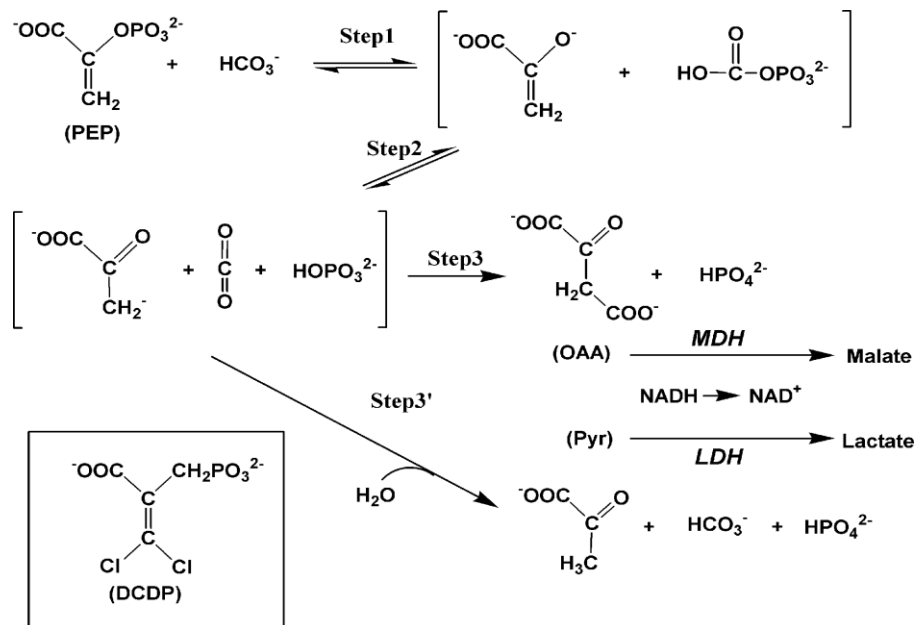


Obr. 3.: Fixace CO₂ katalyzovaná PEPC v C₄ rostlinách typu NADP-ME. Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (PEPC), NADP-malátdehydrogenasa (NADP-MDH), pyruvát, fosfátdikinasa (PPDK) a NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační, NADP-ME) tvoří tzv. C₄ cyklus, který zajišťuje přísun CO₂ k ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylase/oxygenase vyskytující se v buňkách pochev cévních svazků (převzato z [2])

Nefotosyntetická funkce PEPC v C3 rostlinách pravděpodobně zahrnuje: i) doplňování intermediátů do citrátového cyklu, ii) poskytování uhlíkatých skeletů pro asimilaci dusíku a biosyntézu aminokyselin iii) malátové kvašení, iv) spolu s NAD-MDH a NADP-ME udržování stálosti pH v buňce, v) udržování elektroneutrality a vi) spolu s NAD-MDH a NADP-ME produkci redukčních ekvivalentů NADPH [2, 11, 14, 15, 16].

1.2.3. Mechanismus reakce katalyzované PEPC

Reakce katalyzovaná PEPC je vysoce exergonická a ireverzibilní. Přeměna PEP na OAA probíhá ve třech reverzibilních krocích, tzv. tříkrokový mechanismus (viz. obr. 4., str. 8) [20]. Po prvním kroku vzniká z PEP a HCO_3^- enolátový ion pyruvátu a karboxyfosfát. Ve druhém kroku vzniká CO_2 díky izomeraci enolátového iontu a štěpení karboxyfosfátu. Ve třetím kroku vzniká OAA, tato reakce je ireverzibilní [12, 20].



Obr. 4.: Tříkrokový mechanismus reakce katalyzované PEPC (převzato z [12]).

1.2.4. Regulace aktivity PEPC

PEPC může být regulována na několika úrovních. A to: i) dostupností substrátů (PEP a hydrogenuhličitanového iontu), ii) pH, jak iii) vlivem aktivátorů (např. glukosa-6-fosfát), tak iv) vlivem inhibitorů (např. malát) a také v) fosforylací serinového zbytku v blízkosti N- konce.

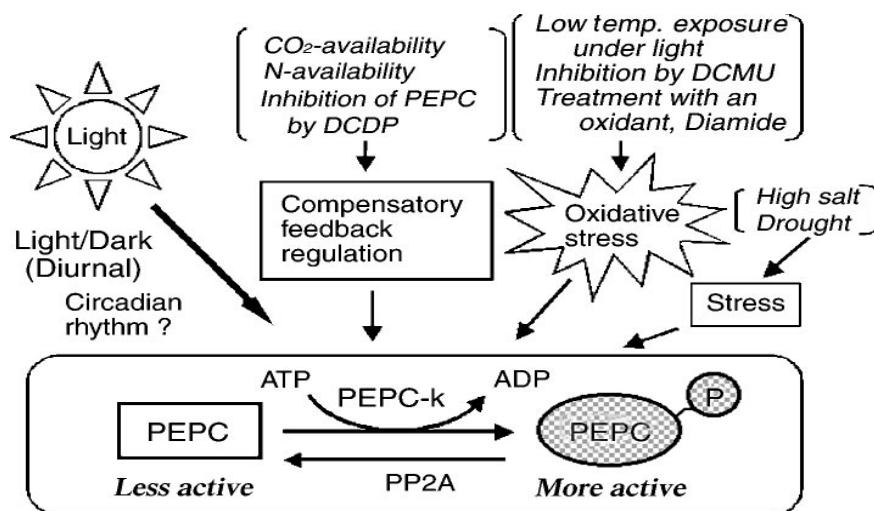
PEPC se spolu s NAD-malátdehydrogeasou (NAD-MDH; EC 1.1.1.37) a NADP-ME také podílí na regulaci pH a elektroneutrality. Zvýšení pH cytoplazmy (alkalizace)

zvýšuje aktivitu PEPC. Produkt reakce katalyzované PEPC, oxalacetát, je redukován NAD-MDH na relativně kyselý malát. Naopak v případě nízkého pH cytoplazmy, je malát dekarboxylován na méně kyselý pyruvát pomocí NADP-ME [6].

Na aktivitu PEPC působí různé efektory, a to v závislosti na organismu, ve kterém se PEPC nachází. PEPC u dvouděložných rostlin je aktivována glukosa-6-fosfátem a inhibována malátem nebo aspartátem [21], PEPC u jednoděložných C4 rostlin je aktivována též glycinem nebo alaninem. PEPC z *E. coli*, je aktivována acetylem-koenzymem A nebo fruktosa-1,6-bisfosfátem a inhibována aspartátem nebo malátem [2, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20].

Fosforylace serinového zbytku v blízkosti N-konce je katalyzována pomocí specifické Ca^{2+} -independentní PEPC kiny. Jedná se o nejmenší známou protein kinasu, jejíž molekulová hmotnost je přibližně 31-33 kDa. Její aktivita je v buňce ovlivňována syntézou *de novo*. Po fosforylaci dochází ke změně kinetických parametrů PEPC. Fosforylovaný enzym má vyšší maximální rychlost reakce, je méně citlivý k působení inhibitorů, ale více citlivý k působení aktivátorů. K defosforylaci dochází pomocí protein fosfatasy 2A (viz obr. 5., str. 9) [2, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20].

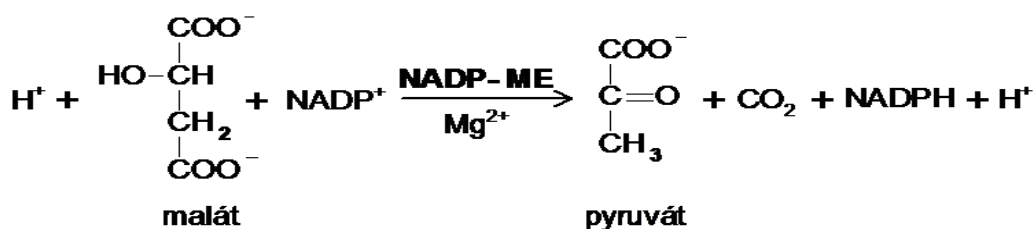
Fosforylace PEPC může být ovlivněna dostupností CO_2 a dusíkatých látek. Další studie ukázaly, že může být fosforylace regulována oxidativním a solným stresem (viz. obr. 5., str. 9) [12].



Obr. 5.: Fosforylace PEPC pomocí specifické PEPC kiny. Fosforylovaný enzym je více aktivní než defosforylovaný (převzato z [12]).

1.3. NADP-DEPENDENTNÍ MALÁTDEHYDROGENASA (OXALACETÁT-DEKARBOXYLAČNÍ)

NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát-dekarboxylační) (systematický název: L-malát:NADP⁺ oxidoreduktasa (oxalacetát-dekarboxylační), EC 1.1.1.40, dále NADP-ME), katalyzuje oxidační dekarboxylaci, kterou je malát za přítomnosti NADP⁺ jako koenzymu a dvojmocných iontů (Mg²⁺ nebo Mn²⁺) přeměněn na pyruvát [6, 11, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28].



NADP-ME může také katalyzovat i reverzibilní reakci, kdy vzniká malát a NADP⁺. Ale rychlost této reakce je velmi nízká [11].

1.3.1. Výskyt a vlastnosti NADP-ME

NADP-ME byl nalezen téměř ve všech živých organismech, jak v prokaryotických a eukaryotických mikroorganismech, tak ve všech typech rostlin, u živočichů i u člověka [6, 11, 22, 28].

Jedná se o vysoce konzervované proteiny, např. sekvenční identita aminokyselin mezi chloroplastovou izoformou NADP-ME kukuřice a lidskou mitochondriální NADP-ME je 47% [29]. V rostlinách je NADP-ME kódován malou genovou rodinou. *Arabidopsis thaliana* a *Oryza sativa* L. obsahují obě 4 geny pro NADP-ME, z toho 3 geny pro cytosolové izoformy a jeden gen pro plastidovou izoformu. Exprese jednotlivých izoforem je vývojově a orgánově specifická [6, 30, 31]. V *Nicotiana tabacum* L. byly zjištěny transkripty pro jednu izoformu plastidovou a dvě cytosolové [19, 28], které jsou pravděpodobně konstitutivní součástí rostliny a součástí primárního metabolismu.

U savců, stejně jako v rostlinách se NADP-ME skládá ze 4 podjednotek, je to tetramer. Molekulová hmotnost jedné podjednotky se pohybuje v rozmezí 62 - 67 kDa. NADP-ME se může vyskytovat i v podobě monomerů a dimerů [22, 26].

1.3.2. Funkce NADP-ME

V játrech savců a člověka je NADP-ME jedním z enzymů poskytujících NADPH pro další syntézy (např. lipidů) [22, 25].

V C4 a CAM rostlinách má NADP-ME důležitou roli ve fotosyntéze, kde poskytuje CO₂ pro Calvinův cyklus [22, 23, 28].

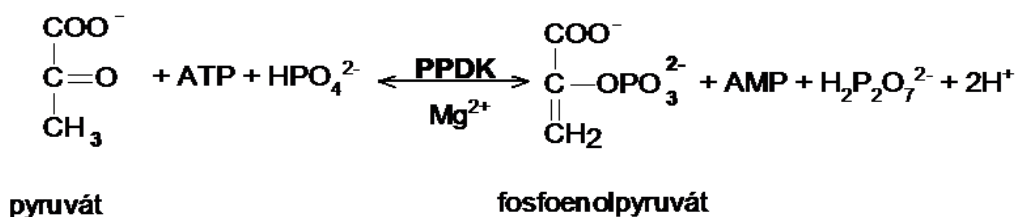
Nefotosyntetická izoforma NADP-ME se vyskytuje ve všech typech rostlin: CAM, C4 i C3 a plní rozmanité funkce: i) poskytuje NADPH potřebné pro další biosyntézy, ii) poskytuje NADPH jako koenzymy pro antioxidační enzymy, nebo iii) udržuje intracelulární pH spolu s PEPC, také iv) má úlohu při obranných odpovědích [6, 22, 24, 28]

1.3.3. Regulace NADP-ME

Fotosyntetická izoforma NADP-ME může být inhibována nadbytkem malátu. Mezi další aktivátory a inhibitory patří sukcinát, α-oxoglutarát, oxaloacetát nebo fruktosa-1,6-bisfosfát. Nefotosyntetická izoforma toho enzymu může být aktivována sukcinátem, acetylkoenzymem A, a nebo palmitoylkoenzymem A. Inhibována GTP, ATP a ADP [11].

1.4. PYRUVÁT, FOSFÁTDIKINASA

Pyruvát, fosfátdikinas (systematický název: ATP:pyruvát, fosfát fosfotransferasa, EC 2.7.9.1, dále jen PPDK) katalyzuje za přítomnosti dvojmocných iontů (Mg²⁺) a za spotřeby ATP přeměnu pyruvátu na fosfoenolpyruvát [6, 32]:



1.4.1. Výskyt a struktura PPDK

PPDK se vyskytuje ve všech typech rostlin (C3, C4 a CAM), ale i v bakteriích a prvocích, avšak v nízké aktivitě. PPDK je zcela nepřítomná u živočichů [6].

PPDK byl nalezen v C3 a v C4 rostlinách jak v chloroplastech, tak v cytosolu [6].

PPDK se skládá ze 4 identických podjednotek, tvoří homotetramer. Molekulová hmotnost jedné podjednotky se pohybuje okolo 94 kDa [32].

1.4.2. Funkce PPDK

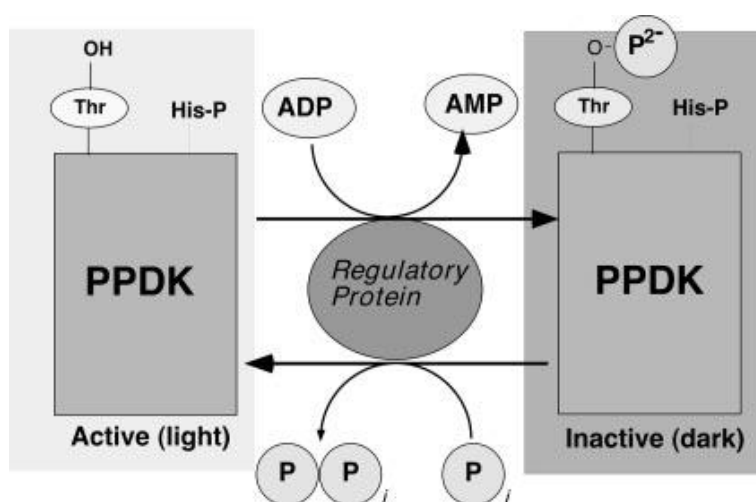
Fotosyntetickou funkci PPDK plní v C4 rostlinách. PPDK určuje rychlost celého C4 cyklu. V tomto cyklu regeneruje primární akceptor CO₂, PEP [6, 32, 33, 34].

Největší aktivita PPDK v pletivech C3 rostlin byla zjištěna v semenech a středních žilkách listů. V semenech pravděpodobně kvůli kontrole metabolismu aminokyselin a biosyntéze škrobu. Zatímco v žilkách poskytuje PEP pro biosyntézu ligninu šikimátovou cestou [6].

1.4.3. Regulace aktivity PPDK

Aktivita PPDK je regulována pomocí světla reverzibilní fosforylací. Defosforylací dochází k aktivaci, zatímco fosforylací k inaktivaci. Tato regulace je zajištěna pomocí bifunkčního regulačního proteinu PPDK (viz. obr. 6., str. 12) [6, 32, 33].

Regulační protein PPDK stejně jako jeho cílový enzym se v C4 rostlinách vyskytuje v chloroplastech mezofylových buněk. Jedná se o velmi zvláštní a unikátní protein minimálně ze tří významných pohledů. Za prvé, jak bylo zmíněno, je bifunkční, slouží jako kinasa i jako fosfatasa. Většina enzymů k fosforylaci potřebují vlastní proteinkinasu. Za druhé jako donor fosfátu mu slouží ADP nikoliv ATP. Za třetí je P_i-dependentní. Při defosforylaci vzniká pyrofosfát [32].



Obr. 6.: Regulace aktivity PPDK pomocí světla a bifunkčního regulačního proteinu PPDK. Tento protein aktivuje PPDK defosforylací a inaktivuje fosforylací (převzato z [32])

1.5. ENZYMY METABOLISMU DUSÍKU

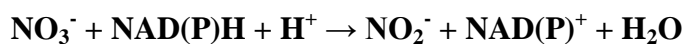
1.5.1. Asimilace dusíku

Dusík je jedním ze základních stavebních kamenů všech živých organismů. Je součástí proteinů, nukleových kyselin a jiných biomolekul. Rostlina přijímá dusičnany kořeny, kde mohou být redukovány a metabolizovány na aminokyseliny, nebo transportovány do nadzemních částí rostliny. V listech mohou být dusičnany uloženy ve vakuolách nebo metabolizovány do formy aminokyselin stejnou cestou jako v kořenech.

Asimilaci dusíku zajišťují čtyři hlavní enzymy. Jedná se o nitrátreduktasu, nitritreduktasu a komplex glutaminsynthetasy/glutamátsynthasy. Sledem reakcí katalyzovaných zmíněnými enzymy dochází k redukci dusičnanů až na amonný kation a poté k následné inkorporaci dusíku do makromolekul [35, 36, 37, 38].

1.5.2. Nitrátreduktasa

Nitrátreduktasa (systematický název: Nitrit:NAD⁺ oxidoreduktasa, EC 1.7.1.1, dále jen NR), je klíčový enzym asimilace dusíku, katalyzuje reakci, kdy dochází k redukci dusičnanů na dusitany [3, 35, 39, 40]:



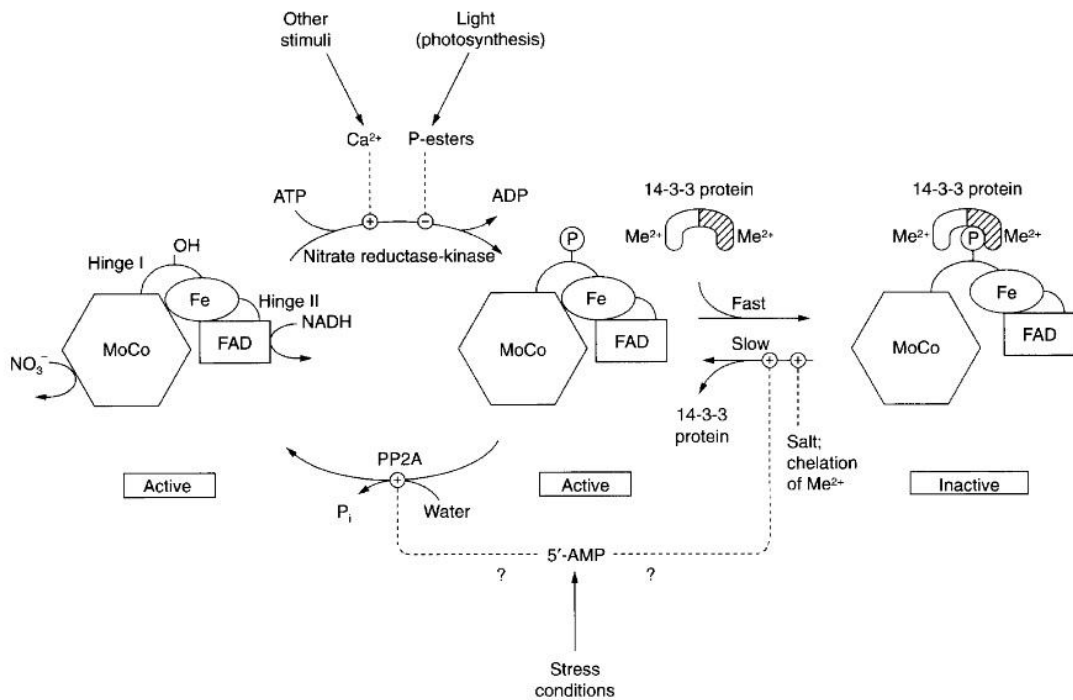
NR je cytosolový enzym. Skládá se ze 2 identických podjednotek, je to dimer. Molekulová hmotnost jedné podjednotky se pohybuje v rozmezí 99 000-104 000 v závislosti na druhu organismu, ze kterého NR pochází. Rychlost reakce katalyzované NR určuje rychlost celé asimilace dusíku.

NR má tři kofaktory, a to: FAD, hem-Fe a molybdenový kofaktor (MoCo). Tato redoxní centra slouží k přenosu elektronů z NAD(P)H na dusičnany. Každé redoxní centrum je propojeno s výraznou funkční a strukturní oblastí NR [3, 35].

Pokud je rostlina vystavena nedostatku nitrátů, a nebo nedostatku světla dochází k poklesu aktivity NR.

NR je vysoce regulována transkripčními a posttranslačními mechanismy [3, 35]. Nejvíce prozkoumána je regulace fosforylací/defosforylací. Jedná se o dvoustupňový regulační mechanismus pomocí proteinu 14.3.3 (viz obr. 7., str. 14). V prvním kroku je aktivní enzym fosforylován pomocí nitrátreduktasakinasy. V druhém kroku na

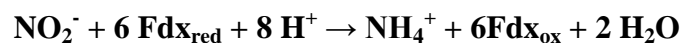
fosforylovaný enzym může nasednout protein z rodiny 14.3.3, a tím enzym inaktivuje. Díky této modifikaci může docházet k regulaci v řádu minut [3, 41, 42]. NR je pravděpodobně 14.3.3 proteinem inhibována nekompetitivně [43].



Obr. 7.: Model dvoustepňové regulace NR reverzibilní vazbou proteinu 14.3.3. Mechanismus regulace je znázorněn na jedné podjednotce NR (převzato z [41])

1.5.3. Nitritreduktesa

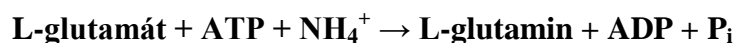
Nitritreduktesa (systematický název Nitrit:ferricytochrom-*c* oxidoreduktesa, EC 1.7.2.1, dále jen NiR) katalyzuje reakci přeměny dusitanů na amonné ionty [39].



Tento enzym se vyskytuje převážně v chloroplastech rostlin. Skládá se z 4Fe-4S centra, FAD a sirohemu [3, 38]. Aktivita NiR je vysoká, zajišťuje přeměnu a tedy odstraňování toxického dusitanu z buňky.

1.5.4. Glutaminsynthetasa

Glutaminsynthetasa (systematický název: L-glutamát:amonium ligasa (ADP-vznikající), EC 6.3.1.2, dále jen GS) katalyzuje přeměnu L-glutamátu a amonných iontů na L-glutamin za spotřeby ATP [10, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 48].



GS byla prvním enzymem, u kterého byla pozorována schopnost inkorporovat amonné ionty do organických sloučenin, například aminokyselin [49]. Původně se předpokládalo, že glutamin může poskytovat svůj amidový dusík pouze limitovanému množství organických sloučenin. Nicméně objev NADH-dependetní a ferredoxin-dependentní glutamátsynthasy prokázal existenci cyklu zakomponovávajícího amonné ionty do uhlíkatého skeletu [49].

GS je velmi rozšířena v rostlinné říši. Ve vyšších rostlinách se GS vyskytuje ve dvou izoformách, ve stroma chloroplastu a v cytosolu [49, 50]. Chloroplastová izoforma GS je odpovědná za asimilaci amonných iontů odvozených z fotorespirace nebo z redukce dusičnanů. Chloroplastová izoforma GS se vyskytuje převážně v listech a zcela chybí v nefotosyntetických orgánech C3 rostlin. Je kódována jedním genem. Cytosolová izoforma GS se v listech vyskytuje zřídka, naopak ji najdeme v nefotosyntetických pletivech, kde se účastní několika fyziologických procesů, např. reasimilace dusíku pocházejícího z proteinů, které jsou degradovány během stárnutí. Cytosolová izoforma GS je kódována třemi až pěti geny [46]. Některé studie ukazují, že obě izoformy GS jsou regulovány vývojovými stádii listů a plní tak různé funkce [51].

GS je oktamer, skládá se z 8 podjednotek. Může se jednat buď o homooktamer nebo heterooktamer [49].

1.5.5. Glutamátsynthasa

Glutamátsynthasa (systematický název: L-glutamát:NAD⁺ oxidoreduktasa (transaminační)) katalyzuje reakci, při které dochází k přenosu aminoskupiny L-glutaminu na 2-oxoglutarát za vzniku dvou molekul L-glutamátů [10, 38, 39, 47]:



GOGAT byla nalezena v rostlinách a některých bakteriích [52]. Vyskytuje se ve třech odlišných izoformách, a to ferredoxin-GOGAT, NADH-GOGAT a NADPH-GOGAT. NADPH-GOGAT je přítomna pouze v bakteriích. Ve vyšších rostlinách se vyskytují ferredoxin-GOGAT a NADH-GOGAT. První izoforma využívá jako donor

elektronu redukováný ferredoxin (EC 1.4.7.1, dále Fd-GOGAT), druhá NADH (EC 1.4.1.14, dále NADH-GOGAT) [38]. Obě izoformy se liší molekulovou hmotností, složením podjednotek, kinetickými vlastnostmi, kofaktorem a funkcí [52].

Fd-GOGAT je flavoprotein s molekulovou hmotností 130-180 kDa. Je funkční jako monomer [10, 52]. Fd-GOGAT je přítomná ve vysokých aktivitách v chloroplastech. Reduktantem je redukováný ferredoxin vzniklý fotosyntézou.

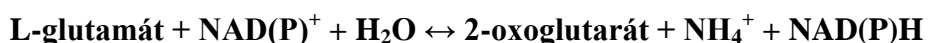
NADH-GOGAT je také flavoprotein, ale liší se molekulovou hmotností, která se pohybuje v rozmezí 225-230 kDa. NADH-GOGAT se vyskytuje v plastidech a lze ji převážně najít ve všech nefotosyntetických pletivech, jako zdroj reaktantů slouží NADH [10, 47, 52].

GOGAT patří do rodiny aminotransferas, které využívají amid z glutaminu k biosyntéze aminokyselin, purinových a pyrimidinových bazí, folátů a nikotinamidových kofaktorů [52].

cDNA byla charakterizována u Fd-GOGAT a NADH-GOGAT z několika druhů rostlin. Z *Arabidopsis* byla získána úplná sekvence genů GOGAT. V *Arabidopsis* je Fd-GOGAT kódován dvěma geny: GLU1 a GLU2, které jsou lokalizovány na chromosomu 5 a 2 [38].

1.5.6. Glutamátdehydrogenasa

Glutamátdehydrogenasa (systematický název: L-glutamát:NAD⁺ oxidoreduktasa (deaminační), EC 1.4.1.2; L-glutamát:NAD(P)⁺ oxidoreduktasa (deaminační), EC 1.4.1.3; L-glutamát:NADP⁺ oxidoreduktasa (deaminační), 1.4.1.4; dále jen GDH) katalyzuje reverzibilní reakci, aminaci/deaminaci L-glutamátu/2-oxoglutarátu [37, 38, 39, 44, 47, 53, 54, 59]:



GDH se nachází v mitochondriích, někdy také v cytoplazmě. GDH se skládá ze 2 podjednotek, α a β . V rostlinách kódují tyto podjednotky nejméně 2 geny [9, 59]. GDH může být jak homo-, tak heterohexamer [54, 55]. Existuje sedm izoform tohoto enzymu [9, 47, 53]. Ačkoliv homohexamer GDH má *in vitro* stejné kinetické vlastnosti, *in vivo* tomu tak být nemusí a každá izoforma může katalyzovat opačné reakce [53].

Až do roku 1974, kdy byl objeven komplex enzymů GS/GOGAT, se předpokládalo, že je GDH hlavním enzymem asimilace dusíku. Od té doby byla funkce GDH nejasná a je předmětem mnoha studií [9, 10, 37, 49, 54, 56]. Existují důkazy o tom, že GDH může katalyzovat reakci anaboličnou i kataboličnou. Anaboličnou reakcí pomáhá reasimilovat malé množství amonných iontů z fotorespirace, nebo pomáhá asimilovat nadměrného množství exogenních amonných iontů. Pokud GDH působí kataboličny, participuje v koordinaci metabolismu C a N, nebo v doplňování intermediátů Krebsova cyklu při nedostatku C [53, 57]. Pomocí *in vivo* nukleární magnetické rezonanční spektroskopie v reálném čase a nadprodukce genů GDH bylo zjištěno, že primární funkcí GDH v rostlinách je deaminace glutamátu [58]. GDH pravděpodobně plní i důležitou roli při stresu rostlin, kde by se mohla uplatňovat i reakce v opačném směru [57].

V *Arabidopsis* je GDH a *gdh* geny rozdílně regulovány v závislosti na dostupnosti metabolitů C a N [54].

2. CÍLE PRÁCE

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

- i) dostupnosti dusíkatých látek (amonných solí, dusičnanů, kaseinu)
- ii) dostupnosti fosfátů
- iii) dostupnosti dodatečného zdroje uhlíku (sacharosy)

2. V uvedeném experimentálním modelu zjistit aktivitu metabolicky souvisejících enzymů:

- i) NADP-ME
- ii) PPDK
- iii) a enzymů podílejících se na metabolismu dusíku: NR, GS, GOGAT, NAD⁺/NADP⁺-GDH

3. MATERIÁL

3.1. CHEMIKÁLIE

α -ketoglutarát	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
AgNO ₃	Lachema, ČR
ATP	Sigma, USA
Bis	Sigma, USA
Bradfordovo činidlo	Sigma, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
BSA	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue R 250, G 250	Sigma, USA
CuSO ₄	Lachema, ČR
DTT	Sigma, USA
EDTA	Sigma, USA
Ethanol	Lachema, ČR
Fenolové činidlo	Lachema, ČR
Formaldehyd	Lachema, ČR
Fosfoenolpyruvát	Sigma, USA
Glukosa-6-fosfát	Sigma, USA
Glutamát	Sigma, USA
Glutamin	Sigma, USA
Glycerol	Penta, ČR
Glycin	Degussa, ČR
HCl	Penta, ČR
KCl	Lachema, ČR
K ₂ CO ₃	Lachema, ČR
KH ₂ PO ₄	Lachema, ČR
K ₂ HPO ₄	Lachema, ČR
KMnO ₄	Lachema, ČR
Kyselina octová	Lachema, ČR
Kyselina trichloroctová	Lachema, ČR
L-malát	Sigma, USA

Methanol	Lachema, ČR
MgCl ₂	Sigma, USA
Na ₂ CO ₃	Lachema, ČR
NADH	Sigma, USA
NADPH	Sigma, USA
NAD ⁺	Sigma, USA
NaOH	Lachema, ČR
NNEDD	Sigma, USA
Nitroblue tetrazolium	Sigma, USA
Iodonitrotetrazolium chlorid	Sigma, USA
Oxalacetát sodný	Sigma, USA
Phenazin methosulfát	Sigma, USA
PVP	Sigma, USA
Pyruvát sodný	Sigma, USA
Sacharosa	Lachema, ČR
SDS	Serva, Německo
Směs enzymů LDH/PK	Sigma, USA
Sulfanilamid	Sigma, USA
TEMED	Serva, Německo
Tris	Sigma, USA
Vinan sodný	Lachema, ČR
Standard o M _r = 10 000 - 205 000	Thermo Scientific, USA

3.2. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Analytické váhy 100 A	Denver Instrument Company, USA
Centrifuga	Hettich Universal 32R, Německo
Elektroforetická souprava	Biometra, Německo
Mísic 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
Vortex	Biosan, Lotyšsko

3.3. ROSTLINNÝ MATERIÁL

Rostliny tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1, byly pěstovány v uzavřených kultivačních nádobkách (viz. kapitola 4.1.1.). Rostlinný materiál byl laskavě poskytnut RNDr. Helenou Synkovou, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR.

4. METODY

4.1. PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

4.1.1. Pěstování rostlin tabáku *Nicotiana tabacum* L.

Rostliny tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1, byly pěstovány „*in vitro*“, v uzavřených kultivačních nádobkách (Magenta GA-7, Diesenhofen, Německo) (viz. obr. 8., str. 22). Kultivační médiem byl Murashige-Skoogův agar. V tomto médiu byly upravovány koncentrace jednotlivých složek.

Rostliny byly rozděleny do několika skupin. První skupinou byly rostliny, které byly pěstovány v kultivační nádobce opatřené filtrem o průměru 10 mm a velikosti pórů 0,22 μm , měly tedy omezený přístup CO_2 . Další skupinou byly rostliny, které byli pěstovány v pozměněném Murashige-Skoogůvě médiu (viz. tabulka 1., 2., 3.). Ke každé skupině byla vytvořena varianta v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) a bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S), jakožto dodatečného zdroje uhlíku. Rostliny byly pěstovány při fotoperiodickém režimu 16 hodin světlo při teplotě 25°C a 8 hodin tma při teplotě 20°C. Vlhkost vzduchu v uzavřených nádobách byla více než 90% a koncentrace CO_2 v místnosti byla 350 $\mu\text{mol}(\text{CO}_2).\text{mol}^{-1}(\text{vzduchu})$.



Obr. 8.: Rostlina tabáku *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1, pěstovaná v kultivační nádobce v Murashige-Skoogůvě agaru.

Tabulka 1.: Přehled upravených koncentrací složek Murashige-Skoogůva média v jednotlivých skupinách rostlin (1. experiment).

Složky média [koncentrace]	Kontrolní rostliny	Rostliny stresované nedostatkem NH_4^- a NO_3^- (N)	Rostliny stresované nedostatkem PO_4^{3-} (P)
KNO_3 [mM]	18,7	0,94	18,7
NH_4NO_3 [mM]	20,6	1,03	20,6
KH_2PO_4 [mM]	1,25	1,25	0,125
KCl [mM]	-	2,99	2,99

Tabulka 2.: Přehled upravených koncentrací složek Murashige-Skoogůva média v jednotlivých skupinách rostlin (2. experiment).

Složky média [koncentrace]	Kontrolní rostliny	Rostliny stresované nedostatkem NH_4^- (N1)	Rostliny stresované nedostatkem NO_3^- (N2)
KNO_3 [mM]	18,7	4,12	-
NH_4NO_3 [mM]	20,6	-	3,74
KH_2PO_4 [mM]	1,25	1,25	1,25
KCl [mM]	-	3	3

Tabulka 3.: Přehled upravených koncentrací složek Murashige-Skoogova média v jednotlivých skupinách rostlin (3. experiment).

Složky média [koncentrace]	Kontrolní rostliny	Rostliny stresované nedostatkem NO_3^- (N2)	Rostliny pěstované s kaseinem (N3)
KNO_3 [mM]	18,7	-	-
NH_4NO_3 [mM]	20,6	3,74	-
KH_2PO_4 [mM]	1,25	1,25	1,25
KCl [mM]	-	3	3
Kasein [%]	-	-	0,5

4.1.2. Odběr vzorků

Z tabáků v kultivačních nádobách byl připraven směsný vzorek ze 3 rostlin. Byly rozlišovány listy, stonky a kořeny. Po odběru byly vzorky zmrazeny tekutým dusíkem a skladovány při teplotě -80°C .

4.2. PŘÍPRAVA EXTRAKTU Z ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

Listy a kořeny tabáku byly homogenizovány v trojnásobném množství extrakčního pufru A o složení: 100 mM Tris-HCl pufr (pH 7,8); 1 mM DTT; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂. Po přidání 0,02 g PVP následovala centrifugace při 4°C a 15 000 RPM (16 600 x g), po dobu 15 minut.

Získaný supernatant byl použit ke stanovení enzymových aktivit.

4.3. MĚŘENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY

Ke stanovení enzymových aktivit byl použit spektrofotometr Helios α , kyveta o délce 1 cm. Měření bylo provedeno za laboratorní teploty s 950 μ l reakční směsi a 50 μ l rostlinného extraktu, nebo 900 μ l reakční směsi a 100 μ l rostlinného extraktu s ohledem na dané enzymy.

Aktivita byla vyjádřena v μ mol substrátu přeměnného za 1 minutu vztažená na 1 gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu.

4.3.1. Měření aktivity PEPC

Enzymová aktivita PEPC byla stanovena pomocí spřažená reakce, ve které nejdříve vzniká OAA, jenž je za pomoci NAD-MDH a NADH přeměněn na malát. Enzymová aktivita PEPC byla stanovena spektrofotometricky, byl sledován úbytek NADH při vlnové délce 340 nm.

Měření enzymové aktivity PEPC bylo provedeno v reakční směsi o složení: 100 mM Tris-HCl pufr (pH 8,1); 5 mM NaHCO₃; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADH; 2 mM PEP. Reakce byla startována přidáním 50 μ l rostlinného extraktu.

Byla měřena i enzymová aktivita PEPC za nižšího pH, a to pH 7,3 za subsaturačních podmínek PEP (0,2 mM) a sledován byl i vliv aktivátoru glukosa-6-fosfátu (5 mM). Reakce byla startována přidáním 100 μ l rostlinného extraktu.

4.3.2. Měření aktivity NADP-ME

Enzymová aktivita NADP-ME byla stanovena spektrofotometricky, byl sledován přírůstek NADPH při vlnové délce 340 nm.

Měření enzymové aktivity NADP-ME bylo provedeno v reakční směsi o složení: 100 mM Tris-HCl pufr (pH 7,4); 10 mM L-malát; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP. Reakce byla startována přidáním 50 µl rostlinného extraktu.

4.3.3. Měření aktivity PPDK

Enzymová aktivita PPDK byla stanovena pomocí spřažené reakce. PPDK katalyzuje vznik PEP, který je pomocí PEPC karboxylován na OAA a ten se dále pomocí enzymu NAD-MDH a NADH přeměňuje na malát. Enzymová aktivita PPDK byla stanovena spektrofotometricky, sledoval se úbytek NADH při vlnové délce 340 nm.

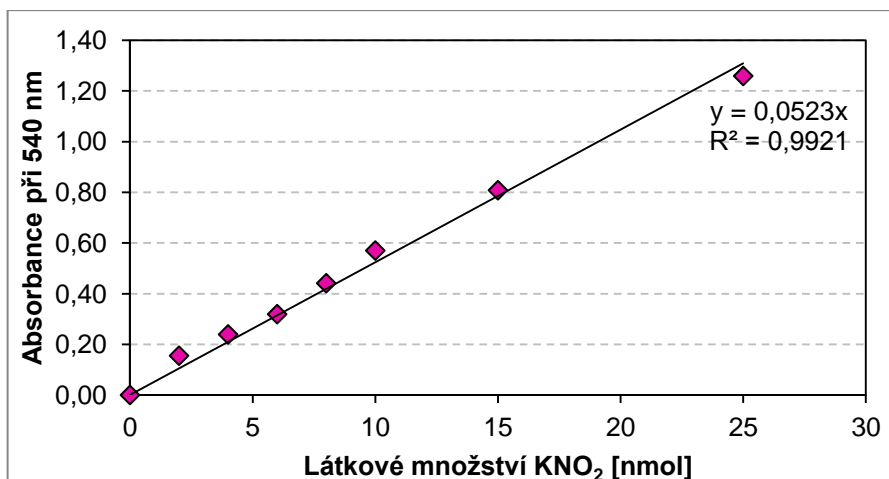
Měření enzymové aktivity PPDK bylo provedeno v reakční směsi o složení: 100 mM Tris-HCl pufr (pH 8,1); 10 mM MgCl₂; 5 mM NaHCO₃; 2 mM pyruvát; 1 mM ATP; 2 mM K₂HPO₄; 0,2 mM NADH. Reakce byla startována přidáním 100 µl rostlinného extraktu.

4.3.4. Měření aktivity NR

Enzymová aktivita NR byla stanovena pomocí reakce, ve které se tvoří z dusitanových iontů a sulfanilamidu diazoniový ion, který pak spolu s NNEDD vytvoří růžové azobarvivo, jehož absorbanci lze měřit při vlnové délce 540 nm.

Měření enzymové aktivity NR bylo provedeno v reakční směsi o složení: 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pufr (pH 7,4); 10 mM EDTA; 0,15 mM NADH; 0,1 M KNO₃. Reakce byla startována přidáním 100 µl rostlinného extraktu. Zároveň byl připraven i slepý vzorek, který obsahoval: 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pufr (pH 7,4); 10 mM EDTA a 100 µl rostlinného extraktu. Po 30 minutách bylo k reakční směsi přidáno 100 µl 5,8 mM sulfanilamidu a 100 µl 0,8 mM NNEDD. Poté byla proměřena absorbance vzorku proti slepému vzorku při 540 nm [60].

K výpočtu aktivity NR byla použita kalibrační křivka (viz. obr. 9., str. 26).



Obr. 9.: Kalibrační křivka závislosti absorbance vzniklého azobarviva měřené při 540 nm na látkovém množství KNO₂.

4.3.5. Měření aktivity GS

GS katalyzuje reakci, při které vzniká ADP. ADP pak spřaženou reakcí s PK poskytuje pyruvát, který slouží jako substrát pro LDH. NAD⁺, které vzniká, je přímo úměrné aktivitě GS. Enzymová aktivita GS byla stanovena spektrofotometricky, sledoval se přírůstek NAD⁺ při vlnové délce 340 nm.

Měření enzymové aktivity GS bylo provedeno v reakční směsi o složení: 100 mM Tris-HCl pufr (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. Zároveň byl připraven i slepý vzorek, který obsahoval: 100 mM Tris-HCl pufr (pH 7,6); 0,3 mM NADH. Reakce byla startována přidáním 100 μl rostlinného extraktu [60].

4.3.6. Měření aktivity GOGAT

Enzymová aktivita GOGAT byla stanovena spektrofotometricky, sledoval se přírůstek NAD⁺ při vlnové délce 340 nm.

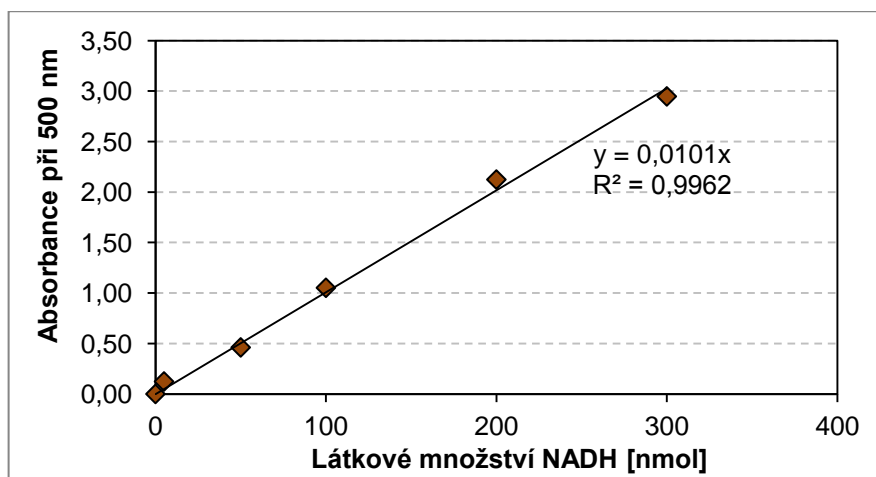
Měření enzymové aktivity GOGAT bylo provedeno v reakční směsi o složení: 100 mM Tris-HCl pufr (pH 7,6); 5 mM α-ketoglutarát; 5 mM L-glutamin; 0,3 mM NADH. Zároveň byl připraven i slepý vzorek, který obsahoval: 100 mM Tris-HCl pufr (pH 7,6); 0,3 mM NADH. Reakce byla startována přidáním 100 μl rostlinného extraktu [60].

4.3.7. Měření aktivity NAD⁺/NADP⁺-GDH

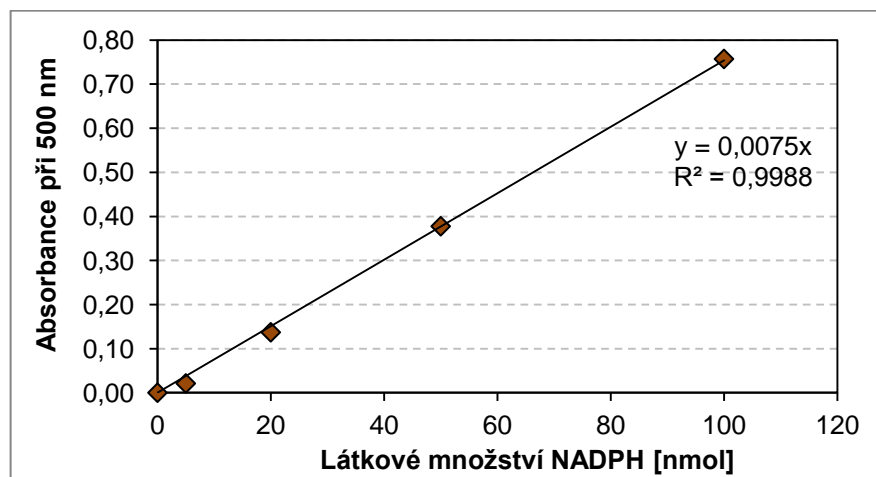
NADH/NAPDH poskytuje s jodonitrotetrazolium chloridem a phenazin methosulfátem červené zabarvení, které má absorpční maximum při 500 nm. Enzymová aktivita NAD⁺/NADP⁺-GDH byla stanovena pomocí barevné reakce při 500 nm.

Měření enzymové aktivity GDH bylo provedeno v reakční směsi o složení: 100 mM Tris-HCl pufr (pH 7,1); 10 mM L-glutamát; 0,2 mM NAD⁺/NADP⁺. Zároveň byl připraven i slepý vzorek, který obsahoval: 100 mM Tris-HCl pufr (pH 7,1); 0,2 mM NAD⁺/NADP⁺. K reakčním směsím bylo přidáno 200 μ l barevného roztoku (5 mg/ml jodonitrotetrazoliové violeti s 5 μ g/ml phenazin methosulfátem). Reakce byla startována přidáním 100 μ l rostlinného extraktu. Po 30 minutách byla proměřena absorbance při 500 nm proti referenčnímu vzorku [60].

K výpočtu aktivity NAD⁺/NADP⁺-GDH byla použita kalibrační křivka (viz. obr. 10., str. 27 a obr. 11., str. 27).



Obr. 10.: Kalibrační křivka závislosti absorbance formazanu vzniklého z NADH, PMS a jodonitrotetrazolium chloridu měřené při 500 nm na látkovém množství NADH.



Obr. 11.: Kalibrační křivka závislosti absorbance formazanu vzniklého z NADPH, PMS a jodonitrotetrazolium chloridu měřené při 500 nm na látkovém množství NADH.

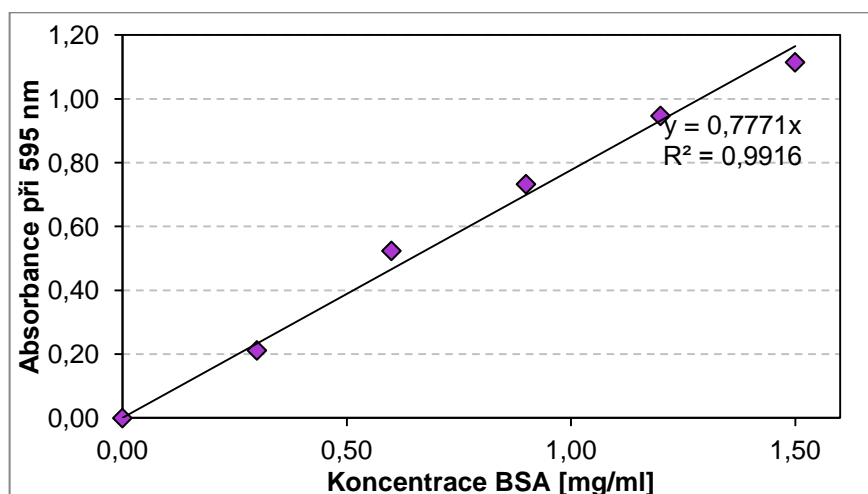
4.4. STANOVENÍ MNOŽSTVÍ BÍLKOVIN

4.4.1. Stanovení množství bílkovin metodou dle Bradfordové

Metoda stanovení bílkovin dle Bradfordové je založena na posunu absorpčního maxima z 365 nm na 595 nm, který je způsoben vazbou barviva Coomassie Brilliant Blue G 250 na proteiny. Změna absorbance při 595 nm je úměrná množství bílkoviny [61].

Jako proteinový standard byl použit BSA v rozmezí koncentrací 0,25 – 1,4 mg/ml. K 33 μ l hrubého extraktu byl přidán 1 ml Bradfordova činidla. Po 30 minutách inkubace byla změřena absorbance při 595 nm.

K výpočtu koncentrace bílkovin byla použita kalibrační křivka (viz. obr. 12., str. 28).

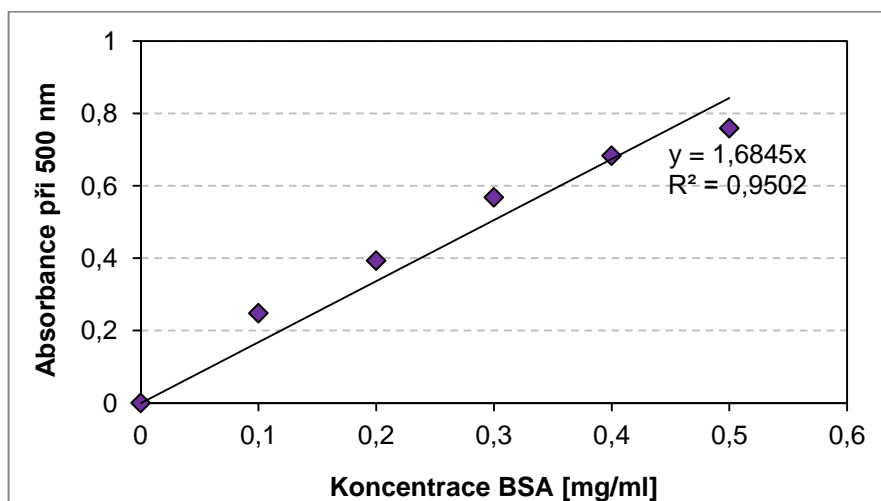


Obr. 12.: Kalibrační křivka stanovení bílkovin dle Bradfordové při 595 nm. Jako standard byl použit BSA.

4.4.2. Stanovení množství bílkovin metodou dle Lowryho

Rostlinný materiál z listů byl dvacetkrát zředěn a použit ke stanovení bílkovin metodou podle Lowryho. K 200 μ l extraktu byl přidán 1 ml roztoku C (o složení: 50 ml 2% Na_2CO_2 v 0,1 M NaOH a 1 ml 0,5% CuSO_4 v 1% vlnanu sodném). Po 10 min bylo k této směsi přidáno fenolové činidlo zředěné v poměru 1:1. Po 30 minutách byla měřena absorbance oproti slepému vzorku při 500 nm.

K výpočtu koncentrace bílkovin byla použita kalibrační křivka (viz. obr. 13., str. 29).



Obr. 13.: Kalibrační křivka stanovení bílkovin dle Lowryho při 500 nm. Jako standard byl použit BSA.

4.5. ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE PROTEINŮ

Všechny elektroforetické separace proteinů byly provedeny pomocí soupravy Biometra. Jak při elektroforetické separaci proteinů v prostředí SDS, tak v nedenujícím prostředí bylo na počátku nastaveno napětí na 70 V. Po překročení hranice zaostřovacího gelu bylo napětí zvýšeno na 140 V.

4.5.1. Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS

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

0,5 ml rostlinného extraktu s trojnásobkem ethanolu bylo ponecháno 4 hodiny při teplotě -25°C . Poté byla směs centrifugována při 4°C a 15 000 RPM (16 600 x g), po dobu 15 minut. Supernatant byl odpipetován a peleta byla resuspendována v 30 μl destilované vody. K takto připravenému vzorku byl v poměru 1:1 přidán vzorkový pufr obsahující: 0,1542 g DTT; 0,5 ml 0,1% bromfenolové modře; 2 ml glycerolu; 2 ml 10% SDS; 2,6 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) a 2,9 ml destilované vody. Směs vzorku a pufru byla po dobu 5 minut povařena. Vzorky pak byly aplikovány ve stejném objemu, nebo bylo aplikováno stejné množství proteinů.

Příprava gelů:

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

10% separační gel o celkovém objemu 5 ml se skládal z: 1,9 ml destilované vody; 1,7 ml 30% směsi akrylamidu/Bis; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru (pH 8,8); 50 μ l 10% SDS; 2 μ l TEMED; 50 μ l 10% peroxodisíranu amonného.

15% separační gel o celkovém objemu 5 ml se skládal z: 1,1 ml destilované vody; 2,5 ml 30% směsi akrylamidu/Bis; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru (pH 8,8); 50 μ l 10% SDS; 2 μ l TEMED; 50 μ l 10% peroxodisíranu amonného.

5% zaostřovací gel o celkovém objemu 6 ml se skládal z: 4,1 ml destilované vody; 1 ml 30% směsi akrylamidu/Bis; 750 μ l 1,0 M Tris-HCl pufru (pH 6,8); 60 μ l 10% SDS; 6 μ l TEMED; 60 μ l 10% peroxodisíranu amonného.

4.5.2. Detekce proteinů po elektroforetické separaci v prostředí SDS pomocí Coomassie Brilliant Blue

Gel byl po elektroforetické separaci proteinů v prostředí SDS ponechán přes noc v barvicí lázni, která se skládala z: 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250; 425 ml ethanolu; 100 ml kyseliny octové; 50 ml methanolu; 425 ml destilované vody. Následující den byl gel odbarvován pomocí lázně z kyseliny octové, ethanolu a destilované vody v poměru 10 : 25 : 65.

4.5.3. Detekce proteinů po elektroforetické separaci v prostředí SDS pomocí dusičnanu stříbrného

Gel byl po elektroforetické separaci proteinů v prostředí SDS detekován pomocí dusičnanu stříbrného.

Nejprve byl gel fixován v 50% methanolu, 12% kyselině trichloroctové a 2% chloridu měďnatém. Poté byl 10 minut promýván v roztoku 10% ethanolu, 5% kyseliny octové a vody. Následovala inkubace v 0,01% KMnO_4 po dobu 10 minut a znovu promývání v roztoku 10% ethanolu, 5% kyseliny octové a vody po dobu dalších 10 minut. Po promytí destilovanou vodou byl gel inkubován v 10% ethanolu po dobu 10 minut. Po dalším promytí v destilované vodě byl gel ponořen do 0,1% AgNO_3 po dobu 10 minut. Po promytí vodou následovala alkalizace v 10% K_2CO_3 po dobu 1 minuty a vyvíjení v 0,1%

formaldehydu v 20% K_2CO_3 po dobu 3 až 4 minut a ustálení v roztoku 10% ethanolu, 5% kyseliny octové a vody po dobu 1 až 2 minut. Poté byl gel naposledy promyt v destilované vodě po dobu 30 minut.

4.5.4. Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v nedenaturujícím prostředí

Vzorky aplikované do jamek v zaostřovacím gelu byly naneseny s 20% sacharosou.

Příprava gelů:

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

6% separační gel o celkovém objemu 5 ml se skládal z: 2,6 ml destilované vody; 1 ml 30% směsi akrylamidu/Bis; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru (pH 8,8); 50 μ l 10% glycerolu; 4 μ l TEMED; 50 μ l 10% peroxodisíran amonný.

12% separační gel o celkovém objemu 5 ml se skládal z: 1,6 ml destilované vody; 2 ml 30% směsi akrylamidu/Bis; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru (pH 8,8); 50 μ l 10% glycerolu; 2 μ l TEMED; 50 μ l 10% peroxodisíran amonný.

3% zaostřovací gel o celkovém objemu 4 ml se skládal z: 3 ml destilované vody; 400 μ l 30% směsi akrylamidu/Bis; 500 μ l 1,0 M Tris-HCl pufru (pH 6,8); 40 μ l 10% glycerolu; 8 μ l TEMED; 40 μ l 10% peroxodisíran amonný.

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

Gel byl po elektroforetické separaci proteinů v nedenaturujícím prostředí ponořen do roztoku o celkovém objemu 10 ml, který se skládal z: 100 mM Tris-HCl pufru (pH 7,4); 10 mM L-malátu; 10 mM $MgCl_2$; 0,2 mM $NADP^+$; a barvy (0,1 mg/ml nitroblue tetrazolium a 5 μ g/ml phenazin methosulfát). Gel byl ponechán v roztoku přes noc.

4.5.6. Detekce $NAD^+/NADP^+$ -GDH v polyakrylamidovém gelu po elektroforetické separaci v nedenaturujícím prostředí

Gel byl po elektroforetické separaci proteinů v nedenaturujícím prostředí ponořen do roztoku o celkovém objemu 10 ml o složení: 100 mM Tris-HCl pufru (pH 7,1); 10 mM

L-glutamát; 0,2 mM NAD⁺/NADP⁺; a barvy (0,1 mg/ml nitroblue tetrazolium a 5 µg/ml phenazin methosulfát). V tomto roztoku byl gel ponechán přes noc.

5. VÝSLEDKY

Rostliny tabáku *Nicotiana tabacum*, L. byly pěstovány v kultivačních nádobkách v Murashinge-Skoogově agaru s modifikovaným množstvím živin. Rostliny byly pěstovány v přítomnosti, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy, jakožto dodatečného zdroje uhlíku. Se sníženými koncentracemi některých živin (fosfátů a dusíkatých látek), nebo v přítomnosti jiných zdrojů dusíku (kasein) (viz. kapitola 4.1.1.).

Z rostlin tabáků, konkrétně z listů a kořenů, byly připraveny extrakty (viz. kapitola 4.2.), ve kterých byla měřena aktivita sledovaných enzymů: PEPC, NADP-ME, PPK, NR, GS, GOGAT a $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ -GDH (viz. kapitola 4.3.). Aktivita enzymů vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu byla u jednotlivých enzymů vynesena do sloupcových grafů. Dále byl zjištěn obsah bílkovin v jednotlivých extraktech (viz. kapitola 4.4.). Také byla provedena elektroforetická separace proteinů v denaturujícím i nedenaturujícím prostředí (viz. kapitola 4.5.1. a 4.5.4.)

5.1. VLIV DOSTUPNOSTI FOSFÁTŮ A DUSÍKATÝCH LÁTEK V KULTIVAČNÍM MÉDIU NA AKTIVITU ENZYMŮ V ROSTLINÁCH TABÁKU

5.1.1. Vzhled rostlin tabáku v jednotlivých skupinách

K experimentu bylo vypěstováno 68 rostlin tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1, které byly rozděleny:

- (a) rostliny tabáku pěstované se sníženým množstvím fosfátů v přítomnosti 1,5% sacharosy (P+S)
- (b) rostliny tabáku pěstované se sníženým množstvím fosfátů bez přítomnosti 1,5% sacharosy (P-S)
- (c) rostliny tabáku pěstované se sníženým množstvím dusíkatých látek v přítomnosti 1,5% sacharosy (N+S)
- (d) rostliny tabáku pěstované se sníženým množstvím dusíkatých látek bez přítomnosti 1,5% sacharosy (N-S)
- (e) kontrolní rostliny tabáku pěstované v přítomnosti 1,5% sacharosy (K+S)

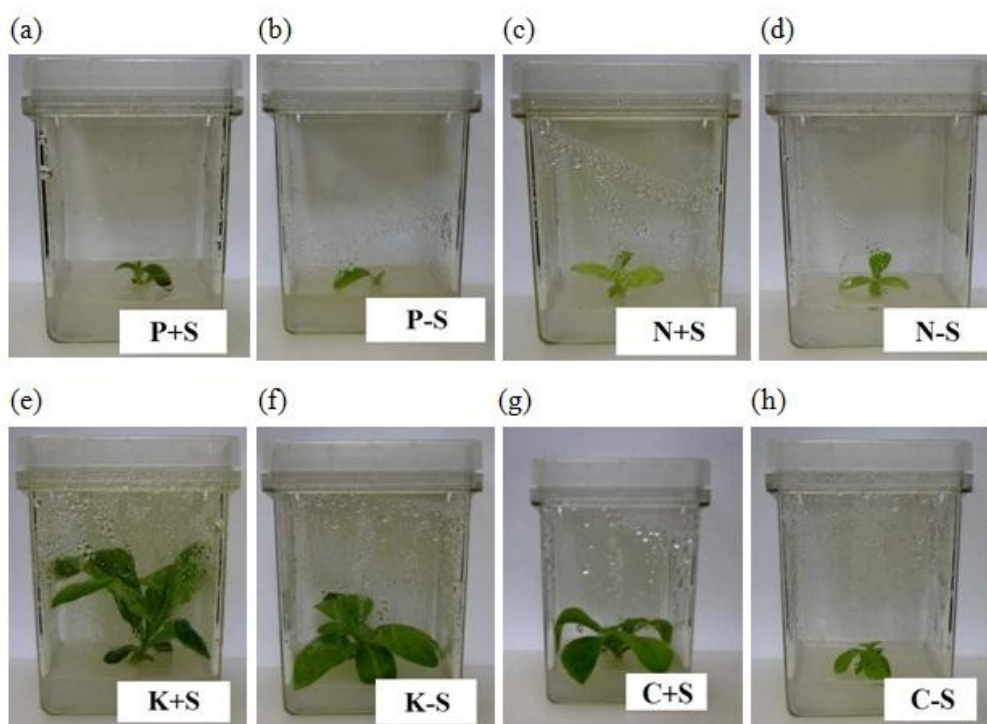
(f) kontrolní rostliny tabáku pěstované bez přítomnosti 1,5% sacharosy (K-S)

(g) rostliny pěstované v uzavřených kultivačních nádobkách zajišťující limitovaný přístup CO₂ v přítomnosti 1,5% sacharosy (C+S)

(h) rostliny pěstované v uzavřených kultivačních nádobkách zajišťující limitovaný přístup CO₂ bez přítomnosti 1,5% sacharosy (C-S)

Rostliny pěstované se sníženým množstvím fosfátů (P), dusíkatých látek (N) i rostliny pěstované s limitovaným přístupem CO₂ byly menší než rostliny kontrolní. Při odběru vzorků nebylo možné rozlišit jednotlivé části rostlin (L - listy, S - stonky, K - kořeny).

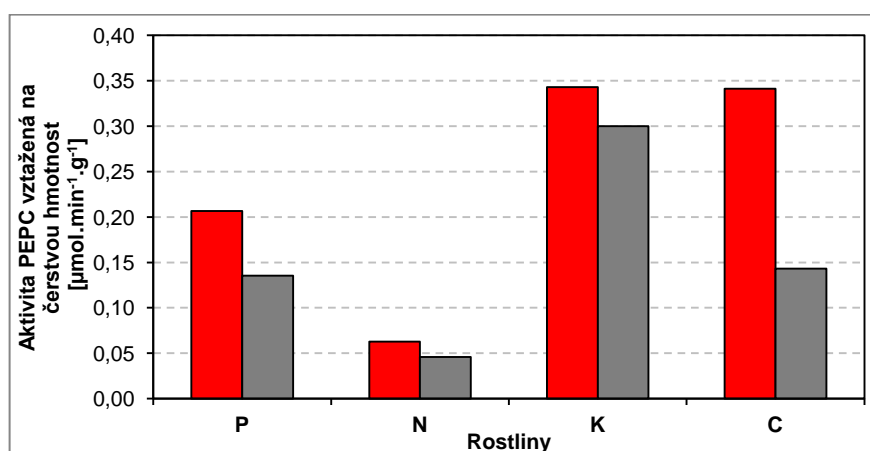
Vzhled jednotlivých rostlin, se sníženým množstvím fosfátů (P), se sníženým množstvím dusíkatých látek (N), kontrolních rostlin (K), nebo rostlin pěstovaných v uzavřených kultivačních nádobkách s limitovaným přístupem CO₂ (C), je znázorněn na obr. 14, str. 34.



Obr. 14.: Rostliny tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1, pěstované v kultivačních nádobkách s různým složením Murashige-Skoogově agaru: se sníženým množstvím fosfátů (P), se sníženým množstvím amoniakálních iontů a zároveň se sníženým množstvím dusičnanů (N), v porovnání s kontrolními rostlinami (K) a rostlinami pěstovanými v uzavřených kultivačních nádobkách opatřených filtrem, který zajišťuje limitovaný přístup CO₂ (C), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S), nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S).

5.1.2. Aktivita PEPC

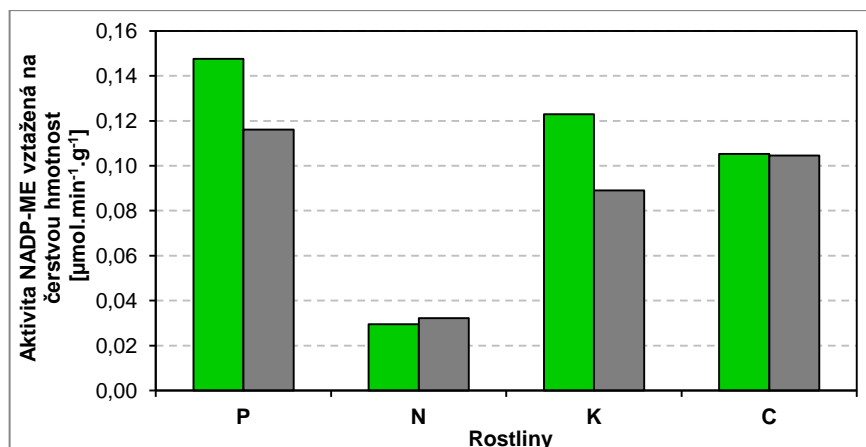
Aktivita PEPC byla měřena u všech skupin rostlin (se sníženým množstvím fosfátů, se sníženým množstvím dusíkatých látek, kontrolních i s limitovaným množstvím CO₂), vždy v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, červené sloupce) a bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, šedé sloupce) (viz. obr. 15., str. 35). Nejvyšší aktivita PEPC byla zjištěna v kontrolních rostlinách (K) a v rostlinách s limitovaným přístupem CO₂ (C) v přítomnosti 1,5% sacharosy. Limitovaný přístup CO₂ způsobil snížení aktivity PEPC v rostlinách pěstovaných bez přítomnosti 1,5% sacharosy. Snížení koncentrace fosfátů (P) znamenalo i snížení aktivity PEPC na polovinu oproti kontrolním rostlinám. K výraznému snížení aktivity PEPC došlo v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusíkatých látek (N).



Obr. 15.: Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu pěstovaného v kultivačních nádobách s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím fosfátů (P), se sníženým množstvím amonných iontů a zároveň se sníženým množstvím dusičnanů (N), v porovnání s kontrolními rostlinami (K) a rostlinami pěstovanými v uzavřených kultivačních nádobkách opatřených filtrem, který zajišťuje limitovaný přístup CO₂ (C), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

5.1.3. Aktivita NADP-ME

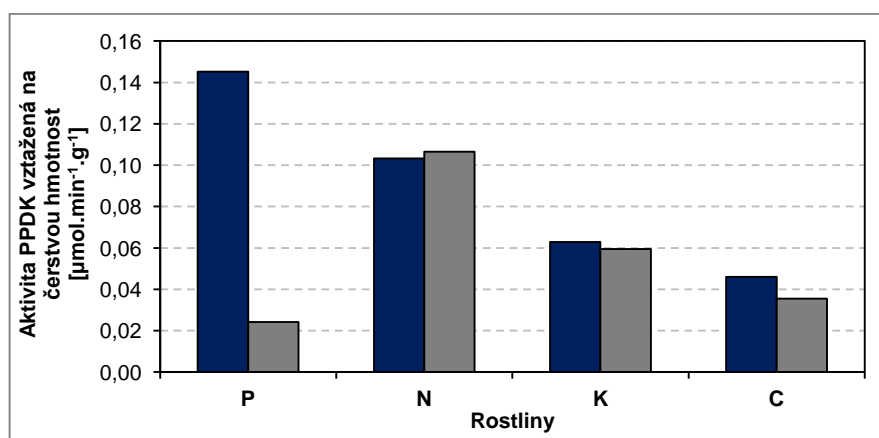
V extraktech jednotlivých skupin byla stanovena aktivita NADP-ME (viz. obr. 16., str. 36). Nejvyšší aktivita NADP-ME byla zjištěna v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím fosfátů (P), a to jak v přítomnosti (+S, zelené sloupce), nebo bez přítomnosti (-S, šedé sloupce) 1,5% sacharosy. Naopak nejnižší aktivita NADP-ME byla stanovena v rostlinách pěstovaných se sníženým dusíkatých látek (N). Aktivita NADP-ME v kontrolních rostlinách (K) a rostlinách s limitovaným množstvím CO₂ (C) byla téměř bez rozdílů.



Obr. 16.: Aktivita NADP-ME vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu pěstovaného v kultivačních nádobách s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím fosfátů (P), se sníženým množstvím amonných iontů a zároveň se sníženým množstvím dusičnanů (N), v porovnání s kontrolními rostlinami (K) a rostlinami pěstovanými v uzavřených kultivačních nádobkách opatřených filtrem, který zajišťuje limitovaný přístup CO₂ (C), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

5.1.4. Aktivita PPKK

Dalším sledovaným enzymem byla PPKK (viz. obr. 17., str. 36). Nejvyšší aktivita tohoto enzymu byla pozorována v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím fosfátů (P) v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, modré sloupce). V rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím fosfátů bez přítomnosti 1,5% sacharosy však byla zjištěna aktivita PPKK nejnižší (-S, šedé sloupce). Zvýšená aktivita PPKK oproti kontrolním rostlinám (K) byla pozorována v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusíkatých látek (N). Mírně snížená aktivita PPKK oproti kontrolním rostlinám byla zjištěna v rostlinách pěstovaných s limitovaným množstvím CO₂ (C).

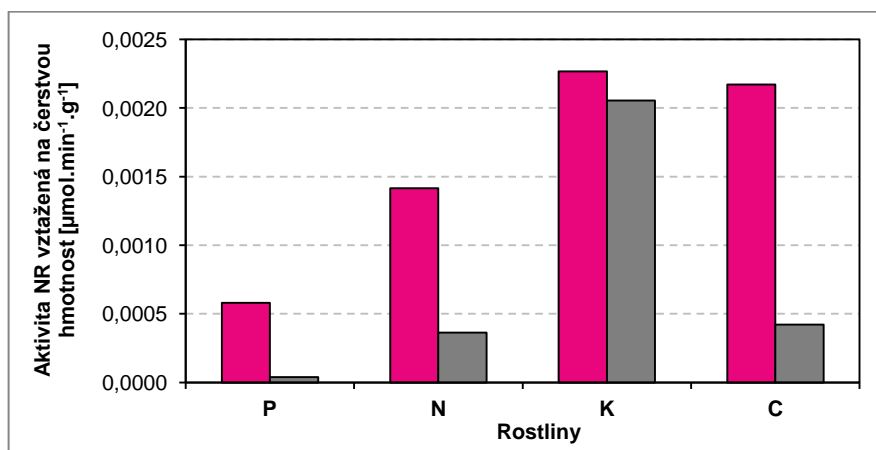


Obr. 17.: Aktivita PPKK vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu pěstovaného v kultivačních nádobách s různým složením kultivačního média: se sníženým

množství fosfátů (P), se sníženým množstvím amonných iontů a zároveň se sníženým množstvím dusičnanů (N), v porovnání s kontrolními rostlinami (K) a rostlinami pěstovanými v uzavřených kultivačních nádobkách opatřených filtrem, který zajišťuje limitovaný přístup CO₂ (C), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.1.5. Aktivita NR

Výrazně snížená aktivita NR byla zjištěna v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím fosfátů (P) a se sníženým množstvím dusíkatých (N) oproti kontrolním rostlinám (K) (viz. obr. 18., str. 37). Aktivita NR v rostlinách s limitovaným množstvím CO₂ (C) v přítomnosti 1,5% sacharosu byla téměř beze změny oproti kontrolním rostlinám, avšak bez přítomnosti 1,5% sacharosu došlo ke snížení aktivity NR. Dále byla pozorována zvýšená aktivita NR u všech jednotlivých skupin rostlin pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S, růžové sloupce) oproti rostlinám pěstovaných bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S, šedé sloupce).

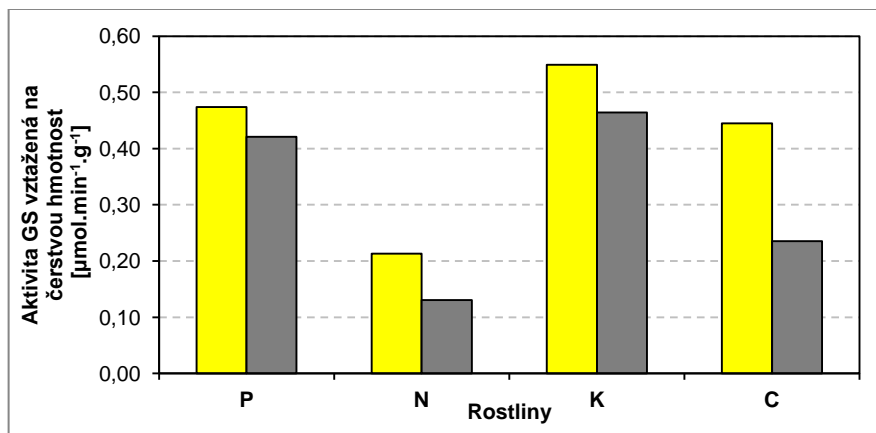


Obr. 18.: Aktivita NR vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu pěstovaného v kultivačních nádobkách s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím fosfátů (P), se sníženým množstvím amonných iontů a zároveň se sníženým množstvím dusičnanů (N), v porovnání s kontrolními rostlinami (K) a rostlinami pěstovanými v uzavřených kultivačních nádobkách opatřených filtrem, který zajišťuje limitovaný přístup CO₂ (C), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.1.6. Aktivita GS

Aktivita GS byla stanovena ve všech variantách pěstovaných rostlin (viz. obr. 19., str. 38). Nejvyšší aktivita byla zjištěna v kontrolních rostlinách (K), jak v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S, žluté sloupce), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S, šedé sloupce). K mírnému snížení aktivity GS došlo v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím

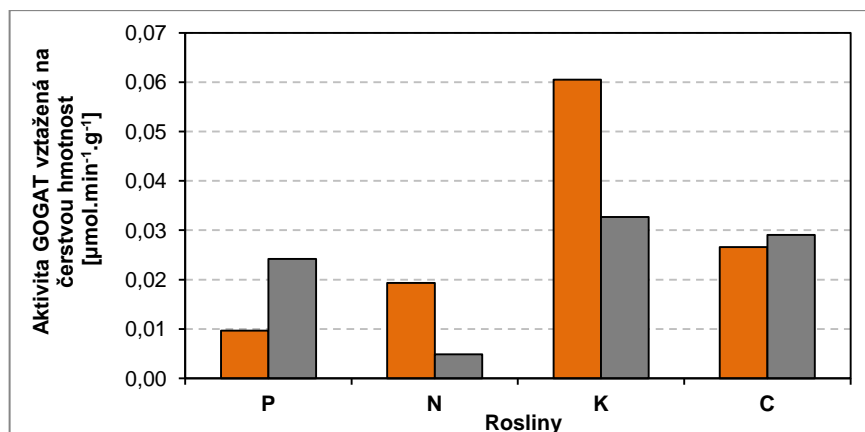
fosfátů (P) a v rostlinách pěstovaných s limitovaným přístupem CO₂ (C) v přítomnosti 1,5% sacharosu. K téměř polovičnímu poklesu aktivity GS oproti kontrolám došlo v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusíkatých látek (N) a v rostlinách pěstovaných s limitovaným přístupem CO₂ (C) bez přítomnosti 1,5% sacharosu.



Obr. 19.: Aktivita GS vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu pěstovaného v kultivačních nádobách s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím fosfátů (P), se sníženým množstvím amonných iontů a zároveň se sníženým množstvím dusičnanů (N), v porovnání s kontrolními rostlinami (K) a rostlinami pěstovanými v uzavřených kultivačních nádobkách opatřených filtrem, který zajišťuje limitovaný přístup CO₂ (C), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.1.7. Aktivita GOGAT

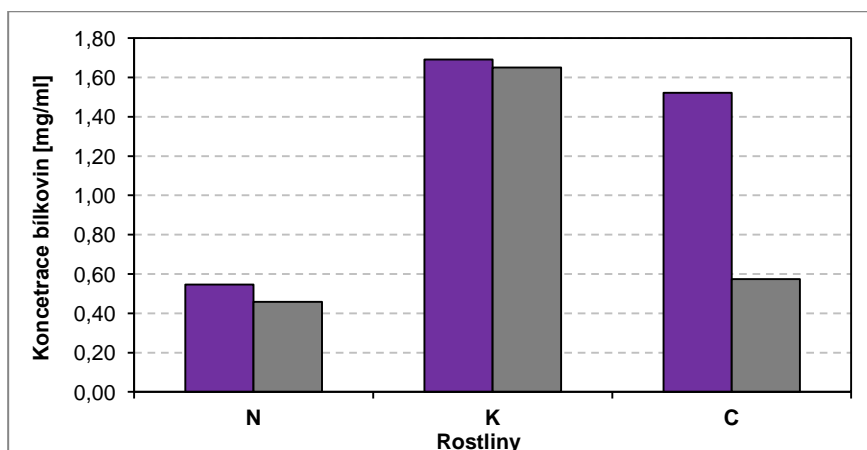
Dalším sledovaným enzymem byla GOGAT (viz. obr. 20., str. 39). Největší aktivita tohoto enzymu byla pozorována v kontrolních rostlinách (K) v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S, oranžové sloupce). Aktivita v kontrolních rostlinách bez přítomnosti 1,5% sacharosu je zhruba poloviční (-S, šedé sloupce). Nejmenší aktivita GOGAT byla zjištěna v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusíkatých látek (N) bez přítomnosti 1,5% sacharosu a v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím fosfátů (P) v přítomnosti 1,5% sacharosu. Aktivita v ostatních rostlinách (se sníženým množstvím fosfátů (P) bez přítomnosti 1,5% sacharosu, se sníženým množstvím dusíkatých látek (N) v přítomnosti 1,5% sacharosu a v rostlinách pěstovaných v uzavíratelných kultivačních nádobkách s limitovaným přístupem CO₂ (C), jak v přítomnosti, tak bez přítomnosti 1,5% sacharosu) odpovídá přibližně aktivitě naměřené v kontrolních rostlinách bez přítomnosti 1,5% sacharosu.



Obr. 20.: Aktivita GOGAT vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu pěstovaného v kultivačních nádobách s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím fosfátů (P), se sníženým množstvím amonných iontů a zároveň se sníženým množstvím dusičnanů (N), v porovnání s kontrolními rostlinami (K) a rostlinami pěstovanými v uzavřených kultivačních nádobkách opatřených filtrem, který zajišťuje limitovaný přístup CO₂ (C), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

5.1.8. Stanovení bílkovin dle Bradfordové

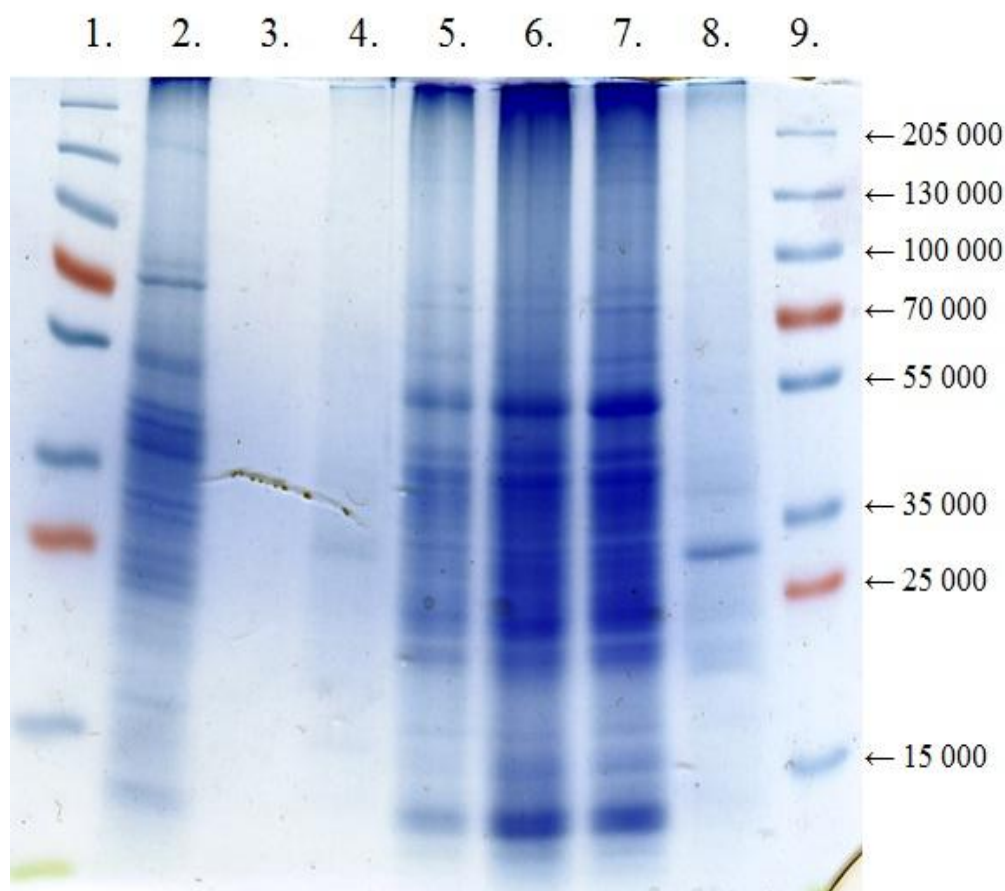
V extraktech jednotlivých skupin rostlin byla stanovena i koncentrace rozpustných bílkovin metodou dle Bradfordové (viz. obr. 21., str. 39). Největší koncentrace bílkovin byla v kontrolních rostlinách (K), a to jak v rostlinách pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, fialové sloupce), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, šedé sloupce). Menší koncentrace bílkovin oproti kontrolním rostlinám byla zjištěna v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusíkatých látek (N) v přítomnosti i bez přítomnosti 1,5% sacharosy, a v rostlinách pěstovaných v uzavřených nádobkách s limitovaným přístupem CO₂ (C) bez přítomnosti 1,5% sacharosy. Téměř žádný rozdíl oproti kontrolám nebyl pozorován v rostlinách pěstovaných v uzavřených nádobkách s limitovaným přístupem CO₂ (C) v přítomnosti 1,5% sacharosy.



Obr. 21.: Množství rozpustných bílkovin v rostlinách pěstovaných v kultivačních nádobách s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím amonných iontů a zároveň se sníženým množstvím dusičnanů (N), v porovnání s kontrolními rostlinami (K) a rostlinami pěstovanými v uzavřených kultivačních nádobkách opatřených filtrem, který zajišťuje limitovaný přístup CO₂ (C), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

5.1.9. Elektroforetická separace proteinů v extraktech z rostliny tabáku

Pomocí soupravy Biometra byla provedena elektroforetická separace proteinů v prostředí SDS. Proteiny rostlinných extraktů byly rozděleny v gradientu 10% až 15% polyakrylamidového gelu a následně detekovány pomocí Coomassie Brilliant Blue (viz. obr. 22., str. 40). Jako standard molekulových hmotností byl použit komerční marker od firmy Thermo Scientific (10 00 - 205 000). Byl aplikován stejný objem extraktu všech vzorků. Z obrázku 22. je patrné, že rostliny pěstované jako kontrolní v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, *dráha č. 5*), bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, *dráha č. 6*) a rostliny pěstované v uzavřených nádobkách s limitovaným přístupem CO₂ v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, *dráha č. 7*) obsahují nejvíce proteinů.



Obr. 22.: Detekce proteinů po elektroforetické separaci proteinů různých skupin rostlin v prostředí SDS v gradientu 10% až 15% polyakrylamidového gelu. Aplikován byl stejný objem vzorku, a to 20 μ l vzorku.

Dráha 1.: Marker od firmy Thermo Scientific se standardními proteiny o relativních molekulových hmotnostech v rozmezí: 10 000 – 205 000

Dráha 2.: Extrakt z listu tabáku pěstovaného v půdě

Dráha 3.: Extrakt z listu tabáku pěstovaného se sníženým množstvím dusíkatých látek se sacharosou (N+S)

Dráha 4.: Extrakt z listu tabáku pěstovaného se sníženým množstvím dusíkatých látek bez sacharosy (N-S)

Dráha 5.: Extrakt z listu kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)

Dráha 6.: Extrakt z listu kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)

Dráha 7.: Extrakt z listu rostlin tabáku pěstovaného v uzavřených kultivačních nádobkách s limitovaným přístupem CO₂ s sacharosou (C+S)

Dráha 8.: Extrakt z listu rostlin tabáku pěstovaného v uzavřených kultivačních nádobkách s limitovaným přístupem CO₂ bez sacharosy (C-S)

Dráha 9.: Marker od firmy Thermo Scientific se standardními proteiny o relativních molekulových hmotnostech v rozmezí: 10 000 – 205 000

5.1.10. Detekce proteinů pomocí dusičnanu stříbrného po elektroforetické separaci v gradientu polyakrylamidového gelu v prostředí SDS

Před detekcí proteinů dusičnanem stříbrným musela být provedena elektroforetická separace proteinů v prostředí SDS v gradientu 10% až 15% polyakrylamidového gelu (viz. obr. 23., str. 42). Do jamek bylo aplikováno stejné množství proteinů, a to 5 μ g proteinů. Z obrázku 23. je zřejmé, že kontrolní rostliny pěstované v přítomnosti 1,5% sacharosy (*dráha č. 5*), bez přítomnosti 1,5% sacharosy (*dráha č. 6*) a rostliny pěstované v uzavřených kultivačních nádobkách s limitovaným přístupem CO₂ v přítomnosti (*dráha č. 7*) a bez přítomnosti 1,5% sacharosy (*dráha č. 8*) mají podobné zastoupení proteinů.



Obr. 23.: Detekce proteinů po elektroforetické separaci proteinů různých skupin rostlin v prostředí SDS v gradientu 10% až 15% polyakrylamidového gelu. Bylo aplikováno stejné množství proteinů, a to 5 μg .

Dráha 1.: Komerční marker

Dráha 2.: Extrakt z listu tabáku pěstovaného v půdě

Dráha 3.: Extrakt z listu tabáku pěstovaného se sníženým množstvím dusíkatých látek se sacharosou (N+S)

Dráha 4.: Extrakt z listu tabáku pěstovaného se sníženým množstvím dusíkatých látek bez sacharosy (N-S)

Dráha 5.: Extrakt z listu kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)

Dráha 6.: Extrakt z listu kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)

Dráha 7.: Extrakt z listu rostlin tabáku pěstovaného v uzavřených kultivačních nádobkách s limitovaným přístupem CO_2 s sacharosou (C+S)

Dráha 8.: Extrakt z listu rostlin tabáku pěstovaného v uzavřených kultivačních nádobkách s limitovaným přístupem CO_2 bez sacharosy (C-S)

Dráha 9.: Extrakt z listu tabáku pěstovaného v půdě

Dráha 10.: BSA

5.2. VLIV DOSTUPNOSTI AMONNÝCH IONTŮ A DUSIČNANŮ V KULTIVAČNÍM MÉDIU NA AKTIVITU ENZYMŮ V ROSTLINÁCH TABÁKU

5.2.1. Vzhled rostlin tabáku v jednotlivých skupinách

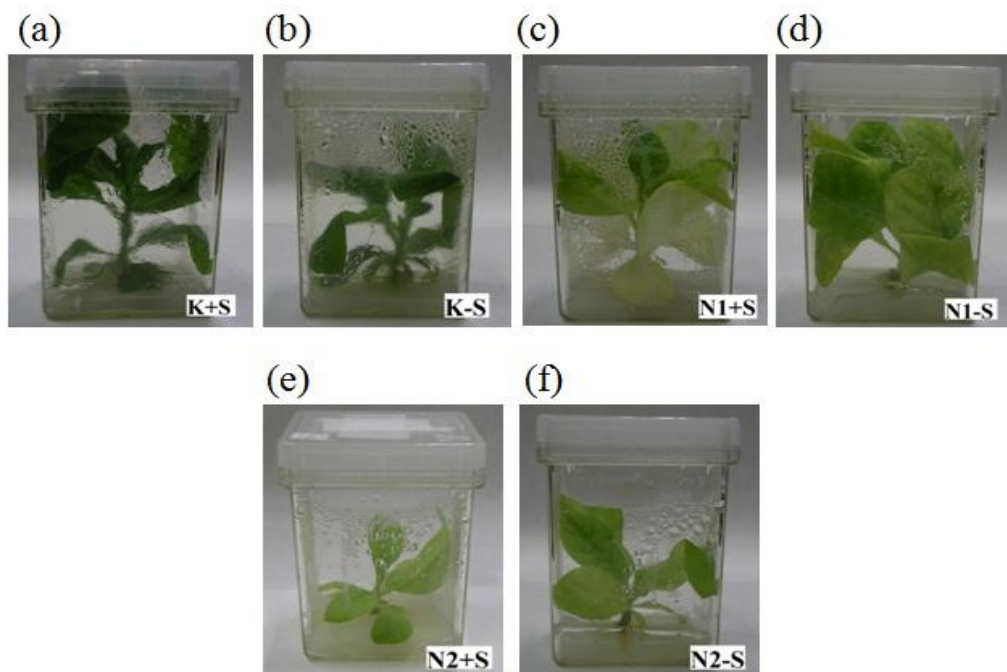
Pro tento experiment bylo vypěstováno 59 rostlin tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1.

Rostliny byly rozděleny do těchto skupin:

- (a) kontrolní rostliny tabáku pěstované v přítomnosti 1,5% sacharosy (K+S)
- (b) kontrolní rostliny tabáku pěstované bez přítomnosti 1,5% sacharosy (K-S)
- (c) rostliny tabáku pěstované se sníženým množstvím amonných iontů v přítomnosti 1,5% sacharosy (N1+S)
- (d) rostliny tabáku pěstované se sníženým množstvím amonných iontů bez přítomnosti 1,5% sacharosy (N1-S)
- (e) rostliny tabáku pěstované se sníženým množstvím dusičnanů v přítomnosti 1,5% sacharosy (N2+S)
- (f) rostliny tabáku se sníženým množstvím dusičnanů bez přítomnosti 1,5% sacharosy (N2-S)

Rostliny pěstované se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2) byly menší než rostliny kontrolní. Avšak rostliny všech skupin byly dostatečně velké, aby při odběru vzorků mohly být rozlišeny jednotlivé části rostliny (L - listy, S - stonky, K - kořeny).

Vzhled jednotlivých rostlin, pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1), se sníženým množstvím dusičnanů (N2) a kontrolních rostlin (K), je znázorněn na obr. 24, str. 44.



Obr. 24.: Rostliny tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1, pěstované v kultivačních nádobách v Murashige-Skoogově agaru: kontrolní rostliny (K) a rostliny pěstované se sníženým množstvím amonných iontů (N1), nebo se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S), nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S).

Hmotnost listů, stonků a kořenů rostlin v jednotlivých skupinách se lišila v závislosti na složení kultivačního média (viz. tabulka 4.).

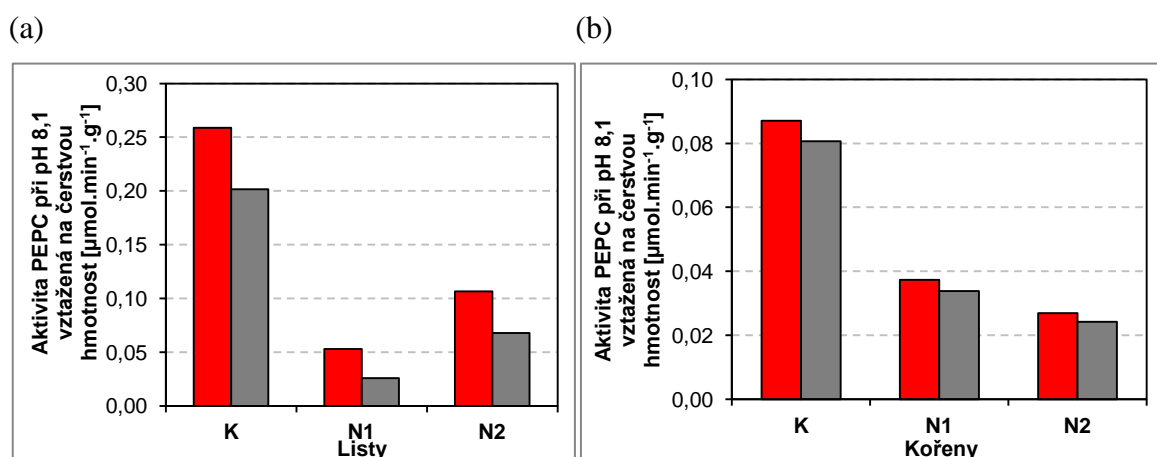
Tabulka 4.: Přehled hmotností jednotlivých částí kontrolních rostlin (K), rostlin pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2) v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) a bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S); L - listy, S - stonky, K - kořeny, Σ - celková hmotnost rostliny.

Skupina	L [g]	S [g]	K [g]	Σ [g]
K+S	4,983	0,693	1,618	7,295
K-S	2,971	0,321	0,429	3,720
N1+S	2,364	0,327	0,993	3,684
N1-S	3,235	0,353	0,331	3,918
N2+S	0,996	0,270	0,808	2,074
N2-S	1,438	0,205	0,686	2,328

5.2.2. Aktivita PEPC

5.2.2.1. Aktivita PEPC za optimálních podmínek

Nejvyšší aktivita PEPC při saturační koncentraci PEP a optimálním pH 8,1 byla zjištěna v kontrolních rostlinách (K) v přítomnosti (+S, červené sloupce) i bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S, šedé sloupce), a to jak v listech (viz. obr. 25. (a), str. 45), tak v kořenech (viz. obr. 25. (b), str. 45) rostlin tabáku. V listech došlo ke snížení aktivity PEPC v rostlinách pěstovaných, jak se sníženým množstvím dusičnanů (N2), tak amonných iontů (N1), kde snížení aktivity bylo ještě větší. V kořenech byla nejnižší aktivita PEPC zjištěna v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2).



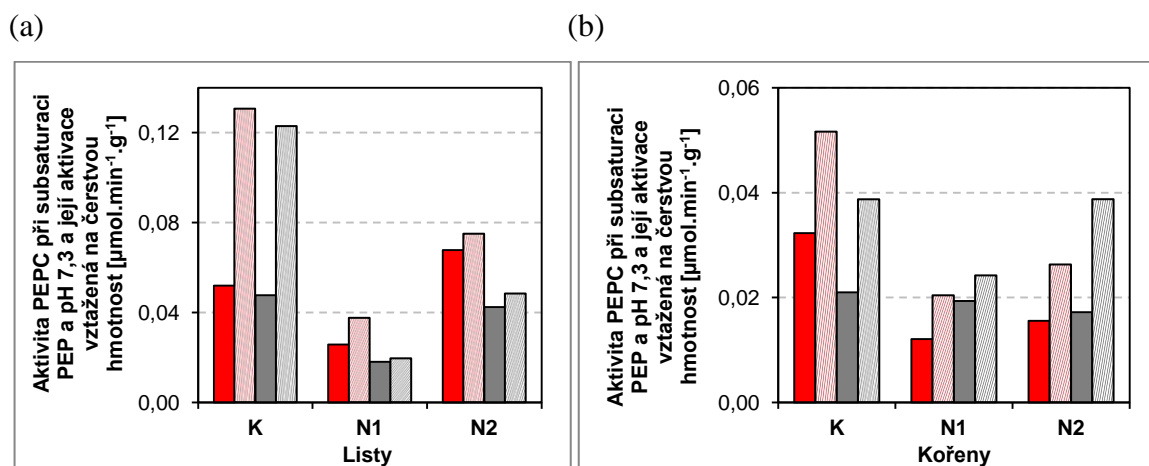
Obr. 25.: Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 8,1 měřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.2.2.2. Aktivita PEPC za suboptimálních podmínek

Největší aktivita PEPC při saturační koncentraci PEP a suboptimálním pH 7,3 byla zjištěna v kontrolních rostlinách (K), a to jak v listech, tak v kořenech rostlin pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) i bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S). V listech došlo ke snížení aktivity PEPC v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) a ještě k většímu snížení v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1). V kořenech tomu bylo opačně, největší snížení bylo pozorováno v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2).

Spektrofotometricky byla stanovena i aktivace PEPC glukosa-6-fosfátem při subsaturační koncentraci PEP a fyziologickém pH 7,3, a to jak v listech (viz. obr. 26. (a), str. 46), tak i v kořenech (viz. obr. 26. (b), str. 46) rostlin tabáku. Největší vliv aktivátoru

glukosa-6-fosfátu v listech byl zaznamenán v kontrolních rostlinách (K) pěstovaných v přítomnosti (+S, červené sloupce) i bez přítomnosti (-S, šedé sloupce) 1,5% sacharosy. V rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2) byl v přítomnosti 1,5% sacharosy zaznamenán jen velmi malý vliv aktivátoru. U těchto stejných skupin rostlin ale pěstovaných bez přítomnosti 1,5% sacharosy nebyl zaznamenán žádný vliv aktivátoru. V kořenech byl také zjištěn největší vliv aktivátoru v kontrolních rostlinách pěstovaných v přítomnosti i bez přítomnosti 1,5% sacharosy. Na rozdíl od listů zde byla zaznamenána významná aktivace glukosa-6-fosfátem i v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to jak v rostlinách pěstovaných v přítomnosti, tak bez přítomnosti 1,5% sacharosy.

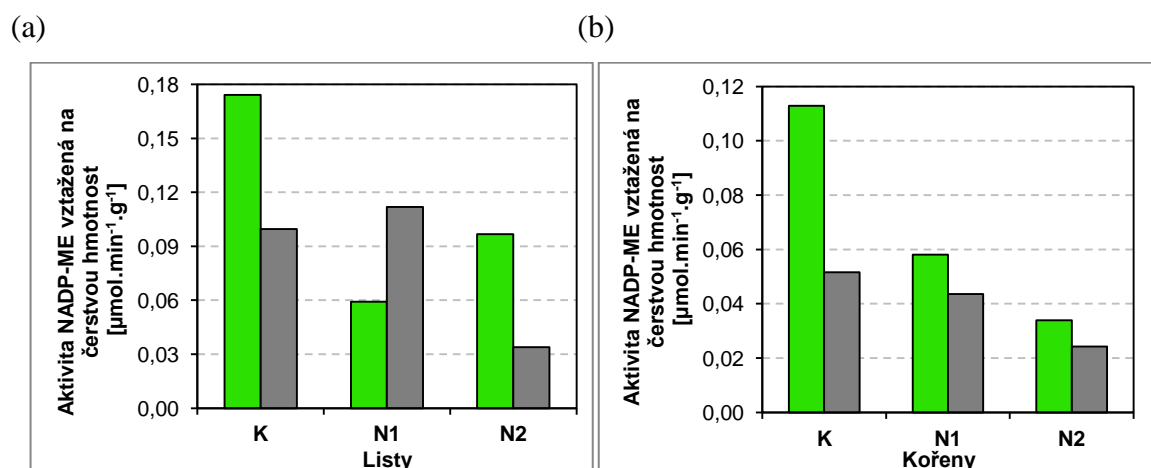


Obr. 26.: Aktivace PEPC glukosa-6-fosfátem vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při subsaturační koncentraci a fyziologickém pH 7,3 (■, ■) v porovnání s aktivitou PEPC bez přítomnosti glukosa-6-fosfátu (■, ■) stanovená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■, ■.

5.2.3. Aktivita NADP-ME

Aktivita NADP-ME byla stanovena jak v listech (viz. obr. 27. (a), str. 47) tak i v kořenech (viz. obr. 27. (b), str. 47) pěstovaných rostlin. Největší aktivita NADP-ME byla zaznamenána v listech a v kořenech kontrolních rostlin (K) pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, zelené sloupce). V listech pak byla druhá největší aktivita NADP-ME stanovena v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, šedé sloupce). K největšímu poklesu aktivity NADP-ME

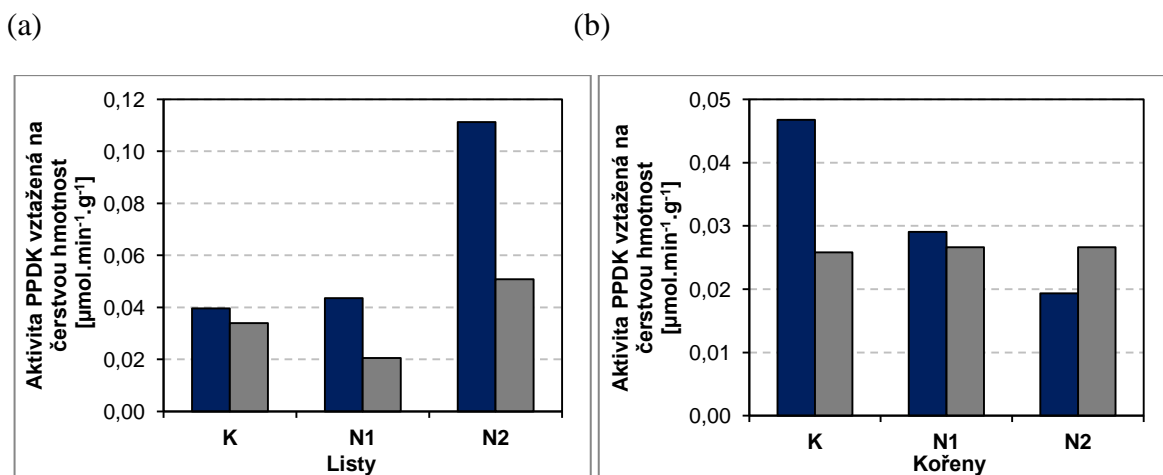
došlo v listech rostlin pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) v přítomnosti 1,5% sacharosy a v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) bez přítomnosti 1,5% sacharosy. V kořenech došlo ke snížení aktivity NADP-ME v přítomnosti i bez přítomnosti 1,5% sacharosy, a to jak v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1), tak se sníženým množstvím dusičnanů (N2), kde byl pokles ještě větší.



Obr. 27.: Aktivita NADP-ME vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,4 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

5.2.4. Aktivity PPDK

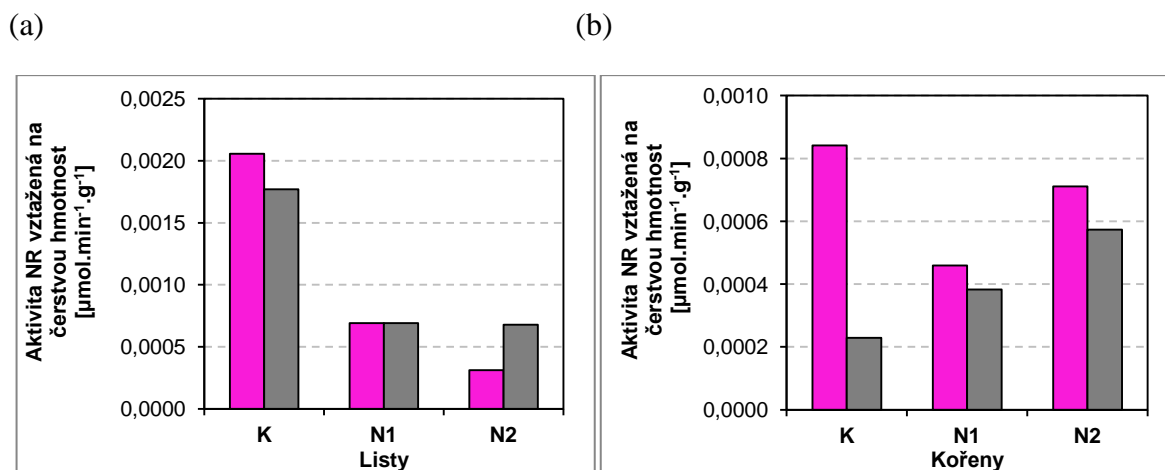
Dalším enzymem, jehož aktivita byla spektrofotometricky měřena, byla PPDK (viz. obr. 28. (a) a (b), str. 48). Nejvyšší aktivita PPDK v listech byla zjištěna v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, modré sloupce). Nejnižší pak v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, šedé sloupce). V kořenech byla největší aktivita PPDK zaznamenána v kontrolních rostlinách (K) v přítomnosti 1,5% sacharosy, nejnižší pak v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) v přítomnosti 1,5% sacharosy.



Obr. 28.: Aktivita PPDK vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 8,1 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

5.2.5. Aktivita NR

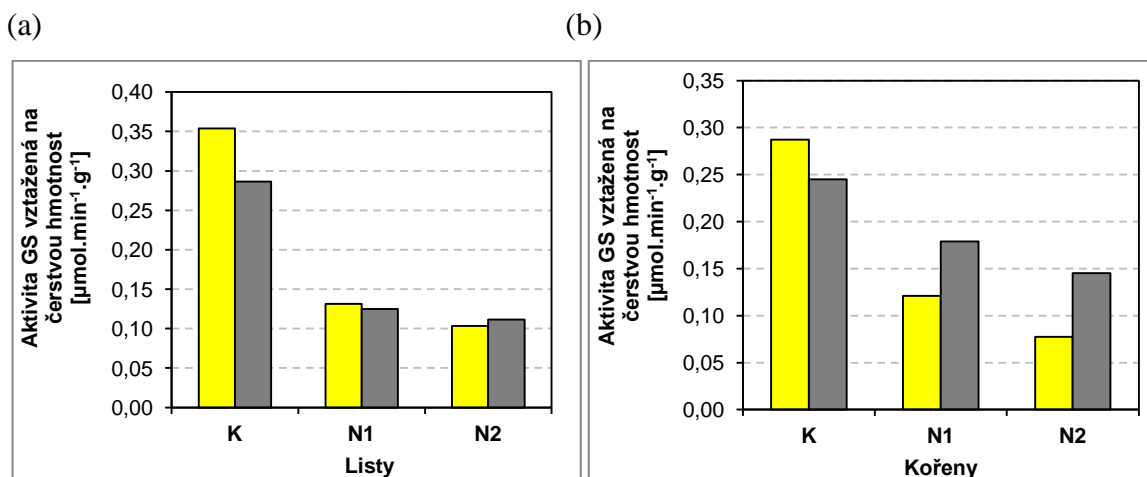
Dále byla v listech (viz. obr. 29. (a), str. 49) i v kořenech (viz. obr. 29. (b), str. 49) stanovena aktivita NR. Největší aktivita NR v listech tabáku byla stanovena v kontrolních rostlinách (K) pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, růžové sloupce). K mírnému poklesu aktivity NR došlo v kontrolních rostlinách pěstovaných bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, šedé sloupce), k většímu pak v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1), a to jak v přítomnosti i bez přítomnosti 1,5% sacharosy. Nejnižší aktivita NR pak byla stanovena v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) v přítomnosti 1,5% sacharosy. V kořenech byla zjištěna největší aktivita NR v kontrolních rostlinách pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosy, nejnižší pak v kontrolních rostlinách pěstovaných bez přítomnosti 1,5% sacharosy. V rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontu (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2) došlo k poklesu aktivity NR.



Obr. 29.: Aktivita NR vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,4 stanovená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

5.2.6. Aktivita GS

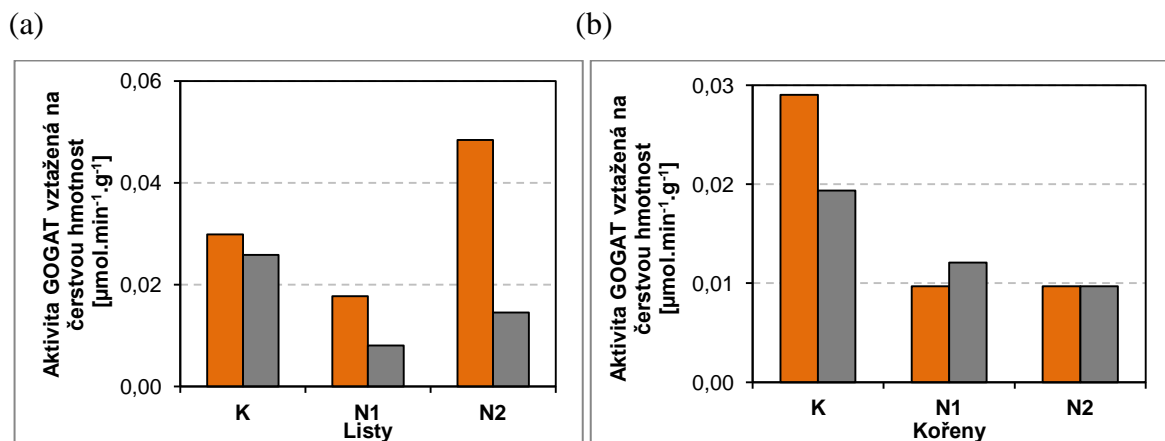
Stanovena byla i enzymová aktivita GS v listech (viz. obr. 30. (a), str. 49) a v kořenech (viz. obr. 30. (b), str. 49) rostlin tabáku. Největší aktivita GS v listech byla zjištěna v kontrolních rostlinách, jak v přítomnosti (+S, žluté sloupce), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, šedé sloupce). V rostlinách se sníženým množstvím amonných iontů (N1) i dusičnanů (N2) došlo k poklesu aktivity GS. V kořenech byla největší aktivita stanovena v kontrolních rostlinách (K). Snížení aktivity GS bylo zjištěno v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) i se sníženým množstvím dusičnanů (N2). V obou případech byla aktivita v rostlinách pěstovaných bez přítomnosti 1,5% sacharosy vyšší, než v rostlinách pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosy.



Obr. 30.: Aktivita GS vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,6 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

5.2.7. Aktivita GOGAT

Dalším sledovaným enzymem byla GOGAT (viz. obr. 31. (a) a (b), str. 50). V listech jednotlivých skupin byla největší aktivita GOGAT zaznamenána v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, oranžové sloupce), nejmenší pak v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, šedé sloupce). V kořenech byla největší aktivita stanovena v kontrolních rostlinách (K) v přítomnosti 1,5% sacharosy. S poklesem zdroje dusíku, amonných iontů (N1) a dusičnanů (N2), došlo i k poklesu aktivity GOGAT u těchto skupin rostlin.

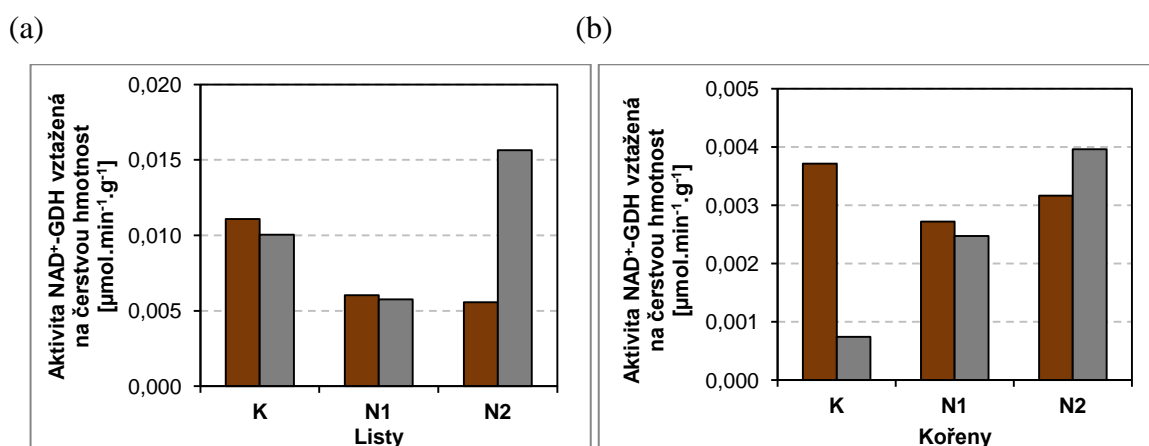


Obr. 31.: Aktivita GOGAT vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,6 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

5.2.8. Aktivita NAD⁺-GDH

Pomocí barevné reakce s jodonitrotetrazoliovou violetí a phenazinem methosulfátem byla stanovena i aktivita NAD⁺-GDH v listech (viz. obr. 32. (a), str. 51) a v

kořenech (viz. obr. 32. (b), str. 51) rostlin tabáku. Největší aktivita NAD⁺-GDH v litech byla zjištěna v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) bez přítomnosti (-S, šedé sloupce) 1,5% sacharosu. V těchto rostlinách ale v přítomnosti (+S, hnědé sloupce) 1,5% sacharosu zároveň byla stanovena nejnižší aktivita NAD⁺-GDH. K poklesu aktivity NAD⁺-GDH došlo v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) v porovnání s kontrolními rostlinami (K). V kořenech byla rovněž zjištěna největší aktivita NAD⁺-GDH v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) bez přítomnosti 1,5% sacharosu. Nejnižší pak v kontrolních rostlinách pěstovaných bez přítomnosti 1,5% sacharosu.

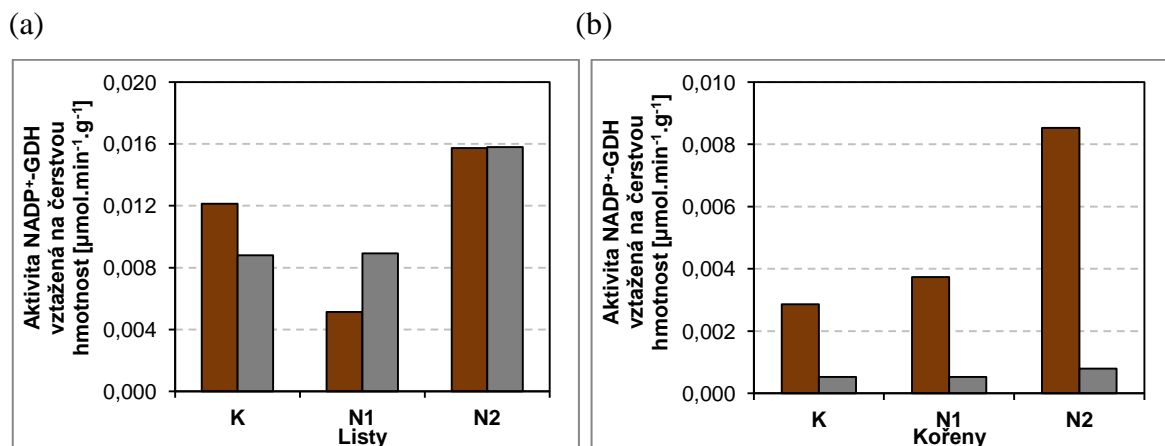


Obr. 32.: Aktivita NAD⁺-GDH vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,1 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.2.9. Aktivita NADP⁺-GDH

Byla stanovena aktivita NADP⁺-GDH v listech (viz. obr. 33. (a), str. 52) i v kořenech (viz. obr. 33. (b), str. 52) rostlin tabáků. V obou částech rostlin byla největší aktivita stanovena v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) v přítomnosti (+S, hnědé sloupce) 1,5% sacharosu. V listech pak byla nejnižší aktivita NADP⁺-GDH zjištěna v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) v přítomnosti 1,5% sacharosu. V kořenech byla nejnižší aktivita NADP⁺-GDH stanovena ve všech skupinách rostlin (jak v kontrolních rostlinách (K), v rostlinách

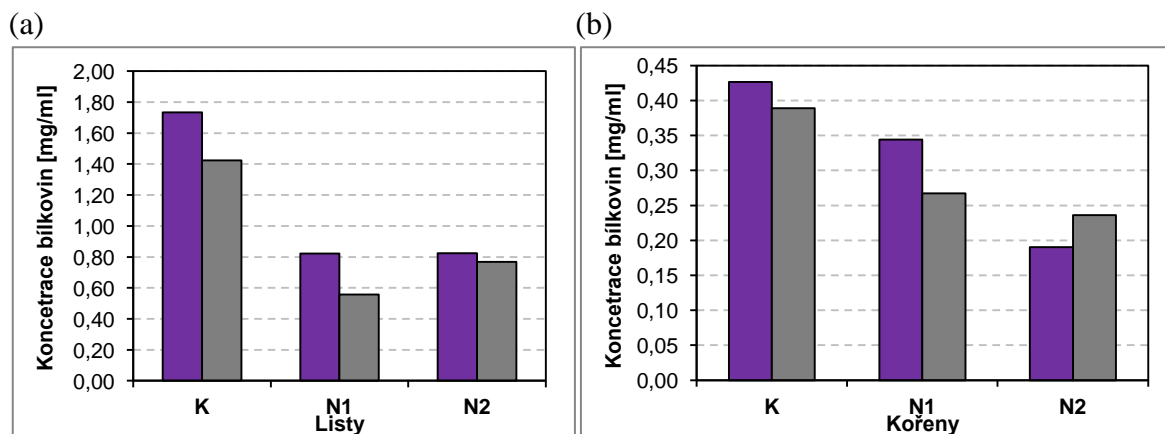
pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1), tak se sníženým množstvím dusičnanů (N2)) pěstovaných bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S, šedé sloupce).



Obr. 33.: Aktivita NADP⁺-GDH vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,1 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.2.10. Stanovení bílkovin dle Bradfordové

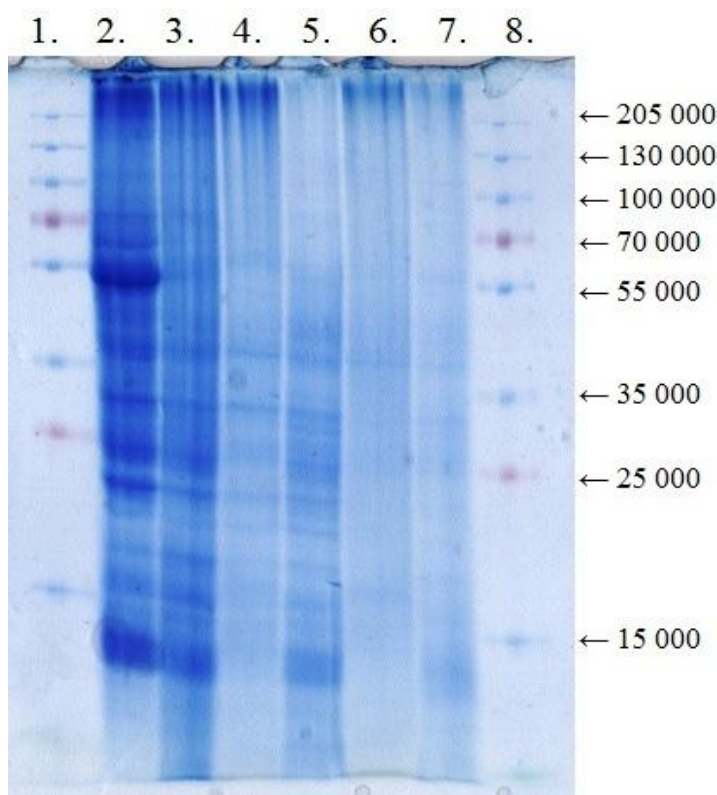
V listech (viz. obr. 34. (a), str. 52) a v kořenech (viz. obr. 34. (b), str. 52) byla také stanovena koncentrace rozpustných proteinů jednotlivých skupin rostlin. Nejvíce proteinů obsahovaly listy a kořeny kontrolních rostlin (K), a to, jak v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S, fialové sloupce), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S, šedé sloupce). V rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2) byl stanoven nižší obsah bílkovin než v kontrolních rostlinách, a to jak v listech, tak kořenech.



Obr. 34.: Koncentrace bílkovin v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím amonných iontů (N1) a se sníženým množstvím dusičnanů (N2), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

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

S extrakty z listů (viz. obr. 35., str. 53) a kořenů (viz. obr. 36., str. 54) jednotlivých skupin rostlin byla provedena elektroforetická separace v prostředí SDS za účelem detekce proteinů rozdělených podle velikosti. Aplikováno bylo stejné množství proteinů, a to 5 μ g.



Obr. 35.: Detekce proteinů po elektroforetické separaci proteinů v prostředí SDS v gradientu 10% až 15% polyakrylamidového gelu. Bylo aplikováno stejné množství bílkovin, a to 5 μ g.

Dráha 1.: Marker od firmy Thermo Scientific se standardními proteiny o relativních molekulových hmotnostech v rozmezí: 10 000 – 205 000

Dráha 2.: Extrakt z listu kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)

Dráha 3.: Extrakt z listu kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)

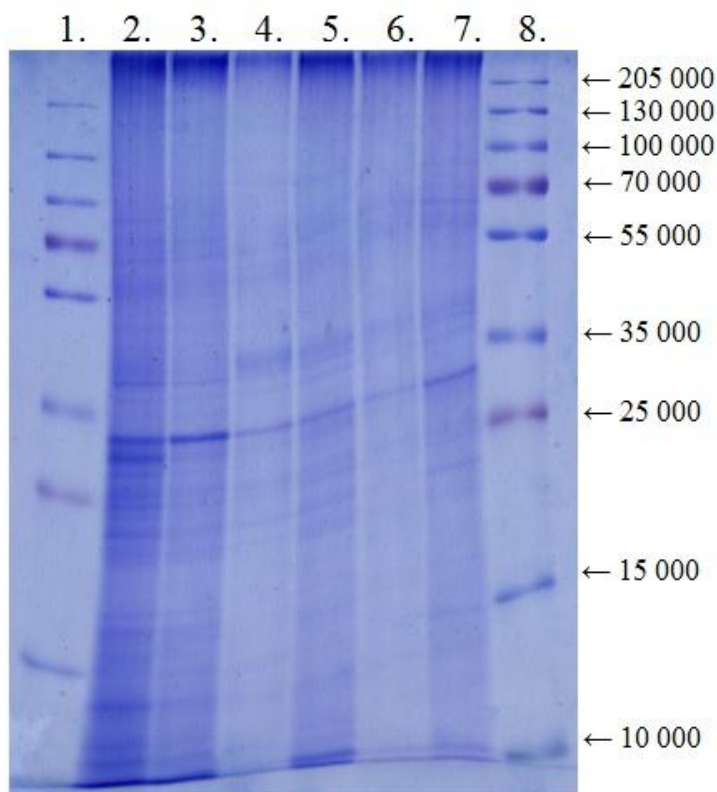
Dráha 4.: Extrakt z listu tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů se sacharosou (N1+S)

Dráha 5.: Extrakt z listu tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů bez sacharosy (N1-S)

Dráha 6.: Extrakt z listu tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů se sacharosou (N2+S)

Dráha 7.: Extrakt z listu tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů bez sacharosy (N2-S)

Dráha 8.: Marker od firmy Thermo Scientific se standardními proteiny o relativních molekulových hmotnostech v rozmezí: 10 000 – 205 000



Obr. 36.: Detekce proteinů po elektroforetické separaci proteinů v prostředí SDS v gradientu 10% až 15% polyakrylamidového gelu. Bylo aplikováno stejné množství bílkovin, a to 5 μ g.

Dráha 1.: Marker od firmy Thermo Scientific se standardními proteiny o relativních molekulových hmotnostech v rozmezí: 10 000 – 205 000

Dráha 2.: Extrakt z kořenů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)

Dráha 3.: Extrakt z kořenů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)

Dráha 4.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů se sacharosou (N1+S)

Dráha 5.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů bez sacharosy (N1-S)

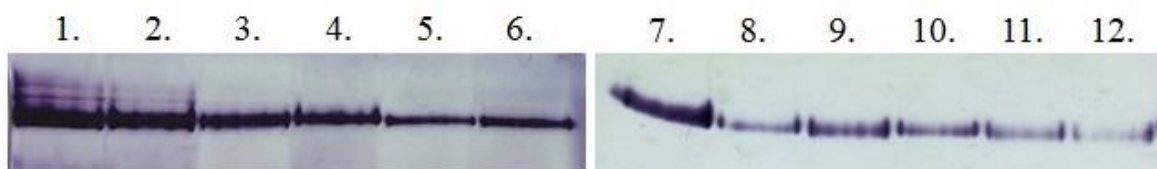
Dráha 6.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů se sacharosou (N2+S)

Dráha 7.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů bez sacharosy (N2-S)

Dráha 8.: Marker od firmy Thermo Scientific se standardními proteiny o relativních molekulových hmotnostech v rozmezí: 10 000 – 205 000

5.2.12. Detekce NADP-ME po elektroforetické separaci v gradientu polyakrylamidového gelu v nedenaturujícím prostředí

Po elektroforetickém rozdělení proteinů extraktů listů a kořenů v nedenaturujícím prostředí pomocí gradientu 6% až 12% polyakrylamidového gelu byla detekována u všech skupin pokusných rostlin aktivita NADP-ME (viz. obr. 37., str. 55). V listech byla největší aktivita NADP-ME zjištěna v kontrolních rostlinách, a to, jak v přítomnosti (+S, *dráha č. 1*), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, *dráha č. 2*). V kořenech byla největší aktivita NADP-ME detekována v kontrolních rostlinách pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, *dráha č. 7*) a v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů (N1) v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, *dráha č. 9*).



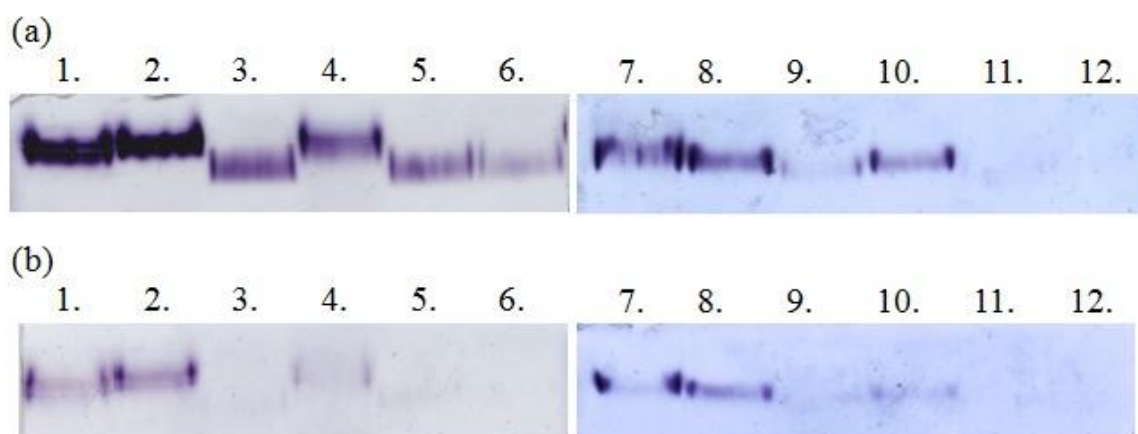
Obr. 37.: Detekce NADP-ME v gradientu 6% až 12% polyakrylamidového gelu po elektroforetické separaci v nedenaturujícím prostředí extraktů listů a kořenů rostlin tabáku
Dráha 1.: Extrakt z listů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)
Dráha 2.: Extrakt z listů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)
Dráha 3.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů se sacharosou (N1+S)
Dráha 4.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů bez sacharosy (N1-S)
Dráha 5.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů se sacharosou (N2+S)
Dráha 6.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů bez sacharosy (N2-S)
Dráha 7.: Extrakt z kořenů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)
Dráha 8.: Extrakt z kořenů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)
Dráha 9.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů se sacharosou (N1+S)
Dráha 10.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů bez sacharosy (N1-S)
Dráha 11.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů se sacharosou (N2+S)
Dráha 12.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů bez sacharosy (N2-S)

5.2.13. Detekce $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ -GDH po elektroforetické separaci v gradientu polyakrylamidového gelu v nedenaturujícím prostředí

Po elektroforetické separaci extraktů listů a kořenů různých skupin rostlin v nedenaturujícím prostředí byla specificky detekována i aktivita dalšího enzymu, $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ -GDH, a to v gradientu 6% až 12% polyakrylamidového gelu.

Největší aktivita NAD^+ -GDH (viz. obr. 38. (a), str. 56) v listech i v kořenech tabáku byla detekována v kontrolních rostlinách, a to jak v přítomnosti (+S, dráha č. 1, 7), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, dráha č. 2, 8).

Také v případě NADP^+ -GDH byla největší aktivita stanovena (viz. obr. 38. (b), str. 56) v listech a v kořenech rostlin tabáku, které byly pěstované jako kontrolní, a to jak v přítomnosti (+S, dráha č. 1, 7), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, dráha č. 2, 8).



Obr. 38.: Detekce NAD^+ -GDH (a) / NADP^+ -GDH (b) v gradientu 6% až 12% polyakrylamidového gelu po elektroforetické separaci v nedenaturujícím prostředí extraktů listů a kořenů rostlin tabáku

Dráha 1.: Extrakt z listů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)

Dráha 2.: Extrakt z listů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)

Dráha 3.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů se sacharosou (N1+S)

Dráha 4.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů bez sacharosy (N1-S)

Dráha 5.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů se sacharosou (N2+S)

Dráha 6.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů bez sacharosy (N2-S)

Dráha 7.: Extrakt z kořenů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)

Dráha 8.: Extrakt z kořenů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)

Dráha 9.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů se sacharosou (N1+S)

Dráha 10.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů bez sacharosy (N1-S)

Dráha 11.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů se sacharosou (N2+S)

Dráha 12.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů bez sacharosy (N2-S)

5.3. Vliv dostupnosti dusičnanů a kaseinu v kultivačním médiu na aktivitu enzymů v rostlinách tabáku

5.3.1. Vzhled rostlin tabáku v jednotlivých skupinách

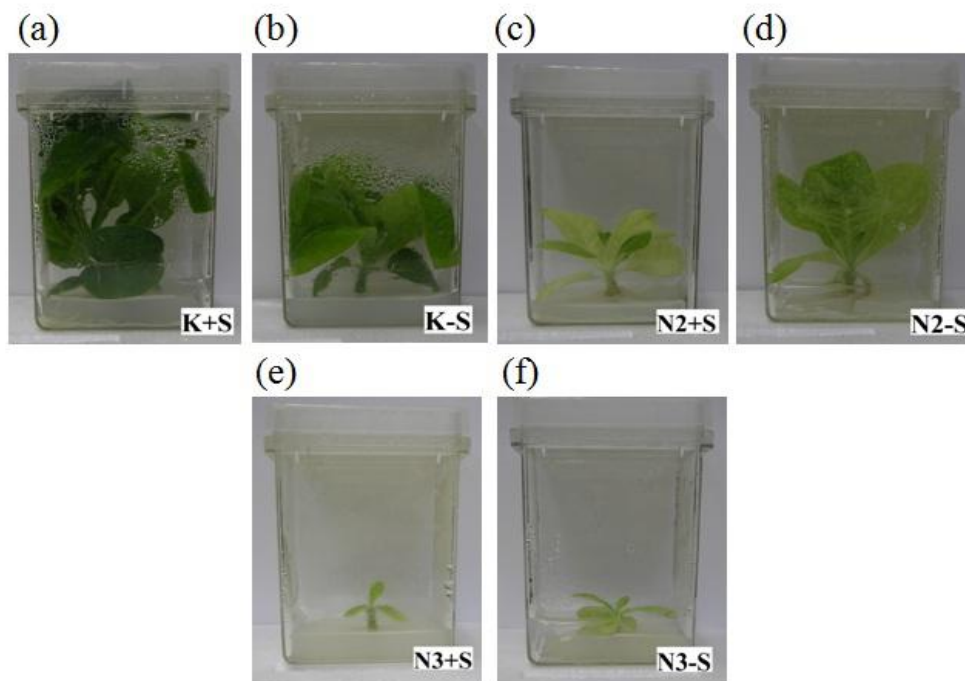
K závěrečnému experimentu bylo vypěstováno 56 rostlin tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1.

Rostliny byly rozděleny do těchto skupin:

- (a) kontrolní rostliny tabáku pěstované v přítomnosti 1,5% sacharosy (K+S)
- (b) kontrolní rostliny tabáku pěstované bez přítomnosti 1,5% sacharosy (K-S)
- (c) rostliny tabáku pěstované se sníženým množstvím dusičnanů v přítomnosti 1,5% sacharosy (N2+S)
- (d) rostliny tabáku pěstované se sníženým množstvím dusičnanů bez přítomnosti 1,5% sacharosy (N2-S)
- (e) rostliny tabáku pěstované v přítomnosti kaseinu a v přítomnosti 1,5% sacharosy (N3+S)
- (f) rostliny tabáku pěstované v přítomnosti kaseinu a bez přítomnosti 1,5% sacharosy (N3-S)

Rostliny pěstované se sníženým množstvím dusičnanů (N2) a rostliny pěstované v přítomnosti kaseinu (N3) byly menší než rostliny kontrolní. Avšak rostliny všech skupin byly dostatečně velké, aby při odběru vzorků mohly být rozlišeny jednotlivé části rostliny (L - listy, S - stonky, K - kořeny).

Vzhled rostlin, pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2), v přítomnosti kaseinu (N3) a kontrolních rostlin (K), je znázorněn na obr. 39, str. 58.



Obr. 39.: Rostliny tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1, pěstované v kultivačních nádobách v Murashige-Skoogově agaru: kontrolní rostliny (K) a rostliny pěstované se sníženým množstvím dusičnanů (N2), rostliny pěstované s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S), nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S).

Hmotnost listů, stonků a kořenů rostlin v jednotlivých skupinách se lišila v závislosti na složení kultivačního média (viz. tabulka 5.).

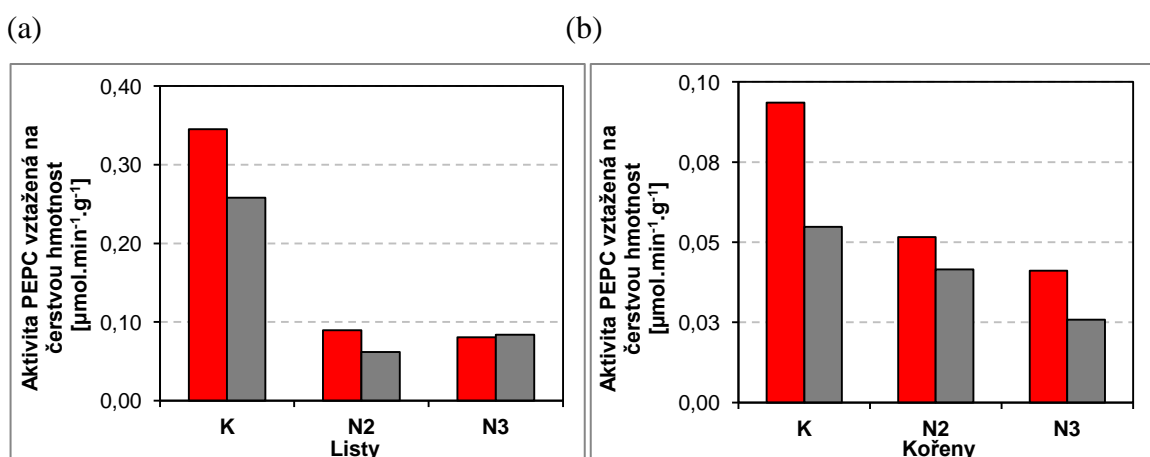
Tabulka 5.: Přehled hmotností jednotlivých částí kontrolních rostlin (K), rostlin pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2), nebo s 0,5% kaseinem jako jediného zdroje dusíku (N3) v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) a bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S); L - listy, S - stonky, K - kořeny, Σ - celková hmotnost rostliny.

Skupina	L [g]	S [g]	K [g]	Σ [g]
K+S	4,176	0,275	0,796	5,247
K-S	2,495	0,213	0,320	3,028
N2+S	1,047	0,192	0,683	1,921
N2-S	1,441	0,209	0,512	2,162
N3+S	0,200	0,089	0,161	0,449
N3-S	0,223	0,090	0,146	0,459

5.3.2. Aktivita PEPC

5.3.2.1. Aktivita PEPC za optimálních podmínek

Největší aktivita PEPC při saturační koncentraci PEP a optimálním pH 8,1 byla stanovena v listech (viz. obr. 40. (a), str. 59) kontrolních rostlin (K) pěstovaných, jak v přítomnosti (+S, červené sloupce), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, šedé sloupce). V rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) a rostlinách pěstovaných v přidavku 0,5% kaseinu (N3) došlo ke snížení aktivity PEPC přibližně na třetinu oproti kontrolním rostlinám. V kořenech (viz. obr. 40. (b), str. 59) byla největší aktivita PEPC zjištěna také v kontrolních rostlinách pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosy. S poklesem koncentrace dusičnanů (N2), nebo v přítomnosti 0,5% kaseinu (N3) jako jediného zdroje dusíku v živném médiu došlo ke snížení aktivity PEPC.

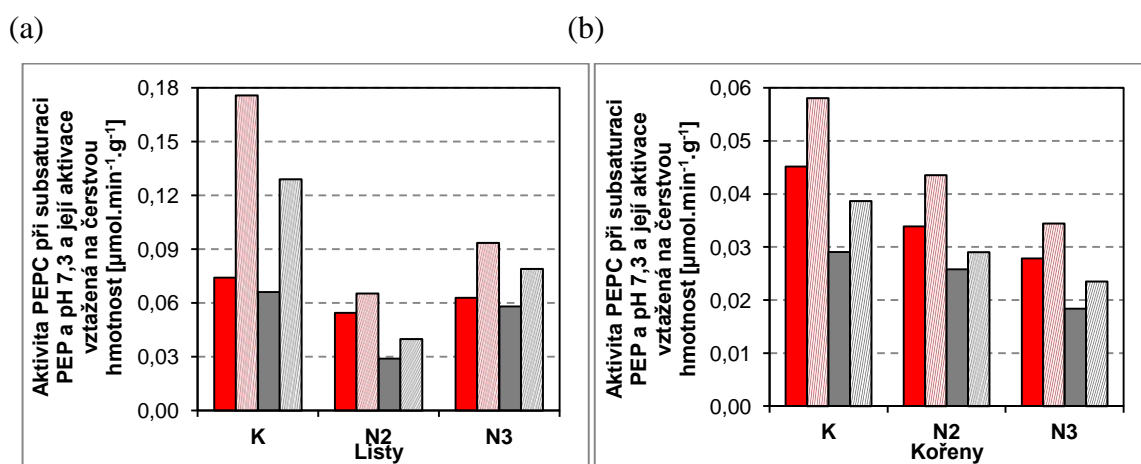


Obr. 40.: Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 8,1 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím dusičnanů (N2), s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

5.3.2.2. Aktivita PEPC za suboptimálních podmínek

Stanovena byla i aktivita PEPC za saturačních podmínek PEP, ale při suboptimálním pH 7,3. Největší aktivita PEPC byla zjištěna v listech i v kořenech kontrolních rostlin (K), a to, jak v přítomnosti (+S, červené sloupce), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, šedé sloupce). V listech a v kořenech rostlin pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2), nebo s přidavkem 0,5% kaseinu (N3) došlo ke snížení aktivity PEPC.

Dále byla zjišťována aktivace PEPC glukosa-6-fosfátem při subsaturační koncentraci PEP a fyziologickém pH 7,3 v listech (viz. obr. 41. (a), str. 60) i v kořenech (viz. obr. 41. (b), str. 60) rostlin tabáku. V listech byla PEPC nejvíce aktivována glukosa-6-fosfátem v kontrolních rostlinách (K) pěstovaných v přítomnosti (+S, červené sloupce) i bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, světle šedé sloupce). Menší vliv aktivátoru byl zaznamenán v rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), nejmenší v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2). V kořenech byl zjištěn největší vliv aktivátoru glukosa-6-fosfátu v kontrolních rostlinách, menší v rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem (N3) a nejmenší v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2).

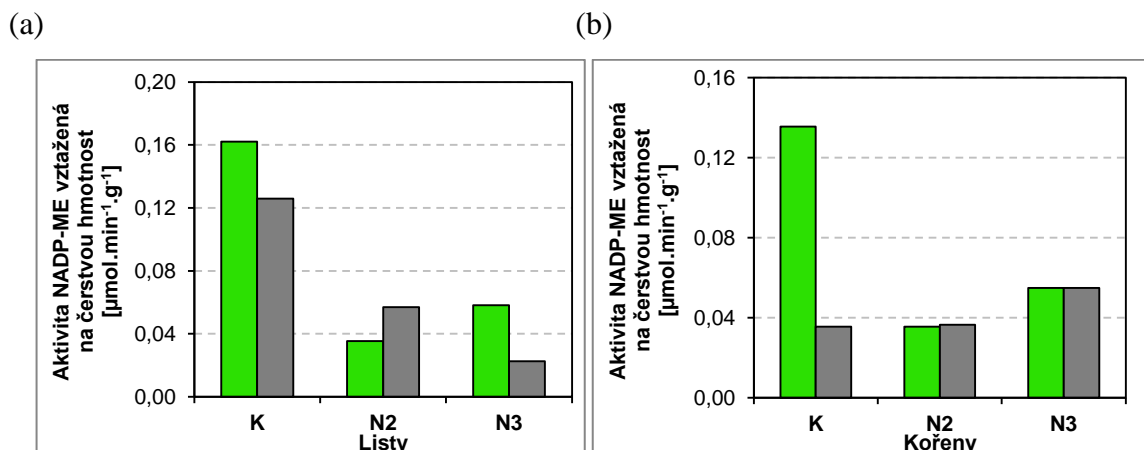


Obr. 41.: Aktivace PEPC glukosa-6-fosfátem vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při subsaturační koncentraci a fyziologickém pH 7,3 (■, ■) v porovnání s aktivitou PEPC bez přítomnosti glukosa-6-fosfátu (■, ■) stanovená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím dusičnanů (N2), s přidavkem 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■, ■.

5.3.3. Aktivita NADP-ME

V extraktech listů a kořenů rostlin tabáku byla stanovena aktivita NADP-ME. Největší aktivita NADP-ME byla zjištěna v listech (viz. obr. 42. (a), str. 61) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v přítomnosti (+S, zelené sloupce), i bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, šedé sloupce). V listech rostlin pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) a v listech rostlin pěstovaných s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3) bylo pozorováno snížení aktivity NADP-ME. V kořenech (viz. obr. 42. (b), str. 61) byla největší aktivita tohoto enzymu zjištěna v kontrolních rostlinách pěstovaných

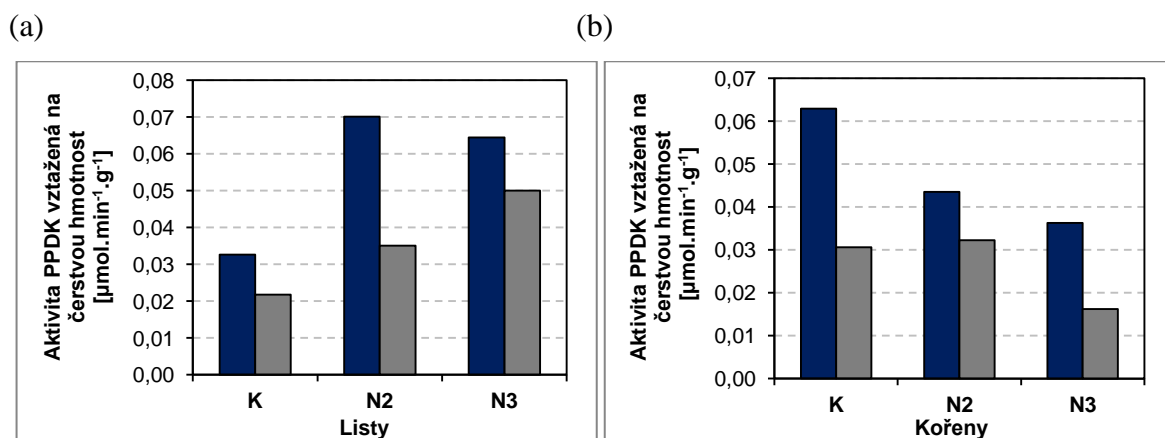
v přítomnosti 1,5% sacharosu. V kořenech ostatních skupin rostlin došlo ke snížení aktivity NADP-ME.



Obr. 42.: Aktivita NADP-ME vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,4 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím dusičnanů (N2), s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.3.4. Aktivita PPKK

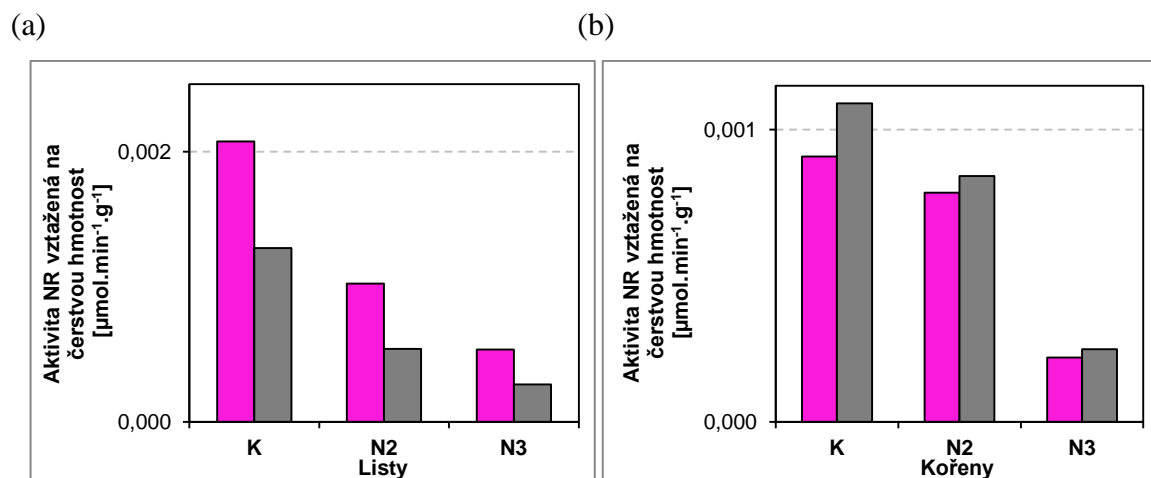
Dalším sledovaným enzymem byla PPKK. Největší aktivita PPKK v listech (viz. obr. 43. (a), str. 61) byla zjištěna v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N3) v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S, modré sloupce), nejmenší v kontrolních rostlinách (K) pěstovaných bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S, šedé sloupce). V kořenech (viz. obr. 43. (b), str. 61) byla největší aktivita PPKK stanovena v kontrolních rostlinách pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosu. Nejmenší aktivita PPKK byla stanovena v kořenech rostlin pěstovaných s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3) bez přítomnosti 1,5% sacharosu.



Obr. 43.: Aktivita PPKK vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 8,1 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím dusičnanů (N2), s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.3.5. Aktivita NR

Aktivita NR byla stanovena jak v listech (viz. obr. 44. (a), str. 62), tak v kořenech (viz. obr. 44. (b), str. 62) všech variant pěstovaných rostlin. V listech byla největší aktivita NR stanovena v kontrolních rostlinách (K) pěstovaných v přítomnosti (+S, růžové sloupce) 1,5% sacharosu, nejmenší v rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3) bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S, šedé sloupce). V kořenech byla největší aktivita NR zjištěna v kontrolních rostlinách pěstovaných bez přítomnosti 1,5% sacharosu. V kořenech rostlin pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2), nebo s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3) došlo ke snížení aktivity NR, a to jak v přítomnosti, tak bez přítomnosti 1,5% sacharosu.

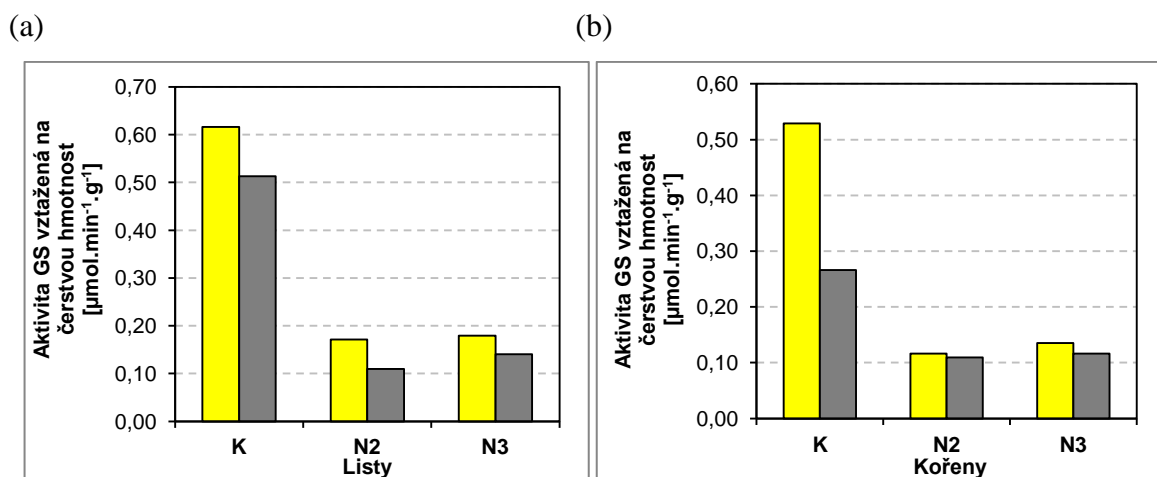


Obr. 44.: Aktivita NR vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,4 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím dusičnanů (N2), s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.3.6. Aktivita GS

Sledována byla i aktivita GS. Největší aktivita tohoto enzymu byla zjištěna v listech (viz. obr. 45. (a), str. 63) kontrolních rostlin (K) pěstovaných jak v přítomnosti (+S, žluté

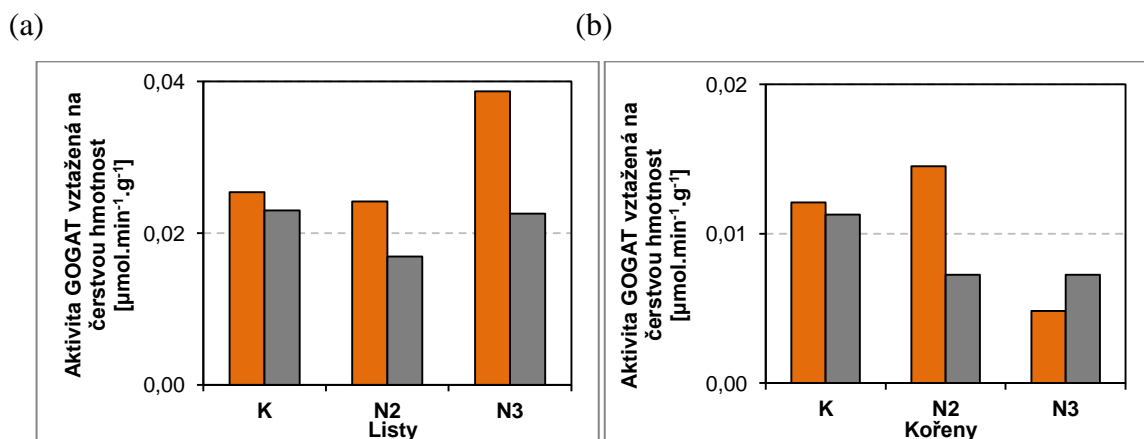
sloupce), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S, šedé sloupce). Aktivita GS v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2), nebo s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3) poklesla přibližně na třetinu. V kořenech (viz. obr. 45. (b), str. 63) byla největší aktivita GS zaznamenána v kontrolních rostlinách pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosu. V kontrolních rostlinách pěstovaných bez přítomnosti 1,5% sacharosu a v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2), nebo s 0,5% kaseinem jaké výhradním zdrojem dusíku (N3) došlo ke snížení aktivity tohoto enzymu.



Obr. 45.: Aktivita GS vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,6 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím dusičnanů (N2), s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.3.7. Aktivita GOGAT

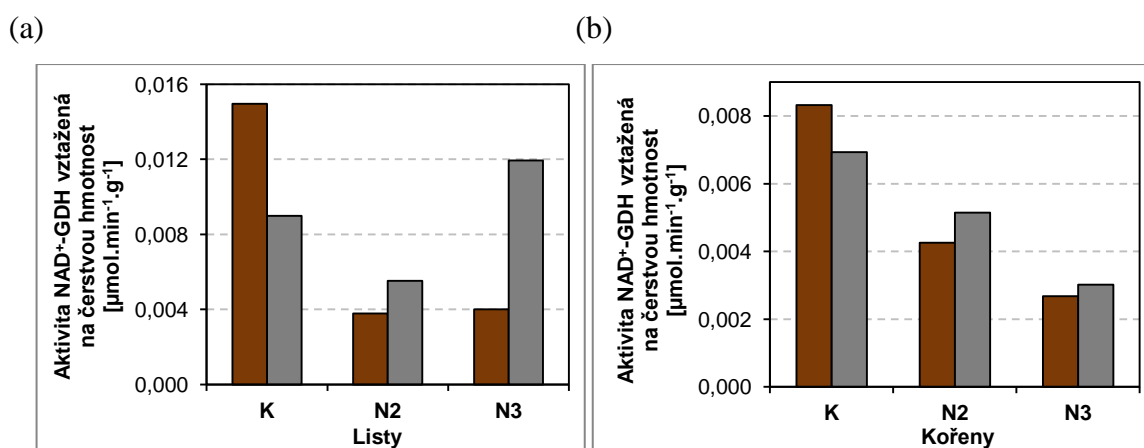
V listech (viz. obr. 46. (a), str. 64) tabáku byla největší aktivita GOGAT stanovena v rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3) v přítomnosti (+S, oranžové sloupce) 1,5% sacharosu. Nejmenší pak byla aktivita GOGAT zjištěna v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S, šedé sloupce). V kořenech (viz. obr. 46. (b), str. 64) byla největší aktivita GOGAT naměřena v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) v přítomnosti 1,5% sacharosu, nejmenší v rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3) v přítomnosti 1,5% sacharosu.



Obr. 46.: Aktivita GOGAT vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,6 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím dusičnanů (N2), s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

5.3.8. Aktivita NAD⁺-GDH

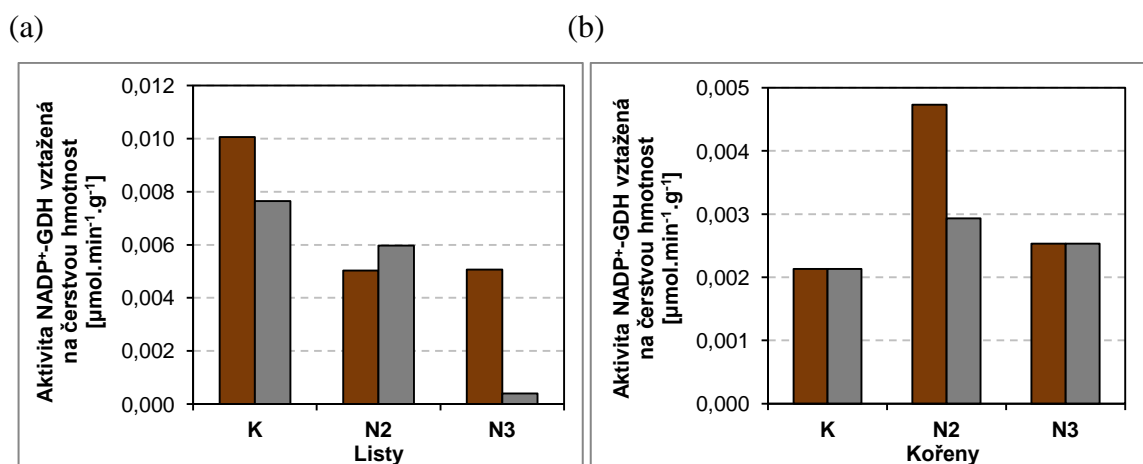
Dalším sledovaným enzymem byla NAD⁺-GDH. Největší aktivita tohoto enzymu v listech (viz. obr. 47. (a), str. 64) byla stanovena v kontrolních rostlinách (K) pěstovaných v přítomnosti (+S, hnědé sloupce) 1,5% sacharosy a v rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3) bez přítomnosti (-S, šedé sloupce) 1,5% sacharosy. V rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem (N3) v přítomnosti 1,5% sacharosy a rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) bylo pozorováno snížení aktivity NAD⁺-GDH. V kořenech (viz. obr. 47. (b), str. 64) byla největší aktivita NAD⁺-GDH zjištěna v kontrolních rostlinách, jak v přítomnosti, tak bez přítomnosti 1,5% sacharosy. V rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) a v rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem (N3) došlo k poklesu aktivity NAD⁺-GDH.



Obř. 47.: Aktivita NAD⁺-GDH vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,1 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím dusičnanů (N2), s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.3.9. Aktivita NADP⁺-GDH

V extraktech z listů a kořenů byla rovněž stanovena aktivita NADP⁺-GDH. Nejvyšší aktivita NADP⁺-GDH v listech (viz obr. 48. (a), str. 65) byla zjištěna v kontrolních rostlinách (K), a to jak v přítomnosti (+S, hnědé sloupce), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S, šedé sloupce). Nejmenší aktivita byla zaznamenána v rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3). V kořenech (viz obr. 48. (b), str. 65) byla zjištěna největší aktivita NADP⁺-GDH v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) v přítomnosti 1,5% sacharosu. V kontrolních rostlinách a rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem (N3), jak v přítomnosti, tak bez přítomnosti 1,5% sacharosu byla pozorována snížená aktivita NADP⁺-GDH.

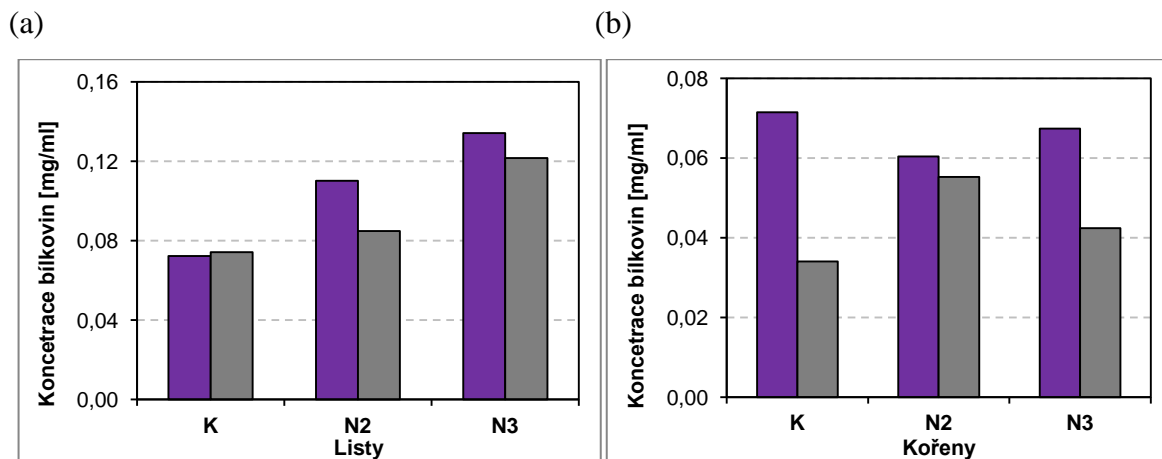


Obř. 48.: Aktivita NADP⁺-GDH vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu při saturační koncentraci a optimálním pH 7,1 naměřená v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím dusičnanů (N2), s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

5.3.10. Stanovení bílkovin dle Lowryho

Metodou dle Lowryho bylo stanoveno množství rozpustných bílkovin v listech (viz. obr. 49. (a), str. 66) a v kořenech (viz. obr. 49. (b), str. 66) rostlin tabáku. Největší množství bílkovin v listech bylo zjištěno v rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem jako

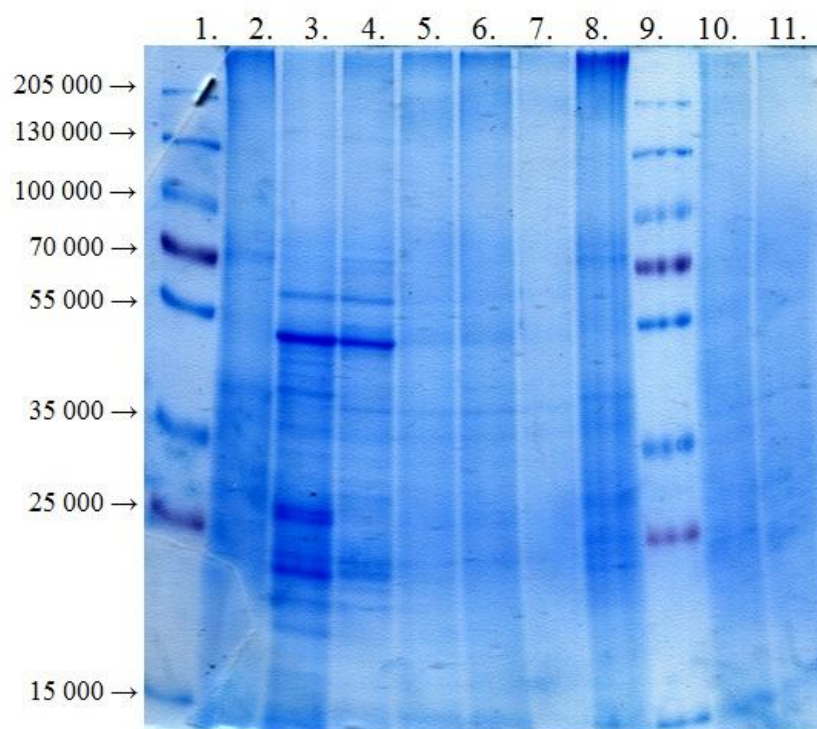
jediným zdrojem dusíku (N3), a to jak v přítomnosti (+S, fialové sloupce), tak i bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S, šedé sloupce). V kořenech byl největší obsah bílkovin stanoven v kontrolních rostlinách (K) a v rostlinách pěstovaných s 0,5% kaseinem, v obou případech v přítomnosti 1,5% sacharosu.



Obr. 49.: Množství rozpustných bílkovin v listech (a) a v kořenech (b) kontrolních rostlin (K) pěstovaných v kultivačních nádobách a rostlin s různým složením kultivačního média: se sníženým množstvím dusičnanů (N2), s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu, a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosu (-S) ■.

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

Proteiny obsažené v extraktech listů různých skupin rostlin byly rozděleny elektroforetickou separací proteinů v prostředí SDS v gradientu 10% až 15% polyakrylamidového gelu. Poté byly detekovány proteiny pomocí Coomassie Brilliant Blue (viz. obr. 50., str. 67). Byl aplikován stejný objem extraktu, 20 μ l.



Obr. 50.: Detekce proteinů listů různých skupin rostlin po elektroforetické separaci proteinů v prostředí SDS v gradientu 10% až 15% polyakrylamidového gelu. Byl aplikován stejný objem extraktu, a to 20 μ l.

Dráha 1.: Marker od firmy Thermo Scientific se standardními proteiny o relativních molekulových hmotnostech v rozmezí: 10 000 – 205 000

Dráha 2.: Extrakt z listu tabáku pěstovaného v půdě

Dráha 3.: Extrakt z listu kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)

Dráha 4.: Extrakt z listu kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)

Dráha 5.: Extrakt z listu tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů se sacharosou (N2+S)

Dráha 6.: Extrakt z listu tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů bez sacharosy (N2-S)

Dráha 7.: Prázdňá

Dráha 8.: Extrakt z listu tabáku pěstovaného v půdě

Dráha 9.: Marker od firmy Thermo Scientific se standardními proteiny o relativních molekulových hmotnostech v rozmezí: 10 000 – 205 000

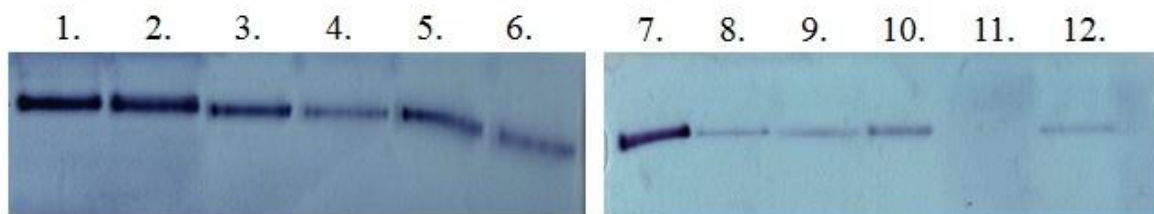
Dráha 10.: Extrakt z listu tabáku pěstovaných s přidavkem kaseinu se sacharosou (N3+S)

Dráha 11.: Extrakt z listu tabáku pěstovaných s přidavkem kaseinu bez sacharosy (N3-S)

5.3.12. Detekce NADP-ME po elektroforetické separaci v gradientu polyakrylamidového gelu v nedenaturujícím prostředí

Extrakty listů a kořenů různých skupin rostlin byly rozděleny v nedenaturujícím prostředí v gradientu 6% až 12% polyakrylamidového gelu a poté byla detekována aktivita NADP-ME (viz. obr. 51., str. 68). Největší aktivita NADP-ME v listech byla zjištěna v kontrolních rostlinách, a to jak v přítomnosti (+S, *dráha č. 1*), tak bez přítomnosti 1,5%

sacharosy (-S, *dráha č. 2*). V kořenech byla největší aktivita NADP-ME detekována v kontrolních rostlinách pěstovaných v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, *dráha č. 7*).



Obr. 51.: Detekce NADP-ME v gradientu 6% až 12% polyakrylamidového gelu po elektroforetické separaci proteinů v nedenaturujícím prostředí extraktů listů a kořenů různých skupin rostlin tabáku

Dráha 1.: Extrakt z listů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)

Dráha 2.: Extrakt z listů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)

Dráha 3.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů se sacharosou (N2+S)

Dráha 4.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů bez sacharosy (N2-S)

Dráha 5.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných v přítomnosti kaseinu se sacharosou (N3+S)

Dráha 6.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných v přítomnosti kaseinu bez sacharosy (N3-S)

Dráha 7.: Extrakt z kořenů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)

Dráha 8.: Extrakt z kořenů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)

Dráha 9.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů se sacharosou (N2+S)

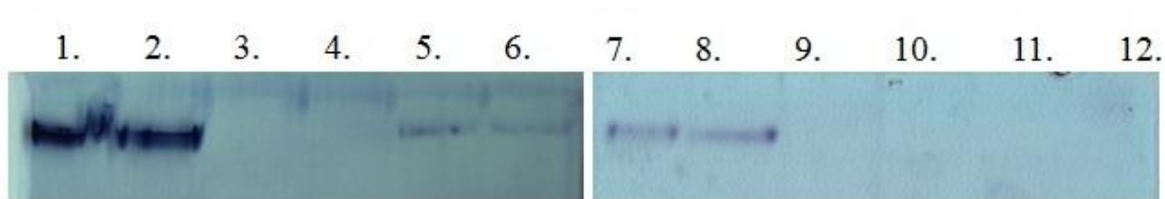
Dráha 10.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů bez sacharosy (N2-S)

Dráha 11.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných v přítomnosti kaseinu se sacharosou (N3+S)

Dráha 12.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných v přítomnosti kaseinu bez sacharosy (N3-S)

5.3.13. Detekce NAD⁺-GDH po elektroforetické separaci v gradientu polyakrylamidového gelu v nedenaturujícím prostředí

Po elektroforetické separaci extraktů listů a kořenů studovaných skupin rostlin v nedenaturujícím prostředí v gradientu 6% až 12% polyakrylamidového gelu byla detekována také aktivita NAD⁺-GDH (viz. obr. 52., str. 69). Největší aktivita NAD⁺-GDH v listech byla zjištěna v kontrolních rostlinách, a to, jak v přítomnosti (+S, *dráha č. 1*), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, *dráha č. 2*). V kořenech byl výsledek stejný, největší aktivita NAD⁺-GDH byla detekována v kontrolních rostlinách pěstovaných jak v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S, *dráha č. 7*), tak bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S, *dráha č. 8*).



Obr. 52.: Detekce NAD^+ -GDH v gradientu 6% až 12% polyakrylamidového gelu po elektroforetické separaci proteinů v nedenaturujícím prostředí extraktů listů a kořenů různých skupin rostlin tabáku

Dráha 1.: Extrakt z listů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)

Dráha 2.: Extrakt z listů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)

Dráha 3.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů se sacharosou (N2+S)

Dráha 4.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů bez sacharosy (N2-S)

Dráha 5.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných v přítomnosti kaseinu se sacharosou (N3+S)

Dráha 6.: Extrakt z listů tabáku pěstovaných v přítomnosti kaseinu bez sacharosy (N3-S)

Dráha 7.: Extrakt z kořenů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného se sacharosou (K+S)

Dráha 8.: Extrakt z kořenů kontrolních rostlin tabáku pěstovaného bez sacharosy (K-S)

Dráha 9.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů se sacharosou (N2+S)

Dráha 10.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů bez sacharosy (N2-S)

Dráha 11.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných v přítomnosti kaseinu se sacharosou (N3+S)

Dráha 12.: Extrakt z kořenů tabáku pěstovaných v přítomnosti kaseinu bez sacharosy (N3-S)

6. DISKUZE

Rostliny jsou tvořeny látkami, které vznikají asimilací jednoduchých anorganických látek. Díky energii slunečního záření se pak vytvářejí složitější a energicky bohatší organické sloučeniny. Tyto látky pak mohou být součástí struktur, nebo mohou zabezpečovat metabolické procesy. Metabolismus rostlin může být ovlivněn živinami, které rostlina získává z půdy nebo z kultivačního média [7]. Nedostatek dusíkatých látek a fosfátů představuje abiotický stres, který je nejčastější příčinou snížené produktivity hospodářsky významných rostlin [62].

PEPC je klíčovým enzymem C4 rostlin, kde zajišťuje primární fixaci CO₂. V poslední době je aktivita PEPC v C3 rostlinách zkoumána v souvislosti se stresem rostlin [6, 63]. Zvýšená aktivita PEPC byla zjištěna v rostlinách stresovaným suchem [64], sníženou dostupností fosfátů [65], nebo virovou infekcí [19].

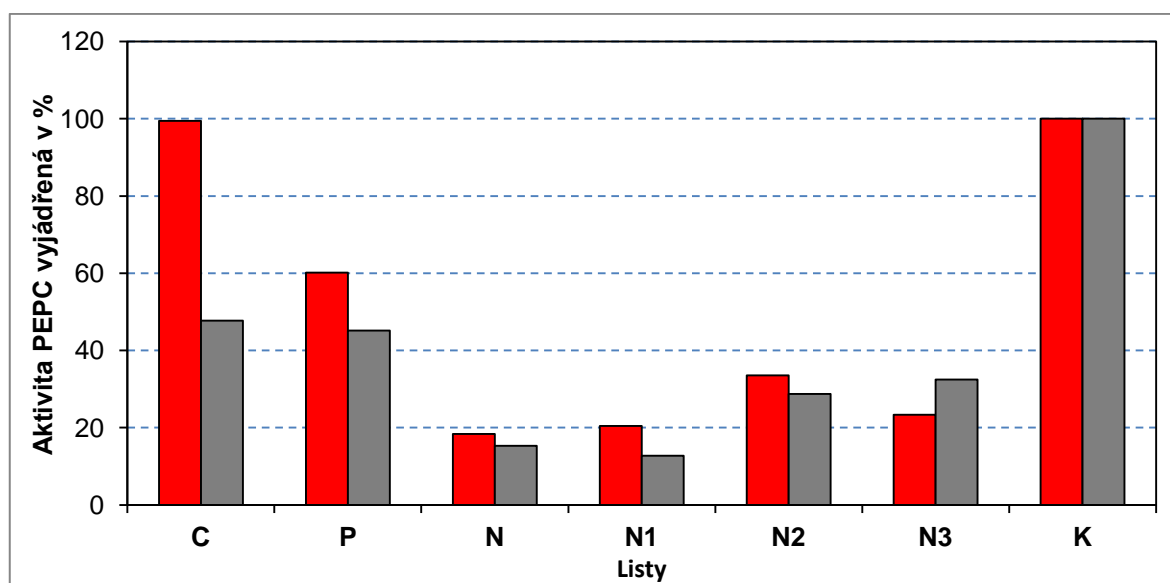
Cílem diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv má složení kultivačního média na aktivitu PEPC a dalších enzymů, Hatch-Slackova cyklu: NADP-ME a PPK, a enzymů metabolismu dusíku: NR, GS, GOGAT, NAD⁺/NADP⁺-GDH.

V této práci byl jako kultivačním médiem použit Murashige-Skoogův agar s modifikovanými koncentracemi živin. Rostliny byly pěstovány s 10x sníženým množstvím fosfátů (KH₂PO₄; P), s 20x sníženým množstvím amonných iontů (NH₄NO₃) a zároveň 20x sníženým množstvím dusičnanů (KNO₃; N), bez přítomnosti jakéhokoliv zdroje amonných iontů a s 5x sníženým množstvím dusičnanů (N1), bez přítomnosti výhradního zdroje dusičnanů a s 5 x sníženým množstvím amonných iontů (N2) nebo v přítomnosti 0,5% kaseinu (N3), jakožto jediného zdroje dusíku v kultivačním médiu.

Aktivita PEPC byla ovlivněna dostupností všech sledovaných látek. Sacharosa, jako zdroj energie a uhlíkatých skeletů, dodávaná do kultivačního média znamenala ve všech skupinách pěstovaných rostlin vyšší aktivitu PEPC než v její nepřítomnosti (viz. obr. 15., str. 35; obr. 25., str. 45; obr. 40, str. 59). Limitovaná dostupnost CO₂, vedla také k nižší aktivitě PEPC, ale pouze v nepřítomnosti sacharosy (obr. 53., str. 71.). V rostlině pěstované v přítomnosti sacharosy mohou probíhat náročné metabolické dráhy a rostlina tak není odkázána pouze na zdroj sacharidů z fotosyntézy. Výsledky jsou v souladu diplomovou prací Kateřiny Minářů [60].

Zajímavý je vliv sníženého množství fosfátů na aktivitu PEPC (viz. obr. 15, str. 35; obr. 53., str. 71). V rostlinách *Arabidopsis thaliana* vede nedostatek fosfátů (P) ke zvýšení

aktivity PEPC [65]. Rostlina může reakci katalyzovanou PEPC zvýšit množství organických kyselin, malátu a citrátu, využitelných k příjmu fosfátů z půdy (viz. obr. 1, str. 4). PEPC spolu s NAD-MDH a NADP-ME také představuje vedlejší alternativní dráhu k enzymové reakci katalyzované pyruvátkinasou v glykolýze. Touto cestou sice nevzniká ATP, ale je uvolněn anorganický fosfát, který může být pro rostlinu v kritickém nedostatku fosfátů důležitý (viz. obr. 1, str. 4) [6]. V této práci byl naopak zjištěn pokles aktivity PEPC. Pravděpodobně záleží na koncentraci fosfátů (P), které byla v tomto experimentu 10x snížena, nebo může záležet i na druhu rostliny.



Obr. 53.: Aktivita PEPC vyjádřená v % stanovená v listech rostlin pěstovaných v uzavřených kultivačních nádobkách opatřených filtrem, který zajišťuje limitovaný přístup CO₂ (C), rostlin pěstovaných se sníženým množstvím fosfátů (P), se sníženým množstvím amonných iontů a zároveň se sníženým množstvím dusičnanů (N), se sníženým množstvím amonných iontů (N1), se sníženým množstvím dusičnanů (N2), s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (N3), v porovnání s kontrolními rostlinami (K), a to buď v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S) ■, nebo bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S) ■.

PEPC se podílí na syntéze 2-oxoglutarátu, důležitého prekurzoru v syntéze aminokyselin. Aktivita PEPC je ovlivněna dostupností zdroje dusíku. V této práci byl porovnáván vliv sníženého množství dusíkatých látek (NH₄NO₃, KNO₃; N), sníženého množství amonných iontů (N1) a sníženého množství dusičnanů (N2). Snížení dostupnosti zdroje dusíku vedlo vždy ke snížení aktivity PEPC. Rostliny N a N1 dosahovaly jen 15-20% aktivity PEPC oproti kontrolním rostlinám. Pouze snížené množství dusičnanů (N2) poskytovalo lepší výsledky, aktivita PEPC byla 30-40% oproti aktivitě v kontrolních rostlinách. Snížené množství dusičnanů znamená, že rostlina nemá v kultivačním médiu k dispozici žádný KNO₃, má 5x sníženou koncentraci NH₄NO₃. Vzhledem k tomu, že tato

sůl obsahuje oba primární zdroje dusíku, jak NO_3^- , tak NH_4^+ , rostlina měla k dispozici větší množství dusíku než rostliny pěstované ve skupině N a N1.

Rostliny ve skupině N3 pěstované v přítomnosti 0,5% kaseinu (N3) jako výhradního zdroje dusíku měly aktivitu PEPC nižší oproti rostlinám kontrolním, srovnatelnou s rostlinami stresovanými nedostatkem dusičnanů (N2). Rostlina je pravděpodobně schopná kasein štěpit pomocí proteas, které kořeny vylučují do média, a tak může být kasein štěpen na di-, tri-, ale i oligopeptidy a použit rostlinou bez předchozího zpracování jako zdroj dusíku. Tento závěr prokázaly studie na rostlinách *Arabidopsis thaliana* a *Hakea actities* [66]. Pravděpodobně bude záležet na rostlinném druhu a dalších podmínkách, jak je rostlina schopna sekretovat proteasy do média a využít protein jako zdroj dusíku.

NADP-ME poskytuje NADPH, který je pro rostlinu důležitý z hlediska růstu, proliferace nebo detoxikace [6], protože je používán pro biosyntézu dalších látek. Aktivita NADP-ME poklesla v přítomnosti dusíkatých látek v kultivačním médiu. Výjimkou byly rostliny pěstované se sníženým množstvím amonných iontů (N1), kde aktivita tohoto enzymu byla vyšší oproti kontrolním rostlinám. V rostlinách pěstovaných se sníženým obsahem fosfátů (P) nebo s limitovaným přístupem CO_2 (C) došlo ke zvýšení aktivity NADP-ME.

Ze sledovaných enzymů byla ve všech skupinách rostlin, kromě rostlin s limitovaným přístupem CO_2 (C), nejvíce zvýšena aktivita PPDK. Tento enzym se vyskytuje v C3 rostlinách, jako je tabák, ve velmi malém množství. Výjimku představují semena a žilky, kde funkce PPDK pravděpodobně spočívá v poskytování PEP pro šikimátovou dráhu a biosyntézu ligninu. PPDK se také podílí na remobilizaci dusíku během senescence. Jak chloroplastová, tak cytosolová izoforma PPDK jsou v *Arabidopsis thaliana* během senescence exprimovány ve zvýšeném množství. PPDK - dependentní cesta remobilizace dusíku využívá pyruvátu pocházejícího z degradovaných proteinů, který je pomocí PPDK a PEPC přeměněn na PEP a OAA, části citrátového cyklu využit k syntéze 2-oxogutarátu, prekursoru pro vznik glutaminu a glutamátu (viz. obr. 1, str. 4) [6, 67]. Tak se zvyšuje hmotnost a obsah dusíku v semenech [67]. Také v nedostatku dusíkatých látek a fosfátů může být PPDK - dependentní dráha využívána pro poskytování 2-oxogutarátu GS/GOGAT cyklu. K nejvyššímu nárůstu aktivity PPDK došlo v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím dusičnanů (N2) a v rostlinách pěstovaných s kaseinem (N3) jako výhradním zdrojem dusíku. V těchto rostlinách byla také zvýšena

aktivita GOGAT, ale pouze v přítomnosti dodatečného zdroje uhlíku, sacharosy. Výsledky jsou v souladu diplomovou prací Kateřiny Minářů [60].

NR katalyzuje první krok asimilace dusíku, kdy přeměňuje dusičnany na dusitany. S poklesem koncentrace živin v kultivačním médiu došlo k poklesu aktivity NR. K největšímu poklesu aktivity došlo v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím fosfátů (P) a v přítomnosti 0,5% kaseinu (N3) jako jediného zdroje dusíku.

Aktivita GS byla ovlivněna všemi sledovanými parametry. K mírnému poklesu aktivity GS došlo v rostlinách pěstovaných s limitovaným přístupem CO₂ (C) a v rostlinách se sníženým obsahem fosfátů (P). V rostlinách, ve kterých byla omezená koncentrace dusíkatých živin, byla zaznamenána nízká aktivita GS.

Aktivita GOGAT byla ovlivněna nejen složením kultivačního média, ale i přístupem CO₂. Limitovaný přístup CO₂ (C) a omezené množství fosfátů (P) způsobily snížení aktivity GOGAT. Nejnižší pokles byl zaznamenán v rostlinách pěstovaných se sníženým množstvím amonných iontů a zároveň dusičnanů (N). Se stoupajícím množstvím zdroje dusíku (ale stále 5x nižším zdrojem než je v kontrolních rostlinách) aktivita GOGAT vzrůstala, více v přítomnosti sacharosy, dodatečného zdroje uhlíku. Největší aktivita GOGAT byla zjištěna v rostlinách pěstovaných v 0,5% kaseinu (N3).

NAD⁺/NADP⁺-GDH katalyzuje reduktivní aminaci 2-oxoglutarátu nebo oxidativní deaminace glutamátu. Doposud není zcela prozkoumána její role při propojení metabolismu uhlíku a dusíku. Za zvýšení aktivity GDH pravděpodobně může proteolytická aktivita při senescenci nebo abiotický stres [55]. K poklesu aktivity došlo ve všech rostlinách se sníženým obsahem živin. Nejmenší pokles byl zaznamenán v rostlinách s nedostatkem dusičnanů (N2).

Závěrem lze říci, že nedostatečné množství živin negativně ovlivňuje metabolismus rostliny, snížená aktivita byla nalezena u PEPC, NR a GS. Odpovídá tomu i hmotnosti jednotlivých částí rostlin. Nejnižší hmotnost listů, stonku a kořenů byla u rostlin pěstovaných v přítomnosti kaseinu (N3) jako výhradního zdroje dusíku v kultivačním médiu. Rostliny pěstované se sníženým množstvím dusičnanů (N2) měly menší hmotnost listů a stonků než rostliny pěstované se sníženým množstvím amonných iontů (N1). U kořenů tomu bylo naopak. Větší délka kořenů souvisí s tolerancí nedostatku živin v rostlinách.

Naopak jiné enzymy, především PPDK, NADP-ME a GOGAT, se zvýšením své aktivity mohou podílet na přizpůsobení metabolismu snížené dostupnosti amonných iontů, dusičnanů a fosfátů v kultivačním médiu.

7. ZÁVĚR

1) V rostlinách pěstovaných *in vitro* v Murashige-Skoogově agaru byla pozorována vyšší aktivita PEPC v přítomnosti sacharosy, jakožto dodatečného zdroje uhlíku. Snížená koncentrace fosfátů a snížená koncentrace dusíkatých látek (amonných iontů a dusičnanů) znamenala sníženou aktivitu PEPC.

2) Podobný vliv sacharosy, fosfátů a dusíkatých látek byl zjištěn pro NADP-ME, avšak aktivita PPDK byla v listech rostlin tabáku v nedostatku fosfátů, amonných iontů i dusičnanů vyšší.

3) V rostlinách pěstovaných se sníženou koncentrací dusíkatých látek byla zjištěna snížená aktivita NR a GS, avšak zvýšená aktivita GOGAT.

4) Rostliny tabáku rostly v kultivačních nádobkách v přítomnosti kaseinu jako výhradního zdroje dusíku. Aktivity sledovaných enzymů v listech i kořenech byly nižší než v kontrolních rostlinách, ale srovnatelné s rostlinami se sníženým množstvím dusíkatých látek (amonných iontů a dusičnanů).

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Ryšlavá, H., Müller, K., Semorádová, Š., Synková, H. a Čeřovská, N.: *Photosynthetica*, 41, 357-363 (2003)
- [2] Jeanneau, M., Vidal, J., Gousset-Dupont, A., Lebouteiller, B., Hodfes, M., Gerentes, D., a Perez, P.: *J. Exp Bot.*, 53, 1837-1845 (2002)
- [3] Crawford, N. M., Kahn, M. L., Leustek, T. a Long, S. R.: Nitrogen and sulfur z knihy *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B. B., Gruissem, W. a Jones, R. J.), 786-824, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland (2000)
- [4] Ferrario-Mery, S., Hodges, M., Hirel, B. a Foyer, Ch. H.: *Planta*, 214, 877-886 (2002)
- [5] O'Leary, B., Park, J. a Plaxton, C.: *Biochem. J.*, 436, 15-34 (2011)
- [6] Doubnerová, V. a Ryšlavá, H.: *Plant Sci.*, 180, 575-583 (2011)
- [7] Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Štěbánek, J. a kolektiv: *Fyziologie rostlin*, Akademika Praha (1998)
- [8] Amtmann, A. a Armengaud, P.: *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12, 275-283 (2009)
- [9] Miyashita, Y. a Good A. G.: *Plant Signaling & Behavior*, 3, 842-843 (2008)
- [10] Temple, S. J., Vance, C. P. a Gantt, J. S.: *Trends Plant Sci.*, 3, 51-56 (1998)
- [11] Ryšlavá, H. a Doubnerová, V.: *Chem. listy*, 104, 1175-1180 (2010)
- [12] Izui, K., Matsumura, H., Furumoto, T. a Kai, Y.: *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 55, 66-84 (2004)
- [13] Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P., a Cretín, C.: *Plant Sci.*, 99, 111-124 (1994)
- [14] Li, X.-R., Wang, L. a Ruan, Y.-L.: *J. Exp Bot.*, 61, 287-295 (2010)
- [15] Masumoto, C., Miyazawa, S., Ohkawa, H., Fukuda, T., Taniguchi, Y., Murayama, S., Kusano, M., Saito, K., Fukayama, H. a Miyao, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 5226-5231 (2010)
- [16] Černý, M., Doubnerová, V., Müller, K. a Ryšlavá, H.: *Biochimie*, 92, 1362-1370 (2010)
- [17] Svensson, P., Bläsing, O. E., a Westhoff, P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 414, 180-188 (2003)
- [18] Nimmo, H. G.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 414, 189-196 (2003)
- [19] Müller, K., Doubnerová, V., Synková, H., Čeřovská, N. a Ryšlavá, H.: *Biol. Chem.*, 3, 245-251 (2009)
- [20] Kai, Y., Matsumura, H. a Izui, K.: *Arch. Biochem.*, 414, 170-179 (2003)

- [21] Avasthi, U. K., Izui, K. a Raghavendra, A. S.: *J. Exp Bot.*, 62, 1017-1026 (2011)
- [22] Doubnerová, V., Jirásková, A., Janošková, M., Müller, K., Bařková, P., Synková, H., Āeřovská, N. a Ryřlavá, H.: *Gen. Physiol. Biophys.*, 26, 281-289 (2007)
- [23] Fu, Z. Y., Zhang, Z. B., Liu, Z.H., Hu, X. J. a Xu, P.: *Biol. Plantarum*, 55, 196-200 (2011)
- [24] Pei, D. L., Ma, H. Z., Zhang, Y., Ma, Y. S., Wang, W. J., Geng, H. X., Wu J. Y. a Li, Ch. W.: *Life Sci.*, 8, 652-657 (2011)
- [25] Chang, G. G. and Tong, L.: *Biochemistry-US*, 42, 12721-12733 (2003)
- [26] Edwards, G. E. a Andreo, C.: *Phytochemistry*, 31, 1845-1857 (1992)
- [27] Rothermel, B. A. a Nelson, T.: *J. Biol. Chem.*, 33, 19587-19532 (1989)
- [28] Doubnerová, V., Potůčková, L., Müller, K. a Ryřlavá, H.: *J. Serb. Chem. Soc.*, 74, 893-906 (2009)
- [29] Xu, Y., Bhargava, G., Wu, B., Loeber, G. a Tong, L.: *Structure*, 7, 877-889 (1999)
- [30] Wheeler, M. C., Tronconi, M. A., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., Flugge, U. I. a Maurino, V. G.: *Plant Physiol.*, 139, 39-51 (2005)
- [31] Chi, W., Yang, J., Wu, N. a Zhang, F.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1865-1874 (2004)
- [32] Chastain, Ch. J., Fries, J. P., Vogel, J. A., Randklev, Ch. L., Vossen, A. P., Dittmer, S. K., Watkins, E. E., Fiedler, L. J., Wacker, S. A., Meinhover, K. C, Sarath, G. a Chollet, R.: *Plant Physiol.*, 128, 1368-1378 (2002)
- [33] Chastain, Ch. J., Xu, W., Parsley, K., Sarath, G., Hibberd, J., a Chollet, R.: *Plant J.*, 53, 854-863 (2008)
- [34] Matsuoka, M.: *J. Biol. Chem.*, 28, 16772-16777 (1990)
- [35] Yamasaki, H. a Sakihama, Y.: *FEBS Lett.*, 468, 89-92 (2000)
- [36] Heldt, H.-W., Piechulla, B. a Heldt, F.: *Plant Biochemistry*, 199-201, 236-242, Academic Pres, 4. vydání (2011)
- [37] Dubois, F., Tercé-Laforgue, T., Gonzalez-Moro, M.-B., Estavillo, J.-M., Sagwan R., Gallais, A. a Hirel, B.: *Plant Physiol. Bioch.*, 41, 565-576 (2003)
- [38] Suzuki, A. a Knaff, D. B.: *Photosynth. Res.*, 83, 191-217 (2005)
- [39] Debouba, M., Maârroufi-Dghimi, H., Suzuki, A., Ghorbel, M. H. a Gouia, H.: *Ann. Bot. - London*, 99, 1143-1151 (2007)
- [40] Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J. a Neill, S.: *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 16314-16318 (2002)
- [41] Huber, S.C., Bachmann, B. a Huber, J. L.: *Elsevier Sci.*, 1, 432-438 (1996)

- [42] Huber, S.C: *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 318-322 (2004)
- [43] Lamberck, I., Chi, J.-Ch., Krizowski, S., Mueller, S., Mehlmer, N., Teige, M., Fischer, K. a Schwarz, G.: *Biochemistry-US*, 49, 8177-8186 (2010)
- [44] Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M., Pageau, K., Lelandais, M., Grandjean, O., Kronenberger, J., Valadier, M.-H., Feraud, M., Jouglet, T. Suzuki, A.: *Plant Physiol.*, 140, 444-456 (2006)
- [45] Valadier, M. H., Yoshida, A., Grandjean, O., Morin, H., Kronenberger, J., Boutet, S., Raballand, A., Hase, T., Yoneyama, T. a Suzuki, A.: *FEBS J.*, 275, 3193-3206 (2008)
- [46] Teixeira, J. a Fidalgo, F.: *Plant Physiol. Bioch.*, 47, 807-813 (2009)
- [47] Forde, B. G. a Lea, P. J.: *J. Exp Bot.*, 58, 2339-2358 (2007)
- [48] Zehnálek, J., Adam, V. a Kizek, A.: *Chem. listy*, 100, 508-514 (2006)
- [49] Mifflin, B. J. a Habash D.: *J. Exp Bot.*, 53, 979-987 (2002)
- [50] Becker, T. W., Carrayol, E. a Hirel, B.: *Planta*, 211, 800-806 (2000)
- [51] Bernard, S. M., Møller, A. L. B., Dionisio, G., Kichey, T., Jahn, T. P., Dubois, F., Baudo, M., Lopes, M. S., Terce'-Laforgue, T., Foyer, Ch. H., Parry, M. A. J., Forde, B. G., Araus, J. L., Hirel, B., Schjoerring, J. K. a Habash, D. Z.: *Plant Mol. Biol.*, 67, 89-105 (2008)
- [52] Nalbantoglu, B.: *Tur. J. Biol.*, 24, 197-213 (2000)
- [53] Purnell, M. P. a Botella, J. R.: *Plant Physiol.*, 143, 530-539 (2007)
- [54] Masclaux-Daubresse, C., Valadier, M.-H., Carrayol, E., Reisdorf-Cren, M. a Hirel, B.: *Plant Cell Environ.*, 25, 14561-1462 (2002)
- [55] Skopelitis, D. S., Paranychianakis, N. V., Paschalidis, K. A., Pliakonis, E. D., Delis, I. D., Yakoumakis, D. I., Kouvarakis, A., Papadakis, A. K., Stephanou, E. G., a Roubelakis-Angelakis, K. A.: *Plant Cell*, 18, 2767-2781 (2006)
- [56] Frechilla, S., Lasa, B., Aleu, M., Juanarena, N., Lamsfus, C. a Aparicio-Tejo, P. M.: *J. Plant Physiol.*, 159, 81-818 (2002)
- [57] Robinson, S. A., Slade A. P., Fox, G. G., Phillips, R., Ratcliffe, R. G. a Stewart, G.R.: *Plant Physiol.*, 95, 509-516 (1991)
- [58] Labboun, S., Tercé-Laforgue, T., Roscher, A., Bedu, M., Restivo, F. M., Velanis, C. N., Skopelitis, D. S., Moschou, P. N., Roubelakis-Angelakis, K. A., Suzuki, A. a Hirel, B.: *Plant Cell Physiol.*, 50, 1761-1773 (2009)
- [59] Abiko, T., Wakayama, M., Kawakami, A., Obara, M., Kisaka Hi., Miwa, T., Aoki, N. a Ohsugi, R.: *Planta*, 232, 299-311 (2010)
- [60] Minářů, K.: Vliv složení kultivačního média na metabolismus rostlin tabáku, Diplomová práce PřF UK Praha, Katedra biochemie (2010)

- [61] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248-254 (1976)
- [62] Khavari-Nejad, R. A., Najafi, F. a Tofighi, C.: *Int. J. Agric. Biol.*, 11, 209-213 (2009)
- [63] Tuteja, N., Tiburcio, A. F., Fortes, A. M. a Bartels, D.: *Plant Signaling & Behavior*, 6, 173-174 (2011)
- [64] Miedzińska, L.: Vliv sucha na metabolismus rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*, L.), Diplomová práce PřF UK Praha, Katedra biochemie (2010)
- [65] Gregory, A. L., Hurley, B. A., Tran, H. T., Valentine, A. J., She, Y.-M., Knowles, V. L. a Plaxton, W. C.: *Biochem J.*, 420, 57-65 (2009)
- [66] Adamczyk, B., Smolander, A., Kitunen, V. a Godlewski, M.: *Plant Signaling & Behavior*, 5, 817-819 (2010)
- [67] Taylor, L., Nunes-Nesi, A., Parsley, K., Leiss, A., Leach, G., Coates, S., Wingler, A., Fernie, A. R. a Hibberd, J. M.: *Plant J.*, 62, 641–652 (2010)

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

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