

**Univerzita Karlova v Praze**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



*Vliv biotického stresu na metabolismus dusíkatých látek v rostlinách tabáku*

The effect of biotic stress on nitrogen metabolism in tobacco plants

Diplomová práce

Školitelka: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultantka: RNDr. Veronika Doubnerová, PhD.

Praha 2010

Martin Fiala

**Poděkování:**

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. a konzultantce RNDr. Veronice Doubnerové, PhD. za velkou pomoc, trpělivost a veškerý čas, který mi věnovaly. Dále Květě Garčkové za rady a nápady při vypracovávání diplomové práce.

### **Prohlášení**

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

V Praze dne .....

Martin Fiala .....

## Abstract

In this project the effect of viral infection on the metabolism of nitrogenous compounds in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) was studied. The tobacco plants were infected with Potato virus Y, strain NTN, ELISA confirmed the presence of the virus. Enzymes that participate in C4 plants in Hatch-Slack cycle phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31, PEPC), NADP-dependent malic enzyme (EC 1.1.1.40, NADP-ME), pyruvate, phosphate dikinase (EC 2.7.9.1, PPK) are present also in C3 plants and are related to plant responses to stress conditions. As a result of viral infection, the activities of all these enzymes were increased. Infection caused by PVY<sup>NTN</sup> decreased activity of nitrate reductase (EC 1.7.1.1, NR), an enzyme catalyzing reduction of nitrates to nitrites. The activity of enzymes catalyzing the synthesis of glutamine from glutamate and ammonium ions: glutamine synthetase (EC 6.3.2.1, GS) and glutamate synthase (EC 1.4.1.14, GOGAT) was enhanced. In addition to this main route of nitrogen fixation the plant can still use glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.2, GDH). This enzyme can also catalyze the opposite reaction, deamination of glutamate. The direction of response depends on environmental conditions. In this case a significant increase of oxidative-deaminating activity due to viral infection was found. The last studied enzyme was phenylalanine ammonium lyase (EC 4.3.1.5, PAL), which catalyzed deamination of phenylalanine to cinnamic acid. This compound is a precursor of a number of secondary metabolites, including defense substances. Effect of viral infection on this enzyme was more complex. At the beginning of infection, the activity of PAL was increased, in the later phase of infection the activity decreased. In this work, the influence of high temperature on the course of viral infection was studied. This experiment showed, that heat shock had a positive effect on plant defenses against the virus. These findings corresponded to the activity of studied enzymes, which were similar to that in control plants.

(In Czech)

Key words: PEPC, nitrogen metabolism, *Nicotiana tabacum* L., PVY

## Abstrakt

V tomto projektu byl studován vliv virové infekce na metabolismus dusíkatých látek v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1). Skupina rostlin tabáku byla infikována *Y virem bramboru*, kmenem NTN. Přítomnost viru byla potvrzena metodou ELISA. Pro studium byla vybrána skupina enzymů, které jsou v C<sub>4</sub> rostlinách součástí Hatchova-Slackova cyklu (fosfoenolpyruvátcarboxylasa (EC 4.1.1.31, PEPC), NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40, NADP-ME), pyruvát, fosfátdikinas (EC 2.7.9.1, PPK). V C<sub>3</sub> rostlinách tyto enzymy souvisejí s odpovědí rostliny na stresové podmínky. V důsledku virové infekce došlo ke zvýšení aktivity těchto enzymů. Infekce PVY<sup>NTN</sup> způsobila snížení aktivity nitrátreduktasy (EC 1.7.1.1, NR), enzymu fixace dusíkatých látek redukujícího dusičnany na dusitany. Dále byly v této práci sledovány enzymy katalyzující syntézu glutamátu a glutaminu z amonných iontů: glutaminsynthetasa (EC 6.3.2.1, GS) a glutamát-synthasa (EC 1.4.1.14, GOGAT). U obou těchto enzymů došlo ke zvýšení jejich aktivity vlivem virové infekce. Mimo tuto hlavní cestu fixace dusíku může ještě rostlina využívat enzym glutamátdehydrogenasu (EC 1.4.1.2, GDH). Enzym katalyzuje také opačnou reakci, deaminaci glutamátu. Směr reakce záleží především na podmínkách prostředí. Také u tohoto enzymu došlo k výraznému zvýšení oxidačně-deaminační aktivity vlivem virové infekce. Posledním studovaným enzymem byla fenylalaninamoniolyasa (EC 4.3.1.5, PAL), která deaminuje fenylalanin za vzniku kyseliny skořicové. Tato látka je prekurzorem řady sekundárních metabolitů včetně obranných látek. Vliv virové infekce na tento enzym byl komplexnější. Nejprve došlo ke zvýšení aktivity PAL, poté již aktivita PAL klesala.

V této práci byl také studován vliv zvýšené teploty na průběh virové infekce. Z tohoto pokusu vyplývá, že zvýšená teplota měla pozitivní vliv na obranyschopnost rostliny proti viru. Tomu odpovídala i aktivita enzymů, která byla podobná aktivitám v kontrolních rostlinách.

Klíčová slova: PEPC, metabolismus dusíku, *Nicotiana tabacum* L., PVY

Seznam zkratek:

<b>ADP</b>	adenosindifosfát
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>BIS</b>	N,N'-methylen-bis(akrylamid)
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>g</b>	tíhové zrychlení
<b>GDH</b>	glutamátdehydrogenasa
<b>GS</b>	glutaminsynthetasa
<b>GOGAT</b>	gluamátsynthasa
<b>HSP</b>	Heat shock protein
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nikotinamidadenindinukleotid
<b>NADH</b>	nikotinamidadenindinukleotid redukovaná forma
<b>NADP-ME</b>	NADP-dependentní malátdehydrogenasa (dekarboxylační)
<b>NNEDD</b>	N-(1-naftyl)ethylendiamindihydrochlorid
<b>NR</b>	nitrátreduktasa
<b>PAL</b>	fenylalaninamoniumlyasa
<b>PEP</b>	fosfoenolpyruvát
<b>PEPC</b>	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
<b>P<sub>i</sub></b>	anorganický fosfát
<b>PPDK</b>	pyruvátfosfátdikinasa
<b>PVP</b>	polyvinylpolypyrrolidon
<b>PVY<sup>NTN</sup></b>	Y virus bramboru, kmen NTN
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tertamethylenethylendiamin
<b>Tris</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethan

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>4</b>
1.1	VIRY .....	4
1.1.1	<i>Rostlinné viry.....</i>	5
1.1.1.1	Potyviry.....	5
1.2	INTERAKCE MEZI ROSTLINOU A VIREM .....	6
1.2.1	<i>Hypersenzitivní reakce .....</i>	7
1.2.2	<i>PR proteiny.....</i>	8
1.2.3	<i>Gene silencing .....</i>	9
1.2.4	<i>Vliv virové infekce na metabolismus rostliny .....</i>	10
1.3	PŘEHLED ENZYMŮ .....	11
1.3.1	<i>Fosfoenolpyruvátkarboxylasa .....</i>	11
1.3.1.1	Charakterizace fosfoenolpyruvátkarboxylasy.....	11
1.3.1.2	Regulace aktivity fosfoenolpyruvátkarboxylasy .....	13
1.3.2	<i>Enzymy podílející se na fixaci dusíkatých látek.....</i>	13
1.3.2.1	Propojení metabolismu sacharidů a aminokyselin.....	13
1.3.2.2	Příjem a fixace dusíku.....	14
1.3.2.3	Nitrátreduktasa.....	15
1.3.2.4	Nitritreduktasa .....	18
1.3.2.5	Glutaminsynthetasa.....	18
1.3.2.6	Glutamátsynthasa.....	19
1.3.2.7	Glutamátdehydrogenasa.....	20
1.3.2.8	Fenylalaninamoniumlyasa .....	21
1.3.3	<i>Další enzymy Hatchova-Slackova cyklu.....</i>	23
1.3.3.1	NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) ....	23
1.3.3.2	Pyruvát, fosfát dikinasa.....	25
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL .....</b>	<b>27</b>
3.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	27
3.2	CHEMIKÁLIE .....	28
3.3	ROSTLINNÝ MATERIÁL.....	29
3.4	ROSTLINNÉ VIRY .....	29
3.5	PROTILÁTKY .....	30

<b>4</b>	<b>METODY .....</b>	<b>30</b>
4.1	PŘÍPRAVA VZORKU Z ROSTLINNÉHO MATERIÁLU .....	30
4.1.1	<i>Pěstování rostlin tabáku .....</i>	30
4.1.2	<i>Příprava rostlinného extraktu pro stanovení aktivity enzymů.....</i>	32
4.2	MĚŘENÍ AKTIVITY ENZYMŮ .....	32
4.2.1	<i>Měření aktivity PEPC.....</i>	32
4.2.2	<i>Měření aktivity NADP-ME .....</i>	32
4.2.3	<i>Měření aktivity PPDK .....</i>	33
4.2.4	<i>Měření aktivity GS.....</i>	33
4.2.5	<i>Měření aktivity GOGAT.....</i>	34
4.2.6	<i>Měření aktivity GDH .....</i>	34
4.2.7	<i>Měření aktivity NR.....</i>	35
4.2.8	<i>Měření aktivity PAL.....</i>	35
4.2.9	<i>Stanovení aktivity proteas.....</i>	36
4.3	STANOVENÍ BÍLKOVIN METODOU DLE BRADFORDOVÉ .....	36
4.4	ELEKTROFORETICKÉ SEPARACE PROTEINŮ .....	37
4.4.1	<i>Elektroforetická separace proteinů v prostředí SDS.....</i>	37
4.4.1.1	<i>Detekce proteinů v gelu .....</i>	38
4.4.2	<i>Elektroforetická separace proteinů v nedenaturujícím prostředí.....</i>	38
4.4.2.1	<i>Detekce aktivity GDH v polyakrylamidovém gelu .....</i>	39
4.5	IMUNOCHEMICKÁ DETEKCE PŘÍTOMNOSTI VIRU .....	39
4.6	IMUNOCHEMICKÁ DETEKCE PŘÍTOMNOSTI HSP 70 .....	40
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
5.1	VLIV INFEKCE ZPŮSOBENÉ PVY <sup>NTN</sup> NA METABOLISMUS ROSTLIN TABÁKU .....	41
5.1.1	<i>Kvantifikace PVY metodou nepřímé ELISA .....</i>	41
5.1.2	<i>Aktivita PEPC v rostlinách tabáku.....</i>	42
5.1.3	<i>Aktivita NADP-ME v rostlinách tabáku .....</i>	43
5.1.4	<i>Aktivita PPDK v rostlinách tabáku .....</i>	44
5.1.5	<i>Aktivita GS v rostlinách tabáku.....</i>	45
5.1.6	<i>Aktivita GOGAT v rostlinách tabáku .....</i>	46
5.1.7	<i>Aktivita GDH v rostlinách tabáku .....</i>	47
5.1.8	<i>Aktivita NR v rostlinách tabáku.....</i>	50



5.1.9	<i>Aktivita PAL v rostlinách tabáku</i> .....	51
5.1.10	<i>Stanovení množství bílkovin v rostlinách tabáku</i> .....	53
5.1.11	<i>Aktivita proteas v rostlinách tabáku</i> .....	54
5.1.12	<i>Elektroforetická separace proteinů v přítomnosti SDS</i> .....	55
5.2	<b>STUDIUM Vlivu TEPLOTNÍHO ŠOKU NA PRŮBĚH VIROVÉ INFEKCE V ROSTLINÁCH TABÁKU</b> .....	56
5.2.1	<i>Kvantifikace PVY<sup>NTN</sup> metodou nepřímé ELISA</i> .....	57
5.2.2	<i>Kvantifikace HSP 70 metodou nepřímé ELISA</i> .....	58
5.2.3	<i>Aktivita PEPC v rostlinách tabáku</i> .....	59
5.2.4	<i>Aktivita NADP-ME v rostlinách tabáku</i> .....	59
5.2.5	<i>Aktivita PPDK v rostlinách tabáku</i> .....	60
5.2.6	<i>Aktivita GS v rostlinách tabáku</i> .....	61
5.2.7	<i>Aktivita GOGAT v rostlinách tabáku</i> .....	62
5.2.8	<i>Aktivita GDH v rostlinách tabáku</i> .....	63
5.2.9	<i>Aktivita NR v rostlinách tabáku</i> .....	64
5.2.10	<i>Aktivita PAL v rostlinách tabáku</i> .....	66
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>72</b>

# 1 Úvod

Rostliny mohou být během svého života vystaveny útokům virů, bakterií, hub a plísní. Kvůli přisedlému způsobu života se však rostlina nemůže bránit změnou stanoviště, proto se u rostlin vyvinuly komplexní a složité obranné mechanismy.

Virové choroby jsou hned po mykotických chorobách druhé nejčastější rostlinné choroby. Nejzávažnější následky mají u vegetativně rozmnožovaných a u vytrvalých rostlin.

Virová infekce patří mezi nejčastější příčiny poklesu výnosu hospodářských plodin. V našich podmínkách jsou viry původci asi 10% chorob a způsobují až 30% ztrát v zemědělství [1].

## 1.1 Viry

Viry jsou nitrobuněční parazité, kteří se mohou rozmnožovat pouze v hostitelské buňce [1,2].

Virová částice (virion) se skládá z virového genomu ve formě nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) a bílkovinného pouzdra nazývaného kapsida. Některé viry obsahují ještě navíc membránový obal. Ten vzniká z buněčné membrány hostitelské buňky [3].

Viry lze dělit podle dvou hlavní kritérií. Nejčastěji viry dělíme podle hostitele do šesti skupin:

- bakteriofágy - napadají bakterie
- cyanofágy - napadají sinice
- fytoviry - napadají rostliny
- mykoviry- napadají houby
- virofágy - napadají jiné viry
- zooviry - napadají živočichy

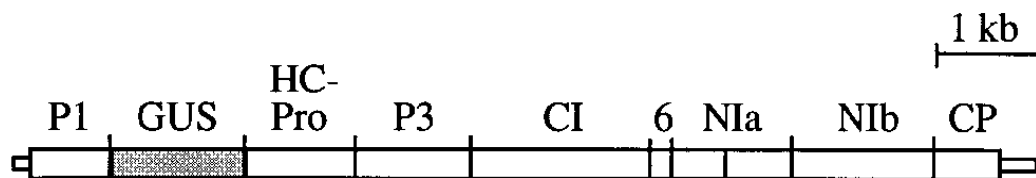
Dále viry můžeme dělit podle jejich genomu na RNA a DNA viry [1,3].

## 1.1.1 Rostlinné viry

Rostlinné viry se od živočišných virů značně odlišují a to hlavně způsobem, jakým infikují hostitele. Rostlinná buňka má na svém povrchu buněčnou stěnu, která jí chrání proti virům. Rostlinné viry tedy nemohou využít povrchových receptorů pro vstup do buňky, jako živočišné viry. Rostlinné viry potřebují vektor, převážně savý hmyz, který naruší buněčnou stěnu a tím jim umožní vstup do buňky. Virus také může ke vstupu do buňky využít poškození integrity buněčné stěny, například v důsledku poranění rostliny. V napadané buňce dojde k rozmnožení viru. K dalšímu šíření hostitelskou rostlinou využívá virus jednak plasmodesmata spojující sousední buňky, ale také vodivá pletiva. Toto šíření infekce se označuje jako systémové. Virus také ve své genetické informaci obsahují geny kódující speciální proteiny. Kromě specifických proteas to mohou být represory transkripce tzv. "gene silencing", ale také tzv. "movement" proteiny (MP). Tyto proteiny umožňují šíření viru z buňky do buňky přes plasmodesmata. To se děje dvěma rozdílnými způsoby. V prvním případě se MP váže na virovou částici a interakcí s plasmodesmaty umožňuje průchod virové částice do zdravé buňky. Ve druhém případě se MP váže na plasmodesmata a zvyšuje jejich propustnost, a tím umožňuje viru průchod do zdravé buňky [3,4].

### 1.1.1.1 *Potyviry*

Potyviry jsou významná skupina virů s pozitivní jednořetězcovou molekulou RNA o délce 9500 nukleotidů. Potyviry se dělí do 6 rodů podle přenosového vektoru. Tato RNA je překládána do jednoho velkého polypeptidu, který má molekulovou hmotnost 340 - 380 kDa. Jednotlivé funkční proteiny jsou z velkého polyproteinu vyštěpovány třemi virovými proteasami (P1, HC-Pro, NIa) (Obr. 1, str. 6) [1,3].



Obr. 1: Struktura genomu potyvirusu. P1- proteasa, HC-Pro - proteasa, P3 - kofaktor proteas, CI- RNA helikasa, NIa - proteasa, NIb - RNA dependentní RNA polymerasa, CP - obalový protein [3]

Potyviry mají vláknitou strukturu. Jejich délka je od 680 do 900 nm. V průměru mají pouze od 11 do 20 nm [1].

Y virus bramboru (PVY) patří mezi největší škůdce hospodářských plodin. PVY se dělí na čtyři hlavní kmeny PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N</sup> a PVY<sup>NTN</sup>. PVY<sup>NTN</sup> způsobuje vznik nektróz a je spojován především s nekrotickou kroužkovitostí bramboru [1,3].

Infekce PVY<sup>NTN</sup> se projevuje vznikem typických nekrotických míst na inokulovaných listech. Tato nekrotická místa se většinou objevují do sedmi dnů od inokulace. Virus se dále šíří i do neinokulovaných listů. Typicky 10 dnů od inokulace se začínají projevovat příznaky, jako jsou povadlé listy a později i nekrotické tmavnutí žilnatiny [1,3].

## 1.2 Interakce mezi rostlinou a virem

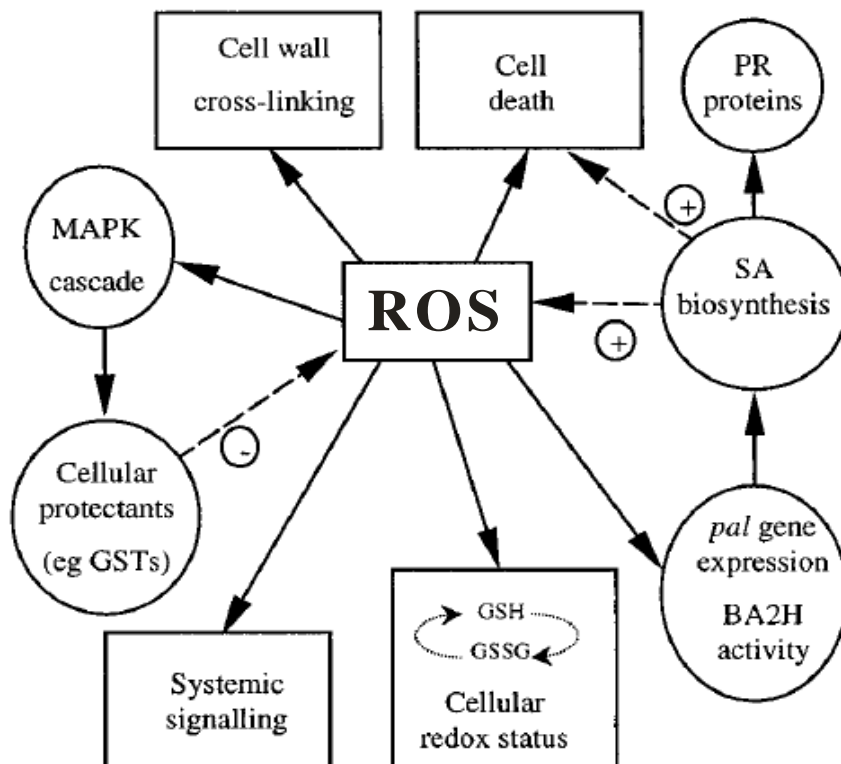
Mezi rostlinami a viry se v průběhu evoluce vytvořily velmi složité vztahy. U virů se vyvinuly dokonalejší techniky, které využívají k šíření rostlinou. Rostliny získaly schopnost účinné obrany proti virům. Ačkoliv rostliny nedisponují specializovanými imunitními buňkami jako živočichové, nejsou proti viru bezbranné a jsou schopny se velice účinně bránit. Využívají jednak mechanické bariéry (buněčná stěna, krycí pletiva, vosky), ale také indukované obranné mechanismy zahrnující změny metabolismu a genové exprese. Většina obranných reakcí rostliny závisí na aktivaci příslušných genů [1,3].

Látky vyvolávající obranou reakci se označují jako elicitory [3]. Tyto látky jsou rozpoznávány specifickými receptory. Přenos signálu od aktivovaného receptoru k DNA je možný více systémy. Nejčastěji se využívá fosfoinositolový systém, který aktivuje proteinkinasy a následně i expresi genů [1,3]. Tyto dráhy spouští syntézu stresových proteinů, sekundárních metabolitů, mezi které patří fenyylpropanoidy, alkaloidy, flavonoidy a terpenoidy. Také dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku, které jsou jednou z prvních forem odpovědi na přítomnosti viru [5].

### **1.2.1 Hypersenzitivní reakce**

Jedná se o proces tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS). Reaktivní formy kyslíku hrají zásadní úlohu během patogeneze. Mohou omezit šíření patogenu zesílením buněčné stěny nebo patogen zničit přímo. Mají také důležitou roli v signalizaci. Reaktivní formy kyslíku jsou pro rostlinu toxické a vedou většinou k buněčné smrti. Sice dojde ke ztrátě několika buněk a poškození rostliny, ale je tím zabráněno dalšímu šíření patogenu. K minimalizování škod z oxidativního poškození, rostliny využívají enzymatického systému k vychytávání ROS [6,7].

Akumulace ROS souvisí s expresí genu fenyllalaninamoniumlyasy na biosyntézu kyseliny salicylové (obr. 2, str. 8). Ta je důležitou signální molekulou a indukuje například syntézu PR proteinů [6,8].



Obr. 2: Schéma obranné odpovědi vyvolané ROS. SA, kyselina salicylová; *pal* gene, gen pro fenylalaninamoniumlyasu; GSH/GSSG, redukovaná a oxidovaná forma glutathionu; MAPK cascade, kaskáda mitogenem aktivované proteinkinázy; GSTs, glutathion S-transferasa [8].

## 1.2.2 PR proteiny

PR proteiny (z anglického označení pathogenesis-related proteins) jsou velice různorodá skupina proteinů, která se nevyskytuje ve zdravé rostlině. Naopak dochází k akumulaci v infikované rostlině. Plní obranou funkci během infekce virem, houbou nebo bakterií. Nejsou specifické vůči určitému patogenu, nicméně jejich exprese je určena typem odpovědi rostliny. Po objevení PR proteinů začala intenzivní studie jejich funkce. Jako první byla objevena chitinasová aktivita PR proteinů tabáku. Přes intenzivní výzkum zůstává funkce některých PR proteinů neznámá. Z chemického hlediska se jedná se proteiny o nižší molekulové hmotnosti (6 - 43 kDa), stabilní při nízkém pH (< 3) a jsou velmi odolné proteasam [9,10].

PR proteiny se rozdělují na kyselé, které se vyskytují v mezibuněčném prostoru a bazické. Kyselé PR proteiny zabraňují šíření patogenu do buňky. Bazické PR proteiny se vyskytují ve vakuole a souvisí s rezistencí vůči hmyzu. V současné době jsou rostlinné PR proteiny rozděleny do 14 tříd (tabulka 1). Aby mohl být protein zařazen mezi PR proteiny, musí splňovat dvě kritéria. Zaprvé nesmí být přítomen ve zdravé rostlině. Zadruhé exprese toho proteinu musí být prokázána alespoň ve dvou různých kombinacích patogen-rostlina, nebo exprese musí být potvrzena dvěma nezávislými laboratořemi [9,10,11]. U řady z nich dosud není jejich funkce známá.

třída	funkce
PR-1	Neznámá
PR-2	$\alpha$ 1,3-glukonasa
PR-3	Chitinasa
PR-4	Chitinasa
PR-5	Neznámá (Thaumatín)
PR-6	Inhibitor proteas
PR-7	Endoproteasa
PR-8	Chitinasa
PR-9	Peroxidasa
PR-10	Ribonukleasa
PR-11	Chitinasa
PR-12	Protein poškozující bakteriální b. membránu
PR-13	Protein toxický pro herbivory
PR-14	Lipidový transportér

Tabulka 1: Třídy PR proteinů a jejich funkce [10]

### 1.2.3 Gene silencing

Tento termín popisuje formu transkripční i post-transkripční genové regulace, která má velký význam jako obranný mechanismus proti virům [12,13]. Transkripční "gene silencing" využívá modifikace histonů tvorbou vnějšího heterochromatinu okolo genu. Tím je zabráněno transkripci genu [13]. V případě post-transkripčního "gene silencing" se jedná o proces degradace RNA v rostlině. Tento proces využívá faktu, že životní cyklus viru

zahrnuje fázi, kdy je přítomná dvoušroubovice virové RNA, která je rozpoznána a štěpena enzymem Dicer na krátké úseky RNA. Tato RNA pak tvoří ribonukleasový komplex RISC (RNAi silencing complex), který je schopen specificky rozeznat virovou mRNA a rozštěpit ji. Tato mRNA je poté rozeznána jako poškozená a degradována. Viry vyvinuly mechanismy vedoucí k rezistenci vůči tomuto mechanismu [12,13].

## **1.2.4 Vliv virové infekce na metabolismus rostliny**

Během virové infekce dochází rovněž k ovlivnění mnoha metabolických drah. Bylo prokázáno, že klesá fotosyntéza a aktivita ribulosabisfosfátkarboxylasy (RubisCO, EC 4.1.1.39) a ke zvýšení fotorespirace [14,15].

Během virové infekce je také ovlivněn metabolismus sacharidů a aminokyselin [16]. Bylo zjištěno, že na začátku infekce dochází k akumulaci volných sacharidů a poklesu aktivity enzymů souvisejících s katabolismem sacharidů. Naopak na vrcholu infekce je koncentrace volných sacharidů nízká a dochází ke zvýšení aktivity enzymů souvisejících s katabolismem sacharidů [17].

Bylo zjištěno, že aktivita fosfoenolpyruvátkarboxylasy, která propojuje metabolismus sacharidů a aminokyselin, je během virové infekce zvýšená [14,18].

Avšak během virové infekce dochází ke zvýšeným nárokům na proteosyntézu vlivem syntézy virových částic, ale také pravděpodobně syntézy obraných proteinů (PR proteiny). Zdá se tedy, že virus ovlivňuje rostlinný metabolismus mnohem komplexněji.

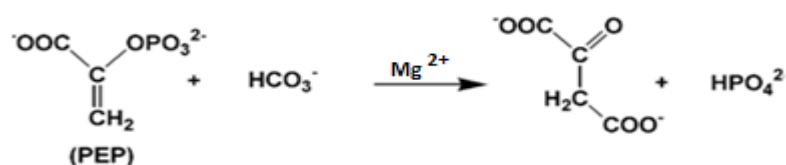


## 1.3 Přehled enzymů

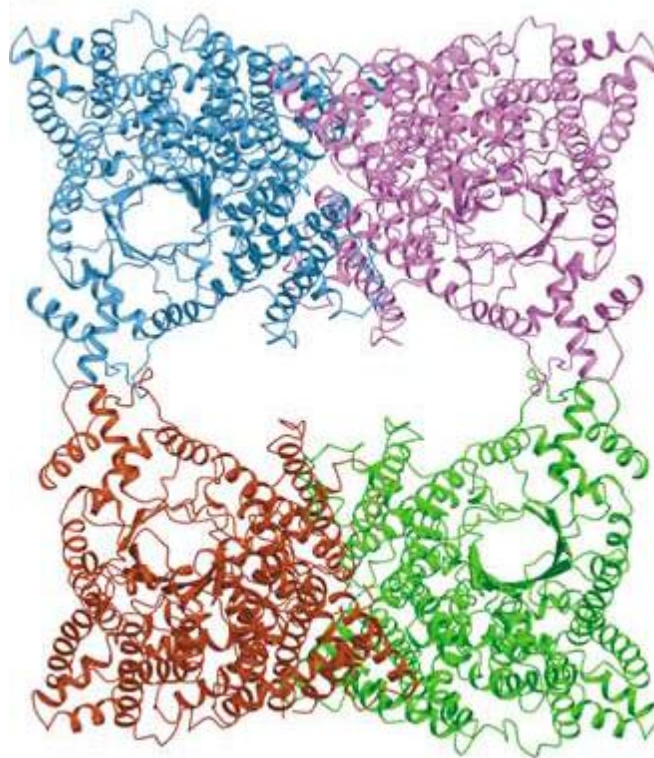
### 1.3.1 Fosfoenolpyruvátkarboxylasa

#### 1.3.1.1 Charakterizace fosfoenolpyruvátkarboxylasy

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (EC 4.1.1.31, PEPC) katalyzuje nevratnou reakci vzniku oxalacetátu z fosfoenolpyruvátu a hydrogenuhlíčanového anionu [19]. Pro tuto reakci je nezbytná přítomnost hořečnatého nebo manganatého kationtu jako kofaktoru. Reakce se skládá z více kroků. Nejprve dojde k navázání hořečnatého kationtu do reakčního centra enzymu. Poté dojde k navázání PEP a nakonec i uhličitánového anionu [19].



Fosfoenolpyruvátkarboxylasa je enzym lokalizovaný v cytosolu. Vyskytuje se ve vyšších rostlinách, řasách a sinicích. Bylo zjištěno, že se jedná o homotetramer s molekulovou hmotností jedné podjednotky přibližně 90 až 110 kDa [19,20,21].



Obr. 3: Model struktury PEPC kukuřice získaný rentgeno-strukturní analýzou [20].

V  $C_3$  rostlinách je hlavní funkcí tohoto enzymu doplňování meziproductů citrátového cyklu. V tomto cyklu vzniká  $\alpha$ -ketoglutarát, který je primární akceptor amonných iontů v metabolismu aminokyselin. Další funkcí PEPC je, společně s NADP-ME, udržování pH cytoplasmy [20,22,23,24,25,26].

V  $C_4$  a CAM rostlinách plní PEPC funkci primární fixace  $CO_2$  pro fotosyntézu. Proto také tento enzym v listech  $C_4$  a CAM rostlin vyskytuje ve velkém množství. V  $C_4$  rostlinách je PEPC aktivní ve dne, v CAM v noci a aktivita PEPC tedy souvisí s cirkadiálním rytmem. Prefixace  $CO_2$  u  $C_4$  rostlin pomáhá snížit ztráty vody výparem a snižuje nežádoucí fotorespiraci. Rovněž tak noční fixace  $CO_2$  v CAM rostlinách umožňuje rostlině minimalizovat ztráty vody. Tato adaptace je výhodná především v horkých a suchých oblastech [22,23,24,26,28].

### **1.3.1.2 Regulace aktivity fosfoenolpyruvátkarboxylasy**

Aktivita je závislá na teplotě a pH. Optimální pH pro tento enzym je 8,1 [27].

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa je v buňce regulována jednak dostupností substrátu PEP, ale také fosforylací a přítomností alosterických efektorů v cytoplazmě [27].

Nejdůležitějšími alosterickými efektory PEPC jsou D-glukosa-6-fosfát a L-malát. D-glukosa-6-fosfát snižuje  $K_m$  pro substrát PEP a tím zvyšuje jeho afinitu PEPC. L-malát, který vzniká z oxalacetátu (produktu reakce katalyzované PEPC) za katalýzy NAD-malátdehydrogenasy (EC 1.1.1.37), funguje jako zpětnovazebný inhibitor PEPC [28,29,30].

Dále je PEPC regulována reverzibilní fosforylací serinu (u tabáku serin-11) v blízkosti N-konce polypeptidu. Tuto fosforylací zajišťuje specifická PEPC kinasa [27].

## **1.3.2 Enzymy podílející se na fixaci dusíkatých látek**

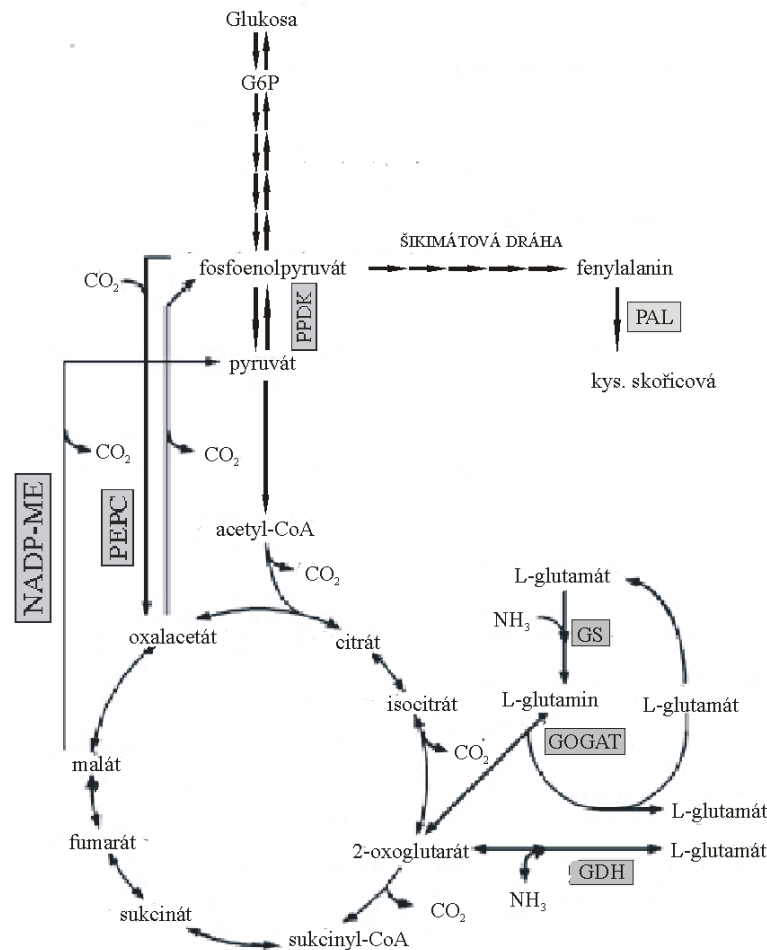
### **1.3.2.1 Propojení metabolismu sacharidů a aminokyselin**

Metabolismus sacharidů je velmi těsně propojen s asimilací dusíku a metabolismem aminokyselin. Během asimilace dusičnanů dochází k poklesu aktivity syntetických drah a naopak ke zvýšení glykolýzy. Fosfoenolpyruvát, který je produktem glykolýzy a Calvinova cyklu, má dvě důležité funkce během asimilace dusičnanů [2,31].

Fosfoenolpyruvát může být PEPC přeměněn na oxalacetát, který vstupuje do citrátového cyklu, kde je sérií reakcí katalyzovaných pyruvátdehydrogenasou (EC 1.2.4.1), citrátsynthasou (EC 2.3.3.1) a isocitrátdehydrogenasou (EC 1.1.1.41) přeměněn na  $\alpha$ -ketoglutarát. Ten je využit enzymovým komplexem glutaminsynthetasa/glutamátsynthasa jako akceptor amonného kationu vzniklého redukcí dusičnanů nitrátreduktasou a nitritreduktasou (Obr. 4) [2,31,32].

Další důležitá funkce fosfoenolpyruvátu souvisí s regulací pH. Fosfoenolpyruvát může být za katalýzy PEPC a NAD-malátdehydrogenasy (EC 1.1.1.39) přeměněn na

malát, který je v kořenech dekarboxylován na pyruvát. Tím rostlina brání okyselení cytoplazmy, ke kterému dochází během asimilace dusičnanů [2,31].



Obr. 4: Propojení metabolismu aminokyselin a sacharidů. PEPC - fosfoenolpyruvátcarboxylasa, GOGAT - glutamátsynthasa, GS - glutaminsynthetasa, GDH - glutamátdehydrogenasa, NADP-ME - NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační), PPK - Pyruvát, fosfátkinasa, PAL - fenyloalaninamoniumlyasa [2].

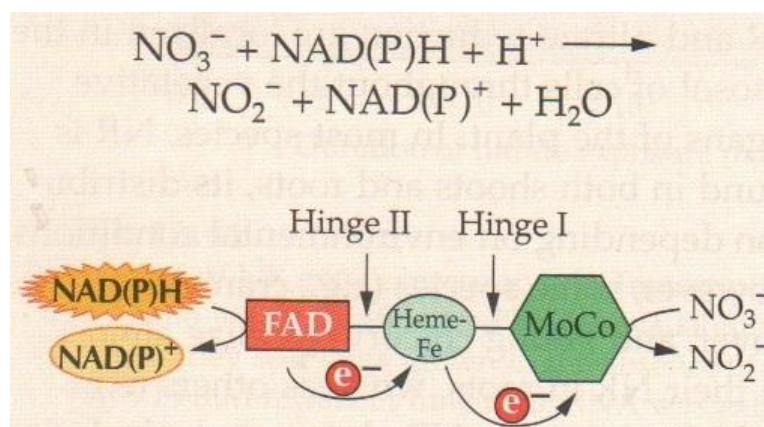
### 1.3.2.2 Příjem a fixace dusíku

Dusík je významný biogenní prvek, který je nezbytný pro syntézu aminokyselin, nukleových kyselin, ale i řady obranných látek. Jako zdroj dusíku rostlině slouží dusičnanové nebo amonné ionty, které rostlina přímá kořeny specifickými přenašeči. Dusičnanové ionty rostlina není schopna metabolicky využít. Proto musí být nejprve redukovány na amonné ionty. Redukce dusičnanů probíhá jednak přímo v kořenech, ale také mohou být dusičnanové anionty transportovány do listů, kde jsou redukovány na ionty

amonné. To, zda jsou dusičnany redukovány v kořenech nebo listech závisí na několika faktorech. Je to jedna na stáří rostliny, ale také na teplotě, dostupnosti uhlíku a samotných dusičnanů. Velkou roli hraje také druhová specifita. Například bobovité rostliny redukují dusičnany téměř výhradně v kořenech [2,32].

### 1.3.2.3 Nitrátreduktasa

Nitrátreduktasa (NR, EC 1.7.1.1) je cytosolový enzym katalyzující přeměnu dusičnanů na dusitany. Jedná se o první krok asimilace dusíku rostlinou. Jeho molekulová hmotnost je přibližně 200 kDa. Tento dimerní komplexní enzym obsahuje tři kofaktory - flavinadenindinukleotid, hemově vázané železo a molybdenový kofaktor (MoCo) (obr. 5). Tyto kofaktory tvoří redoxní centra pro přenos elektronů z NADH na dusičnan [33,34,35].



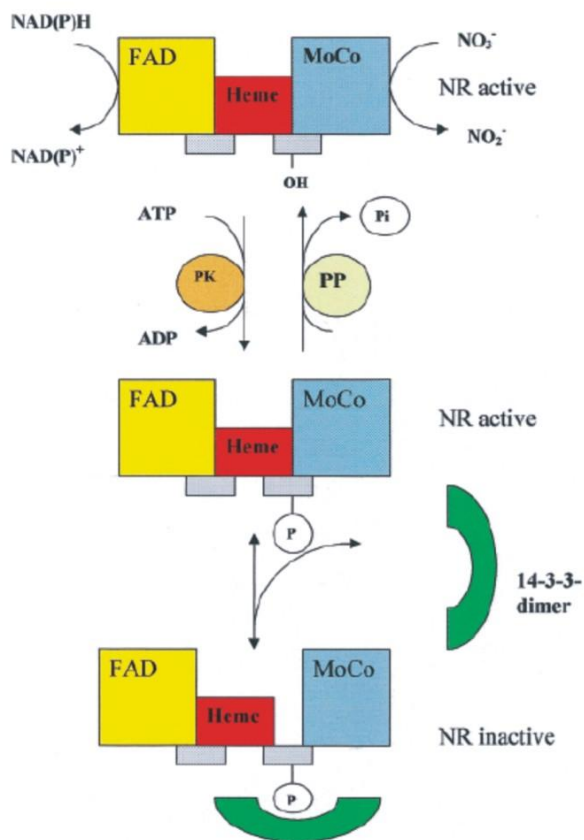
Obr. 5: Domény přítomné v NR [2].

Aktivita nitrátreduktasy je v rostlině vysoce regulována. Je o jednak proto, že redukce dusičnanů na dusitany je energeticky náročný proces spotřebovávající NAD(P)H. Ale také proto, že dusitany, produkty NR, jsou pro rostlinu velmi toxické. Z těchto důvodů musí být aktivita NR citlivě regulována. To je zajištěno hned několika mechanismy [33,34,35].

Regulace aktivity NR je hlavně umožněna transkripcí mRNA genu pro NR. K syntéze mRNA nitrátreduktasy dochází pouze, pokud je v cytoplasmě dostatečné množství dusičnanových iontů. Pokud je tato podmínka splněna, dochází k syntéze mRNA brzy ráno a svého vrcholu dosahuje v poledne. Tomu odpovídá i aktivita nitrátreduktasy, která roste během první poloviny dne a maxima dosahuje v poledne. Po poledni již aktivita NR pomalu klesá až do setmění. Regulace transkripce je ovšem velmi pomalá [33,34].

V případě potřeby rychlé regulace aktivity NR využívá rostlina posttranslační modifikace. Pokud dojde ke snížení fotosyntézy, reaguje na to rostlina fosforylací NR na serinovém zbytku  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní proteinkinasy, následované  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  dependentní vazbou proteinu 14-3-3 na fosforylovaný serinový zbytek (Obr. 6). Vazbou 14-3-3 proteinu dojde k přerušení přenosu elektronů a tím i k inhibici aktivity NR [33,34]. Pro zachování vazby nitrátreduktasy a proteinu 14-3-3 je nezbytná přítomnost kationtů  $\text{Mg}^{2+}$ . Koncentrace  $\text{Mg}^{2+}$  je velmi nízká během dne a tím umožňuje disociaci komplexu nitrátreduktasy a proteinu 14-3-3. Také aktivita  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní proteinkinasy je regulována a to inhibicí fyziologickou koncentrací glukosa-6-fosfátu. Způsob regulace aktivity NR značí potřebu koordinace metabolismu sacharidů a aminokyselin. Na rozdíl od syntézy NR, nízká koncentrace dusičnanů nemá na fosforylaci nitrátreduktasy žádný vliv [2,33,35].

Fosforylovaná nitrátreduktasy může být opět defosforylována a to proteinfosfatasou 2A. Jako signál k reaktivaci NR slouží asimiláty fotosyntézy (Obr. 6) [33,35].

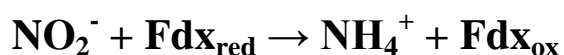


Obr. 6: Model regulace aktivity NR fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3. Aktivní NR je fosforylována NR kinasou (PK). Na fosforylovanou NR se naváže dimer proteinu 14-3-3 a inaktivuje jí. Pokud dojde k vyvázání proteinu 14-3-3 od NR, dojde k defosforylací NR proteinfosfatasou 2A (PP) a enzym se vrátí opět do své aktivní formy [33].

Dále nitrátreduktasa katalyzuje produkci oxidu dusnatého. Přestože tato reakce je minoritní a využívá pouze jedno procento kapacity enzymu, je produkt této reakce velice důležitou látkou regulující rostlinný metabolismus, především za nefyziologických podmínek [2,34]. Oxid dusnatý funguje jako signální molekula, která indukuje transkripci genů odpovědných za obranu před patogeny. Oxid dusnatý se také účastní procesů vedoucí k buněčné smrti. NO se váže na hem v hemoproteinech a tímto způsobem inhibuje aktivitu katalasy a askorbátperoxidasy, které detoxifikují  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Inhibicí produkce oxidu dusnatého dochází k výraznému zhoršení průběhu infekce v rostlině [2].

### 1.3.2.4 Nitritreduktasa

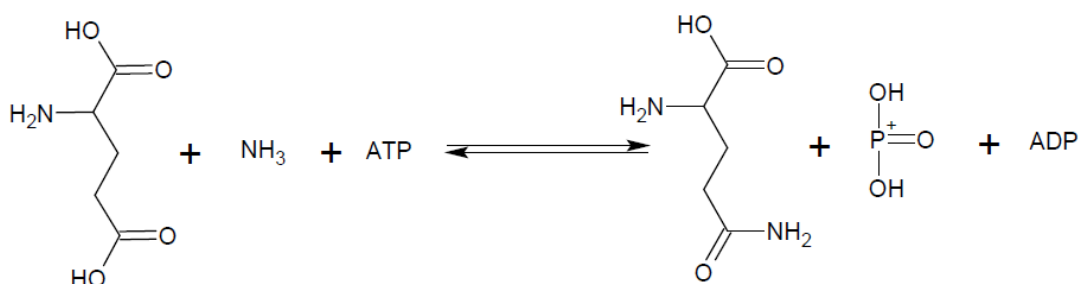
Enzymem podílejícím se na asimilaci dusíku je nitritreduktasa (NiR, EC 1.7.7.1). Dále redukuje dusitany produkované nitrátreduktasou na amonné ionty. Jako zdroj elektronů slouží tomuto enzymu redukovaný ferredoxin (Fdx) [36,37].



Jedná se plastidový monomerní protein o relativní molekulové hmotnosti přibližně 63 000. Jako prostetickou skupinu obsahuje  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  a také jeden sirohem [36,37].

### 1.3.2.5 Glutaminsynthetasa

Glutaminsynthetasa (GS, EC 6.3.1.2) je klíčový enzym fixace amonných iontů a syntézy aminokyselin. Tento enzym se nachází jak v cytoplasmě, tak plastidech. Katalyzuje vznik glutaminu z glutamátu a amonných iontů za spotřeby ATP [37,38,39,40,41,42].



Jedná se o protein o relativní molekulové hmotnosti 350 000 až 400 000. V případě formy vyskytující se v rostlinách obsahuje GS osm podjednotek. Vyznačuje se vysokou afinitou k  $\text{NH}_4^+$  [40,41].

Plastidová forma plní funkci fixace  $\text{NH}_4^+$  vzniklého redukcí nitrátů. V chloroplastech fixuje  $\text{NH}_4^+$  vznikající ve fotorespiraci a společně s glutamát-synthasou regeneruje glutamát spotřebovávaný fotorespirací. Cytosolová forma plní funkci fixace

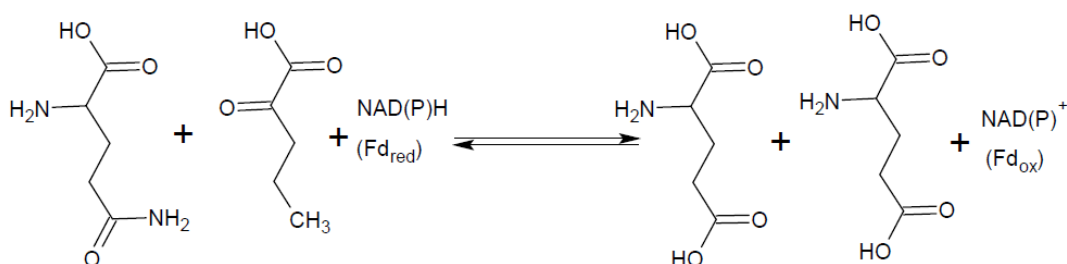


$\text{NH}_4^+$  vzniklého redukcí nitrátů, přijatého kořeny a  $\text{NH}_4^+$  pocházejícího z odbourávání aminokyselin [40].

Studiem vlivu infekce PVY na GS bylo zjištěno, množství mRNA cytosolové formy GS se zvýšilo. Naopak u plastidové formy GS byl zaznamenán pokles množství mRNA v důsledku virové infekce [43].

### 1.3.2.6 *Glutamátsynthasa*

Glutamátsynthasa (GOGAT, glutamát-2-oxoglutarát amino-transferasa) katalyzuje reakci, ve které z glutaminu a 2-oxoglutarátu vznikají dvě molekuly glutamátu. Jedna molekula glutamátu je využita GS jako akceptor  $\text{NH}_4^+$  pro regeneraci glutaminu. Druhá molekula glutamátu je využita při transaminačních reakcích během syntézy další aminokyselin [40].

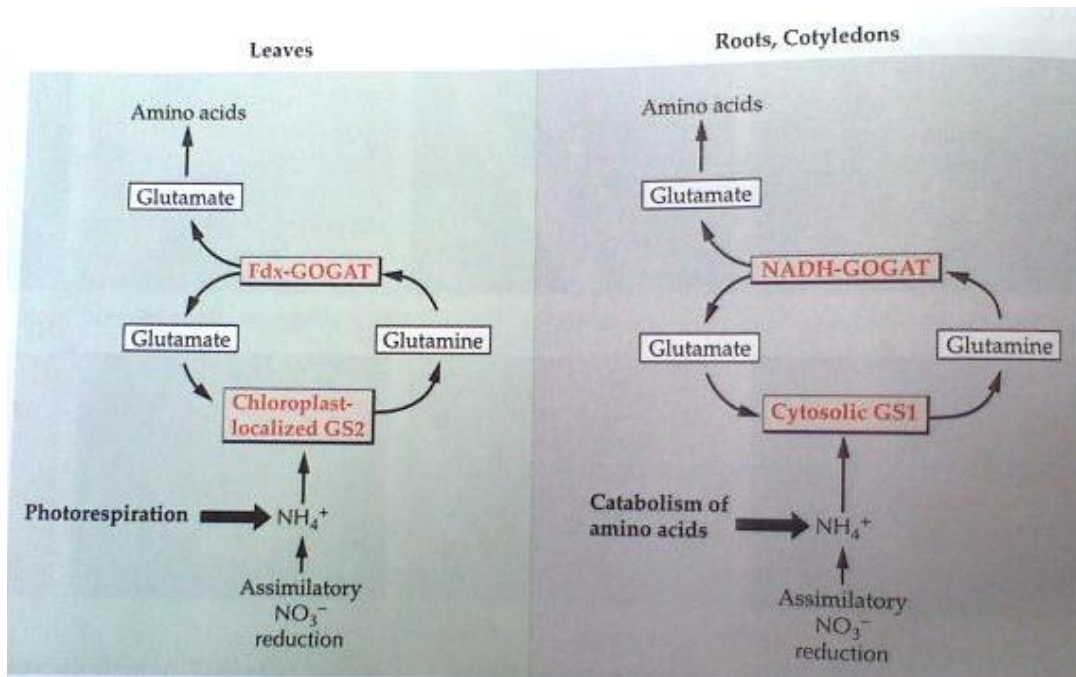


Tento enzym se v rostlině vyskytuje ve dvou rozdílných formách (obr. 7, str. 20) [44].

**Fdx-GOGAT** (EC 1.4.7.1) je přítomný v chloroplastu a jako donor elektronů využívá ferredoxin (Fdx). Redukovaná forma ferredoxinu vzniká během světelné fáze fotosyntézy a proto je aktivita Fdx-GOGAT přímo závislá na fotosyntéze. Vyskytuje se ve vyšších rostlinách, řasách a sinicích. Jedná se o monomerní Fe-S protein s relativní molekulovou hmotností přibližně 150 000 [44].

Druhou formou je **NADH-GOGAT** (EC 1.4.1.14). Tato forma je přítomna v plastidech převážně nefotosyntetických buněk. Jako donor elektronů využívá NADH nebo NADPH.

Jedná se taktéž o monomerní Fe-S protein, ovšem s relativní molekulovou hmotností přibližně 230 000 [44,45].



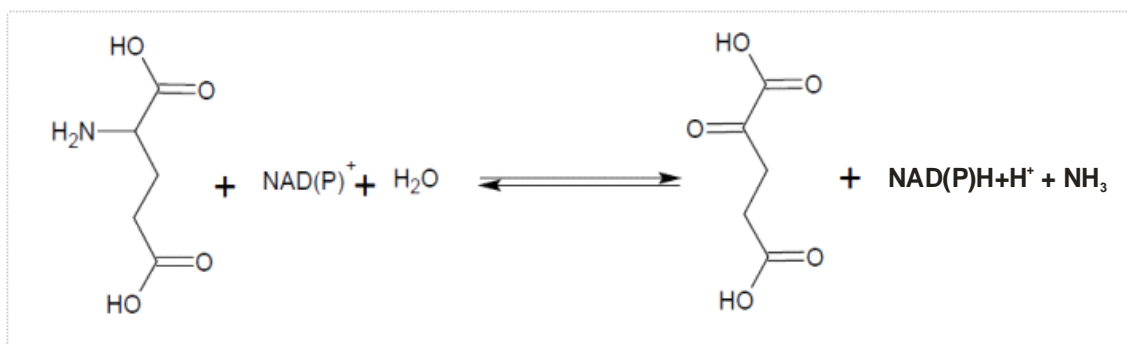
Obr. 7: Chloroplastová forma glutamátsynthasy (Fdx-GOGAT) spolu s plastidovou formou glutaminsynthetasy (GS2) fixují  $\text{NH}_4^+$  vznikající ve fotorespiraci. Nefotosyntetická forma glutamátsynthasy (NADH-GOGAT) spolu s cytosolovou formou glutaminsynthetasy (GS1) fixují  $\text{NH}_4^+$  pocházející z katabolismu aminokyselin [2].

### 1.3.2.7 *Glutamátdehydrogenasa*

Glutamátdehydrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2) katalyzuje reverzibilní oxidačně-deaminační reakci kdy z glutamátu vzniká 2-oxoglutarát. Tento mitochondriální enzym může katalyzovat i obrácenou aminační reakci a podílet se tak na fixaci dusíku. Avšak GDH má k amonným kationtům mnohem menší afinitu než GS a proto má velmi malou nebo žádnou roli v primární fixaci dusíku v rostlině [40,46,47].

Avšak za stresových podmínek, kdy není komplex GS/GOGAT plně funkční, může zvýšená aktivita GDH poskytovat glutamát pro biosyntézu protektivních látek a mírnit toxický vliv vysoké koncentrace amonných kationů [48].

Studiem vlivu infekce PVY na GDH bylo zjištěno, že aktivita GDH ve směru aminační reakce se v důsledku virové infekce zvyšuje. Aktivita GDH v obráceném, deaminačním směru nebyla virovou infekcí ovlivněna [49].

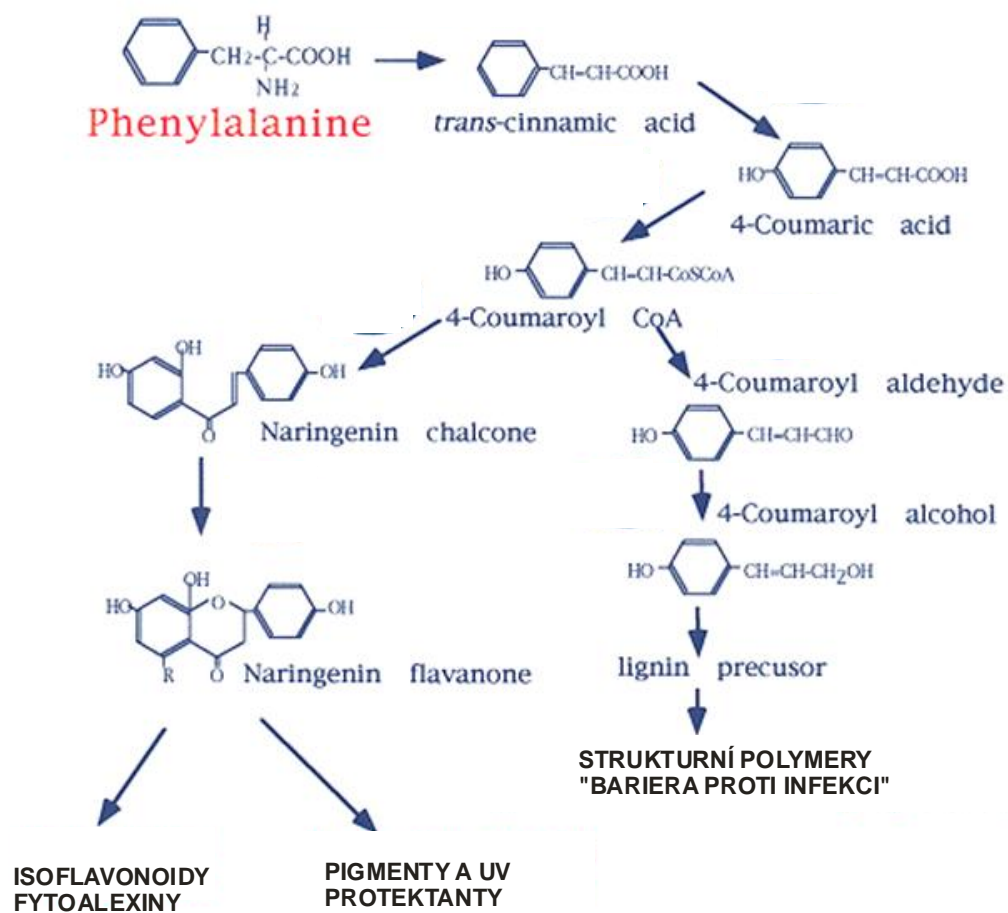


### 1.3.2.8 *Fenylalaninamoniumlyasa*

Dalším enzymem, který se podílí na metabolismu dusíkatých látek a produkci obraných látek proti stresu je fenylalaninamoniumlyasa (PAL, EC 4.3.1.5). PAL je prvním a klíčovým enzymem v syntetické dráze fenylpropanoidů. Deaminuje fenylalanin z šikimátové dráhy na trans-cinnamát, který je prekurzorem řady látek patřící do skupiny fenylpropanoidů. Tyto látky plní řadu esenciálních funkcí, jako je například mechanická opora (lignin), protektivní látky proti abiotickému i biotickému stresu (antioxidanty) a pigmenty (antokyanin) (obr. 8, str. 22) [8].

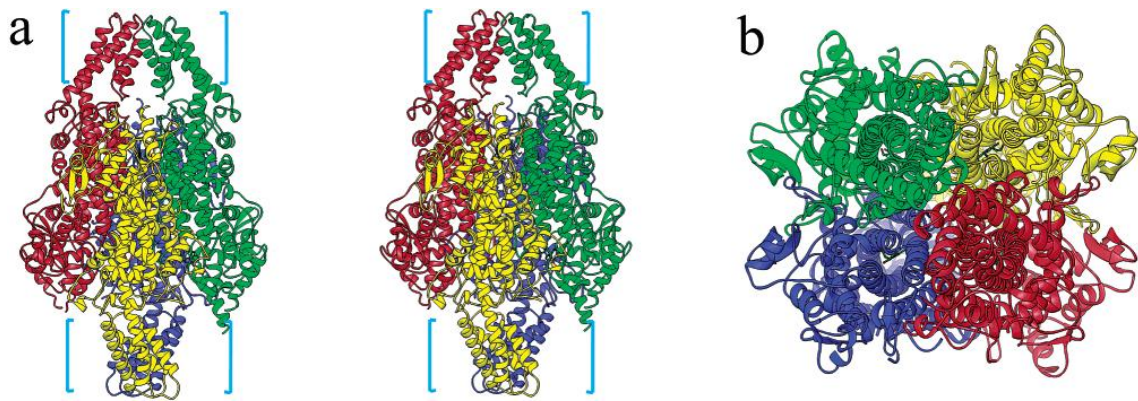
Studiem vlivu houbové infekce na rýži bylo zjištěno, že již během 6 hodin od začátku infekce dochází ke zvýšené exprese PAL [49].

Při studiu vlivu houbové infekce na plod jabloně bylo zaznamenáno zvýšení aktivity PAL v důsledku infekce [50].



Obr. 8: Trans-cinnamát je prekurzor řady fenylypropanoidů. Tyto látky plní rozličné funkce. Strukturní (lignin), pigmenty, protektivní látky proti biotickému stresu (fytolalexiny) [51].

Strukturně se jedná o homotetramer o molekulové hmotnosti 76,5 kDa pro PAL tabáku [52].



Obr. 9: Struktura PAL z *Rhodosporidium toruloides*. získaná rentgeno-strukturní analýzou. Na obrázku je tetramer PAL složený ze čtyř identických podjednotek (červená, žlutá, modrá, zelená) [52].

### 1.3.3 Další enzymy Hatchova-Slackova cyklu

NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) a Pyruvát, fosfátdikinas jsou spojovány především s  $C_4$  cestou fotosyntetické fixace  $CO_2$ . Jedná se o cyklus katalyzovaný PEPC, NADP-dependentní malátdehydrogenasou (NADP-MDH, EC 1.1.1.82), NADP-ME a PPK. NADP-ME přeměňuje malát na pyruvát a  $CO_2$ . Tím zvyšuje koncentraci  $CO_2$  v blízkosti RuBisCo. PPK regeneruje PEP pro další fixaci  $CO_2$  PEPC [2].

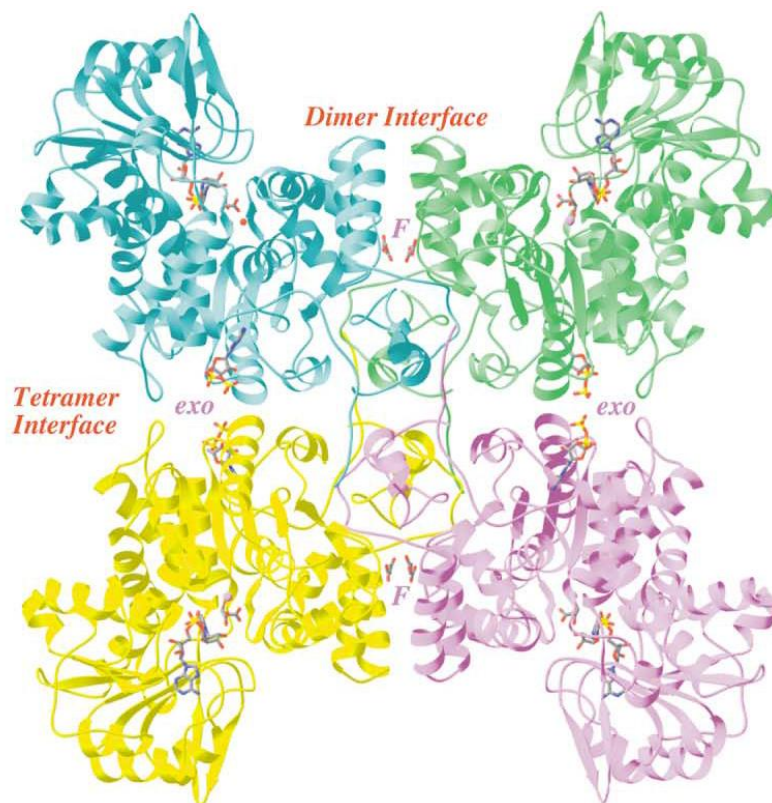
Tyto enzymy jsou přítomny i v  $C_3$  rostlinách, avšak v nižších aktivitách a uplatňují především za stresových podmínek [30].

#### 1.3.3.1 *NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační)*

NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) (NADH-ME, EC 1.1.1.40) katalyzuje oxidační dekarboxylaci malátu za vzniku pyruvátu,  $CO_2$  a NADPH. Pro reakci je potřeba koenzym NADP<sup>+</sup> a dvojmocný kation (nejčastěji  $Mn^{2+}$  nebo  $Mg^{2+}$ ). NADP-ME katalyzuje také obrácenou reakci, avšak výrazně menší rychlostí [53].



Tento enzym se nachází v prokaryotických i eukaryotických mikroorganismech, rostlinách a živočiších. U rostlin se vyskytuje ve formě tetrameru o relativní molekulové hmotnosti jedné podjednotky přibližně 62 000 - 67 000 [53,54,55].



Obr. 10: Model struktury lidského NADP-ME získaného rentgeno-strukturní analýzou. Jedná se o tetramer složený ze čtyř stejných podjednotek (žlutá, modrá, zelená, fialová) [56].

NADP-ME plní řadu rozličných funkcí. Fotosyntetické formy u  $C_4$  a CAM rostlin se podílí na dekarboxylaci malátu a tím poskytuje  $\text{CO}_2$  pro Calvinův cyklus. Nefotosyntetické formy plní několik funkcí. Je to jednak poskytování NADPH pro syntézu mastných kyselin a sekundárních metabolitů. Poskytování NADPH jako koenzymu pro antioxidantní enzymy. Spolu s PEPC se také podílí na udržování stálého pH cytoplasmy [30,57].

Aktivita NADP-ME je často studována v souvislosti se stresem. Zvýšení aktivity NADP-ME bylo zjištěno v souvislosti solným stresem i stresem suchem [58]. Také virová infekce způsobila zvýšení aktivity NADP-ME, ale pouze u cytosolové, nefotosyntetické formy [59].

### **1.3.3.2 Pyruvát, fosfátdikinasa**

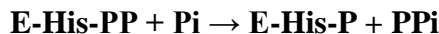
Pyruvát, fosfátdikinasa (PPDK, EC 2.7.9.1) katalyzuje za přítomnosti ATP a anorganického fosfátu vznik fosfoenolpyruvátu z pyruvátu [60].

Reakce probíhá ve třech krocích:

V prvním kroku reaguje PPDK (E) s ATP za vzniku sloučeniny Enzym-difosfát a AMP



V druhém kroku se odštěpuje fosfát z enzymu a reakcí s volným fosfátem vzniká pyrofosfát



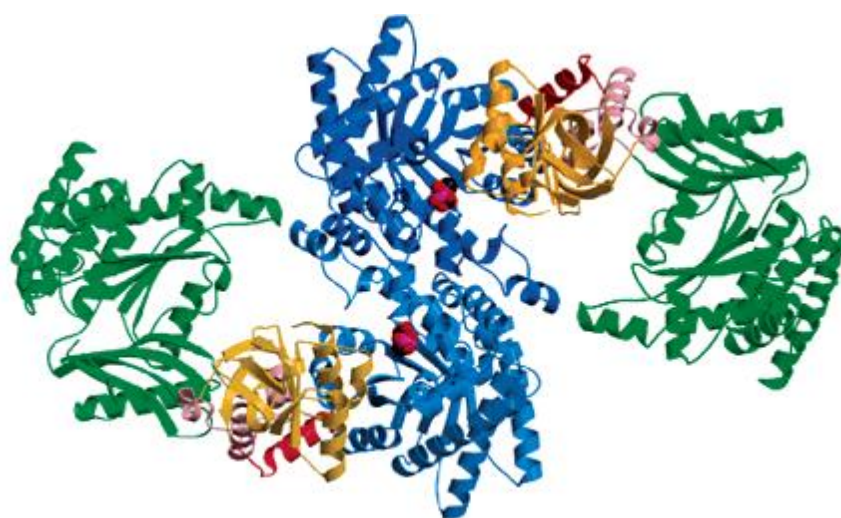
V posledním kroku reaguje fosforylovaný enzym s pyruvátem za vzniku PEP



Jak již bylo zmíněno výše, tento rostlinný enzym se nachází především v C<sub>4</sub>, kde se podílí na regeneraci PEP pro další fixaci CO<sub>2</sub>. V C<sub>3</sub> rostlinách se nachází jen v malém množství. Jeho hlavní funkcí je regenerace PEP. Ten může být využit pro glukoneogenezi, ale také v šikimátové dráze k syntéze fenylyalaninu, prekursoru sekundárních metabolitů. Fotosyntetický isoforma PPDK se nachází v chloroplastech, nefotosyntetická v cytosolu [61,62,63].

Byla také zjištěna souvislost mezi aktivitou PPDK a stresem a to jak abiotickým, tak biotickým. Virová infekce způsobila zvýšení aktivity PPDK v listech tabáku.

Aktivní forma PPDK je tetramer složený ze čtyř identických podjednotek o relativní molekulové hmotnosti 94 000 - 97 000 (obr. 11) [61,62,64].



Obr. 11: Model struktury PPDK kukuřice získaná rentgeno-strukturní analýzou. Dimer PPDK s navázaným substrátem, žlutě: centrální doména, zeleně: doména vázající nukleotid, modře: doména vázající pyruvát/PEP [65].

PPDK je regulována reverzibilní fosforylací threonylového zbytku regulačním proteinem PPDK, který katalyzuje mimo inaktivace PPDK fosforylací, ale také aktivaci defosforylací. Tato fosforylace je indukována tmou [64].



## 2 Cíl práce

- Zjistit vliv virové infekce na aktivitu enzymů souvisejících s příjmem, fixací dusíku a syntézou aminokyselin (NR, GS, GOGAT),
- Zjistit vliv virové infekce na aktivitu enzymů souvisejících s přeměnou a degradací aminokyselin (PAL, GDH)
- Zjistit vliv virové infekce na aktivitu enzymů Hatchova-Slackova cyklu (PEPC, NADP-ME, PPKK)
- Zjistit, zda je v podmínkách biotického stresu zvýšená proteosyntéza umožněna zvýšeným příjmem dusíku či jeho recyklací z vlastních proteinů hostitelské rostliny
- Zjistit vliv teplotního šoku na průběh virové infekce v rostlinách tabáku

## 3 Materiál

### 3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy 100 A	Denver instrument company, USA
Centrifuga	Hettich Universal 32R, Německo
Elektroforetická souprava	Biometra, Německo
Spektrofotometr Helios $\alpha$	Thermo Spectronic, USA
Spektrofotometr Ultrospec 2 100	Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

## 3.2 Chemikálie

Akrylamid	Sigma, USA
ATP	Sigma, USA
Bis	Sigma, USA
Bradfordovo činidlo	Sigma, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
BSA	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue R 250, G 250	Sigma, USA
Dodecylsírán sodný	Serva, Německo
DTT	Sigma, USA
EDTA	Sigma, USA
Ethanol	Lachema, ČR
Fenolové činidlo	Lachema, ČR
Fenylalanin	Sigma, USA
Fosfoenolpyruvát	Sigma, USA
Glukosa-6-fosfát	Sigma, USA
Glutamát sodný	Sigma, USA
Glutamin	Sigma, USA
Glycerol	Penta, ČR
Glycin	Degussa, ČR
HCl	Penta, ČR
KCl	Penta, ČR
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Lachema, ČR
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Lachema, ČR
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Lachema, ČR
Kyselina octová	Lachema, ČR
Kyselina skořicová	Sigma, USA
Kyselina trichloroctová	Lachema, ČR
L-malát	Sigma, USA
Methanol	Lachema, ČR
MgCl <sub>2</sub>	Sigma, USA
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Lachema, ČR

NADH	Sigma, USA
NADPH	Sigma, USA
NAD <sup>+</sup>	Sigma, USA
NaOH	Lachema, ČR
NNEDD	Sigma, USA
N,N'-methylen-bis(akrylamid)	Sigma, USA
Nitroblue tetrazolium	Sigma, USA
Iodonitrotetrazolium chlorid	Sigma, USA
Oxalacetát sodný	Sigma, USA
Phenazin methosulfát	Sigma, USA
Protilátka anti-HSP 70	Thermo Fisher Scientific, USA
Protilátka anti-rabbit IgG	Sigma, USA
PVP	Sigma, USA
Pyruvát sodný	Sigma, USA
Sacharosa	Lachema, ČR
Sulfanilamid	Sigma, USA
TEMED	Serva, Německo
Tris	Sigma, USA
Vinan sodný	Lachema, ČR

### 3.3 Rostlinný materiál

Rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 byly laskavě poskytnuty doc. RNDr. Noemi Čeřovskou, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR.

### 3.4 Rostlinné viry

Y virus bramboru, kmen PVY<sup>NTN</sup> (izolát Lebanon) byly laskavě poskytnuty doc. RNDr. Noemi Čeřovskou, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR.

## 3.5 Protilátky

Protilátka proti obalovému proteinu *Y viru bramboru* byly laskavě poskytnuty doc. RNDr. Noemi Čeřovskou, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR.

Protilátka proti HSP 70 byla dodána firmou Thermo Fisher Scientific, USA.

# 4 Metody

## 4.1 Příprava vzorku z rostlinného materiálu

### 4.1.1 Pěstování rostlin tabáku

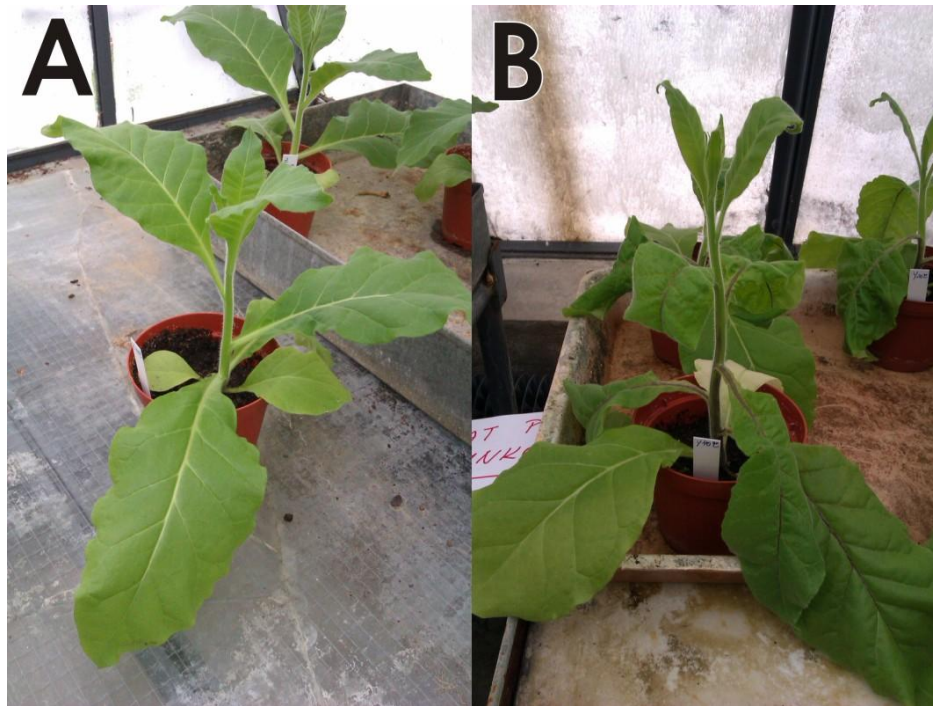
Pro studium vlivu virové infekce na metabolismus rostlin tabáku byly použity 30 dnů staré rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 vypěstované v zemině. Rostliny byly rozděleny do dvou skupin po 15 rostlinách. První skupina byla infikována *Y virem bramboru*, kmenem NTN. Druhá skupina infikována nebyla a sloužila jako kontrolní.

Pro první pokus byly rostliny pěstovány ve skleníku. Ve druhém pokusu byly rostliny pěstovány v komoře s umělým osvětlením (cyklus 14 hodin světla, 10 hodin tmy), stálou teplotou 20°C a relativní vlhkostí 75%.

Také pro studium vliv teplotního šoku na průběh virové infekce byly použity 30 dnů staré rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 pěstované v zemině. Rostliny byly rozděleny do 5 skupin po 15 rostlinách na rostliny neinfikované, kontrolní; rostliny neinfikované, vystavené teplotní šoku; rostliny tabáku infikované PVY<sup>NTN</sup> ;

rostliny tabáku infikované PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavené teplotnímu šoku; rostliny tabáku vystavené teplotnímu šoku a následně infikované PVY<sup>NTN</sup>. Teplotní šok byl proveden umístěním rostlin do 40°C po dobu 2 hodin.

Inokulace byla provedena potřením dolního listu rostliny směsí homogenizátu listu infikovaného *Y virem bramboru* v přenosovém roztoku (0,057M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a karborundového prášku.



Obr. 12.: Rostlina *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 A) kontrolní B) infikovaná PVY<sup>NTN</sup> (16. den od inokulace)

Z rostlin byly v pravidelných intervalech odebírány vzorky horních, systémově infikovaných vzorků. Z každé skupiny byly připraveny směsné vzorky. Každý směsný vzorek obsahoval rostlinný materiál ze tří rostlin. Vzorky byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při – 80 °C.

## **4.1.2 Příprava rostlinného extraktu pro stanovení aktivity enzymů**

Listy tabáku byly homogenizovány v třecí misce s trojnásobným množstvím extrakčního pufru A (100 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol). K homogenátu bylo přidáno 0,05 g PVP na 1 ml homogenátu, který byl následně centrifugován při 16 600 g a teplotě 4°C po dobu 15 minut. Získaný supernatant byl použit jako extrakt pro stanovení aktivity enzymů.

## **4.2 Měření aktivity enzymů**

### **4.2.1 Měření aktivity PEPC**

Pro měření aktivity fosfoenolpyruvátcarboxylasy bylo využito spřažené reakce, kdy v prvním kroku z fosfoenolpyruvátu vznikal OAA, jenž byl následně za spotřeby NADH redukován pomocí NAD-dependentní malátdehydrogenasy na malát. Úbytek NADH byl měřen spektrofotometricky jako pokles absorbance při 340 nm po dobu 5 minut. Měření bylo provedeno na přístroji Helios  $\alpha$ , v kyvetě s optickou délkou 1 cm. Reakce byla provedena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100mM Tris-HCl pufr (pH 8,1); 5mM NaHCO<sub>3</sub>; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM NADH; 2 mM PEP.

Reakce byla startována přidáním 100  $\mu$ l extraktu [66]. Aktivita byla vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

### **4.2.2 Měření aktivity NADP-ME**

Pro měření aktivity NADP-ME bylo využito reakce, kdy byl malát za spotřeby NADP oxidován oxalacetát. Přírůstek NADPH byl měřen spektrofotometricky jako nárůst absorbance při 340 nm po dobu 5 minut. Měření bylo provedeno na přístroji Helios  $\alpha$ ,

v kyvetě s optickou délkou 1 cm. Reakce byla provedena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM malát; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM NADP

Reakce byla startována přidáním 100 µl extraktu [66]. Aktivita byla vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

### **4.2.3 Měření aktivity PPK**

Pro měření aktivity PPK bylo využito spřažené reakce, kdy v prvním kroku z pyruvátu vznikal fosfoenolpyruvát. V druhém kroku pomocí PEPC z fosfoenolpyruvátu vznikal OAA, jenž byl následně za spotřeby NADH redukován pomocí NAD-dependentní malátdehydrogenasy na malát. Úbytek NADH byl měřen spektrofotometricky jako pokles absorbance při 340 nm po dobu 5 minut. Měření bylo provedeno na přístroji Helios α, v kyvetě s optickou délkou 1 cm. Reakce byla provedena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala: 100 M Tris-HCl pH 8,1; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM NaHCO<sub>3</sub>; 2 mM pyruvát; 1 mM ATP; 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 mM NADH

Reakce byla startována přidáním 200 µl extraktu [66]. Aktivita byla vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

### **4.2.4 Měření aktivity GS**

Pro měření aktivity GS bylo využito modifikované metody podle Manchenko [67]. Úbytek NADH byl měřen spektrofotometricky jako pokles absorbance při 340 nm po dobu 5 minut oproti slepému vzorku, který obsahoval 100 mM Tris-HCl a 0,3 mM NADH. Měření bylo provedeno na přístroji Helios α, v kyvetě s optickou délkou 1 cm. Reakce byla provedena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala: 100 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM L-glutamát; 2,5 mM ATP; 10 mM NH<sub>4</sub>Cl; 0,3 mM NADH; 1 mM PEP a 6,6 U PK a 13,5 U LDH.

GS katalyzuje reakce, ve které vzniká ADP, substrát pro PK. Tento enzym poskytuje pyruvát, který využívá LDH k syntéze laktátu. Vznikající  $\text{NAD}^+$  bylo měřeno spektrofotometricky a odpovídá aktivitě GS.

Reakce byla startována přidáním 100  $\mu\text{l}$  extraktu. Aktivita byla vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

#### 4.2.5 Měření aktivity GOGAT

Pro měření aktivity GOGAT bylo využito reakce, kdy z glutaminu a 2-oxoglutarátu vznikají transaminací dvě molekuly glutamátu za spotřeby NADH. Úbytek NADH byl měřen spektrofotometricky jako pokles absorbance při 340 nm po dobu 5 minut. Měření bylo provedeno na přístroji Helios  $\alpha$ , v kyvetě s optickou délkou 1 cm. Reakce byla provedena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM  $\alpha$ -ketoglutarát; 5 mM L-glutamin; 0,3 mM NADH

Reakce byla startována přidáním 100  $\mu\text{l}$  extraktu [67]. Aktivita byla vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

#### 4.2.6 Měření aktivity GDH

Pro měření aktivity GDH bylo využito toho, že tento enzym z 2-oxoglutarátu poskytuje glutamát za vzniku NADH, které reaguje s jodonitrotetrazoliovou violetí a N-methylfenazonium methylsulfátem za vzniku fenazinového barviva. Aktivita GDH byla stanovena jako změna absorbance při 500 nm za 30 minut. Pro výpočet aktivity GDH byla použita kalibrační přímka (Obr. 25, str. 50) sestavená pro látkové množství 0 až 300 nmol NADH. Měření bylo provedeno na přístroji *Ultrospec 2100*, v kyvetě s optickou délkou 1 cm. Reakce byla provedena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala: 100 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM  $\alpha$ -ketoglutarát; 5 mM L-glutamin; 0,3 mM NADH; 5 mg/ml jodonitrotetrazoliové violeti; 5  $\mu\text{g/ml}$  N-methylfenazonium methylsulfátu.



Reakce byla startována přidáním 200  $\mu\text{l}$  extraktu [67]. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

#### 4.2.7 Měření aktivity NR

Stanovení aktivity nitrátreduktasy katalyzující přeměnu dusičnanu na dusitan je založeno na reakci dusitanu se sulfanilamidem, která poskytuje diazoniovou sůl. Ta reakcí se sloučeninou NNEDD tvoří fialové azobarvivo, jehož intenzita se stanovuje spektrofotometricky při 540 nm.

Reakční směs obsahovala 100 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 10 mM EDTA; 0,15 mM NADH; 0,1 M  $\text{KNO}_3$ . Reakce byla startována přidáním 100  $\mu\text{l}$  extraktu a probíhala 30 minut při teplotě 26 °C. Poté byl do reakční směsi přidán 5,8 mM sulfanilamid a 0,8 mM NNEDD. Referentní vzorek neobsahoval NADH a  $\text{KNO}_3$ . Měření bylo provedeno na spektrofotometru *Ultrospec 2100* v kyvetě s optickou délkou 1 cm v reakčním objemu 1 ml [68]. Aktivita byla vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

#### 4.2.8 Měření aktivity PAL

Pro měření aktivity PAL bylo využito reakce, kdy z fenylalaninu vzniká kyselina skořicová. Kyselina skořicová, na rozdíl od fenylalaninu, silně absorbuje pro 280 nm. Aktivita PAL se projeví na nárůst absorbance pro 280 nm. Reakce byla startována přidáním 100  $\mu\text{l}$  extraktu a probíhala 30 minut. Měření bylo provedeno na spektrofotometru *Ultrospec 2100*, v kyvetě s optickou délkou 0,5 cm. Reakce byla provedena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM fenylalanin [67]. Aktivita byla vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

## 4.2.9 Stanovení aktivity proteas

Aktivita proteas byla stanovena spektrofotometricky pomocí azokaseinu [69]. Princip metody spočívá ve štěpení azokaseinu (bílkoviny s aminokyselinami substituovanými azobarvivem) na polypeptidové štěpy, které se nesráží v prostředí 5 % kyseliny trichloroctové. Reakční směs o objemu 1 ml obsahovala: 100  $\mu$ l rostlinného extraktu, 100 mM Tris-HCl pH 8,1, azokasein (5 mg/l). Reakce probíhala 30 minut. Poté byl do reakční směsi přidán 1 ml 5% kyseliny trichloroctové. Následně byla reakční směs centrifugována při 16 600 g a teplotě 4°C po dobu 15 minut. V supernatantu byla změřena absorbance při 440 nm oproti slepému pokusu, který obsahoval místo rostlinného extraktu destilovanou vodu [69].

## 4.3 Stanovení bílkovin metodou dle Bradfordové

Tato metoda je založena na interakci Coomassie brilliant blue G 250 s aromatickými a bazickými aminokyselinami v bílkovině. Po vytvoření komplexu s proteinem dochází ke změně absorpčního maxima Coomassie brilliant blue G 250 z 465 nm na 595 nm [70].

K 10  $\mu$ l rostlinného extraktu bylo přidáno 23,3  $\mu$ l destilované vody a 1 ml Bradfordova činidla. Po důkladném promíchání se směs inkubovala po dobu 20 min. Poté byla změřena absorbance při 595 nm proti referenčnímu vzorku obsahujícímu 33,3  $\mu$ l destilované vody a 1 ml Bradfordova činidla [70].

Hodnota absorbance při 595 nm byla pomocí kalibrační přímky přepočtena na množství bílkovin. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 0,25 – 1,4 mg.ml<sup>-1</sup>.

## 4.4 Elektroforetické separace proteinů

### 4.4.1 Elektroforetická separace proteinů v prostředí SDS

Elektroforetické separace proteinů v prostředí dodecylsírany sodného byla provedena metodou dle Laemmliho [71]. Na začátku separace bylo napětí nastaveno na 70 V. Poté, co vzorek opustil zaostřovací gel, bylo napětí zvýšeno na 140 V.

Pro lepší rozdělení proteinů byl použit polyakrylamidový gel s gradientem koncentrace akrylamidu 10 - 15 %. Koncentrace zaostřovacího gelu byla 5%. Gradient koncentrace akrylamidu byl vytvořen pomocí mísiče gradientu.

10% separační gel o celkovém objemu 5 ml obsahoval 1,9 ml destilované vody; 1,7 ml 30% směsi akrylamid/BIS; 1,3 ml 1,5M Tris-HCl pufru, pH 8,8; 50  $\mu$ l 10% SDS; 2  $\mu$ l TEMED; 50  $\mu$ l 10 % peroxodisíranu amonného.

15% separační gel o celkovém objemu 5 ml obsahoval 1,1 ml destilované vody; 2,5 ml 30% směsi akrylamid/BIS; 1,3ml 1,5M Tris-HCl pufru, pH 8,8; 50  $\mu$ l 10% SDS; 2  $\mu$ l TEMED a 50  $\mu$ l 10 % peroxodisíranu amonného.

5% zaostřovací gel o celkovém objemu 6 ml obsahoval 4,1 ml destilované vody; 1 ml 30% směsi akrylamid/BIS; 750  $\mu$ l 1,0M Tris-HCl pufru, pH 6,8; 60  $\mu$ l 10% SDS; 6  $\mu$ l TEMED a 60 $\mu$ l 10 % peroxodisíranu amonného.

Elektrodový pufr obsahoval 18,8 g glycinu, 3 g Tris a 1 g SDS v 1 l destilované vody.

Vzorky pro separaci byly připraveny z rostlinného extraktu připraveného podle 4.1.2, který byl smíchán se vzorkovým pufrům v poměru 1:1. Vzorkový pufr obsahoval: 0,1542 g DTT, 0,5 ml 0,1% bromfenolové modře, 2 ml glycerolu, 2 ml 10% SDS, 2,6 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) a 2,9 ml destilované vody. Směs byla poté zahřáta k varu.

Takto připravený vzorek byl po zchlazení aplikován do jamek v gelu po 20  $\mu$ l.

#### **4.4.1.1 Detekce proteinů v gelu**

Gel byl po separaci umístěn do barvicí lázně, která obsahovala v 1 litru 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250, 425 ml ethanolu, 50 ml methanolu, 100 ml kyseliny octové a 425 ml destilované vody. Po obarvení byl gel umístěn do odbarvovací lázně, která obsahovala kyselinu octovou, ethanol a destilovanou vodu v poměru 2:5:13.

#### **4.4.2 Elektroforetická separace proteinů v nedenaturujícím prostředí**

Elektroforetická separace proteinů v nedenaturujícím byla provedena metodou dle Lee a Lee [72]. Byl použit separační gel o koncentraci akrylamidu 6%. Koncentrace zaostřovacího gelu byla 5%. Na začátku separace bylo napětí nastaveno na 70 V. Poté, co vzorek opustil zaostřovací gel, bylo napětí zvýšeno na 140 V.

6% separační polyakrylamidový gel o celkovém objemu 10 ml obsahující 5,2 ml destilované vody; 2 ml 30% směsi akrylamid/BIS; 2,6 ml 1,5 M Tris-HCl pufu, pH 8,8; 100  $\mu$ l 10% glycerolu; 8  $\mu$ l TEMED; 100  $\mu$ l 10 % peroxodisíranu amonného.

3% zaostřovací polyakrylamidový gel o celkovém objemu 4 ml obsahující 3 ml destilované vody; 400  $\mu$ l 30% směsi akrylamid/BIS; 500  $\mu$ l 1,0 M Tris-HCl pufu, pH 6,8; 40  $\mu$ l 10% glycerolu; 8  $\mu$ l TEMED; 40  $\mu$ l 10 % peroxodisíranu amonného.

Vzorky pro separaci byly připraveny z rostlinného extraktu připraveného podle 4.1.2. K nim byla přidána sacharosa tak, aby její výsledná koncentrace byla 20 %. Takto připravené vzorky byly poté aplikovány do jamek v gelu v množství 20  $\mu$ l.

#### **4.4.2.1 Detekce aktivity GDH v polyakrylamidovém gelu**

Po elektroforetické separaci proteinů byla provedena detekce aktivity GDH v gelu. Gel byl umístěn do reakční směsi obsahující 100 mM Tris-HCl pH 7,1, 10 mM L-glutamát, 0,2 mM NAD<sup>+</sup>; 0,1 mg/ml nitroblue tetrazolium a 5 µg/ml phenazin methosulfate V této reakční směsi byl ponechán 12 hodin [67].

### **4.5 Imunochemická detekce přítomnosti viru**

Přítomnost virové infekce byla zjištěna imunochemickou metodou nepřímé ELISA [73]. Vzorky systémově infikovaných listů tabáku byly homogenizovány v desetinásobném množství potahovacího pufru (1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 g NaN<sub>3</sub> v 1 litru H<sub>2</sub>O) a přefiltrovány. Do reakční jamky v jamkové destičce pro ELISA bylo pipetováno 100 µl vzorku. Destička se poté nechala inkubovat přes noc. Každá z jamek byla 4x promyta promývacím roztokem (8 g NaCl, 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g KCl, 0,2 g NaN<sub>3</sub>, 0,05 % Tween 20 v jednom litru H<sub>2</sub>O). Následně bylo do každé jamky přidáno 100 µl primární králičí protilátky proti obalovému proteinu PVY o koncentraci 5µl/ml konjugačního pufru (20 g PVP, 2 g BSA v 1 litru promývacího roztoku). Destička byla inkubována při 37°C po dobu 3 hodin. Každá z jamek byla poté opět promyta promývacím roztokem. Navázané protilátky byly vizualizovány přidáním 100 µl kozí protilátky proti králičí protilátce o koncentraci 1 µl/30 ml konjugačního pufru. Destička byla inkubována 4 hodiny při 37°C. Následně byly jamky promyty promývacím roztokem. Kozí protilátka je konjugovaná s alkalickou fosfatase, což umožňuje po přidání 100 µl p-nitrofenylfosfát (1 mg/ml, pH 9,8), který je substrátem alkalické fosfatasy, detekovat přítomnost obalového proteinu viru jako změřeny absorbance při 405 nm za 30 minut [74].

## 4.6 Imunochemická detekce přítomnosti HSP 70

Přítomnost HSP 70 byla imunochemicky detekována metodou ELISA. Byl použit modifikovaný postup pro detekci PVY<sup>NTN</sup> (kapitola 4.5) s tím, že jako primární protilátka byla místo protilátky proti PVY použita králičí protilátka proti HSP 70 v ředění 0,5 µl/ml konjugačního pufru.

## 5 Výsledky

### 5.1 Vliv infekce způsobené PVY<sup>NTN</sup> na metabolismus rostlin tabáku

Byly provedeny dva pokusy vlivu infekce Y viru bramboru na metabolismus rostlin tabáku. V prvním pokusu (označen **A**) byly rostliny pěstovány ve skleníku v půdě. Ve druhém pokusu (označen **B**) byly rostliny pěstovány v půdě v komoře o konstantní teplotě 20°C, 75% vlhkosti a s umělým osvětlením (cyklus: 14 hodin světla, 10 hodin tmy).

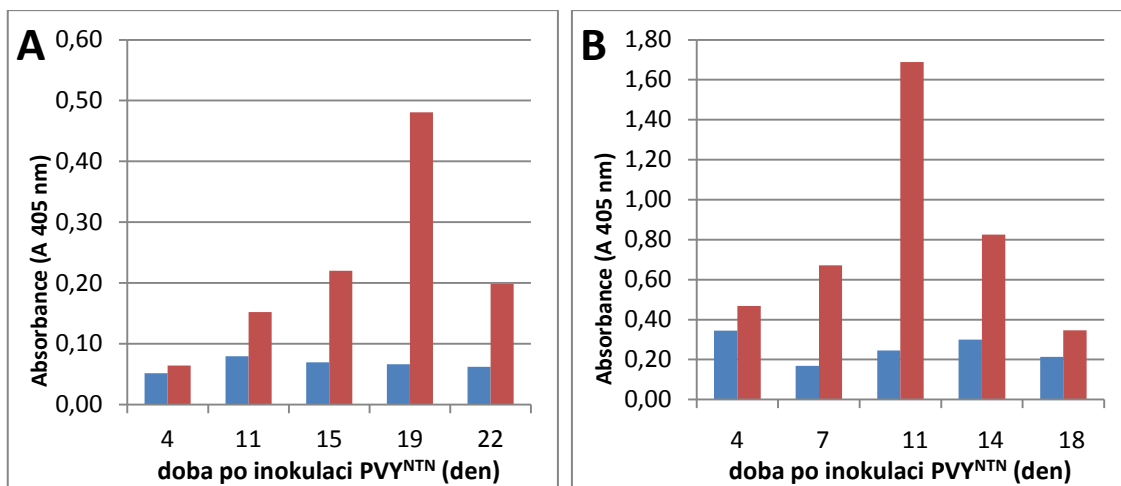
V obou pokusech byly rostliny rozděleny do dvou skupin. První skupina byla infikována *Y virem bramboru*, kmenem NTN. Druhá skupina infikována nebyla a sloužila jako kontrolní.

#### 5.1.1 Kvantifikace PVY metodou nepřímé ELISA

Ověření, že infekce PVY<sup>NTN</sup> v pokusných rostlinách skutečně proběhla, bylo provedeno imunochemicky pomocí nepřímé ELISA metody. Tato metoda umožňuje zjistit přítomnost obalového proteinu *Y viru bramboru*.

V prvním (A) i druhém (B) pokusu byla zjištěna přítomnost obalového proteinu Y viru bramboru. Infekce tedy proběhla v obou případech (obr. 13, str. 42).

V prvním pokusu (A) byla přítomnost PVY<sup>NTN</sup> detekována 11. den od inokulace. Maximum infekce bylo 19. den. V druhém pokusu (B) byla přítomnost PVY detekována 7. den od inokulace. Maximum infekce bylo 11. den (obr. 13, str. 42).



Obr. 13: Detekce *Y viru bramboru* metodou ELISA v listech rostlin tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■). Na ose y je vynesena absorbance p-nitrofenolu.

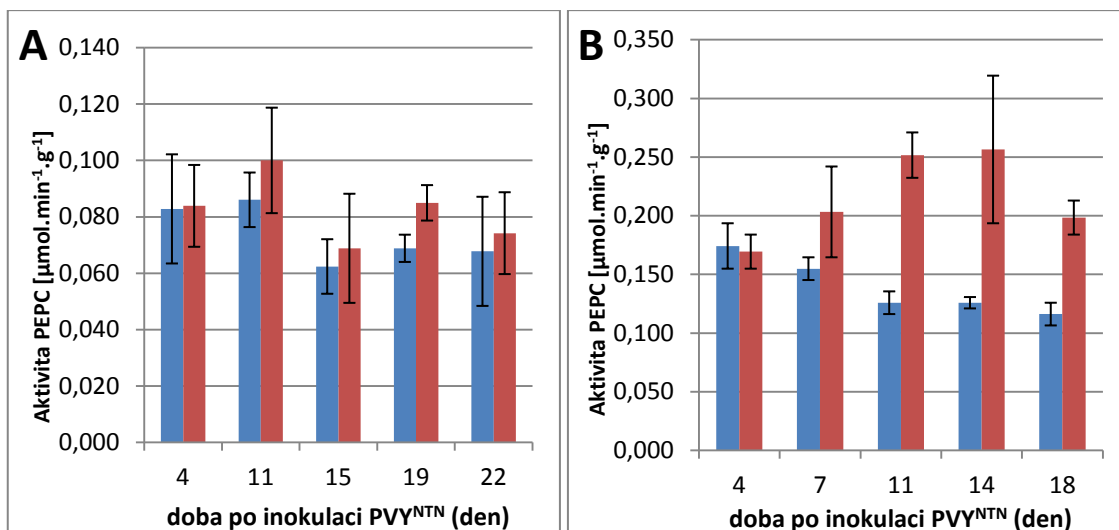
### 5.1.2 Aktivita PEPC v rostlinách tabáku

V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> stejně jako v rostlinách kontrolních, neinfikovaných byla sledována aktivita PEPC a to jak v prvním (A), tak i druhém (B) pokusu (obr. 14, str. 43).

V prvním pokusu (A) byla ve všech sledovaných dnech zaznamenána mírně vyšší aktivita PEPC v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (obr.14A, str. 43). Největší rozdíl 20% byl zaznamenán 19. den, tedy stejný den, kdy byla přítomnost viru nejvyšší.

V druhém pokusu (B) aktivita PEPC v kontrolních rostlinách do 11. dne mírně klesala. Naopak u rostlin infikovaných PVY<sup>NTN</sup> aktivita PEPC v průběhu pokusu stoupala a nejvyšší byla 11. a 14. den od inokulace. Poté již klesala. V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> byla mimo 4. dne zjištěna vyšší aktivita PEPC než v kontrolních, neinfikovaných rostlinách (obr.14B, str. 43).





Obr. 14: Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných *Y virem bramboru* (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) pro první (A) a druhý (B) pokus. Měření bylo provedeno při optimálním pH 8,1 a saturační koncentraci PEP.

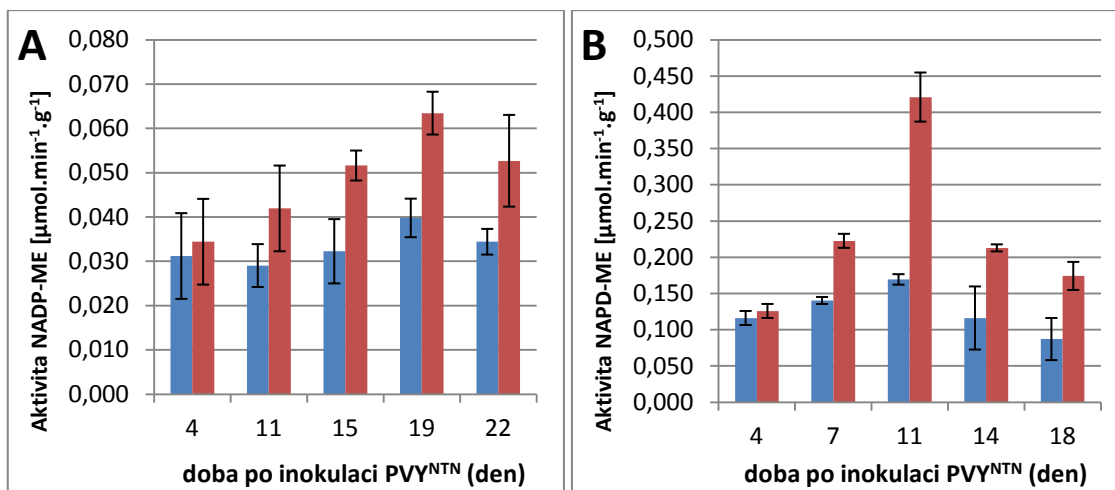
### 5.1.3 Aktivita NADP-ME v rostlinách tabáku

Na obrázku 15 na str. 44 je znázorněna aktivita NADP-ME jak v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> tak v kontrolních, neinfikovaných rostlinách v prvním (A) i druhém (B) pokusu.

Nejvýraznější zvýšení aktivity v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> oproti kontrolním rostlinám bylo v prvním pokusu (A) zaznamenáno 19. den od inokulace, kde činilo 160%. Poté již aktivita NADP-ME klesala (obr.15A, str. 44).

Také v druhém pokusu (B) byla aktivita NADP-ME v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> zvýšená v průběhu celého pokusu oproti kontrolním rostlinám. Rozdíl v aktivitě je patrný od 7. dne. Nejvyšší rozdíl v aktivitě byl 11. den, kde je aktivita NADP-ME v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> 3x vyšší než v rostlinách kontrolních (obr.15B, str. 44). Tak při detekci viru metodou ELISA bylo maximum 11. den (obr. 13B, str. 42).

V prvním (A) i druhém (B) pokusu odpovídal průběh aktivity NADP-ME průběhu infekce zjištěné metodou ELISA (obr. 13, str. 42).



Obr. 15: Aktivita NADP-ME vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných *Y virem bramboru* (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) pro první (A) a druhý (B) pokus.

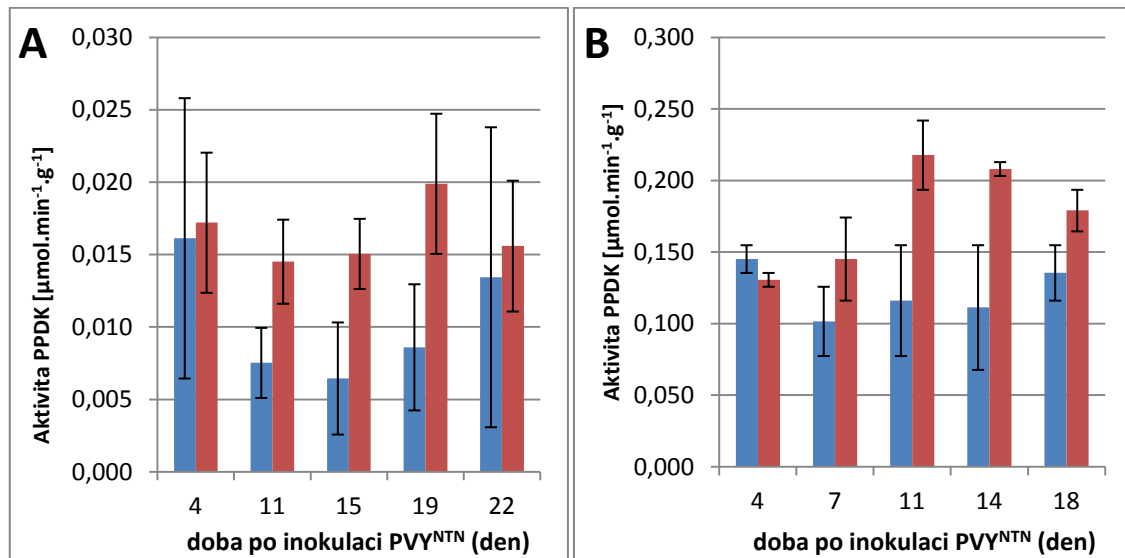
### 5.1.4 Aktivita PPK v rostlinách tabáku

V této studii byla sledována aktivita PPK v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a v kontrolních, neinfikovaných rostlinách, a to jak v prvním (A) tak i druhém (B) pokusu.

Studiem aktivity PPK bylo zjištěno, že v prvním pokusu (A) bylo zaznamenáno zvýšení aktivity PPK v rostlinách kontrolních 4. a 22. den. Aktivita PPK v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> se mimo 19. den držela na stejné úrovni, kdy se zvýšila o 25% oproti 15. dni (obr.16A, str. 45). Aktivita PPK byla v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> ve všech sledovaných dnech vyšší než v rostlinách kontrolních. Nejvyšší rozdíl byl zaznamenán 19. den, kdy byl 2,5x vyšší než v rostlinách kontrolních (obr.16A, str. 45).

Také v druhém pokusu (B) bylo zaznamenáno zvýšení aktivity PPK v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> ve všech sledovaných dnech mimo 3. dne. Rozdíl v aktivitě byl patrný od 7. dne. Nejvyšší rozdíl v aktivitě je 11. a 14. den, kde byla aktivita PPK v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> 2x vyšší než v rostlinách kontrolních (obr.16B, str. 45).

Nejvyšší aktivita PPKK v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> byla zaznamenána 11. den. Ve stejný den byla také zaznamenána nejvyšší přítomnost viru (obr. 13B, str. 42).



Obr. 16: Aktivita PPKK vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných *Y virem bramboru* (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) pro první (A) a druhý (B) pokus.

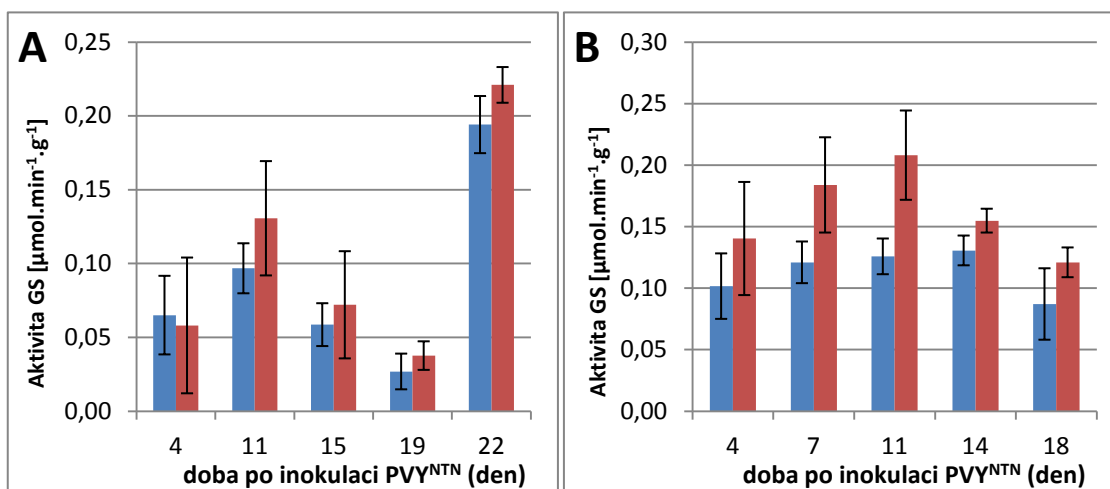
### 5.1.5 Aktivita GS v rostlinách tabáku

V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a v kontrolních, neinfikovaných rostlinách byla sledována aktivita GS v prvním (A) i druhém (B) pokusu.

V prvním pokusu (A) bylo zaznamenáno výrazné kolísání aktivity GS a to jak v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> tak v kontrolních rostlinách (obr.17A, str. 46). Ve všech dnech mimo 4. bylo zaznamenáno aktivity v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> oproti rostlinám kontrolním. Nejvyšší rozdíl v aktivitě byl zaznamenán 11. den, kde byla aktivita v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> o 25% vyšší než v rostlinách kontrolních.

V druhém pokusu (B) bylo v průběhu celého pokusu zaznamenáno zvýšení aktivity GS v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> oproti kontrolním, neinfikovaným rostlinám.

Nejvyšší rozdíl v aktivitě GS byl zaznamenán 11. den. Poté již aktivita GS v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> klesala (obr.17B).



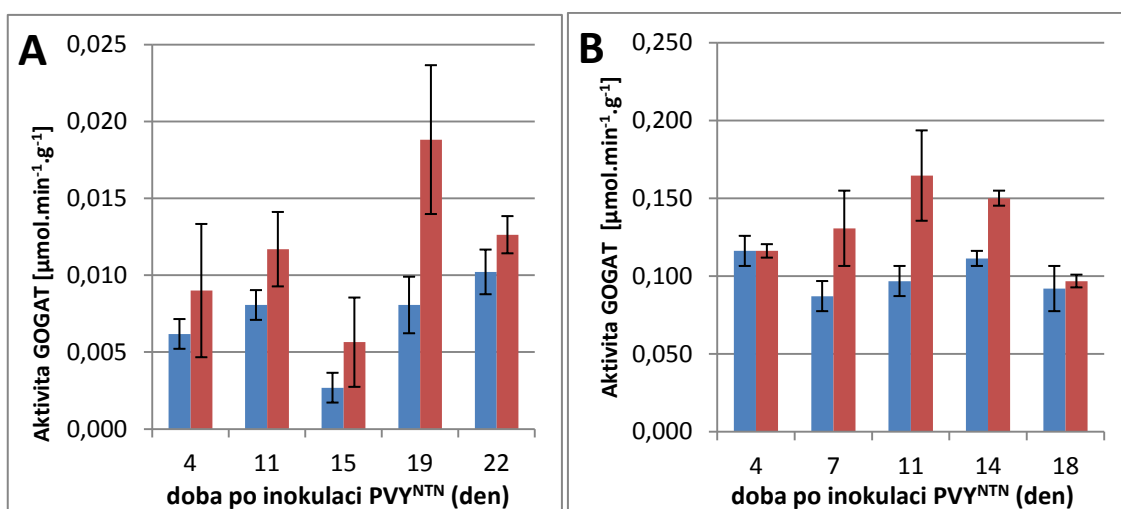
Obr. 17: Aktivita GS vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných *Y virem bramboru* (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) pro první (A) a druhý (B) pokus.

### 5.1.6 Aktivita GOGAT v rostlinách tabáku

Na obrázku 18 na str. 47 je znázorněna aktivita GOGAT jak v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> tak v kontrolních, neinfikovaných rostlinách v prvním (A) i druhém (B) pokusu.

V kontrolních rostlinách aktivita GOGAT mírně stoupala. Výjimkou byl 15. den, kdy došlo k poklesu aktivity GOGAT. Ke stejnému poklesu aktivity v tento den došlo rovněž v druhé skupině rostlin infikovaných PVY<sup>NTN</sup>. Aktivita GOGAT byla v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> v průběhu celého pokusu vyšší než v rostlinách kontrolních. Nejvýraznější zvýšení aktivity v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> oproti kontrolním rostlinám bylo zaznamenáno 19. den od inokulace, kde činilo 200% (obr.18A, str. 47). Maximum infekce bylo rovněž 19. den (obr. 13, str. 42A). Poté již aktivita GOGAT klesala.

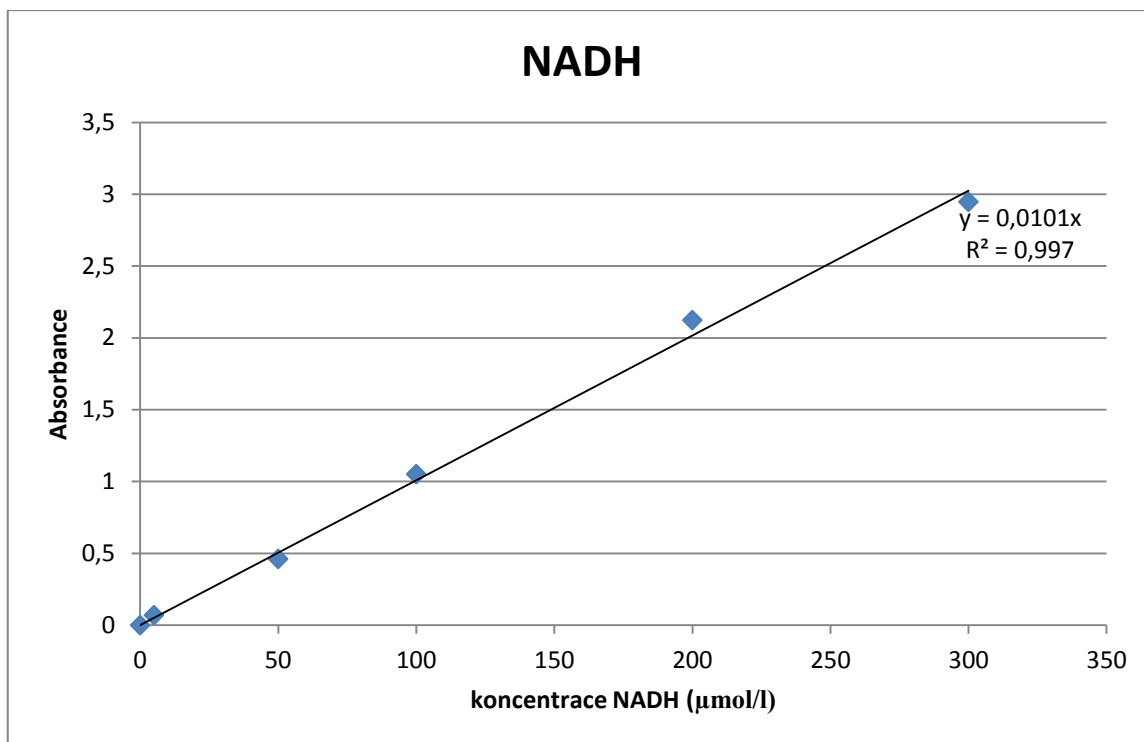
Také v druhém pokusu (B) byla sledována aktivita GOGAT. Stejně jako v prvním pokusu i zde bylo zaznamenáno zvýšení aktivity GOGAT v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> oproti kontrolám. Rozdíl v aktivitě je patrný od 7. dne. Nejvyšší rozdíl v aktivitě je 11. den, kde je aktivita GOGAT v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> o 60% vyšší než v rostlinách kontrolních (obr.18B). Poté již aktivita GOGAT klesala a 18. den byla obdobná jako v rostlinách kontrolních. Maximum aktivity GOGAT odpovídá maximu infekce zjištěné metodou ELISA (obr. 13B, str. 42).



Obr. 18: Aktivita GOGAT vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných *Y virem bramboru* (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) pro první (A) a druhý (B) pokus.

### 5.1.7 Aktivita GDH v rostlinách tabáku

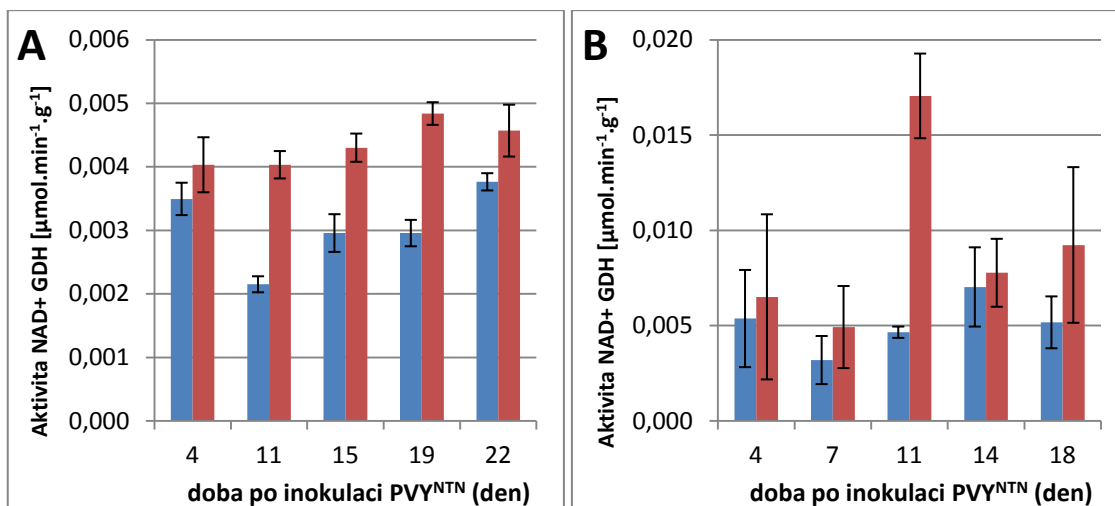
V rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a v kontrolních, neinfikovaných rostlinách byla sledována aktivita GDH v prvním (A) i druhém (B) pokusu. Stanovení GDH je založeno na sledování změny absorbance při 500 nm, ke které dochází reakcí vznikajícího NADH s jodonitrotetrazoliové violeti a N-methylfenazonium methylsulfátem ke vzniku fenazinového barviva. Pro výpočet aktivity GDH byla použita kalibrační přímka (Obr. 19, str. 48) sestavená pro koncentraci 0 až 300  $\mu\text{mol/l}$  NADH.



Obr. 19: Kalibrační přímka závislosti absorbance fenazinového barviva vznikajícího reakcí NADH s jodonitrotetrazoliovou violetí a N-methylfenazonium methylsulfátem na koncentraci NADH.

V prvním pokusu (A) bylo zjištěno, že aktivita GDH v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> v průběhu pokusu mírně stoupala až do 19. dne, kde se nacházelo maximum. Poslední 22. den aktivita GDH již mírně klesla. V rostlinách kontrolních došlo 11. den k poklesu aktivity GDH, poté již aktivita tohoto enzymu stoupala. V průběhu celého pokusu byla aktivita GDH v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> vyšší než v rostlinách kontrolních. Nejvyšší rozdíl byl zaznamenán 11. den, kdy byla aktivita GDH v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> 2x vyšší oproti kontrole (obr.20A, str. 49).

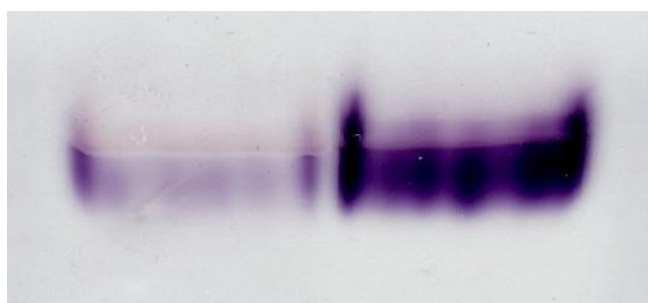
V druhém pokusu (B) bylo zaznamenáno v průběhu celého pokusu zvýšení aktivity GDH v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> oproti kontrolním, neinfikovaným rostlinám. Rozdíl v aktivitě GDH byl nejvyšší 11. den, tedy v maximum virové infekce. V tento den byla aktivita GDH v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> více než 3x vyšší než v kontrolních rostlinách (obr.20B, str. 49).



Obr. 20: Aktivita glutamátdehydrogenasy vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných *Y virem bramboru* (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) pro první (A) a druhý (B) pokus.

U druhé studie byla provedena nativní elektroforetická separace proteinů z rostlinného extraktu a následná detekce aktivity NAD<sup>+</sup> glutamátdehydrogenasy v gelu. Na obr. X je detekována aktivita GDH ve formě jednoho proužku, a to jak pro rostliny tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (Y), tak neinfikovaných rostlin (K). Na tomto obrázku je patrný rozdíl v intenzitě proužků mezi oběma skupinami rostlin. U vzorku z rostlin infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (Y) je proužek výrazně intenzivnější barvy (obr. 21).

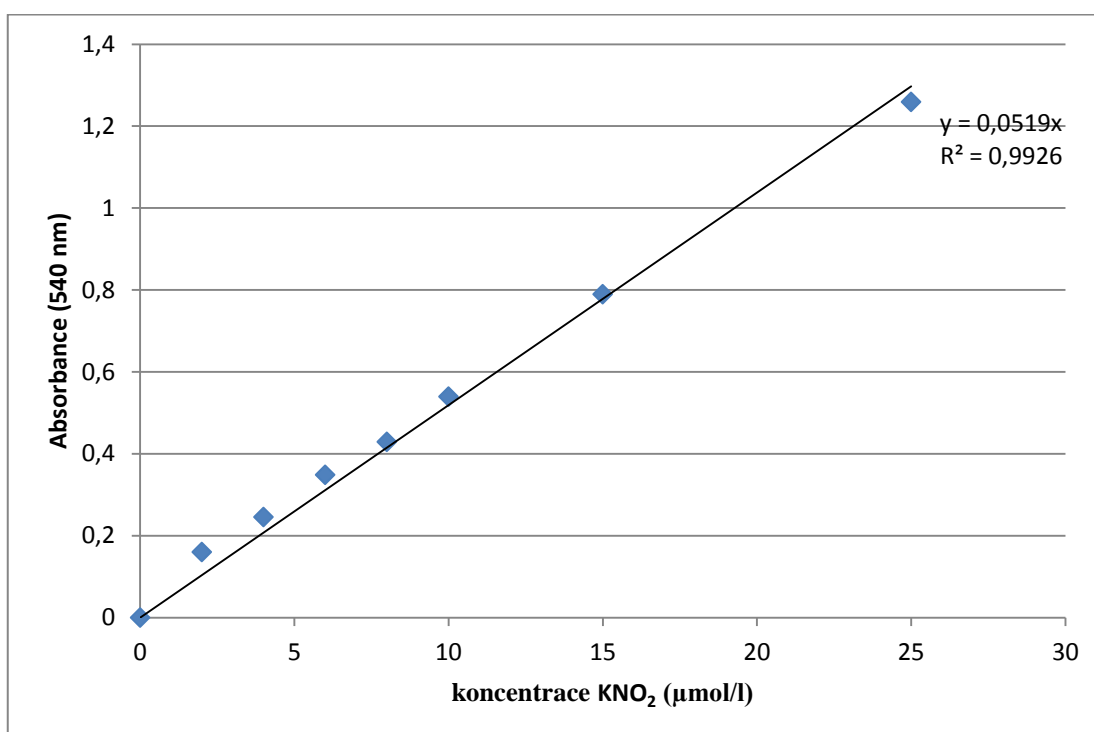
**K**                      **Y**



Obr. 21: Detekce aktivity GDH po elektroforetické separaci proteinů v nedenerujícím prostředí v rostlinách tabáku infikovaných *Y virem bramboru* (Y) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách (K).

### 5.1.8 Aktivita NR v rostlinách tabáku

V druhém pokusu byla v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a v kontrolních, neinfikovaných rostlinách sledována aktivita NR. Stanovení NR je založeno na sledování změny absorbance při 540 nm, ke které dochází reakcí dusitanového iontu (produktu reakce katalyzované NR) se sulfanilamidem a NNEDD za vzniku azobarviva. Pro výpočet aktivity NR byla použita kalibrační přímka (Obr. 22) sestavená pro koncentraci 0 až 25  $\mu\text{mol KNO}_2$ .

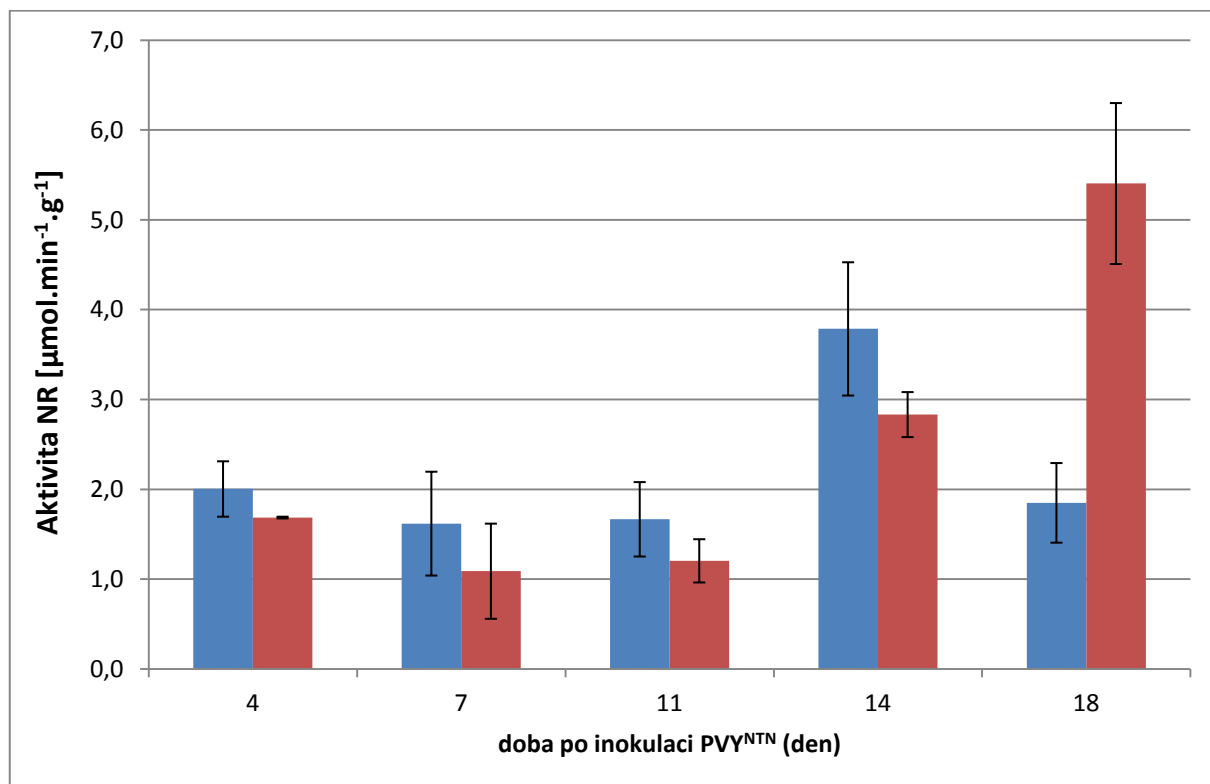


Obr. 22: Kalibrační přímka závislosti absorbance azobarviva vznikajícího reakcí dusitanového iontu se sulfanilamidem a NNEDD na koncentraci dusitanových anionů.

Při studiu aktivity NR bylo zjištěno, že v kontrolních rostlinách došlo 14. den ke zvýšení aktivity NR oproti ostatním sledovaným dnům. V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> došlo od 14. dne ke zvýšení aktivity NR. Aktivita dále stoupala i 18. den, kdy byla nejvyšší. V kontrolních rostlinách byla zjištěna mírně vyšší aktivita NR ve všech



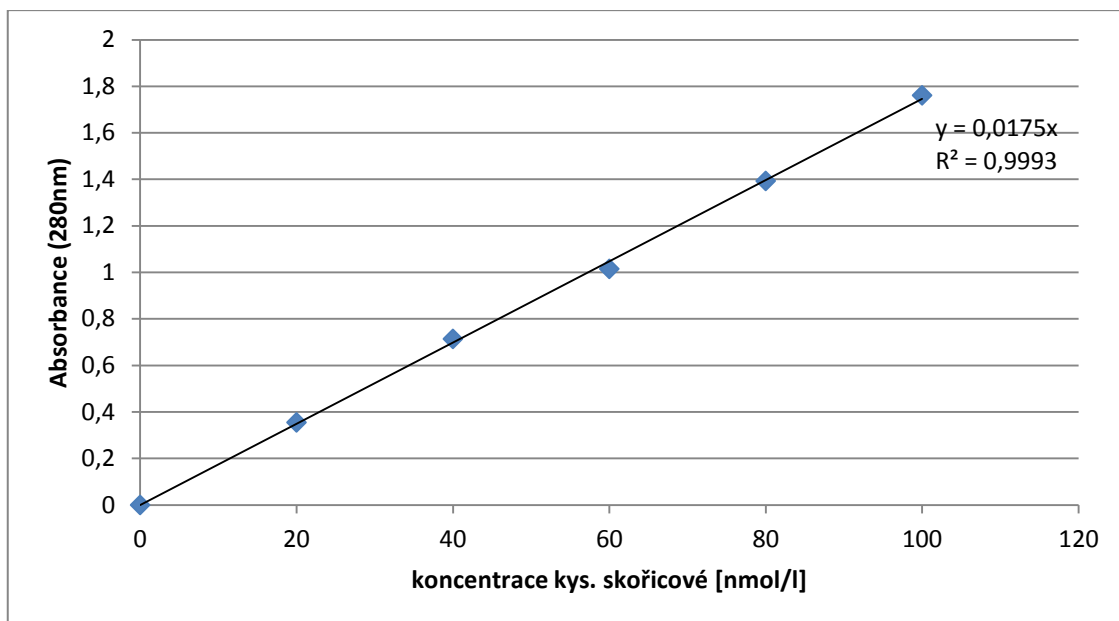
sledovaných dnů (mimo 18. dne) než v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup>. V 18. den byla aktivita NR v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> téměř 3x vyšší (obr. 23).



Obr. 23: Aktivita nitrátreduktasy vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných *Y virem bramboru* (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■).

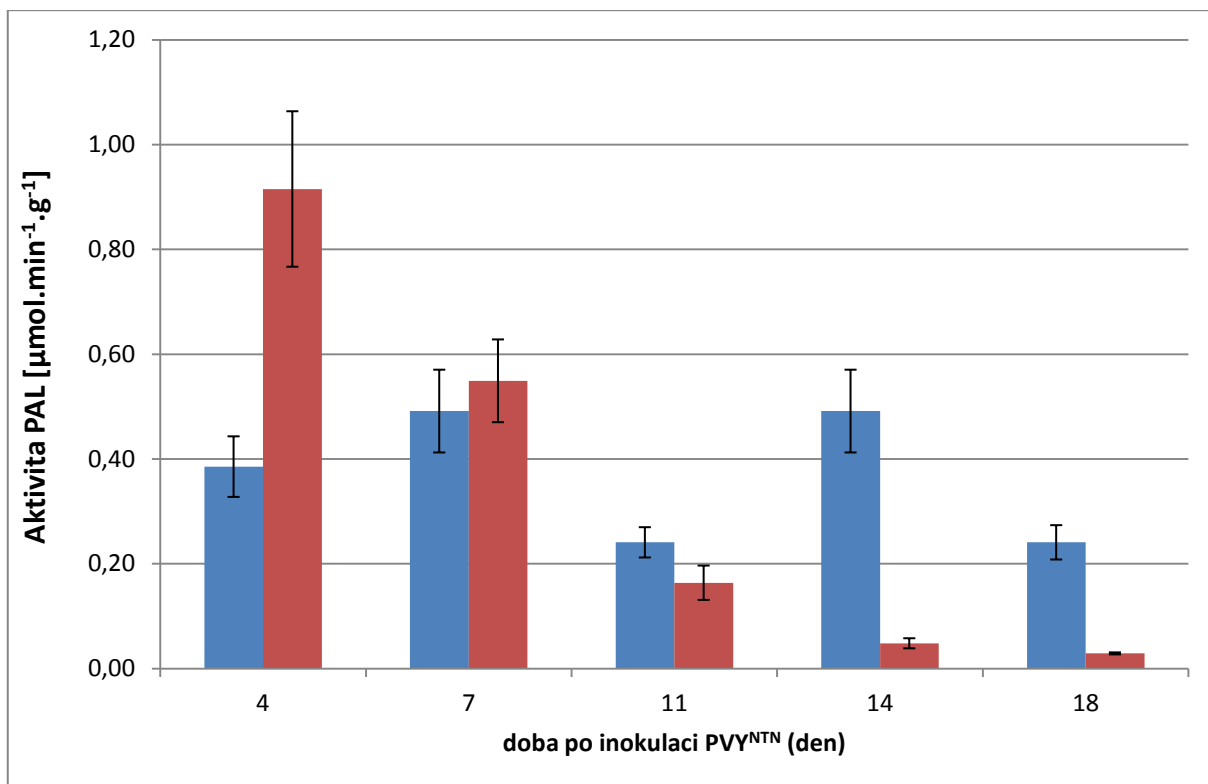
### 5.1.9 Aktivita PAL v rostlinách tabáku

V druhém pokusu byla rovněž sledována aktivita PAL v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a v kontrolních, neinfikovaných rostlinách. Stanovení PAL je založeno na sledování změny absorbance při 280 nm, kdy z fenylalaninu vzniká kyselina skořicová, která absorbuje při 280 nm. Pro výpočet aktivity byla využita kalibrační přímka (obr. 24, str. 52).



Obr. 24: Kalibrační přímka závislosti absorbance kyseliny skořicové na její koncentraci.

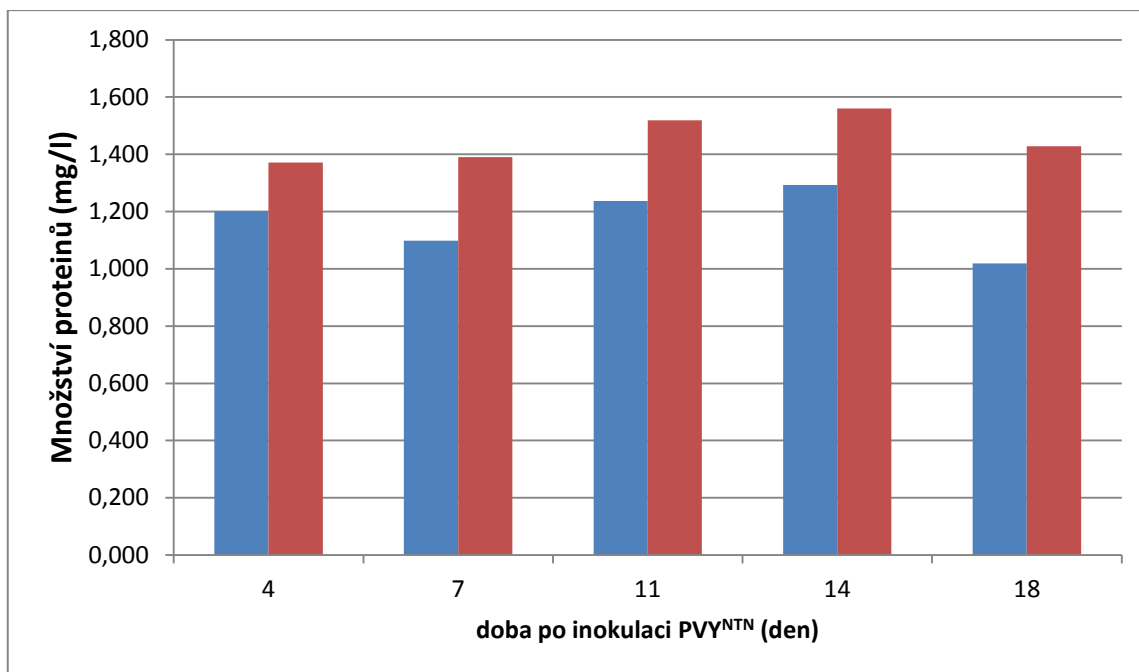
V druhém pokusu byla v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a v kontrolních, neinfikovaných rostlinách sledována aktivita PAL. V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> aktivita PAL v průběhu pokusu výrazně klesala. Nejvyšší byla 3. den od inokulace, kdy byla více než 2x vyšší než u kontrolních rostlin. Naopak od 14. dne od inokulace nebyla téměř žádná aktivita zaznamenána (obr. 25, str. 53).



Obr. 25: Aktivita fenylalaninamoniumlyasy vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných *Y virem bramboru* (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■).

### 5.1.10 Stanovení množství bílkovin v rostlinách tabáku

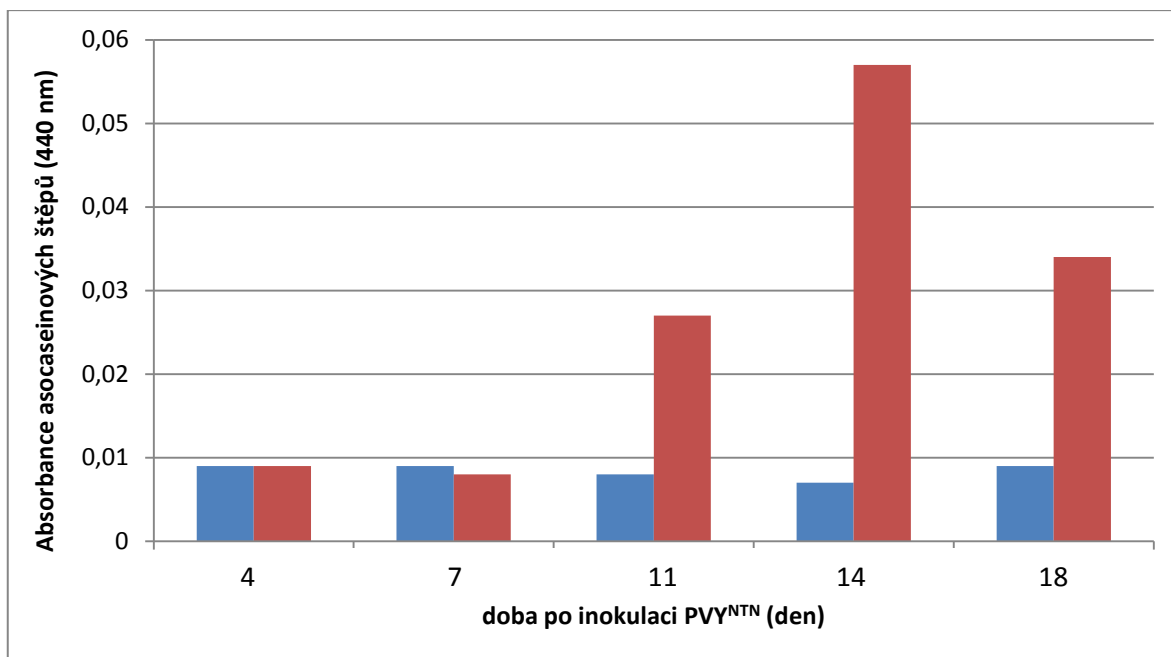
V druhé studii bylo zjištěno, že rostliny vystavené virové infekci obsahují více bílkovin než kontrolní, neinfikované rostliny. Tento rozdíl byl ovšem velmi malý, přibližně o 20%. V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> i v kontrolních rostlinách se ve všech odběrových dnech nacházelo přibližně stejné množství bílkovin (obr. 26, str. 54).



Obr. 26: Množství bílkovin v rostlinách tabáku infikovaných *Y virem bramboru* (■) a v neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■).

### 5.1.11 Aktivita proteas v rostlinách tabáku

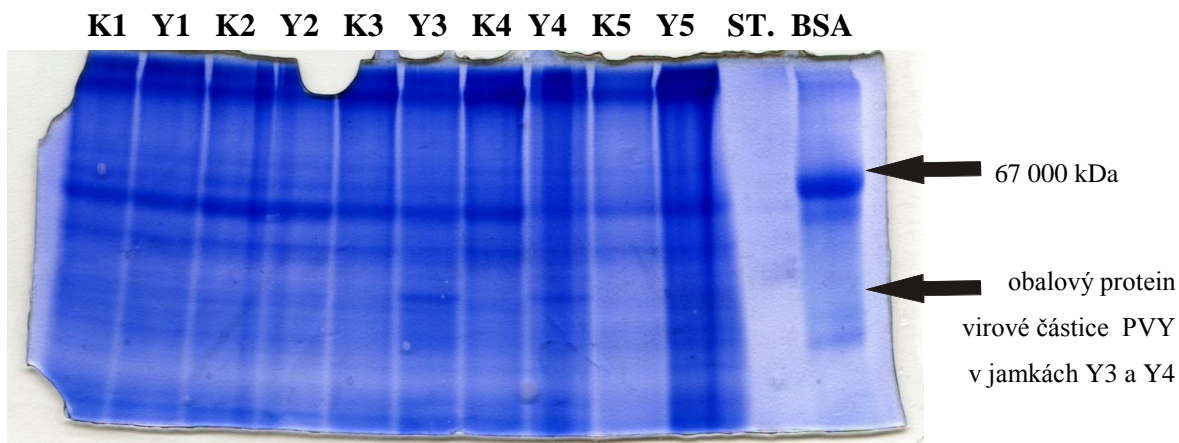
V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a v kontrolních, neinfikovaných rostlinách byla sledována aktivita proteas. Stanovení je založeno na sledování absorbance asokaseinových polypeptidů vzniklých štěpením proteasami. Tyto polypeptidy se, na rozdíl od azokaseinu samotného, nesrážejí v prostředí 5% kyseliny trichlorocrové. Aktivita proteas se v průběhu pokusu v kontrolních rostlinách neměnila, v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> byla aktivita proteas do 7. dne stejná s kontrolními rostlina. Od 11. dne došlo ke zvýšení aktivity proteas. Tato aktivita byla nejvyšší 14. den, kdy byla přibližně 6x vyšší než u kontrolních rostlin. Poté již aktivita proteas klesala (obr. 27, str. 55).



Obr. 27: Aktivita proteas v rostlinách tabáku infikovaných *Y virem bramboru* (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■).

### 5.1.12 Elektroforetická separace proteinů v přítomnosti SDS

Pomocí elektroforetické separace proteinů v přítomnosti SDS bylo porovnáváno zastoupení proteinů v extraktech rostlin infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a kontrolních, neinfikovaných rostlin. Obrázek 27 dokumentuje, že mezi oběma skupinami byl zjištěn kvalitativní rozdíl v zastoupení proteinů. U vzorku Y4 je proužek s relativní molekulovou hmotností přibližně 56 000 výrazně slabší než u ostatní vzorků. Pravděpodobně se jedná o velkou podjednotku Ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasu. U vzorků Y3 a Y4 se objevuje výrazný proužek. Nejspíš se jedná o obalový protein virové částice PVY<sup>NTN</sup> (obr. 28, str. 56).



Obr. 28: Elektroforetická separace proteinů v prostředí SDS v gradientu 10 - 15 % polyakrylamidového gelu. Do každé jamky bylo aplikováno 25  $\mu$ l vzorku. ST - standard, BSA - hovězí sérový albumin.

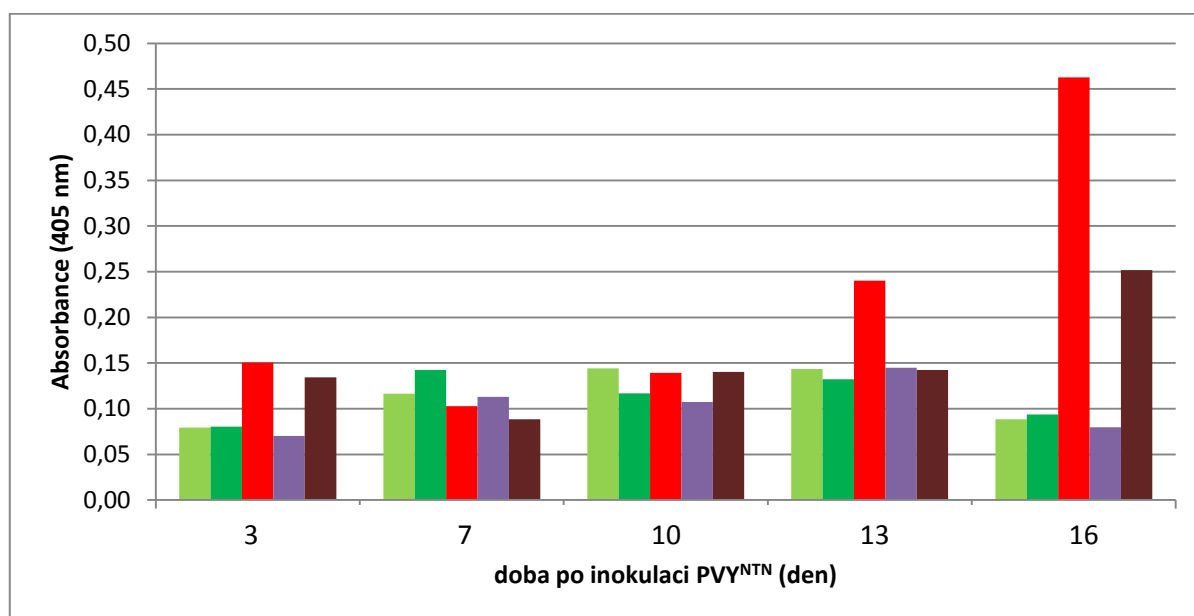
## 5.2 Studium vlivu teplotního šoku na průběh virové infekce v rostlinách tabáku

V této práci byly provedeny pokusy vlivu teplotního šoku na infekci PVY<sup>NTN</sup> v rostlinách tabáku.

Rostliny pěstované v půdě byly rozděleny do 5 skupin na rostliny neinfikované, kontrolní (■), rostliny neinfikované, vystavené teplotnímu šoku (■), rostliny tabáku infikované PVY<sup>NTN</sup> (■), rostliny tabáku infikované PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavené teplotnímu šoku (■), rostliny tabáku vystavené teplotnímu šoku a následně infikované PVY<sup>NTN</sup> (■). Každá skupina obsahovala 15 rostlin. Teplotní šok byl proveden umístěním rostlin do 40°C po dobu 2 hodin.

### 5.2.1 Kvantifikace PVY<sup>NTN</sup> metodou nepřímé ELISA

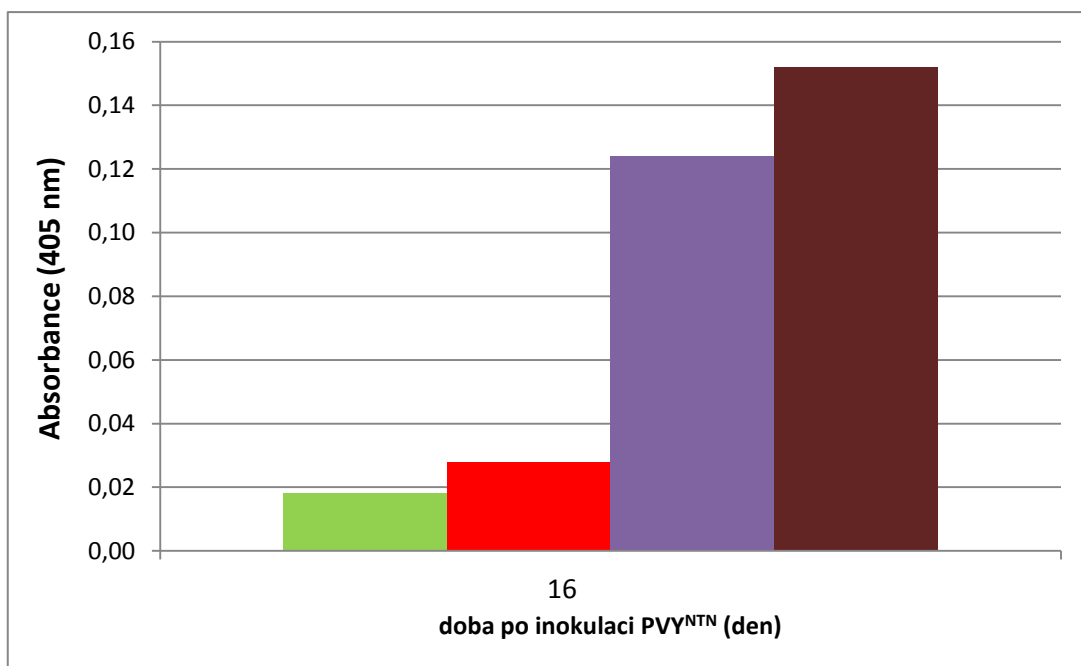
Pro potvrzení, že v inokulovaných rostlinách došlo k infekci, byla provedena metoda nepřímé ELISA umožňující detekci obalového proteinu PVY<sup>NTN</sup>. V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) bylo zaznamenáno zvýšení množství obalového virového proteinu. Přítomnost viru bylo prokazatelná 13. den a nejvyšší byla 16. den. V rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) byla přítomnost viru prokazatelná až 16. den. V ostatních skupinách nebyla přítomnost viru zaznamenána (obr. 29).



Obr. 29: Detekce přítomnosti obalového proteinu PVY<sup>NTN</sup> v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■), v rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) a v neinfikovaných, kontrolních rostlinách vystavených teplotní šoku (■). Na ose y je vynesena absorbance p-nitrofenolu.

## 5.2.2 Kvantifikace HSP 70 metodou nepřímé ELISA

Pro ověření přítomnosti HSP 70 v rostlinách vystavených teplotnímu šoku byla provedena metoda nepřímé ELISA umožňující detekci vybraného HSP 70. V rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) a v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■) byl detekován HSP 70. V neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) i v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) bylo zjištěno výrazně menší množství HSP 70 (obr. 30).

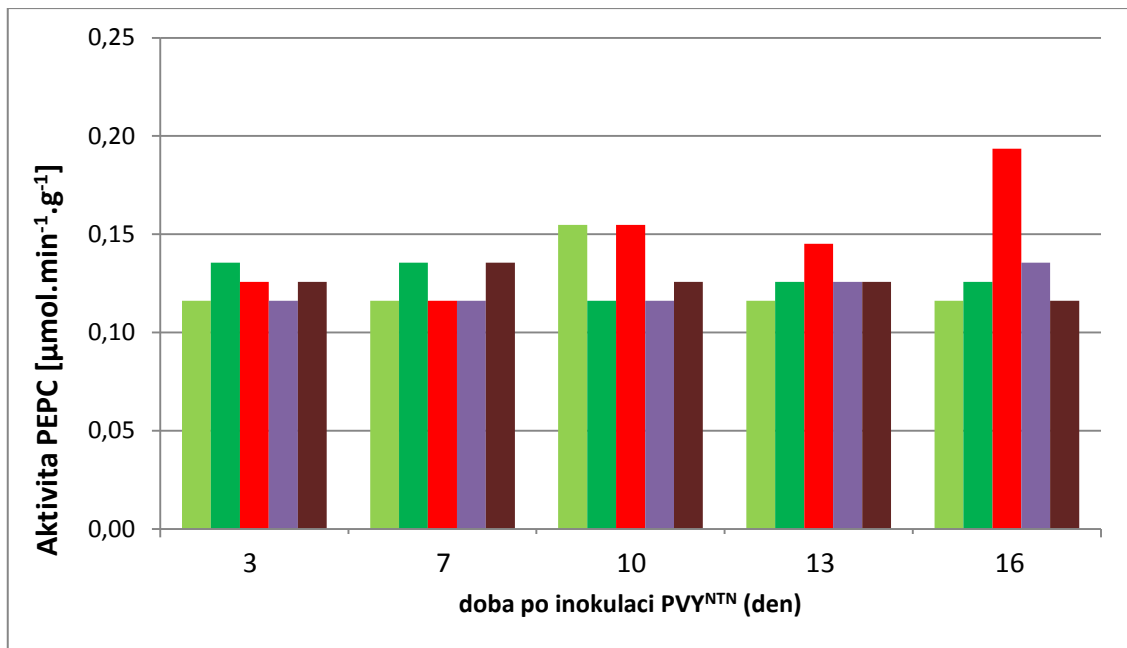


Obr. 30: Přítomnosti HSP 70 v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■), v rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■). Na ose y je vynesena absorbance p-nitrofenolu.



### 5.2.3 Aktivita PEPC v rostlinách tabáku

Ve všech skupinách rostlin byla sledována aktivita PEPC. V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) byla zjištěna 16. den zvýšená aktivita PEPC oproti ostatním skupinám. V ostatních sledovaných skupinách rostlin nebyly zjištěny výraznější změny v aktivitě PEPC (obr. 31).

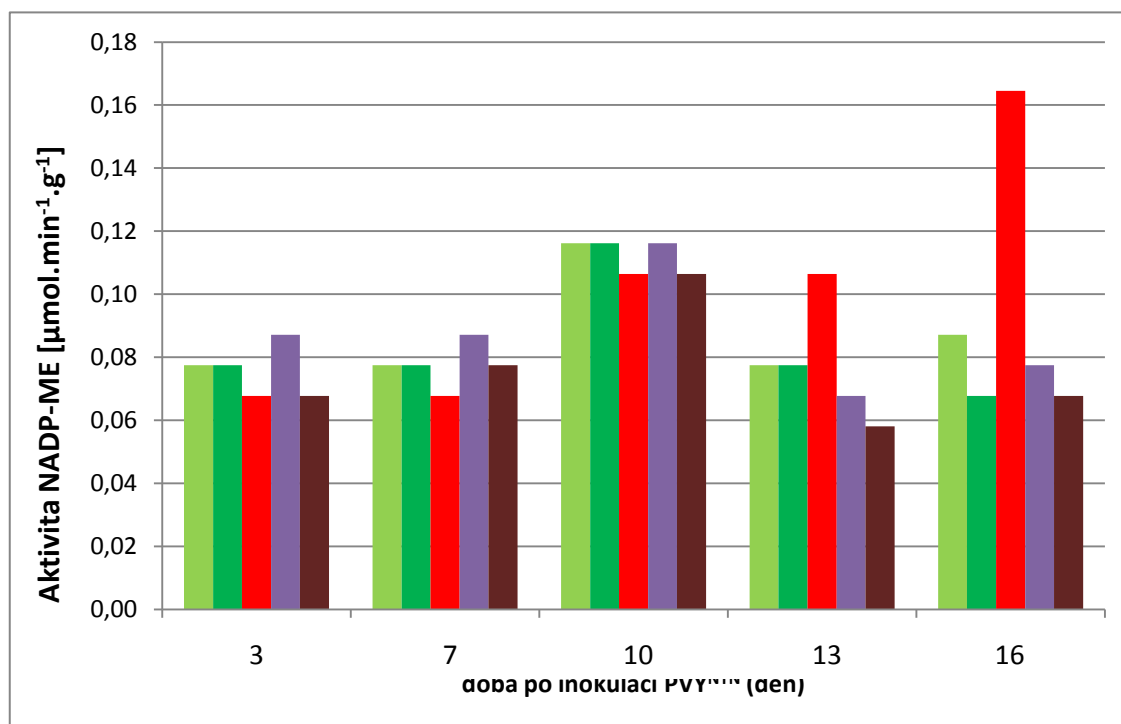


Obr. 31: Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■), rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách vystavených teplotní šoku (■). Měření bylo provedeno při optimálním pH 8,1 saturační koncentraci PEP.

### 5.2.4 Aktivita NADP-ME v rostlinách tabáku

V 5 zkoumaných skupinách rostlin byla sledována aktivita NADP-ME. Ve všech skupinách rostlin tabáku bylo 10. den bylo zjištěno zvýšení aktivity NADP-ME. V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) bylo zaznamenáno zvýšení aktivity NADP-ME oproti

ostatním skupinám rostlin. Rozdíl v aktivitě byl patrný od 13. dne. Nejvyšší rozdíl v aktivitě byl 16. den, kdy byla aktivita NADP-ME o 52% vyšší než v neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■). Tento proběh odpovídá průběhu virové infekce zjištěné metodou ELISA (obr. 29, str. 57). V ostatních skupinách nebyl zaznamenán relevantní rozdíl v aktivitě NADP-ME (obr. 32).

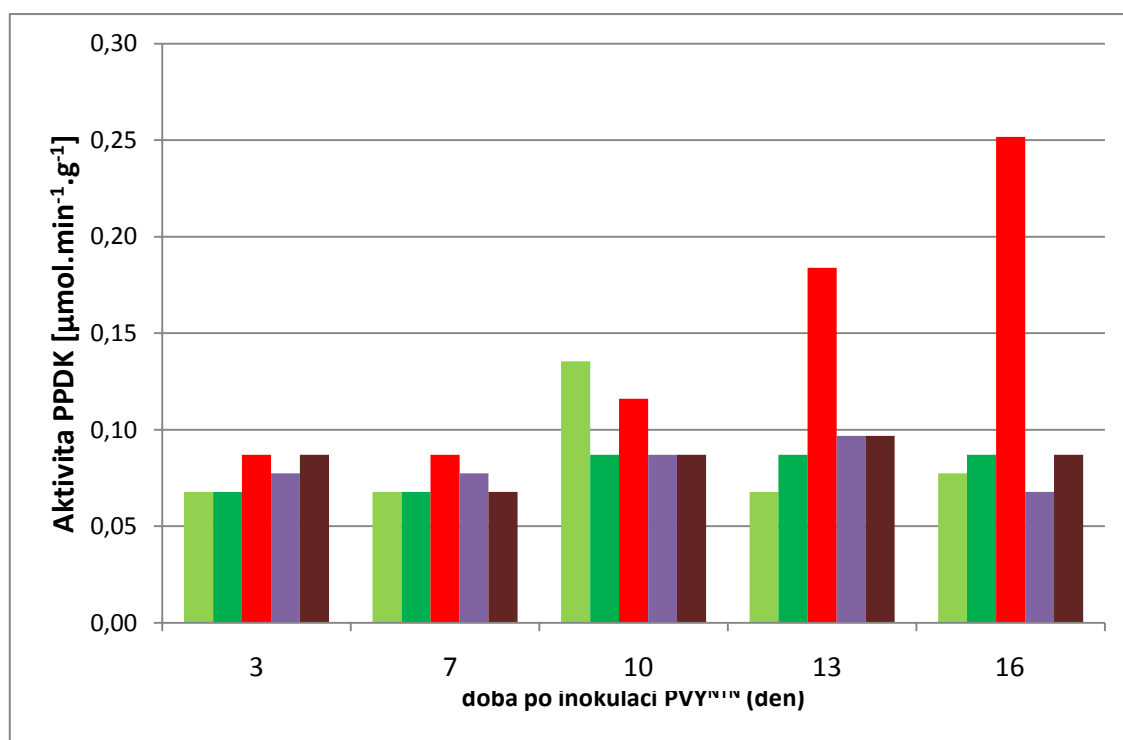


Obr. 32: Aktivita NADP-ME vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■), rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách vystavených teplotní šoku (■).

### 5.2.5 Aktivita PPK v rostlinách tabáku

Na obrázku 33 na str. 61 je znázorněna aktivita PPK ve všech 5 sledovaných skupinách rostlin tabáku. Ve skupině kontrolních, neinfikovaných rostlin (■) bylo zaznamenáno 10. den zvýšení aktivity PPK oproti ostatním skupinám. Zvýšená aktivita

PPDK byla rovněž zaznamenána v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■). Toto zvýšení aktivity je patrné od 13. dne. Nejvyšší rozdíl v aktivitě je 16. den, kdy je aktivita PPDK téměř 3x větší než v ostatních skupinách (obr. 33). To odpovídá výsledkům kvantifikace viru metodou ELISA (obr. 29, str. 57).

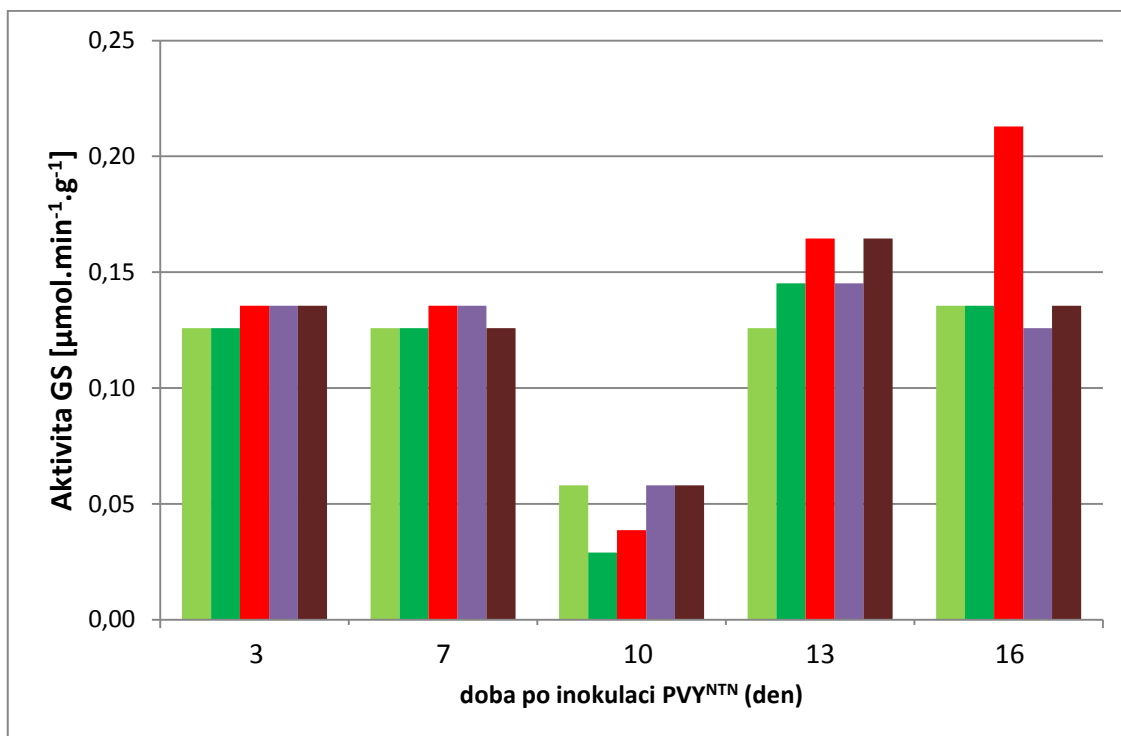


Obr. 33: Aktivita PPDK vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■), rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách vystavených teplotní šoku (■).

## 5.2.6 Aktivita GS v rostlinách tabáku

Ve všech skupinách rostlin byla sledována aktivita GS. Ve všech sledovaných skupinách došlo 10. den k výraznému poklesu aktivity GS v rostlinách tabáku. V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) bylo zaznamenáno zvýšení aktivity GS oproti ostatním

skupinám rostlin. Rozdíl v aktivitě je patrný až 16. den. V ostatních skupinách nebyl zaznamenán relevantní rozdíl v aktivitě GS (obr. 34).

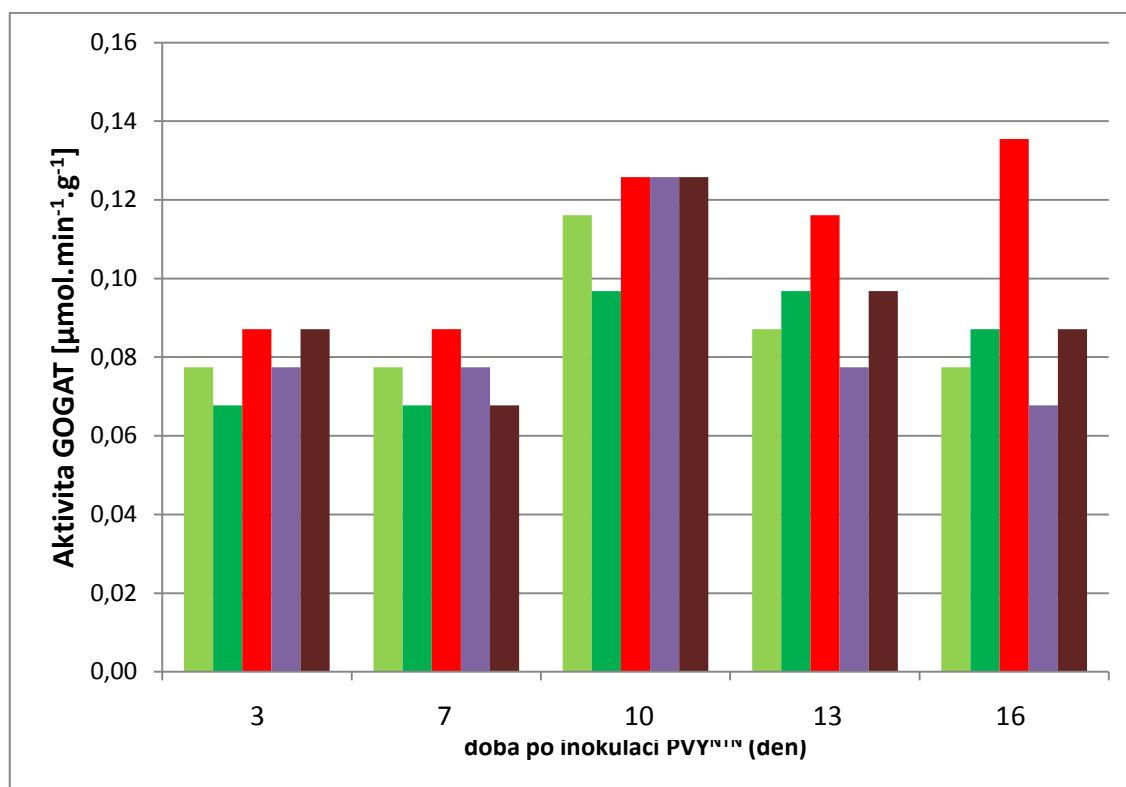


Obr. 34: Aktivita GS vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■), rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách vystavených teplotní šoku (■).

### 5.2.7 Aktivita GOGAT v rostlinách tabáku

V každé z pěti skupin rostlin byla sledována aktivita GOGAT a výsledky zaneseny do grafu (obr. 35, str. 63). Pouze v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) bylo zaznamenáno zvýšení aktivity GOGAT oproti ostatním skupinám rostlin. Tento rozdíl v aktivitě GOGAT je patrný od 13. dne. Nejvyšší rozdíl v aktivitě je 16. den, kdy je aktivita PPK o 75%

vyšší než v neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■). Naopak v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■) bylo zaznamenáno 13. a 16. den snížení aktivity GOGAT oproti ostatním skupinám. (obr. 35).

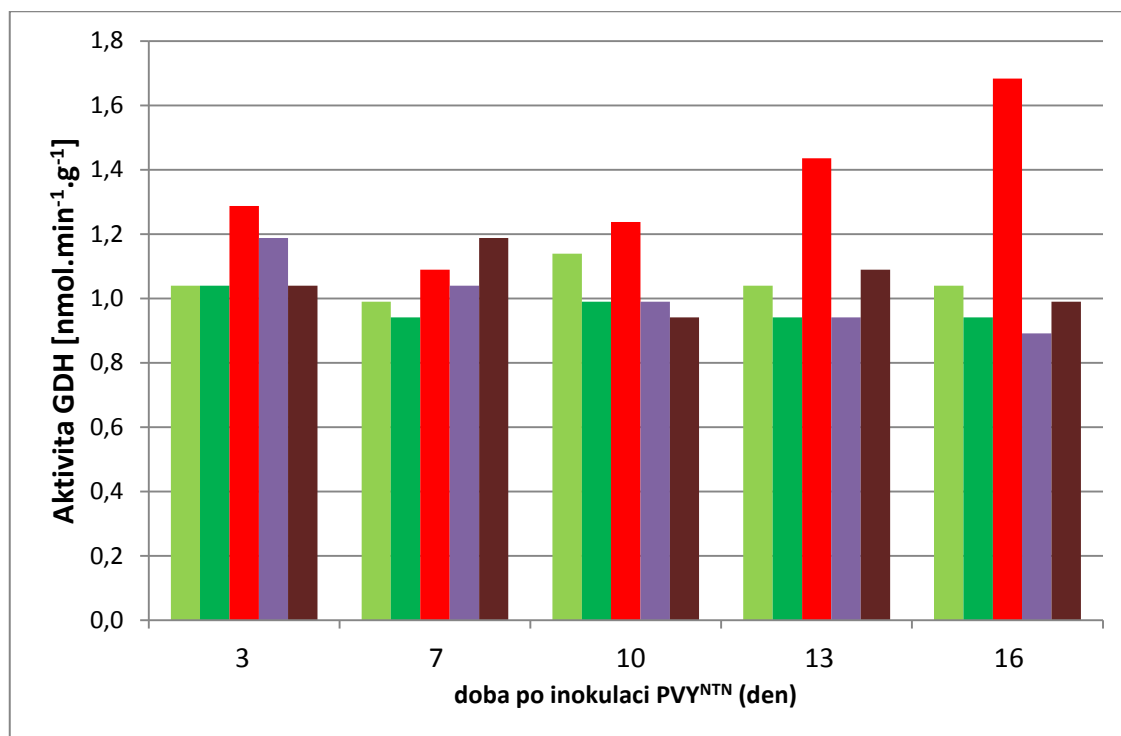


Obr. 35: Aktivita GOGAT vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■), v rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách vystavených teplotní šoku (■).

### 5.2.8 Aktivita GDH v rostlinách tabáku

Ve všech skupinách rostlin byla sledována aktivita GDH. Stanovení GDH je založeno na sledování změny absorbance při 500 nm, ke které dochází reakcí vznikajícího NADH s jodonitrotetrazoliové violeti a N-methylfenazonium methylsulfátem ke vzniku barviva. Pro výpočet aktivity GDH byla použita kalibrační přímka (Obr. 19, str. 48) sestavená pro látkové množství 0 až 300 nmol NADH.

V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> bramboru (■) bylo zaznamenáno zvýšení aktivity GDH oproti ostatním skupinám rostlin. Rozdíl v aktivitě je patrný od 13. dne. Nejvyšší rozdíl v aktivitě je 16. den. Zde rozdíl činil 80% oproti aktivitě v neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■). V ostatních skupinách nebyly zaznamenány výraznější změny v aktivitě GDH (obr. 36).

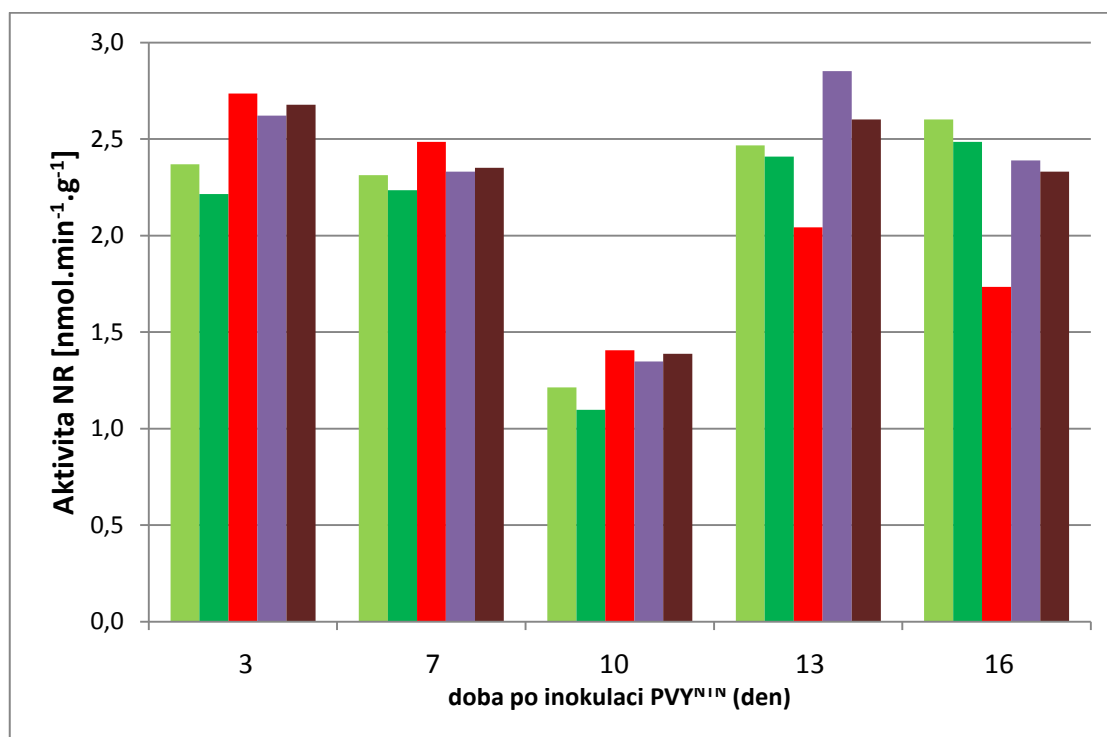


Obr. 36: Aktivita GDH vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■), rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách vystavených teplotní šoku (■).

## 5.2.9 Aktivita NR v rostlinách tabáku

Ve všech skupinách rostlin byla sledována aktivita NR. Pro výpočet aktivity NR byla použita kalibrační přímka (Obr. 22, str. 50) sestavená pro látkové množství 0 až 25 nmol KNO<sub>2</sub>.

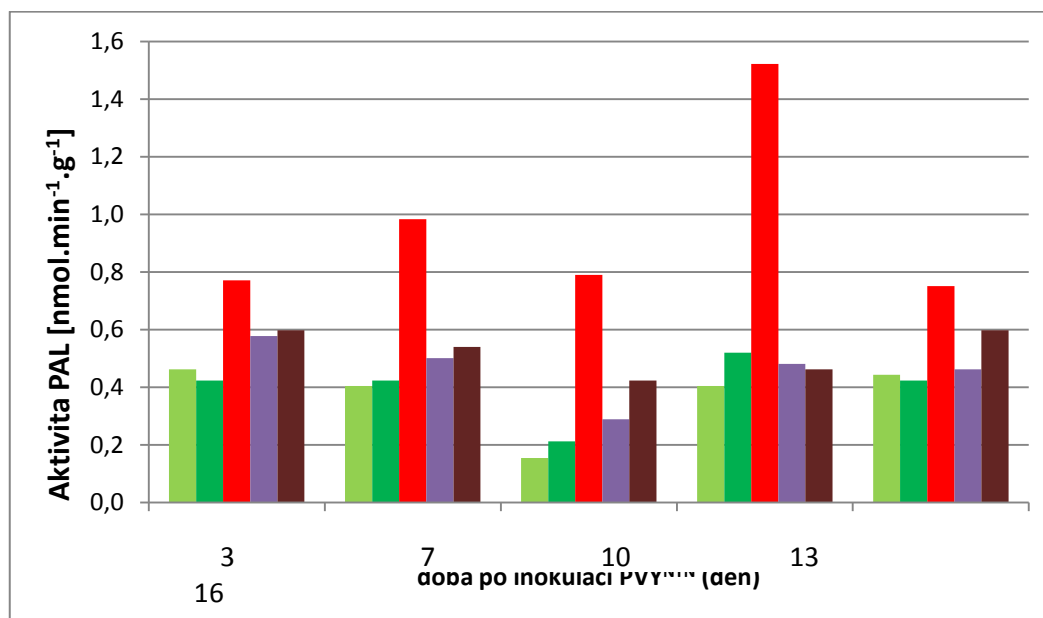
V průběhu pokusu došlo 10. den k poklesu aktivity NR ve všech sledovaných skupinách rostlin. V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) bylo v průběhu pokusu zaznamenáno snížení aktivity NR oproti ostatním skupinám rostlin, když na začátku pokusu byla aktivita NR mírně vyšší než v ostatních skupinách a poté v průběhu celého pokusu klesala. Nejvýraznější pokles aktivity NR byl zaznamenán 16. den, když činil 32% oproti aktivitě NR v neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■). Také ve skupinách rostlin vystavených teplotnímu šoku a infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■,■) byla na začátku pokusu zaznamenána zvýšená aktivita NR oproti rostlinám kontrolním (■). Stejně jako v případě rostlin infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) i zde aktivita NR klesala v porovnání s aktivitou v neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■). Poslední sledovaný den byla aktivita NR již nižší než v neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) (obr. 37).



Obr. 37: Aktivita NR vztažená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■), rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách vystavených teplotnímu šoku (■).

## 5.2.10 Aktivita PAL v rostlinách tabáku

Ve všech skupinách rostlin byla sledována aktivita PAL. Pomocí kalibrační přímky (obr. 24. str. 50) byla vypočítána aktivita PAL. V rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) bylo zaznamenáno zvýšení aktivity PAL oproti ostatním skupinám rostlin ve všech sledovaných dnech. Nejvyšší rozdíl v aktivitě je 13. den. Poté již aktivita PAL klesala. V rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) byla 10. a 16. den zaznamenána zvýšená aktivita PAL oproti ostatním skupinám (■,■,■), mimo rostlin infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), kde byla aktivita PAL výrazně vyšší. Ve skupinách rostlin vystavených teplotnímu šoku a infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■,■) bylo od 3. do 10. dne zaznamenáno zvýšení aktivity PAL oproti neinfikovaným, kontrolním rostlinám vystaveným teplotní šoku (■). V rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■) bylo zvýšení aktivity PAL zaznamenáno rovněž 16. den (obr. 38).



Obr. 38: Aktivita PAL vztážená na čerstvou hmotnost v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), v rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku (■), rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (■), neinfikovaných, kontrolních rostlinách (■) a neinfikovaných, kontrolních rostlinách vystavených teplotní šoku (■).



## 6 Diskuze

Rostliny během svého života musí velmi často čelit stresovým podmínkám. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jakým způsobem ovlivní infekce PVY<sup>NTN</sup> metabolismus dusíkatých látek v rostlinách tabáku.

C<sub>4</sub> rostliny využívají přídavné metabolické dráhy, které jim umožňují lépe snášet horké a suché podnebí s vysokými slunečními intenzitami než C<sub>3</sub> rostliny. Enzymy, které jsou součástí Hatchova-Slackova cyklu, jsou přítomny i v C<sub>3</sub> rostlinách, i když v nižší aktivitě. Bylo zjištěno, že tyto enzymy mohou být významné pro C<sub>3</sub> rostliny za stresových podmínek [30,75]. V této práci byla sledována aktivita enzymů, které jsou v C<sub>4</sub> rostlinách součástí Hatchova-Slackova cyklu (PEPC, NADP-ME a PPKK).

Studium biotického stresu je složité především z důvodu kvantifikace tohoto stresu. Na průběh infekce má vliv mnoho faktorů. Jedná se především o stáří rostlin a okolní teplotu. Případně vliv jiného patogenu.

Pro zjištění přítomnosti viru v rostlinách tabáku, byla provedena imunochemická detekce obalového proteinu PVY (ELISA), což je pouze semikvantitativní metoda. Z obr. 13 na str. 42 vyplývá, že infekce v prvním pokusu probíhající ve skleníku byla mírnější, s maximem 19. den od inokulace a infekce v druhém pokusu byla silnější, s maximem 11. den. To patrně souvisí s tím, že rostliny byly v průběhu druhého pokusu pěstovány ve stabilních vnějších podmínkách. Průběh virové infekce odpovídal jiným studiím prováděným v naší laboratoři [18,76]. Pozorované změny ve sledovaných enzymových aktivitách se v jednotlivých pokusech částečně lišily právě s ohledem na rozsah infekce.

V této práci byl sledován vliv virové infekce na PEPC.

PEPC byla v prvním pokusu v infikovaných rostlinách zvýšena jen velmi mírně, zatímco ve druhém pokusu byla 11. den 2x vyšší oproti kontrolním rostlinám (obr. 14, str. 43). Tento výsledek odpovídá dalším studiím, které se zabývaly vlivem virové infekce na PEPC [14,18]. V těchto studiích bylo rovněž zjištěno, že PVY<sup>NTN</sup> ovlivnil aktivitu PEPC víc než PVA.

Dalším enzymem často spojovaným se stresem je NADP-ME, který poskytuje NADPH pro biosyntézu mnoha látek a sekundárních metabolitů.

V obou pokusech (obr. 15, str. 44) bylo zjištěno zvýšení aktivity NADP-ME v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup>. Průběh aktivity NADP-ME odpovídá průběhu infekce zjištěné metodou ELISA (obr. 13, str. 42). Z těchto dat se zdá, že existuje závislost mezi množstvím viru a aktivitou NADP-ME. Ke stejnému zjištění došly i studie zabývající se vlivem virové infekce na aktivitu NADP-ME [76].

Aktivita PPDK měla obdobný charakter jako v případě NADP-ME. A to jak v první části, tak druhé části diplomové práce. To potvrzují i studie zabývající se vlivem virové infekce na aktivitu PPDK [15,59]. Na aktivitu PEPC, NADP-ME a PPDK měl vliv i stres suchem. Došlo ke zvýšení aktivity těchto enzymů a to až čtyřnásobně [57]. Zdá se tedy, že enzymy PEPC, NADP-ME a PPDK mají za stresových podmínek pro rostliny velký význam.

Zdroj dusíku hraje důležitou roli během života rostlin, ale i v průběhu virové infekce. Rostlina potřebuje dusíkaté látky pro syntézu PR proteinů a obranných látek. Rovněž replikace a syntéza virových proteinů klade vysoké nároky na zdroje dusíku.

V této práci byly také sledovány enzymy podílející se na fixaci dusíkatých látek do aminokyselin. Rostliny přijímají z půdy dusík především ve formě dusičnanů, které jsou redukovány na dusitany za katalýzy NR. Jedná se o vysoce regulovaný enzym, jehož aktivita je řízena jednak jeho expresí, ale také fosforylací a následnou inaktivací regulačním proteinem. Studium vlivu sucha na aktivitu NR bylo zjištěno, že aktivita NR se vlivem sucha prudce snižuje a po zalití opět aktivita stoupá [77]. Studium vlivu *X viru bramboru* na NR bylo zjištěno, že virus zabraňuje transkripci genu 14-3-3 proteinu. Tento protein je mimo jiné odpovědný za inhibici NR a umožňuje její degradaci [78]. Výzkum také naznačuje, rostlina může v napadené části rostliny snížit metabolismus dusíkatých látek a přesměrovat ho do zdravých částí [79].

V této práci bylo zjištěno, že aktivita NR byla v druhém pokusu (obr. 23, str. 51) v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> nižší než v kontrolních rostlinách. Pouze poslední sledovaný den byla 3x vyšší. To může souviset s energetickou náročností procesu fixace dusíku, kdy rostlina tuto dráhu utlumuje ve prospěch degradace vlastních bílkovin jako

zdroje dusíku. Po ústupu infekce rostlina tuto dráhu naopak aktivuje, aby doplnila deficit dusíkatých látek. Tuto hypotézu podporují i výsledky ze stanovení aktivity proteas (obr. 27, str. 55). Aktivita proteas byla v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> až 6x vyšší než v rostlinách kontrolních.

Enzymy, které katalyzují syntézu glutaminu a glutamátu z amonných iontů, GS a GOGAT byly v této práci rovněž sledovány. Studium metabolismu rostlin pěstovaných v médiu s nedostatkem dusíku nebo fosfátu bylo zaznamenáno snížení aktivity obou těchto enzymů [80]. U cytosolové formy GS bylo navíc zjištěno zvýšení aktivity v důsledku virové infekce [43]. Ke zvýšení aktivity GS došlo rovněž při stresu zasolením půdy [81].

Ve druhém pokusu (obr. 17, str. 46, obr. 18, str. 47) bylo zaznamenáno zvýšení aktivity GS i GOGAT v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup>. Je tedy možné, že aktivita GS a GOGAT je v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> zvýšená v důsledku zvýšených nároků na proteosyntézu a syntézy virových částic, ale také PR proteinů, avšak NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pochází spíše z metabolismu (zvýšená fotorespirace, proteolýza a degradace aminokyselin), než zvýšeným příjmem dusičnanů z půdy.

Dalším sledovaným enzymem byla GDH. Tento enzym je spojován především s degradací aminokyselin. Avšak za stresových podmínek má GDH důležitou úlohu i v syntéze aminokyselin. Studium vlivu infekce PVY na GDH bylo zjištěno, že aktivita GDH ve směru aminační reakce se v důsledku virové infekce zvyšuje. Aktivita GDH v obráceném, deaminačním směru nebyla virovou infekcí ovlivněna [43].

V této práci bylo ve druhém pokusu zaznamenáno výrazné zvýšení aktivity GDH v rostlinách infikovaných PVY<sup>NTN</sup> (obr. 20, str. 49). Zvýšená aktivita GDH může mít dvojitý důvod. Jednak se může GDH podílet na deaminaci aminokyselin a poskytování uhlíkatých skeletů pro energetický metabolismus. Může se ale také podílet spolu GS/GOGAT na fixaci amonných iontů, které jsou pro rostliny ve vyšší koncentraci toxické.

Posledním enzymem, který se podílí na metabolismu dusíkatých látek a zároveň na produkci obraných látek proti stresu je PAL. Studium vliv houbové infekce na rýži bylo zjištěno, že již během 6 hodin od začátku infekce dochází ke zvýšené expresy genu PAL [49].

Při studiu vlivu houbové infekce na plod jabloně bylo zaznamenáno zvýšení aktivity PAL v důsledku infekce [50].

Také v této práci bylo zaznamenáno zvýšení aktivity PAL v důsledku virové infekce (obr. 25, str. 53). Největší rozdíl byl zaznamenán hned první měřený den a poté již aktivita PAL klesala.

Z výsledků se zdá, že vliv virové infekce na metabolismus rostliny závisí především na intenzitě infekce. Zvýšená aktivita PAL na začátku infekce naznačuje syntézu obraných látek z řad sekundárních metabolitů. Vzhledem ke snížení aktivity NR a naopak zvýšení aktivity proteas v průběhu infekce se zdá, že zvýšené nároky na proteosyntézu v důsledku syntézy virových částic a PR proteinů jsou umožněny spíše degradací vlastních bílkovin než zvýšeným příjmem dusíku kořeny.

Tato práce se zabývala také vlivem zvýšené teploty na průběh virové infekce. Během teplotního šoku rostlina tvoří tzv. HSP. Jedná se molekulární chaperony účastnící se opravy poškozených proteinů vlivem zvýšené teploty. Nedávné studie zjistily, že tyto proteiny mohou interagovat s virovým obalovým proteinem a podporovat šíření viru rostlinou [82,83]. Naopak v pokusu provedeném v rámci této diplomové práce měl teplotní šok pozitivní vliv na obranyschopnost rostliny proti viru. V rostlinách tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a následně vystavených teplotnímu šoku nebyla prokázána přítomnost viru a ani žádný ze sledovaných enzymů nevykazoval změnu aktivity oproti kontrolní skupině rostlin. V rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku a následně infikovaných PVY již byl virus detekován, ale později a ve výrazně menším množství. Tomu odpovídaly i aktivity sledovaných enzymů. V obou skupinách rostlin bylo zaznamenáno i zvýšené množství HSP 70 (obr. 30, str. 58).

Z tohoto pokusu rovněž vyplývá, že teplota 40°C aplikovaná po dobu dvou hodin na rostliny tabáku neměla vliv na aktivitu sledovaných enzymů, změny v enzymových aktivitách korelovaly s relativním množstvím virových proteinů v rostlinách.

K ověření vlivu zvýšené teploty na průběh virové infekce bude třeba provést další experimenty.

## 7 Závěr

- Infekce PVY<sup>NTN</sup> způsobila zvýšení aktivity GS a GOGAT v systémově infikovaných listech rostlin tabáku. Zvýšení aktivity odpovídá maximu infekce.
- Infekce PVY<sup>NTN</sup> způsobila snížení aktivity NR v listech rostlin tabáku. Naopak poslední odběrový den došlo k výraznému zvýšení aktivity NR.
- Infekce PVY<sup>NTN</sup> způsobila zvýšení aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu (PEPC, NADP-ME, PPK) v systémově infikovaných listech rostlin tabáku.
- Aktivita enzymů souvisejících s přeměnou a degradací aminokyselin (PAL, GDH) a proteas byla vlivem infekce PVY<sup>NTN</sup> zvýšená.
- Vystavení rostlin tabáku teplotě 40°C po dobu 2 hodin způsobilo změny v průběhu virové infekce.

## 8 Seznam použité literatury

- [1] Khan, J.A., Dijkstra, J.: Plant Viruses As Molecular Pathogens, Food Product Press, London (2001)
- [2] Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R.: Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plants Physiologists, Rockville, Maryland (2000)
- [3] Závada, V.: Molekulární virologie I., Peres, Praha (1999)
- [4] Matthews, R.E.F.: Plant virology, Academic Press, New York (1970)
- [5] Mehdy, M.C., Sharma, Y.K., Sathasivan, K., Bays, N.W.: *Physiol. Plant* 98, 365-374 (1996)
- [6] Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F.: *Cell Mol. Life Sci.* 57, 779-795 (2000)
- [7] Arias, M.C., Lenardon, S., Taleisnik, E.: *J. Phytopathol.* 151, 267-273 (2003)
- [8] MacDonald, M.J., D'Cunha, G.B.: *Biochem. Cell Biol* 85, 273-282 (2007)
- [9] Ziadi S., Poupard P., Brisset, M.N., Paulin J.P., Simonea U.P.: *J. Plant Pathol.* 50, 579-586 (2001)
- [10] Edreva A.: *Gen. Appl. Plant Physiol.* 31, 105-124 (2005)
- [11] Van Loon, L.C., Van Strien E.A.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85-97 (1999)
- [12] Meister, G., Tuschl, T.: *Nature* 431, 343-349 (2004)
- [13] Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., Vance, V.B.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 13079–13084 (1998)
- [14] Ryšlavá, H., Muller, K., Semorádová, Š., Synková, H., Čerovská, N.: *Photosynthetica* 41, 357-363 (2003)
- [15] Synková, H., Semorádová, Š., Schnablová, R., Muller, K., Pospíšilová, J., Ryšlavá, H., Malbeck, J., Čerovská, N.: *Plant Sci.* 171, 607–616 (2006)
- [16] Tschops, H., Gibon, Y., Carillo, P., Armengaud, P., Szekowka, M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Koehl, K., Stitt, M.: *Plant Cell Environ.* 32, 300-318 (2009)
- [17] Šindelářová, M., Šindelář, L., Burketová, L.: *Biol. Plant.* 42, 431-439 (1999)
- [18] Müller, K., Doubnerová, V., Synková, H., Čerovská, N., Ryšlavá, H.: *Biol. Chem.* 390, 245-251 (2009)
- [19] Kai, Y.; Matsumura, H.; Izui, K.: *Arch. Biochem. Biophys.* 414, 170-179 (2003)
- [20] Izui, K., Matsumura, H., Furumoto, T., Kai, Y. : *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 69-84 (2004)
- [21] Svensson, P., Bläsing, O.E., Westhoff, P. : *Arch. Biochem. Biophys.* 414, 180-188 (2003)
- [22] Miyao, M., Fukayama, H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 414, 197-203 (2003)
- [23] Toyota, K., Koizumi, N., Sato, F. : *J. Exp. Bot.* 384, 961-969 (2003)
- [24] Jeanneau, M., Vidal, J., Gouseet-Dupont, A., Leboutteiller, B., Hodges, M., Gerentes, D., Perez, P.: *J. Exp. Bot.* 53, 1837-1845 (2002)
- [25] Andreo, C.S., Gonzales, D.H., Iglesias, A.A. : *FEBS Lett.* 213, 1-8 (1987)

- [26] Fukayama, H., Tamai, T., Taniguchi, Y., Sullivan, S., Miyao, M., Nimmo, H.G. : *Plant J.* **47**, 258-268 (2006)
- [27] Nimmo, H.G. : *Arch. Bioch. Biophys.* **414**, 189-196 (2003)
- [28] Ting, I.P., Osmond, C.B. : *Plant Physiol.* **51**, 448-453 (1973)
- [29] Foyer, Ch.H., Valadier, M.H., Migge, A., Becker, T.W.: *Plant Physiol.* **117**, 283-292 (1998)
- [30] Ryšlavá, H., Doubnerová, V.: *Chem. Listy* **104**, 1175-1180 (2010)
- [31] Stitt, M., Muller, C., Matt, P.: *J. Exp. Bot.* **53**, (2001)
- [32] Luštinec, J., Žárský, V.: *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*, Karolinum, Praha (2005)
- [33] Kaiser, W., Huber, S.: *J. Exp. Bot.* **52**, 1981-1989 (2001)
- [34] Kaiser, W., Huber, S.: *Plant Physiol.* **106**, 817-821 (1994)
- [35] Huber, S., MacKintosh, C., Kaiser, W.: *Plant Mol. Biol.* **50**, 1053-1063 (2002)
- [36] Hirasawa, M., Dose, M.M., Kleis-SanFrancisco, S., Hurley, J.K., Tollin, G., Knaff, D.B. : *Arch. Biochem. Biophys.* **354**, 95-101 (1998)
- [37] Kuznetsova, S., Knaff, D.B., Hirasawa, M., Lagoutte, B., Sétif, P. : *Biochemistry* **43**, 510-517 (2004)
- [38] Ishiyama, K., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Obara, M., Yamaya, T., Takahashi, H.: *J. Biol. Chem.* **279**, 16598-16605 (2004)
- [39] Gawronski, J.D., Benson, D.R. : *Anal. Biochem.* **327**, 114-118 (2004)
- [40] Forde, B.G., Lea, P.J. : *J. Exp. Bot.* **58**, 2339-2358 (2007)
- [41] Oliveira, I.C., Coruzzi, G.M. : *Plant Physiol.* **121**, 301-309 (1999)
- [42] Ishiyama, K., Inoue, E., Yamaya, T., Takahashi, H.: *Plant Cell Physiol.* **47**, 299-303 (2006)
- [43] Pageau, K., Reisdorf-Cren, M., Morot-Gaudry, J.F., Masclaux-Daubresse, C.: *J. Exp. Bot.* **57**, 547-557 (2006)
- [44] Blanco, L., Reddy, P., Silvente, S., Bucciarelli, B., Khandual, S., Alvarado-Affantranger, X., Sánchez, F., Miller, S., Vance, C., Lara-Flores, M.: *Plant Cell Environ.* **31**, 454-472 (2008)
- [45] Suzuki, A., Rothstein, S.: *Eur. J. Biochem.* **243**, 708-718 (1997)
- [46] Meers, J.L., Tempest, D.W., Brown, C.M.: *J. Gen. Microbiol.* **64**, 187-194 (1970)
- [47] Wang, Z.Q., Yuan, Y.Z., Ou, J.Q., Lin, Q.H., Zhang, C.F., 2007. *J. Plant Physiol.* **164**, 695-701.
- [48] Chaffei, C., Houda G., Habib G.M.: *J. Plant Nutr.* **26**, 1617-1634 (2003)
- [49] Giberti, S., Berteà, C.M., Narayana, R., Maffei, M.E., Forlani, G.: *J. Plant Physiol.* **169**, 249-254 (2012)
- [50] Schovánková, J., Opatová, H.: *Hort. Sci.* **38**, 1-10 (2011)
- [51] Sriprasertsak, P., Raweerotwiboon, A., Yamada, T., Sutrabutra, T.: *Kasetsart J.: Nat. Sci.* **36**, 361-369 (2002)
- [52] Calabrese, J.C., Jordan, D.B., Boodhoo, A., Sariaslani, S., Vanneli, T.: *Biochemistry* **43**, 11403-11416 (2004)
- [53] Edwards, G.E.; Andreo, C.S.: *Phytochem.* **31**, 1845 - 1857 (1992)

- [54] Wheeler, M.C.G., Tronconi, M.A., Drincovich, M.F., Andreo, C.S, Flügge, U., Maurino, V.G. : *Plant Physiol.* 139, 39-51 (2005)
- [55] Chi, W., Zhou, J., Zhang, F., Wu, N.: *Acta Bot. Sin.* 46, 873-882 (2004)
- [56] Yang, Z., Lanks, Ch.W., Tong, L.: *Structure* 10, 951-960 (2002)
- [57] Tronconi, M.A., Fahnenstich, H., Weehler, M.C.G., Andreo, C.S., Flugge, U., Drincovich, M.F., Maurino, V.G.: *Plant Physiol.* 146, 1540-1552 (2008)
- [58] Miedzińska, L.: Vliv sucha na metabolismus tabáku, Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2010)
- [59] Doubnerová, V., Janošková, M., Synková, H., Šubr, Z., Čeřovská, N., Ryšlavá, H.: *Gen. Appl. Plant Physiol.* 33, 123-140, (2007)
- [60] Parsley, K., Hibberd, J.M.: *Plant Mol. Biol.* 62, 339-349 (2006)
- [61] Moons, A, Valcke,R., Van Montagu, M.: *Plant J.* 15, 89 – 98 (1998)
- [62] Chastain, Ch.J., Fries, J.P., Vogel, J.A., Randklev, Ch.L., Vossen, A.P., Dittmer, S.K., Watkins, E.E., Fiedler,L.J.; Wacker,S.A.; Meinhover,K.C.; Sarath,G.; Chollet,R. :*Plant Physiol.* 128, 1368 – 1378 (2002)
- [63] Burnell,J.N., Chastain,Ch.J. : *Biochem. Bioph. Res. Co.* 345, 675-680 (2006)
- [64] Chastain,Ch.J., Xu,W., Parsley,K., Sarath,G., Hibberd,J.M., Chollet,R. : *Plant J.* 53, 854-863 (2008)
- [65] Nakanishi,T., Nakatsu,T., Matsuoka,M., Sakata,K., Kato,H. : *Biochemistry* 44, 1136-1144 (2005)
- [66] Ryšlavá,H., Müller,K., Semorádová,Š., Synková,H., Cerovská,N. : *Photosynthetica* 41, 357-363 (2003)
- [67] Manchenko,G.P. : *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*, CRC Press (1994)
- [68] Debouba,M., Gouia,H., Suzuki,A., Ghorbel,M.H. : *J. Plant Physiol.* 163, 1247-1258 (2006)
- [69] Strydom, E., Mackie, I.R., Woods, D.R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 214-217 (1986)
- [70] Bradford, M.: *Anal. Biochem.* 72, 248 – 254 (1976)
- [71] Laemmli,U.K. : *Nature* 227, 680-685 (1970)
- [72] Lee,D.H., Lee,C.B. : *Plant Sci.* 159, 75–85 (2000)
- [73] Clark, M.F., Adams, A.N.: *J. Gen. Virol.* 34, 475-483 (1977)
- [74] Čeřovská, N.: *Plant Pathol.* 47, 505-509 (1998)
- [75] Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: *Plant Sci.* 180, 575-583, (2011)
- [76] Doubnerová, V., Müller, K., Čeřovská, N., Synková, H., Spoustová, P., Ryšlavá, H.: *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3583-3598, (2009)
- [77] Sivaramakrishnan, S., Patell, V.Z., Flower, D.J., Peacock, J.M.: *Physiol. Plant.* 74: 418-426 (1988)
- [78] Hirano, T., Ito, A., Berberich, T., Terauchi, R., Saitoh, H.: *Mol. Genet. Genomics* 278, 125–133 (2007)
- [79] Newingham, B.A., Callaway, R.M., Rad, H.R.: *Oecologia* 153, 913-920 (2007)
- [80] Minářů K.: Vliv složení kultivačního média na metabolismus rostlin tabáku, Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2010)



- [81] Teixeira, J., Fidalgo, F.: *Plant Physiol. Biochem.* 47, 807–813 (2009)
- [82] Mathioudakis, M.M., Veiga, R., Ghita, M., Tsikou, D., Medina, V., Canto, T., Makris, A.M., Livieratos, I.C.: *Virus Res.* 163, 28–39 (2012)
- [83] Hafrén, A., Hofius, D., Ronnholm, G., Sonnewald, U., Makinen, K.: *Plant Cell* 22, 523–535 (2010)

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

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