

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Veronika Plisková

Vliv abiotického stresu na metabolismus rostlin okurky (*Cucumis sativa* L.)

The effect of abiotic stress on cucumber plants (*Cucumis sativa* L.)

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Veronika Hýsková Ph.D. (roz. Doubnerová)

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze,

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Veronice Hýskové, PhD. za veškeré rady, čas, podporu a pomoc, které mi s velkou ochotou a trpělivostí poskytovala v průběhu vypracovávání této práce. Mé díky patří také Doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. a ostatním členům laboratoře biochemie rostlin za rady a pomoc.

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

V neposlední řadě patří moje díky rodině a přátelům za veškerou podporu v průběhu studia.

Tato práce byla podporována Univerzitou Karlovou v Praze v rámci projektu UNCE 204025/2012.

Abstrakt

V důsledku působení vysoké koncentrace soli dochází k akumulaci sodných iontů v rostlině, což způsobuje neschopnost přijímat vodu, narušení rovnováhy iontů, poškození fotosyntézy a vznik oxidativního stresu. V souvislosti se solným stresem tedy klesá dostupnost NADPH. Odolnost rostliny vystavené působení zvýšené koncentrace soli závisí na její schopnosti kompenzovat sníženou dostupnost NADPH, jenž může být využit jako koenzym v antioxidačních řetězcích a k syntéze antioxidačních a osmoticky aktivních látek.

V této práci bylo u rostlin okurky seté (*Cucumis sativa* L. convar. Jogger F1) vystavených solnému stresu v podobě 100 mM NaCl zaznamenáno snížení relativního obsahu vody, snížení množství enzymu Rubisco a zvýšení množství proteinu Hsp70 v listech a zvýšení akumulace sodných iontů v listech i kořenech. Následkem solného stresu došlo ke zvýšení aktivity (až o 270 %) enzymů poskytujících NADPH: NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasy, glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační), nefosforylační glyceraldehydfosfátdehydrogenasy v listech experimentálních rostlin, a to hlavně druhý a třetí den působení solného stresu. Také aktivita méně zastoupených NADP-dependentních enzymů (až o 200 %): glukosa-1-dehydrogenasy, glukonát-2-dehydrogenasy, galaktosa-1-dehydrogenasy, ribosa-1-dehydrogenasy a glycerol-2-dehydrogenasy byla v rané fázi odpovědi vůči solnému stresu vyšší v listech i kořenech stresovaných rostlin než v rostlinách kontrolních. V neposlední řadě byl zjištěn nárůst aktivity šikimátdehydrogenasy, klíčového enzymu šikimátové dráhy, vedoucí např. k syntéze fenolických látek a flavonoidů, jejichž množství bylo také zvýšené.

Abstract

The exposure of plants to high salt concentrations causes accumulation of sodium ions. This leads to the inability of the plants to uptake water, a disturbance of ion homeostasis, a decrease in photosynthesis and oxidative stress. As a result of the salt stress, the availability of NADPH decreases. The adaptation to the concentrations of salt depends on plant's ability to compensate for the decreased availability of NADPH, which can be further used in antioxidative cycles and the synthesis of antioxidative compounds and osmoprotectants.

In this work, the reduction of relative water content, a decrease in the Rubisco enzyme activity, an increase of Hsp70 in the leaves and an increase in the accumulation of sodium ions was shown in cucumber plants (*Cucumis sativa* L. *convar. Jagger F1*) exposed to salt stress (100 mM NaCl). As a consequence of salt stress, an increase in the activity of NADPH providing enzymes was found. Particularly on the second and third day of salt stress, an increase in the activity (up to 270 %) of: NADP-isocitrate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADP-malic enzyme, non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in leaves was detected. The activity of less abundant NADP-dehydrogenases (glucose 1-dehydrogenase, gluconate 2-dehydrogenase, galactose 1-dehydrogenase, ribose 1-dehydrogenase and glycerol 2-dehydrogenase) was also increased (up to 200 %) as a part of an early response to salt stress in the roots and leaves of the stressed plants. In addition, there was an increase in the activity of shikimate dehydrogenase, a key enzyme of the shikimate pathway, leading for example to the synthesis of phenolic compounds and flavonoids, whose amount was also increased.

Klíčová slova

Solný stres

NADPH

NADP-dependentní enzymy

Antioxidanty

Hsp70

Key words

Salt stress

NADPH

NADP-dependent enzymes

Antioxidants

Hsp70

Seznam použitých zkratek

2-OG	2-oxoglutarát
2-PG	2-fosfoglycerát
AAS	atomová absorpční spektrometrie
ABA	kyselina abscisová
ADP	adenosindifosfát
AES	atomová emisní spektrometrie
AK	aminokyselina
Asp	kyselina L-asparagová
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BisTris	1,3-bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)propan
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
C ₄ -rostliny	rostliny, jejichž prvním fotosyntetickým produktem je čtyřuhlíkatá látka (oxalacetát)
CAM	metabolismus rostlin z čeledi tlusticovitých (z angl. Crassulacean acid metabolism)
CBB	Coomassie brilliant blue
CCC	ko-transportér kationtů a chloridových iontů (z angl. cation chloride cotransporter)
Co A	koenzym A
DHA	dehydroaskorbát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
DW	hmotnost sušiny (z angl. dry weight)
E-4-P	D-erythrosa-4-fosfát
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
F-1,6-BP	D-fruktosa-1,6-bisfosfát
F-6-P	D-fruktosa-6-fosfát
FRAP	metoda stanovení antioxidačních schopností (z angl. ferric reducing antioxidant power)
FW	čerstvá hmotnost (z angl. fresh weight)
g	tíhové zrychlení ($g = 9,807 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$)

G6PDH	D- glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, (EC 1.1.1.49)
GA1,3BP	D-glyceraldehyd-1,3-bisfosfát
GA-3P	D-glyceraldehyd-3-fosfát
GSH	glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
HKT	vysokoafinitní přenašeč pro draselné ionty (z angl. high affinity transporter for potassium)
Hsp	proteiny teplotního šoku (z angl. heat shock protein)
KUP/HAK/KT	transportní systémy pro draselné ionty (z angl. K ⁺ uptake permease/high affinity K ⁺ transporter/ K ⁺ transporter)
MDHA	monodehydroaskorbát
m-RNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAAD	nikotinadenindinukleotid
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukováný)
NADP-ICDH	NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasa (dekarboxylační) (EC 1.1.1.42)
NADP-ME	NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40)
NA-GAPDH	nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (EC 1.2.1.9)
NAMN	mononukleotid kyseliny nikotinové
NBT	nitroblue tetrazolium chlorid
NHX	vakuolární Na ⁺ /H ⁺ antiporter
NMNAT	nikotinmononukleotidadenyltransferasa (EC 2.7.7.1)
NTRC	NADPH thioredoxinreduktasa (EC 1.8.1.9)
OAA	oxalacetát
OPPC	oxidativní pentosafosfátová cesta
PBS	fosfátový pufr spolu s dalšími ionty (z angl. physiological buffer system)
PEP	fosfoenolpyruvát
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa (EC 4.1.1.31)
PM	cytoplazmatická membrána

PVP	polyvinylpolypyrrolidon
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
Rubisco	D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenia (EC 4.1.1.39)
RUBP	D-ribulosa-1,5-bisfosfát
RWC	relativní obsah vody (z angl. relative water content)
SDH	šikimátdehydrogenasa (EC 1.1.1.25)
SDS	dodecylsíran sodný
SOS	signální kaskáda související se solným stresem (z angl. salt overly sensitive)
T	Tween
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethan
TW	hmotnost po nasycení destilovanou vodou (z angl. turgid weight)

Obsah:

1	Úvod.....	4
1.1	Zasolení.....	4
1.2	Sodné ionty	5
1.2.1	Transport Na ⁺	5
1.3	Halofyté a glykofyté	8
1.4	Solný stres.....	8
1.4.1	Ovlivnění metabolismu rostlin solným stresem.....	8
1.4.1.1	Osmotický stress.....	9
1.4.1.2	SOS signální dráha	10
1.4.1.3	Aktivní formy kyslíku	11
1.4.1.4	Antioxidační systémy	11
1.4.1.5	Peroxidasy	12
1.4.1.6	Hsp70.....	12
1.4.2	Metabolismus rostlinné buňky.....	13
1.4.3	NADPH.....	14
1.4.4	NADP-dependentní enzymy	15
1.4.5	Šikimátdehydrogenasa	17
1.4.6	Souvislost se stresem	18
1.4.7	Minoritní NADP-dependentní enzymy.....	19
2	Cíl práce.....	23
3	Metody.....	24
3.1	Použité chemikálie.....	24
3.2	Přístroje.....	25
3.3	Pěstování experimentálních rostlin.....	26
3.4	Příprava vzorků.....	26
3.4.1	Odebírání rostlinného materiálu	26
3.4.2	Příprava vzorků pro stanovení enzymové aktivity	26
3.4.3	Příprava vzorků pro stanovení koncentrace Na ⁺ iontů	26
3.4.4	Příprava vzorků pro stanovení koncentrace NADP ⁺	27
3.4.5	Příprava vzorků pro stanovení NADPH	27
3.4.6	Příprava vzorků pro stanovení fenolických látek a flavonoidů	27
3.5	Stanovení aktivity enzymů.....	27
3.5.1	NADP-isocitrátdehydrogenasa	28
3.5.2	NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační).....	28
3.5.3	Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa	29

3.5.4	Šikimátdehydrogenasa	29
3.5.5	Nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa	29
3.5.6	Minoritní NADP-dependentní enzymy	29
3.5.7	Stanovení aktivity peroxidasy	29
3.6	Analytické metody	29
3.6.1	Stanovení relativního obsahu vody	29
3.6.2	Stanovení koncentrace Na ⁺ a K ⁺ iontů	30
3.6.3	Stanovení koncentrace fenolických látek	31
3.6.4	Stanovení koncentrace flavonoidů	31
3.6.5	Stanovení antioxidačních schopností metodou FRAP	31
3.6.6	Stanovení koncentrace rozpustných bílkovin podle Bradfordové	32
3.6.7	Stanovení koncentrace NADP ⁺	32
3.6.8	Stanovení koncentrace NADPH	32
3.7	Elektroforetické metody	33
3.7.1	Elektroforetická separace v nativním prostředí	33
3.7.2	Červená nativní elektroforéza	33
3.7.2.1	Detekce aktivity NADP-ICDH po nativní elektroforéze	33
3.7.2.2	Detekce aktivity NADP-ME po nativní elektroforéze	33
3.7.2.3	Detekce aktivity G6PDH po nativní elektroforéze	34
3.7.2.4	Detekce aktivity SHD po nativní elektroforéze	34
3.7.3	Elektroforetická separace v prostředí SDS	34
3.7.3.1	Detekce proteinů v gelu	34
3.8	Imunochemická detekce Hsp70 na nitrocelulosové membráně	34
4	Výsledky	36
4.1	Přehled provedených experimentů	36
4.2	Vliv solného stresu na relativní obsah vody a množství rozpustných proteinů	37
4.3	Stanovení koncentrace sodných a draselných iontů	40
4.4	Vliv solného stresu na aktivitu enzymů	42
4.4.1	Aktivita G6PDH	42
4.4.2	Aktivita NADP-ICDH	44
4.4.3	Nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa	47
4.4.4	Aktivita SDH	48
4.4.5	Méně zastoupené NADP-dependentní enzymy	50
4.5	Vliv solného stresu na množství NADP ⁺ a NADPH	52
4.6	Vliv solného stresu na antioxidační schopnosti	53
5	Diskuse	57

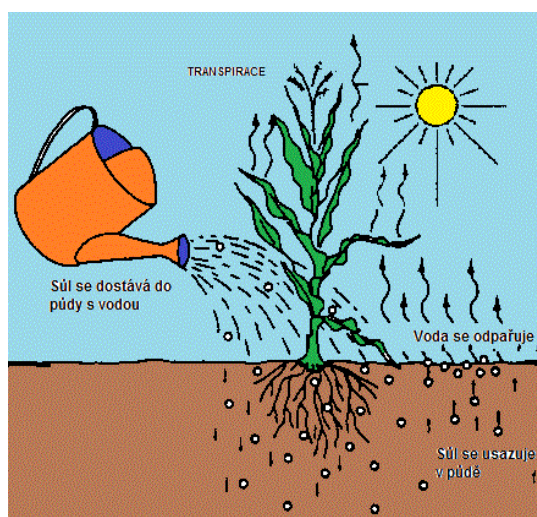
6	Závěr	63
7	Seznam použité literatury	64

1 Úvod

1.1 Zasolení

Sucho a zasolení se v posledních letech staly dvěma hlavními faktory, které limitují rostlinnou zemědělskou produkci. [1] Z celkové rozlohy souše na Zemi je 38 % využíváno k zemědělství, z čehož je 22 % zasoleno. [2] Vysoký obsah solí v půdě tedy ohrožuje značnou část zemědělsky využívané půdy. Slanost (salinita) půdy je definována jako množství rozpustných solí v půdě. Podle obsahu solí v půdě pak dělíme půdu na neslanou (0-3 g/l), mírně zasolenou (3-6 g/l), středně zasolenou (6-12 g/l) a vysoce zasolenou (více jak 12 g/l). Solným stresem pak rozumíme vystavení organismu zvýšené koncentraci soli v půdě. Zvýšená koncentrace se liší v závislosti na druhu rostliny, obecně rozlišujeme tři skupiny rostlin, odolné (snáší koncentrace soli do 10 g/l), středně odolné (snáší koncentrace do 5 g/l) a citlivé (snáší koncentrace do 2,5 g/l).[3]

Primární příčinou zasolení je zavlažování, v první řadě v oblastech postižených suchem. Při umělém zavlažování se spolu s vodou do půdy dostávají i ionty solí v ní rozpustné (obr. 1). Voda se odpařuje velmi rychle a soli zůstávají ve svrchních vrstvách půdy. Jedná se především o sodné, chloridové, síranové, hořečnaté, vápenaté a hydrogenuhličitanové ionty. Postupem času může dojít až k znehodnocení půdy. Dalšími příčinami zvýšené koncentrace soli v půdě jsou slané deště v blízkosti pobřeží moří a oceánů, kontaminace z podložních hornin a používání průmyslových hnojiv s obsahem sodíku při pěstování rostlin. [4]



obr. 1 Vznik zasolení. Ionty se do půdy dostávají během zavlažování, voda se následně odpaří a soli v půdě zůstávají.[3]

1.2 Sodné ionty

V relativně nízkých koncentracích jsou sodné ionty pro rostlinu potřebné. Sodné ionty mohou být rostlinnou buňkou využity jednak jako kofaktory některých enzymů, a jednak mohou v některých případech sloužit jako náhrada draselných iontů při nedostatku draslíku. Je to dáno chemickou podobností těchto dvou prvků. Rostlinné druhy, schopné provést tuto záměnu, jsou označovány jako natrofilní. Při optimální koncentraci mohou sodné ionty zvýšit produktivitu rostlin. [5] Bylo navrženo, že u některých rostlin s C4 typem metabolismu jsou sodné ionty transportovány společně s pyruvátem z buněk pochev cévních svazků do buněk mesofylu. Ko-transport pyruvátu a sodných iontů probíhá přes buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu buněk mesofylu. [6] Naopak vysoké koncentrace sodných iontů jsou pro rostlinu toxické. Dochází k narušení mnoha rovnováh a metabolických drah.

1.2.1 Transport Na^+

Rostliny se mezi sebou liší v toleranci solného stresu, mechanismy transportu sodných iontů jsou však podobné. Rostlinná buňka si v cytoplazmě udržuje vysoký poměr K^+/Na^+ , za fyziologických podmínek je tedy cytoplazmatická koncentrace draselných iontů relativně vysoká (100-200 mM), zatímco koncentrace sodných iontů je oproti tomu relativně nízká (1-10 mM). Je také udržován záporný elektrochemický potenciál na cytoplazmatické membráně (-140 V). [7] Mnohé studie uvádějí, že u glykofytů udržení vysokého poměru koncentrací K^+/Na^+ v listech je spojeno s tolerancí vůči solnému stresu. [8] Do příjmu Na^+ rostlinou buňkou se zapojuje několik mechanismů. (viz obr. 2, str. 7)

Primárně jsou sodné ionty přijímány pasivním transportem přes neselektivní iontové kanály. Podle toho, jak tyto kanály reagují na změny membránového potenciálu, je můžeme rozdělit na kanály aktivované depolarizací, kanály aktivované hyperpolarizací a na napětí nezávislé neselektivní kationtové kanály. Tyto kanály mohou být také členěny podle toho, s jakými ligandy interagují. Jedná se například o kanály regulované aminokyselinami, kanály regulované cyklickými mononukleotidy apod. [9]

V současné době je v souvislosti se sodnými ionty diskutována role různých transportérů pro draselné ionty. Důležitou roli hrají jednak při transportu Na^+ iontů do buňky a jednak při jejich eliminaci v podmínkách solného stresu. Jedná se o rodinu vysoko afinitních transportérů pro draselné ionty HKT (z angl. High affinity transporter for

potassium) a rodinu přenašečů označovanou KUP/HAK/KT (z angl. K^+ uptake permease/high-affinity K^+ transporter/ K^+ transporter). [10]

Transmembránové proteiny HKT byly původně identifikovány jako transportéry určené výhradně pro draselné ionty, avšak v posledních letech je studován jejich význam při transportu Na^+ do buňky. Na základě biofyzikálních a fylogenetických vlastností jsou rozlišovány 2 třídy (podrodiny) proteinů HKT, 1. třída zahrnuje kanály preferující Na^+ , naopak transportéry 2. třídy silně preferují K^+ . [11] Genom *Arabidopsis thaliana* L. obsahuje pouze 1 gen pro tento typ transportérů (AtHKT) [12], u rýže *Oryza sativa* L. jich bylo nalezeno 8 (OsHKT) [13] a byly detekovány i v genomu ječmene *Hordeum vulgare* L. (HvHKT). [14] Tyto kanály jsou důležité při toleranci solného stresu, je navrhováno, že HKT jsou exprimovány v buňkách dřevního parenchymu, aby odváděly sodné ionty do xylému, a tak chránily listy před poškozením solným stresem. [11]

Další skupinou membránových proteinů je KUP/HAK/KT. Tyto transportní systémy zajišťují za normálních podmínek velkou část transportu draselných iontů do rostlinné buňky. Podle některých studií se však mohou podílet i na transportu sodných iontů do buňky. Například u vysokoafinitního draselného kanálu (HAK) v rostlinách ječmene byl, kromě vysokoafinitního přenosu draselných iontů, zjištěn i nízkoafinitní příjem sodných iontů. [15] V jiných studiích bylo naopak zjištěno, že přenašeče z této rodiny jsou sodnými ionty inhibovány na funkční i transkripční úrovni. [16]

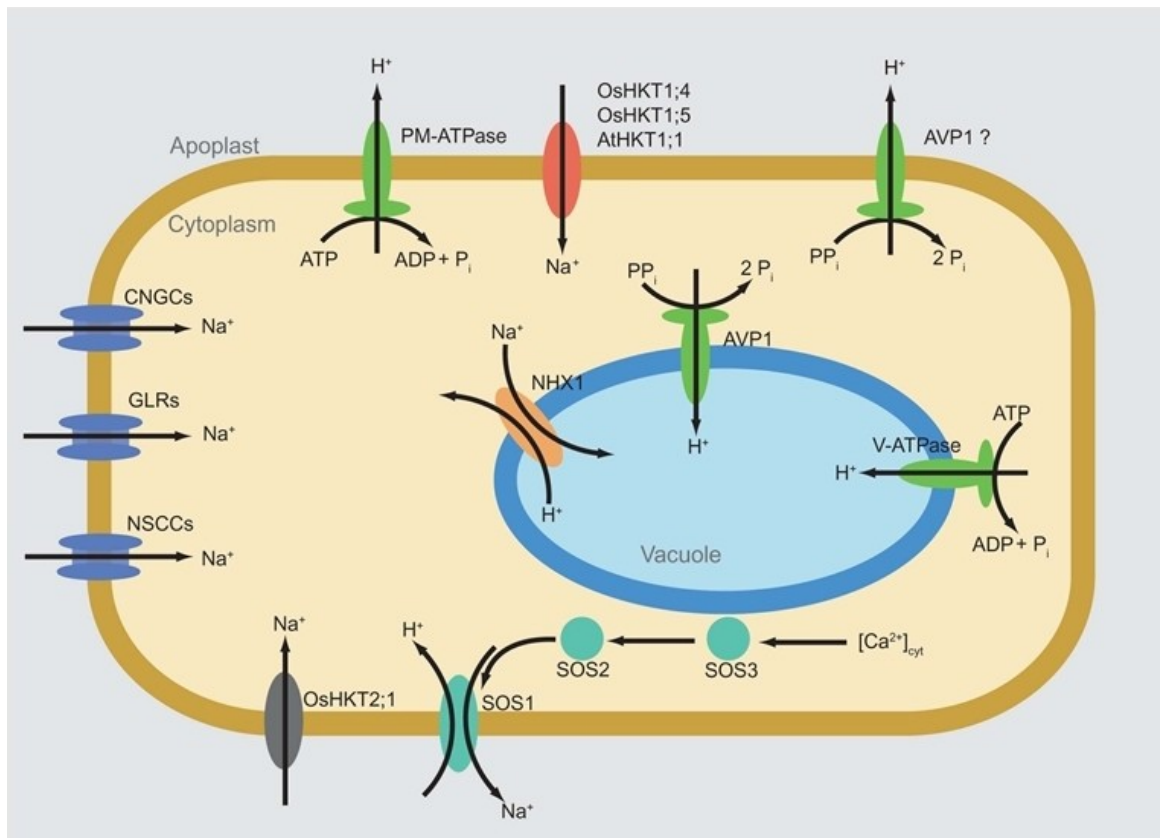
Sodné ionty mohou být také přijímány pomocí kotransportérů kationtů a chloridových iontů CCC (z angl. Cation Chloride Cotransporters), jedná se o přenašeče transportující chloridové ionty ve spojení s transportem Na^+ nebo K^+ . [17]

Negativní rozdíl mezi potenciály uvnitř a vně cytoplazmatické membrány a nízká koncentrace Na^+ v cytosolu upřednostňují tok sodných iontů do buňky. Při zvýšené koncentraci sodných iontů v okolním prostředí dochází ke zvýšení koncentrace Na^+ a snížení koncentrace K^+ v cytoplazmě, což způsobuje nerovnováhu iontů. [18] Rostlina se snaží o dosažení rovnováhy tím, že pumpuje sodné ionty z cytoplazmy zpět do okolního prostředí nebo do vakuoly. Tento transport je zajišťován pomocí Na^+/H^+ antiportérů umístěných ve vakuolární a cytoplazmatické membráně. Sodné ionty jsou tedy vyměňovány za protony, proces je řízen elektrochemickým gradientem, vytvářeným protonovými pumpami, jako je H^+ ATPasa a H^+ pyrofosfatasa. [19] Na^+/H^+ antiportér cytoplazmatické membrány je označován jako SOS1 a je součástí SOS (z angl. salt overly

sensitive) signální kaskády, jednoho z obranných mechanismů rostlin proti solnému stresu. [20]

Nedílnou součástí transportu sodných iontů, obzvláště při vystavení podmínkám solného stresu je vakuola. Vakuolární přenašeče se podílí jednak na udržování pH cytosolu a jednak na zachování rovnováhy iontů. Těmito přenašeči rozumíme zejména vakuolární Na^+/H^+ antiportér, označovaný NHX, který vyměňuje protony zevnitř vakuoly za sodné ionty z cytoplazmy. Elektrochemický protonový gradient je zajišťován činností vakuolární H^+ pyrofosfatasy a vakuolární H^+ ATPasy. [21]

Přemístění sodných iontů do vakuoly nejen snižuje koncentraci Na^+ iontů v cytoplazmě, ale také se podílí na osmotickém přizpůsobení, umožňujícím zachovat příjem vody ze solných roztoků. Snižováním cytoplazmatické koncentrace sodných iontů se zvyšuje odolnost rostliny. [22]



obr. 2 Transportní systémy pro sodné ionty v rostlinné buňce. *PM-ATPase* (H^+ ATPasa cytoplazmatické membrány), *HKT* (vysokoafinitní transportéry pro draselné ionty: *OsHKT*, *AtHKT*); *SOS1,2* a *3* (signální kaskáda *Salt overly sensitive*); *NSCC* (neselektivní iontové kanály); *GLR* (*glutamátové receptory*); *CNGC* (kanály regulované cyklickými mononukleotidy); *AVP1* (vakuolární H^+ -pyrofosfatasa); *V-ATPase* (vakuolární H^+ -ATPasa); *NHX* (vakuolární Na^+/H^+ antiportér) [23]

1.3 Halofyté a glykofyté

Podle toho, jak rostliny snášejí zasolení, je rozdělujeme do dvou skupin. Jsou to halofytní a glykofytní rostliny.

Halofytní rostliny jsou vůči solnému stresu odolné, jejich stavba a metabolismus jsou přizpůsobené zvýšené koncentraci soli. [24] Podle jedné z definic jsou jako halofytní označovány rostliny, schopné vykonat kompletní životní cyklus v prostředí o minimálně 200 mM koncentraci soli. [25] Tyto rostliny využívají mnoho různých mechanismů odolnosti vůči stresu. Často dochází k transportu sodných iontů do vakuoly nebo ven z buňky, v rámci celé rostliny pak může docházet ke hromadění Na^+ iontů ve starých listech nebo výhoncích. [23] V proteomických studiích halofytů bylo identifikováno 622 proteinů, které jsou v souvislosti se solným stresem exprimovány ve zvýšené míře. Tyto proteiny jsou zapojeny do fotosyntézy, energetického metabolismu, antioxidantních drah a udržování rovnováhy iontů. Mezi halofytní rostliny řadíme *Thellungiella halophila* L., rostlinu příbuznou *Arabidopsis thaliana* L., která má malý genom, proto je často používána ke studiu mechanismů odolnosti vůči solnému stresu. Další halofytní rostliny jsou např. ječmen obecný (*Hordeum vulgare* L.), ječmen přímořský (*Hordeum marinum* L.) a kosmatec křišťálový (*Mesembryanthemum crystallinum* L.). [26]

Glykofytní rostliny jsou citlivé k jakýmkoli výkyvům koncentrace soli a při delším vystavení solnému stresu hynou. Do této skupiny řadíme rýži, pšenici, většinu zeleniny včetně okurky (*Cucumis sativa* L.) a *A. thaliana* L. [23]

1.4 Solný stres

1.4.1 Ovlivnění metabolismu rostlin solným stresem

Rostlina pravděpodobně vnímá přítomnost zvýšené koncentrace soli v okolním prostředí pomocí membránových receptorů nebo prostřednictvím cytoplazmatických enzymů, citlivých vůči Na^+ iontům. Jedním z možných senzorů by mohl být Na^+/H^+ antiportér, který je součástí SOS signální dráhy (obr. 3, strana 10). [27]

Vystavení zasolení způsobí nárůst nitrobuňkové koncentrace Na^+ , což má za následek inhibici celé řady enzymů a zpomalení metabolických drah. Naopak aktivovány jsou reakce spojené s osmotickým a oxidativním stresem. Osmotický stres vyvolává přesun vody do extracelulárního prostoru, zmenšení buněčného a vakuolárního objemu, v důsledku oxidativního stresu pak dochází k intenzivnější respiraci a zvýšené tvorbě aktivních forem kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species). [27] Přenosem elektronu

na kyslík vzniká superoxidový anion, prekursor dalších ROS. [28] Zvýšená koncentrace sodných iontů v cytoplazmě způsobuje mimo jiné uvolnění vápenatých iontů z vakuoly, a tím nárůst koncentrace vápenatých iontů, které působí jako druhý posel v mnoha signálních drahách a podílí se na spouštění obranných reakcí buňky. [29] Další důležitou sloučeninou pro buněčnou signalizaci je kyselina abscisová (ABA), jejíž syntéza je indukována signály solného stresu. [30] Zvýšení intracelulární koncentrace ABA, především v listech, je způsobeno osmotickým stresem, konkrétně poklesem turgoru. Toto zvýšení vede k uzavření průduchů, snížení výměny plynů a zpomalení fotosyntézy. [31]

Díky přisedlému způsobu života, rostliny vyvinuly řadu obranných reakcí na biochemické a molekulárně biologické úrovni. Jedná se obzvláště o selektivní příjem nebo vylučování sodných iontů, kontrolu příjmu iontů kořeny a jejich transport do listů, přerozdělování iontů, syntéza osmoticky aktivních látek, záměna/úprava fotosyntézy, změny ve struktuře membrány, indukce antioxidantních enzymů a stimulace fytohormony. [32] Uvedené reakce se liší v závislosti na druhu rostliny a době vystavení solnému stresu.

1.4.1.1 Osmotický stress

Zvýšený obsah iontů solí v půdě je doprovázen snížením vodního potenciálu v okolí kořenů rostliny. Následkem toho je v buňkách kořenů vyšší vodní potenciál než v okolí, příjem vody rostlinou je pak omezen, protože transport vody probíhá z prostředí o vyšším potenciálu do prostředí o nižším potenciálu. Snížení příjmu vody způsobí ztrátu turgoru, zpomalení růstu a pokles fotosyntetické účinnosti. [33]

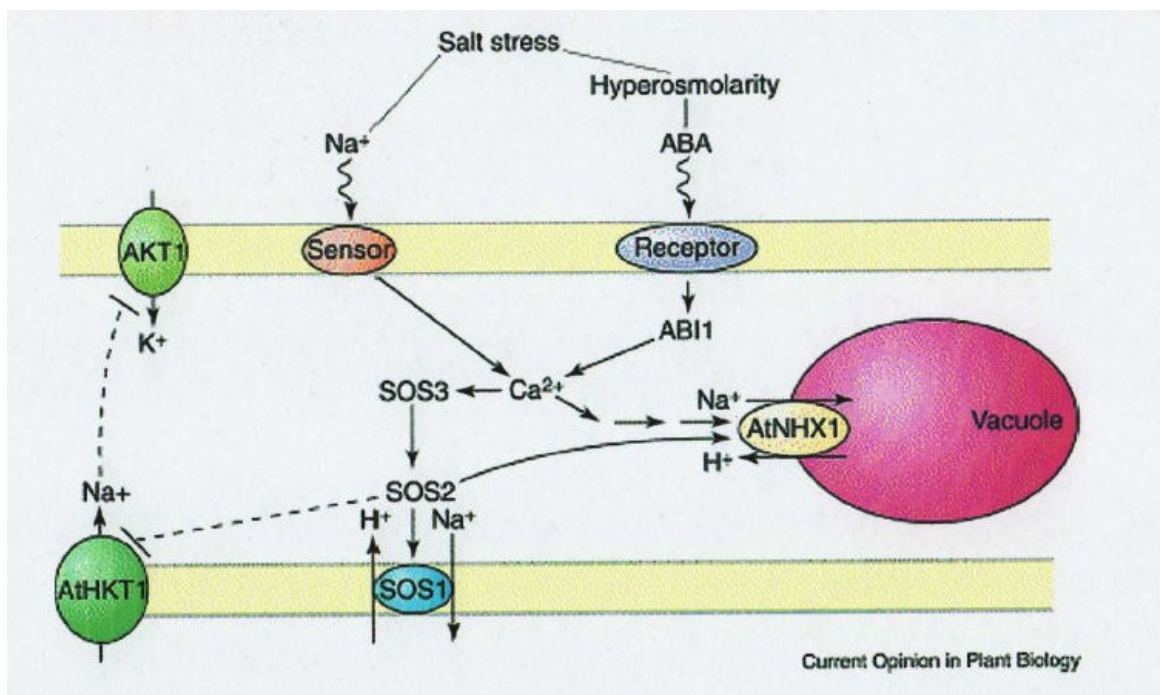
Sodné ionty jsou transportovány z buněk kořene do ostatních částí rostliny. Osmotický stres tedy vede k zastavení růstu stonku a listů, naopak kořeny rostou dále. Bylo navrženo, že kontrola růstu v souvislosti s vnějším prostředím a vývojem je ovlivňována cyklin-dependentními kinasami (CDK) [34] Zpomalení buněčného dělení je charakterizováno snížením aktivity CDK. [35] CDK jsou v rámci odpovědi na osmotický stres syntetizovány *de novo*; jsou pravděpodobně regulovány na úrovni transkripce i postranskripčních modifikací. [36] Ke snížení aktivity CDK dochází působením kyseliny abscisové. [37]

Další důležitou obranou reakcí rostliny je syntéza osmoticky aktivních látek, které zvyšují osmotický potenciál uvnitř buňky a tím se podílejí na zachování příjmu vody. Jedná se o sloučeniny, které se mohou v buňce vyskytovat ve vysokých koncentracích a při

tom pro ni nejsou toxické. Řadíme sem některé aminokyseliny (např. prolin), oligosacharidy rafinosové řady (rafinosa, stachyosa a verbaskosa) a cukerné alkoholy, jako je mannitol nebo pinitol. [38]

1.4.1.2 SOS signální dráha

Objevení SOS signální kaskády v *Arabidopsis thaliana* L. napomohlo porozumění tomu, jak rostlina rozpoznává solný stres. [39] Zvýšená koncentrace vápenatých iontů, indukovaná nárůstem koncentrace sodných iontů, spouští SOS signální kaskádu, sestávající se ze tří hlavních částí: SOS3, což je v podstatě senzor pro Ca^{2+} [40] SOS2 neboli serin/treoninová proteinkinasa [41] a SOS1 čili Na^+/H^+ antiportér cytoplazmatické membrány. [42] Zvýšená koncentrace vápenatých iontů vede k aktivaci SOS3-SOS2 protein kinasy, která reguluje SOS1, viz obr. 3. Za normálních podmínek je mRNA pro SOS1 velmi nestabilní, při vystavení solnému stresu však stabilita vzrůstá. [43] Tento nárůst stability je pravděpodobně způsoben reaktivními formami kyslíku, jejichž produkce je patrně zesilována aktivitou NADPH oxidasy. [44] Dochází tedy ke zvýšení požadavku na množství NADPH. SOS1 je protein, který má 10-12 podjednotek a je citlivý na koncentraci Na^+ . [27]



obr. 3 SOS signální dráha. Zvýšená koncentrace Na^+ iontů způsobí zvýšení koncentrace Ca^{2+} , a tím aktivuje Ca^{2+} - dependentní SOS3-SOS2 proteinkinasy, která reguluje expresi přenašců sodných iontů: SOS1 (Na^+/H^+ antiportér), HKT a NHX [22]

1.4.1.3 Aktivní formy kyslíku

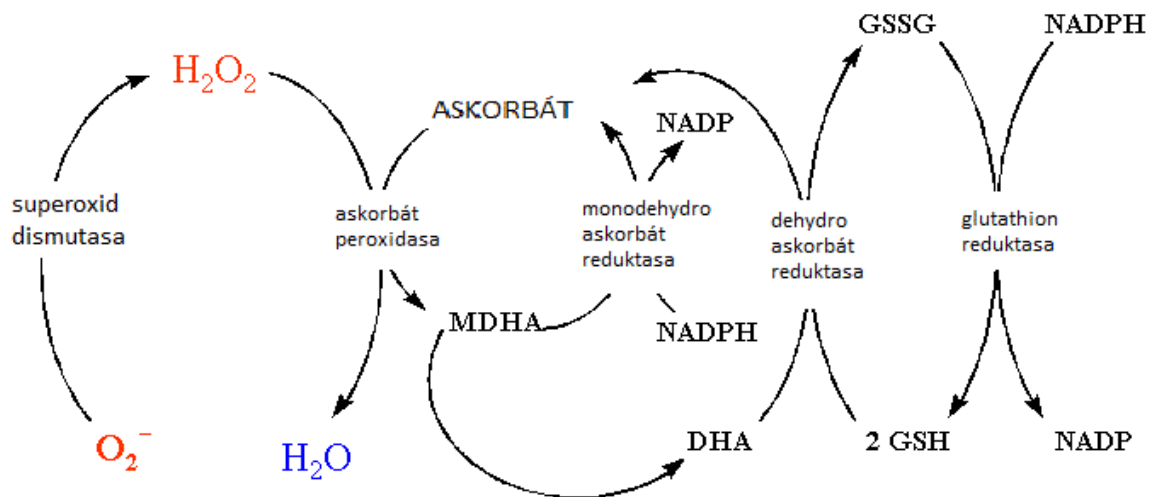
Solný stres se řadí mezi oxidativní stres tím, že způsobuje tvorbu ROS, jako jsou singletový kyslík, peroxid vodíku, superoxidové anionty, hydroxidové a perhydroxylové radikály. Tyto látky spouštějí expresi některých genů pro proteiny podílející se na obranných reakcích, jsou ale také pro buňku toxické, vedou k inaktivaci enzymů, poškození membrán, proteinů i nukleových kyselin [45] ROS mohou také sloužit jako signální molekuly regulující celou řadu procesů, jako je růst, vývoj, odpovědi na biotický i abiotický stres a programovaná buněčná smrt. [46]

Rostlinná buňka je vzniklými ROS ohrožena, proto probíhá detoxifikace pomocí antioxidačních látek a enzymů. Mezi antioxidační látky řadíme glutathion, L-askorbát (vitamin C), karotenoidy, α -tokoferol, fenolické látky a flavonoidy. [28] Antioxidačními enzymy pak rozumíme enzymy askorbát-glutathionového (Halliwell-Asadova) cyklu: superoxidodismutasy (EC 1.15.1.11), askorbátperoxidasy (EC 1.11.1.11), monodehydroaskorbátreduktasy (EC 1.6.5.4), dehydroaskorbátreduktasy (EC 1.8.5.1) a glutathionreduktasy (EC 1.6.4.2) a dále pak fosfolipidhydroperoxid-glutathionperoxidasy (EC 1.11.1.9), katalasy (EC 1.11.1.6), glutathionperoxidasy (EC 1.11.1.12) a peroxidasy (EC 1.11.1.7). [47]

NADPH oxidasa (EC 1.6.3.1) je klíčový enzym pro vznik aktivních forem kyslíku, katalyzuje reakci, při které dochází k přenosu elektronů z NADPH na kyslík, produktem reakce je superoxidový anion, jenž je prekurzorem dalších ROS. Při solném stresu je zvýšena produkce těchto forem kyslíku, a tudíž je zvýšena spotřeba redukovaného koenzymu NADPH. [28]

1.4.1.4 Antioxidační systémy

Významným antioxidačním cyklem je Halliwell-Asadův cyklus. Superoxidový radikál je enzymem superoxidodismutasy přeměněn na kyslík a peroxid vodíku. Peroxid vodíku je eliminován askorbátperoxidasou za současné přeměny askorbátu na monodehydroaskorbát. Regenerace askorbátu pak může probíhat jednak pomocí NADP-dependentní monodehydroaskorbátreduktasy a jednak může spontánně přejít na dehydroaskorbát, jenž je za současné oxidace glutathionu přeměněn na askorbát. Oxidovaný glutathion je následně redukován za spotřeby NADPH a účasti enzymu glutathionreduktasy. [48] Sled reakcí je znázorněn na obr. 4.



obr. 4 Halliwell-Asadův cyklus. MDHA (monodehydroaskorbát), GSH (redukovaný glutathion), GSSG (oxidovaný glutathion), DHA (dehydroaskorbát).[47]

Jako antioxidační látky působí také fenolické látky. Řadíme sem deriváty fenolových kyselin, zejména kyseliny benzoové, např. kyselinu salicylovou, nebo deriváty kyseliny skořicové a třísloviny. Neméně důležitou skupinou těchto látek jsou flavonoidy, což jsou významné sekundární metabolity, červená a modrofialová barviva ovoce, např. anthokyany, flavanoly, flavony apod. Flavonoidy působí jako antioxidanty, v podstatě „čistí“ buňku od ROS a tím chrání lipidy před poškozením. [47]

1.4.1.5 Peroxidasy

Enzymy třídy oxidoreduktas katalyzující oxidaci substrátu za současné redukce peroxidu vodíku na vodu nazýváme peroxidasy. Dělí se do tří skupin: peroxidasy třídy I, jejichž hlavní funkcí je detoxifikace nadbytečného množství peroxidu vodíku. Tento typ se vyskytuje u všech organismů. Peroxidasy třídy II byly nalezeny u hub, podílí se na degradaci zbytků půdy. [49] Do třídy III řadíme peroxidasy rostlin, jejichž hlavní úlohou je redukce peroxidu vodíku, pomocí přenosu elektronu na molekulu donoru. Jako donory jsou často používány fenolické látky, ligniny a sekundární metabolity. [50] Peroxidasa (EC 1.11.1.7), někdy též guajakolperoxidasa, je jeden z antioxidačních enzymů, zabraňuje nadměrné akumulaci peroxidu vodíku při. Zvýšená aktivita guajakolperoxidasy byla zjištěna v rostlinách žensenu vystavených abiotickému stresu v podobě $CuSO_4$ [51]; a v rostlinách chryzantém, vystavených solnému stresu. [52]

1.4.1.6 Hsp70

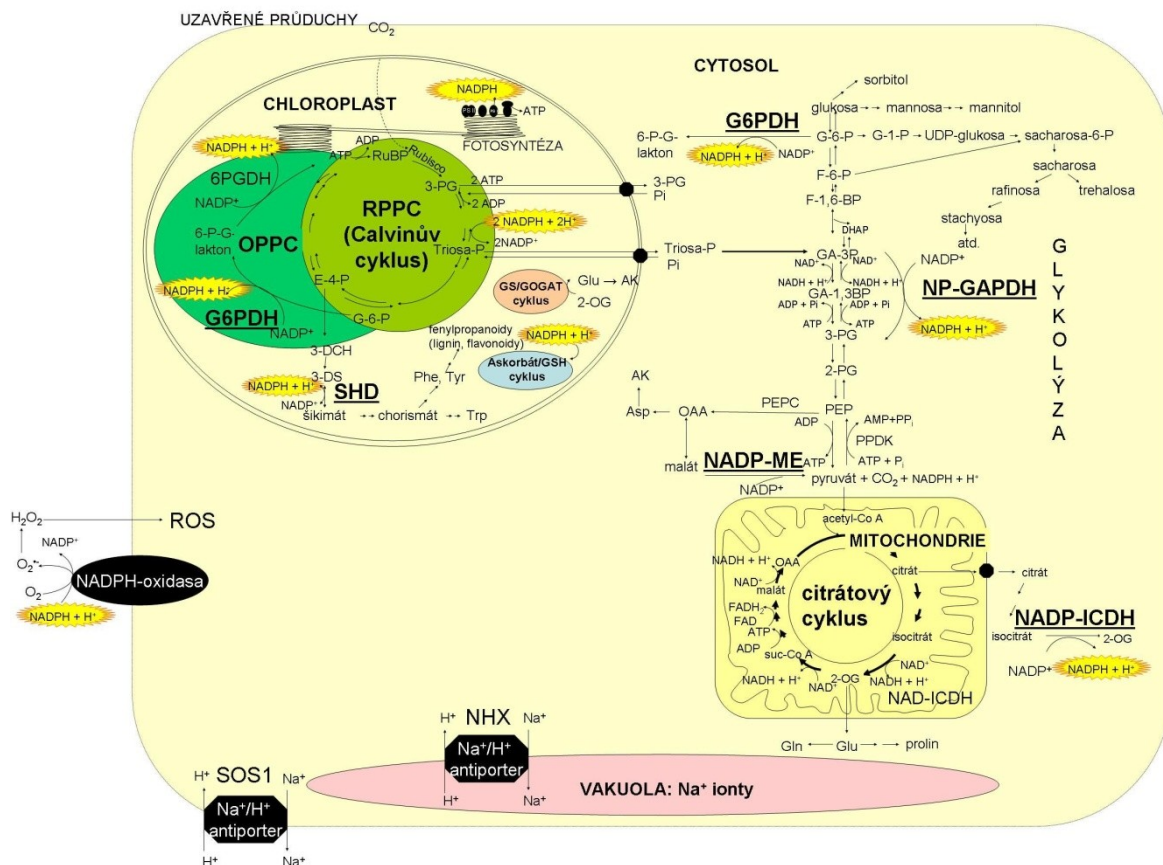
Solným stresem je také indukována zvýšená exprese proteinů teplotního šoku (Hsp z angl. Heat-shock protein), zejména Hsp70. Číslovka u zkratky označuje přibližnou

molekulovou hmotnost v kDa. Tyto proteiny byly původně identifikovány díky jejich zesílené expresi při vystavení organismu zvýšené teplotě. [53] Podílí se nejen na sbalování proteinů do správných prostorových konformací, ale i na jejich rozbalování a transportu přes membrány cílových organel.[54] Hsp70 chrání jednotlivé segmenty proteinů rostoucího nascentního polypeptidového řetězce během proteosyntézy. [28] Zatímco konstitutivně exprimované proteiny Hsp70 se většinou podílejí na správném sbalování proteinů syntetizovaných *de novo*, Hsp70 indukované abiotickými stresory se více podílejí na opětovném sbalení či degradaci proteinů, které již svou nativní konformaci ztratily. Hsps mohou cílové proteiny udržovat ve správné konformaci, a tím minimalizovat agregaci nenativních proteinů, popřípadě mohou denaturované a agregované proteiny směřovat k degradaci a odstranění z buňky. [53]

V genomu *A.thaliana* L. bylo nalezeno 18 genů pro protein Hsp70. [54] Hsp70 má i další úlohy v odpovědích rostliny na vystavení stresovým podmínkám. Působí při ochraně fotosystému II před fotoinhibicí, může stabilizovat klíčové enzymy, spolu s Hsp90 se podílí na signalizaci ABA a může ovlivňovat uzavírání průduchů. [51]

1.4.2 Metabolismus rostlinné buňky

Na obr. 5 jsou naznačeny metabolické dráhy, v nich zapojené enzymy studované v této práci a jejich kompartmentace v rostlinné buňce vystavené solnému stresu. Důležitou součástí jsou NADP-dependentní enzymy. V důsledku solného stresu je poškozena fotosyntéza a tím produkce NADPH, nedostatek tohoto koenzymu by mohl být kompenzován právě zvýšenou aktivitou NADP-dependentních enzymů. NADP-isocitrátdehydrogenasa, NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační), glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, šikimátdehydrogenasa a nefosforylační glyceraldehydfosfátdehydrogenasa patří mezi majoritně zastoupené enzymy, které byly studovány v této diplomové práci.



obr. 5 Ovlivnění metabolismu rostlinné buňky solným stresem. Enzymy sledované v této práci označeny podtržením, jejich kompartmentace a zapojení do metabolických drah. (OPPC (oxidativní pentosafosfátový cyklus); G6PDH (glukosa-6-fosfátdehydrogenasa); 6PGDH (6-fosfoglukonátdehydrogenasa); NADP-ME (NADP-dependentní malátdehydrigenasa (oxalacetát dekarboxylační); NADH-ICDH (NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasa); NP-GAPDH (nefosforylační glyceraldehdfosfátdehydrogenasa); Askorbát/GSH cyklus (askorbát-glutathionový cyklus), SHD (šikimátdehydrogenasa); PEPC (fosfoenolpyruvátdehydrogenasa); AK (aminokyseliny); acetyl-Co A (acetyl-koenzym A); Asp (kyselina L-asparagová); 3-DCH (3-dehydrochinát); 3-DS (3-dehydrošikimát); DHAP (dihydroxyacetonfosfát); E-4-P (D-erythrosa-4-fosfát); F-6-P (D-fruktosa-6-fosfát); F-1,6-BP (D-fruktosa-1,6-bisfosfát); GA-3P (D-glyceraldehyd-3-fosfát); GA-1,3BP (D-glyceraldehyd-1,3-bisfosfát); G-1-P (D-glukosa-1-fosfát); G-6-P (D-glukosa-6-fosfát); Glu (kyselina L-glutamová); Gln (L-glutamin); OAA (oxaloacetát); 2-OG (2-oxoglutarát); PEP (fosfoenolpyruvát); 2-PG (2-fosfoglycerát); 3-PG (3-fosfoglycerát); 6-P-G-lakton (6-fosfo-D-glukonolakton); Prolin (L-prolin); Phe (L-fenylalanin); Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa); RuBP (D-ribulosa-1,5-bisfosfát); sacharosa-6-P (sacharosa-6-fosfát); suc-Co A (sukcinyl-koenzym A); Triosa-P (triosafosfát); Trp (L-tryptofan); Tyr (L-tyrosin); ROS (reaktivní formy kyslíku); NHX (vakuolární Na^+/H^+ antiportér); SOS1 (Na^+/H^+ antiportér plasmatické membrány))

1.4.3 NADPH

Koenzym nikotinamidadeninukleotidfosfát hraje důležitou roli v mnoha metabolických drahách. Má dvě formy oxidovanou NADP^+ a redukovanou $\text{NADPH} + \text{H}^+$, při redukci dochází k vazbě vodíku na uhlík C-4 pyridinového kruhu, který tím ztrácí aromatickou povahu a kladný náboj. [56]

U rostlin biosyntéza pyridinových nukleotidů *de novo* vychází z aspartátového, prekurzoru. Působením enzymů aspartát oxidasa (EC 1.4.3.1) a chinolinátsynthetasa (EC 2.5.1.72) vzniká chinolinát, který je následně přeměňován na mononukleotid kyseliny nikotinové (NAMN) enzymem chinolináttransferasa (EC 2.4.2.19). NAMN je pak adenylován na nikotinadenin dinukleotid (NAAD) enzymem nikotinmononukleotidadenyltransferasa (NMNAT, EC 2.7.7.1). Následuje aminace pomocí enzymu NAD-synthasa (EC 6.3.1.5), při které vzniká NAD^+ , které může být následně NAD-kinasou (2.7.1.23) přeměněno na NADP^+ . [57] K produkci redukovaného koenzymu NADPH dochází pomocí řady reakcí v buňce, důležitým zdrojem je vedle fotosyntézy, pentosafosfátová cesta, konkrétně reakce katalyzované glukosa-6-fosfátdehydrogenasou a 6-fosfoglukonátdehydrogenasou. Neméně důležitá pro vznik NADPH je aktivita dalších NADP-dependentních enzymů. Jedná se především o NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasu a NADP-dependentní malátdehydrogenasu (oxalacetát dekarboxylační). [58]

NADPH je klíčový koenzym celé řady metabolických procesů a elektronových transportů. Redukovaná forma, NADPH, je využívána mnoha různými biosyntetickými procesy, jedná se o nezbytný redukční ekvivalent Calvinova cyklu a antioxidačních enzymů glutathionreduktasy a monodehydroaskorbátreduktasy a NADPH-dependentního thioredoxinového systému [59] Neméně důležité je NADPH pro udržování redoxní rovnováhy v rostlinné buňce. [57]

Nedávno bylo zjištěno, že se NADP^+ a NAD^+ podílí na regulaci buněčných procesů. Konkrétně se účastní signalizace zprostředkované Ca^{2+} a oprav DNA pomocí poly-ADP-ribosylace a deacetylace. [59]

Tento koenzym je při vystavení rostliny solnému stresu nezbytný. Jak již bylo uvedeno dříve, pro správnou funkci SOS signální kaskády jsou nezbytné ROS, jejichž produkce je indukována NADPH oxidasou. Aktivní formy kyslíku však musí být eliminovány, protože by mohly poškodit buňku, to je realizováno antioxidačními cykly, kde je NADPH koenzymem významných enzymů. [60] Nezbytný je také pro enzym šikimátdehydrogenasa, jenž je součástí šikimátové dráhy, která vede k syntéze důležitých antioxidačních látek, především flavonoidů. [61]

1.4.4 NADP-dependentní enzymy

Přeměna isocitrátu na 2-oxoglutarát je reakce katalyzovaná enzymem isocitrátdehydrogenasou (Isocitrát: NADP^+ oxidoreduktasa (dekarboxylační) EC 1.1.1.42,

dále NADP-ICDH). Buněčná lokalizace enzymu je široká, výskyt byl prokázán v mitochondriích, chloroplastech, peroxizomech a cytoplazmě. [62] Největší podíl na aktivitě má cytosolová isoforma, produkt reakce 2-oxoglutarát vstupuje v chloroplastu do glutaminsynthetasového/ glutamátsynthasového cyklu, který hraje důležitou roli při fixaci dusíku. Produktem reakce katalyzované NADP-ICDH je redukovaný koenzym NADPH, důležitý pro další metabolické dráhy. [63]

NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační) (L-malát:NADP⁺ oxidoreduktasa, EC 1.1.1.40, dále jen NADP-ME) je významný při fotosyntéze C₄ a CAM rostlin. V těchto rostlinách dochází k prefixaci CO₂ v mesofylových buňkách, vzniká C₄-dikarboxylová kyselina, která je transportována do buněk pochev cévních svazků. V chloroplastech těchto buněk dochází k dekarboxylaci a k poskytování CO₂ pro Calvinův cyklus přímo v místě jeho působení. Produkt této reakce, pyruvát, je transportován zpět do mesofylových buněk. V rostlinách typu CAM je NADP-ME lokalizována v cytosolu. Ve všech typech rostlin má NADP-ME také řadu nefotosyntetických funkcí. Enzym byl izolován z cytosolu i plastidů C₃ a C₄ rostlin a také z cytosolu CAM rostlin. [56] Jednou z nefotosyntetických funkcí je regulace buněčného pH; pokud je hodnota pH cytoplazmy příliš nízká, L-malát je prostřednictvím NADP-ME přeměněn na méně kyselý pyruvát, a tím je hodnota pH zvýšena. Další důležitou funkcí tohoto enzymu je poskytování NADPH pro antioxidační enzymy a různé biochemické dráhy. [64] NADP-ME se také může podílet spolu s NAD-dependentní malátdehydrogenasou (EC 1.1.1.37) a fosfoenolpyruvátkarboxylasou (PEPC, EC 4.1.1.31) na přeměně fosfoenolpyruvátu na pyruvát a NADP⁺ na NADPH v odbočce glykolýzy při nedostatku fosfátu. Produkt reakce, pyruvát, může být využíván biosyntetickými drahami. V neposlední řadě se enzym uplatňuje při zrání plodů a poskytování CO₂ pro fotosyntézu. [65]

Pentosafosfátová cesta je důležitá metabolická dráha, v rostlinách zpracovává 20-30 % sacharidů. [67] Rozlišujeme dvě fáze, oxidační a redukční (tzv. Calvinův cyklus). Úvodním krokem oxidační fáze pentosafosfátové cesty (OPPC) je přeměna glukosa-6-fosfátu na 6-fosfoglukono- γ -lakton, během které dochází k redukcí NADP⁺ na NADPH + H⁺. Tuto reakci katalyzuje enzym glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (D-glukosa-6-fosfát: NADP⁺ oxidoreduktasa, EC 1.1.1.49, dále jen G6PDH). Jedná se o silně exergonickou ireverzibilní reakci. Oxidační část pentosafosfátové cesty probíhá ve tmě v chloroplastech, poskytuje NADPH pro syntetické metabolické dráhy a antioxidační cykly. [66] Produktem OPPC je ribosa-5-fosfát, jenž vstupuje do Calvinova cyklu. Ten

probíhá stejně jako OPPC v chloroplastech, pokud by oba cykly probíhaly současně, by byl tento proces neefektivní. Proto je nutná regulace klíčových enzymů těchto cyklů tak, aby oxidační fáze probíhala za tmy a redukční fáze za světla. G6PDH klíčovým enzymem OPPC, je tedy aktivována ve tmě a naopak inhibována světlem, signalizace je zprostředkována fotosyntetickými elektronovými transportéry ferredoxinem a thioredoxinem. K inhibici dochází také vysokým poměrem NADPH/NADP⁺. [28] G6PDH je lokalizována v chloroplastech, cytosolu a sekundární buněčné stěně. [66]

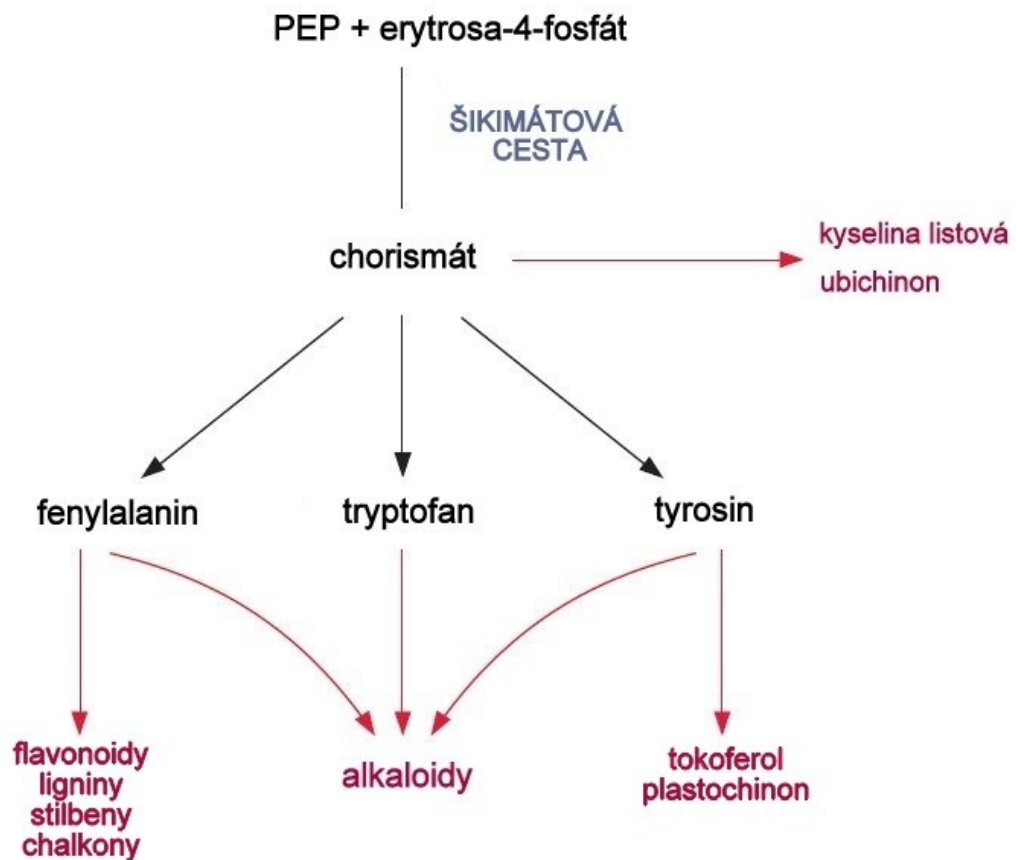
Nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (D-glyceraldehyd-3-fosfát:NADP⁺ oxidoreduktasa, EC 1.2.1.9, dále NP-GAPDH) katalyzuje ireversibilní přeměnu glyceraldehyd-3-fosfátu na 3-fosfoglycerát za současné redukce koenzymu NADP⁺. [67] Jedná se o nedílnou součást buněčného metabolismu, je například součástí člunkového systému, kde se podílí na transportu NADPH z chloroplastu do cytosolu. Důležitou roli hraje tento enzym při nedostatku fosfátu. Za normálních podmínek buňka spotřebuje k tvorbě 3-fosfoglycerátu z glyceraldehyd-3-fosfátu v glykolýze další fosfát. NP-GAPDH produkuje 3-fosfoglycerát přímo a buňka se tak může vyhnout spotřebě dalšího fosfátu a vytvoření jedné molekuly ATP. [69] Molekulová hmotnost byla stanovena například po izolaci z rostlin řepy (*Beta vulgaris* L.) na 190 000, aktivní forma se skládá ze čtyř podjednotek o molekulové hmotnosti 53 000. [70]

1.4.5 Šikimátdehydrogenasa

Šikimát:NADP⁺ 3-oxidoreduktasa (EC 1.1.1.25, dále SDH) je enzym, který řadíme mezi majoritně zastoupené, avšak za fyziologických podmínek katalyzuje reakci ve směru spotřeby NADPH. Reakce je součástí šikimátové cesty, která spojuje metabolismus sacharidů a biosyntézu aromátů. Jedná se o sled sedmi reakcí, do kterých vstupují erytrosa-4-fosfát a fosfoenolpyruvát, vzniká chorismát, tedy prekurzor pro syntézu aromatických aminokyselin, flavonoidů, ligninů, alkaloidů a některých hormonů např. auxinu. Tyto látky jsou velmi důležité pro život rostliny a některé z nich jsou významné nutriční látky.

Přítomnost SDH byla prokázána u bakterií, hub a rostlin, nikoliv však u živočichů. Enzym katalyzuje přeměnu 3-dehydrošikimátu na šikimát za spotřeby NADPH v rámci šikimátové cesty, jak již bylo uvedeno výše. [28] Dále bylo prokázáno, že při reakci SDH s 3-dehydrošikimátem může dojít k enolizaci a následnému vzniku kyseliny gallové. Tato reakce probíhá za spotřeby NADP⁺. Produkt reakce, kyselina gallová, je důležitý sekundární metabolit hub a rostlin. Je to sloučenina zodpovědná za snížení rizika výskytu

cévních onemocnění u osob, které pravidelně konzumují potraviny s vysokým obsahem kyseliny gallové, jako je červené víno, zelený čaj a ovoce. [70]



obr. 6 Šikimátová cesta a její produkty. Produktem šikimátové cesty je chorismát, jenž je prekurzorem vzniku aromatických aminokyselin, které mohou být dále využity jako prekurzory vzniku flavonoidů a alkaloidů.[28]

1.4.6 Souvislost se stresem

Byla provedena řada studií, zabývajících se vlivem solného stresu na aktivitu výše popsaných enzymů. Většina studií však popisuje vliv solného stresu na aktivitu jednotlivých enzymů. Přehled je uveden v tabulce (Tabulka 1). V důsledku solného stresu dochází k poškození metabolických drah, které vedou ke vzniku redukovaného koenzymu NADPH, jenž je důležitý pro řadu metabolických drah. Jedná se jednak o běžný metabolismus rostliny a jednak o antioxidační cykly, důležité ve stresu. V této diplomové práci jsem se zabývala otázkou, zda se rostlina snaží kompenzovat sníženou dostupnost a zároveň zvýšenou potřebu NADPH, pomocí zvýšení aktivity NADP-dependentních enzymů.

Tabulka 1 Přehled publikovaných experimentů o vlivu solného stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů.

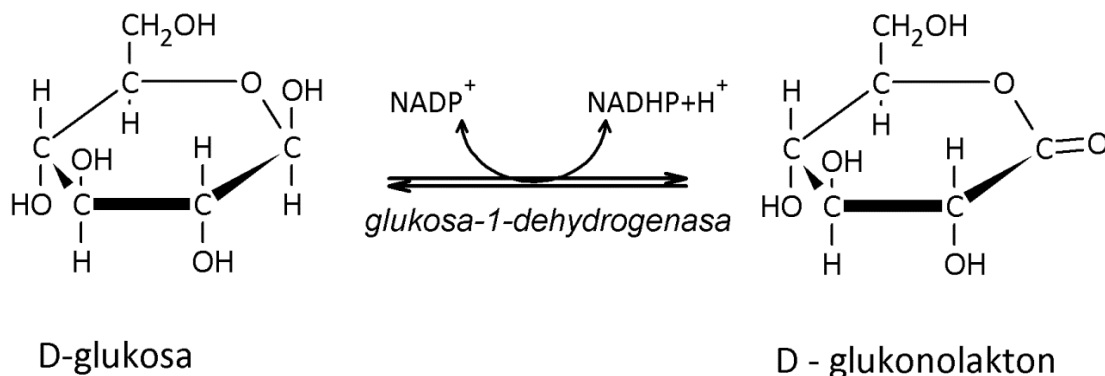
rostlina	koncentrace NaCl	doba stresu	ICDH	NADP-ME	G6PDH	SDH	NP-GAPDH	reference
<i>Aloe vera</i> L.	300 mM	140 h	ND	ND	zvýšená	ND	ND	[72]
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	100 mM	7 dní	zvýšená	zvýšená	zvýšená	ND	ND	[73]
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	150 mM	3 týdny	ND	ND	zvýšená	ND	ND	[74]
<i>Cicer arietinum</i> L.	25 mM	5 týdnů	zvýšená	ND	ND	ND	ND	[75]
<i>Echinacea angustifolia</i> L.	50 mM	15 týdnů	ND	ND	ND	zvýšená	ND	[76]
<i>Oleaceae olea</i> L.	200 mM	21 dní	zvýšená	zvýšená	zvýšená	ND	ND	[77]
<i>Oryza sativa</i> L.	100 mM	14 dní	ND	zvýšená	ND	ND	ND	[65]
<i>Oryza sativa</i> L.	150 mM	2 dny	ND	ND	zvýšená	ND	ND	[78]
<i>Oryza sativa</i> L.	80 mM 200 mM	6 dní	ND	ND	zvýšená	ND	ND	[80]
<i>Pennisetum clandestinum</i> L.	50-200 mM	15 dní	zvýšená	ND	snížena	ND	ND	[81]
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	100 mM	24 h	ND	ND	zvýšená	ND	ND	[82]
<i>Pisum sativum</i> L.	85,5 mM	35 dní	ND	ND	snížena	ND	ND	[83]
<i>Triticum aestivum</i> L.	200 mM	24 h	ND	zvýšená	ND	ND	ND	[84]
<i>Zea Mays</i> L.	500 mM	5 dni	ND	snížena	ND	ND	ND	[85]

1.4.7 Minoritní NADP-dependentní enzymy

V této práci byly rovněž studovány minoritně zastoupené NADP-dependentní enzymy, které mohou být zdrojem NADPH. Jednalo se o glukosa-1-dehydrogenasu (EC 1.1.1.119), glukonát-2-dehydrogenasu (EC 1.1.1.215), ribosa-1-dehydrogenasu (EC 1.1.1.115), galaktosa-1-dehydrogenasu (EC 1.1.1.120) a glycerol-2-dehydrogenasu (EC 1.1.1.156). Existuje jen malé množství studií jejich vlastností v rostlinných i živočišných buňkách. Doposud nebyl zkoumán vliv solného stresu na funkci těchto enzymů u rostlin. Avšak reakce katalyzované těmito enzymy produkují NADPH, proto by se mohly, stejně jako majoritní NADP-dependentní enzymy, podílet na kompenzaci snížené dostupnosti NADPH.

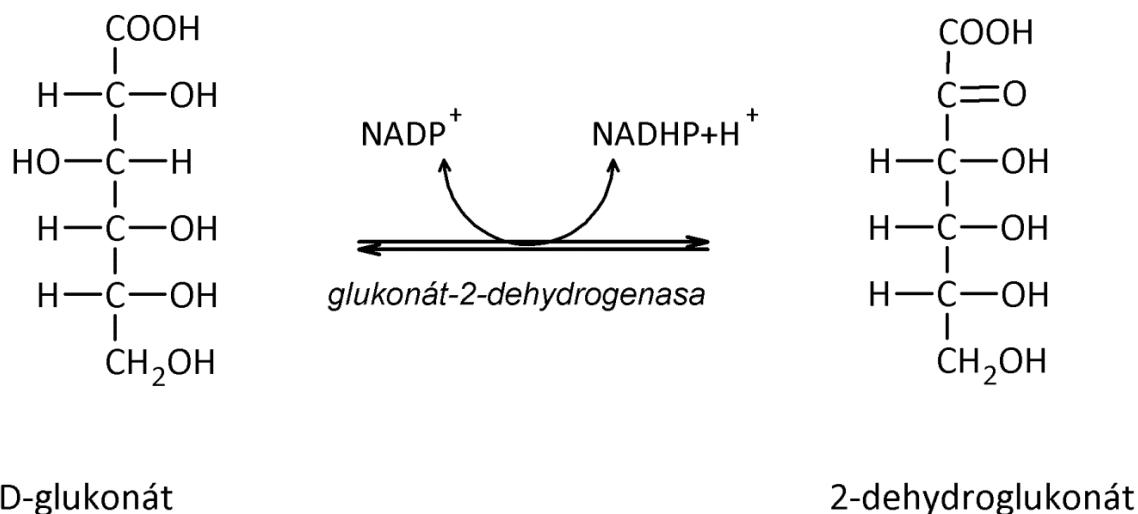
Enzym glukosa-1-dehydrogenasa katalyzuje přeměnu D-glukosy na D-glukorono-1,5-lakton (obr. 7). Při krystalizaci glukosa-1-dehydrogenasy z *Gluconobacter oxydans*

byla stanovena relativní molekulová hmotnost tohoto enzymu na 153 000, přičemž se vyskytuje ve formě tetrametru. Ve výše uvedené studii bylo též určeno, že k inhibici dochází v přítomnosti Cu^{2+} , Hg^{2+} a Ni^{2+} iontů. [86] Enzym byl také studován u bakterií *Gluconobacter cerinus*, v této studii bylo stanoveno pH optimum v intervalu 7,5-9. Rovněž byla studována substrátová specifita, bylo zjištěno, že k enzymové reakci dochází v přítomnosti D-glukosy, D-mannosy, 2-deoxy-D-glukosy a 2-amino-2-deoxy-D-manosy, k náhradě NADP^+ za NAD^+ však nedochází. [87]



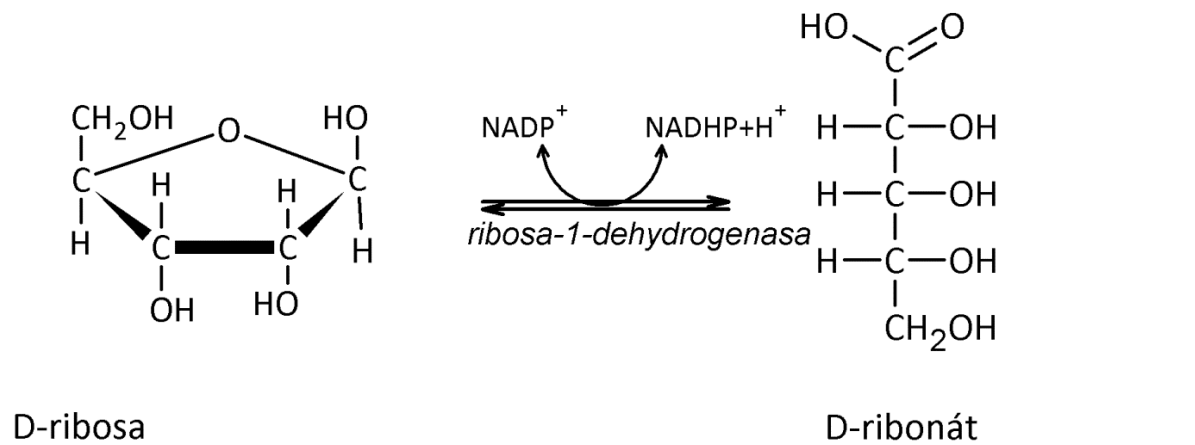
obr. 7 Reakce katalyzovaná enzymem glukosa-1-dehydrogenasa.

K přeměně D-glukonátu na 2-dehydroglukonát dochází za katalýzy enzymu glukonát-2-dehydrogenasa (obr. 8). Vlastnosti glukonát-2-dehydrogenasy byly zkoumány pouze u prokaryot. U bakterií rodu *Acetobacter* byl tento enzym lokalizován v cytoplasmě ve formě trimeru o molekulové hmotnosti 120 000. [90] Enzym nalezený v *E. coli* byl pak ve formě dimeru a relativní molekulová hmotnost byla stanovena na 74 000. [88] U bakterií rodu *Pseudomonas* byla glukonát-2-dehydrogenasa nalezena vázaná v cytoplazmatické membráně, jako součást metabolismu glukosy. [90]



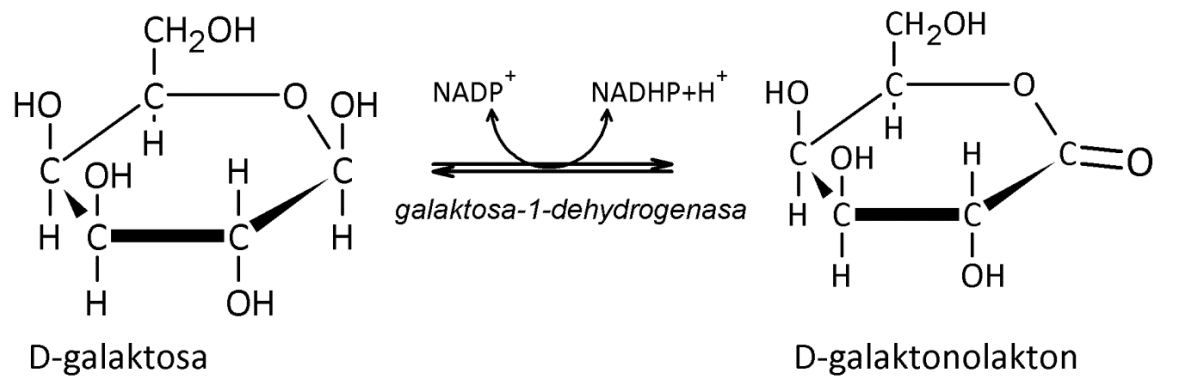
obr. 8 Reakce katalyzovaná enzymem glukonát-2-dehydrogenasa.

Ribosa-1-dehydrogenasa katalyzuje vznik D-ribonátu z D-ribosy (obr. 9. Byla izolována z jaterních buněk prasete divokého, bylo stanoveno pH optimum 9,7 a K_m pro D-ribosu 8 mM. Jako inhibitory působí $HgCl_2$ a p-chlormerkurbenzoát. [91]



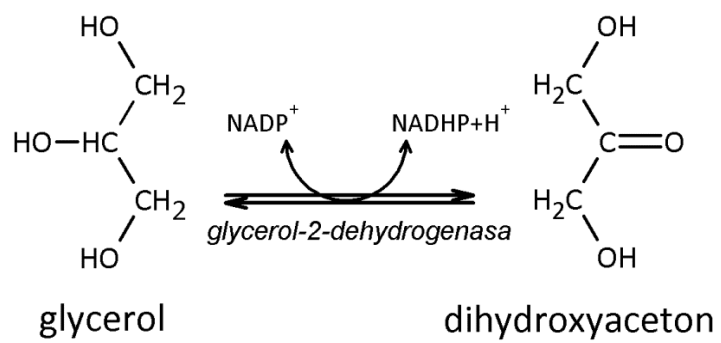
obr. 9 Reakce katalyzovaná enzymem ribosa-1-dehydrogenasa.

Galaktosa-1-dehydrogenasa je enzym, který katalyzuje vznik D-galaktolaktonu z D-galaktosy (obr. 10). Enzym byl izolován z bakterií rodu *Pseudomonas*, bylo stanoveno pH optimum 10,5. Reakce je součástí metabolismu galaktosy, její produkt, D-galaktolakton může být dále přeměněn enzymem 1,4-laktonasa na galakonolaktonát, který je sledem dalších reakcí přeměněn na glyceraldehyd-3-fosfát, který vstupuje do glykolýzy. [91]



obr. 10 Reakce katalyzovaná enzymem galaktosa-1-dehydrogenasa.

Glycerol-2-dehydrogenasa, někdy také dihydroxyacetonreduktasa byla studována u bakterií *Glukonobacter suboxydans*, kde byla nalezena jako součást transportu glycerolu přes cytoplazmatickou membránu. [92] U extrémně halofytních zelených řas *Dunaliella salina* byla studována v souvislosti s osmotickým stresem vyvolaným 0,5-5,0 M NaCl. [93]



obr. 11 Reakce katalyzovaná enzymem glycerol-2-dehydrogenasa.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda solný stres způsobí v rostlinách okurky *Cucumis sativa* L. obranné reakce v podobě zvýšené aktivity majoritně i méně zastoupených NADP-dependentních enzymů a v jaké míře ovlivní poměr redukované a oxidované formy koenzymu NADPH, syntézu fenolických látek a flavonoidů, množství proteinu Hsp70, relativní obsah vody a koncentraci sodných a draselných iontů listech a kořenech.

3 Metody

3.1 Použité chemikálie

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

Akrylamid, Sigma, USA

AlCl₃, Sigma, USA

Aldolasa z králičího svalu, Sigma, USA

Anti-HSP70 Polyklonální králičí protilátka zaměřená proti Hsp70, Thermo Scientific, USA

Anti-Rabbit IgG Polyklonální kozí protilátka připravená proti králičí protilátce konjugovaná s alkalickou fosfatase, Sigma, USA

BisTris, Sigma, USA

Bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/Nitroblue tetrazolium chlorid tablety, Sigma, USA

BSA, Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R, G, Sigma, USA

CsCl, Sigma, USA

Činidlo Bradfordové, Sigma, USA

D, L-Isocitrát trisodný, Sigma, USA

D-Fruktosa-1,6-bisfosfát, Sigma, USA

D-Galaktosa, Lachema, ČR

D-Glukonát, Sigma, USA

D-Glukosa, Sigma, USA

D-Glukosa-6-fosfát sodný, Sigma, USA

D-Ribosa, California Corp, USA

DTT, Sigma, USA

EDTA, Lachema, ČR

Fenazinmethosulfát, Sigma, USA

Folinovo-Ciocalteuovo činidlo, Penta, ČR

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa z *Leuconostoc mesenteroides*, Sigma, USA

Glycerol, Penta, ČR

Glycin, Sigma, USA

Guajakol, Sigma, USA

HClO₄, Sigma, USA

HNO₃, Lach:ner, ČR

Jodonitrotetrazolium chlorid, Sigma, USA

KH₂PO₄, Lachema, ČR
Kvercetin dihydrát - Riedel-de Haën, Německo
L-malát sodný, Sigma, USA
Methanol, Lach:ner, ČR
MgCl₂, Sigma, USA
Na⁺ (1,000±0,002 g/l), Analytika, ČR
Na₂CO₃, Lachema, ČR
NADP⁺, Sigma, USA
NADPH, Sigma, USA
NaN₃, Sigma, USA
Nitroblue tetrazolium chlorid, Sigma, USA
Ponceau Red S, Sigma, USA
PVP, Sigma, USA
Sacharosa, Lachema, ČR
SDS, Sigma, Německo
Šikimát sodný, Sigma, USA
TEMED, Serva, Německo
Tricin, Sigma, USA
Tris (hydroxymethyl) aminomethan, Sigma, USA
Tween, Sigma, USA
Ostatní chemikálie, Lachema, ČR

3.2 Přístroje

Spektrofotometr Helios α , Thermo Spectronic, USA
Centrifuga Hettich Universal 32R, Hettich, Německo
Analytické váhy XE Series 100A, Denver Instrument Company, USA
pH metr UB-10, Denver Instrument Company, USA
AAS spektrometr AAS 3, Zeiss Jena, Německo
Elektroforetická souprava, Biometra, Německo
Spektrofotometr Ultrospec 2 100, Amersham Pharmacia Biotech, Anglie
Souprava po přenos proteinů z gelu na membránu, Biometra, Německo
Vortex v-1 plus, Biosan, Lotyšsko

3.3 Pěstování experimentálních rostlin

Semena okurky seté (*Cucumis sativa* L. convar. *Jogger F1*) byla jeden až dva týdny klíčena v minipařeništi na buničité vatě, poté byly sazenice přesazeny nádob s půdou a umístěny ve skleníku katedry experimentální biologie rostlin, kde byly pěstovány po dobu 20-30 dní.

Následně byly některé rostliny velmi opatrně vyjmuty z půdy, jejich kořeny byly omyty destilovanou vodou a umístěny do kádinek o objemu 1 l naplněných roztokem NaCl nebo destilovanou vodou.

3.4 Příprava vzorků

3.4.1 Odebírání rostlinného materiálu

Z experimentálních rostlin bylo odstřiženo vždy několik vrchních listů, které byly zváženy a následně rozděleny pro různé extrakce tak, aby vzorky byly směsné. Dále byly zpracovávány kořeny. Rostliny byly vyjmuty z půdy nebo roztoku, kde byly umístěny po dobu experimentu, kořeny byly omyty destilovanou vodou a následně zpracovávány, jako rostlinný materiál.

Rostlinný materiál byl dále homogenizován v třecí misce pomocí tloučku, s extrakčním roztokem který se lišil v závislosti na stanovení. Byly použity 3 ml extrakčního roztoku na 1 g čerstvé hmoty rostlinného materiálu.

3.4.2 Příprava vzorků pro stanovení enzymové aktivity

Rostlinný materiál byl homogenizován s pufrem A, který byl připraven smísením 100 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM DTT, 1 mM EDTA a 5 mM MgCl₂, po homogenizaci byl přidán 0,02 g PVP na 1 ml roztoku. Homogenizovaná směs byla centrifugována při 4°C, po dobu 15 minut, při 16 600 x g následně byl odebrán supernatant, který byl označen jako rostlinný extrakt.

3.4.3 Příprava vzorků pro stanovení koncentrace Na⁺ iontů

Pro stanovení koncentrace Na⁺ iontů byl rostlinný materiál homogenizován v trojnásobném množství destilované vody. Homogenizovaná směs byla centrifugována při 4°C, po dobu 15 minut, při 16 600 x g následně byl odebrán supernatant, který byl označen jako rostlinný extrakt.

3.4.4 Příprava vzorků pro stanovení koncentrace NADP⁺

Pro stanovení koncentrace NADP⁺ je nutné rostlinný materiál homogenizovat v prostředí HClO₄, inaktivovat tak enzymy a tím zabránit průběhu nežádoucích enzymových reakcí, spotřebovávajících NADP⁺. Kyselé prostředí zvyšuje stabilitu oxidované formy tohoto koenzymu. Rostlinný materiál byl homogenizován v trojnásobném množství 1 M HClO₄, na 1 ml extraktu bylo přidáno 0,02 g PVP. Následovala centrifugace při 4°C, po dobu 15 minut, při 16 600 x g. Odebraný supernatant byl neutralizován 5 M K₂CO₃, indikace pH byla provedena pomocí lakmusového papírku. Po přidavku 0,02 g PVP na 1 ml extraktu, byla provedena další centrifugace za stejných podmínek jako první a odebraný supernatant byl uchováván při -20°C.

3.4.5 Příprava vzorků pro stanovení NADPH

Extrakty pro stanovení NADPH byly připraveny homogenizací v přítomnosti NaOH. Stejně jako pro stanovení NADP⁺ je nejprve nutné provést inaktivaci enzymové aktivity, která byla způsobovala spotřebu NADPH. Zásadité prostředí bylo použito, protože NADPH je stabilní při vysokých hodnotách pH. Byla provedena homogenizace rostlinného materiálu v trojnásobném množství 1 M NaOH, homogenizovaná směs pak byla inkubována po dobu 3 minut při teplotě 100°C, po ochlazení bylo přidáno 0,02 g PVP na 1 ml extraktu a směs byla centrifugována při 4°C, po dobu 15 minut, při 16 600 x g. Byl odebrán supernatant, který byl neutralizován 0,1 M HCl, pH bylo indikováno pomocí lakmusového papírku. K neutrálním směsím bylo přidáno 0,02 g PVP na 1 ml extraktu a byla provedena centrifugace po dobu 15 minut, při 4°C a 16 600 x g. Odebraný supernatant byl uchováván při -20°C.

3.4.6 Příprava vzorků pro stanovení fenolických látek a flavonoidů

Pro stanovení koncentrace fenolických látek a flavonoidů byly vzorky získávány tzv. extrakcí horkou vodou. Rostlinný materiál o hmotnosti 0,5 g byl homogenizován s 10 ml destilované vody, směs byla kvantitativně převedena do Erlenmayerovy baňky a udržována při teplotě 80°C po dobu 20 minut. Po vychladnutí byla provedena centrifugace při 4°C a 9 400 x g po dobu 10 minut. Odebraný supernatant byl filtrován přes jednorázový stříkačkový filtr Schleier&Schuell o velikosti pórů 0,2 µm.

3.5 Stanovení aktivity enzymů

Aktivita NADP-dependentních enzymů byla stanovována spektrofotometricky. Toto stanovení je založeno na rozdílných absorpčních spektrech oxidované a redukované

formy koenzymu NADPH, rozdíl v absorpci je největší při vlnové délce $\lambda=340$ nm. Proto byla měřena změna absorbance při 340 nm, která byla dále přepočtena na aktivitu podle Rovnice 1.

$$a = \frac{\Delta A \cdot V_t \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l \cdot t \cdot V_e}$$

Rovnice 1 kde

a = aktivita v $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$

A = absorbance

V_t = celkový objem reakční směsi v l

ε = molární absorpční koeficient ($\varepsilon=6200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l = délka kyvety v cm

t = doba, po kterou měření probíhalo v min

V_e = objem rostlinného extraktu v l

Takto vypočtená aktivita pak byla vztažena na čerstvou hmotnost podle Rovnice 2

$$a_{FW} = a \cdot \frac{V}{m}$$

Rovnice 2 kde

a_{FW} = aktivita vztažená na čerstvou hmotnost

V = objem extrakčního pufru v ml

m = hmotnost rostlinného materiálu v g

3.5.1 NADP-isocitrátdehydrogenasa

Reakční směs o objemu 1 ml obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr s pH = 7,4; 0,2 mM NADP⁺; 2mM L-isocitrát a 2 mM MgCl₂. Reakce byla iniciována přidáním 50 μ l rostlinného extraktu.

3.5.2 NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)

Aktivita NADP-ME byla stanovována v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr s pH = 7,4; 0,2 mM NADP⁺; 10 mM L – malát a 2 mM MgCl₂. Nakonec bylo přidáno 50 μ l rostlinného extraktu, čímž byla reakce iniciována.

3.5.3 Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Reakční směs pro stanovení G6PDH měla objem 1 ml a obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr s pH = 7,6; 0,2 mM NADP⁺; 10 mM D-glukosa-6-fosfát a 2 mM MgCl₂. Reakce byla zahájena přidáním 50 µl rostlinného extraktu.

3.5.4 Šikimátdehydrogenasa

Stanovení aktivity SDH probíhalo v 1 ml reakční směsi o složení: 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol - NaOH pufr s pH = 9,0; 10 mM šikimát; a 0,2 mM NADP⁺. Zahájení reakce bylo provedeno přidáním 50 µl rostlinného extraktu.

3.5.5 Nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa

Aktivita NP-GAPDH byla stanovena v 1 ml reakční směsi, nejprve proběhla spřažená reakce: 100 mM Tris HCl pufr s pH=7,4; 10 mM fruktosa-1,6-bisfosfát; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP⁺ a 1U aldolasy bylo inkubováno 1 hodinu při 30°C, následně byla iniciována reakce přidáním 100 µl rostlinného extraktu.

3.5.6 Minoritní NADP-dependentní enzymy

Mezi minoritně zastoupené NADP-dependentní enzymy řadíme glukosa-1-dehydrogenasa, glukonát-2-dehydrogenasa, ribosa-1-dehydrogenasa, galaktosa-1-dehydrogenasa a glycerol-2-dehydrogenasa. Jejich aktivita byla stanovována v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris HCl pufr s pH=7,4; 0,2 mM NADP⁺ a substrát pro daný enzym o koncentraci 10mM. Jako substráty byly použity: D-glukosa, D-glukonát, D-ribosa, D-galaktosa nebo glycerol. Reakce byla iniciována přidáním 100 µl rostlinného extraktu.

3.5.7 Stanovení aktivity peroxidasy

Aktivita peroxidasy byla stanovena v 1,5 ml reakční směsi, která obsahovala 16mM fosfát-citrátový pufr s pH=4,6, 13,3 mM guajakol a 9,75 mM H₂O₂. Reakční směs byla inkubována 15 minut při 25°C a poté byla iniciována reakce přidáním 250 µl rostlinného extraktu. Byla měřena změna absorbance při 420 nm po dobu 3 minut. Aktivita pak byla vynesena jako $\Delta A_{420}/\text{min}$. [94]

3.6 Analytické metody

3.6.1 Stanovení relativního obsahu vody

Pro stanovení relativního obsahu vody (RWC, relative water content) byl vždy odebrán nejvrchnější list, ze kterého byly vykrojeny 4 řezy o obsahu 1,5 cm². Řezy byly

ihned po odebrání zváženy na analytických vahách, hodnota byla zaznamenána jako čerstvá hmotnost (FW, fresh weight). Následně byly části listů přeneseny do Eppendorfovy zkumavky s chladnou destilovanou vodou a ponechány 4 hodiny na ledu. Poté byly řezy vyjmuty a zváženy, tato hmotnost byla zaznamenána jako hmotnost po nasycení listu destilovanou vodou (TW, turgid weight). Listy nasycené destilovanou vodou byly následně přeneseny do Eppendorfových zkumavek a umístěny do termostatovaného bločku se suchou lázní, kde byly sušeny při 70°C po dobu 48 hodin. Vyschlé řezy listů byly zváženy a tato hodnota byla zaznamenána jako hmotnost sušiny (DW, dry weight). Nakonec byl podle Rovnice 3 vypočítán relativní obsah vody. [95]

$$RWC = \frac{FW-DW}{TW-DW} \cdot 100$$

Rovnice 3 kde

RWC = relativní obsah vody v g

FW = čerstvá hmotnost v g

TW = hmotnost listu po nasycení destilovanou vodou v g

DW = hmotnost sušiny v g

3.6.2 Stanovení koncentrace Na^+ a K^+ iontů

Koncentrace sodných a draselných iontů byly stanoveny pomocí atomové emisní spektrometrie (AES) s využitím spektrometru AAS 3 (Zeiss Jena, Německo). Touto analytickou metodou je možné stanovit koncentraci některých prvků ve vzorku i ve velmi nízkých koncentracích. Metoda je založená na atomizaci vzorku a excitaci atomů sodíku a draslíku plamenem. Při následné deexcitaci těchto atomů dochází k vyzáření kvanta energie prostřednictvím elektromagnetického záření určité vlnové délky charakteristické pro příslušný prvek. Měřena byla intenzita emitovaného záření při 589,0 nm (šířka spektrálního intervalu 0,1 nm) pro stanovení sodíku a při 766,5 nm pro stanovení draslíku. Tato intenzita byla v rozsahu 0 – 2,5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ lineární funkcí koncentrace obou prvků.

Koncentrace obou prvků ve vzorcích (extraktech) byla vyhodnocována z lineární části kalibračních závislostí. Ke kalibračním roztokům i k roztokům vzorků byl pro potlačení nežádoucí ionizace přidáván chlorid cesný (CsCl) o výsledné koncentraci cesných iontů 1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Ze získaných hodnot intenzit emitovaného záření vypočítána koncentrace Na^+ a K^+ iontů ve vzorku v g/l a mol/l.

3.6.3 Stanovení koncentrace fenolických látek

Koncentrace fenolických látek byla stanovena pomocí Folinova činidla. V alkalickém prostředí probíhá oxidace fenolických látek, současně dochází ke změně žlutého zbarvení fosfowolframové heteropolykyseliny na modře zbarvený komplex. Stanovení proběhlo ve 2 ml reakční směsi, která obsahovala 200 μ l rostlinného extraktu (pro stanovení koncentrace fenolických látek a flavonoidů) nebo fenolu o známé koncentraci, 5 % (v/v) Folinovo činidlo a 3 % (v/v) Na_2CO_3 . Reakční směs byla inkubována po dobu 30 minut při laboratorní teplotě a následně byla změřena absorbance při 760 nm proti slepému vzorku, který namísto vzorku obsahoval destilovanou vodu. [96] Hodnoty koncentrace fenolických látek byly následně vypočteny z kalibrační křivky, která byla sestrojena pro fenol o koncentraci 0,17-2,75 mM.

3.6.4 Stanovení koncentrace flavonoidů

Koncentrace flavonoidů byla v rostlinných extraktech stanovena kolorimetricky. Nejprve bylo ke 250 μ l extraktu (pro stanovení koncentrace fenolických látek a flavonoidů) přidáno 1,25 ml destilované vody a 75 μ l 5% (w/v) KNO_2 , roztok byl inkubován po dobu 6 minut, následně bylo přidáno 150 μ l 10% (w/v) AlCl_3 , po 5-ti minutách inkubace bylo přidáno 0,5 ml 1 M NaOH a 275 μ l destilované vody. Poté byla měřena absorbance reakční směsi při 510 nm oproti slepému pokusu obsahujícímu namísto extraktu destilovanou vodu. [97] Kalibrace byla provedena pomocí roztoku kvercetinu o koncentraci 0-2,96 mM.

3.6.5 Stanovení antioxidačních schopností metodou FRAP

Antioxidační schopnost respektive redukční potenciál antioxidantu se metodou FRAP (z angl. ferric reducing antioxidant power) stanovuje pomocí schopnosti antioxidantu redukovat Fe^{3+} . Redukce Fe^{3+} na Fe^{2+} při nízkém pH způsobí vznik barevného (modro-fialového) Fe^{2+} -tripyridyltriazinového komplexu, který má absorpční maximum při 593 nm.

Nejprve bylo smísením 10 ml 300 mM acetátového pufru, pH 3,6; 1ml 10 mM TPTZ v 40 mM HCl a 1 ml 20 mM FeCl_3 připraveno FRAP činidlo. K 600 μ l FRAP činidla bylo přidáno 20 μ l extraktu nebo standardu (kyselina askorbová) a po dobu 4 minut byla sledována změna absorbance při 593 nm. [98] Kalibrační přímka byla sestrojena pro 0-0.1 mM kyselinu askorbovou.

3.6.6 Stanovení koncentrace rozpustných bílkovin podle Bradfordové

Činidlo Bradfordové obsahuje barvivo Coomassie Brilliant Blue (CBB), methanol a kyselinu fosforečnou. Barvivo obsažené v činidle reaguje s aminokyselinami, převážně s argininem, v prostředí kyseliny fosforečné za vzniku barevného komplexu, který lze následně stanovit kolorimetricky. Byla sestrojena kalibrační křivka pro hovězí sérový albumin (BSA) o koncentracích 0-1,4 mg/ml. Rostlinné extrakty byly ředěny destilovanou vodou, k 10 µl extraktu bylo přidáno 23,3 µl destilované vody, k 33,3 µl rostlinného extraktu nebo roztoku BSA bylo přidáno 1 ml činidla Bradfordové, směs byla inkubována po dobu 20-ti minut a následně byla měřena absorbance při 595 nm. [99]

3.6.7 Stanovení koncentrace NADP⁺

Množství NADP⁺ bylo stanovováno v extraktech inaktivovaných 1 M HClO₄. Ke stanovení byla použita komerční glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, NADP⁺ v extraktech bylo přeměněno na NADPH, ke směsi bylo pak přidáno barvivo, které se vzniklým NADPH vytvořilo červený komplex, jehož množství bylo stanoveno spektrofotometricky.

Reakční směs o objemu 1 ml obsahovala 100 mM Tris HCl pufr s pH = 7,4, 5 mM glukosa-6-fosfát, 2 mM MgCl₂ a 1 U G6PDH. Reakce probíhala 30 minut při laboratorní teplotě, následně bylo přidáno 200 µl barviva obsahující 5 mg/ml jodonitrotetrazoliové violeti a 5 µg/ml fenazinmethosulfátu. Byla měřena absorbance proti slepému vzorku neobsahujícím komerční enzym při 500 nm.

Stejným způsobem byla měřena kalibrační závislost, pro koncentrace NADPH 0,01 – 0,07 mM, roztoky byly připraveny smísením 250 mM Tris-HCl pufru pH = 7,4 s NADPH o příslušné koncentraci a 200 µl detekčního barviva.

3.6.8 Stanovení koncentrace NADPH

Koncentrace NADPH byla stanovována v rostlinných extraktech inaktivovaných NaOH. K 0,5 ml extraktu bylo přidáno 100 µl barviva, obsahujícího 5 mg/ml jodonitrotetrazoliové violeti a 5 µg/ml fenazinmethosulfátu. U takto připravených vzorků byla měřena absorbance při 500 nm proti slepému vzorku, který obsahoval místo extraktu 0,5 ml destilované vody.

3.7 Elektroforetické metody

3.7.1 Elektroforetická separace v nativním prostředí

Byl připraven 6% separační polyakrylamidový gel s glycerolem, který obsahoval 3 ml 30% akrylamidu/Bis; 1,9 ml 1,5 mM Tris-HCl pufru pH 8,8; 0,003 ml TEMED; 0,075 ml 10% glycerolu; 2,45 ml destilované vody a 0,075 ml 10% peroxidisíanu amonného

Následně byl připraven 3% zaostřovací polyakrylamidový gel s glycerolem, který obsahoval 1,5 ml 30% akrylamidu/Bis, 1,9 ml 1,5 mM Tris-HCl pufru pH 8,8; 0,006 ml TEMED; 0,075 ml 10% glycerolu; 3,95 ml destilované vody a 0,075 ml 10% peroxidisíanu amonného.

Elektrodový pufr obsahoval 18,8 g/l glycinu, 3 g/l Tris a 0,1% glycerol. Rostlinné extrakty byly smíchány se sacharosou (20 %) a nanесeny do jamek v zaostřovacím gelu, při průchodu čela zaostřovacím gelem bylo napětí nastaveno na 70 V, po dosažení separačního gelu bylo zvýšeno na 140 V.

3.7.2 Červená nativní elektroforéza

Byl připraven 10% separační polyakrylamidový gel, který obsahoval 10% akrylamid/bis-akrylamid, 12,5 mM BisTris, 0,012% Ponceau R, 0,05% peroxosíran amonný a TEMED. Zaostřovací gel obsahoval 3% akrylamid, 4,2 mM BisTris, 0,004% Ponceau, 0,05% peroxosíran amonný a TEMED.

Elektrodový pufr obsahoval 50 mM Tricin, 15 mM BisTris a 0,012% Ponceau. Rostlinné extrakty byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 1:1. Vzorkový pufr obsahoval: 15% glycerol, 50 mM BisTris/HCl pufr a 0,02% Ponceau R. [100]

3.7.2.1 Detekce aktivity NADP-ICDH po nativní elektroforéze

Po skončení separace byl gel umístěn do Petriho misky s 10 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr s pH = 7,4; 0,2 mM NADP⁺; 2mM L-isocitrát; 2 mM MgCl₂; 0,1 mg/ml nitrobluetetrazolium a 5 μg/ml fenazinmethosulfát.

3.7.2.2 Detekce aktivity NADP-ME po nativní elektroforéze

Po ukončení separace byl gel přemístěn do 10 ml reakční směsi v Petriho misce. Směs obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr s pH = 7,4; 0,2 mM NADP⁺; 10 mM L – malát; 2 mM MgCl₂; 0,1 mg/ml nitrobluetetrazolium a 5 μg/ml fenazinmethosulfát.

3.7.2.3 Detekce aktivity G6PDH po nativní elektroforéze

Po skončení separace byl gel vložen do Petriho misky s 10 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr s pH = 7,6; 0,2 mM NADP⁺; 10 mM D-glukosa-6-fosfát; 2 mM MgCl₂; 0,1 mg/ml nitrobluetetrazolium a 5 µg/ml fenazinmethosulfát.

3.7.2.4 Detekce aktivity SHD po nativní elektroforéze

Po dokončení separace byl gel umístěn do Petriho misky s 10 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol - NaOH pufr s pH = 9,0; 0,2 mM NADP⁺; 10 mM šikimát 0,1 mg/ml nitrobluetetrazolium a 5 µg/ml fenazinmethosulfát.

3.7.3 Elektroforetická separace v prostředí SDS

Byla prováděna elektroforetická separace v prostředí SDS podle Laemmliho. Rostlinné extrakty byly smíchány se vzorkovým pufrům v poměru 1:1. Vzorkový pufr obsahoval 0,13 M Tris HCl pufr s pH=6,8; 0,005% bromfenolovou modř, 70 mM SDS, 100 mM DTT a 20% glycerol. [101]

Byl připraven 6% zaostřovací a 10% separační akrylamidový gel. Vzorky smíchané se vzorkovým pufrům byly před nanesením povařeny po dobu 5ti minut. Následně bylo do každé jamky Hamiltonovou stříkačkou naneseno 25 µl vzorku.

Elektrodový pufr obsahoval 1 g/l SDS, 3 g/l Tris a 18,8 g/l glycinu. Napětí před dosažením separačního gelu bylo 70 V, po dosažení bylo zvýšeno na 140 V.

3.7.3.1 Detekce proteinů v gelu

Po ukončení separace byl gel umístěn do barvicího roztoku Coomassie Brilliant Blue, který obsahoval 2 g/l Coomassie Brilliant Blue R250, 0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue G, 42,5% ethanol, 5% methanol a 10% kyselinu octovou, ve kterém byl ponechán přes noc. Druhý den byl pak gel přesunut do odbarvovacího roztoku, který obsahoval 10% kyselinu octovou a 25% ethanol.

3.8 Imunochemická detekce Hsp70 na nitrocelulosové membráně

Postupem uvedeným výše byla provedena elektroforetická separace v prostředí SDS. Po skončení separace byl gel umístěn do soupravy pro přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu umístěnou na 5 vrstvách filtračního papíru, které byly smočené v transferovém pufru. Transferový pufr obsahoval 25 mM Tris, 150 mM glycin a 10% metanol. Na gel bylo přiloženo dalších 5 vrstev filtračního papíru smočeného

v transferovém pufru. Aparatura byla uzavřena, byl použit elektrický proud I vypočtený podle Rovnice 4.

$$I = S[\text{cm}^2] \cdot 5\text{mA}$$

Rovnice 4 kde

I = elektrický proud v mA

S = obsah membrány v cm^2

Proteiny byly pomocí elektrického proudu přenášeny po dobu 30 minut. Poté byla membrána přenesena do 1% (w/v) roztoku BSA (0,1 g BSA v 10 ml PBS), kde byla po dobu 1 hodiny blokována. Roztok PBS obsahoval 0,14 M NaCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 15 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl a 3 mM NaN_3 . Následně byla membrána 3x po 5-ti minutách promyta roztokem PBS+T, který byl připraven přidáním detergentu Tween do PBS pufru tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,05% (v/v) Byl připraven roztok protilátky anti-HSP o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ konjugačního pufru, ve kterém byla membrána inkubována přes noc v lednici. Konjugační pufr byl připraven rozpuštěním 5 g PVP a 0,5 g BSA ve 250 ml PBS pufru. Druhý den byla membrána opět třikrát po 5 minutách promyta PBS+T, a inkubována 3 hodiny při 37°C v roztoku sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatou (ředěném v poměru 1 : 30 000 s konjugačním pufrem). Následovalo další promytí PBS+T (třikrát po 5 minutách) a dále pak inkubace v roztoku připraveném rozpuštěním tablety BCIP/NBT v 10 ml destilované vody.

4 Výsledky

4.1 Přehled provedených experimentů

V této práci byly rostliny okurky seté vystavovány solnému stresu. Bylo provedeno 8 experimentů, během kterých byly sledovány vybrané biochemické parametry. Pro každé stanovení byly porovnávány hodnoty zjištěné pro tři skupiny rostlin. První skupinou byly stresované rostliny, které byly vyjmuty z půdy a po omytí kořenů ponořeny do kádinky o objemu 1l, obsahující 100 mM (případně 70 mM) roztok NaCl. Druhou skupinu tvořily rostliny, které byly po vyjmutí z půdy a omytí kořenů umístěny v 1l kádince s destilovanou vodou, označeny byly jako 0 mM. Nádoby byly obaleny filtračním papírem, aby nedošlo k osvětlení kořenů. Rostliny ve třetí skupině byly ponechány v půdě a označeny byly jako kontrolní. Ve 100 mM NaCl rostliny okurky přečkaly 4 dny a poté uhynuly, v 70 mM roztoku pak přečkaly 7 dní.

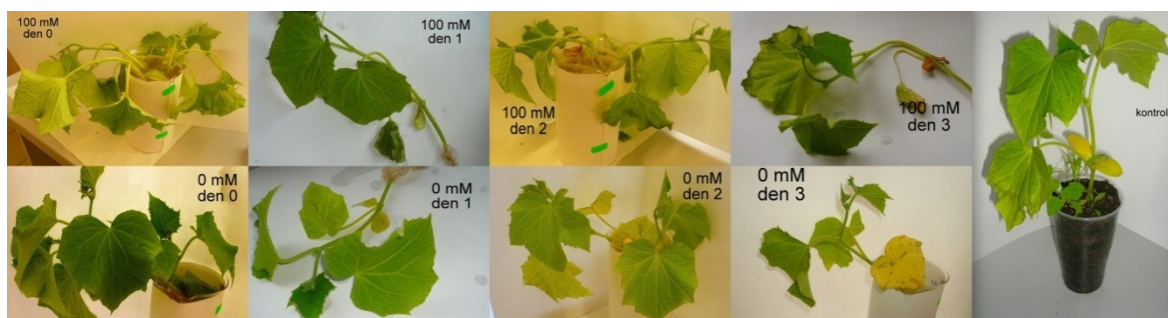
Tabulka 2 Přehled provedených experimentů

experiment	koncentrace NaCl	kontrola	stáří sazenic	počet rostlin v jedné skupině
1	100 mM	dH ₂ O	15 dní	6
2	100 mM	dH ₂ O	18 dní	5
3	100 mM	dH ₂ O	34 dní	5
4	70 mM	dH ₂ O,půda	37 dní	7
5	100 mM	dH ₂ O,půda	35 dní	5
6	100 mM	dH ₂ O,půda	35 dní	5
7	100 mM	dH ₂ O,půda	42 dní	5
8	100 mM	dH ₂ O,půda	40 dní	5

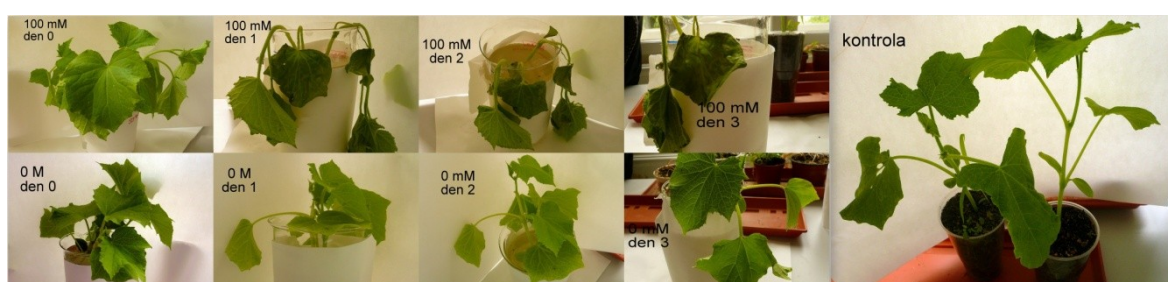
Během experimentů 1-5 byly vybírány podmínky, ve kterých byly rostliny uchovávány během experimentu, byla optimalizována stanovení a intervaly mezi jednotlivými odběry. Dále jsou uvedeny výsledky experimentů 6, 7 a 8.

Rostliny byly rozděleny do tří skupin, 2 hodiny po začátku vystavení stresu byly odebrány vzorky, ze kterých byly připraveny rostlinné extrakty, tento odběr byl označen jako odběr ze dne 0. Každý další den byly vzorky odebírány ve stejnou denní dobu. Pro stanovení aktivity enzymů, koncentrace sodných a draselných iontů, koncentraci NADP⁺ a koncentrace ve vodě rozpustných proteinů byly odebírány vzorky kořenů i listů. Relativní obsah vody, množství Rubisco, koncentrace fenolických látek, flavonoidů a antioxidační schopnosti byly odebírány pouze vzorky listů.

Průběh působení solného stresu na experimentální rostliny byl fotograficky dokumentován (obr. 12, obr. 13).



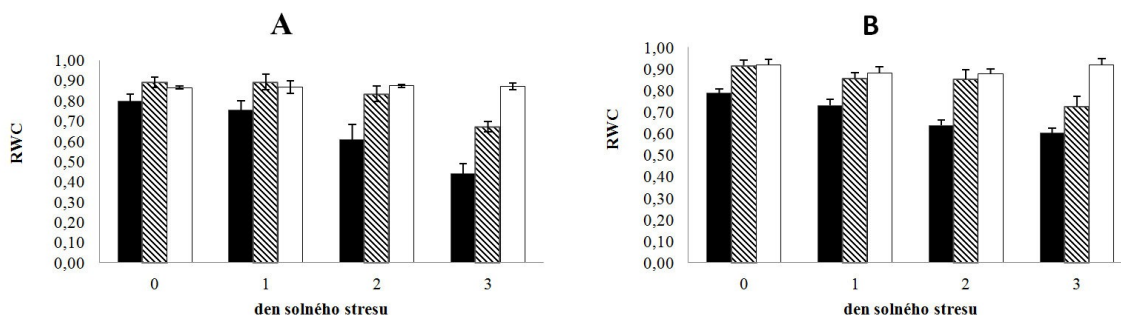
obr. 12 Průběh solného stresu v pokusu 6. (100 mM - stresované rostliny, 0 mM – rostliny v destilované vodě a kontrolní rostliny)



obr. 13 Průběh solného stresu v pokusu 7. (100 mM - stresované rostliny, 0 mM – rostliny v destilované vodě a kontrolní rostliny)

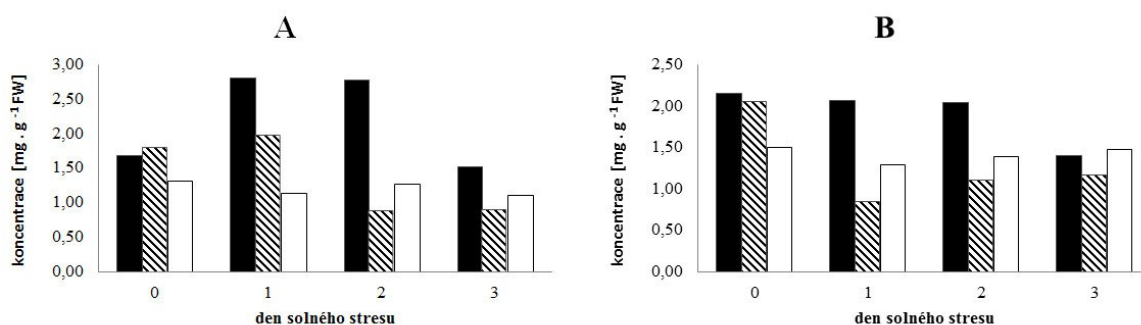
4.2 Vliv solného stresu na relativní obsah vody a množství rozpustných proteinů

V důsledku solného stresu dochází u rostlin k ovlivnění schopnosti přijímat vodu. Ve všech čtyřech dnech, po které byly rostliny vystaveny působení solného stresu, byl stanovován relativní obsah vody v listech. Porovnání hodnot RWC pro každý den stresu a pro všechny 3 skupiny experimentálních rostlin zobrazuje obr. 14. Z dat získaných v experimentech 6 a 7 je zřejmé, že u kontrolních rostlin se relativní obsah vody v lisech neměnil, u rostlin v destilované vodě došlo k mírnému poklesu a u rostlin vystavených působení solného stresu relativní obsah vody výrazně klesal, poslední den došlo k 50% poklesu oproti kontrolním rostlinám.



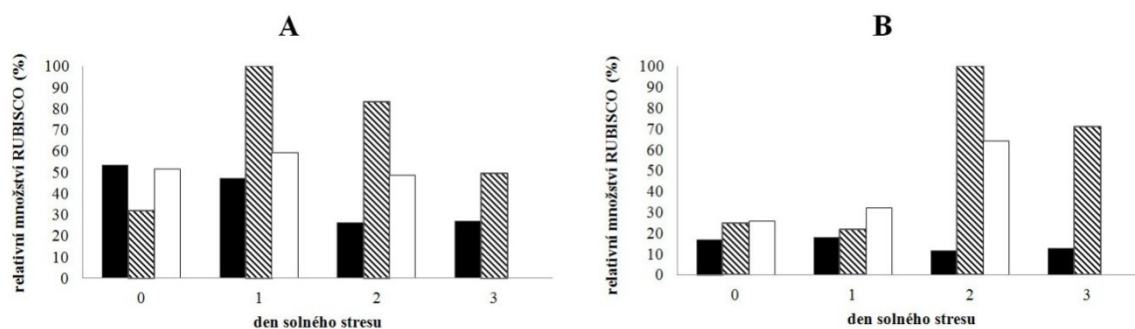
obr. 14 Relativní obsah vody v listech rostlin okurky v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě, A-experiment 6, B-experiment 7)

Vystavení rostlin solnému stresu spouští řadu obranných reakcí, které jsou doprovázeny změnami v expresi proteinů. Ve všech odběrových dnech bylo stanoveno množství ve vodě rozpustných proteinů metodou podle Bradfordové. Porovnání koncentrace proteinů mezi jednotlivými typy experimentálních rostlin ukazuje obr. 15. V obou experimentech bylo množství proteinů v rostlinách vystavených působení solného stresu zvýšené, a to obzvláště první a druhý den působení solného stresu.

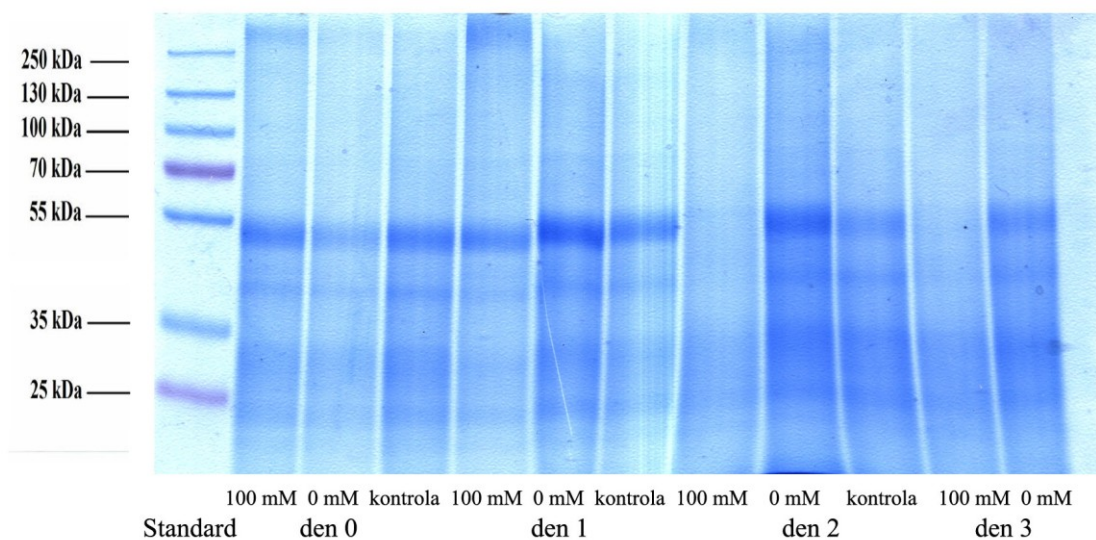


obr. 15 Koncentrace rozpustných proteinů v listech rostlin okurky v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě A-experiment 6, B-experiment 7)

Jedním z pro rostlinu důležitých proteinů je enzym Rubisco, nedílná součást Calvinova cyklu. Množství Rubisco bylo detekováno po elektroforetické separaci v prostředí SDS (např. obr. 17). Na gely byly vzorky nanášeny tak, aby v každé dráze bylo stejné množství ve vodě rozpustných proteinů (7 µg v každé jamce). Byla provedena denzitometrická analýza výsledných gelů obarvených CBB, získané hodnoty byly vyneseny do grafů (obr. 16, str. 39). Z uvedených dat je patrné, že množství tohoto enzymu je ve stresovaných rostlinách nižší než v rostlinách kontrolních. Naopak zvýšené množství tohoto enzymu bylo nalezeno v rostlinách v destilované vodě.

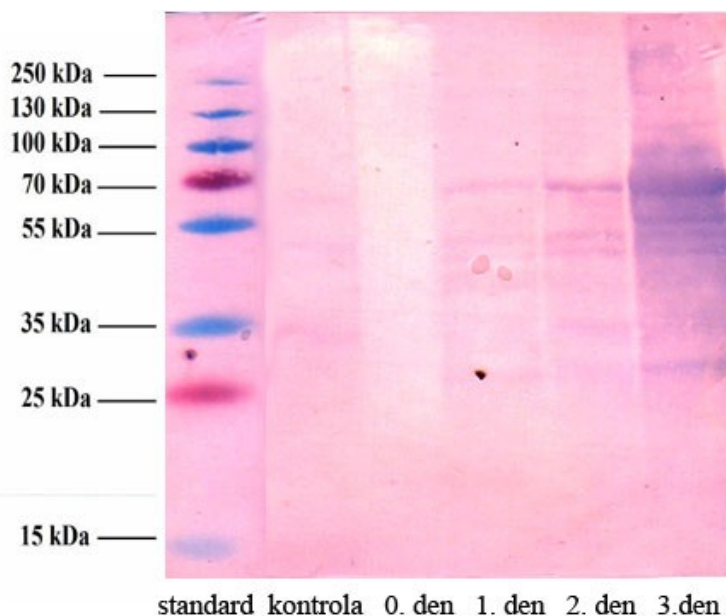


obr. 16 Relativní množství proteinu Rubisco v listech rostlin okurky v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl zjištěné na základě denzitometrické analýzy zón polyakrylamidového gelu po SDS elektroforéze odpovídajících Mr 55 000 (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě, A-experiment 6, B-experiment 7)



obr. 17 Detekce rozpustných proteinů v listech experimentálních rostlin v průběhu vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (100 mM - stresované rostliny, 0 mM – rostliny v destilované vodě a kontrolní rostliny) Do jamek bylo nanášeno stejné množství proteinů (7 μg).

Jedním z klíčových proteinů při reakci rostliny vůči solnému stresu je Hsp70. Přítomnost tohoto proteinu byla detekována imunochemicky na nitrocelulosové membráně po elektroforetické separaci rostlinných vzorků v prostředí SDS. Proteiny byly na membránu přeneseny metodou Western blot, na které byl následně detekován Hsp70 (obr. 18). Hsp70 byl detekován ve všech čtyřech odběrových dnech (0. - 4. den) v listech stresovaných rostlin v porovnání s jedním kontrolním odběrem (0. den). Ze získaných dat je patrné, že množství Hsp70, bylo nultý den ve stresovaných rostlinách snižené v porovnaná s kontrolním odběrem, v průběhu působení solného stresu došlo ke značnému nárůstu.

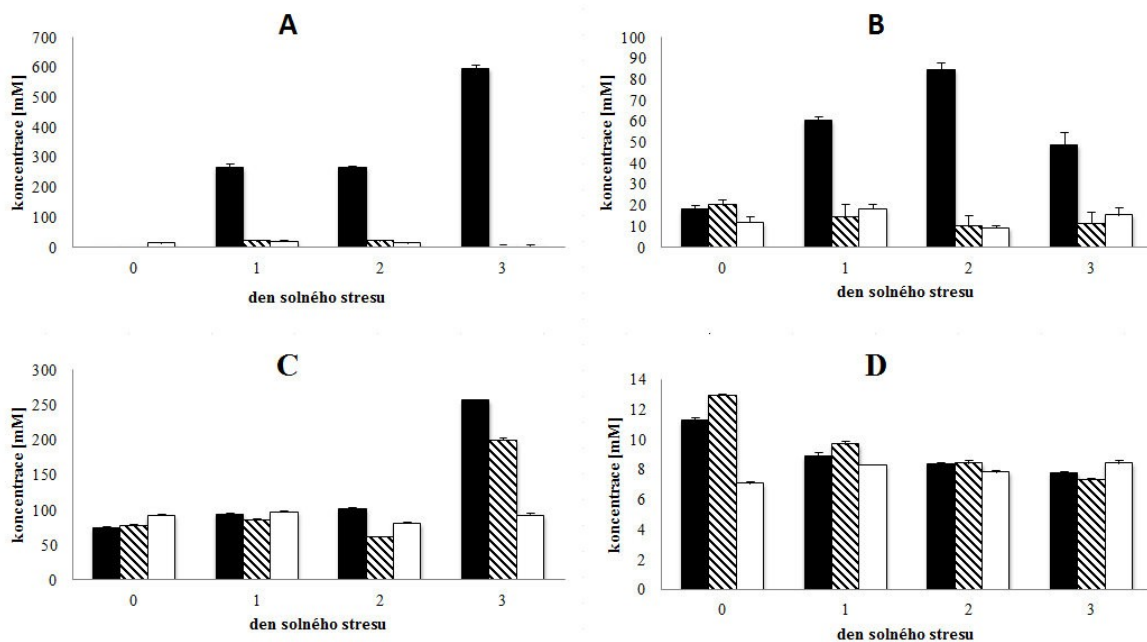


obr. 18 **Specifická imunochemická detekce Hsp70.** Porovnání množství Hsp70 ve stresovaných rostlinách v průběhu vystavení solnému stresu s kontrolní rostlinou v den 0. Do gelu bylo nanášeno stejný objem vzorku (25 μ l), množství rozpustných proteinů bylo 4,6 μ g (kontrola), 10,9 μ g (0.den), 10,8 μ g (1.den), 11,4 μ g (2.den) a 13,3 μ g (3.den)

4.3 Stanovení koncentrace sodných a draselných iontů

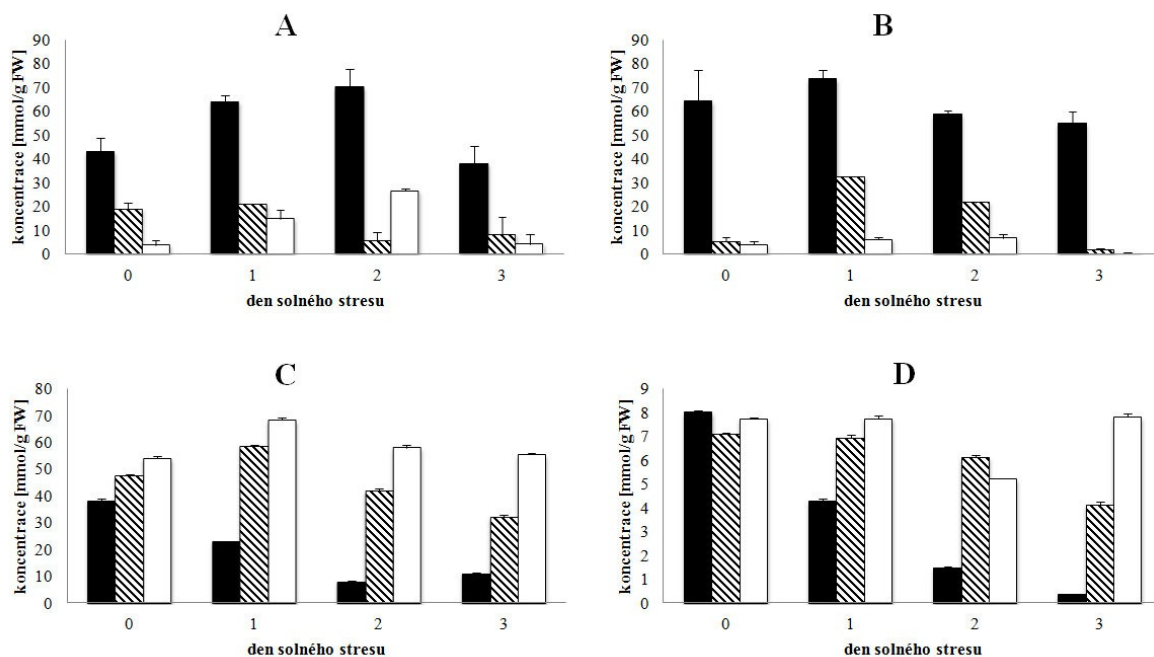
Intenzita ovlivnění metabolismu rostliny solným stresem závisí mimo jiné na množství sodných iontů v rostlině. Koncentrace sodných iontů úzce souvisí s koncentrací draselných iontů, pro rostlinu je důležitá rovnováha mezi koncentracemi těchto dvou iontů. Množství sodných a draselných iontů bylo stanoveno metodou AAS v extraktech z listů i kořenů.

Zjištěné hodnoty koncentrací sodných i draselných iontů v listech byly vyneseny do grafů (obr. 19), ze kterých je zřejmé, že koncentrace sodných iontů v listech (obr. 19A a B) byla mnohonásobně vyšší než v kontrolních rostlinách. Koncentrace sodných iontů (obr. 19AB) ve stresovaných rostlinách v obou experimentech znatelně stoupala. Maxima dosáhla v experimentu 6 (obr. 19A) třetí den, kdy byla 118x vyšší než koncentrace v kontrolních rostlinách, v experimentu 7 byla maximální koncentrace sodných iontů v listech stresovaných rostlin zjištěna druhý den vystavení solnému stresu, kdy byla 10x vyšší než koncentrace v kontrolních rostlinách. Koncentrace draselných iontů (obr. 19CD) v experimentu 6 stoupala, maximálně zvýšená byla třetí den, v experimentu 7 byla ve stresovaných rostlinách zvýšená nultý den (o 60 %) a v dalším průběhu byla srovnatelná s koncentrací v kontrolních rostlinách.



obr. 19 Koncentrace sodných (A a B) a draselných (C a D) iontů v listech rostlin okurky v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě, AC-experiment 6, BD-experiment 7)

Koncentrace obou iontů byla stanovena také v kořenech (obr. 20). Koncentrace sodných iontů (obr. 20AB) byla během vystavení solnému stresu ve stresovaných rostlinách v obou experimentech značně zvýšená v porovnání s kontrolními rostlinami a to až 170x (třetí den experimentu 7, obr. 20B). Koncentrace draselných iontů v kořenech rostlin okurky (obr. 20CD) v průběhu působení solného stresu klesala.



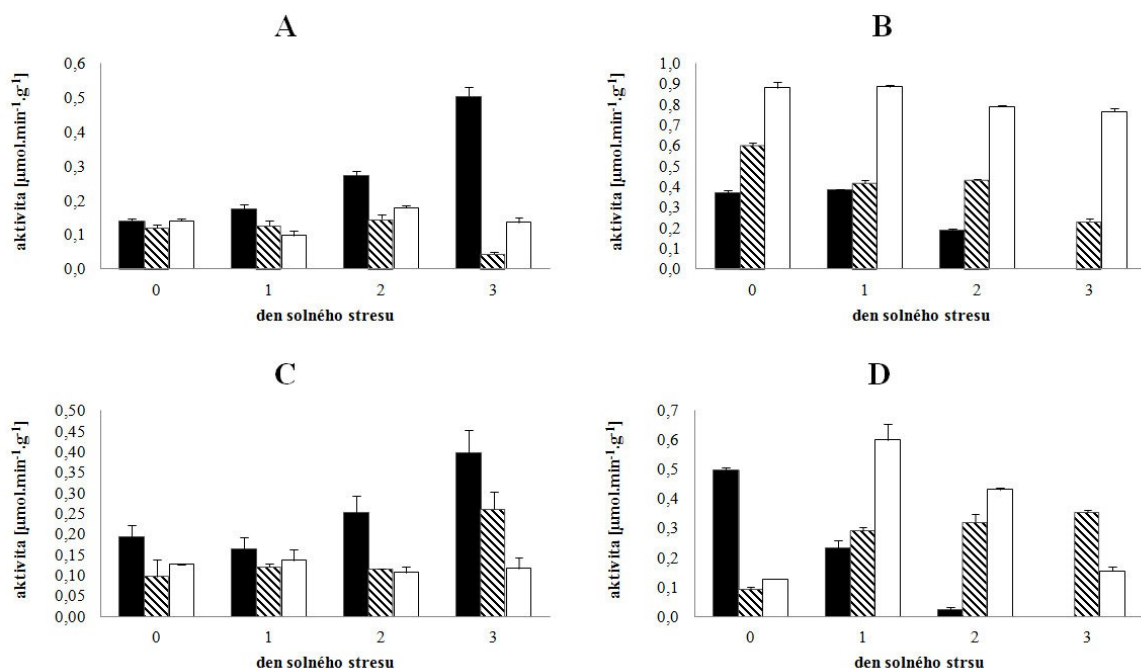
obr. 20 Koncentrace sodných (A a B) a draselných (C a D) iontů v kořenech experimentálních rostlin v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě; A, C-experiment 6, B, D-experiment 7)

4.4 Vliv solného stresu na aktivitu enzymů

V důsledku solného stresu dochází ke snížení fotosyntetické účinnosti, jedním z následků je snížená dostupnost NADPH. Alternativním zdrojem tohoto redukovaného koenzymu by mohly být NADP-dependentní enzymy. Aktivita NADP-dependentních enzymů byla stanovena ve všech čtyřech odběrových dnech, a to jak v listech, tak kořenech, naměřené hodnoty byly vyneseny do grafů, ve kterých je porovnávána aktivita těchto enzymů ve stresovaných a kontrolních rostlinách.

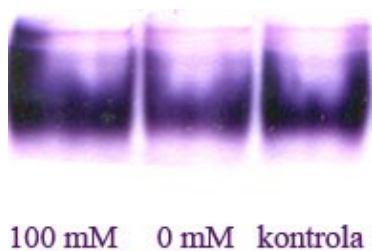
4.4.1 Aktivita G6PDH

Hodnoty aktivity G6PDH v listech (obr. 21 AC) a kořenech (obr. 21 BD) experimentálních rostlin byly vyneseny do grafů v závislosti na době působení solného stresu. V listech rostlin vystavených solnému stresu byly aktivity G6PDH v porovnání s kontrolními rostlinami zvýšené. Třetí den vystavení rostlin stresovým podmínkám byla aktivita G6PDH maximálně zvýšená, v experimentu 6 (obr. 21A) o 270 %, v experimentu 7 (obr. 21C) o 240 %. Naopak v kořenech (obr. 21 B a D) byla aktivita G6PDH v rostlinách vystavených solnému stresu po celou dobu snížena a v průběhu experimentů klesala.



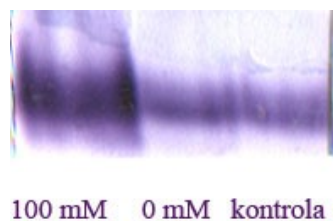
obr. 21 Aktivita G6PDH v listech (A a C) a kořenech (B a D) rostlin okurky seté vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě; A, C-experiment 6, B, D-experiment 7)

Detekce aktivity G6PDH v listech rostlin okurky byla provedena také po červené nativní elektroforéze (RN-PAGE) druhý den působení solného stresu (obr. 22). Bylo zjištěno mírné zvýšení aktivity v tento den, které odpovídá výše uvedeným naměřeným hodnotám (viz obr. 21AC).



obr. 22 Specifická detekce aktivity G6PDH po červené nativní elektroforéze v listech rostlin okurky druhý den vystavení podmínkám solného stresu. 100 mM - stresované rostliny, 0 mM – rostliny v destilované vodě a kontrolní rostliny. Do jamek bylo aplikováno vždy 25 μ l rostlinného extraktu, množství rozpustných proteinů bylo: 11,5 μ g (100 mM), 4,3 μ g (0 mM), 4,9 μ g (kontrola)

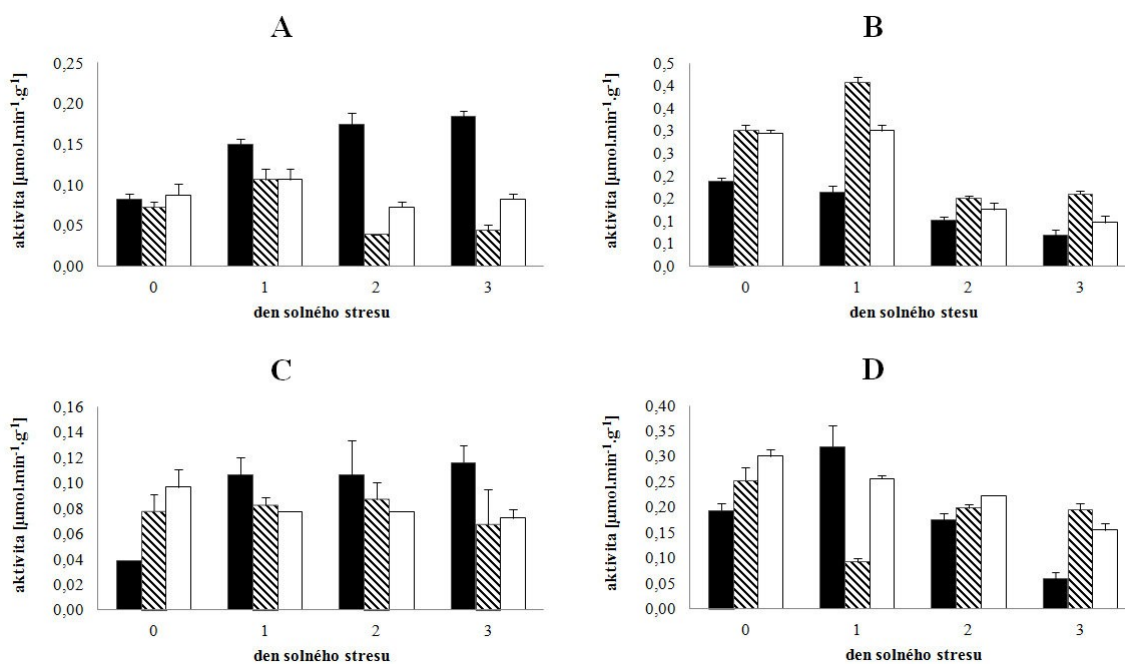
Třetí den působení stresu byla specificky detekována aktivita G6PDH po nativní elektroforéze. Výstup ukazuje obr. 23, ze kterého je patrné výrazné zvýšení aktivity G6PDH ve stresovaných rostlinách (100 mM) v porovnání s rostlinami v destilované vodě (0 mM) a kontrolními rostlinami. Detekován byl jeden proužek odpovídající aktivitě G6PDH.



obr. 23 *Specifická detekce aktivity G6PDH po nativní elektroforéze v listech rostlin okurky třetí den vystavení stresovým podmínkám. 100 mM - stresované rostliny, 0 mM – rostliny v destilované vodě a kontrolní rostliny.*

4.4.2 Aktivita NADP-ICDH

V listech a kořenech experimentálních rostlin byla stanovována aktivita enzymu NADP-ICDH jednak spektrofotometricky a jednak byla aktivita detekována po nativní elektroforéze. Hodnoty aktivity získané ze spektrofotometrického stanovení byly vyneseny do grafů (obr. 24, strana 43). Na obr. 24AC jsou aktivity NADP-ICDH v lisech experimentálních rostlin. Hodnoty zjištěné u stresovaných rostlin byly nultý den sniženy v porovnání s hodnotami zjištěnými v kontrolních rostlinách. V následujících dnech působení stresu pak v obou experimentech aktivita NADP-ICDH v listech stresovaných rostlin stoupala. Největší zvýšení bylo zaznamenáno třetí den solného stresu, kdy v experimentu 6 byla aktivita ve stresovaných rostlinách o 125 % vyšší než v kontrolních, v experimentu 7 o 60 %. Naopak v kořenech (obr. 24BD) byla aktivita NADP-ICDH zjištěná u stresovaných rostlin snižena. Zvýšení bylo zaznamenáno pouze v experimentu 7 (obr. 24D) první den solného stresu.



obr. 24 Aktivita NADP-ICDH v lisech (A a C) a kořenech (B a D) rostlin okurky vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě, A, B-experiment 6, B, D – experiment 7)

Detekce aktivity NADP-ICDH v listech experimentálních rostlin byla provedena také po červené nativní elektroforéze, a to druhý den vystavení podmínkám solného stresu. Z výsledku (obr. 25) je zřejmé, že aktivita ve stresovaných rostlinách je zvýšená, což koresponduje s daty získanými při spektrofotometrické detekci aktivity toho to enzymu (viz obr. 24AC)



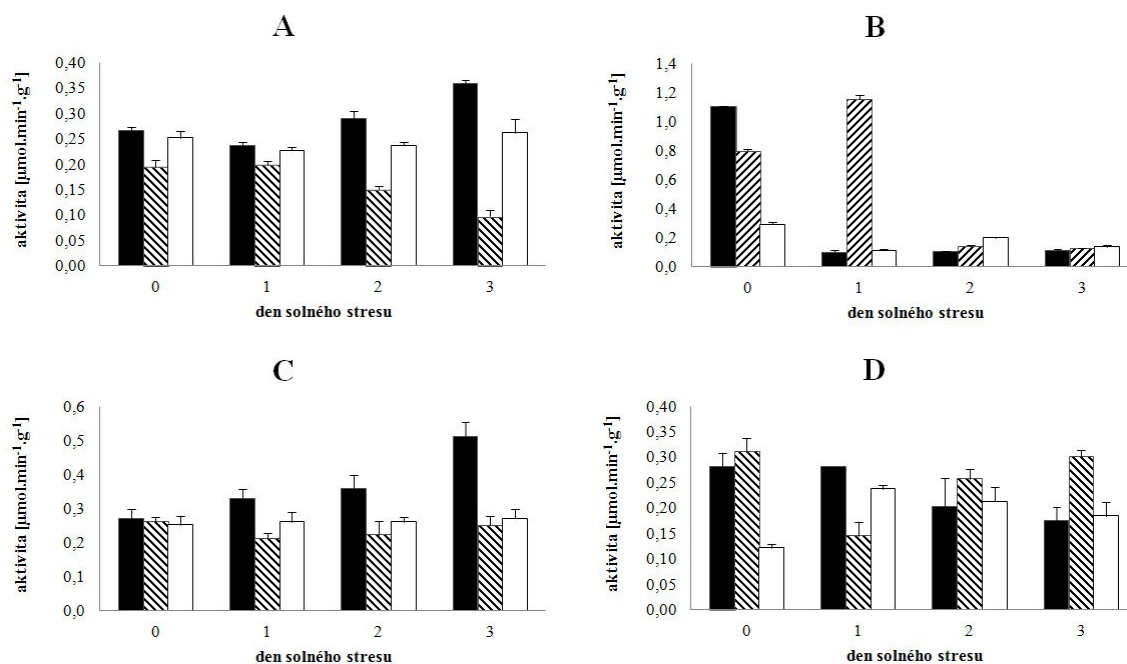
100 mM 0 mM kontrola

obr. 25 Specifická detekce aktivity NADP-ICDH po červené nativní elektroforéze vzorků listů rostlin okurky druhý den vystavení podmínkám solného stresu. Do jamek bylo aplikováno vždy 25 μ l rostlinného extraktu, množství rozpustných proteinů bylo: 13,3 μ g (100 mM), 4,4 μ g (0 mM), 4,6 μ g (kontrola)

Aktivita NADP-ME

V průběhu experimentů byla sledována aktivita NADP-ME. Hodnoty ze spektrofotometrického stanovení aktivity byly vyneseny do grafů (obr. 26). Aktivita NADP-ME v listech stresovaných rostlin (obr. 26AC) byla v obou pokusech po celou dobu

zvýšená v porovnání s kontrolními rostlinami. Maximální zvýšení bylo zjištěno třetí den solného stresu, v experimentu 6 (obr. 26A) o 40 %, v experimentu 7 (obr. 26C) o 90 %. Aktivita v listech rostlin vystavených destilované vodě byla během obou experimentů buď snížena, nebo stejná jako aktivita kontrolních rostlin. V kořenech (obr. 26 B,D) byly aktivity rostlin vystavených 100 mM roztoku NaCl výrazně zvýšené v porovnání s kontrolními rostlinami pouze nultý den o 280 % v experimentu 6 a o 130 % v experimentu 7.



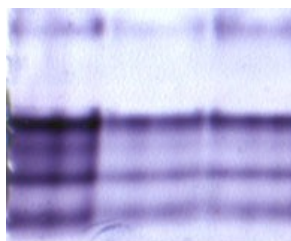
obr. 26 Aktivita NADP-ME v listech (A a C) a kořenech (B a D) rostlin okurky seté vztahovaná na čerstvou hmotnost v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě, A, B-experiment 6, B, D – experiment 7)

Aktivita NADP-ME byla specificky detekována v listech experimentálních rostlin po červené nativní elektroforese druhý den působení solného stresu (obr. 27). Zjištěná data potvrzují nárůst aktivity, zjištěné spektrofotometricky (viz obr. 26AC).



obr. 27 Specifická detekce aktivity NADP-ME po červené nativní elektroforese v listech rostlin okurky. 100 mM - stresované rostliny, 0 mM – rostliny v destilované vodě a kontrolní rostliny. Do jamek bylo aplikováno vždy 25 μl rostlinného extraktu, množství rozpustných proteinů bylo: 11,4 μg (100 mM), 4,3 μg (0 mM), 4,9 μg (kontrola)

Třetí den solného stresu byla provedena specifická detekce NADP-ME po nativní elektroforetické separaci (obr. 28). Z výsledných dat je patrné zvýšení aktivity NADP-ME ve stresovaných rostlinách. Bylo detekováno 5 různých zón v každém z analyzovaných vzorků. Z výsledku je patrné, že aktivita NADP-ME ve stresovaných rostlinách je vyšší než v rostlinách kontrolních, stejně jako u spektrofotometricky získaných dat, viz obr. 26AC.

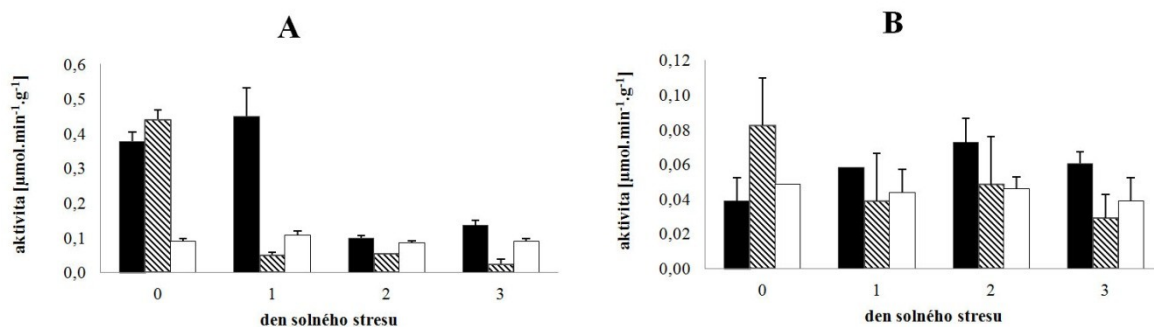


100 mM 0 mM kontrola

obr. 28 *Specifická detekce aktivity NADP-ME po nativní elektroforéze v listech rostlin okurky. 100 mM - stresované rostliny, 0 mM – rostliny v destilované vodě a kontrolní rostliny. Do jamek bylo aplikováno vždy 25 μ l rostlinného extraktu, množství rozpustných proteinů bylo: 13,3 μ g (100 mM), 4,4 μ g (0 mM), 4,6 μ g (kontrola)*

4.4.3 Nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa

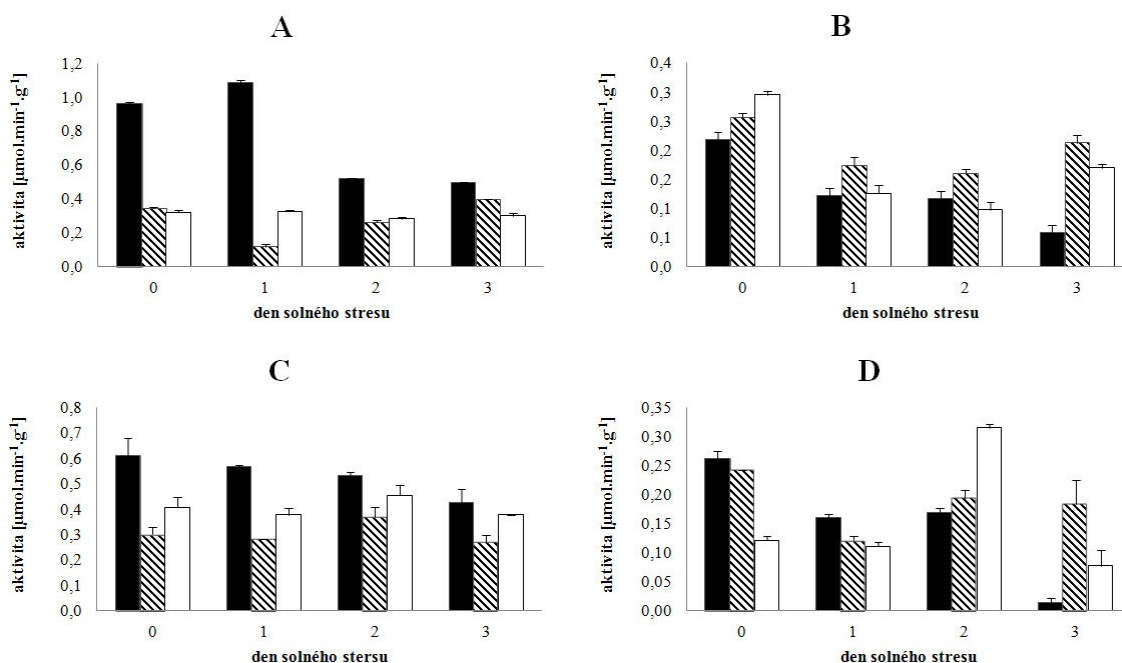
V listech rostlin okurky byla stanovována také aktivita NP-GAPDH. Na obr. 29 jsou zjištěné hodnoty aktivity v listech rostlin NP-GAPDH vyneseny do grafů. Nultý den byla v obou uvedených experimentech zvýšená aktivita toho enzymu v listech rostlin v destilované vodě. V experimentu 6 (obr. 29A) byla aktivita v listech rostlin vystavených působení solného stresu zvýšená, výrazně nultý (a první den, poté se její hodnota snížila, avšak stále byla vyšší než u kontrolních rostlin. V experimentu 7 (obr. 29B) byla nultý den aktivita NP-GAPDH nižší než v kontrolních rostlinách, ve všech následujících odběrových dnech byla zjištěná aktivita NP-GAPDH ve stresovaných rostlinách vyšší než v kontrolních, průměrně o 50 %.



obr. 29 Aktivita NP-GAPDH v listech rostlin okurky seté vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě, A-experiment 6, B-experiment 7)

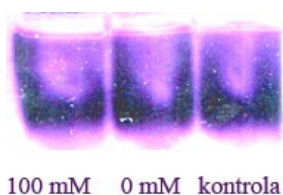
4.4.4 Aktivita SDH

Aktivita enzymu SDH byla detekována spektrofotometricky. Získaná data byla vynesena do grafů, které ukazuje obr. 30. Data zjištěná v listech experimentálních rostlin (obr. 30AC) ukazují zvýšení aktivity stresovaných rostlin oproti kontrolním nultý, první a třetí den v obou uvedených experimentech. V experimentu 6 bylo zvýšení nultý den o 200 % a první den o 235 %, v sedmém experimentu pak byl rozdíl v aktivitách nultý den 50 % a první den 50 %. V aktivitě rostlin v destilované vodě nebyly zaznamenány výrazné změny. V kořenech aktivita SDH během působení solného stresu klesala (obr. 29B a D), minimální aktivita byla tedy zaznamenána třetí den vystavení stresovým podmínkám, ve stejný odběrový den bylo zároveň potvrzeno zvýšení aktivity SDH u rostlin vystavených působení destilované vody.



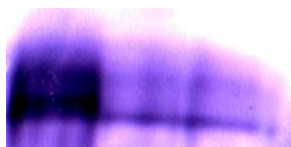
obr. 30 Aktivita SDH v listech (A a C) a kořenech (B a D) rostlin okurky seté vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (■ 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě A, B-experiment 6, B, D – experiment 7)

Druhý den vystavení stresu byla provedena červená nativní elektroforéza vzorků listů experimentálních rostlin, po ukončení separace byla provedena specifická detekce aktivity SDH (obr. 31). Získaný výsledek neukazuje výrazné rozdíly v aktivitě SDH mezi experimentálními rostlinami, spektrofotometricky získané hodnoty aktivit rovněž neukazují trend pro druhý den vystavení stresovým podmínkám.



obr. 31 Specifická detekce aktivity SDH po červené nativní elektroforéze v listech rostlin okurky druhý den vystavení podmínkám solného stresu. 100 mM - stresované rostliny, 0 mM – rostliny v destilované vodě a kontrolní rostliny. Do jamek bylo aplikováno vždy 25 μ l rostlinného extraktu, množství rozpustných proteinů bylo: 11,4 μ g (100 mM), 4,3 μ g (0 mM), 4,9 μ g (kontrola)

Třetí den experimentu byla provedena elektroforetická separace v nativním prostředí, po jejímž ukončení byla detekována aktivita SDH (obr. 32). Jak je vidět na obrázku, aktivita rostlin vystavených stresovým podmínkám je výrazně vyšší než u rostlin v destilované vodě a kontrolních rostlin, což potvrzuje zvýšení aktivity zjištěné při spektrofotometrickém stanovení. Zároveň byly v každé dráze rozlišeny 2 zóny.

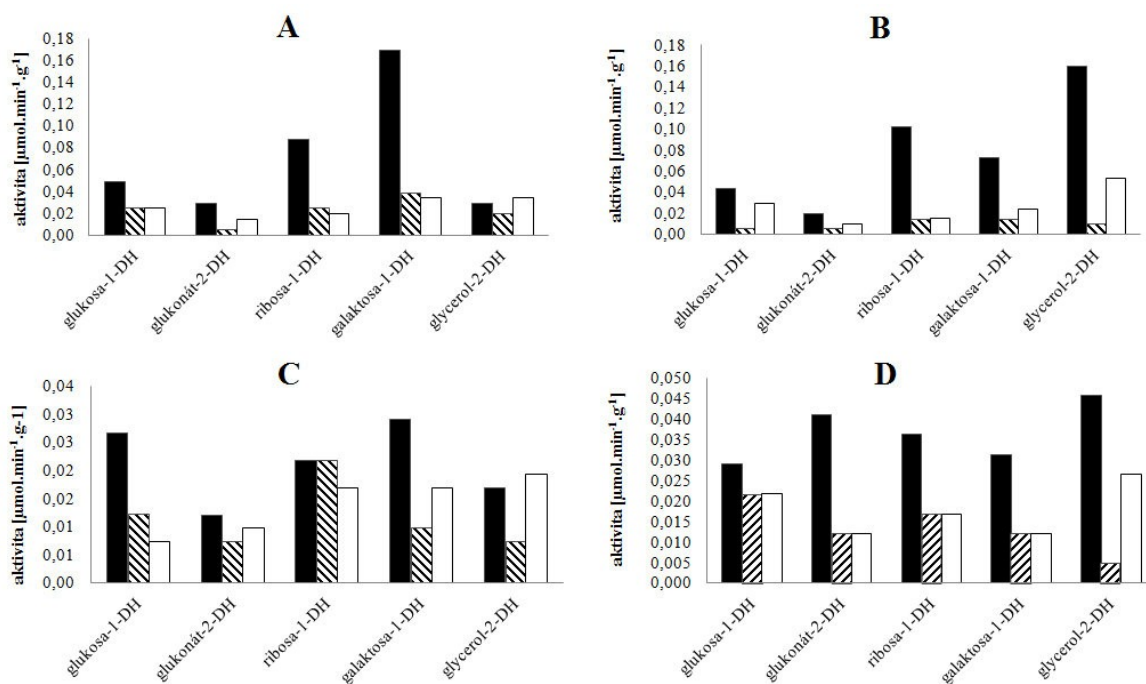


100 mM 0 mM kontrola

obr. 32 *Specifická detekce aktivity SDH po nativní elektroforéze v listech rostlin okurky třetí den vystavení stresovým podmínkám. 100 mM - stresované rostliny, 0 mM – rostliny v destilované vodě a kontrolní rostliny. Do jamek bylo aplikováno vždy 25 μ l rostlinného extraktu, množství rozpustných proteinů bylo: 13,3 μ g (100 mM), 443 μ g (0 mM), 4,6 μ g (kontrola)*

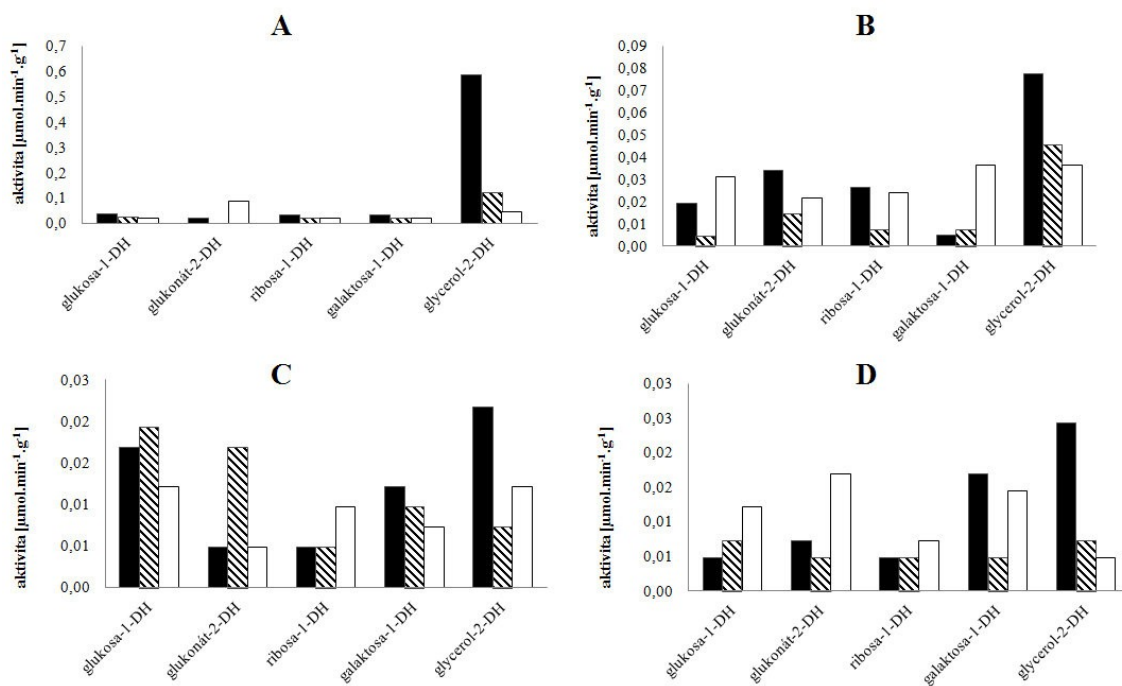
4.4.5 Méně zastoupené NADP-dependentní enzymy

V listech a kořenech experimentálních rostlin byla v průběhu experimentů také stanovována aktivita méně zastoupených NADP-dependentních enzymů. Naměřená data ve vzorcích z listů ukazují zvýšení aktivit těchto enzymů nultý a první den vystavení podmínkám solného stresu (obr. 33). V obou uvedených odběrových dnech byla zjištěna zvýšená aktivita minoritně zastoupených NADP-dependentních enzymů v listech rostlin vystavených solnému stresu. Zjištěné hodnoty ukazují zvýšení aktivity galaktosa-1-dehydrogenasy stresovaných rostlin v den 0, v experimentu 7 (obr. 33A) 5x, v experimentu 8 (obr. 33C) o 40 % v porovnání s kontrolními rostlinami. První den byla výrazně zvýšená aktivita glycerol-2-dehydrogenasy v listech rostlin vystavených solnému stresu, v experimentu 7 (obr. 33B) o 200 %, v experimentu 8 (obr. 33D) o 70 % oproti kontrole.



obr. 33 Aktivita minoritně zastoupených NADP-dependntních enzymů v listech rostlin okurky seté vztažená na čerstvou hmotnost nultý (A a C) a první (B a D) den vystavení podmínkám solného stresu. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě, A, B-experiment 7, B, D – experiment 8)

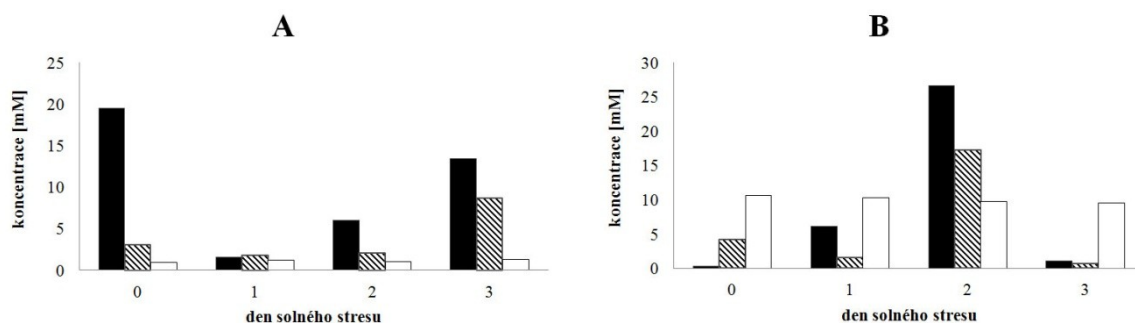
Aktivita minoritně zastoupených NADP-dependntních enzymů byla detekována také v kořenech experimentálních rostlin. Rozdíly v aktivitě těchto enzymů byly zaznamenány nultý a první den vystavení stresovým podmínkám (obr. 34). Výrazné zvýšení bylo zjištěno v aktivitě glycerol-2-dehydrogenasy, která byla oba uvedené dny zvýšená v porovnání s aktivitou tohoto enzymu v kontrolních rostlinách.



obr. 34 Aktivita minoritně zastoupených NADP-dependentních enzymů v kořenech rostlin okurky seté vztažená na čerstvou hmotnost nultý (A a C) a první (B a D) den vystavení podmínkám solného stresu. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě A, B-experiment 7, B, D – experiment 8)

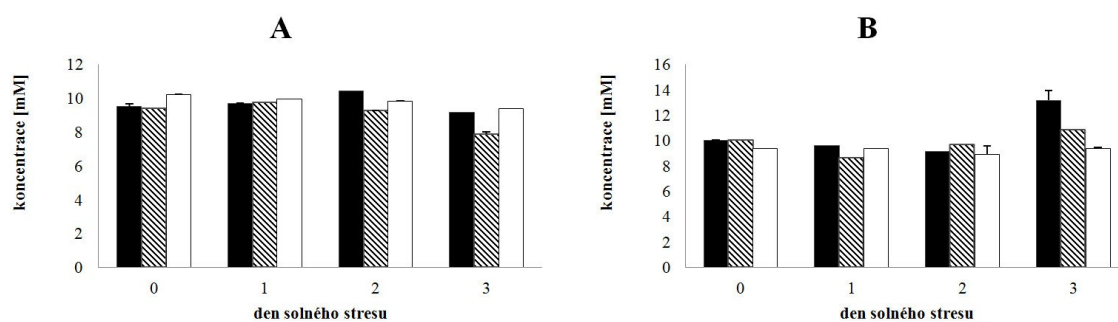
4.5 Vliv solného stresu na množství $NADP^+$ a $NADPH$

Solný stres negativně ovlivňuje fotosyntetickou účinnost, tudíž se snižuje dostupnost $NADPH$. V předešlých měřeních bylo zjištěno, že se zvyšuje aktivita NADP-dependentních enzymů v rostlinách okurky vystavených solnému stresu. Během působení solného stresu bylo proto v kořenech i listech experimentálních rostlin sledováno množství oxidované i redukované formy koenzymu $NADP^+$. Ze zjištěných dat (obr. 35) je patrné zvýšení koncentrace $NADP^+$ v listech stresovaných rostlin oproti kontrolním nultý a třetí den vystavení podmínkám solného stresu, naopak v kořenech bylo zjištěno výrazné zvýšení druhý den stresu. Ihned po začátku působení solného stresu bylo zjištěné množství $NADP^+$ v listech stresovaných rostlin 20x vyšší než v listech rostlin kontrolních, množství $NADP^+$ v kořenech stresovaných rostlin bylo naopak 40x menší než v kořenech kontrolních rostlin.



obr. 35 Množství $NADP^+$ v listech (A) a kořenech (B) rostlin okurky v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □- kontrola pěstovaná v půdě)

Množství NADPH bylo sledováno ve stejných rostlinách jako množství $NADP^+$. Na obr. 36 je znázorněno porovnání koncentrací NADPH v experimentálních rostlinách během působení solného stresu. Nebyly zaznamenány výrazné změny v koncentraci redukovaného koenzymu.



obr. 36 Množství NADPH v listech (A) a kořenech (B) rostlin okurky v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □- kontrola pěstovaná v půdě)

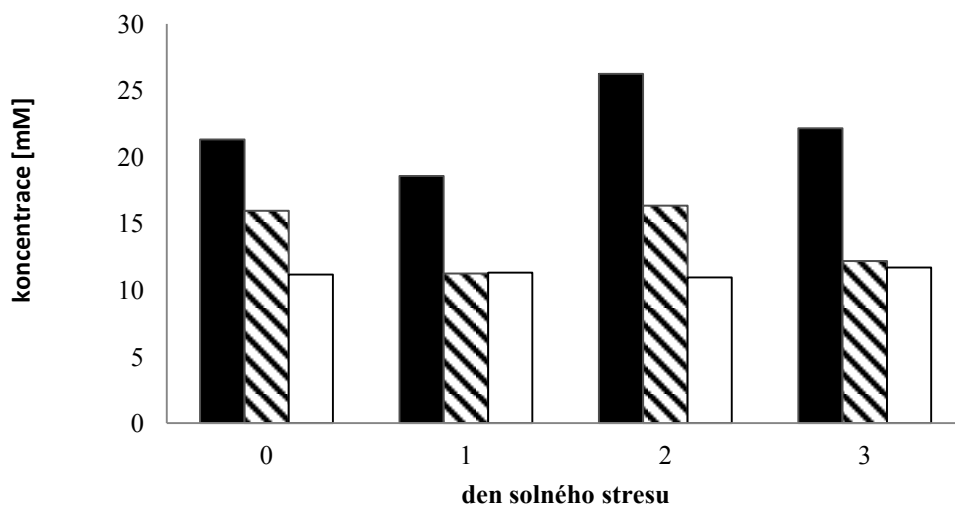
Pro rostliny je však důležitý poměr oxidované a redukované formy tohoto koenzymu. Bylo zjištěno, že kontrolní rostliny si udržují v listech i kořenech stálý poměr mezi těmito dvěma formami. Naopak u stresovaných rostlin dochází ke snížení poměru $NADPH/NADP^+$ v listech, avšak v kořenech došlo k výraznému zvýšení tohoto poměru v rané fázi působení solného stresu.

4.6 Vliv solného stresu na antioxidační schopnosti

Jedním z účinků solného stresu je vznik oxidativního stresu; v rostlinné buňce vznikají aktivní formy kyslíku, které mohou buňku poškozovat. Na odstraňování ROS se podílí skupina fenolických látek, flavonoidy. V průběhu experimentu bylo v listech

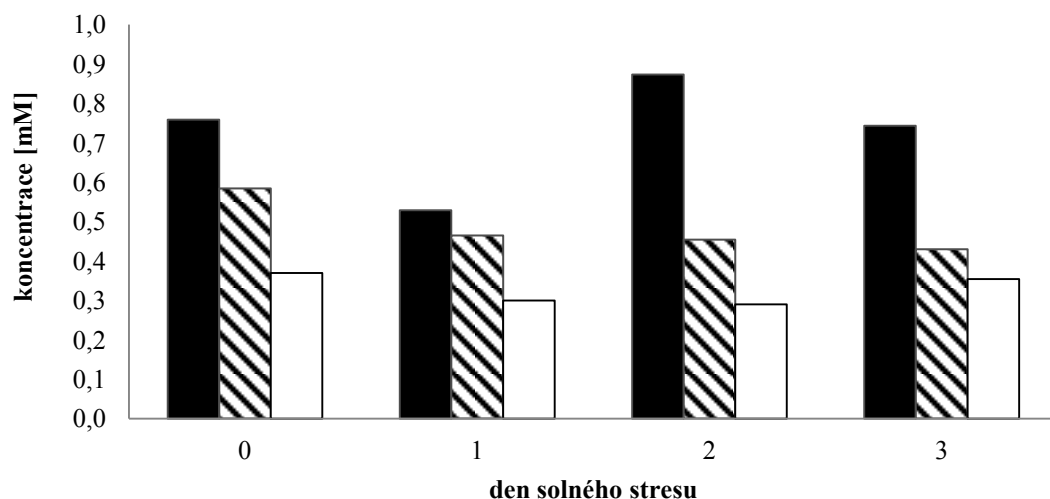
zjišťováno množství fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacita extraktů experimentálních rostlin.

Porovnání koncentrace fenolických látek v experimentálních rostlinách v závislosti na době působení solného stresu znázorňuje obr. 37. Z obrázku je patrné výrazné zvýšení koncentrace fenolických látek v listech stresovaných rostlin oproti rostlinám kontrolním i rostlinám v destilované vodě.



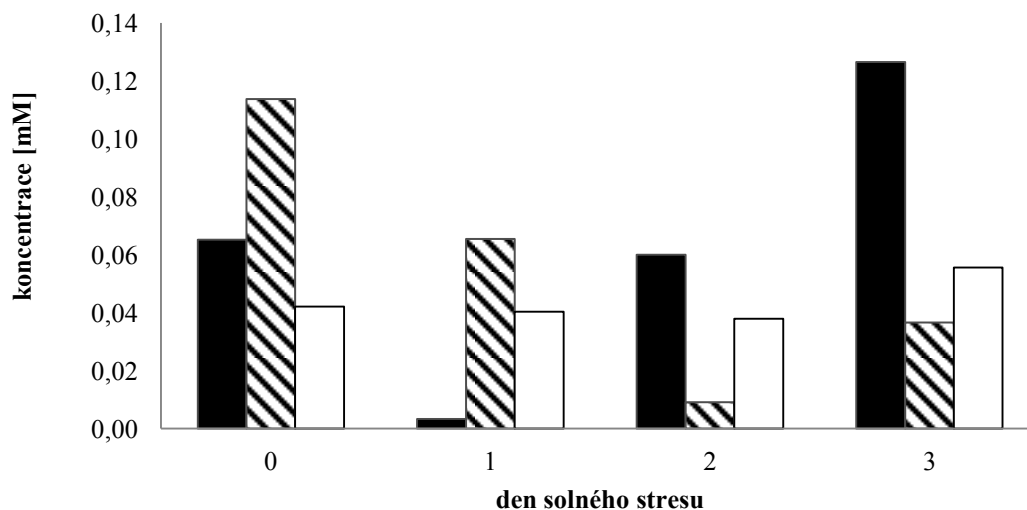
obr. 37 Koncentrace fenolických látek v listech rostlin okurky v průběhu působení solného stresu v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě) Celkový obsah fenolických látek je vztažen na ekvivalent fenolu.

Dále byla v průběhu experimentu sledována koncentrace flavonoidů, hodnoty vynesené do grafu znázorňuje obr. 38. Koncentrace flavonoidů v rostlinách v destilované vodě byla oproti kontrolním rostlinám zvýšená, průměrně o 95 %, nijak výrazně se však neměnila. Ve stresovaných rostlinách byla koncentrace flavonoidů znatelně vyšší v porovnání s kontrolními rostlinami.



obr. 38 Koncentrace flavonoidů v listech rostlin okurky v průběhu působení solného stresu v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě). Celkový obsah flavonoidů je vztažen na ekvivalenty kvercetinu.

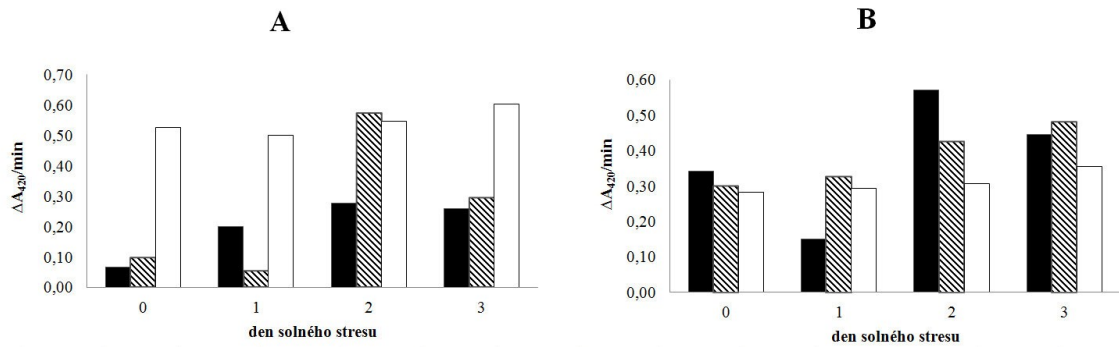
V průběhu působení solného stresu byla v extraktech listů experimentálních rostlin sledována jejich antioxidační schopnost (obr. 39). Zvýšená antioxidační kapacita ve stresovaných rostlinách v porovnání kontrolními byla zjištěna nulový (o 55 %), druhý (o 60 %) a třetí (o 130 %) den vystavení rostlin solnému stresu.



obr. 39 Antioxidační schopnost vodných extraktů listů rostlin okurky v průběhu působení solného stresu v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě) Antioxidační schopnost je vyjádřena pomocí ekvivalentů kyseliny askorbové v mM

Na odbourávání ROS se podílí řada antioxidačních drah a enzymů. Mezi detoxifikační enzymy řadíme peroxidasy. V průběhu působení solnému stresu byla

v rostlinách sledována aktivita guajakolperoxidasy. V listech (obr. 40A) byla aktivita ve stresovaných rostlinách snížena po celou dobu vystavení rostlin podmínkám solného stresu, zatímco v kořenech (obr. 40B) byla aktivita nultý, druhý i třetí den zvýšená.



obr. 40 Aktivita guajakolperoxidasy listech (A) a kořenech (B) rostlin okurky v závislosti na době vystavení stresovým podmínkám v podobě 100 mM NaCl. (■- 100 mM NaCl, ▨- destilovaná voda, □-kontrola pěstovaná v půdě)

5 Diskuse

Zemědělská produkce je ohrožována celou řadou nepříznivých vlivů, které způsobují stres rostlin, a tím snižují výnosy. Mezi velmi rozšířené faktory patří zasolení, které nejen v oblastech postižených suchem znesnadňuje pěstování zemědělsky významných plodin. Nároky na zemědělskou produkci však narůstají se stoupajícím počtem obyvatel. [102] Většina užitkových rostlin je glykofytní, to znamená, že v prostředí se zvýšenou koncentrací soli nedokáže přežít. Proto je důležité porozumět mechanismům účinku solného stresu a zároveň pochopit obrané reakce rostlin.

V této diplomové práci byla zkoumána souvislost solného stresu se změnami metabolismu glykofytních rostlin okurky *Cucumis sativa* L. *convar. Jogger F1*. Experimentální rostliny i podmínky byly vybírány na základě předchozí studie porovnávající aktivitu NADP-dependentních enzymů a množství Na^+ iontů přijatých rostlinou. [102] Rostliny okurky Na^+ ionty v listech akumulovaly a zároveň v porovnání s jinými rostlinami např. tabákem *Nicotiana tabacum* L. *cv Petit Havana SRI* vykazovaly vysoké aktivity NADP-dependentních enzymů. [102], [103] K indukci solného stresu byly experimentální rostliny vyjmuty z půdy a jejich kořeny byly po omytí ponořeny do roztoku NaCl. Tento přístup byl zvolen z důvodu lepší kvantifikace koncentrace stresoru.

Poškození rostliny solným stresem je závislé na množství sodných iontů, které rostlina přijme do cytoplazmy. Nárůst nitrobuňkové koncentrace sodných iontů může být pro rostlinu toxický. V prvním stádiu bývá inhibováno pumpování protonů H^+ -ATPasou plazmatické membrány, což způsobí snížení acidifikace apoplastu a redukci růstu a vývoje nadzemních částí rostliny. K závažnějším změnám může docházet ve druhé fázi solného stresu, kdy v důsledku vysoké cytosolové koncentrace Na^+ iontů dochází k záměně draselných iontů za sodné, a tím ke snížení aktivity enzymů s kofaktorem K^+ . [105] Koncentrace sodných a draselných iontů byla sledována v listech i kořenech metodou AES (obr. 19AB, str. 41, obr. 20, str. 42). V řadě studií byla dokumentována akumulace sodných iontů v listech glykofytních rostlin *A. thaliana* L. [106], *Oryza sativa* L. [107], stejně jako v listech rostlin okurky (obr. 19AB, str. 41). Kořeny rostlin vystavených působení solného stresu čelí vysokým koncentracím Na^+ , sodné ionty jsou transportovány po směru koncentračního gradientu do kořenů [8], kde jejich koncentrace roste (obr. 20AB, str. 42), naopak koncentrace draselných iontů v kořenech klesá (obr. 20CD, str. 42). To je pravděpodobně způsobeno skutečností, že Na^+ využívají pro vstup do buněk vysokoafinitní kanály pro draselné ionty, a tím zabraňují transportu K^+ do buněk. [108]

Míra působení solného stresu se také projevuje snížením příjmu vody rostlinou. V listech rostlin okurky RWC poklesl až na 50 % (obr. 14, str. 38). Pokles obsahu vody v listech stresovaných rostlin je způsoben poklesem vodního potenciálu v kořenech, a tím způsobenou neschopností rostlin přijímat vodu.

Jedním z nejzávažnějších důsledků solného stresu je snížení fotosyntetické aktivity, zvýšení respirace, navození oxidativního a osmotického stresu. Snížení fotosyntetické účinnosti vyplývá z několika procesů, ke kterým dochází, jako je uzavření průduchů, nedostatečný elektronový transport a snížená aktivita fotosyntetických enzymů. [109] Nedostatečný fotosyntetický elektronový transport má za následek sníženou dostupnost NADPH a ATP. Cílem této práce bylo zjistit, zda nedostatek NADPH může být kompenzován aktivitou NADP-dependentních enzymů. Konkrétně se jednalo o enzymy: G6PDH, NADP-ICDH, NADP-ME, NP-GAPDH a méně zastoupené NADP-dependentní enzymy: glukosa-1-dehydrogenasa, glukonát-2-dehydrogenasa, ribosa-1-dehydrogenasa, galaktosa-1-dehydrogenasa a glycerol-2-dehydrogeansa. Z literatury byla v souvislosti se solným stresem zjištěna zvýšená aktivita NADP-ICDH, G6PDH a NADP-ME (viz Tabulka 1, strana 19). Studie, která by dokumentovala souvislost aktivity všech jmenovaných enzymů se solným stresem současně, však publikována nebyla. V listech byl zaznamenán nárůst aktivity vztažené na čerstvou hmotnost všech studovaných enzymů (kapitola 4.4). V raných fázích stresu byly zvýšené aktivity spíše méně zastoupených NADP-dependentních enzymů a SDH, zatímco ostatní majoritně zastoupené NADP-dependentní enzymy (G6PDH, NADP-ICDH, NADP-ME a NP-GAPDH) byly zvýšené převážně až v pozdější fázi solného stresu (2. a 3. den). Nejvíce byla zvýšena aktivita G6PDH, a to 2,7-krát 3. den solného stresu (obr. 21 str. 43) Aktivita majoritních NADP-dependentních enzymů byla současně specificky detekována po nativní elektroforéze, jak klasické, tak RN-PAGE, jejíž výhodou je současná možnost stanovení relativní molekulové hmotnosti pomocí standardních proteinů o známé molekulové hmotnosti. To však již součástí práce nebylo. Pro všechny studované enzymy kromě NADP-ME a SDH byla po nativní elektroforéze patrná pouze 1 zóna indikující přítomnost 1 isoformy. V případě SDH byly patrné 2. zóny a v případě NADP-ME 5 zón. Nemusí se však jednat pouze o isoformy, ale i degradační produkty, štěpy či oligomery tohoto enzymu.

Obranná odpověď v podobě zvýšené aktivity NADP-dependentních enzymů v listech byla v naší laboratoři zjištěna i pro rostliny *Nicotiana tabacum* L. vystavené biotickému stresu v podobě infekce Y virem bramboru, kmene NTN (PVYNTN). [103]

Pouze aktivita SDH, klíčového enzymu šikimátové dráhy katalyzujícího však naopak spotřebu NADPH, vlivem virové infekce zvýšena nebyla, zatímco v rostlinách okurky byla aktivita tohoto enzymu zvýšená po celou dobu působení solného stresu, a to zejména ve dnech 0 a 1, kdy byl rozdíl mezi stresovanými a kontrolními rostlinami přes 200 % (obr. 30AC, strana 49). Toto zvýšení by mohlo naznačovat význam SDH při prvotních odpovědích na vystavení solnému stresu. Produktem šikimátové cesty je chorismát, který je důležitým prekurzorem pro biosyntézu antioxidantních látek podílejících se na detoxifikaci ROS jako jsou fenolické látky a flavonoidy a současně je prekurzorem biosyntézy aromatických aminokyselin. Nedostatek vody a toxicita sodných iontů narušují aerobní metabolismus rostlinné buňky, což vede k akumulaci ROS. [39] Hromadění ROS má sice pozitivní vliv v signalizaci stresu, zvyšuje stabilitu mRNA pro SOS1, který je důležitou součástí SOS signální kaskády. Jedná se o Na^+/H^+ antiporter, který se významně podílí na pumpování sodných iontů z cytoplazmy do okolního prostředí nebo do vakuoly, čímž se zvyšuje odolnost rostliny. [43] Produkce ROS NADPH-oxidasou je však pro buňku energeticky náročná, neboť vyžaduje spotřebu NADPH. Kromě toho jsou aktivní formy kyslíku pro rostlinnou buňku vysoce toxické, proto se je rostlina snaží eliminovat jak enzymovými tak neenzymovými mechanismy. V listech rostlin okurky vystavené působení solného stresu bylo v porovnání s kontrolními rostlinami po celou dobu experimentu zjištěno zvýšené množství fenolických látek a flavonoidů (kapitola 4.6). Antioxidační schopnosti byly zvýšené nultý, druhý a třetí den působení stresu (obr. 39, str. 55) Zajímalo nás, zda zvýšená aktivita fenolických látek a flavonoidů souvisí s aktivitou antioxidačního enzymu guajakolperoxidasy, která může flavonoidy využít jako donor elektronů a detoxifikovat tak zvýšené množství peroxidu vodíku produkovaného za podmínek stresu. [109] To se však nepotvrdilo, aktivita guajakolperoxidasy v listech rostlin okurky byla snížena (obr. 40, str. 56). Je možné, že se jedná o isoformu peroxidasy vázanou v buněčné stěně, tudíž by byla potřebná její účinnější extrakce s využitím detergentu, nebo že se na obranné odpovědi tento enzym nepodílí.

Z minoritních enzymů byla v listech nejvíce zvýšená aktivita glycerol-2-dehydrogenasy (až 4,8-krát oproti kontrolní rostlině pěstované v půdě). Bakteriální isoforma tohoto enzymu se podílí na transportu glycerolu [90]. Zvýšení aktivity NADP-dependentních enzymů v listech okurky bylo doprovázeno zvýšeným množstvím NADP^+ a snížením poměru $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (tabulka 3A).

Tabulka 3 Poměr $NADPH/NADP^+$ v listech (A) a kořenech (B) rostlin okurky v průběhu působení solného stresu 100 mM - stresované rostliny, 0 mM – rostliny v destilované vodě a kontrolní rostliny.

A			
den	100 mM	0 mM	kontrola
0	0,5	3	11
1	6,4	5	8,5
2	1,7	4	9,4
3	0,7	1	7,1

B			
den	100 mM	0 mM	kontrola
0	37	2,4	0,89
1	1,6	5,5	0,91
2	0,34	0,56	0,92
3	12	15	1,0

Snížení poměru $NADPH/NADP^+$ bylo dokumentováno u rostlin rýže v pozdější fázi solného stresu, spolu se zvýšením aktivity G6PDH. [80] V rostlinách olivovníku bylo taktéž zjištěno, že v podmínkách solného stresu se nemění množství $NADPH$, zároveň klesá poměr $NADPH/NADP^+$ spolu s rostoucí aktivitou G6PDH, $NADP-ICDH$ a $NADP-ME$. [77] $NADP$ -dependentní dehydrogenasy se tedy v listech nejspíše podílejí na kompenzaci snížené dostupnosti $NADPH$ v podmínkách solného stresu. Zvýšením aktivity $NADP$ -dependentních enzymů je v rámci odpovědi vůči solnému stresu pravděpodobně poskytováno $NADPH$ potřebné jak pro antioxidační cykly, tak pro různé biosyntézy, např. biosyntézu osmoticky aktivních látek (prolinu, mannitolu), isoprenoidů a mastných kyselin pro opravy poškozených membrán, tak pro regulační systémy (např. $NADP$ -thioredoxinový systém). $NADP^+$ se také může podílet na mechanismech regulace transkripce pomocí poly- ADP -ribosylace a deacetylace. [57]

V kořenech byla aktivita většiny $NADP$ -dependentních enzymů zvýšená pouze nultý den vystavení solnému stresu, v tento den byl v kořenech výrazně zvýšen poměr $NADPH/NADP^+$ (viz Tabulka 3B). Zvýšení aktivity $NADP$ -dependentních enzymů tedy souvisí se zvýšeným poměrem $NADPH/NADP^+$. Snížený poměr $NADPH/NADP^+$ v listech stresovaných rostlin (tabulka 3A) by mohl souviset s uchováváním $NADPH$ v kořenech, jejichž zachování rostlina pravděpodobně preferuje před zachováním listů. V pozdější fázi solného stresu byly aktivity $NADP$ -dependentních enzymů v kořenech

sníženy, možná v důsledku inhibice způsobené vysokými koncentracemi sodných iontů v kořenech (viz obr. 20AB, str. 42). V kořenech daleko výrazněji klesal poměr K^+/Na^+ nejspíše z důvodu jejich přímého kontaktu se stresorem. Zároveň v nefotosyntetických částech rostliny, jako jsou kořeny, jsou NADP-enzymy odlišně regulovány. Např. regulace chloroplastové G6PDH závisí na světle indukovaném množství thioredoxinu, stejně jako na poměru NADPH/NADP⁺. [28]

Aktivity sledovaných enzymů byly vztaženy na čerstvou hmotnost, i když se hmotnost listu vlivem solného stresu mění (viz RWC), avšak specifickou aktivitu vztaženou na množství bílkovin ovlivňuje mnoho faktorů. Některé proteiny jsou stresem poškozeny a jsou směřovány k degradaci, jejich množství tedy klesá, u jiných proteinů naopak vlivem stresu dochází pomocí signalizačních drah ke zvýšené expresi. V rostlinách okurky bylo množství rozpustných proteinů zvýšené (obr. 15AB, str. 38). Tento nárůst je pravděpodobně způsoben zvýšenou expresí obranných proteinů, indukovanou solným stresem. Abiotickým stresem může být indukován i molekulární chaperon Hsp70, protein podílející se nejen na opravě poškozených proteinů, syntéze *de novo*, ale i na transportu proteinů a na ochraně fotosystému II před fotoinhibicí. Ve spolupráci s Hsp90 participuje na signalizaci ABA a uzavírání průduchů. [52] Cytoplazmatická koncentrace sodných iontů může v průběhu solného stresu způsobit chyby ve sbalování proteinů nebo jejich poškození; funkce Hsp70 je tedy pro buňku v těchto podmínkách prospěšná. V rostlinách okurky byla přítomnost Hsp70 sledována (obr. 18, str. 40), k nejvýznamnějšímu zvýšení množství tohoto proteinu došlo třetí den působení solného stresu. Zvýšení množství Hsp70 ve stresovaných rostlinách pravděpodobně ukazuje jeho roli v obranných reakcích vůči solnému stresu v rostlinách okurky. Zvýšená exprese Hsp70 byla zjištěna u rostlin čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor*, L.) vystavených solnému stresu. [110]

Se stresem také dochází ke zvýšení koncentrace PR proteinů (pathogenesis related proteinů), mezi které patří např. peroxidasy a glukonasy a které se mohou zvyšovat nejen při patogenezi, ale i působením abiotických stresorů a LEA proteinů (late embryogenesis abundant proteins). [111] Naopak jiné proteiny jsou působením stresu degradovány. Enzymem velice citlivým vůči nepříznivým podmínkám je Rubisco, snížení jeho množství bylo zjištěno i v listech rostlin okurky (obr. 16, str. 39). Z tohoto důvodu nejsou aktivity NADP-dependentních enzymů vztaženy na množství bílkovin.

Další otázkou bylo, jak provést kontrolní pokusy. Nejprve se nabízela možnost nahradit roztok 100 mM NaCl destilovanou vodou. Tyto rostliny však podle všeho byly

také vystaveny silnému osmotickému stresu. Docházelo u nich k poklesu RWC, mírnému zvýšení flavonoidů a fenolických látek a antioxidačních schopností. V kořenech docházelo v počáteční fázi stresu k nárůstu aktivity NADP-ME, v listech NP-GAPDH. Jedna z možností pro kontrolní skupinu bylo využití živného média, ale i vyjmutí kořenů z půdy představuje stres, proto jako kontrolní rostliny byly použity rostliny pěstované v půdě.

Vystavení rostlin okurky působení 100 mM NaCl indukovalo silný solný stres a vyvolalo obranné reakce na úrovni metabolických změn.

6 Závěr

Solný stres (100 mM NaCl) indukoval v rostlinách okurky seté (*Cucumis sativa* L. *convar. Jogger F1*) reakce v podobě zvýšení aktivity hlavních NADP-dependentních enzymů (především: glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, NADP-isocitrátdehydrogenasy, NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační), šikimát dehydrogenasy a nefosforylační glyceraldehydrofosfátdehydrogenasy) v listech experimentálních rostlin, zejména třetí den vystavení podmínkám zasolení. Stejně tak v raných fázích solného stresu došlo ke zvýšení aktivity méně zastoupených NADP-dependentních enzymů (glukosa-1-dehydrogenasy, glukonát-2-dehydrogenasy, ribosa-1-dehydrogenasy, galaktosa-1-dehydrogenasy a glycerol-2-dehydrogenasy) v listech i v kořenech stresovaných rostlin. V listech byl oproti kořenům zaznamenán snížený poměr NADPH/NADP⁺.

Dále bylo ve stresovaných rostlinách zjištěno zvýšené množství Hsp70, nárůst koncentrace antioxidantních látek (fenolických látek, flavonoidů) a antioxidantních schopností, snížení relativního obsahu vody a množství enzymu Rubisco v listech a snížení poměru K⁺/Na⁺ v listech i kořenech, což dokládá vystavení rostlin silnému solnému stresu.

7 Seznam použité literatury

1. Bray, E.A.: Trends Plant Sci. 2, 48–54 (1997)
2. <<http://www.fao.org/economic/ess/ess-agri/en/>>(1.8.2013)
3. <http://www.fao.org/docrep/R4082E/r4082e08.htm> > (1.8.2013)
4. Mahajan, S., Tuteja, N., Arch. Biochem. Biophys. 444, 139–158 (2005)
5. Pilon Smits, E.A.: Curr. Opin. Plant Biol. 12, 267–274 (2009)
6. Ohnishi, J., Flügge, U.I., Heldt, H.W., Kanai, R.: Plant Physiol. 94, 950–959 (1990)
7. Blumwald, E., Aharon, G.S., Apse, M.P., Biochim. Biophys. Acta. 1465, 140-151 (2000)
8. Hauser, F., Horie, T.: Plant Cell Environ. 33, 552–565 (2010)
9. Kronzucker, H.J.: New Phytol. 189, 54–81 (2011)
10. Hasegawa, P.M.: Environ. Exp. Bot. 92, 19–31 (2013)
11. Platten, J.D.: Trends Plant Sci. 11, 372–374 (2006)
12. Uozumi N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.P., Nakamura, T., Schroeder, J.I.: Plant Physiol. 122, 1249-1260 (2000)
13. Horie, T.: Plant J. 27, 129–138 (2001)
14. Huang, S.: J. Exp Bot. 59, 927–937 (2008)
15. Santa Maria, G.E.: Plant Cell. 9, 2281–2289 (1997)
16. Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., Rubio, F.: Environ. Exp. Bot. 65, 263–269 (2009)
17. Colmenero Flores, J.M.: Plant J. 50, 278–292 (2007)
18. Hussain, K.: Afr. J. Biotech. 4, 416–422 (2010)
19. Baliesteros, E., Blumwald, S. Donarie, J. P., Belver, A.: Physiol. Plantarum. 99, 228-234 (1997)
20. Qiu, Q.S.: P. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 8436–8441 (2002)
21. Ahmad, I., Hellebust, J.A.: Plant Physiol. 88, 348-354 (1988)
22. Zhu, J.K.: Curr. Opin. Plant Biol. 6, 441-445 (2003)
23. Craig Plett, D., Møller, I.S.: Plant Cell Environ. 33, 612–626 (2010).
24. Apse, P.M., Aharon, G.S., Snedden, W.A., Blumwald, E.: Science 285, 1256-1258 (1999)
25. Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A.Clipson, N.J.W.: Q.Rev. Biol. 61, 313-337 (1986)
26. Zhang, H., Han, B., Wang, T., Chen, S., Li, H., Zhang, Z., Dai, S., J Proteome Res, 11, 49-67(2012)

27. Turkan, I., Demiral, T.: *Environ. Exp. Bot.* 67, 2-9 (2009)
28. Heldt, H. W., Piechulla, B., Heldt, F.: *Plant Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo (2011)
29. Bartels, D., Sunkar, R.: *Crc. Crit. Rev. Plant Sci.* 24, 23–58 (2005)
30. Shi, H., Zhu, J.K.: *Plant Mol. Biol.* 50, 543-550 (2002)
31. Saeed, M., Dahab, A.A., Wangzhen, G., Tianzhen, Z.: *Omics* 16, 188–199 (2012)
32. Parida, A.K., Das, A.B.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 324-349 (2005)
33. Nonami, H.: *Plant Physiol.* 93, 1601–1609 (1990)
34. den Boer, B.G.W., Murray, J.A.H., *Trends Cell Biol.* 10, 245-250 (2000)
35. Schuppler, J.I., He, P.H., John, P.C.L., Munns, R.: *Plant Physiol.* 117, 667-678 (1998)
36. Setter, T.L., Flannigan, B.A.: *J. Exp. Bot.* 52 (2001)
37. Wang, H.: *The Plant J.* 15, 501–510 (1998).
38. Bohnert, H.J., Jensen, R.G.: *Trends Biotechnol.* 14, 89–97 (1996).
39. Zhu, J.K.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 53 247-273 (2002)
40. Liu, J., Zhu, J.K.: *Science* 280, 1943-1945 (1998)
41. Liu, J., Ishitani, M., Halfer, U., Kim, C.S., Zhu, J.K.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3730-3734 (2000)
42. Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., Zhu, J.K.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6896–6901 (2000)
43. Shi, H., Lee, B.H., Wu, S.J., Zhu, J.K.: *Nat. Biotech.* 21, 81–85 (2003)
44. Chung, J.S., Zhu, J.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Shi, H.: *Plant J.* 53, 554-565 (2008)
45. Piterkova, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P.: *Chem. Listy.* 99, 455–466 (2005).
46. Apel, K., Hirt, H.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399 (2004)
47. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V.: *Ann. Bot.* 91, 179–194 (2003)
48. Foyer, C., Halliwell, B.: *Planta.* 133, 21–25 (1976)
49. Cosio, C., Dunand, C.: *J. Exp. Bot.* 60, 391–408 (2009)
50. Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H.: *Plant Cell Physiol.* 42, 462–468 (2001)
51. Khatun, S., Ali, M.B., Hahn, E.J., Paek, K.Y.: *Environ. Exp. Bot.* 64, 279-285 (2008)
52. Liu, Q.L., Zhong, M., Pan, Y.Z., Jiang, B.B., Jia, Y., Zhang, H.Q.: *Plant Physiol. Bioch.* 69, 27-33 (2013)

53. Doubnerová V., Ryšlavá H.: Roles of Hsp70 in plant abiotic stress. *Molecular Approaches for Plant Abiotic Stress*. Eds.: Gaur, R.K., Sharma, P. Science Publishers/CRC Press, kapitola v knize
54. Wang, W. X., Vinocur, B., Altman, A.: *Planta*. 218, 1-14 (2003)
55. Lin, Z.H., Chen, L.S., Chen, R.B., Zhang, F.Z., Jiang, H.X., Tang, N., Smith, B.R.: *J. Plant Physiol.* 168, 644–652 (2011)
56. Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L.: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland (2000)
57. Hashida, S., Takahashi, H., Uchimzia, H.: *Annal. Bot. London*. 103, 819-824 (2009)
58. Pollak, N. , Dölle, Ch., Ziegler, M: *Biochem J.* 402, 205-218, (2007)
59. Pétriacq, P., de Bont, L., Tcherkez, G., Gakière, B.: *Plant Signaling Behav.* 8, 7-17 (2013)
60. Noctor, G.: *Plant Cell Environ.* 29, 409-425 (2006)
61. Ding, L., Hofius, D., Hajirezaei, M.R., Fernie, A.R., Boernke, F., Sonnewald, U., *J. Exp. Bot.* 58, 2053-2067 (2007)
62. Chen, R., Le Maréchal, P., Vidal, J., Jacquot, J.P., Gadal, P.: *Eur. J. Biochem.* 175, 565-572 (1988)
63. Leterrier , M., del Río, L.A., Corpas, F.J., *Free Radical Res.* 41, 49-67 (2007)
64. Kulichikhin, K.Y., Chirkova, T.V., Fagestedt, K.V.: *Russ. J. Plant. Physl.* 56, 377-388 (2008)
65. Liu, Y., Wu, R., Wan, Q., Xie, G., Bi, Y.: *Plant Cell Physiol.* 48, 511-522 (2007)
66. Kong, W. F., Chen, J. Y., Hou, Z. X., Wen, P. F., Zhan, J. Ch., Pan, Q. H., Huang, W. D.: *J. Plant Physiol.* 164, 934-944 (2007)
67. Vodrážka, Z.: *Biochemie, Academia, Praha* (2007)
68. Gómez Casati, D.F., Sesma, J.I., Iglesias, A.A.: *Plant Science.* 154, 107–115 (2000)
69. Piattoni, V.C., Ruis, S.P., Gomez-Casati, D.F., Guerrero, S.A., Iglesias, A.A.: *Biochimie*, 92, 909-913 (2010)
70. Pupillo, P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 194, 581–592 (1979)
71. Muir, R.M., Ibáñez, A.M., Uratsu, S.L., Ingham, E.S., Leslie, C.A., McGranahan, G.H., Batra, N., Goyal, S., Joseph, J., Jemmis, E.D., Dandekar, A.M.: *Plant. Mol. Biol.* 75, 555–565 (2011).
72. Sun, S.B., Shen, Q.R., Wan, J.M., Liu, Z.P.: *Acta Biochim Biophys.* 35, 423-429 (2003)

73. Leterrier, M, Barroso, J.B., Valderrama,R., Palma, J.M., Corpas, F.J.: *Biol. Plantarum.* 56, 705-710 (2012)
74. Santo, S.D., Stampfl, H., Krasensky, J., Kempa, S., Gibon, Y., Petutschnig, E., Rozhon, W., Heuck, A., Clausen, T., Jonak, C.: *Plant Cell.* 24, 3380–3392 (2012)
75. Molina, C., Zaman-Allah, M., Khan, F., Fatnassi, N.,Horres, R., Rotter, B.,Steinhauer, D.,Amenc, L.,Drevon, J.J., Winter, P., Kahl, G.: *Plant Biol.* 11, 1471-2229 (2011)
76. Montanari, M., Degl’Innocenti, E., Maggini, R., Pacifici, S., Pardossi, A., Guidi, L.: *Food Chem.* 107, 1461–1466 (2008)
77. Valderama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M.V., Chaki, M., Pedrajas, J.R., Fernández-Ocaña, A., del Río, L.A., Barroso, J.B.: *Plant Cell Environ.* 29, 1449-1459 (2006)
78. Liu, S., Cheng, Y., Zhang, X., Guan, Q., Nishiuchi, S., Hase, K., Takano, T.: *Plant Mol. Biol.* 64, 49-58, (2007)
79. Huang, J.,Zhang, H., Wang, J., Yang, J.: *Mol. Biol. Rep.* 30, 223-227(2003)
80. Zhang L, Liu J, Wang X, Bi Y.: *Plant Growth Regul.* 69, 139-148 (2013)
81. Muscolo, A., Panuccio, M.R., Sidari, M.: *Plant Sci.* 164, 1103–1110 (2003)
82. Liu, Y., Wu, R., Wan, Q., Xie, G., Bi, Y.: *Plant Cell Physiol.* 48, 511-522 (2007)
83. Olmos, E.: *Plant Sci.* 120, 37–45 (1996).
84. Fu, Z.Y., Zhang, Z.B., Liu, Z.H., Hu, X.J., Xu, P.: *Biol. Plant.* 55, 196–200 (2011)
85. Omoto, E., Taniguchi, M., Miyake, H.: *J. Plant Physiol.* 169, 469–477 (2012)
86. Adachi, O., Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyama, M.: *Agr. Biol. Chem. Tokyo.* 44, 301–308 (1980)
87. Avigad, G., Alroy, Y., Englard, S.: *J. Biol. Chem.* 243, 1943-1941 (1968)
88. Ameyama, M., Adachi, O.: *Methods Enzymol.* 89, 203-210 (1982)
89. Yum, D.Y., Lee, B.Y., Hahm, D.H., Pan, J.G.: *J. Bacteriol.* 180, 5984–5988 (1998)
90. De Werra, P., Péchy-Tarr, M., Keel, C., Maurhofer, M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4162–4174 (2009)
91. <www.bernda-enzymes.org> (1.7.2013)
92. Adachi, O., Ano, Y., Shinagawa, E., Matsushita, K.: *Biosci. Biotech. Bioch.* 72, 2124–2132 (2008)
93. Chen, H.: *PLOS ONE.* 7, (2012)
94. Aydin, N., Kdioglu, A.: *Bulg. J. Plant Physiol.:* 27, 85-92 (2001)
95. Weahterley, P.E.: *New Phytol.* 49, 81-91, (1949)

96. Cicco, N., Lanorte, M.T., Paraggio, M., Viggiano, M., Lattanzio, V.: *Microchem. J.* 91, 107–110 (2009)
97. Liu, et al., *J. Agric. Food. Chem.* 50, 2926-2930 (2002)
98. Tsao, R., Yang, R., Xie, S, Sockovie, E., Khanizadeh, S.: *J. Agr. Food Chem.* 53, 4989-4995 (2005)
99. Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
100. Dráb, T., Kračmerová, J., Tichá, I., Hanzlíková, E., Tichá, M., Ryšlavá, H., Doubnerová, V., Maňásková-Postlerová, P., Liberda, J.: *Electrophoresis.* 32, 3597-3599 (2011)
101. Laemmli, U.K.: *Nature.* 227, 680-685 (1970)
102. Cominelli, E., Conti, L., Tonelli, C., Galbiati, M.: *New Biotechnol.* 30, 355-361 (2013)
103. Plisková, V.: Souvislost abiotického stresu s NADP-dependentními enzymy v rostlinách: Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str.19-26 (2011)
104. Kovalová, T.: Vliv stresu na NADP-dependentní enzymy ve vyšších rostlinách: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 39-61 (2012)
105. Pitann, B., Mohamed, A.K., Neubert, A.B., Schubert, S.: *J. Plant Nutr. Soil Sc.* 176, 148-156 (2013)
106. Manabe, Y., Bressan, R.A., Wang, T., Li, F., Koiwa, H., Sokolchik, I., Li, X., Maggio, A.: *Plant Physiol.* 146, 612–622 (2007)
107. Obata, T., Kitamoto, H. K., Nakamura, A., Fukuda, A., & Tanaka, Y.: *Plant Physiol.* 144, 1978-1985 (2007)
108. Aleman, F., Nieves Cordones, M., Martinez, V., Rubio, F.: *Plan Cell Physiol.* 52, 1603-1612 (2011)
109. Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P.: *J. Plant Growth Regul.* 32, 216-232 (2013)
110. Ngara, R., Ndimba, R., Borch-Jensen, J., Jensen, O. N., Ndimba, B.: *J. Proteomics.* 75, 4139-4150 (2012)
111. Turan, S., Cornish, K., Kumar, S.: *Aust. J. Corp Sci.* 6, 1337-1348 (2012)

