UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Vliv sucha na metabolismus rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: Mgr. Veronika Doubnerová

Praha 2008

Lucia Miedzińska

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE

3233218459

př. č. 106 B/08 stud
UNIVERZITA KARLOVA v Praze (brož)
Přírodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

PROHLÁŠENÍ

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

V Praze, dne 5. června 2008

Na tomto místě bych chtěla poděkovat hlavně své školitelce RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za odborné vedení a cenné rady v průběhu bakalářské práce. Dále také Mgr. Veronice Doubnerové, za pomoc a spolupráci při bakalářské práci a práci v laboratoři.

V neposlední řadě také Ing. Karlovi Müllerovi a RNDr. Radomíře Vaňkové za poskytnutí materiálu a pomoc při jeho odběru.

Obsah

Seznam použitých zkratek 6

1 ÚVOD 7
1.1 Průběh stresové reakce 8
1.2 Vliv abiotického stresu na metabolismus rostlin 9
1.3 Vodní stres 10
1.4 Fosfoenolpyruvátkarboxylasa 14
1.4.1 Výskyt a funkce PEPC 14
1.4.2 PEPC a stres 14
1.4.3 Regulace PEPC 15
1.5 Pyruvát, orthofosfátdikinasa 15
1.5.1 Výskyt PPDK 15
1.5.2 PPDK a stres 15
1.6 NADP – malátdehydrogenasa 16
1.6.1 Výskyt NADP-ME 16
1.6.2 Funkce NADP-ME 16
1.6.3 Regulace NADP-ME 17
1.6.4 NADP-ME a stres 17
1.7 Cíl práce 18

2 MATERIÁL A METODY 19
2.1 Materiál 19
2.2 Chemikálie 19
2.3 Přístroje 19
2.4 Metody 20
2.4.1 Příprava rostlinného materiálu 20
2.4.2 Odběr vzorků z rostlinného materiálu 20
2.4.3 Příprava rostlinného extraktu 22
2.4.4 Stanovení enzymové aktivity 22
2.4.4.1 Stanovení aktivity PEPC 23
2.4.4.2 Stanovení aktivity PPDK 23
2.4.4.3 Stanovení aktivity NADP-ME 23
2.4.5 Stanovení koncentrace bílkovin 24

3 VÝSLEDKY 25
3.1 První pokus 25
3.1.1 Aktivita PEPC v rostlinách *Nicotiana tabacum* L. 25
3.1.2 Aktivita PPDK v rostlinách *Nicotiana tabacum* L. 27
3.1.3 Aktivita NADP-ME v rostlinách *Nicotiana tabacum* L. 28
3.1.4 Koncentrace rozpustných bílkovin v různých částech *Nicotiana tabacum* L. 29
3.2 Druhý pokus 31
3.2.1 Aktivita PEPC v rostlinách *Nicotiana tabacum* L. 31
3.2.2 Aktivita PPDK v rostlinách *Nicotiana tabacum* L. 33
3.2.3 Aktivita NADP-ME v rostlinách *Nicotiana tabacum* L. 35
3.2.4 Koncentrace rozpustných bílkovin v různých částech *Nicotiana tabacum* L. 37

4 DISKUSE 39

5 ZÁVĚR 41

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 42

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

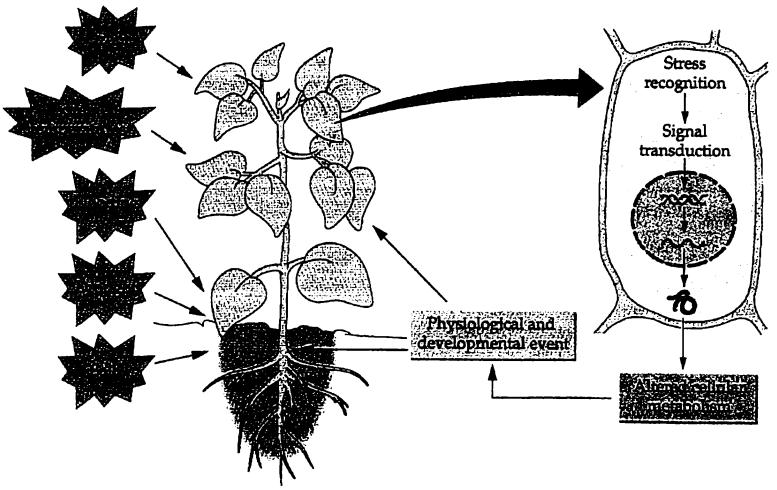
ABA	kyselina abscisová
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
C_3 rostlina	rostlina, u které je prvním fotosyntetickým produktem 3-fosfoglycerát (tříuhlíkatá sloučenina)
C_4 rostlina	rostlina, u které je prvním fotosyntetickým produktem oxalacetát (čtyřuhlíkatá sloučenina)
CAM	Crassulacean acid metabolism
CYP450	cytochrom P450
CYP707A	cytochrom patřící do rodiny cytochromů P450
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraacetát
MPa	mega Pascal – jednotka tlaku
NAD^+/ NADH	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaný/redukovaný)
$NADP^+$/ NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný/redukovaný)
NADP-ME	NADP – malátdehydrogenasa
OAA	oxalacetát
PEP	fosfoenolpyruvát
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových kationtů
P_i	anorganický fosfát
PPDK	pyruvát, orthofosfátdikinasa
PVP	polyvinylpolypyrrolidon
RPM	počet otáček za minutu
RuBisCo	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 ÚVOD

Rostliny, stejně jako lidé, žijí v určitém životním prostředí. Toto životní prostředí se vyznačuje proměnlivými vnějšími podmínkami. Dané podmínky mohou být pro růst, vývoj a rozmnožování rostlin příznivé, anebo jsou méně vhodné. V případě nepříznivých vlivů dochází k přizpůsobování rostlin. Přizpůsobování rostlin vede k zpomalení životních funkcí či poškozování rostlinných orgánů. Pokud však není rostlina schopna se přizpůsobit, může dojít až k jejímu úhynu [1], [3], [6]. Pro každý rostlinný druh lze zvolit interval mezi minimální a maximální tolerovanou hodnotou faktoru působícího na rostlinu, tento interval je nazýván **ekologická valence faktoru** [1], [2], [3].

Jako **stresové faktory** (stresory) jsou označovány nepříznivé vlivy vnějšího prostředí, které narušují celistvost rostlin. **Stres** je stav rostliny, ve kterém se nachází pod vlivem stresorů [1], [3], [9]. Na rostlinu většinou nepůsobí jen jeden stresový faktor, ale několik faktorů najednou (viz. obr. 1.1). Jde tedy vždy o dynamickou rovnováhu mezi řadou spolupůsobících faktorů. Stresy mohou vést u rostlin k mnoha změnám na různých úrovních. Jedná se o **modifikace** a **mutace**. Modifikace je nedědičná genotypická změna, která trvá až do vyznění příčiny a nepřenáší se na potomstvo. Mutace je trvalá, genetická změna, která se předává dále na potomstvo [2].

Stresové faktory se dělí do dvou skupin: **abiotické faktory** a **biotické faktory** [1], [2], [3]. Abiotické faktory se dále člení na fyzikální a chemické. Mezi fyzikální patří např. teplotní faktory, záření či vliv větru a mezi chemické patří nedostatek či nadbytek nezbytných živin pro rostliny nebo přítomnost toxických látek. Mezi biotické faktory se řadí např. napadení patogenními mikroorganismy či konkurence mezi organismy.



Obr. 1. 1 Různé typy abiotického stresu působí změny ve vývoji a fyziologii rostliny [21]

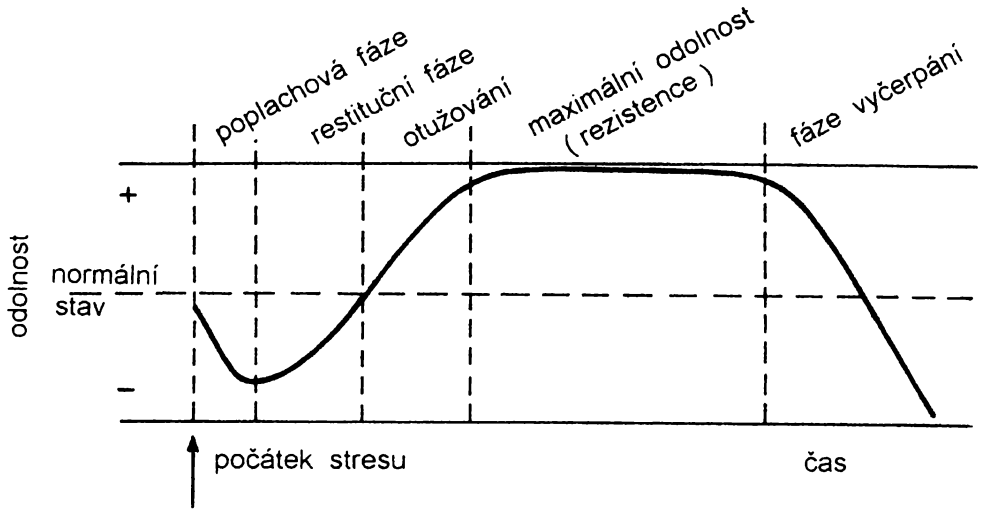
1.1 Průběh stresové reakce

Rostliny jsou vůči působení různých vnějších vlivů přizpůsobeny různě vyvinutými ochrannými strukturami (např. silná kutikula a impregnace buněčných stěn). Toto přizpůsobení vede k tomu, že se rostlina vyhne stresu úplně (avoidance) nebo odolává působení stresorů (tolerance). Může také dojít k tomu, že se rostlina nedokáže vyhnout stresu (intolerance) a v takovémto případě dochází k poškození organismu nebo až k úhynu [1], [2], [3], [6].

Rostliny tolerantní vůči stresu byly dříve získávány křížením, avšak v poslední době se využívají transgenní rostliny nesoucí vhodný gen [5].

Stresová reakce (viz. obr. 1.2) je charakterizována několika po sobě jdoucími fázemi [1], [2], [3].

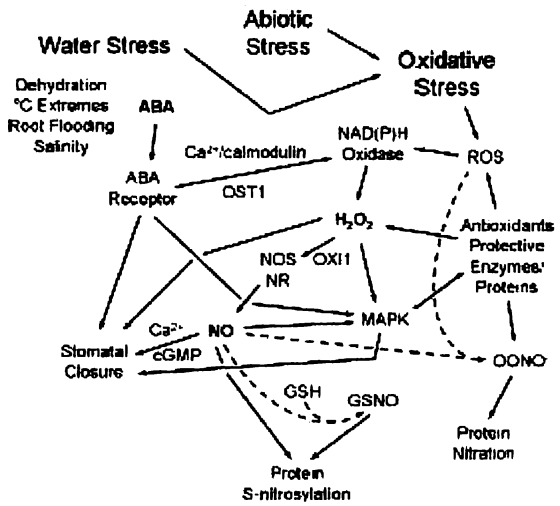
Ihned po začátku působení stresového faktoru nastává první fáze a to **fáze poplachová**, kdy dochází k narušení životních funkcí a buněčných struktur rostliny. Dále mohou nastat dva případy. V prvním případě může dojít k tomu, že intenzita působení stresového faktoru překročí letální mez a rostlina uhyne, v druhém případě intenzita působení nepřekročí tuto mez a rostlina spustí vyrovnávací mechanismy-**restituční fáze**, což vede ke zvýšení odolnosti rostliny vůči stresorům. Období odolnosti rostliny se nazývá **fáze rezistence.** Při dlouhodobém a intenzivním působení stresových faktorů však fáze rezistence přejde do **fáze vyčerpání**, kdy odolnost rostliny klesá. Celý průběh stresové reakce a její výsledek je ovlivněn především intenzitou a délkou působení stresových faktorů a také závisí na adaptačních schopnostech rostliny, které jsou dány genetickými předpoklady [1], [2], [3].



Obr. 1. 2 Schéma průběhu stresové reakce [1]

1.2 Vliv abiotického stresu na metabolismus rostlin

Abiotický stres působí aktivaci několika obranných odpovědí rostliny (viz. obr. 1.3). Jednou z nejdůležitějších je zvýšení množství fytohormonu ABA, která reguluje uzavírání průduchů [6], [7], [8]. ABA moduluje rovněž expresi řady genů, např. osmoprotektivních proteinů jako jsou dehydriny [1]. Abiotický stres je také provázen tvorbou aktivních forem kyslíku především superoxidového radikálu a peroxidu vodíku. Tyto látky mohou působit přímo oxidativní poškození, což je zvláště důležité v případě infekce patogenními mikroorganismy, ale působí i jako signální molekuly. Buňky chrání před oxidativním poškozením systém antioxidačních enzymů a antioxidačních sloučenin [40]. Další signalizační molekulou je NO [40].



Obr. 1. 3 Metabolické cesty aktivované abiotickým stresem [40]

1.3 Vodní stres

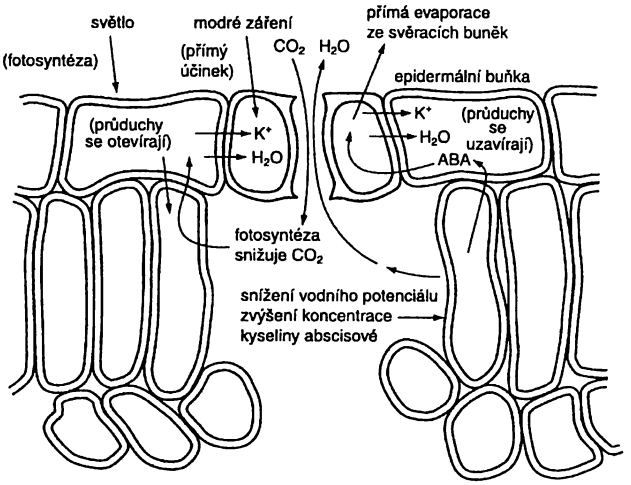
Jedním z nejčastějších stresových faktorů je vodní stres. Vodní stres může být zapříčiněn nedostatkem, ale i nadbytkem vody. Nadbytek vody působí hypoxii v rostlinách. Nedostatek vody v rostlině je způsoben jednak suchem, jednak nedostatkem příjmu vody pomocí kořenů rostlin v zasolených půdách, nebo za chladu [1], [4], [22].

Rostlina potřebuje obrovské množství vody, jelikož její koloběh je příliš rychlý a zásoba vody v půdě či v rostlinách stačí jen na krátkou dobu, pokud není neustále doplňována. K udržení maximální rychlosti růstu rostliny je potřeba udržovat turgor (tlakový potenciál) buněk, což není úplně jednoduché, jelikož ve dne rostlina přijímá CO_2 pro fotosyntézu. Tento proces, při kterém se otevírají průduchy, je doprovázen ztrátou vody a tedy i ztrátou turgoru buňky [1], [3]. Při poklesu turgoru o 0,1 až 0,2 MPa můžeme zaznamenat zpomalení růstu. K úplnému zastavení dochází při tzv. prahových hodnotách turgoru 0,3 až 0,4 MPa [2].

Podle stavu vody v rostlině (vodního potenciálu) můžeme určit, jak velkému stresu je rostlina vystavena a v jaké fázi se zrovna vyskytuje [7]. Při působení sucha dochází ke snižování vodního potenciálu. Pokud hodnoty vodního potenciálu neklesnou pod -0,5 MPa hovoříme o mírném stresu, v rozmezí hodnot od -0,5 až -1,5 MPa je oblast středně velkého stresu a v případě poklesu vodního potenciálu pod hodnotu -1,5 MPa se jedná o velmi silný stres. Při velmi silném stresu dochází současně k poklesu turgoru až na 0, což zapříčiňuje uvadání listů. Podle hodnot turgoru lze tedy usoudit, že nejdříve dochází k zastavení růstu a až poté k uvadnutí [1], [2], [3].

Pod vlivem působení sucha dochází nejdříve k poklesu vodního potenciálu na -0,1 až -0,2 MPa, což zapříčiní zpomalení růstu, hromadění nevyužitých asimilátů a ovlivnění metabolických pochodů včetně fotosyntézy [1]. Dalším poklesem vodního potenciálu na hodnoty -0,2 až -0,8 MPa dochází ke změnám aktivit enzymů, ovlivnění syntézy proteinů, zpomalení buněčného dělení či zvýšení koncentrace kyseliny abscisové. Když snižování vodního potenciálu stále pokračuje až k hodnotám okolo -1,0 MPa, v rostlině dochází k syntéze specifických metabolitů. Pokud by ovšem vodní potenciál klesal dále, došlo by k vážným metabolickým změnám jako například k zastavení fotosyntézy [2], [3]. Jestliže ale v tomto případě dojde k dodání vody, je rostlina schopná se postupně vrátit do původního stavu. Překročí-li však hranici vodního potenciálu -2,0 MPa, už nemůže dojít ke zpětné regeneraci rostliny[1].

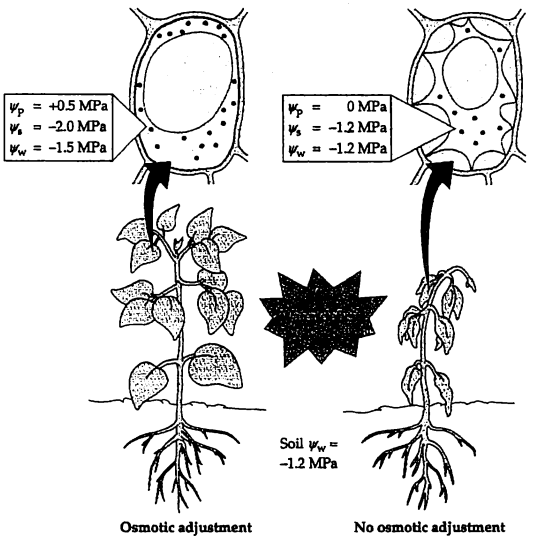
Při hodnotě vodního potenciálu mezi -0,2 a -0,8 MPa dochází mimo jiné ke zvýšení koncentrace kyseliny abscisové (déle jen ABA) až 40-ti násobně. Strukturní rysy nezbytné pro biologickou aktivitu této molekuly jsou volná karboxylová skupina a cyklohexanový kruh, který musí obsahovat dvojnou vazbu na α či β pozici, přičemž konfigurace C2 dvojné vazby musí být cis. ABA vzniká *in vivo* hydrolýzou abscisis-β-D-glukopyranosidu. Původně byla ABA nalezena v listech dřevnatých rostlin, ale posléze byla izolována i ze semen. ABA je tedy produkována působením sucha a sama působí mnohonásobným efektem. Jednak jako regulátor průduchů a dormance, majoritní rolí je však ovlivňování průduchů [8]. Při vyvinutí stresu dojde ke zvýšení koncentrace ABA v ochranných buňkách, tyto buňky ztratí K^+ ionty, a tudíž i turgor, čímž dojde k uzavření průduchů a ochraně buňky před vysycháním (proces viz. obr. 1.4). Hladina ABA je určena podílem její biosyntézy a katabolismu. Katabolismus probíhá dvojím způsobem, buď oxidativně, kdy je ABA hydroxylována na kyselinu pomocí katalýzy CYP707A, který patří do skupiny CYP450, nebo pomocí konjugace s cukernou složkou např. jako ABA glukosylester, který je uskladněn ve vakuolách [6]. Kvůli uzavírání průduchů dochází ke snížení výměny plynů, což ovlivní i fotosyntézu a transpiraci [1], [19] . Zvýšená koncentrace ethylenu má hlavní význam při zvýšení odolnosti rostlin vůči suchu či mrazu [3].



Obr. 1. 4 Proces uzavírání průduchů ovlivněný produkcí ABA [4]

Průduchová regulace výměny plynů slouží ke snížení ztráty vody při přijímání CO_2 důležitého pro fotosyntézu. V aridních oblastech mají rostliny C_4 a CAM vyvinuty fixační cesty pro CO_2, aby se dokázaly adaptovat na omezení ztráty vody při asimilaci uhlíku [1]. CAM rostliny sukulentního typu jsou suchu přizpůsobeny nejlépe, a to proto, že při světelné fázi fotosyntézy jsou průduchy uzavřeny. Koncentrace osmolytů u těchto rostlin je velmi malá [1].

K hromadění specifických metabolitů v rostlině dochází při hodnotách vodního potenciálu okolo -1,0 MPa [3]. Jejich funkce vede k udržení buněčného turgoru či struktury buněk během působení sucha, působí jako osmolytika (viz obr. 1.5). Mezi osmolyty patří sacharidy (rafinosa, sacharosa, thehalosa), cukerný alkohol (sorbitol), aminokyseliny (prolin, glycin) a betainy [6], [7]. Manitol hraje důležitou roli při odstraňování hydroxylových radikálů či při stabilizaci makromolekulární struktury, D-ononitol je používán jako ochrana enzymů a membrán poškozených efektem hydroxylových radikálů [6].



Obr. 1. 5 Vodní potenciál v rostlině, která osmolyty syntetizuje (vlevo) a nesyntetizuje (vpravo), ψ_p-tlakový potenciál (turgor), ψ_s-osmotický potenciál, ψ_w-vodní potenciál [21]

Narůstající množství prolinu se nachází v uvadlých rostlinách. Prolin působí nejen jako osmolytikum, ale i ke stabilizaci proteinů či jako vychytávač volných radikálů [7]. Nedostatek prolinu způsobuje snížení tolerance vůči suchu. Jeho nadbytek je však také škodlivý, protože působí inhibičně na růst a v takové míře je pro rostlinu toxický [6].

Při hodnotách vodního potenciálu okolo -0,2 až -0,8 MPa dochází také ke změně aktivity některých enzymů [1], [2], [3]. Významně je snížená aktivita nitrátreduktasy, je

tedy zpomalena redukce nitrátu. Naopak aktivita mnoha hydrolas, především α-amylasy, ribonukleasy je zvýšená, zvyšuje se tedy hydrolýza škrobu [1], [7].

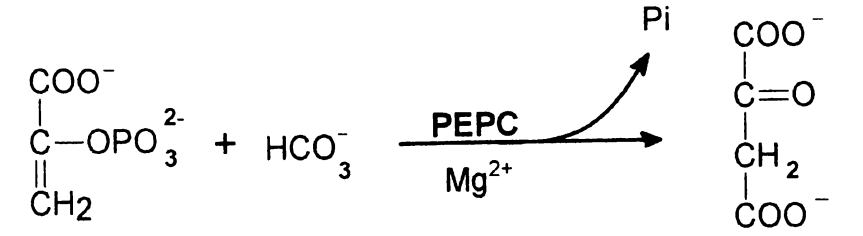
Řada proteinů je indukovatelná v rostlině v závislosti na ztrátě vody vysokým obsahem solí v půdě nebo chladem. Jedná se například o dehydriny [7], [3].

1.4 Fosfoenolpyruvátkarboxylasa

/EC 4.1.1.31; dále jen PEPC/

Systematický název – fosfát : oxalacetát karboxylasa (fosforylační)

Je to enzym katalyzující β-karboxylaci fosfoenolpyruvátu (PEP) v přítomnosti HCO_3^- a bivalentního kationtu kovu (Mn^{2+} či Mg^{2+}) za vzniku oxalacetátu a anorganického fosfátu. Tato reakce je ireverzibilní. Vzniklý oxalacetát může být dále redukován pomocí NAD – malátdehydrogenasy na malát [11], [12], [13].



fosfoenolpyruvát

oxalacetát (OAA)

1.4.1 Výskyt a funkce PEPC

Tento cytosolový enzym je přítomný ve všech fotosyntetizujících organismech (jako např. ve vyšších rostlinách a v řasách) či nefotosyntetizujících bakteriích. Nebyl však nalezen v živočišných buňkách, kvasinkách či houbách [11]. Hraje důležitou roli při zrání plodů, vývoji semen či jejich klíčení, také je přítomný při dělení buněk či při ontogenezi [11], [12].

PEPC přítomná v mezofylových buňkách C_4 rostlin a v CAM rostlinách má fotosyntetickou funkci, tzn. katalyzuje primární fixaci CO_2. Funkcí PEPC v nefotosyntetických částech rostlin a v C_3 rostlinách je doplňování intermediátů citrátového cyklu a poskytování uhlíkových skeletů pro syntézu aminokyselin. Další funkcí je regulace buněčného pH [13].

1.4.2 PEPC a stres

Bylo zjištěno, že v rostlinách dochází ke změně aktivity PEPC vlivem stresu [13]. Např. v kořenech pšenice byla zjištěna dvojnásobná exprese PEPC působením sucha, zimy či NaCl a LiCl [13], [20].

1.4.3 Regulace PEPC

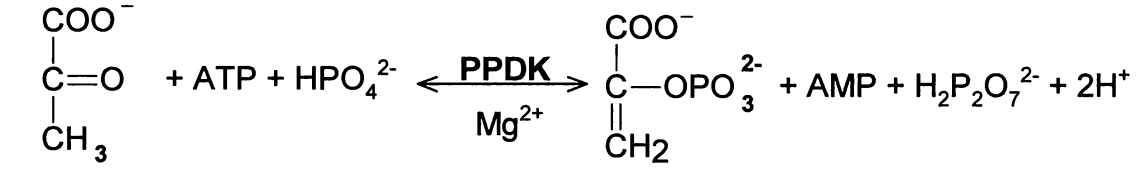
PEPC je regulována na mnoha úrovních. Je citlivě regulována pomocí pH; i malá změna pH cytoplasmy působí změnu v aktivitě PEPC [11]. Dále se na regulaci aktivity podílejí inhibitory, především malát, aspartát i další meziprodukty citrátového cyklu a aktivátory (glukosa-6-fosfát) [13]. PEPC je také fosforylována především specifickou PEPC kinasou na serinu blízko N-konce [11]. Tato fosforylace znamená změnu vlastností enzymu, často zvýšení maximální rychlosti reakce, snížení citlivosti vůči inhibici malátem či zvýšení citlivosti vůči aktivaci glukosa-6-fosfátu [12].

1.5 Pyruvát, orthofosfátdikinasa

/EC 2.7.9.1; dále jen PPDK/

Systematický název - ATP : pyruvát, fosfát fosfotransferasa

Enzym katalyzující reakci, při níž dochází k přeměně pyruvátu, za přítomnosti ATP a anorganického fosfátu na fosfoenolpyruvát (PEP), AMP a pyrofosfát. Reakce probíhá v přítomnosti hořečnatých iontů [17].



pyruvát fosfoenolpyruvát

1.5.1 Výskyt PPDK

Výskyt PPDK je lokalizován především v chloroplastu mezofylových buněk C_4 rostlin a v CAM rostlinách, kde je odpovědný za produkci PEP, který slouží jako primární akceptor CO_2. Vyskytuje se i v C_3 rostlinách, kde jeho funkce není zcela dobře známa [17].

Jsou známy dvě isoformy, a to PPDK v cytosolu a chloroplastu.V bakteriích dochází ke katalýze reverzibilní reakce, čímž se z fosfoenolpyruvátu získává ATP [17].

1.5.2 PPDK a stres

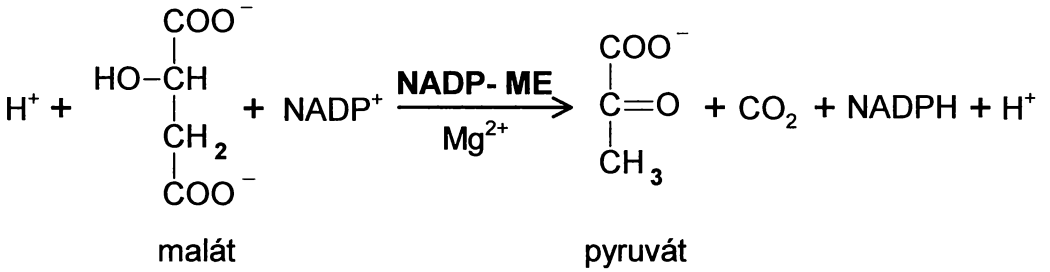
Abiotický stres jako je nedostatek kyslíku, vody či působení ABA byl zkoumán v souvislosti s aktivitou PPDK. Bylo zjištěno, že tyto typy stresu zvyšují expresi cytosolové formy PPDK v rýži [17].

1.6 NADP – malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)

/E.C 1.1.1.40; dále jen NADP-ME/

Systematický název – L-malát : $NADP^+$ oxidoreduktasa

NADP-ME patří mezi oxidoreduktasy. Katalyzuje přeměnu L-malátu na pyruvát a oxid uhličitý v přítomnosti bivalentního kationtu kovu (Mn^{2+} či Mg^{2+}) a koenzymu $NADP^+$. Tato reakce je reverzibilní, ale převládá ve směru dekarboxylace (v případě *in vivo*) [14], [15].



1.6.1 Výskyt NADP-ME

NADP-ME se nachází v živočišných tkáních, v rostlinách, ale také v prokaryotických a eukaryotických mikroorganismech. U rostlin se vyskytuje v listech, stoncích, etiolovaných tkáních, kořenech, semenech a plodech. U živočichů ho nalézáme především v játrech a tukové tkáni [14].

Podle výskytu v buňce rozlišujeme dvě isoformy tohoto enzymu, a to cytosolovou a plastidovou formu[14], [16].

NADP-ME se vyskytuje především jako tetramer, ale v některých rostlinách může být přítomen i jako dimer s nižší aktivitou. Zda-li se enzym vyskytuje jako tetramer či dimer, může ovlivňovat hodnota pH (např. při pH=7 je NADP-ME z kukuřice ve formě dimeru) [14].

1.6.2 Funkce NADP-ME

Funkce NADP-ME v C_4 a CAM rostlinách je fotosyntetická, malát je dekarboxylován na pyruvát a uvolněný CO_2 je substrátem ribulosobisfosfátkarboxylasy v Calvinově cyklu [14]. V nefotosyntetických částech rostlin je NADP-ME spojen především s biosyntézou lipidů a dalších látek procesy, ve kterých je využíván redukovaný NADPH. Pyruvát může být využit jako zdroj energie. V živočišných tkáních souvisí NADP-ME také se syntézou tuků, steroidů či detoxifikačními reakcemi [15].

1.6.3 Regulace NADP-ME

NADP-ME z různých zdrojů je regulován různým způsobem. Např. živočišný enzym může být inhibován pomocí ATP, nebo aktivován fumarátem či sukcinátem [14].

1.6.4 NADP-ME a stres

Bylo zjištěno, že na některé typy stresu reaguje rostlina zvýšením aktivity NADP-ME [16]. Rostlina *Mesembryanthemum crystallinum*, která má přechodný typ fotosyntézy, reaguje na nedostatek vody a soli v půdě přepnutím fotosyntézy z C_3 na typ CAM a dochází tedy ke zvýšení aktivity NADP-ME [16].

1.7 Cíl práce

Cílem bakalářské páce bylo zjistit, zda existuje souvislost mezi aktivitou enzymů PEPC, PPDK a NADP-ME v rostlinách *Nicotiana tabacum* L. cv. W38 a nedostatkem vody v těchto rostlinách a jak je tato aktivita ovlivněna polohou listů na rostlině.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Materiál

Rostlinný materiál :

- rostliny *Nicotiana tabacum* L. cv. W38 (kultivar Wisconsin 38)

Rostlinný materiál byl laskavě poskytnut RNDr. Vaňkovou, Ústav experimentální botaniky AV ČR

2.2 Chemikálie

Adenosintrifosfát (ATP) – Sigma, USA

Bradfordovo činidlo – Sigma, USA

Dithiothreitol (DTT) – Sigma, USA

Ethylendiamintetraacetát (EDTA) – Lachema, ČR

Fosfoenolpyruvát sodný (PEP) - Sigma, USA

L – malát sodný - Sigma, USA

$MgCl_2$ – Sigma, USA

NADH - Sigma, USA

$NADP^+$ - Sigma, USA

$NaHCO_3$ – Lachema, ČR

Na_2HPO_4 – Lachema, ČR

Polyvinylpolypyrrolidon (PVP) – Sigma, USA

Pyruvát sodný - Sigma, USA

Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Sigma, USA

2.3 Přístroje

Analytické váhy 100A – Denver Instrument Company, USA

Centrifuga Hettich Universal 32 R – Hettich, Německo

Spektrofotometr Helios α – Thermo Spectronic, USA

Spektrofotometr Ultrospec 2100 – Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

Vortex MS2 Minishaker – IKA Works INC., USA

2.4 Metody

2.4.1 Příprava rostlinného materiálu

Rostlinný materiál, rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. W38 byl pěstován v boxech pro kultivaci rostlin při umělém osvětlení a teplotním režimu (16h 25°C den/8h 23°C noc) a vlhkosti (80%/35%, kontroly/sucho).

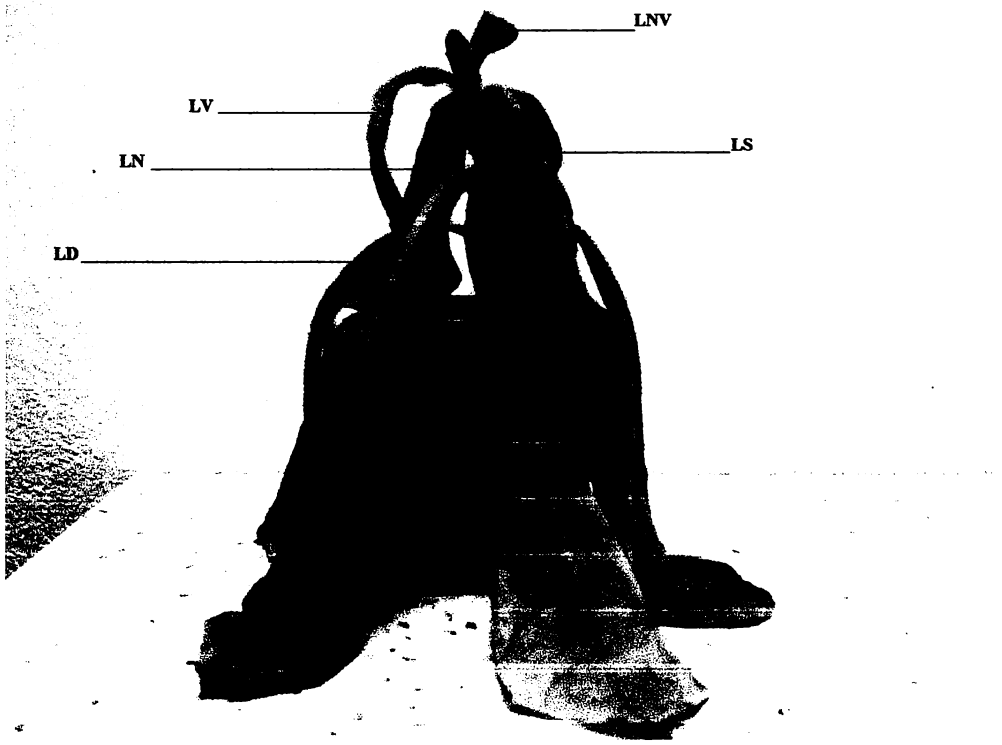
Rostliny byly přesazeny po 4 týdnech od výsevu. Osmitýdenní rostliny pak byly rozděleny do dvou skupin (kontrolní skupina 15 rostlin a skupina stresovaná suchem 15 rostlin). Skupině stresovaných rostlin byla naposledy dodána voda v den označený jako nultý den pokusu. Rostliny stresované suchem byly zabaleny do parafínu, aby nedocházelo k přijímání vzdušné vlhkosti. Kontrolním rostlinám byla dodávána voda pravidelně (každý den).

2.4.2 Odběr vzorků z rostlinného materiálu

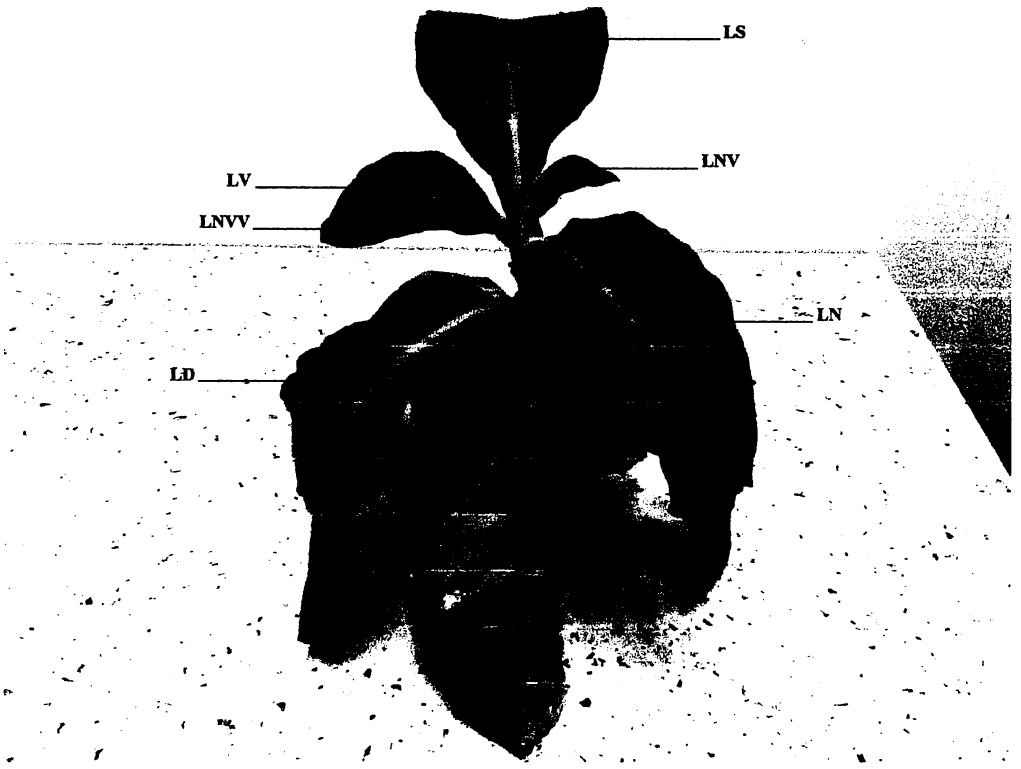
Vzorky byly odebírány pro první pokus 3. a 7. den sucha a pro druhý pokus 5. (viz. obr. 2.1) a 11. den sucha (viz. obr. 2.2). Při druhém pokusu byly rostliny stresované suchem 11. den pokusu zality a 12. den odebrány vzorky (viz. obr. 2.3).

Listy byly odebírány jako směsné vzorky z 5 kontrolních a 5 stresovaných rostlin, a to po jednotlivých patrech listů, podle umístění na rostlině: nově vzrostlé vrcholové listy (LNVV), vrcholové listy (LNV), první plně vyvinuté listy (LV), velké listy (LN), střední listy (LS) a spodní listy (LD) (viz. obr. 2.1, 2.2 a 2.3). V prvním pokusu byly 7. den odebrány též kořeny, které byly důkladně očištěny tekoucí vodou a osušeny buničitou vatou. Směsné vzorky listů a kořenů byly okamžitě zmraženy v tekutém dusíku a skladovány při - 80°C.

Obr. 2. 1 Kontrolní rostlina *Nicotiana tabacum* L., cv. W38 byla rozdělena na různé části podle velikosti listů a umístění listů na rostlině. Odebrány byly vrcholové listy (**LNV**), první plně vyvinuté listy (**LV**), velké listy (**LN**), střední listy (**LS**) a spodní listy (**LD**).



Obr. 2. 2 Rostlina *Nicotiana tabacum* L., cv. W38, 11. den bez zálivky, byla rozdělená na různé části podle velikosti listů a umístění listů na rostlině. Odebrány byly vrcholové listy (**LNV**), první plně vyvinuté listy (**LV**), velké listy (**LN**), střední listy (**LS**) a spodní listy (**LD**).



Obr. 2. 3 Rostlina *Nicotiana tabacum* L., cv. W38 následující den,kdy byla po jedenáctidenním stresu suchem zalita. Byly odebrány nově vzrostlé vrcholové listy (**LNVV**), vrcholové listy (**LNV**), první plně vyvinuté listy (**LV**), velké listy (**LN**), střední listy (**LS**) a spodní listy (**LD**).

2.4.3 Příprava rostlinného extraktu

Pro stanovení enzymové aktivity bylo odebráno 0,3 až 1g rostlinného materiálu, zváženo a homogenizováno pomocí tloučku v třecí misce spolu s trojnásobným množstvím chlazeného extrakčního pufru A (100 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl pufr (pH 7,8), 1 $mmol.l^{-1}$ DTT, 1 $mmol.l^{-1}$ EDTA, 5 $mmol.l^{-1}$ $MgCl_2$). Homogenáty byly dále převedeny do mikrozkumavek typu Eppendorf a bylo k nim přidáno PVP (asi 0,02g). Následně byly homogenáty centrifugovány při 15000 RPM (16 600 x g), po dobu 15 minut, při 4°C. Pro stanovení enzymové aktivity byl dále používán pouze rostlinný extrakt.

2.4.4 Stanovení enzymové aktivity

Aktivity enzymů (PEPC, PPDK a NADP-ME) v rostlinných extraktech byly sledovány v příslušných reakčních směsích spektrofotometricky na spektrofotometru Helios α, při vlnové délce 340 nm, měřením absorbance po dobu 5 minut při teplotě 25°C, objemu reakční směsi 1 ml a délce kyvety 1 cm.

Při stanovení bylo využito změny absorbance při přeměně $NAD(P)^+$ na NAD(P)H a naopak. Molární absorpční koeficient $NAD(P)^+$ při 340 nm má hodnotu 6200 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$. Výsledná aktivita enzymu je vždy průměrnou hodnotou stanovení 3 různých směsných vzorků. Dále byla aktivita jednotlivých enzymů vyjadřována jako specifická aktivita (aktivita sledovaného enzymu vztažená na koncentraci proteinů v extraktu) a jako aktivita vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu.

2.4.4.1 Stanovení aktivity PEPC

Ke stanovení aktivity enzymu **PEPC** byla využita spřažená reakce, ve které je v prvním kroku vznikající OAA dále pomocí v extraktu přítomné NAD-malátdehydrogenasy redukován na malát za spotřeby NADH.

Zaznamenáváme pokles absorbance způsobený úbytkem NADH. Reakční směs obsahovala 100 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl pufr (pH 8,1), 5 $mmol.l^{-1}$ $NaHCO_3$, 2 $mmol.l^{-1}$ $MgCl_2$, 0,2 $mmol.l^{-1}$ NADH, 2 $mmol.l^{-1}$ PEP a reakce byla startována 20 µl rostlinného extraktu.

2.4.4.2 Stanovení aktivity PPDK

Ke stanovení aktivity enzymu **PPDK** byla využita dvojitě spřažená reakce. V prvním kroku dochází za katalýzy PEPC ke karboxylaci vzniklého PEP na OAA a ten je v dalším kroku redukován NAD-malátdehydrogenasou na malát. PEPC i NAD-malátdehydrogenasa jsou v rostlinném extraktu přítomny.

Zaznamenáváme pokles absorbance způsobený úbytkem NADH. Reakční směs obsahovala 100 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl pufr (pH 8,1), 5 $mmol.l^{-1}$ $NaHCO_3$, 10 $mmol.l^{-1}$ $MgCl_2$, 2 $mmol.l^{-1}$ pyruvátu, 2 $mmol.l^{-1}$ ATP, 2 $mmol.l^{-1}$ Na_2HPO_4, 0,2 $mmol.l^{-1}$ NADH a 50 µl rostlinného extraktu.

2.4.4.3 Stanovení aktivity NADP-ME

Ke stanovení aktivity enzymu **NADP-ME** byla využita reakce, při které je malát za současné redukce $NADP^+$ tímto enzymem dekarboxylován za vzniku pyruvátu, oxidu uhličitého a NADPH.

Vznik redukovaného NADPH se projeví zvýšením absorbance. Reakční směs obsahovala 100 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl pufr (pH 7,4), 10 $mmol.l^{-1}$ malátu, 2 $mmol.l^{-1}$ $MgCl_2$, 0,2 $mmol.l^{-1}$ $NADP^+$. Reakce byla startována 50 µl rostlinného extraktu.

2.4.5 Stanovení koncentrace bílkovin

Koncentrace rozpustných bílkovin v daném rostlinném materiálu byla určena metodou podle Bradfordové [10]. Princip této metody je založen na vzniku komplexu bílkoviny s barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250. Tato vazba způsobí posun absorpčního maxima z původních 465 nm na 595 nm. Byla změřena absorbance vzniklého komplexu při 595 nm.

Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) v koncentračním rozsahu 0 až 1,4 $mg.ml^{-1}$.

3 VÝSLEDKY

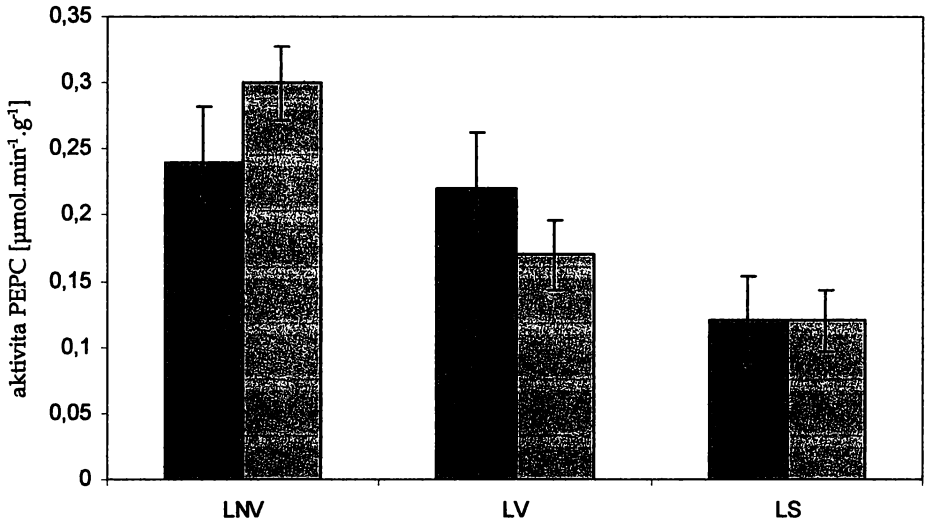
3.1 První pokus

Při prvním pokusu byly hledány vhodné podmínky stresu suchem pro sledování změny aktivity daných enzymů (PEPC, PPDK, NADP-ME) v rostlinách *Nicotiana tabacum* L. cv. W38. Pro odběr kontrolních rostlin a rostlin vystavených suchu byl zvolen 3. den a 7. den sucha.

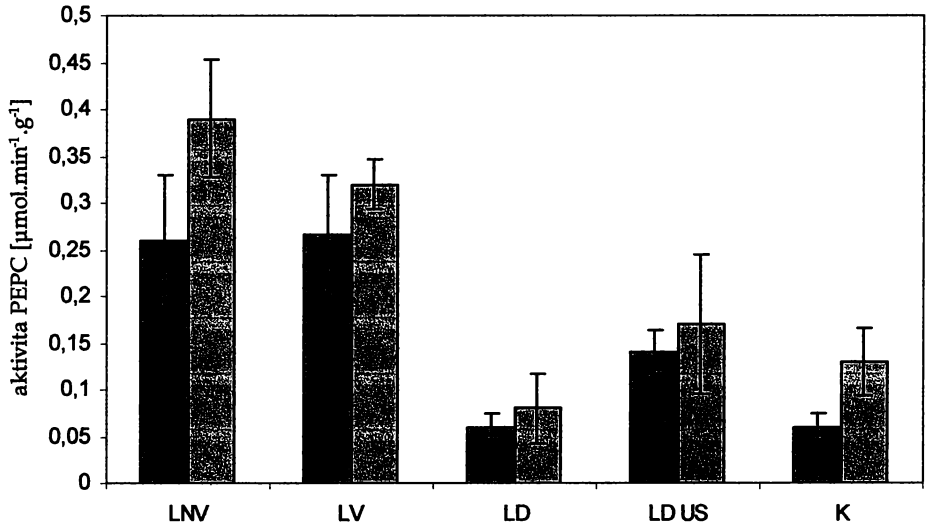
Rostliny *Nicotiana tabacum* L. kultivar Wisconsin 38, byly pěstovány za daných podmínek (viz. 2.4.1, str. 20). Pokus byl ukončen ve stáří rostlin zhruba 8 týdnů odběrem vzorků z různých částí rostlin (viz. 2.4.2, str. 20). Tyto směsné vzorky byly použity pro přípravu extraktů (viz. 2.4.3, str. 22) a v těchto extraktech byla stanovována aktivita enzymů PEPC, PPDK a NADP-ME (viz. 2.4.4, str. 22) a koncentrace bílkovin (viz. 2.4.5, str. 24).

3.1.1 Aktivita PEPC v rostlinách *Nicotiana tabacum* L.

Obrázky 3.1 a 3.2, dokumentují aktivitu PEPC v kontrolních a stresovaných rostlinách tabáku po 3, respektive 7 dnech sucha, a to v listech odebraných po jednotlivých patrech. Aktivita PEPC se snižuje od horních listů směrem ke spodním listům. Po 3 dnech sucha nejsou v rostlinách tabáku výrazné změny aktivity PEPC v porovnání s kontrolními rostlinami (viz. obr. 3.1). Po 7 dnech sucha byla zjištěna ve všech listech vyšší aktivita PEPC (viz. obr. 3.2) oproti kontrolním rostlinám. U vrcholových listů vzrostla aktivita o 50 %, v ostatních listech bylo zvýšení aktivity menší.



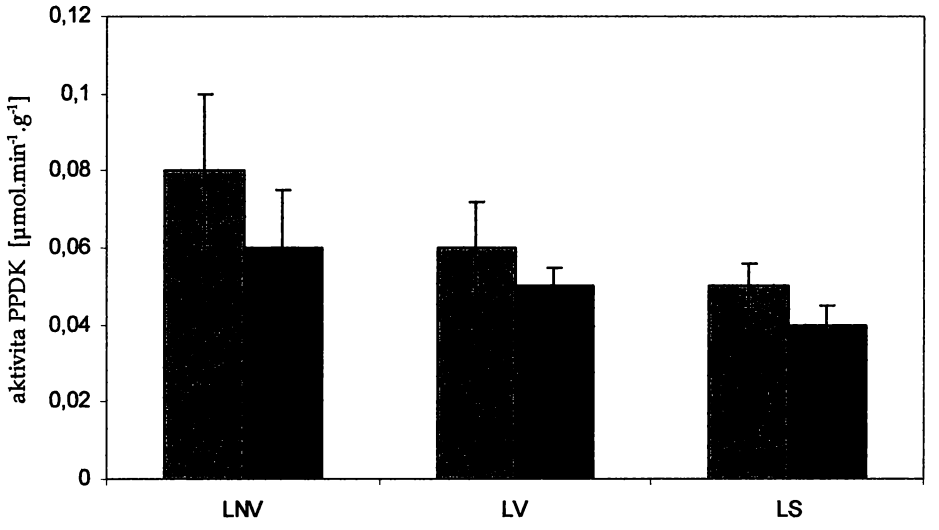
Obr. 3. 1 Aktivita **PEPC** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 3. dnu sucha; ■ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LS – střední listy.



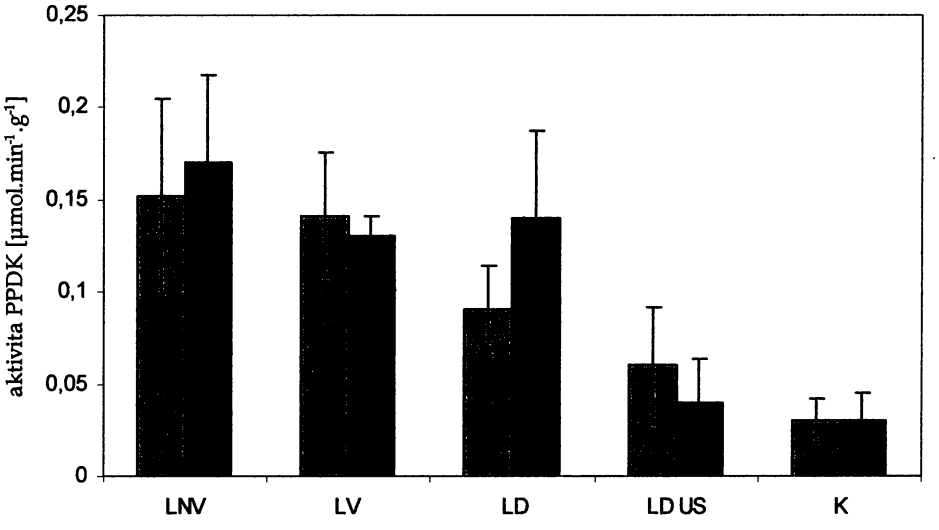
Obr. 3. 2 Aktivita **PEPC** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 7. dnu sucha; ■ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LD – spodní listy, LD US – spodní uschlé listy, K – kořeny.

3.1.2 Aktivita PPDK v rostlinách *Nicotiana tabacum* L.

Aktivity PPDK jsou dokumentovány na obr. 3.3 po 3 dnech sucha a na obr. 3.4. po 7 dnech sucha. Průběh je podobný jako u PEPC. Po 3 dnech sucha (viz. obr. 3.3) nejsou vidět znatelné rozdíly mezi kontrolními a stresovanými rostlinami. Po 7 dnech sucha byla aktivita PPDK ve stresovaných rostlinách mírně zvýšená ve vrcholových i spodních listech (viz. obr. 3.4) oproti kontrolním rostlinám přibližně o 30%. Aktivity tohoto enzymu se snižují od vrchních listů směrem ke spodním patrům listů.



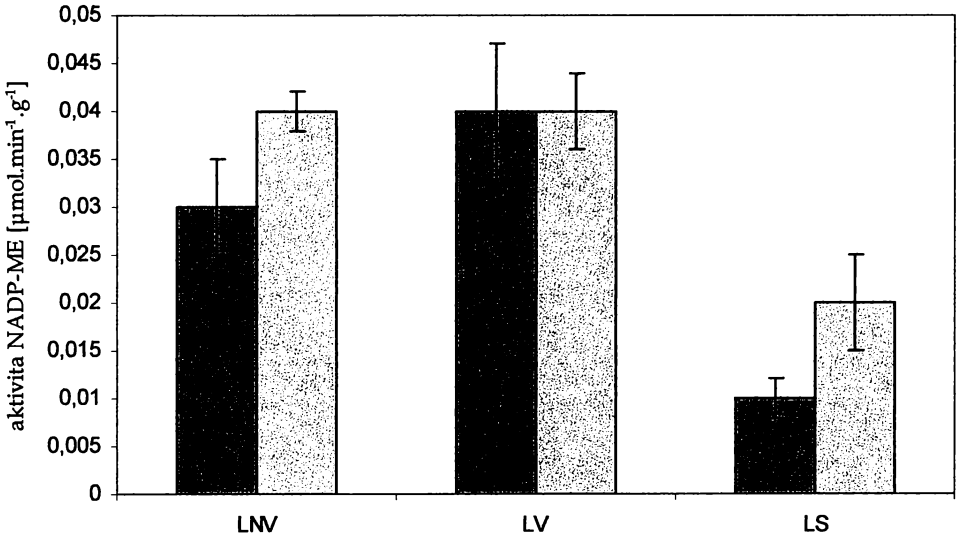
Obr. 3. 3 Aktivita **PPDK** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 3. dnu sucha; ■ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LS – střední listy.



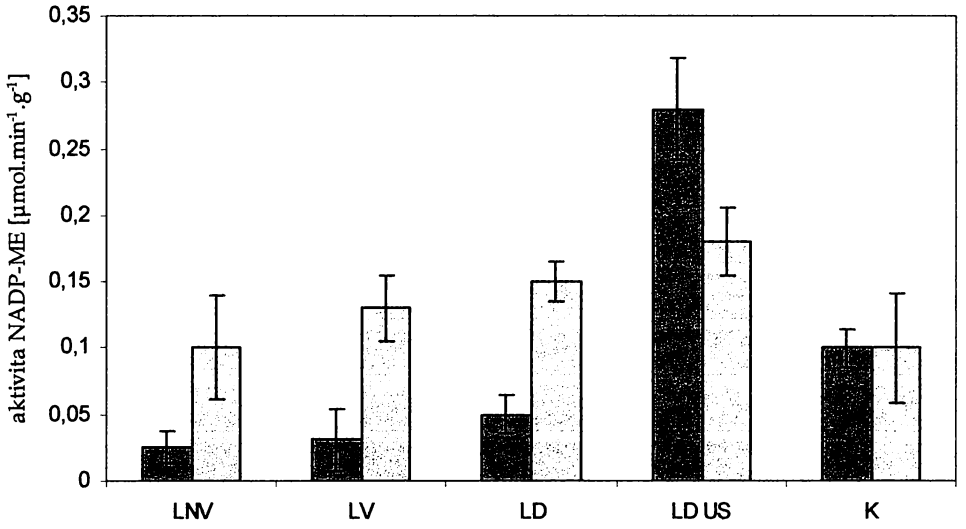
Obr. 3. 4 Aktivita **PPDK** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 7. dnu sucha; ■ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LD – spodní listy, LD US – spodní uschlé listy, K – kořeny.

3.1.3 Aktivita NADP-ME v rostlinách *Nicotiana tabacum* L.

Obr. 3.5 dokumentuje aktivitu NADP-ME po 3 dnech sucha a podobně jako v předchozích případech není pozorovatelná výrazná změna aktivity mezi kontrolními a stresovanými rostlinami. V případě 7 dnů sucha (viz. obr. 3.6) je však vidět, že aktivita enzymu ve stresovaných rostlinách je vyšší, u plně vyvinutých listů až o 300%, než v kontrolních rostlinách. Výjimku tvoří pouze aktivita NADP-ME v uschlých stresovaných listech, která je oproti kontrolním listům nižší. Aktivita tohoto enzymu se směrem od nejvyšších listů k nejspodnějším zvyšuje.



Obr. 3. 5 Aktivita **NADP-ME** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 3. dnu sucha; ■ – kontrolní rostliny, ▨ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LS – střední listy.

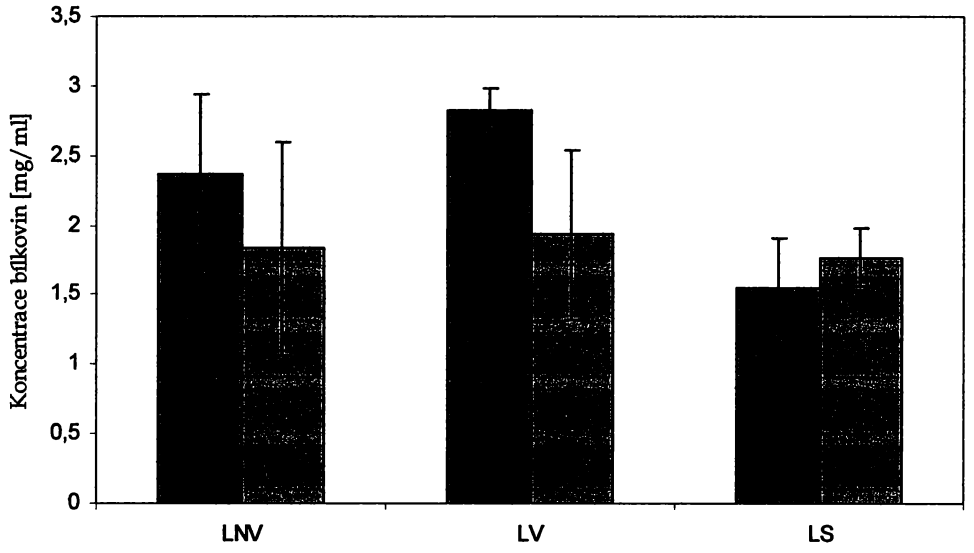


Obr. 3. 6 Aktivita **NADP-ME** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 7. dnu sucha; ■ – kontrolní rostliny, – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LD – spodní listy, LD US – spodní uschlé listy, K – kořeny.

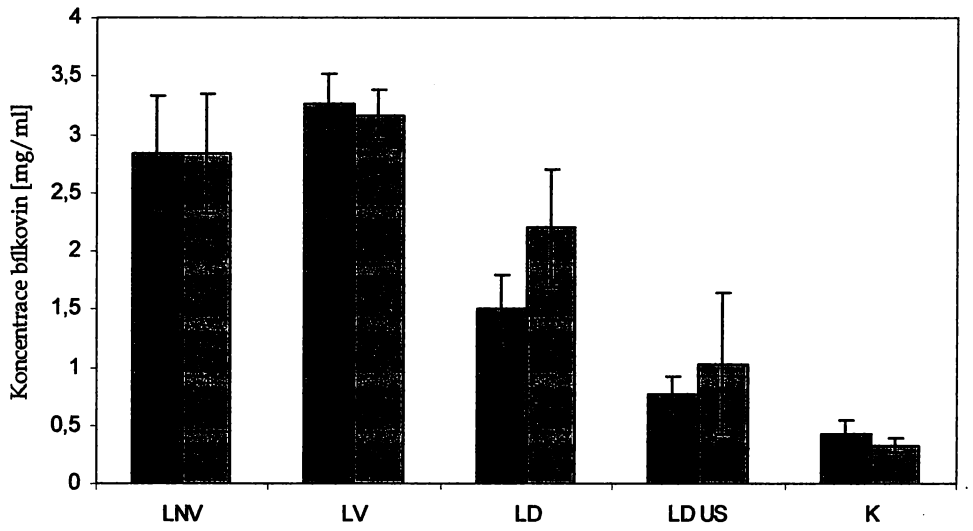
3.1.4 Koncentrace rozpustných bílkovin v různých částech *Nicotiana tabacum* L.

Množství rozpustných bílkovin ve vzorcích bylo stanoveno metodou podle Bradfordové (viz. 2.4.5, str. 25).

Při srovnání výsledků z odběru po 3 dnech sucha (viz. obr. 3.7) je koncentrace bílkovin v kontrolních rostlinách, ve vrcholových listech o 20% vyšší, než ve stresovaných rostlinách. V případě odběru po 7 dnech sucha (viz. obr. 3.8) lze pozorovat v stresovaných rostlinách zvýšení koncentrace bílkovin u spodních listů o 50%.



Obr. 3. 7 Obsah rozpustných bílkovin po 3. dnech sucha ve vzorcích z různých částí rostlin *Nicotiana tabacum* L. ; ■ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LS – střední listy.



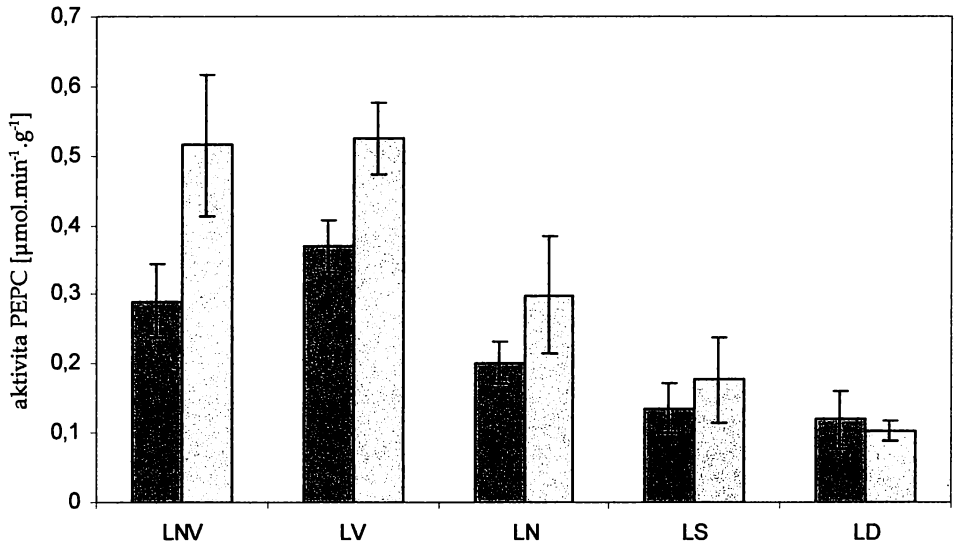
Obr. 3. 8 Obsah rozpustných bílkovin po 7. dnech sucha ve vzorcích různých částí rostlin *Nicotiana tabacum* L.; ■ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LD – spodní listy, LD US – spodní uschlé listy, K – kořeny.

3.2 Druhý pokus

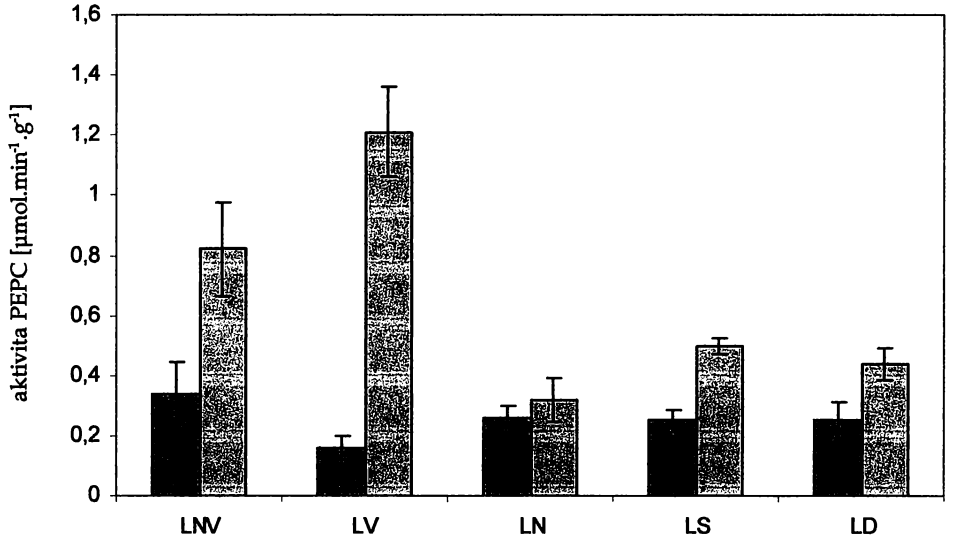
V druhém pokusu, byl zvolen odběr vzorků po 5 a 11 dnech stresu způsobeném suchem a 1 den po zalití stresovaných rostlin.

3.2.1 Aktivita PEPC v rostlinách *Nicotiana tabacum* L.

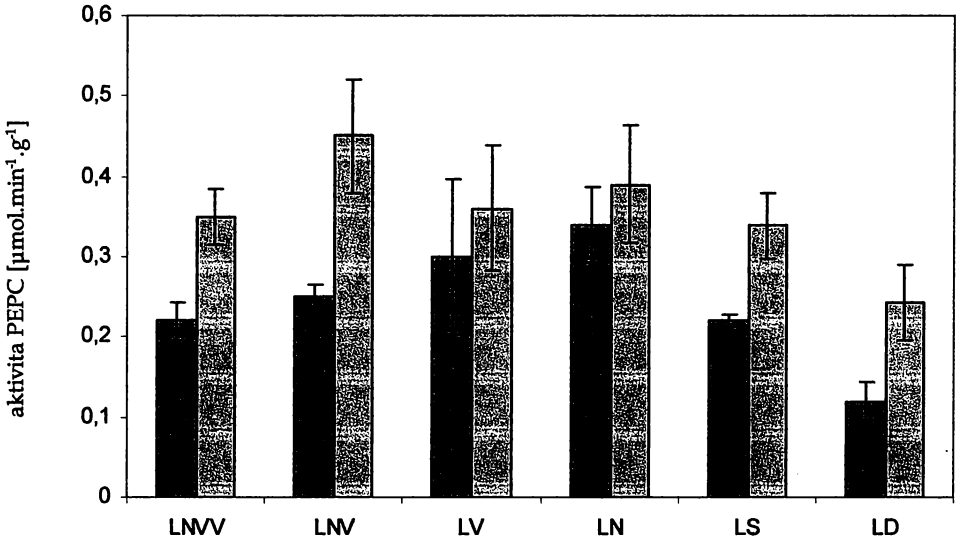
Obr. 3.9, 3.10 a 3.11 dokumentují aktivitu PEPC v kontrolních a ve stresovaných rostlinách po 5 a 11 dnech a následující den po zalití stresovaných rostlin tabáku. Při porovnání aktivit enzymů mezi kontrolními a stresovanými rostlinami je vidět, že aktivity jsou vyšší ve stresovaných rostlinách. Po 5 dnech stresu došlo ke zvýšení aktivit ve stresovaných rostlinách u vrcholových listů o 77%, a po 11 dnech u těchto listů o 140% a v případě prvních plně vyvinutých listů až o 650%. Při odběru následující den po zalití (viz. obr. 3.11) došlo k zpětnému snížení aktivity v stresovaných rostlinách, ale stále byly aktivity enzymu ve stresovaných rostlinách u vrcholových listů o 80% vyšší než v kontrolních rostlinách.



Obr. 3. 9 Aktivita **PEPC** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 5. dnu sucha; ■ – kontrolní rostliny, □ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD – spodní listy.



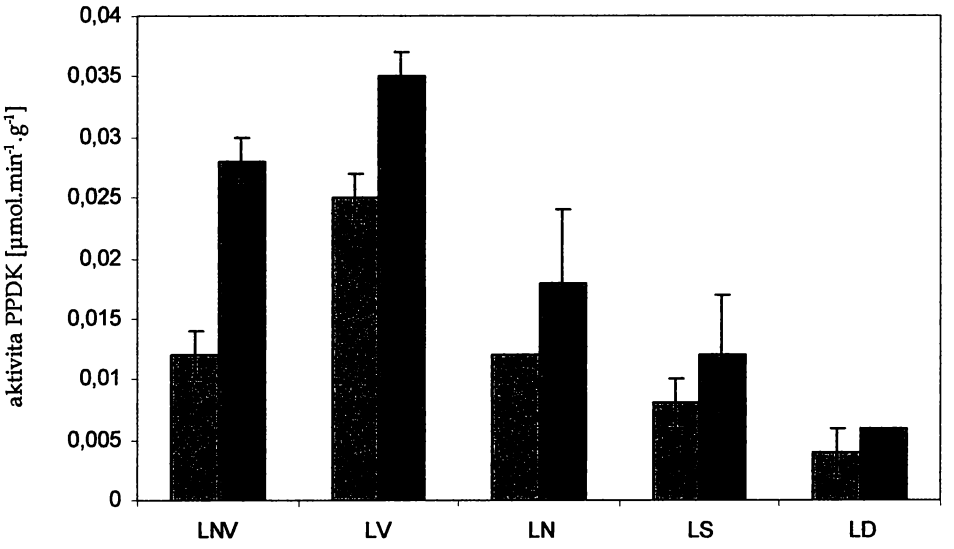
Obr. 3. 10 Aktivita **PEPC** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 11. dnu sucha; ■ – kontrolní rostliny, ▩ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD – spodní listy.



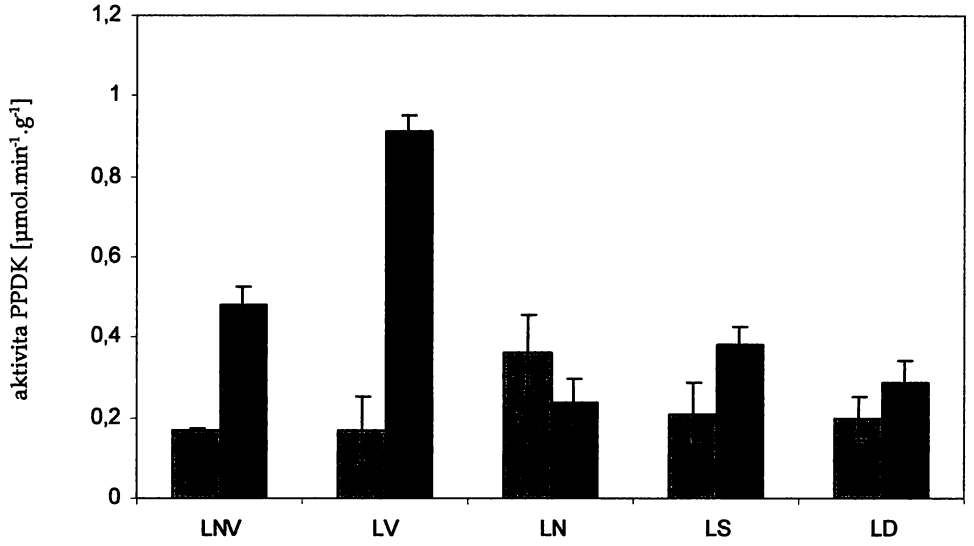
Obr. 3. 11 Aktivita **PEPC** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., den po zalití stresovaných rostlin; ■ – kontrolní rostliny, ▩ – rostliny vystavené suchu; LNVV – nově vzrostlé vrcholové listy, LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD –spodní listy.

3.2.2 Aktivita PPDK v rostlinách *Nicotiana tabacum* L.

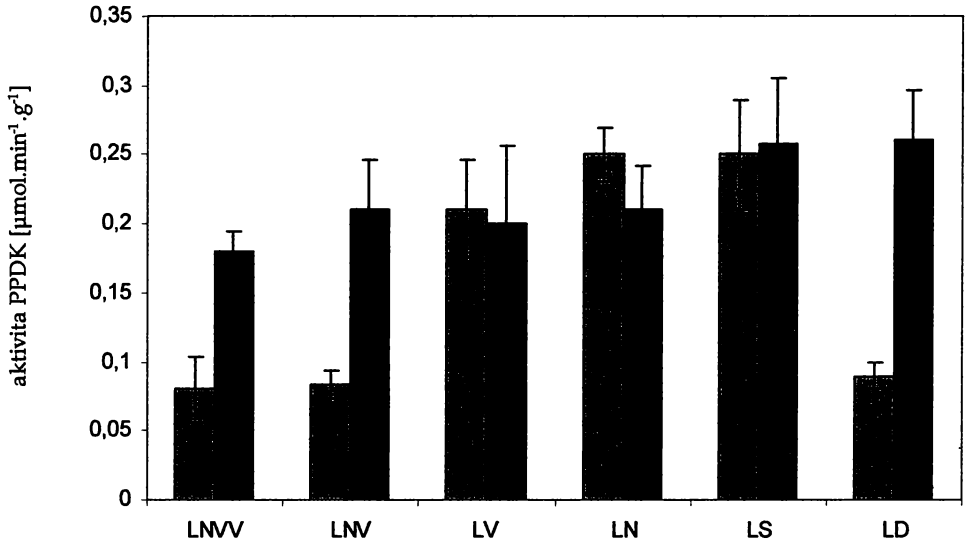
V případě aktivity PPDK po 5 (viz. obr. 3.12) a 11 (viz. obr. 3.13) dnech sucha sledujeme, že aktivity enzymu ve stresovaných rostlinách jsou výrazně vyšší než v kontrolních rostlinách. U odběru po 5 dnech sucha se jedná o zvýšení aktivity enzymu v případě vrcholových listů o 130%. Po 11 dnech sucha se aktivita enzymu v těchto listech zvýší o 180% oproti aktivitě v kontrolních rostlinách. V případě odběru den po zalití (viz. obr. 3.14) se aktivity enzymu ve stresovaných rostlinách sníží v porovnání s aktivitami enzymu v stresovaných rostlinách 11 den sucha, ale stále jsou vyšší oproti aktivitám enzymu v kontrolních rostlinách, u vrcholových listů o 150%. Aktivita PPDK se snižuje od horních listů směrem ke spodním listům.



Obr. 3. 12 Aktivita **PPDK** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 5. dnu sucha; ▪ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD – spodní listy.



Obr. 3. 13 Aktivita **PPDK** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 11. dnu sucha; ■ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD – spodní listy.

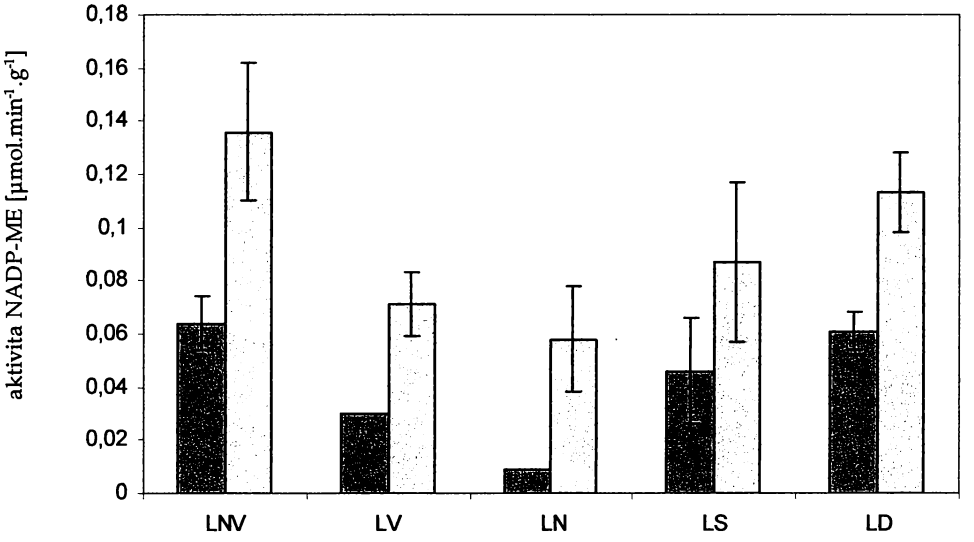


Obr. 3. 14 Aktivita **PPDK** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., den po zalití stresovaných rostlin; ■ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNVV – nově vzrostlé vrcholové listy, LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD – spodní listy.

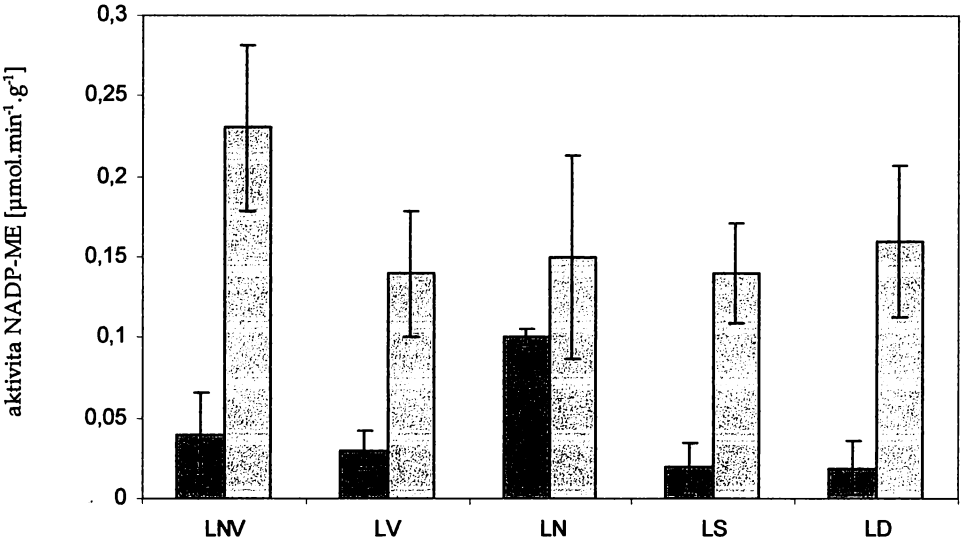
3.2.3 Aktivita NADP-ME v rostlinách *Nicotiana tabacum* L.

Při pozorování aktivity NADP-ME je vidět, že nejvyšší aktivitu mají listy vrcholové, následuje snížení aktivity enzymu směrem k následujícím listům a dále se s nižší polohou listu aktivita NADP-ME zvyšuje.

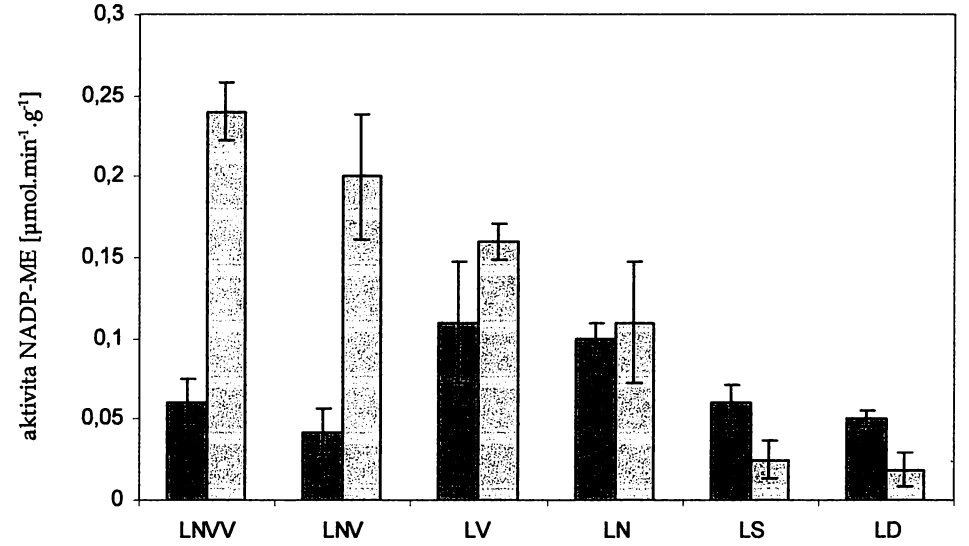
U obou případů, jak u aktivit enzymu ve stresovaných rostlinách po 5 dnech (viz. obr. 3.15) tak po 11 dnech (viz. obr. 3.16) je vidět výrazné zvýšení aktivit enzymu v rostlinách vystavených suchu oproti kontrolním rostlinám. Toto zvýšení je po 5 dnech sucha u vrcholových listů o 112% a po 11 dnech sucha až o 475%. 1 den po zalití (viz. obr. 3.17) rostlin jsou aktivity ve stresovaných rostlinách vyšší než v kontrolních rostlinách, ale zvýšení je jen o 370%.



Obr. 3. 15 Aktivita **NADP-ME** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 5. dnu sucha; ■ – kontrolní rostliny, – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD –spodní listy.



Obr. 3. 16 Aktivita **NADP-ME** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., po 11. dnu suchu; ■ – kontrolní rostliny, ▨ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD – spodní listy.

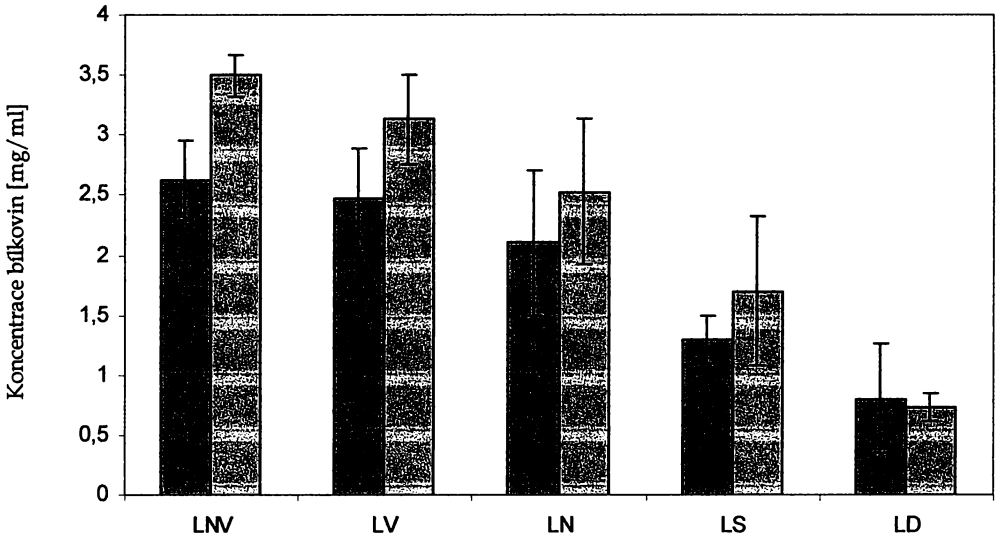


Obr. 3. 17 Aktivita **NADP-ME** vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* L., den po zalití stresovaných rostlin; ■ – kontrolní rostliny, ▨ – rostliny vystavené suchu; LNVV – nově vzrostlé vrcholové listy, LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD – spodní listy.

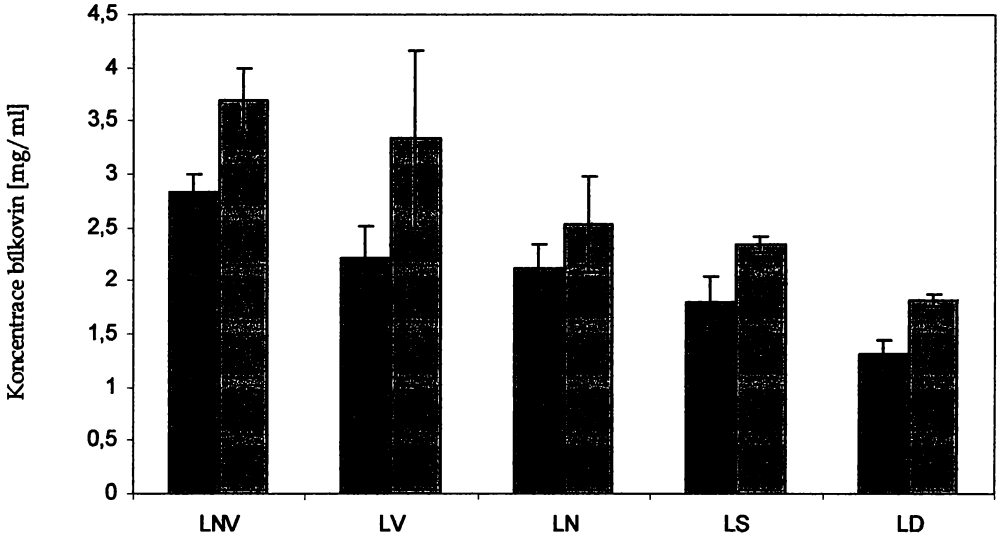
3.2.4 Koncentrace rozpustných bílkovin v různých částech *Nicotiana tabacum* L.

Z následujících grafů (obr. 3.18, 3.19 a 3.20) je zřejmé, že koncentrace rozpustných bílkovin je v případě rostlin vystavených suchu vyšší než v kontrolních rostlinách. Zvýšení koncentrace stresovaných rostlin zaznamenáváme po 5 dnech sucha (viz. obr. 3.18) u vrcholových listů o 30% a u spodních listů je koncentrace bílkovin kontrolních rostlin vyšší o 10%. Dále po 11 dnech sucha (viz. obr. 3.19) se koncentrace rozpustných bílkovin zvýší o 30% u vrcholových listů. Při odběru den po zalití (viz. obr. 3.20) dojde ke snížení rozdílů koncentrací mezi stresovanými a kontrolními rostlinami, koncentrace bílkovin u vrcholových listů stresovaných rostlin je dokonce o 10% nižší než v kontrolních rostlinách.

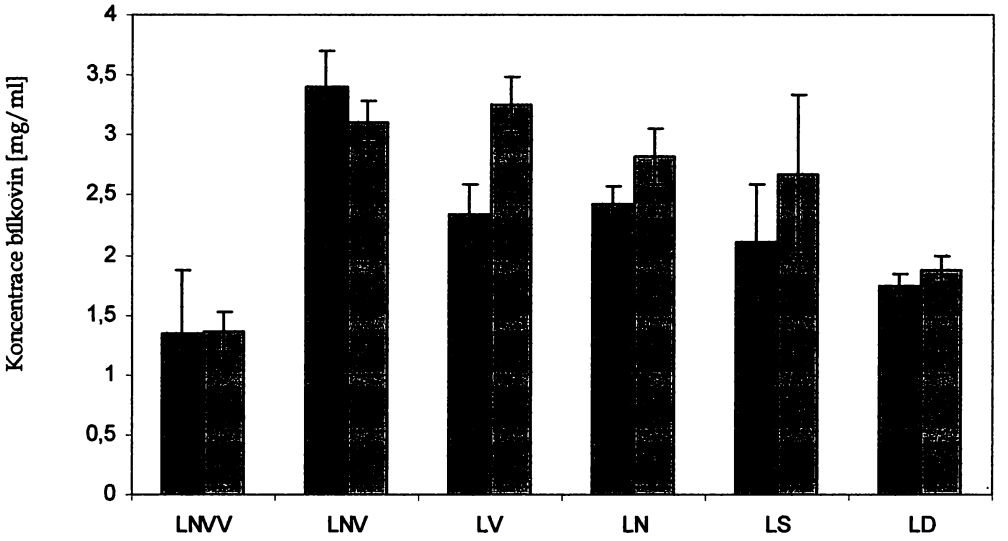
Je patrné že koncentrace rozpustných proteinů se snižuje od horních listů směrem ke spodním listům tabáku.



Obr. 3. 18 Obsah rozpustných bílkovin po 5. dnech sucha ve vzorcích různých částí rostlin *Nicotiana tabacum* L.; ■ – kontrolní rostliny, ▫ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD – spodní listy.



Obr. 3. 19 Obsah rozpustných bílkovin po 11. dnech sucha ve vzorcích různých částí rostlin *Nicotiana tabacum* L.; ■ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD – spodní listy.



Obr. 3. 20 Obsah rozpustných bílkovin den po zalití stresovaných rostlin ve vzorcích různých částí rostlin *Nicotiana tabacum* L.; ■ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNVV – nově vzrostlé vrcholové listy, LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy, LN – velké listy, LS – střední listy, LD – spodní listy.

4 DISKUSE

Sucho patří mezi významné stresové faktory rostlin, neboť téměř jedna třetina zemského povrchu se řadí mezi aridní nebo semiaridní oblasti [22].

Již mírná dehydratace vede k poklesu turgoru, který má za následek uzavření průduchů, pokles růstu rostliny a snížení fotosyntézy. Tyto změny a další nedostatek vody způsobující vadnutí listů, pak vedou k metabolickým změnám, které souvisejí se zvýšením koncentrace specifických látek a se změnou aktivity některých enzymů. Silná dehydratace je také spojena s poškozením membrán, především poškození jejích permeability. Druhotně pak stres suchem vyvolá deficienci živin jejich nedostatečným zásobováním a sníženým příjmem kořeny [22].

V této bakalářské práci jsem zkoumala, zda by enzymy anaplerotických metabolických drah, fosfoenolpyruvátkarboxylasa, NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační) a pyruvát, orthofosfátdikinasa, mohly mít souvislost s odpovědí rostliny na stres suchem. V C_3 rostlinách (tabáku), ve kterých fotosyntéza probíhá přímo enzymem RuBisCo, je funkce PEPC, PPDK a NADP-ME stále studována. PEPC je enzym, který může spojovat metabolismus sacharidů (jeho substrátem je fosfoenolpyruvát) a metabolismus aminokyselin (produkt PEPC oxalacetát může být snadno transaminován na aspartát). Zjistila jsem, že především dlouhodobější stres suchem (11 dnů) má v horních listech rostlin *Nicotiana tabacum* L. cv. W38 vliv na aktivitu PEPC (obr. 3.10, str. 32). Ve vrcholových listech jsem pozorovala až 2,4-násobný nárůst aktivity PEPC. V jiných studiích byla zvýšená aktivita PEPC nalezena v souvislosti s nadbytkem toxických látek a iontů či naopak s nedostatkem živin [23], [24], [25], dále v souvislosti se solným a osmotickým stresem [13], [16], [26] a stresem ovlivňujícím rovnováhu vody v rostlině např. chlad a vodní stres [27], [28].

Obdobně enzym PPDK byl v mém pokusu 11. den sucha až 2,8-krát zvýšen oproti rostlinám pěstovaným ve fyziologických podmínkách (obr. 3.13, str. 34). Tento enzym poskytuje fosfoenolpyruvát, intermediát glykolýzy či substrát PEPC na úkor spotřebovaného ATP.

Nejcitlivěji reagoval enzym NADP-ME, který byl 7. (obr. 3.6, str. 29) a především 11. den sucha významně zvýšen 5,8-krát (obr. 3.16, str. 36). NADP-ME produkuje pyruvát, CO_2 a NADPH. Všechny tyto produkty jsou v rostlinách vystavených suchu velmi potřebné: NADPH může sloužit k biosyntéze mastných kyselin při opravě poškozených

membrán; CO_2 je v období, kdy má rostlina uzavřené průduchy, využitelný pro fotosyntézu a pyruvát se může zapojit do dýchacího řetězce. Také NADP-ME stejně jako PEPC je studován v souvislosti se stresem: zvýšená aktivita byla nalezena po působení solného stresu [29], [30], [31], po působení kadmia [32]., stresu chladem [33] a v hyperhydrických podmínkách [34].

U případu zalití rostlin po 11. dnech sucha (obr. 3.11, str.32; obr. 3.14, str. 34 a obr. 3.17, str. 36) jsem zaznamenala pokles aktivit PEPC, PPDK a NADP-ME u stresované skupiny rostlin, což ukazuje, že rostlina je schopna se regenerovat a veškeré své funkce vrátit do původního stavu [1].

V naší laboratoři byla v minulosti souvislost PEPC, PPDK a NADP-ME studována s biotickým stresem vyvolaným virovou infekcí (*Y virem bramboru*) [35], [36], [37], [38]. Tento stres projevující se značným nekrotickým poškozením a kroucením listů, má podobně jako stres suchem destruktivní vliv především na listy, projevuje se uzavřením průduchů a také způsoboval zvyšování aktivity PEPC, PPDK a NADP-ME [39], [35], [36], [37], [38].

Nadále bude zajímavé studovat, zda při stresu dochází ke kooperaci námi sledovaných enzymů a zda-li stres suchem ovlivňuje expresi proteinů PEPC a NADP-ME.

5 ZÁVĚR

1. Byla zjištěna zvýšená aktivita PEPC, PPDK a NADP-ME v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. W38) pěstovaných za nedostatku vody v porovnání s kontrolními rostlinami pěstovanými za optimálních podmínek.

2. Zvýšení aktivity PEPC, PPDK a NADP-ME stresem sucha v rostlinách tabáku je výraznější v horních listech než ve spodních listech.

3. Zvýšení aktivity PEPC, PPDK a NADP-ME je menší po 5 dnech sucha než po 11 dnech sucha.

4. První den po zaplavení se aktivita PEPC, PPDK a NADP-ME v rostlinách vystavených suchu snižuje, čímž dochází ke zmenšení rozdílů enzymových aktivit mezi kontrolními a stresovanými rostlinami.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATIRY

[1] Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J.: Fyziologie rostlin. Academia, Praha (1998)

[2] Bláha, L. a kol. : Rostlina a stres. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha (2003)

[3] Hnilička, F., Hniličková, H.: Botanika zemědělská speciální-vybrané kapitoly z fyziologie rostlin. skriptum ČZU v Praze, str. 2-53 (2002)

[4] Luštinec, J., Žárský, V.: Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Karolinum, Praha (2003)

[5] Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., Sharma, K. K.: Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospect. *Plant Cell Rep.* **27**, 411-424 (2008)

[6] Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., Shinozaki, K.: Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 296-302 (2007)

[7] Paleg, L.G., Aspinall, D.: The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Academic press, Sydney, New York, London, Toronto, San Francisco (1981)

[8] Moore, T.C.: Abscisic acid and related compounds, v knize *Biochemistry and physiology of plant hormones*, (Moore, T.C., ed.). Springer Netherlands ,New York, str. 181-203 (1979)

[9] Kincl, M, Krpeš, V.: Základy fyziologie rostlin. Montanex a.s., Ostrava (2000)

[10] Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976)

[11] Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P., Crétin, C.: Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. *Plant Sci.* **99**, 111-124 (1994)

[12] Chollet, R., Vidal, J., O'Leary, H.M.: Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Biol.* **47**, 273-98 (1996)

[13] Gonzáles, M.C., Sánchez, R., Cejudo, F.J.: Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta* **216**, 985-992 (2003)

[14] Edvards, G.E., Andreo, C.S.: NADP-malic enzyme from plants. *Phytochemistry* **31**, 1845-1857 (1992)

[15] Drincovich, M.F., Casati, P., Andreo, C.S.: NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolit pathways. *FEBS Lett.* **490**, 1-6 (2001)

[16] Cushman, J.C.: Characterization and expression of a NADP-malic enzyme cDNA induced by salt stress from the facultative crassulacean acid metabolism plant. *Eur. J. Biochem.* **208**, 259-266 (1992)

[17] Moons, A., Valcke, R., Van Montagu, M.: Low-oxygen stress and water deficit include pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C_3 plant. *Plant J.* **15**, 89-98 (1998)

[18] Fravolini, A., Williams, D.G., Thompson, T.L.: Carbon isotope discrimination and bundle sheath leakiness in three C_4 subtypes grown under variable nitrogen, water and atmospheric CO_2 supply. *J. Exp. Bot.* **53**, 2261-2269 (2002)

[19] Medrano, H., Escalona, J.M., Bota, J., Gulías, J., Flexas, J.: Regulation of photosyntesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Ann. Bot.* **89**, 895-905 (2002)

[20] Buchanan, C.D., Lim, S., Salzman, R.A., Kagiampakis, I., Morishige, D.T., Weers, B.D., Klein, R.R., Pratt, L.H., Cordonnier-Pratt, M-M., Klein, P.E., Mullet, J.E.: *Sorghum bicolor's* transcriptome response to dehydratation, high salinity and ABA. *Plant Mol. Biol.* **58**, 699-720 (2005)

[21] Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E.: Responses to abiotic stresses, v knize Biochemistry & molecular biology of plants, (Buchanon, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L, eds.). American Society of plant physiologists, Rockville, Maryland (2000)

[22] Prášil, I.T., Burketová, L.: Přednášky Rostlina a stres, PřF UK Praha (2006)

[23] Mench, M,, Vangronsveld, J., Didier, V., Clijsters, H.: Evaluation of metal mobility, plant availability and immobilization by chemical agents in a limed-silty soil. *Environ. Pollut.* **86**, 279-86 (1994)

[24] De Nisi, P., Zocchi, G.: Phosphoenolpyruvate carboxylase in cucumber (*Cuclis sativus* L.) roots under iron deficiency: aktivity and kinetic characterization. *J. Exp. Bot.* **51**, 1903-1909 (2000)

[25] Johnson, J.F., Vance, C.P., Allan, D.L.: Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. Altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **112**, 31-41 (1996)

[26] Asai, N., Nakajima, N., Tamaoki, M., Kamada, H., Kondo, N.: Role of malate synthesis mediated by phosphoenolpyruvate carboxylase in guard cells in the regulation of stomatal movement. *Plant Cell Physiol.* **41**, 10-15 (2000)

[27] Fedina, I.S., Popova, A.V.: Photosynthesis, photorespiration and proline accumulation in water-stressed pea leaves. *Photosyntetica* **32**, 213-220 (1996)

[28] Thind, S.K., Malik, C.P.: Correlated changes of some amino-acids and protease in seedlings subjected to water ant temperature stresses. *Ryton-Ann. REI Bot.* **28**, 261-269 (1988)

[29] Valderrama, R., Corpus, F.J., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M.V., Chaki, M., Pedrajas, J.R., Fernández-Ocaña, A., Del Río, L.A., Barroso, J.B.: The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell Environ.* **29**, 1449-1459 (2006)

[30] Sun, S.B., Shen, Q.R., Wan, J.M., Liu, Z.P.: Induced expression of the gene for NADP-malic enzyme in leaves of *Aloe vera* L. under salt stress. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **35**, 423-429 (2003)

[31] Liu, S., Cheng, Y., Zhang, Y., Guang, Q., Nishiuchi, S., Hase, K., Takano, T.: Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L.) is induced by environmental stresses; over-expression that gene in Arabidopsis confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* **64**, 49-58 (2007)

[32] Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J.: Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 437-444 (2005)

[33] Crecelius, F., Streb, P., Feierabend, J.: Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *J. Exp. Bot.* **54**, 1075-1083 (2003)

[34] Saher, S., Fernández-García, N., Piqueras, A., Hellín, E., Olmos, E.: Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured in vitro: a hypoxia stress? *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 573-582 (2005)

[35] Doubnerová, V.: Biochemické změny v rostlinách tabáku způsobené biotickým stresem. Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2004)

[36] Janošková, M.: Vliv virové infekce na transgenní rostliny nesoucí geny pro nestrukturní proteiny potyvirů. Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2005)

[37] Jirásková, A.: Studium isoforem NADP-ME v rostlinách. Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2006)

[38] Müller, K.: Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in tobacco plants during potyviral infection. Dizertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2008)

[39] Ryšlavá, H., Müller, K., Semorádová, Š., Synková, H., Čeřovská, N.: Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by *Potato virus A* and *Potato virus Y*. *Photosynthetica* **41**, 357-363 (2003)

[40] Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, P.M., Ribeiro, D., Wilson, I.: Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **59**, 165-176 (2008)

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

Jméno a příjmení	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka