

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Úloha S-nitrosylace v regulaci aktivity enzymů u hrachu setého v reakci na abiotický stres

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Vendula Suszková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 30. 4. 2020

Bc. Vendula Suszková

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, vstřícnost, pomoc a poskytnutí potřebných materiálů k vypracování předložené diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Janě Sekaninové, Ph.D. za cenné rady a pomoc při vypracování experimentální části práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Vendula Suszková
Název práce	Úloha S-nitrosylace v regulaci aktivity enzymů u hrachu setého v reakci na abiotický stres
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Kadmium je toxický těžký kov, který při vysokých koncentracích narušuje antioxidační ochranu rostlin a může vyvolat oxidační a nitrosační stres v důsledku nadměrné produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Produkce oxidu dusnatého (NO) a následná interakce s jinými redoxními molekulami může vést k regulaci biologické aktivity proteinů prostřednictvím S-nitrosylace, reverzibilní kovalentní modifikace, ke které dochází vazbou NO na cysteinová rezidua proteinu.

Cílem diplomové práce bylo sledovat vliv přítomnosti chloridu kademnatého v růstovém médiu o různých koncentracích na fyziologické a biochemické procesy aktivované u rostlin v reakci na abiotický stres. Byl stanoven vliv přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na fyziologické parametry rostlin, produkci ROS a RNS, zastoupení S-nitrosylovaných proteinů, produkci polyaminů a aktivitu enzymů podílejících se na jejich degradaci: diaminooxidasy (DAO) a aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH). Experimenty byly realizovány na dvou genotypech hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset), které se liší rezistencí vůči patogenům. Se zvyšující se koncentrací CdCl_2 v růstovém médiu došlo k inhibici fyziologických parametrů rostlin, snížení produkce H_2O_2 , zvýšení produkce hROS, RNS a intenzity S-nitrosylace proteinů. Aktivita DAO byla v kořenové části rostlin obou genotypů snížena, naopak v nadzemní části byla zvýšena. Podobně byla zvýšena aktivita AMADH v kořenové i nadzemní části rostlin obou genotypů hrachu setého.

Klíčová slova	hrách setý, kadmium, oxid dusnatý, polyaminy, reaktivní formy kyslíku, reaktivní formy dusíku, S-nitrosylace, těžké kovy
Počet stran	89
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Vendula Suszková
Title	The role of S-nitrosylation in regulation of enzyme activities in pea in response to abiotic stress
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Cadmium is a toxic heavy metal, which at high concentrations disrupts antioxidant protection of plants and can cause oxidative and nitrosative stress due to excessive production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species. Production of nitric oxide (NO) and subsequent interactions with other redox molecules can lead to the regulation of biological activity of proteins through S-nitrosylation, a reversible covalent modification, which consists in adding of a NO group to a cysteine residues of proteins.

The aim of this thesis was to study the effect of various concentration of cadmium chloride in growth medium on the physiological and biochemical processes activated in plants in response to abiotic stress. The effect of the presence of Cd²⁺ in the growth medium on plant physiological parameters, production of ROS and RNS, representation of S-nitrosylated proteins, production of polyamines and activity of enzymes involved in their degradation, diaminoxidase (DAO) and aminoaldehyde dehydrogenase (AMADH), was determined. For experiments, two genotypes of pea (*P. sativum* cv. Kudrnáč and *P. sativum* cv. Twinset), which differ in resistance to pathogens, were used. Increasing CdCl₂ concentrations in the growth medium inhibited plant physiological parameters, decreased H₂O₂ production, increased hROS, RNS production and protein S-nitrosylation intensity. DAO activity was decreased in the roots of both genotypes but increased in the shoots. Similarly, the activity of AMADH was increased in the roots and shoots of both pea genotypes.

Keywords	pea, cadmium, nitric oxide, polyamines, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, S-nitrosylation, heavy metals
Number of pages	89
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Charakteristika stresových faktorů u rostlin	3
2.1.1	Abiotické stresové faktory – těžké kovy	3
2.2	Role reaktivních forem kyslíku v obranných mechanismech u rostlin	5
2.2.1	Reaktivní formy kyslíku	5
2.2.2	Produkce reaktivních forem kyslíku	6
2.2.3	Význam a funkce reaktivních forem kyslíku	6
2.2.4	Antioxidační obranný systém rostlin	7
2.2.5	Reaktivní formy kyslíku a působení těžkých kovů na rostliny	8
2.3	Role reaktivních forem dusíku v obranných mechanismech u rostlin	10
2.3.1	Reaktivní formy dusíku	10
2.3.2	Produkce reaktivních forem dusíku – oxid dusnatý	11
2.3.3	Význam a funkce oxidu dusnatého	13
2.3.4	Regulace hladiny oxidu dusnatého v rostlinných buňkách	13
2.3.5	Oxid dusnatý a působení těžkých kovů na rostliny	15
2.4	Role polyaminů v obranných mechanismech u rostlin	16
2.4.1	Polyaminy	16
2.4.2	Význam a funkce polyaminů u rostlin	17
2.4.3	Biosyntéza polyaminů	18
2.4.4	Katabolismus polyaminů	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1	Materiál a přístroje	22
3.1.1	Rostlinný materiál	22
3.1.2	Chemikálie	22
3.1.3	Přístroje a vybavení	23
3.2	Metody	24
3.2.1	Příprava rostlinného materiálu	24
3.2.2	Zpracování rostlinného materiálu	25
3.2.3	Stanovení obsahu kadmia v hrachu setém	26
3.2.4	Stanovení fyziologických parametrů rostlin	26
3.2.5	Stanovení proteinů metodou Bradforda	27
3.2.6	Stanovení vlivu Cd ²⁺ v médiu na obsah polyaminů	27
3.2.7	Stanovení aktivity diaminooxidasy	28
3.2.8	Stanovení aktivity aminoaldehyddehydrogenasy	29
3.2.9	Detekce aminoaldehyddehydrogenasy metodou Western blot	29
3.2.10	Histochemická detekce reaktivních forem dusíku a kyslíku	32
3.2.11	Fluorimetrické stanovení oxidu dusnatého	34
3.2.12	Fluorimetrické stanovení peroxidu vodíku	34
3.2.13	Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch	35
3.2.14	Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy	37
3.2.15	Statistické zpracování dat	38
4	VÝSLEDKY	39
4.1	Stanovení obsahu kadmia v hrachu setém	39
4.2	Vliv Cd ²⁺ v médiu na fyziologické parametry hrachu setého	40
4.3	Vliv Cd ²⁺ v médiu na obsah proteinů	42
4.4	Vliv Cd ²⁺ v médiu na obsah polyaminů	43
4.5	Vliv Cd ²⁺ v médiu na enzymy podílející se na metabolismu polyaminů	46

4.5.1	Stanovení aktivity enzymu diaminooxidasy a aminoaldehyddehydrogenasy	46
4.5.2	Detekce aminoaldehyddehydrogenasy metodou Western blot	47
4.6	Vliv Cd^{2+} v médiu na produkci oxidu dusnatého	48
4.6.1	Histochemická detekce produkce oxidu dusnatého	48
4.6.2	Fluorimetrické stanovení oxidu dusnatého	50
4.7	Vliv Cd^{2+} v médiu na produkci S-nitrosothiolů	51
4.7.1	Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch	51
4.7.2	Vliv Cd^{2+} v médiu na aktivitu enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy	52
4.8	Vliv Cd^{2+} v médiu na produkci reaktivních forem kyslíku.....	53
4.8.1	Histochemická detekce produkce reaktivních forem kyslíku	53
4.8.2	Histochemická detekce produkce vysoce reaktivních forem kyslíku pomocí aminofenylfluoresceinu	55
4.8.3	Histochemická detekce produkce vysoce reaktivních forem kyslíku pomocí hydroxyfenylfluoresceinu	56
4.8.4	Histochemická detekce produkce peroxidu vodíku pomocí diaminobenzidinu	58
4.8.5	Fluorimetrické stanovení peroxidu vodíku	59
5	DISKUZE.....	61
6	ZÁVĚR.....	74
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	88

CÍLE PRÁCE

1. Teoretická část

Vypracování literární rešerše se zaměřením na charakterizaci:

- Obranných reakcí aktivovaných u rostlin vystavených působení těžkých kovů se zaměřením na Cd^{2+} ionty:
 - role reaktivních forem kyslíku a dusíku
 - zapojení polyaminů a enzymů podílejících se na jejich metabolismu

2. Experimentální část

- Stanovení vlivu Cd^{2+} iontů na:
 - růst a vývoj hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč, *P. sativum* cv. Twinset)
 - hladinu polyaminů a aktivitu enzymů podílejících se na jejich metabolismu
 - produkci reaktivních forem kyslíku a aktivitu vybraných antioxidačních enzymů
 - produkci reaktivních forem dusíku, hladinu S-nitrosothiolů a intenzitu S-nitrosylace

1 ÚVOD

Rostliny jsou přisedlé organismy bez možnosti pohybu za lepšími podmínkami pro svůj růst a vývoj, a proto jsou neustále vystaveny nepříznivým podmínkám prostředí (Begara-Morales *et al.*, 2018). Navíc v posledních letech lidská činnost nesmírně přispěla ke znečištění životního prostředí tím, že umožnila nekontrolované zvyšování produkce odpadů (Groppa *et al.*, 2001).

Mezi významné látky znečišťující prostředí řadíme těžké kovy, jejichž hlavními zdroji jsou odpady těžebního a chemického průmyslu (Fariduddin *et al.*, 2013). Kadmium je jedním z hlavních průmyslových polutantů, který vykazuje fytotoxicitu již při nízkých koncentracích (Groppa *et al.*, 2001). Přítomnost vysokých koncentrací kadmia v půdě obvykle vyvolává v rostlinách mnoho stresových symptomů, jako je inhibice růstu, zejména kořenů a poruchy minerální výživy rostlin (John *et al.*, 2008). Kromě toho kadmium způsobuje změny redoxní rovnováhy, které jsou podnětem k vyvolání odezvy rostlin na tyto nepříznivé podmínky prostředí (Begara-Morales *et al.*, 2016). V souvislosti s odezvou rostlin na stresové podmínky jsou známy různé signální molekuly s regulační funkcí, z nichž nejvýznamnější jsou reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), jako je např. peroxid vodíku (H_2O_2) a oxid dusnatý (NO) (Begara-Morales *et al.*, 2018). Za normálních fyziologických podmínek mají tyto molekuly signální funkci, ale ve stresových podmínkách prostředí mají potenciál způsobit řadu poškození (Farnese *et al.*, 2016). Nadprodukce ROS způsobuje u rostlin tzv. oxidační stres, který vede k dezintegraci biomembrán peroxidací lipidů v rostlinných buňkách (Fornazier *et al.*, 2002). Nadprodukce NO vede k indukci tzv. nitrosačního stresu následkem kterého dochází k poškození rostlinných buněk (Asgher *et al.*, 2017). Významnou funkcí ROS a NO je schopnost regulace rozmanitých biologických procesů prostřednictvím oxidace, nitrace a nitrosylace proteinů. Jedná se o procesy posttranslační modifikace, kdy S-nitrosylace spočívá ve vazbě NO na cysteinová rezidua proteinu za vzniku daného S-nitrosothiolu (Stamler *et al.*, 2001).

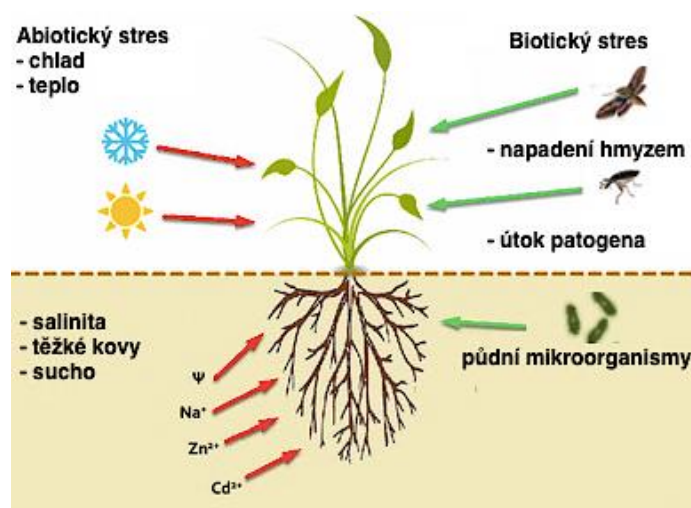
Rostliny vystavené působení těžkých kovů se vyrovnávají s jejich poškozením syntézou řady metabolitů, jako jsou např. polyaminy (PA) (Sharma a Dietz, 2006). Polyaminy jsou sloučeniny široce distribuované v živých buňkách a jsou zapojeny do celé řady regulačních procesů, jako je podpora růstu, dělení a diferenciace buněk a replikace DNA (Groppa *et al.*, 2001). Důležitost PA pro normální růst a funkci buněk je zdůrazněna složitým regulačním systémem syntézy a degradace pro udržení požadované koncentrace

PA v rostlinných buňkách (Fariduddin *et al.*, 2013). Kromě fyziologických funkcí v růstu a vývoji rostlin se PA podílí na ochraně rostlin při stresových reakcích, např. jako antioxidanty, podílející se na snížení hladiny volných radikálů a stabilizaci buněčné membrány (Wang *et al.*, 2004; Fariduddin *et al.*, 2013).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Charakteristika stresových faktorů u rostlin

Rostliny jsou neustále v průběhu svého života konfrontovány s širokým spektrem nejrůznějších stresových faktorů, které mohou narušovat metabolismus rostlin, snižovat jejich produktivitu, způsobovat fyziologické změny a v krajních případech mohou vést až k úhynu rostlin (Rejeb *et al.*, 2014). Rozlišujeme dva typy stresových faktorů. Prvním typem jsou stresové faktory biotické povahy, zahrnující poškození rostliny patogenem, nebo negativní působení okolních organismů (Obr. 1). Druhým typem jsou stresové faktory abiotické povahy, například teplo, chlad, sucho, působení těžkých kovů nebo salinita (Obr. 1) (Piterková *et al.*, 2005; Rejeb *et al.*, 2014; van Oosten *et al.*, 2017).



Obr. 1 Abiotické a biotické stresové faktory působící na rostliny (převzato z van Oosten *et al.*, 2017).

2.1.1 Abiotické stresové faktory – těžké kovy

Kovy, jejichž hustota je vyšší než $0,005 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ lze označit jako tzv. těžké kovy (Schützendübel, 2002). Mezi zástupce těžkých kovů s potenciálně toxickými účinky na rostliny a jiné živé organismy řadíme kadmium (Cd), olovo (Pb), kobalt (Co), zinek (Zn), železo (Fe), měď (Cu), arsen (As) a chrom (Cr). Některé z těchto těžkých kovů, jako jsou např. Zn, Cu a Fe, slouží v nízkých koncentracích jako nezbytné mikroživiny potřebné pro růst rostlin (Nagajyoti *et al.*, 2010). Zdroje těžkých kovů v ekosystému a půdě jsou rozmanité, od těch přirozeně se vyskytujících v mateční hornině a sopečných ohniscích, až po ty vyskytující se v půdě v důsledku antropogenní průmyslové činnosti, např. těžby, hnojení a aplikace pesticidů (Morselli *et al.*, 2004; Nagajyoti *et al.*, 2010).

Na přítomnost těžkých kovů v půdě, jejichž koncentrace se velmi liší, reagují různé druhy rostlin odlišně. Některé rostliny se vyvinuly tak, že tolerují specifické hladiny těžkých kovů pomocí detoxikačních mechanismů, většina z nich je však citlivá na půdu kontaminovanou těžkými kovy (Yadav, 2010; Majeed *et al.*, 2019). Citlivost rostlin na působení těžkých kovů závisí na vzájemném propojení fyziologických a molekulárních mechanismů, jako jsou (1) příjem a akumulace těžkých kovů prostřednictvím vazby na extracelulární exudáty a složky buněčných stěn; (2) transport těžkých kovů z cytoplasmy do buněčných kompartmentů včetně vakuol; (3) komplexace iontů těžkých kovů uvnitř buňky různými látkami, např. organickými kyselinami, aminokyselinami, ferritiny, fytochelatinu a metallothioneiny; (4) obecné biochemické odpovědi na obranu proti stresu jako je indukce antioxidačních enzymů a hromadění volného prolinu; (5) aktivace nebo modifikace rostlinného metabolismu umožňující odpovídající fungování metabolických drah a rychlou opravu poškozených buněčných struktur (Metwally *et al.*, 2005).

Cd je neesenciální toxický těžký kov, který se za běžných podmínek vyskytuje v půdě v nízkých koncentracích (Wagner, 1993). Hlavními zdroji znečištění těžkými kovy jsou aplikace fosfátových hnojiv a pesticidů, rozptýl čistírenských a splaškových kalů, těžba a průmyslové emise (Pinto *et al.*, 2004; Kuriakose a Prasad, 2008). Přestože je Cd nepodstatným prvkem minerální výživy rostlin, je velmi snadno a rychle absorbován kořeny a transportován xylémem do vegetativních a reprodukčních orgánů rostliny, kde se akumuluje (Sanità di Toppi a Gabrielli, 1999; Metwally *et al.*, 2005). Množství Cd nahromaděného v rostlinách se mezi druhy značně liší (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006). Známým toxickým účinkem působení Cd na rostliny je inhibice růstu, poškození a snížení počtu laterálních kořenů v důsledku poškození fotosyntetického aparátu a poškození distribuce makro a mikro živin (Sandalio *et al.*, 2001; Benavides *et al.*, 2005). U hrachu setého bylo popsáno mnoho dalších toxických účinků Cd na metabolismus rostlin, jako např. inhibice aktivity enzymů, narušení buněčných transportních procesů a změny v syntéze RNA (Pérez Chaca *et al.*, 2014). Cd je také spojováno s poruchami antioxidační ochrany rostlin, které vyvolává oxidační stres v důsledku nadměrné produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) (Panda *et al.*, 2011). ROS následně způsobují oxidační poškození biomolekul, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny a mohou mít vliv na aktivitu enzymů antioxidační ochrany rostlin (Roychoudhury *et al.*, 2012).

2.2 Role reaktivních forem kyslíku v obranných mechanismech u rostlin

2.2.1 Reaktivní formy kyslíku

Hromadění molekulárního kyslíku (O_2) v zemské atmosféře umožňuje aerobním organismům v průběhu buněčného dýchání využívat kyslík jako terminální akceptor elektronů (Dismukes *et al.*, 2001). Molekulární kyslík není velmi reaktivní ani škodlivý, ale může být během normálního buněčného metabolismu, nebo v důsledku odpovědi rostlin na nejrůznější biotické a abiotické stresové faktory, částečně redukován nebo excitován, což vede k tvorbě tzv. reaktivních forem kyslíku (ROS) (Saxena *et al.*, 2016). Odhaduje se, že 1–2 % O_2 spotřebovaného rostlinami je přemístěno za účelem produkce ROS v různých subcelulárních kompartmentech, jako jsou chloroplasty, mitochondrie a peroxisomy (Tab. 1) (Blokhina *et al.*, 2003, Apel a Hirt, 2004). Mezi ROS řadíme peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$), hydroxylový radikál (OH^{\bullet}), hydroperoxylový radikál ($OH_2^{\bullet-}$), peroxylový radikál (ROO^{\bullet}) a singletový kyslík (1O_2) (Tab. 1) (Karuppanandian *et al.*, 2011; Mittler, 2017).

Tab. 1 Přehled druhů reaktivních forem kyslíku a jejich vlastnosti: biologický poločas ($t_{1/2}$), vzdálenost migrace, biologický účinek a místo produkce (převzato z Mittler, 2017).

ROS	$t_{1/2}$	Vzdálenost migrace	Biologický účinek	Místo produkce
Superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$)	1–4 μ s	30 nm	Reakce s Fe-S proteiny Degradace na peroxid vodíku	Apoplast, chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy, elektron-transportní řetězec
Hydroxylový radikál (OH^{\bullet})	1 ns	1 nm	Extrémně reaktivní se všemi biomolekulami (DNA, RNA, lipidy a proteiny)	Železo a peroxid vodíku (Fentonova reakce)
Peroxid vodíku (H_2O_2)	>1 ms	>1 μ m	Reakce s proteiny atakem cysteinových a methioninových residuí. Reakce s hemovými proteiny. Reakce s DNA.	Peroxisomy, chloroplasty, mitochondrie, cytosol, apoplast
Singletový kyslík (1O_2)	1–4 μ s	30 nm	Oxidace lipidů, proteinů (Trp, His, Tyr, Met a Cyt residua) a G residua DNA	Membrány, chloroplasty, jádra

2.2.2 Produkce reaktivních forem kyslíku

Produkce reaktivních forem kyslíku je prostřednictvím molekulárního kyslíku buďto přenosem energie, nebo reakcemi vedoucích k přenosu elektronů (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Přijetí přebytečné energie molekulárním kyslíkem může vést k tvorbě singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$). Ten je v porovnání s O_2 velmi reaktivní a může interagovat s různými biomolekulami (Mittler, 2002; Halliwell, 2006). V biologických systémech je singletový kyslík produkován pod vlivem UV záření, nebo v chloroplastech v důsledku fotosenzibilizace molekul chlorofylu (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Jednoelektronová redukce molekulárního kyslíku vede k tvorbě superoxidového radikálu ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Superoxidový radikál je středně reaktivní s biologickým poločasem přibližně 1 μs , tudíž nemá schopnost procházet přes biomembrány a je snadno degradovatelný na peroxid vodíku (H_2O_2). Reakcí $\text{O}_2^{\bullet-}$ s velmi významným zástupcem volných radikálů oxidem dusnatým (NO) dochází ke vzniku peroxynitritu (OONO^-). Protonací $\text{O}_2^{\bullet-}$ ve vodných roztocích vzniká hydroxyperoxylový radikál ($\text{OH}_2^{\bullet-}$). Peroxid vodíku (H_2O_2) je středně reaktivní s biologickým poločasem přibližně 1 ms, tudíž má schopnost volného pohybu přes biomembrány. Tato vlastnost umožňuje H_2O_2 rozptýl v krátkých vzdálenostech od místa produkce, čímž může docházet k šíření poškození, které způsobuje. Zároveň má schopnost inaktivovat enzymy v důsledku oxidace thiolových skupin v proteinové struktuře enzymů. Významná úloha H_2O_2 souvisí s jeho působením jako druhého posla v rámci stresové signalizace (Halliwell, 2006; Moller *et al.*, 2007). Za nejreaktivnější zástupce z rodiny ROS lze považovat hydroxylový radikál (OH^{\bullet}), jehož produkce je umožněna jednoelektronovou redukcí H_2O_2 a Fentonovou reakcí (reakce peroxidu vodíku s iontem přechodného kovu v nižším mocenství, např. Fe^{2+} a Cu^+) nebo Haber-Weissovou reakcí (reakce mezi superoxidovým radikálem a peroxidem vodíku). Hydroxylový radikál může potenciálně reagovat se všemi druhy biomolekul, jako jsou např. proteiny, lipidy a DNA a také téměř s jakoukoliv složkou buněk. Jelikož rostlinné buňky nejsou schopny zachytit tyto vysoce reaktivní formy kyslíku, jejich nadměrná produkce může vést až k programované buněčné smrti rostliny (Karuppanapandian *et al.*, 2011).

2.2.3 Význam a funkce reaktivních forem kyslíku

Reaktivní formy kyslíku jsou silná oxidační činidla, která jsou extrémně reaktivní a způsobují poškození biomembrán a dalších životně důležitých buněčných komponent rostlin (Petrov a van Breusegem, 2012). I přes vysokou potenciální toxicitu mají ve skutečnosti

ROS dvojí funkci *in vivo*, a to v závislosti na jejich koncentraci, místě a době působení, předchozích expozicích stresu atd. (Miller *et al.*, 2010). Obecně mohou mít ROS při nižších koncentracích funkci signální molekuly. Jako signální molekuly jsou vysoce univerzální kvůli svým různorodým vlastnostem, které zahrnují různé úrovně reaktivity, místa produkce a potenciál procházet biologickými membránami. Nejpravděpodobněji byly poprvé použity buňkami jako signální molekuly ke snímání nebezpečných hladin atmosférického kyslíku nebo ke sledování různých metabolických reakcí (Mittler, 2017). V rámci vývoje získaly významnou funkci v regulaci téměř všech aspektů života v rostlinách, zvířatech a většině eukaryotických organismů (Mittler *et al.*, 2011). Například u vyšších rostlin bylo zjištěno, že ROS regulují vývoj, diferenciaci, redoxní hladiny, stresovou signalizaci, interakce s jinými organismy, systémové reakce a buněčnou smrt (Mittler, 2017). Naopak při vyšších koncentracích ROS představují významnou hrozbu v podobě inaktivace enzymů, poškození životně důležitých buněčných organel v rostlinách, poškození DNA a vzniku mutací, což může vést k nenapravitelným metabolickým dysfunkcím a v konečném důsledku až k programované buněčné smrti (Karuppanapandian *et al.*, 2011).

2.2.4 Antioxidační obranný systém rostlin

Proces produkce ROS je za běžných fyziologických podmínek vyvažován degradací ROS pomocí buněčného antioxidačního obranného systému rostlin (Mittler, 2002; Rahal *et al.*, 2014). Tento proces probíhá v rostlinných buňkách neustále, a to z toho důvodu, aby se zabránilo některým potenciálním toxickým účinkům ROS, např. oxidace a poškození DNA, RNA, bílkovin a biomembrán, souhrnně označovaných jako tzv. oxidační stres (Mittler, 2017). Antioxidační obranný systém rostlin je tvořen složkami jak enzymovými, tak neenzymovými. Enzymový antioxidační systém rostlin zahrnuje katalasu (CAT), askorbátperoxidasu (APX), guajakolperoxidasu (GPX) a superoxidodismutasu (SOD). Kromě toho je pro regeneraci aktivních forem antioxidantů zapotřebí řada enzymů, jako jsou např. monodehydroaskorbátoreduktasa (MDHAR), dehydroaskorbátoreduktasa (DHAR) a glutathionreduktasa (GR) (Tab. 2) (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Neenzymový antioxidační systém rostlin zajišťují některé unikátní sekundární metabolity spolu s některými antioxidačními molekulami s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou kyselina askorbová (AA), glutathion (GSH), tokoferoly (TOCs), karotenoidy (CARs) a fenolické sloučeniny (Tab. 2) (Das *et al.*, 2016).

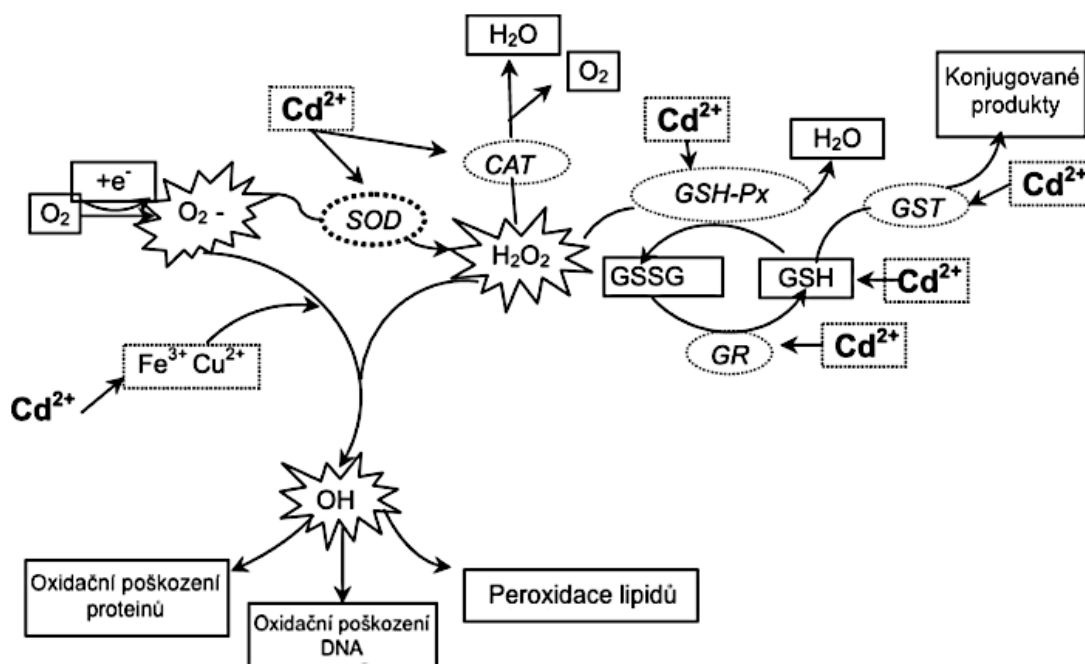
Tab. 2 Nejdůležitější enzymové a neenzymové antioxidační systémy, jejich lokalizace a účinek na reaktivní formy kyslíku v rostlinných buňkách (převzato z Karuppanapandian *et al.*, 2011).

Enzymové antioxidanty	Katalyzovaná reakce	Číselný kód enzymu	Subcelulární lokalizace
CAT	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	1.11.1.6	Per, Gly a Mit
APX	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AA} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{DHA}$	1.11.1.11	Cyt, Per, Chl a Mit
GPX	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DHA} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$	1.11.1.7	Chl, Cyt, Mit a ER
SOD	$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	1.15.1.1	Cyt, Chl, Per a Mit
MDHAR	$2\text{MDHA} + \text{NADH} \rightarrow 2\text{AA} + \text{NAD}^+$	1.6.5.4	Chl, Mit a Cyt
DHAR	$\text{DHA} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{AA} + \text{GSSG}$	1.8.5.1	Chl, Mit a Cyt
GR	$\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$	1.6.4.2	Cyt, Chl a Mit
Neenzymové antioxidanty			
AA	Substrát pro APX. Detoxifikuje H_2O_2		Chl, Cyt, Mit, Per, Vac a Apo
GSH	Substrát pro různé typy POX, GR. Detoxifikuje H_2O_2 další hydroperoxidasy a toxické sloučeniny		Chl, Cyt, Mit, Per, Vac a Apo
TOCs	Chrání membránové lipidy před peroxidací, detoxikuje peroxidy lipidů a zháší $^1\text{O}_2$		Membrány
CARs	Zháší $^1\text{O}_2$. Sestavení fotosystému, prekurzory kyseliny abscisové (ABA)		Chl, chromoplast, elaioplast a amyloplast
Flavonoidy	Může přímo vychytávat H_2O_2 a OH^{\cdot}		Vac

Zkratky: $^1\text{O}_2$: singletový kyslík; AA: kyselina askorbová; Apo: apoplast; APX: askorbátperoxidasa; CARs: karotenoidy; CAT: katalasa; Cyt: cytosol; Chl: chloroplast; DHA: dehydroaskorbát; DHAR: dehydroaskorbátreduktasa; ER: endoplazmatické retikulum; Gly: glyoxisomy; GPX: guajakolperoxidasa; GR: glutathionreduktasa; GSH: glutathion; GSSG: oxidovaný glutathion; GST: glutathion-S-transferasa; H_2O : voda; H_2O_2 : peroxid vodíku; MDHA: monodehydroaskorbát; MDHAR: monodehydroaskorbátreduktasa; Mit: mitochondrie; O_2 : kyslík; $\text{O}_2^{\cdot-}$: superoxidový radikál; OH^{\cdot} : hydroxylový radikál; Per: peroxisomy; POX: peroxidasa; SOD: superoxidodismutasa; TOCs: tokoferoly; Vac: vakuola.

2.2.5 Reaktivní formy kyslíku a působení těžkých kovů na rostliny

Primární odezvou rostlin vystavených vysokým hladinám těžkých kovů (Cd) je produkce reaktivních forem kyslíku způsobující oxidační stres (Yadav, 2010). Těžké kovy indukují oxidační stres v buňkách rostlin následujícími způsoby: (1) přímým přenosem elektronů v jednoelektronových reakcích, které vedou k produkci volných radikálů; (2) prostřednictvím přechodných kovů (např. Fe^{3+} , Cu^{2+}) nesoucích ve svém orbitalu nepárové elektrony a podporujících přenosy elektronů na O_2 , interkonverzi ROS a oxidoredukční jevy; (3) interferencí s metabolickými drahami zejména v tylakoidních membránách; (4) inaktivací antioxidačních enzymů, jako např. katalasy a superoxidodismutasy, zodpovědných za detoxikaci volných radikálů (Obr. 2) (Matović *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2016).



Obr. 2 Způsoby Cd-indukované tvorby reaktivních forem kyslíku. Kadmium narušuje enzymovou složku antioxidačního obranného systému rostlin: SOD: superoxiddismutasa; CAT: katalasa; GSH-Px: glutathionperoxidasa; GST: glutathion-S-transferasa; GR: glutathionreduktasa a neenzymovou složku: GSSG a GSH: oxidovaný a redukovaný glutathion. Kadmium také zvyšuje hladiny přechodných kovů (Fe^{3+} , Cu^{2+}), které mohou rozkládat peroxid vodíku (H_2O_2) na reaktivní hydroxylový radikál (OH^\cdot) (převzato z Matović *et al.*, 2011).

Jedním z nejškodlivějších účinků reaktivních forem kyslíku u rostlin vystavených působení těžkých kovů je peroxidace lipidů, která může přímo způsobit poškození biomembrán. Za spolehlivý ukazatel oxidačního stresu u rostlin lze považovat malondialdehyd (MDA), jelikož se jedná o jeden z produktů rozkladu polynenasycených mastných kyselin biomembrán (Demiral a Türkan, 2005).

Pro boj s toxicitou těžkých kovů a jejich akumulace rostliny vyvinuly detoxikační mechanismy (Das *et al.*, 2016). Tyto mechanismy jsou primárně založeny na produkci thiolů s nízkou molekulovou hmotností a vysokou afinitou k toxickým kovům (Bricker *et al.*, 2001). Mezi nejvýznamnější thioly s nízkou molekulovou hmotností produkovaných v souvislosti s expozicí rostlin těžkými kovy řadíme glutathion (GSH) a cystein (Cys). Glutathion (GSH) je síru obsahující tripeptidový thiol skládající se z glutaminu, cysteinu a glycinu ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) (Yadav, 2010). Vyskytuje se ve formě redukované jako thiol (GSH) nebo ve formě oxidované jako disulfid (GSSG) (Borková, 2008). GSH je syntetizován dvěma reakcemi závislými na ATP, kde γ -glutamylcysteinsynthetasa (GSH1, EC 6.3.2.2) katalyzuje tvorbu peptidové vazby mezi karboxylovou skupinou glutamátu a aminoskupinou cysteinu za vzniku γ -glutamylcysteinu ($\gamma\text{-EC}$).

Ve druhé reakci glutathionsynthetasa (GSH2, EC 6.3.2.3) liguje glycinový zbytek s γ -EC za vzniku GSH (Yadav, 2010). Redukovaný glutathion působí jako antioxidant a přímo se podílí na redukci většiny druhů ROS generovaných během oxidačního stresu (Millar *et al.*, 2003; Foyer a Noctor, 2005; Shao *et al.*, 2008). Kromě toho hraje GSH zásadní roli v mnoha buněčných detoxikačních procesech xenobiotik a těžkých kovů. Mechanismus účinku GSH spočívá v konjugaci GSH s cílovou sloučeninou, která má být detoxikována (Marrs, 1996; Alfenito *et al.*, 1998). Konjugace GSH je řízena prostřednictvím glutathion-S-transferasy (Edwards *et al.*, 2000; Edwards a Dixon, 2005). Konjugáty jsou následně transportovány do vakuol a chrání tak rostlinnou buňku před jejich škodlivými účinky (Klein *et al.*, 2006; Yazaki, 2006). GSH je také významný jakožto prekurzor pro syntézu fytochelatinů. Jedná se o malé polypeptidy bohaté na cystein vázající se na těžké kovy. Fytochelatiny jsou syntetizovány z GSH v transpeptidizační reakci katalyzované enzymem fytochelatinsynthasou (Yadav, 2010). Fytochelatiny tvoří v cytosolu komplexy s ionty toxických kovů a následně je transportují do vakuol, tudíž chrání rostlinné buňky před škodlivými účinky těžkých kovů (Salt a Rauser, 1995).

2.3 Role reaktivních forem dusíku v obranných mechanismech u rostlin

2.3.1 Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku (RNS) jsou sloučeniny primárně odvozené od oxidu dusnatého (NO) a mohou vznikat buď jeho oxidací, nebo redukcí. RNS lze rozdělit do dvou skupin, a to na skupinu volných radikálů zahrnující oxid dusnatý (NO) a oxid dusičitý (NO₂) a na skupinu látek neradikálové povahy, do které řadíme kyselinu dusitou (HNO₂), oxid dusitý (N₂O₃), peroxyinitrit (ONOO⁻), alkylperoxyinitrit (ROONO), S-nitrosothioly (SNO) a další. RNS představují ústřední molekuly pro regulaci velkého množství buněčných procesů v rostlinách, které jsou nedílnou součástí jejich vývoje a reakcí na abiotický stres (Umbreen *et al.*, 2018). Je důležité si uvědomit, že tyto malé redoxně aktivní molekuly jsou klíčovými komponenty sítě pro přenos buněčného signálu a jsou významné při aktivaci antioxidantních obranných mechanismů rostlin (del Río *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2012; Skelly a Loake, 2013; Asgher *et al.*, 2017).

Oxid dusnatý (NO, N=O) je multifukční, redoxně reaktivní, malá, difúzní, bioaktivní plynná molekula, která řídí široké spektrum růstových a vývojových procesů rostlin a účastní se několika mechanismů tolerance vůči abiotickému stresu (Xiong *et al.*, 2010; Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2011). Z důvodu přítomnosti nepárového elektronu v π orbitalu atomu dusíku molekuly NO se jedná o vysoce reaktivní molekulu s dvojitým působením (tj. pozitivní/negativní) v biologických systémech. Vzhledem ke svým výjimečným chemickým vlastnostem a biologickému působení je NO považován za velmi významného zástupce RNS (Asgher *et al.*, 2017).

2.3.2 Produkce reaktivních forem dusíku – oxid dusnatý

Dle současných znalostí mají rostliny širokou škálu biosyntetických drah NO, které lze obecně klasifikovat jako oxidační nebo redukční, zahrnující jak enzymové, tak neenzymové procesy (Gupta *et al.*, 2011; Kolbert *et al.*, 2019).

Enzymová redukční dráha biosyntézy NO je zajištěna prostřednictvím nitrátreduktasy (NR, EC 1.6.6.1), která využívá NAD(P)H jako zdroj elektronů pro přeměnu dusičnanů na dusitany (NO_2^-). Ty jsou následně redukovány na NO (Gill *et al.*, 2013). Za běžných fyziologických podmínek se však odhaduje, že procento aktivity NR *in vivo* zapojené do redukce dusitanů představuje pouze přibližně 1 % kapacity redukce dusičnanů. Přesto je NR důležitým zdrojem enzymové produkce NO v rostlinách (Gupta *et al.*, 2011). V rostlinách mohou být dusitany enzymově redukovány také jinými enzymy, jako jsou nitrit:NO-reduktasa (Ni:NOR), která je pravděpodobně lokalizována v plazmatické membráně, nebo xantinoxidasa (XO), která pro svou funkci vyžaduje molybden jako kofaktor (Stohr a Ullrich, 2002; Neill *et al.*, 2003). Bylo také prokázáno, že křenová peroxidasa vytváří NO z hydroxymočoviny a peroxidu vodíku (Huang *et al.*, 2002; Veitch, 2004). Dalšími kandidáty pro tvorbu NO jsou hemové proteiny, cytochromy P450. Tyto proteiny katalyzují oxidaci N-hydroxyargininu (NOHA) v přítomnosti NADPH a O_2 za vzniku NO (Obr. 3) (Boucher *et al.*, 1992; Mansuy a Boucher, 2002). Produkci NO v rostlinách může vyvolat také přítomnost polyaminů, jako jsou spermin a spermidin (Tun *et al.*, 2002). Bylo dokázáno, že hladiny polyaminů korelují s produkcí NO, jelikož L-arginin je prekurzorem v jejich biosyntéze (Gao *et al.*, 2009).

Enzymová oxidační dráha biosyntézy NO je zajištěna prostřednictvím oxidace sloučenin redukovaného dusíku: L-argininu, polyaminů nebo hydroxylaminů (Kolbert *et al.*, 2019). Na rozdíl od dobře charakterizovaného enzymu NO synthasy (NOS)

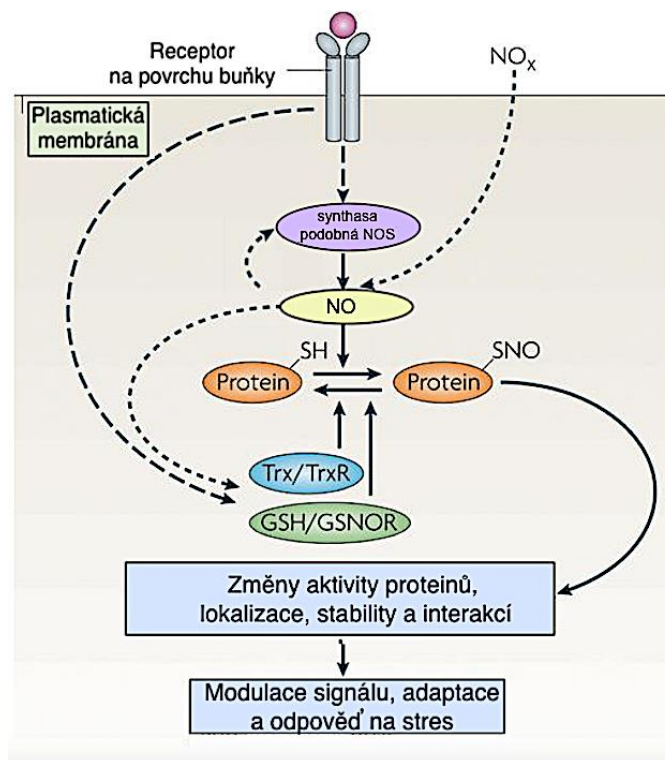
2.3.3 Význam a funkce oxidu dusnatého

V živočišných systémech má oxid dusnatý (NO) důležitou roli jako neurotransmitter a podílí se na regulaci imunitních odpovědí nebo svalové relaxaci (Gupta *et al.*, 2011). U bakterií NO indukuje geny podílející se na ochraně před oxidačním stresem a působí jako signál při patogenezí a rezistenci vůči patogenům (Sudhamsu a Crane, 2009). U rostlin je NO klíčovou signální molekulou, která se všudypřítomně podílí na regulaci rozmanitého spektra fyziologických, vývojových a biochemických procesů v rostlinách (Asgher *et al.*, 2017). Je také známo, že se NO podílí na regulaci četných odpovědí rostlin na různé abiotické a biotické stresové podmínky (Qiao a Fan, 2008). Tak jako jiné molekuly volných radikálů závisí biologický účinek NO na buněčné koncentraci a na místu produkce (Asgher *et al.*, 2017). Při nízkých koncentracích NO působí jako signální molekula. Mezi procesy, u nichž je prokázáno, že jsou regulovány NO, patří klíčení semen, růst kořenů, dýchání, uzavírání stomat a adaptivní reakce na biotické a abiotické stresy, např. sucho, teplo, chlad, salinita nebo působení těžkých kovů (Gupta *et al.*, 2011; Mutlu a Yürekli, 2015). V případě, že koncentrace NO v rostlině výrazně vzroste na dostatečně vysokou hladinu, může docházet k indukci tzv. nitrosačního stresu, následkem kterého dochází k poškození rostlinných buněk (Asgher *et al.*, 2017).

2.3.4 Regulace hladiny oxidu dusnatého v rostlinných buňkách

Biosyntéza, degradace a interakce NO s reaktivními partnery jsou kriticky důležitými mechanismy pro regulaci hladin NO v rostlinných buňkách v ustáleném stavu (Kolbert *et al.*, 2019). Poté co je NO generováno, může interagovat s jinými redoxními molekulami a potenciálně regulovat biologickou aktivitu proteinů prostřednictvím řady různých mechanismů (Fancy *et al.*, 2017). Jedním z těchto mechanismů je reakce NO se zástupcem ROS (superoxidovým radikálem) za vzniku peroxinitritu (ONOO⁻) (Beckman *et al.*, 1990). Tvorba peroxynitritu může vést k nitraci tyrosinových residuí proteinů. Jedná se o nevratný dvoustupňový proces posttranslační modifikace, během kterého se nitroskupina NO₂ váže na aromatický kruh tyrosinu v poloze *ortho*, což vede k tvorbě 3-nitrotyrosinu (Souza *et al.*, 2008). V důsledku vazby NO₂ na tyrosin může dojít ke změnám konformace modifikovaných proteinů a následnému ovlivnění jejich biologické aktivity. Nitrace snižuje možnost fosforylace tyrosinu, což může ovlivnit přenos informací v řadě signálních drah v rostlinných buňkách (Hnízdová *et al.*, 2009). Dalším mechanismem je S-nitrosylace. Jedná se o reverzibilní kovalentní připojení

skupiny NO k thiolovému bočnímu řetězci (-SH) cysteinu za vzniku S-nitrosothiolu s nízkou molekulovou hmotností, jako je S-nitrosocystein nebo S-nitrosoglutathion (Obr. 4) (Hogg, 2000; Benhar *et al.*, 2009; Spadaro *et al.*, 2010). S-nitrosylace je mechanismus posttranslační modifikace při kterém dochází k modifikaci aktivity proteinů, změně jejich lokalizace nebo interakce (Lamotte *et al.*, 2015).



Obr. 4 Mechanismus a následky reverzibilní S-nitrosylace. Oxid dusnatý (NO), který je tvořen především synthasou podobnou NOS, nebo vyššími oxidy dusíku (NO_x) mohou reagovat v přítomnosti elektronových akceptorů s proteinovými thioley za vzniku S-nitrosylovaných proteinů (SNO proteinů). Enzymová denitrosylace SNO proteinů je zprostředkována jedním ze dvou enzymových systémů: systém S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR), který obsahuje glutathion (GSH) a systém thioredoxinreduktasy (TrxR), který obsahuje thioredoxin (Trx). Signály iniciované receptory buněčného povrchu mohou regulovat aktivitu synthasy podobné NOS a denitrosylas, které určují rovnováhu mezi S-nitrosylací a denitrosylací proteinu (převzato z Benhar *et al.*, 2009).

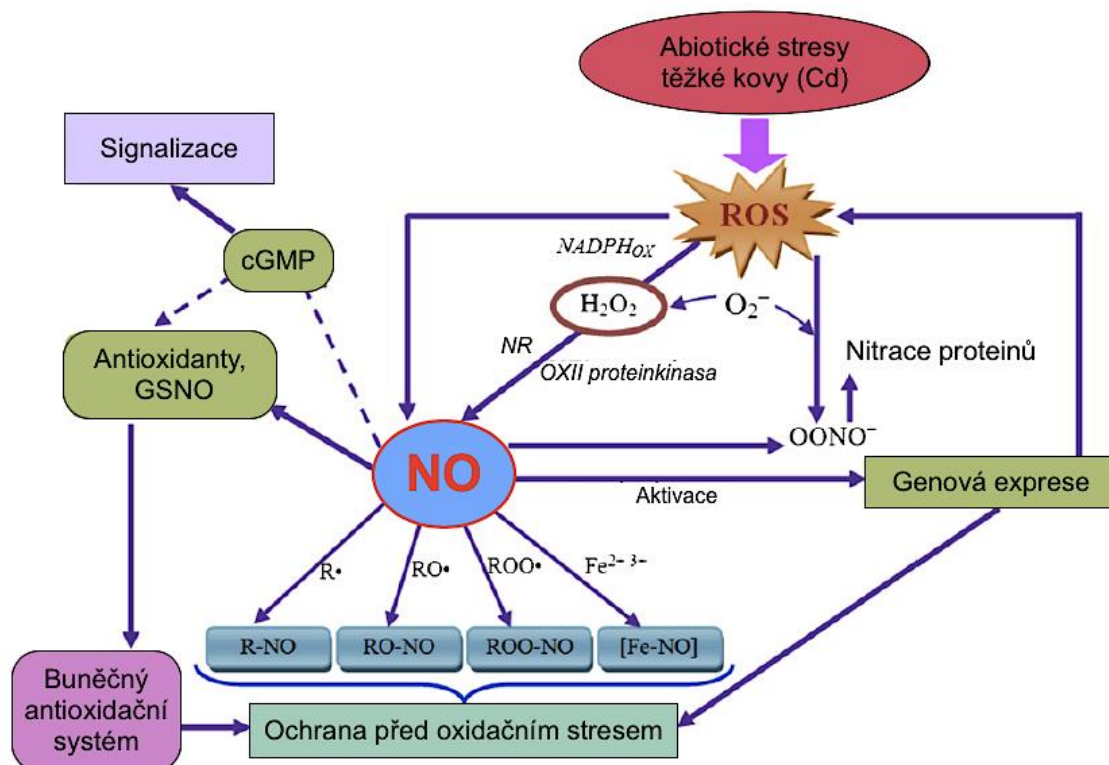
Nejhojněji zastoupeným S-nitrosothiolem je S-nitrosoglutathion (GSNO), který je generován S-nitrosylační reakcí NO s glutathionem (GSH) (Hasanuzzaman *et al.*, 2018). Kromě toho, že se jedná o intracelulární rezervoár NO, může být GSNO transportován mezi buňkami, a tudíž mít funkci přenašeče signálu NO na velké vzdálenosti (Cassia *et al.*, 2018). Hladina GSNO v buňce má vliv na stupeň nitrosylace proteinů a peptidů, čímž ovlivňuje funkci a aktivitu různých enzymů a transkripčních faktorů. *In vivo* je hladina GSNO řízena enzymem GSNOR, alkoholdehydrogenasou třídy III, známou také jako formaldehyddehydrogenasa závislá na glutathionu. Tento enzym zprostředkovává

redukcí GSNO na glutathion sulfinamid za využití kofaktoru NADH. Následně dochází ke spontánní chemické přeměně, která vede k různým produktům, včetně glutathion disulfidu (GSSG), hydroxylaminu (NH₂OH), kyseliny glutathion sulfinové (GSO₂H) a amoniaku (NH₃) (Gupta *et al.*, 2011). GSNOR se podílí na aktivaci antioxidantního systému, regulaci tvorby ROS a RNS, buněčném redoxním stavu, stimulaci genů reagujících na stresové podmínky a programované buněčné smrti vyvolané stresem (Tichá *et al.*, 2017b; Cheng *et al.*, 2018). Dalším enzymem podílejícím se na regulaci hladiny GSNO je thioredoxinreduktasa (TrxR, EC 1.6.4.5) (Cassia *et al.*, 2018).

2.3.5 Oxid dusnatý a působení těžkých kovů na rostliny

Bylo prokázáno, že Cd, jeden z nejvíce toxických prvků vyskytujících se ve vnějším prostředí, interferuje s oxidem dusnatým, multifunkční signální molekulou v živých organismech. Bylo také zjištěno, že u rostlin vystavených působení těžkého kovu Cd dochází *in vivo* ke zvýšené tvorbě NO. Za běžných fyziologických podmínek je hladina a lokalizace ROS a produkce NO v buňce vyvážená, což usnadňuje následné signalizační procesy nebo posttranslační modifikace. V rostlinách vystavených působení kadmia dochází na buněčné úrovni k akumulaci ROS, čímž se zvyšuje riziko oxidačního stresu u rostlin. Následkem je narušení enzymového a neenzymového antioxidantního systému. Zároveň se jeví jako pravděpodobné, že dochází ke změnám v produkci syntézy NO, což vede k nerovnováze mezi ROS a NO (Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2011). Je zajímavé, že interakce ROS/NO může být cytotoxická nebo ochranná v závislosti na relativních koncentracích ROS a NO (Beligni a Lamattina, 1999). Všeobecně je známo, že NO chrání rostlinné buňky před oxidačním stresem. Tato ochranná funkce NO je zajištěna (1) reakcí s lipidovými radikály, která zastavuje šíření peroxidace lipidů; (2) vychytáváním O₂⁻ a ONOO⁻, čímž se neutralizují další buněčné procesy; (3) aktivací antioxidantních enzymů, např. superoxiddismutasy (SOD, EC 1.15.1.1), katalasy (CAT, EC 1.11.1.6), askobátperoxidasy (APX, EC 1.11.1.11), guajakolperoxidasy (GPX, EC 1.11.1.7) a glutathionreduktasy (GR, EC 1.6.4.2) a (4) funkcí NO jako signální molekuly v kaskádě reakcí vedoucích ke změnám v genové expresi při stresu vyvolaném působením těžkých kovů (Obr. 5) (Gill *et al.*, 2009; Hao a Zhang, 2010; Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Dosud publikované výsledky naznačují intenzivní vzájemnou komunikaci mezi NO, ROS a dalšími molekulami, které by mohly být zapojeny do buněčné signalizace

při stresu vyvolaném Cd, jako jsou polyaminy (PA), kyselina jasmonová (JA), kyselina salicylová (SA) a ethylen (ET) (Groppa *et al.*, 2008; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2009).

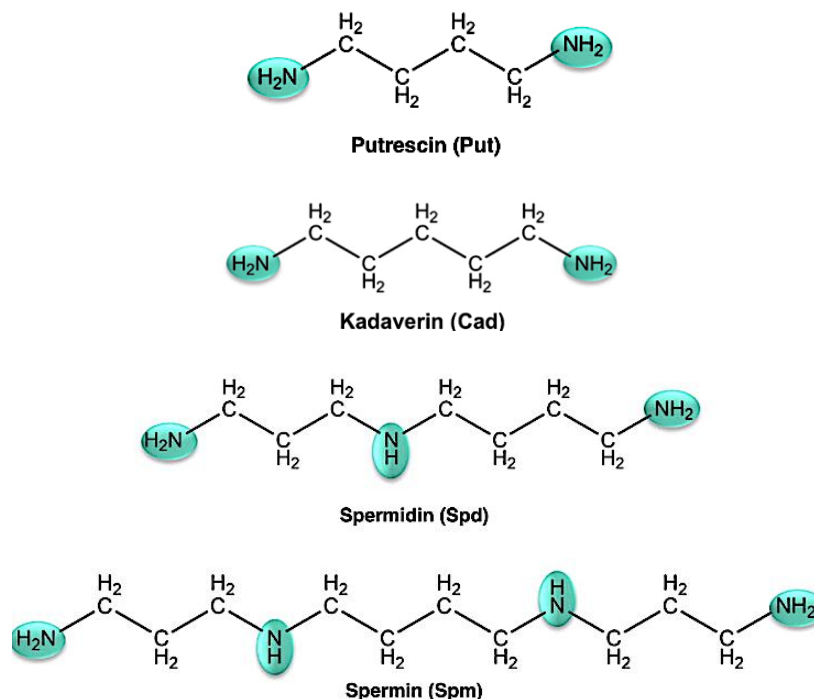


Obr. 5 Možné mechanismy ochrany rostlin vystavených abiotickému stresu působení těžkých kovů (Cd) prostřednictvím NO (převzato z Gill *et al.*, 2013).

2.4 Role polyaminů v obranných mechanismech u rostlin

2.4.1 Polyaminy

Polyaminy (PA) jsou alifatické organické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, které obsahují variabilní uhlovodíkové řetězce se dvěma nebo více primárními aminoskupinami (NH_2) (Takahashi a Kakehi, 2010; Vuosku *et al.*, 2018). PA se vyskytují ve formě volné nebo jako konjugáty vázané na fenolové kyseliny a jiné sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností nebo na makromolekuly, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny (Rady *et al.*, 2019). Schopnost interakce PA s proteiny a nukleovými kyselinami, membránovými fosfolipidy a složkami buněčných stěn je umožněna v důsledku polykationtové povahy PA při fyziologických hodnotách pH (Mutlu a Yürekli, 2015). Mezi nejběžněji se vyskytující volné PA řadíme diamin putrescín (Put), diamin kadaverin (Cad), triamin spermidin (Spd) a tetraamin spermin (Spm) (Obr. 6) (Wimalasekera *et al.*, 2011; Jastrzab *et al.*, 2017).



Obr. 6 Strukturní vzorce biogenních polyaminů (převzato z Jastrzab *et al.*, 2017).

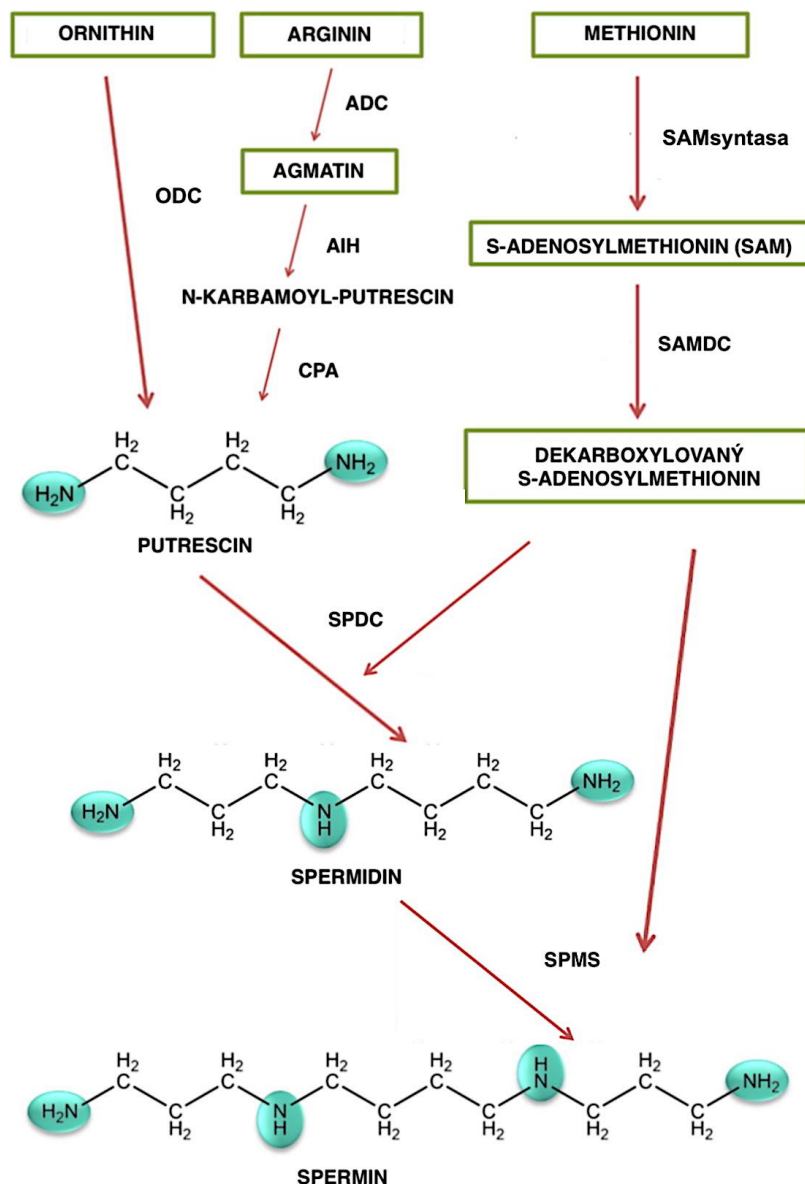
2.4.2 Význam a funkce polyaminů u rostlin

PA jsou všudypřítomné ve všech živých organismech (Wimalasekera *et al.*, 2011). Z důvodu polykationtové povahy PA, která umožňuje vazbu a stabilizaci aniontových makromolekul v buňce, se zpočátku předpokládalo, že jsou biologické funkce PA pouze strukturální (Anwar *et al.*, 2015; Pegg, 2016). Pozdější studie však odhalily účast PA na celé řadě vývojových a fyziologických procesů, jako jsou např. regulace buněčné proliferace, somatická embryogeneze, diferenciace, morfogeneze a stárnutí, transkripční a translační regulace, genová exprese, homeostáza a signální transdukce (Kusano *et al.*, 2007; Kusano *et al.*, 2008; Takahashi a Kakehi, 2010; Anwar *et al.*, 2015; Pegg, 2016). Je také známo, že PA zvyšují toleranci rostlin vůči působení různých environmentálních stresů, jako je salinita, chlad, sucho, včetně působení těžkých kovů (Liu *et al.*, 2007; Wimalasekera *et al.*, 2011). Kromě toho mohou PA zachytávat reaktivní formy kyslíku (ROS) a další volné radikály a stimulovat antioxidační obranný systém u rostlin (Ha *et al.*, 1998; Kubiš, 2008). PA také zvyšují expresi genů kódující antioxidační enzymy (Wang *et al.*, 2010). Vzhledem k silné antioxidační kapacitě jsou PA klíčové při omezení rozsahu poškození biologických makromolekul zprostředkovaného oxidačním stresem (Alcázar *et al.*, 2010).

2.4.3 Biosyntéza polyaminů

Biosyntéza polyaminů je zahájena dekarboxylací aminokyselin ornithinu, argininu a lysinu. K syntéze spermidinu (Spd) a sperminu (Spm) je využito aminopropylové části methioninu (Bagni a Tassoni, 2001). K biosyntéze putrescinu (Put) v rostlinných buňkách dochází dvěma odlišnými cestami: buď přímo dekarboxylací ornithinu prostřednictvím ornithindekarboxylasy (ODC; EC 4.1.1.17) nebo nepřímo dekarboxylací argininu pomocí arginindekarboxylasy (ADC; EC 4.1.1.19) (Obr. 7) (Wimalasekera *et al.*, 2011). Biosyntéza Put dráhou ADC je následována dvěma po sobě jdoucími kroky katalyzovanými agmatiniminohydrolasou (AIH; EC 3.5.3.12), kdy nejprve dojde k transformaci agmatinu na N-karbamoylputrescin a poté pomocí N-karbamoylputrescinaminohydrolasy (CPA; EC 3.5.1.53) na putrescin (Obr. 7) (Bagni a Tassoni, 2001; Wimalasekera *et al.*, 2011; Jastrzab *et al.*, 2017).

Triaminový spermidin (Spd) a tetraaminový spermin (Spm) se vytváří postupným přidáváním aminopropylových skupin k Put a Spd v reakcích katalyzovaných spermidinsynthasou (SPDS; putrescinaminopropyltransferasa; EC 2.5.1.16) a sperminsynthasou (SPMS; spermidinaminopropyltransferasa; EC 2.5.1.22). Aminopropylové skupiny se vytvářejí dekarboxylací S-adenosylmethioninu (SAM) katalyzovanou S-adenosylmethionindekarboxylasou (SAMDC; EC 4.1.1.50) (Obr. 7) (Slocum *et al.*, 1984).

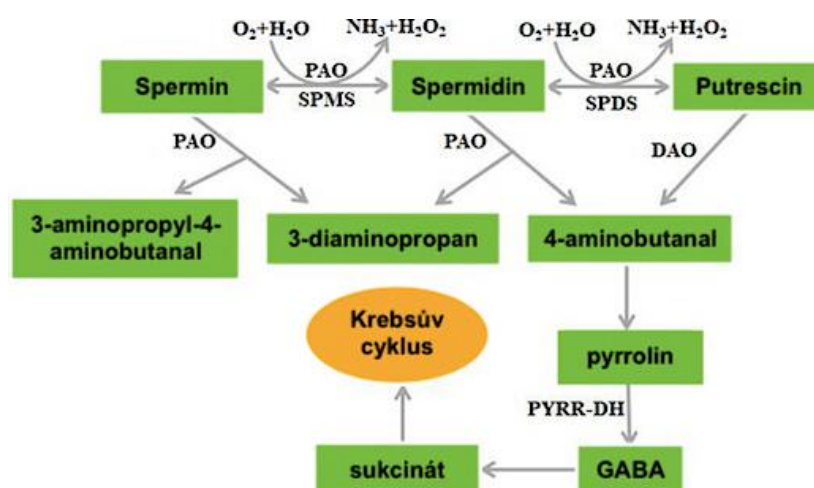


Obr. 7 Schéma drah biosyntézy hlavních rostlinných polyaminů. ADC: arginindekarboxylasa; AIH: agmatininohydrolasa; CPA: N-karbamoylputrescinaminohydrolasa; ODC: ornithindekarboxylasa; SPDS: spermidinsynthasa; SPMS: sperminsynthasa; SAMsyntasa: S-adenosylmethioninsynthasa; SAMDC: S-adenosylmethionindekarboxylasa (převzato z Jastrzab *et al.*, 2017).

Schopnost biosyntézy Put prostřednictvím dvou alternativních cest je připisována potřebě specifického řízení různých funkcí v růstu a vývoji rostlin (Koetje *et al.*, 1993). Předpokládá se, že syntéza Put ODC dráhou je významná v souvislosti s dělením rostlinných buněk (Acosta *et al.*, 2005), kdežto ADC dráha je důležitá ve stresových odpovědích a v morfologických procesech (Gemperlová, 2009). Důležité je také zdůraznit, že řada abiotických a biotických stresových faktorů silně reguluje expresi genů podílejících se na biosyntéze polyaminů (Wimalasekera *et al.*, 2011).

2.4.4 Katabolismus polyaminů

Katabolismus polyaminů probíhá oxidační deaminací za pomoci enzymů aminooxidás, které převádějí biogenní polyaminy na odpovídající aminoaldehyd. U rostlin rozlišujeme dvě skupiny těchto enzymů: měď vázající diaminooxidasy (DAO; EC 1.4.3.6) a flavin vázající polyaminooxidasy (PAO; EC 1.5.3.11) (Bouchereau *et al.*, 1999). Některé izoformy PAO se také účastní zpětné přeměny sperminu na spermidin nebo putrescin (Moschou *et al.*, 2008). V rostlinách se degradační produkty polyaminového katabolismu dále metabolizují NAD⁺ dependentními aminoaldehyddehydrogenasami (AMADH, EC 1.2.1.19 nebo EC 1.2.1.54) na aminokyseliny, například 1-amino-3,3-diethoxypropan (APAL) a 4-aminobutyraldehyd (ABAL) na β-alanin a kyselinu γ-aminomáselnou (GABA) (Awal *et al.*, 1997). Při oxidaci putrescinu vzniká pyrrolin, H₂O₂ a amoniak (Gill a Tuteja, 2014). Poté následuje přeměna pyrrolinu na GABA, která je finálně přeměněna na kyselinu jantarovou, která je součástí Krebsova cyklu (Obr. 8) (Eller *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2019).



Obr. 8 Schéma dráhy katabolismu rostlinných polyaminů. PAO: polyaminooxidasa; DAO: diaminooxidasa; SPMS: sperminsynthasa; SPDS: spermidinsynthasa, PYRR-DH: pyrrolindehydrogenasa (převzato z Chen *et al.*, 2019).

Tyto oxidační dráhy mohou ovlivnit homeostázu polyaminů a modulovat hormonální signalizaci a redoxní stav, a tím udělit ochrannou roli ve stresových podmínkách (Aziz *et al.*, 1999; Moschou *et al.*, 2008; Pál *et al.*, 2015). Homeostáze polyaminů může být také ovlivněna nerovnováhou mezi aktivací biosyntetických a oxidačních drah ve stresových podmínkách, což vede k nadbytku nebo nedostatku polyaminů a způsobuje náchylnost ke stresu (Aziz *et al.*, 1999; Nambeesan *et al.*, 2012; Hatmi *et al.*, 2015).

Oxidace polyaminů je signálním mechanismem jak při adaptaci na abiotický stres, tak při reakci na odolnost vůči chorobám. Vedlejší produkt katabolismu polyaminů H_2O_2 se podílí na zvýšené hladině ROS v důsledku působení stresových faktorů. Schopnost produkce ROS má významnou funkci v rámci obranných mechanismů rostlin a je úzce spjata i se zlepšenou odolností rostlin vůči patogenům a tolerancí vůči abiotickému stresu. Vytvořený H_2O_2 může indukovat expresi různých obranných nebo stresově reagujících genů. Peroxid vodíku se také podílí na programované buněčné smrti, taktéž na otevírání stomat a používá se k zesíťování a zrání buněčné stěny peroxidasami (Hatmi *et al.*, 2018).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Rostlinný materiál

V experimentální části diplomové práce byly použity dva genotypy hrachu setého (*Pisum sativum*), které se liší rezistencí vůči patogenům.

- *P. sativum* cv. Kudrnáč – citlivý genotyp
- *P. sativum* cv. Twinset – rezistentní genotyp vůči padlí, fusariovému vadnutí a viru hrachové mozaiky PSbMV (Pea Seed-borne Mosaic Virus)



Obr. 9 Genotypy hrachu setého: A) *Pisum sativum* cv. Kudrnáč B) *Pisum sativum* cv. Twinset

3.1.2 Chemikálie

Analytika spol. s.r.o. (Česká republika): Metranal®3 (jahodové listí), Metranal®8 (zelená řasa), peroxid vodíku p.a.⁺, vodný kalibrační roztok pro prvek kadmium

AppliChem (Německo): dodecylsírán sodný (SDS)

Bio-Rad (USA): Precision Plus Protein Dual Xtra Standard

Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo): albuminová frakce V, Tween-20, 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát (BCIP), redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu (NADH)

Enzo Life Sciences (Česká republika): aminofenylfluorescein (APF)

Honeywell Fluka (Rumunsko): askorbát sodný, diethyl ether, dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na⁺ EDTA), dimethylformamid (DMF), chlorid kademnatý, methylmethanthiosulfonát (MMTS), pefabloc[®] SC

Lach-Ner (Česká republika): ethanol, glycelor, hydroxid sodný, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methanol, peroxid vodíku

Merck KGaA (Německo): kyselina dusičná 69% Suprapur[®]

SERVA Electrophoresis GmbH (Německo): 4-(2-aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF), azid sodný, křenová peroxidasa, Triton X-100

Sigma-Aldrich (Německo): aceton, akrylamid (AA), 1-amino-3,3-diethoxypropan (APAL), 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein (DAF-FM), 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceindiacetát (DAF-FM DA), benzoylchlorid, bromfenolová modř, diaminobenzidin (DAB), diaminohexan (DAH), dihydrochlorid putrescinu, dithiotreitol (DTT), fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), glycin, hovězí sérový albumin (BSA), hydroxyfenylfluorescein (HPF), chlorid hořečnatý, kyselina mravenčí, kyselina trichloroctová (TCA), merkaptoethanol, 2-methoxyfenol (guajakol), N,N'-metylenbisakrylamid (BIS), *n*-butanol, neocuproin, nitrotetrazoliová modř (NBT), oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu (NAD⁺), persíran amonný (APS), poly(vinylpolypyrrolidon) (PVPP), Ponceaus S, protilátka anti-AMADH2 (králičí), protilátka anti-biotin značená alkalickou fosfatasou (myší), sekundární protilátka anti-králičí značená alkalickou fosfatasou, sušené mléko (Skim milk Powder), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

Thermo Fisher Scientific (USA): 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H₂DCF-DA), EZ-Link[™] HPDP-Biotin

Unilever (Česká republika): SAVO

3.1.3 Přístroje a vybavení

Analytické předvážky (Radwag, Polsko); analytické váhy (Denver instrument, USA); automatické pipety (Eppendorf, Německo); blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA); blotovací systém Trans-Blot SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad, USA); centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo); detekční zařízení Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA);

digitální pH metr (XS Instruments, Itálie); digitální předvážky (KERN, Německo); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (BioSan, Litva); exsikátor (Kavalierglass, Česká republika); kolonky NAP-5 (GE Healthcare, USA); mikrodestičkový reader PowerWave XS (BioTek Instruments, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikroskop Olympus BX 50 (OLYMPUS, Japonsko); mikrovlnný rozkladný systém MLS 1200 mega (Milestone, Itálie); nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA); ORS-ICP-MS 7700x (Agilent Technologies, Japonsko); oscilační homogenizátor MM400 (Retsch, Německo); rotační koncentrátor Concentrator plus (Eppendorf, Německo); rotátor Grant Bio PTR-30 (Keison Products, Anglie); teflonové mineralizační kelímky s víčky; termostat (BioSan, Litva); třepačka 3D (BioSan, Litva); vortex (BioSan, Litva); zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava rostlinného materiálu

Semena jednotlivých genotypů hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) byla sterilizována za využití 3% (v/v) roztoku Sava Original po dobu 2 minut. 10× vodou propláchnutá semena byla namočena ve vodě po dobu 24 h. Následně nabobtnaná semena byla rozmístěna na čtvercové Petriho misky obsahující navlhčené filtrační papíry a ponechána klíčit po dobu 3 dnů při teplotě 25 °C. Po naklíčení semen byly rostliny pěstovány 7 dní ve fytotronu při 25 °C v ¼ Hoaglandově roztoku (Tab. 3). Koncentrace CdCl₂ v růstovém médiu byla 0, 1, 10 a 50 µmol·l⁻¹ CdCl₂. Finálním krokem přípravy rostlinného materiálu byl odběr nadzemní a kořenové části rostliny, zamrazení rostlinného materiálu pomocí tekutého dusíku a uchování materiálu pro následné zpracování v mrazáku při -80 °C. V případě mikroskopických technik a stanovení produkce NO a H₂O₂ byl rostlinný materiál zpracován ihned po odběru.

Tab. 3 Příprava Hoaglandova roztoku. KNO₃: dusičnan draselný; Ca(NO₃)₂·4H₂O: tetrahydrát dusičnanu vápenatého; NH₄H₂PO₄: dihydrogenfosforečnan amonný; MgSO₄·7H₂O: heptahydrát síranu hořečnatého; H₃BO₃: kyselina boritá; KCl: chlorid draselný; MnSO₄·5H₂O: pentahydrát síranu manganatého; ZnSO₄·7H₂O: heptahydrát síranu zinečnatého; CuSO₄·5H₂O: pentahydrát síranu měďnatého; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O: tetrahydrát molybdenanu amonného; FeSO₄·7H₂O: heptahydrát síranu železnatého; Na₂EDTA: sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové; FeEDTA: železitá sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové.

Chemická látka	Koncentrace zásobního roztoku [mmol·l ⁻¹]	Molekulová hmotnost [g·mol ⁻¹]	Objem [ml·l ⁻¹]	Výsledná koncentrace [μmol·l ⁻¹]
KNO ₃	1000	101,1	1,5	1500
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1000	236,16	1	1000
NH ₄ H ₂ PO ₄	1000	115,08	0,5	500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1000	246,49	0,25	250
H ₃ BO ₃	25	61,84	0,5	12,5
KCl	50	74,5	1	50
MnSO ₄ ·5H ₂ O	2	241,08		2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	287,55		2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5	249,75		0,5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,5	1235,95		0,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	20	278,02	1	20
Na ₂ EDTA				
	20	372,24		20

3.2.2 Zpracování rostlinného materiálu

Z rostlin uchovávaných při -80 °C (nadzemní a kořenové části) byl připraven směsný vzorek (z 3–5 rostlin) homogenizací za pomoci tekutého dusíku v třecí misce do podoby jemného prášku. Takto připravené rostlinné vzorky byly rozděleny do mikrozkuvek po 300 mg a uchovávány v mrazícím boxu při -80 °C pro další zpracování. K extrakci vzorků byl využit extrakční pufr s následujícím složením: 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátový pufr, pH 7; 1% (w/v) PVPP; 2 mmol·l⁻¹ DTT; 0,5 mmol·l⁻¹ pepabloc; 2 mmol·l⁻¹ EDTA. Extrakce byla provedena v poměru 1:2 (w/v). Homogenát byl vortexován po dobu 2 minut a následně ponechán 20 minut na rotátoru v chladícím boxu pro dokonalé promíchání rostlinného vzorku s extrakčním pufrem. Poté následovala centrifugace vzorků 20 minut při 16 000 g a teplotě 4 °C.

3.2.3 Stanovení obsahu kadmia v hrachu setém

Pro stanovení obsahu kadmia v rostlinách byly využity nadzemní a kořenové části 10–15 rostlin po lyofilizaci. Stanovení bylo realizováno ve 3 biologických opakováních. K přípravě rostlinných vzorků byl použit mikrovlnný rozkladný systém MLS 1200 mega, který využívá pro rozklad vzorku zvýšené teploty a tlaku. Tento systém umožňuje současně přípravu až 6 rostlinných vzorků ve speciálních teflonových kelímcích s víčky. Rostlinné vzorky v teflonových kelímcích byly zváženy. Poté bylo do teflonových kelímků přidáno 5 ml 69% kyseliny dusičné a 1 ml peroxidu vodíku. Následovalo umístění připravených rostlinných vzorků v teflonových kelímcích do přístroje. K rozkladu byl využit rozkladný program, který je popsán v tabulce (Tab. 4).

Tab. 4 Rozkladný program využitý k přípravě vzorků za pomoci mikrovlnného rozkladného systému MLS 1200 mega.

Krok číslo	Čas [min]	Výkon [W]
1	2	250
2	2	0
3	5	400
4	2	0
5	2	500
6	2	0
7	6	600

Po dokončení rozkladného programu byly teflonové kelímky vyjmuty z přístroje a ponechány vychladnout. Získaný obsah z teflonových kelímků byl přenesen do předem zvážených a označených 15 ml zkumavek. Naplněné zkumavky byly zváženy pro stanovení přesné hmotnosti získaného vzorku. Pro stanovení obsahu kadmia v připravených rostlinných vzorcích a certifikovaných referenčních materiálech (jahodové listí a zelená řasa) byl využit přístroj ORS-ICP-MS 7700x. Pro přípravu kalibračních roztoků byl použit vodný kalibrační roztok pro prvek kadmium. Kalibrační řada byla stanovena v rozmezí 0–1000 ppb (0, 1, 50, 100, 500, 1000 ppb).

3.2.4 Stanovení fyziologických parametrů rostlin

U 7denních rostlin obou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset byla stanovena průměrná délka nadzemní a kořenové části (vyhodnoceno vždy 30 rostlin v 5 biologických opakováních). Byla stanovena průměrná hmotnost čerstvého materiálu (FW) nadzemní a kořenové části a po lyofilizaci rostlinného materiálu byla stanovena průměrná hmotnost suchého materiálu (DW) (vyhodnoceno 10–15 rostlin

ve 3 biologických opakováních). Pro stanovení průměrného počtu postranních kořenů byly vyhodnoceny 3 rostliny ve 3 biologických opakováních.

Tolerance dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset na přítomnost Cd^{2+} byla vypočtena jako index tolerance (TI), který udává procento hmotnosti čerstvého (FW_t), resp. suchého materiálu (DW_t), resp. délky (L_t) kořenové a nadzemní části rostlin pěstovaných v přítomnosti CdCl_2 o různých koncentracích (1, 10 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) oproti kontrolním rostlinám (FW_c , resp. DW_c , resp. L_c) podle následující rovnice dle metodiky uvedené v práci Metwally *et al.* (2005):

$$TI [\%] = \frac{\text{FW}_t}{\text{FW}_c} \times 100 - 100$$

3.2.5 Stanovení proteinů metodou Bradforda

Metoda stanovení proteinů dle Bradforda využívá vazbu barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein. Toto barvivo existuje ve dvou různých barevných formách. Červená forma barviva se po navázání na bílkovinu přemění na modrou formu, což způsobuje posun absorpčního maxima barviva z 465 na 595 nm (Bradford, 1976).

Stanovení proteinů metodou Bradforda bylo provedeno spektrofotometricky za využití readeru PowerWave XS v 96-ti jamkových mikrodestičkách. Měření probíhalo při vlnové délce 595 nm. Do jednotlivých jamek mikrodestičky bylo pipetováno 45 μl destilované vody, 5 μl standardu BSA/vzorku a 200 μl Bradfordova činidla, tzn. zásobní roztok Coomassie Blue naředěn destilovanou vodou v poměru 1:4 (zásobní roztok Coomassie Brilliant Blue: 50 mg CBB G-250; 25 ml 95% methanolu; 50 ml 85% kyseliny fosforečné). Následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Pro kalibraci byly využity standardy hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci: 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7 - 0,8 - 0,9 - 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorky byly měřeny ve dvojím technickém opakování.

3.2.6 Stanovení vlivu Cd^{2+} v médiu na obsah polyaminů

Klasické analytické metody detekce polyaminů v rostlinách jsou založeny na chromatografických metodách. Pro kvantifikaci polyaminů jsou využívány především techniky založené na chromatografické separaci pomocí HPLC s předkolonovou nebo pokolonovou derivatizací. Jednou z nejvyužívanějších metod pro determinaci polyaminů je stanovení benzoylederivátů. Metoda využívá principu reakce primárních aminoskupin

polyaminů s benzoylchloridem v alkalickém prostředí. Benzoylderiváty vzniklé touto reakcí následně absorbují záření v ultrafialové oblasti s maximy při vlnové délce 224 a 254 nm (Sánchez-López *et al.*, 2009).

Pro stanovení vlivu Cd^{2+} na obsah polyaminů bylo použito 5 mg lyofilizované nadzemní a kořenové části rostlinného materiálu pěstovaného v přítomnosti rozdílných koncentrací CdCl_2 (0, 1, 10, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) dvou genotypů hrachu setého. K 5 mg rostlinného materiálu bylo přidáno 250 μl 5% kyseliny trichloroctové s přídavkem 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ diaminohexanu (DAH) a 5 skleněných kuliček (3 mm) nutných k následné homogenizaci s frekvencí třepání 27 Hz po dobu 5 minut. Zhomogenizované vzorky byly sonikovány 10 minut při teplotě 25 °C. Poté byla provedena centrifugace 10 minut při 12 400 g. Supernatant byl kvantitativně přenesen do čistých zkumavek, do kterých bylo přidáno pro determinaci volných polyaminů 500 μl 2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH a 2,5 μl benzoylchloridu. Po 5 s vortexování vzorků byla reakční směs ponechána 40 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 500 μl saturovaného roztoku NaCl. Benzoylované polyaminy byly extrahovány 2× po 500 μl diethyl etheru. Vytvořená etherová vrstva v jednotlivých vzorcích byla přenesena do čistých zkumavek, které byly vloženy do rotačního koncentrátoru na 30 minut při 60 °C pro odpaření etheru. Takto připravené vzorky byly rozpuštěny v 250 μl 0,5% kyseliny mravenčí a ponechány sonikovat 10 minut při teplotě 25 °C. Poté proběhla centrifugace 10 minut při 16 000 g. Supernatanty jednotlivých vzorků byly přeneseny po 70 μl do skleněných vialek k analýze na přístroji UHPLC-MS.

3.2.7 Stanovení aktivity diaminooxidasy

Diaminooxidasa (DAO) katalyzuje oxidaci alifatického diaminu putrescinu na aminoaldehyd za současného uvolňování peroxidu vodíku. Ten je využit peroxidasou k oxidaci guajakolu za vzniku 3,3'-dimethoxyfenyl-4,4'-bifenochinonu. Při této reakci dochází ke vzniku žlutohnědě zbarveného produktu, který lze detekovat spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm ($\epsilon = 4\,500\ \text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Smith a Barker, 1989).

Aktivita enzymu DAO byla měřena spektrofotometricky za využití readeru PowerWave XS v 96-ti jamkových mikrodestičkách. Měření probíhalo při 30 °C a vlnové délce 436 nm. Do jednotlivých jamek mikrodestičky bylo pipetováno 155 μl reakční směsi s následujícím složením: 15 ml 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru, pH 7; 250 μl 35 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ guajakolu a 250 μl 0,01% (w/v) křenové peroxidasy. Následovalo přidání

15 μl čerstvě připraveného rostlinného extraktu (kapitola 3.2.2). Pro zahájení reakce bylo do jednotlivých jamek přidáno 5 μl 87,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu. Do jamek pro blank bylo místo 5 μl 87,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu pipetováno 5 μl destilované vody. Jednotlivá stanovení probíhala v technickém triplikátu, kdy každý vzorek měl vlastní blank. Byl zaznamenán nárůst absorbance při vlnové délce 436 nm v průběhu 2 minut v časových intervalech 10 s. Celkové stanovení aktivity DAO bylo provedeno v pěti biologických opakováních.

3.2.8 Stanovení aktivity aminoaldehyddehydrogenasy

V rostlinách je degradační produkt polyaminového katabolismu 1-amino-3,3-diethoxypropan (APAL) oxidován NAD^+ dependentní aminoaldehyddehydrogenasou (AMADH, EC 1.2.1.19) na β -alanin za současné redukce NAD^+ na NADH (Awal *et al.*, 1997). Produkci NADH lze detekovat spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm ($\epsilon = 6\,220\ \text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Aktivita enzymu AMADH byla měřena spektrofotometricky za využití readeru PowerWave XS v 96-ti jamkových mikroleštičkách. Měření probíhalo při 30 °C a vlnové délce 340 nm. Do jednotlivých jamek mikroleštičky bylo pipetováno 165 μl reakčního pufru (150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 9), 10 μl 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD^+ (vždy čerstvě připraveno) a 15 μl čerstvě připraveného rostlinného extraktu (kapitola 3.2.2). Pro zahájení reakce bylo do jednotlivých jamek přidáno 10 μl 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ APAL (vždy čerstvě připraveno). Do jamek pro blank bylo místo 10 μl 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ APAL pipetováno 10 μl 0,2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl. Jednotlivá stanovení probíhala v technickém triplikátu, kdy každý vzorek měl vlastní blank. Byl zaznamenán nárůst absorbance při vlnové délce 340 nm v průběhu 10 minut v časových intervalech 30 s. Celkové stanovení aktivity AMADH bylo provedeno v pěti biologických opakováních.

3.2.9 Detekce aminoaldehyddehydrogenasy metodou Western blot

Pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů se používá denaturační polyakrylamidová elektroforéza proteinů, při které jsou proteiny separovány v denaturovaném stavu. Vliv různého náboje je neutralizován pomocí dodecylsiranu sodného (SDS), který se na proteiny váže v poměru 1,4 mg SDS/1 mg proteinu. Proteiny tak získávají přibližně stejnou hustotu náboje a v polyakrylamidovém gelu s vhodnou velikostí pórů se dělí podle své molekulové hmotnosti. Malé proteiny cestují polyakrylamidovým gelem rychleji,

zatímco proteiny o velké molekulové hmotnosti se pohybují směrem k anodě pomaleji (Laemmli, 1970). Western blotting je analytická metoda, která se využívá k přenosu proteinů po rozdělení SDS elektroforézou na vhodnou membránu.

Skla pro přípravu gelů pro elektroforézu byla omyta 96% ethanolem pro odstranění veškerých nečistot. Takto připravená skla byla vložena do aparatury pro přípravu gelů. Následovala příprava 10% dělicího polyakrylamidového gelu podle postupu uvedeného v tabulce (Tab. 5) a nanesení připraveného roztoku gelu do prostoru mezi skla. Povrch polyakrylamidového gelu byl ihned převrstven *n*-butanolem pro zamezení výskytu vzduchových bublin. Po uplynutí přibližně 15 minut a dostatečném zatuhnutí dělicího polyakrylamidového gelu byl *n*-butanol odstraněn a horní část gelu byla opláchnuta destilovanou vodou. Povrch gelu byl osušen pomocí filtračního papíru. Následovalo převrstvení již zatuhlého dělicího gelu 4% zaostřovacím polyakrylamidovým gelem (Tab. 5). Ihned po nalití roztoku zaostřovacího gelu do prostoru mezi skla byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek pro následující aplikaci připravených rostlinných vzorků. Po uplynutí přibližně 25 minut byla skla s připravenými gely přenesena do elektroforetické komůrky. Prostor elektroforetické komůrky byl naplněn elektrolytickým pufrům (0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,3; 0,192 mol·l⁻¹ glycin; 0,1% (w/v) SDS). Poté následovalo vyjmutí vloženého hřebínku v zaostřovacím polyakrylamidovém gelu, čímž vznikly jednotlivé jamky v gelu. Rostlinné vzorky byly připraveny postupem shodným s kapitolou 3.2.2. Nutným krokem bylo zředění připravených rostlinných extraktů v případě nadzemní část rostlin, a to 40×. Připravené vzorky byly následně smíseny se 4× koncentrovaným Laemmliho vzorkovacím pufrům (40% (v/v) glycerol; 240 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8; 8% (w/v) SDS; 0,04% (w/v) bromfenolová modř; 5% (v/v) beta-merkaptoethanol) v poměru 3:1 (v/v) a 10 minut inkubovány při 95 °C. Poté následovalo ochlazení vzorků a jejich aplikace do jednotlivých jamek gelu. Do první jamky bylo napipetováno 5 μl standardu molekulové hmotnosti Precision Plus Protein Dual Xtra Standard, do druhé jamky 15 μl standardu AMADH1 a do následujících jamek 15 μl vzorků. Po nanesení vzorků do jamek gelu byla elektroforetická komůrka přenesena do elektroforetické vany, do které byl doplněn elektrolytický pufr po vyznačenou rysku. Následovalo připojení elektroforetické vany ke zdroji a zahájení separace proteinů nejprve při 120 V přibližně 20 minut. Následně bylo napětí zvýšeno na 180 V.

Po provedení separace proteinů následoval přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu metodou semi-dry Western blotting. Membrána a dva filtrační papíry (o rozměru 8×7,5 cm) byly namočeny v blotovacím pufru (0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,3; 0,192 mol·l⁻¹ glycin, 20% (v/v) methanol). Aplikace jednotlivých vrstev na spodní elektrodu (anodu) byla v následujícím pořadí: filtrační papír – nitrocelulózová membrána – gel – filtrační papír. Následně byly odstraněny vzduchové bubliny mezi jednotlivými vrstvami. Po přiložení druhé elektrody (katoda) byla blotovací kazeta zapojena ke zdroji napětí. Přenos proteinů probíhal za konstantního proudu 192 mA po dobu 2 h. Po uplynutí 2 h byla membrána obarvena Ponceau S pro kontrolu správného přenesení proteinů na membránu. K odbarvení membrány byla využita destilovaná voda. Poté byla membrána přenesena na 1,5 h do blokovacího roztoku, tj. 5% (w/v) roztoku sušeného mléka v Tris-fosfátovém pufru s přísadkou Tween 20 (TTBS pufr). Po blokaci byla membrána inkubována v roztoku primární protilátky: králičí anti-AMADH2 v roztoku 5% sušeného mléka v TTBS pufru (ředění 1:2000) přes noc při stálém míchání a teplotě 4 °C.

Další den byla membrána 4× po 15 minutách promyta v TTBS pufru a následně inkubována v roztoku sekundární protilátky: anti-králičí značená alkalickou fosfatase v roztoku 5% sušeného mléka v TTBS pufru (ředění 1:2500) po dobu 2 h při stálém míchání a laboratorní teplotě. Následovalo opětovné promytí membrány 4× po 15 minutách v TTBS pufru. Finálním krokem byla detekce alkalické fosfatasy navázané na sekundární protilátce za využití barvicího roztoku NBT-BCIP (10 ml alkalického fosfatasového pufru (AP), 33 µl NBT roztoku a 33 µl BCIP roztoku). Po 10minutové inkubaci s barvicím roztokem byla membrána s detekovanými tmavě fialovými bandy, lokalizujícími AMADH, opláchnuta v destilované vodě a vyfotografována pomocí detekčního zařízení. Vyhodnocení získaných snímků membrán probíhalo v programu ImageJ.

Tab. 5 Příprava 4% zaostrovacího a 10% dělicího polyakrylamidového gelu. Rozpis je uveden pro 4 gely o tloušťce 0,75 mm. AA/BIS: akrylamid/bisakrylamid, SDS: dodecylsírán sodný, APS: persírán amonný, TEMED: tetramethylethylendiamin.

Gel [% T]	H ₂ O [ml]	AA/BIS (T 30%, C 2,67%) [ml]	1,5 mol·l ⁻¹ Tris/HCl pH 8,8 [ml]	0,5 mol·l ⁻¹ Tris/HCl pH 6,8 [ml]	10% (w/v) SDS [ml]	TEMED [ml]	APS [ml]
4%	6,1	1,3	2,5	-	0,1	0,01	0,1
10%	8,2	6,6	-	5	0,2	0,02	0,2

Využívané roztoky:

AA/BIS roztok (T 30%, C 2,67%): 9,2% (w/v) AA; 0,8% (w/v) BIS; destilovaná voda

AP pufr: 100 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 9,5; 5 mmol·l⁻¹ MgCl₂; 100 mmol·l⁻¹ NaCl

BCIP roztok: 5% (w/v) BCIP v 100% (v/v) N, N'-dimethylformamidu (DMF)

NBT roztok: 10% (w/v) NBT v 70% (v/v) N, N'-dimethylformamidu (DMF)

Ponceau S: 0,2% Ponceau S; 10% kyselina octová

TBS pufr, pH 7,5: 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl; 0,5 mmol·l⁻¹ NaCl

TTBS pufr: 2000 ml TBS, pH 7,5; 2 ml 0,1% (v/v) Tween-20

3.2.10 Histochemická detekce reaktivních forem dusíku a kyslíku

Histochemická detekce reaktivních forem dusíku

Pro lokalizaci reaktivních forem dusíku lze využít celé škály fluorochromů. Nejčastěji se jedná o barvivo diaminofluorescein diacetát (DAF-FM DA), který může proniknout rychle do buněk, kde je následně hydrolyzován intracelulárními esterasami. Reakce fluorescenčního barviva s oxidačním produktem NO vede k vytvoření vysoce fluorescenčního triazolofluoresceinu DAF-FM T (Kojima *et al.*, 1999).

Pro histochemickou detekci reaktivních forem dusíku (NO) byly apikální části 5-ti hlavních a 5-ti postranních kořenů sedmidenních rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při různých koncentracích CdCl₂ (0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹) nejprve umístěny do 10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl pufru, pH 7,5. Poté následovala inkubace s fluorescenční sondou 10 μmol·l⁻¹ DAF-FM DA po dobu 5 minut. Po propláchnutí v 10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl pufru, pH 7,5 byly apikální části kořenů přeneseny do 50% (v/v) glycerolu na podložním sklíčku a mikroskopovány, kdy byla detekována zelená fluorescence. Pozorování bylo realizováno na fluorescenčním mikroskopu fy. Olympus BX50 (hranol U-MWB2: excitační filtr 460–490 nm, emisní filtr 520 nm).

Histochemická detekce reaktivních forem kyslíku

Pro lokalizaci reaktivních forem kyslíku lze použít běžně využívanou fluorescenční sondu 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H₂DCF-DA), která slouží jako indikátor pro ROS včetně peroxidu vodíku, hydroxylových radikálů a peroxyinitritu. H₂DCF-DA difunduje do buněk přes buněčnou stěnu a po štěpení intracelulárními esterasami a oxidací se nefluorescenční H₂DCF-DA přemění na vysoce fluorescenční 2',7'-dichlorfluorescein (DCF) (Ameziane-El-Hassani a Dupuy, 2013).

Pro detekci vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS) lze využít činidla aminofenylfluorescein (APF) a hydroxyfenylfluorescein (HPF). HPF reaguje především s hydroxylovými radikály a peroxynitrem. APF navíc reaguje s kyselinou chlornanovou (HClO). Přidáním těchto činidel do prostředí rostlinných buněk lze detekovat hROS jako zelenou fluorescenci. Protože téměř nedochází k autooxidaci excitačním světlem, je snadné s nimi manipulovat a poskytují spolehlivá data (Soh, 2006).

Pro detekci peroxidu vodíku lze využít barvení 3,3'-diaminobenzidinem (DAB). DAB je oxidován peroxidem vodíku v přítomnosti rostlinných peroxidas za vzniku tmavě hnědého produktu nerozpustného v alkoholu. Vzniklá sraženina se využívá k detekci přítomnosti a distribuce peroxidu vodíku v rostlinných buňkách (Daudí a O'Brien, 2012).

Pro histochemickou detekci reaktivních forem kyslíku (ROS, hROS) byly apikální části 5-ti hlavních a 5-ti postranních kořenů sedmidenních rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při různých koncentracích CdCl₂ (0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹) nejprve umístěny do 10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl pufru, pH 7,5. Poté následovala inkubace s fluorescenční sondou 10 μmol·l⁻¹ H₂DCF-DA, resp. APF, resp. HPF po dobu 1 minuty. Po propláchnutí v 10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl pufru, pH 7,5 byly apikální části kořenů přeneseny do 50% (v/v) glycerolu na podložním sklíčku a mikroskopovány, kdy byla detekována zelená fluorescence. Pozorování při použití sond H₂DCF-DA, HPF a APF bylo realizováno na fluorescenčním mikroskopu fy. Olympus BX50 (hranol U-MWB2: excitační filtr 460–490 nm, emisní filtr 520 nm).

Pro histochemickou detekci peroxidu vodíku byly apikální části 5-ti hlavních a 5-ti postranních kořenů sedmidenních rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při různých koncentracích CdCl₂ (0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹) nejprve umístěny na 15 minut do 10 mmol·l⁻¹ kyseliny askorbové. Poté byly segmenty kořenů přemístěny do roztoku DAB a vloženy do exsikátoru pod vakuum po dobu 5 minut pro účinnou infiltraci roztoku. Následovalo přenesení segmentů kořenů do 50% (v/v) glycerolu na podložním sklíčku a mikroskopování, kdy bylo detekováno červenohnědé zbarvení.

3.2.11 Fluorimetrické stanovení oxidu dusnatého

Fotostabilní fluorescenční indikátor oxidu dusnatého (NO) 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM) reaguje s NO v přítomnosti O₂, což vede k produkci analogu triazolo-fluoresceinu (DAF-FM T), který vykazuje asi 160× větší kvantovou účinnost fluorescence (Rümer *et al.*, 2012).

Apikální části 15-ti hlavních a 15-ti postranních kořenů sedmidenních rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při různých koncentracích CdCl₂ (0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹) o velikosti přibližně 3 mm byly vloženy do 400 μl 20 mmol·l⁻¹ K-fosfátového pufru, pH 6. Po promytí apikálních částí kořenů následovalo odpipetování pufru a přidání 400 μl reakční směsi obsahující 20 mmol·l⁻¹ K-fosfátový pufr, pH 6; 5 μmol·l⁻¹ DAF-FM v 5 mmol·l⁻¹ zásobním roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO) a 10 mmol·l⁻¹ azid sodný. Poté proběhla inkubace reakční směsi s kořenovými segmenty 20 minut při stálém míchání a teplotě 30 °C. Po odpipetování reakční směsi do čistých zkumavek následovalo fluorimetrické stanovení relativní intenzity fluorescence za využití readeru v 96-ti jamkových mikrodestičkách. Měření probíhalo při vlnových délkách excitace a emise 560 a 590 nm. Do jednotlivých jamek mikrodestičky bylo pipetováno 100 μl reakční směsi. Jednotlivá stanovení probíhala v technickém triplikátu u celkem tří biologických opakováních.

3.2.12 Fluorimetrické stanovení peroxidu vodíku

Pro fluorimetrické stanovení produkce peroxidu vodíku lze využít činidlo Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin). V přítomnosti křenové peroxidasy, která je nezbytnou složkou degradující peroxid vodíku, Amplex red reaguje s peroxidem vodíku v poměru 1:1. Výsledným produktem je červená fluorescenční sloučenina resorufin, která může být detekována fluorimetricky nebo spektrofotometricky (Brumbarova *et al.*, 2016).

Apikální části 15-ti hlavních a 15-ti postranních kořenů sedmidenních rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při různých koncentracích CdCl₂ (0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹) o velikosti přibližně 3 mm byly vloženy do 400 μl 20 mmol·l⁻¹ K-fosfátového pufru, pH 6. Po promytí apikálních kořenových částí následovalo odpipetování pufru a přidání 400 μl reakční směsi obsahující 20 mmol·l⁻¹ K-fosfátový pufr, pH 6; 50 μmol·l⁻¹ Amplex Red v 10 mmol·l⁻¹ zásobním roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO) a 0,1 U křenovou peroxidasu. Poté proběhla inkubace reakční

směsi s kořenovými segmenty 20 minut při stálém míchání a teplotě 30 °C. Po odpipetování reakční směsi do čistých zkumavek následovalo fluorimetrické stanovení relativní intenzity fluorescence za využití readeru v 96-ti jamkových mikrodestičkách. Měření probíhalo při excitaci 485 nm a emisi 590 nm. Do jednotlivých jamek mikrodestičky bylo pipetováno 100 µl reakční směsi. Jednotlivá stanovení probíhala v technickém triplikátu v celkem třech biologických opakováních.

3.2.13 Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch

Metoda biotin-switch se využívá k detekci S-nitrosylovaných proteinů a je založena na mechanismu tří po sobě následujících kroků: (1) blokace volných cysteinových thiolů S-methylthiolací za využití methylmethanthiosulfonátu (MMTS: reaktivní thiosulfonát); (2) přeměna SNO na thioly transnitrosací s askorbátem; (3) *in situ* značení S-biotinylací vznikajících thiolů pomocí biotin-HPDP, reaktivního směšného disulfidu biotinu. Stupeň biotinylace (a tedy S-nitrosylace) je stanoven imunometodou – Western blot s využitím protilátky na biotin (Forrester *et al.*, 2009).

Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch byla provedena v kořenech dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při různých koncentracích CdCl₂ (0, 1, 10 a 50 µmol·l⁻¹). Prvním krokem byla extrakce vzorků extrakčním TEGN pufrem (500 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8; 5 mmol·l⁻¹ Na⁺ EDTA; 15% (v/v) glycerol; 0,1 mmol·l⁻¹ neocuproin; 1 mmol·l⁻¹ AEBSF) v poměru 1:2 (w/v). Suspenze byla ponechána 20 minut na rotátoru v chladícím boxu pro dokonalé promíchání rostlinného vzorku s extrakčním pufrem. Poté následovala centrifugace vzorků 20 minut při 16 000 g a teplotě 4 °C. V jednotlivých vzorcích bylo stanoveno množství proteinů metodou Bradforda (3.2.5). Ze vzorku obsahujícího nejmenší množství proteinů bylo odebráno 500 µl. U ostatních vzorků byl objem použitého rostlinného materiálu vypočítán tak, aby veškeré vzorky obsahovaly stejné množství proteinů. Ke vzorkům bylo podle objemu použitého rostlinného materiálu přidáno určité množství 0,02 mmol·l⁻¹ MMTS a 2% (w/v) SDS. Následovala inkubace 30 minut při 50 °C ve tmě. Po inkubaci byly vzorky doplněny 80% (v/v) acetonem do objemu 2 ml a nechány precipitovat 30 minut při -28 °C. Poté proběhla centrifugace vzorků 20 minut při 14 000 g a teplotě 4 °C. Aceton byl ze vzorků odstraněn. Následně bylo ke vzorkům přidáno 0,5 ml 80% (v/v) acetonu. Opět proběhla centrifugace vzorků 20 minut při 14 000 g a teplotě 4 °C. Aceton byl opět odstraněn. Pro rozpuštění vzniklého peletu

v jednotlivých vzorcích bylo přidáno ke vzorkům 300 μl TEGN pufru s 1% (w/v) SDS. Vzorky byly 15 minut vortexovány a sonikovány po dobu 10 minut. Po dokonalém rozpuštění peletu bylo ke vzorkům přidáno 6 μl 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ askorbátu rozpuštěného ve vodě a 75 μl 4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ biotinu-HPDP rozpuštěného v DMF (připraveno vždy čerstvě). Následovala inkubace 1 h při laboratorní teplotě ve tmě. Po inkubaci byl ke vzorkům přidán 80% (v/v) aceton a vzorky byly ponechány precipitovat přes noc při $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Následující den byly vzorky centrifugovány 20 minut při 14 000 g a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aceton byl ze vzorků odstraněn. Poté byl ke vzorkům přidán 1 ml 80% (v/v) acetonu a proběhla opět centrifugace 20 minut při 14 000 g a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aceton byl ze vzorků opět odstraněn. Pro rozpuštění vzniklého peletu v jednotlivých vzorcích bylo ke vzorkům přidáno 400 μl TEGN pufru bez přídavku AEBSF. Vzorky byly vortexovány 30 minut. Poté následovala příprava vzorků pro elektroforézu, tzn. k připraveným vzorkům byl přidán 4x koncentrovaný neredukující Laemmliho vzorkovací pufr (40% (v/v) glycerol; 240 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 6,8; 8% (w/v) SDS; 0,04% (w/v) bromfenolová modř) v poměru 3:1 (v/v). Pro elektroforézu byl využit gel tloušťky 1,5 mm (příprava shodná s kapitolou 3.2.9). Do první jamky gelu byly napipetovány 3 μl komerčního standardu molekulové hmotnosti Precision Plus Protein Dual Xtra Standard a do následujících jamek 25 μl připravených vzorků. Po provedení separace proteinů následoval přenos proteinů na nitrocelulósovou membránu metodou semi-dry Western blotting po dobu 2 h s postupem shodným s kapitolou 3.2.9. Po uplynutí 2 h byla membrána obarvena Ponceau S pro kontrolu správného přenesení proteinů na membránu. K odbarvení membrány byla využita destilovaná voda. Poté byla membrána přenesena na 1 h do blokovacího roztoku, tj. 5% (w/v) roztoku BSA v TTBS pufru. Po provedení blokování byla membrána inkubována v roztoku protilátky: myší anti-biotin konjugovaná s alkalickou fosfatase v roztoku 5% BSA v TTBS pufru (ředění 1:2000) přes noc při stálém míchání a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla membrána 4x po 15 minutách promyta v TTBS pufru. Poté následovala detekce alkalické fosfatasy za využití barvicího roztoku NBT-BCIP (10 ml alkalického fosfatasevého pufru (AP), 33 μl NBT roztoku a 33 μl BCIP roztoku). Po 10minutové inkubaci s barvicím roztokem byla membrána s detekovanými tmavě fialovými bandy, lokalizujícími S-nitrosylované proteiny, opláchnuta v destilované vodě a vyfotografována pomocí detekčního zařízení. Vyhodnocení získaných snímků membrán probíhalo v programu ImageJ.

3.2.14 Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy

Enzym S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) katalyzuje NADH dependentní redukci S-nitrosoglutathionu (GSNO) na glutathion disulfid (GSSG) a NH_3 . GSNOR je schopna regulovat úroveň GSNO a nepřímo obsah oxidu dusnatého v rostlinných buňkách. Aktivitu GSNOR lze detekovat spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm ($\epsilon = 6\,220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Corpas *et al.*, 2008).

K mikroskopickým s předem připraveným rozetřeným rostlinným materiálem (kořenové a nadzemní části dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při koncentracích 0, 1, 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2) byl přidán čerstvě připravený extrakční pufr (50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 7,5; 0,2% (v/v) Triton X-100; 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT; 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF) v poměru 1:2 (w/v). Homogenát byl vortexován po dobu 2 minut a poté na 20 minut umístěn na rotátor v chladícím boxu pro řádné promíchání extrakčního pufru s rostlinným materiálem. Následovala centrifugace 20 minut při 16 000 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl přenesen do čistých mikroskopických a uchováván na ledu. K odstranění endogenního GSNO byl supernatant přečištěn gelovou filtrací na kolonce NAP-5 (náplň Sephadex, porozita G-25). Kolonka byla nejprve ekvilibrována 3×2,5 ml ekvilibračního pufru (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8). Po vsáknutí celkového objemu ekvilibračního pufru bylo aplikováno 250 μl supernatantu. Poté následovala aplikace 500 μl elučního pufru (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8). Vzápětí byl veškerý eluát jímán do mikroskopických a uchováván na ledu. Závěrečným krokem bylo promytí kolonek 25 ml destilované vody (možnost opakovaného použití kolonek) (Corpas *et al.*, 2008).

Aktivita enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) byla měřena spektrofotometricky za využití readeru PowerWave XS v 96-ti jamkových mikrodestičkách. Měření probíhalo při 30 °C, kdy byla sledována oxidace NADH při vlnové délce 340 nm (Warburghův optický test). Do jednotlivých jamek mikrodestičky bylo pipetováno 210 μl reakčního pufru (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8), 30 μl čerstvě připraveného rostlinného extraktu a 30 μl 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADH (vždy čerstvě připraveno). Pro zahájení reakce bylo do jednotlivých jamek přidáno 30 μl 4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO (vždy čerstvě připraveno a uchováván ve tmě). Do jamek pro blank bylo místo 30 μl 4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO pipetováno 30 μl destilované vody. Jednotlivá stanovení probíhala v technickém triplicátu, kdy každý vzorek měl vlastní blank. Byl zaznamenán pokles absorbance při vlnové délce 340 nm v průběhu 10 minut v časových intervalech 30 s. Celkové stanovení aktivity GSNOR bylo provedeno v pěti biologických opakováních.

3.2.15 Statistické zpracování dat

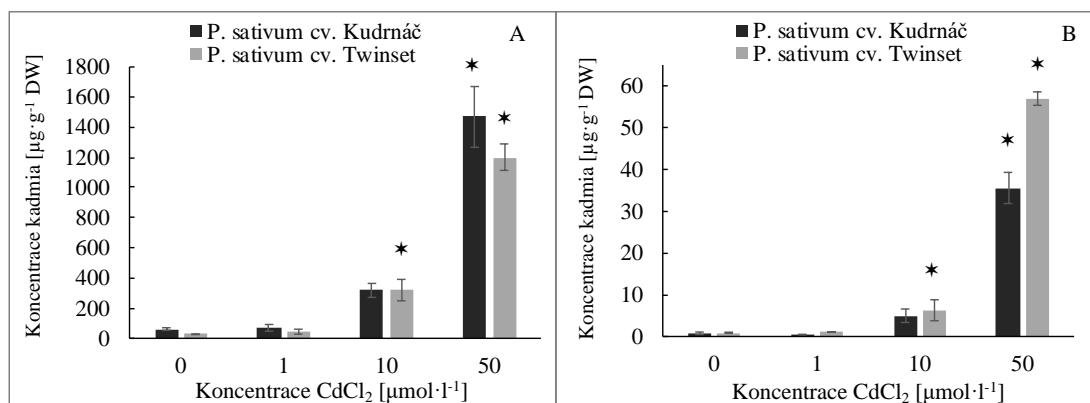
Veškerá stanovení byla provedena v triplikátech ve 3–5 nezávislých experimentech. Data uvedená v grafech představují průměr \pm standardní odchylka (SD) ze 3–5 nezávislých měření. Statistická analýza byla provedena jednocestnou analýzou rozptylu (ANOVA) a následně Bonferroniho post-hoc testem ($p \leq 0,05$) v programu Statistica 13.4.0.14.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení obsahu kadmia v hrachu setém

Cd je pro rostlinu nepodstatným prvkem minerální výživy, přesto je přes kortikální pletivo kořenu velmi snadno a rychle absorbováno a transportováno do nadzemní části rostliny (Yang *et al.*, 1998; Sanità di Toppi a Gabbrielli, 1999). Obecně se obsah kadmia v rostlinách snižuje v následujícím pořadí: kořenová část – nadzemní část – plody – semena (Blum, 1997).

Z dosažených výsledků stanovení obsahu kadmia u rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při koncentracích 0, 1, 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu lze pozorovat významné rozdíly v obsahu kadmia v kořenové a nadzemní části (Obr. 10A,B). Cd bylo detekované i u kontrolních rostlin, jeho koncentrace byla v kořenech v desítkách $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, v nadzemní části rostlin byla koncentrace o dva řády nižší v porovnání s kořenovou částí rostlin. V kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč bylo detekované dvojnásobné množství kadmia v porovnání s genotypem Twinset. V případě aplikace 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 do růstového média nedošlo k významnému zvýšení obsahu kadmia v pletivu rostlin. Při vyšších koncentracích CdCl_2 (10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2) v růstovém médiu lze pozorovat výrazný nárůst v obsahu kadmia jak v kořenové, tak nadzemní části rostliny v porovnání s kontrolními rostlinami. V kořenové části se jednalo o cca 5násobné, resp. 24násobné zvýšení obsahu kadmia v případě pěstování *P. sativum* cv. Kudrnáč v prostředí 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 , resp. 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v případě *P. sativum* cv. Twinset se jednalo o cca 12násobné, resp. 45násobné navýšení koncentrace kadmia. V nadzemní části byla navýšena koncentrace kadmia cca 7násobně u obou genotypů hrachu při pěstování v 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 a cca 47násobně (*P. sativum* cv. Kudrnáč), resp. 64násobně (*P. sativum* cv. Twinset) při pěstování v 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Rozdíly mezi genotypy ve schopnosti přijímat Cd a transportovat z kořenové části do nadzemní jsou patrné při vystavení rostliny nejvyšší testované koncentraci 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu, kdy v kořenové části *P. sativum* cv. Kudrnáč byl zaznamenán o cca 20 % vyšší obsah kadmia v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset. Naopak u nadzemní části rostliny lze pozorovat trend opačný, vyšší obsah kadmia o cca 38 % byl detekován u *P. sativum* cv. Twinset v porovnání s *P. sativum* cv. Kudrnáč.



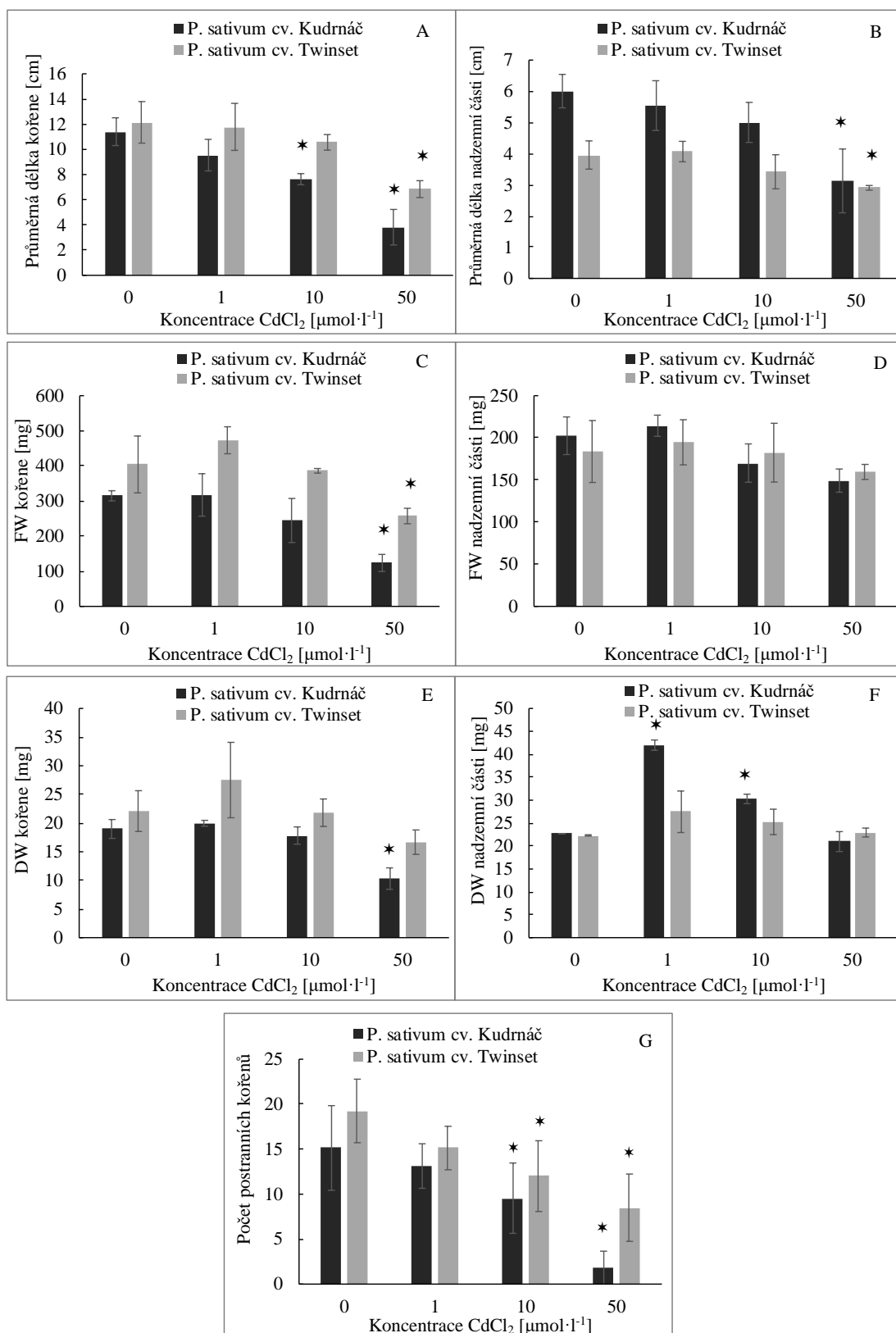
Obr. 10 Stanovení obsahu kadmia v kořenové (A) a nadzemní části (B) rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při koncentracích 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂ v růstovém médiu. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * (p ≤ 0,05).

4.2 Vliv Cd²⁺ v médiu na fyziologické parametry hrachu setého

Cd je toxický těžký kov, jehož přítomnost v životním prostředí je způsobena především průmyslovou činností a používáním fosfátových hnojiv. Rostliny jsou citlivé již na nízké koncentrace Cd v půdě. Toxickým účinkem působení Cd na rostliny je inhibice růstu, poškození a snížení počtu laterálních kořenů (Sandalo *et al.*, 2001; Benavides *et al.*, 2005). V předložené práci byl porovnán vliv přítomnosti Cd²⁺ na fyziologické parametry rostlin u dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 11).



Obr. 11 Fotografické snímky rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂.



Obr. 12 Vliv přítomnosti CdCl₂ v růstovém médiu na fyziologické parametry *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Koncentrace CdCl₂ v růstovém médiu: 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹. Stanovení délky kořene (A), nadzemní části rostlin (B); hmotnosti (FW) čerstvě odebraných kořenů (C), nadzemních částí rostlin (D); hmotnosti (DW) vysušených kořenů (E), nadzemních částí rostlin (F); orientační stanovení počtu postranních kořenů rostlin (G). Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($p \leq 0,05$).

Ve třech biologických opakováních bylo provedeno měření délky kořenové a nadzemní části vždy u 30 rostlin a stanovení hmotnosti čerstvého (FW) a suchého (DW) rostlinného materiálu u 10–15 rostlin (Obr. 12A–F). Dále byl orientačně stanoven průměrný počet postranních kořenů (Obr. 12G). Z dosažených výsledků je patrné, že se zvyšující se koncentrací CdCl₂, kterému byly rostliny v průběhu růstu vystaveny, došlo ke snížení délky jak nadzemní, tak kořenové části rostlin u obou genotypů hrachu setého (Obr. 12A–B). V souladu s detekovanou inhibicí růstu bylo pozorováno snížení hmotnosti obou částí rostliny (stanovení čerstvé a suché váhy – FW a DW) (Obr. 12C–F). Se zvyšující se koncentrací CdCl₂ v růstovém médiu byl zaznamenán výrazný pokles počtu postranních kořenů (Obr. 12G).

Z výsledků je zřejmé, že zvýšená koncentrace CdCl₂ v růstovém médiu měla významnější inhibiční efekt na genotyp *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset. V prostředí 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂ v porovnání s kontrolním experimentem byla délka kořene snížena u genotypu Kudrnáč o cca 65 % a u genotypu Twinset cca o 45 %. FW kořenové části se snížila o cca 60 % u genotypu Kudrnáč a o cca 35 % u genotypu Twinset a DW kořenové části se snížila o cca 45 % u genotypu Kudrnáč a o cca 25 % u genotypu Twinset. Vliv 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂ v růstovém médiu na fyziologické parametry u *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset (kořen i nadzemní část) vyhodnocený z grafů v Obr. 12A–G je přehledně uveden v tabulce (Tab. 6).

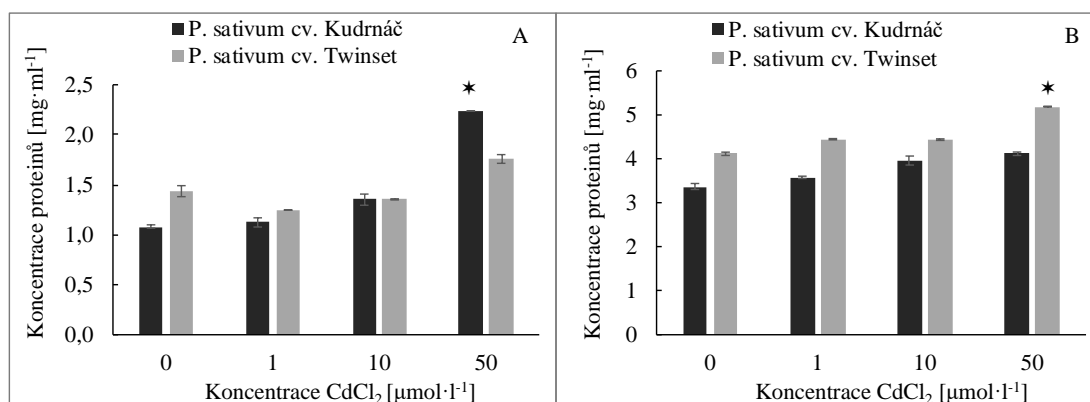
Tab. 6 Vliv 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂ v růstovém médiu na fyziologické parametry u *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset (porovnání s kontrolními rostlinami). Vyhodnoceno z grafů uvedených v Obr. 12A–G.

	Pokles daného fyziologického parametru v % (cca)			
	<i>P. sativum</i> cv. Kudrnáč kořen	<i>P. sativum</i> cv. Twinset kořen	<i>P. sativum</i> cv. Kudrnáč nadzemní část	<i>P. sativum</i> cv. Twinset nadzemní část
Délka	65	45	50	25
FW	60	35	35	15
DW	45	25	10	10
Postranní kořeny	85	50		

4.3 Vliv Cd²⁺ v médiu na obsah proteinů

V nadzemní části rostlin hrachu setého byl detekován přibližně 3× vyšší obsah proteinů než v kořenech u obou studovaných genotypů. Přítomnost Cd²⁺ v růstovém médiu má vliv na celkový obsah proteinů zastoupený v rostlinném materiálu (Obr. 13A,B). Se vzrůstající koncentrací CdCl₂ v růstovém médiu byla zaznamenána zvýšená produkce proteinů v kořenu i v nadzemní části u obou genotypů. U rostlin pěstovaných při nejvyšší

testované koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu v porovnání s kontrolními rostlinami byl detekován cca o 20–25 % zvýšený obsah proteinů, pouze v případě kořene *P. sativum* cv. Kudrnáč byla stanovena dvojnásobně vyšší hladina proteinů.



Obr. 13 Vliv přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na obsah proteinů u kořenové (A) a nadzemní části (B) rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Koncentrace CdCl_2 v růstovém médiu: 0, 1, 10 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Data představují průměr \pm SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($p \leq 0,05$).

4.4 Vliv Cd^{2+} v médiu na obsah polyaminů

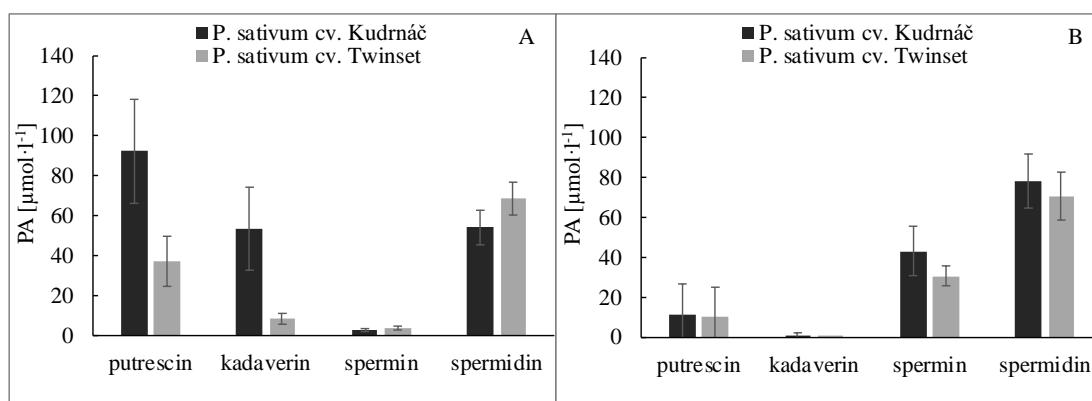
Produkce polyaminů (PA) souvisí s odezvou rostlin na nejrůznější biotické a abiotické stresové podmínky, včetně působení těžkých kovů (Liu *et al.*, 2007; Wimalasekera *et al.*, 2011). PA zvyšují toleranci rostlin vůči nejrůznějším environmentálním stresům a jsou klíčové při omezení rozsahu poškození biologických makromolekul v důsledku oxidačního stresu (Alcázar *et al.*, 2010). Řada biotických a abiotických stresových faktorů může silně regulovat expresi genů podílejících se na biosyntéze PA (Wimalasekera *et al.*, 2011).

Z dosažených výsledků stanovení bazálních hodnot PA putrescinu, kadaverinu, sperminu a spermidinu u kontrolních rostlin (Obr. 14A,B) lze pozorovat rozdíly v produkci jednotlivých PA v kořenové a nadzemní části a rozdílnou intenzitu produkce ve vybraných genotypech hrachu setého. Produkce PA byla vyšší u genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset, a to zejména putrescinu a kadaverinu v kořenové části. V kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč byl nejintenzivněji produkován putrescin (cca o 40 % více v porovnání se spermidinem a kadaverinem). Nejnižší úroveň produkce byla pozorována u sperminu. V kořenové části *P. sativum* cv. Twinset byl nejintenzivněji produkován spermidin, poté s 50% nižší produkcí putrescin a nejméně kadaverin a spermin. V nadzemní části obou genotypů hrachu setého byl na bazální

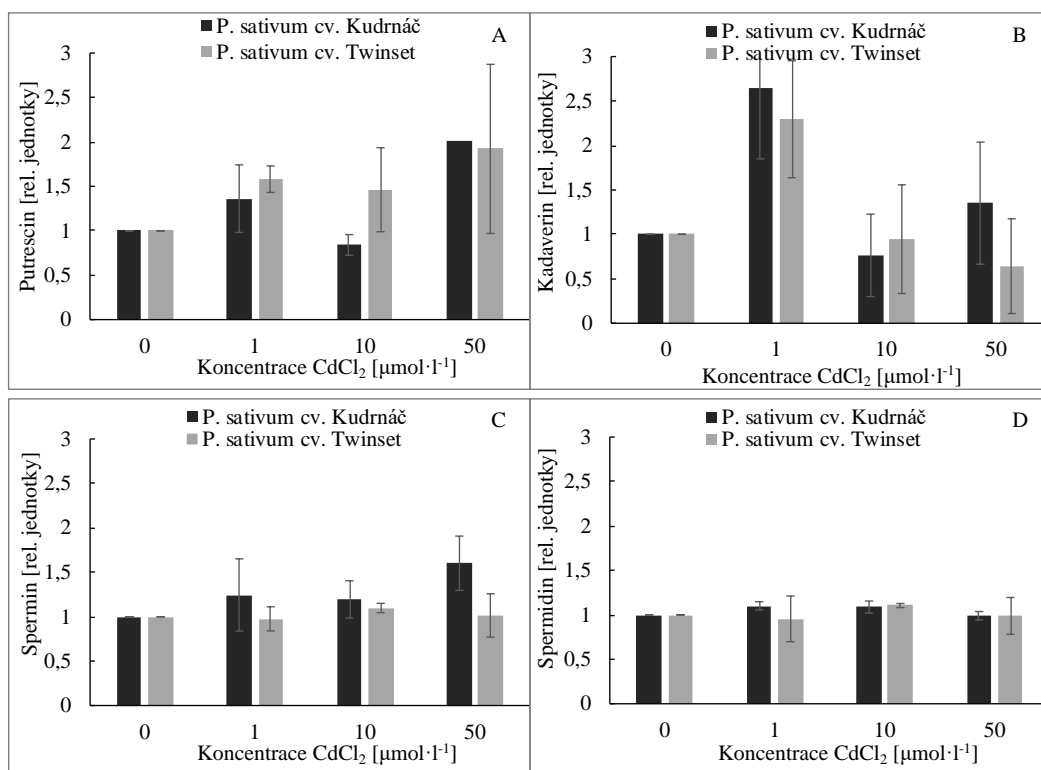
úrovni nejintenzivněji produkován spermidin, poté spermin, putrescin a nejméně kadaverin.

Byl stanoven vliv přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na produkci PA putrescinu, kadaverinu, sperminu a spermidinu v kořenové části rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při různých koncentracích CdCl_2 v růstovém médiu (Obr. 15A–D). V grafech je uvedena změna hladiny PA u stresovaných rostlin vztažená ke kontrolnímu vzorku. Se zvyšující se koncentrací CdCl_2 v růstovém médiu byl detekován nárůst produkce putrescinu u obou genotypů hrachu setého. Produkce kadaverinu byla u obou genotypů hrachu setého nejintenzivnější u rostlin pěstovaných v médiu s $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Stanovení obsahu kadaverinu je zatíženo poměrně velkou směrodatnou odchylkou. Výsledky lze z tohoto důvodu považovat za orientační a bude nutné provést ověření proměřením nejméně dalších dvou sad vzorků. V případě sperminu lze u *P. sativum* cv. Kudrnáč pozorovat mírný nárůst v produkci se zvyšující se koncentrací CdCl_2 , naopak u *P. sativum* cv. Twinset nedošlo k významným změnám. Rozdíly v produkci spermidinu v souvislosti s expozicí rostlin různým koncentracím CdCl_2 nebyly detekovány u obou genotypů hrachu setého.

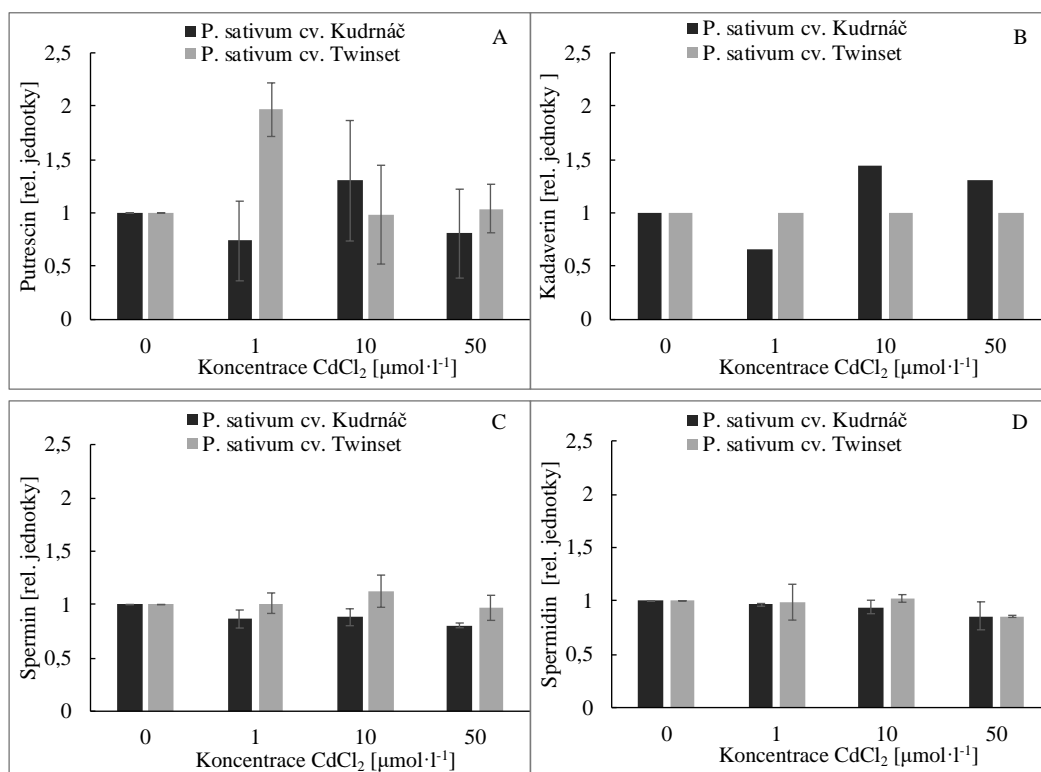
V nadzemní části *P. sativum* cv. Kudrnáč byla zvýšena produkce putrescinu pouze u rostlin pěstovaných v médiu s $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . V případě *P. sativum* cv. Twinset byla zaznamenána změna v obsahu putrescinu (cca dvojnásobný nárůst koncentrace) v přítomnosti $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu (Obr. 16A). Obsah kadaverinu, sperminu a spermidinu v nadzemní části rostlin u obou genotypů hrachu setého nebyl výrazně ovlivněn přítomností rozdílných koncentrací CdCl_2 v růstovém médiu (Obr. 16B–D).



Obr. 14 Porovnání bazálních hodnot polyaminů putrescinu, kadaverinu, sperminu a spermidinu v kořenové (A) a nadzemní části (B) rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Data představují průměr \pm SD.



Obr. 15 Vliv přítomnosti Cd²⁺ v růstovém médiu na produkci putrescinu (A), kadaverinu (B), sperminu (C) a spermidinu (D) v kořenové části rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂. Data představují průměr ± SD.



Obr. 16 Vliv přítomnosti Cd²⁺ v růstovém médiu na produkci putrescinu (A), kadaverinu (B), sperminu (C) a spermidinu (D) v nadzemní části rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂. Data představují průměr ± SD.

4.5 Vliv Cd^{2+} v médiu na enzymy podílející se na metabolismu polyaminů

Enzymy diaminooxidasa (DAO) a aminoaldehyddehydrogenasa (AMADH) jsou významné z hlediska katabolismu polyaminů. Měď vázající diaminooxidasa katalyzuje oxidaci putrescinu na odpovídající aminoaldehyd (Bouchereau *et al.*, 1999). Degradční produkty jsou dále metabolizovány NAD^+ dependentními aminoaldehyddehydrogenasami na aminokyseliny (Awal *et al.*, 1997). Jedním z dílčích cílů diplomové práce bylo stanovit vliv Cd^{2+} v růstovém médiu na aktivitu DAO a AMADH.

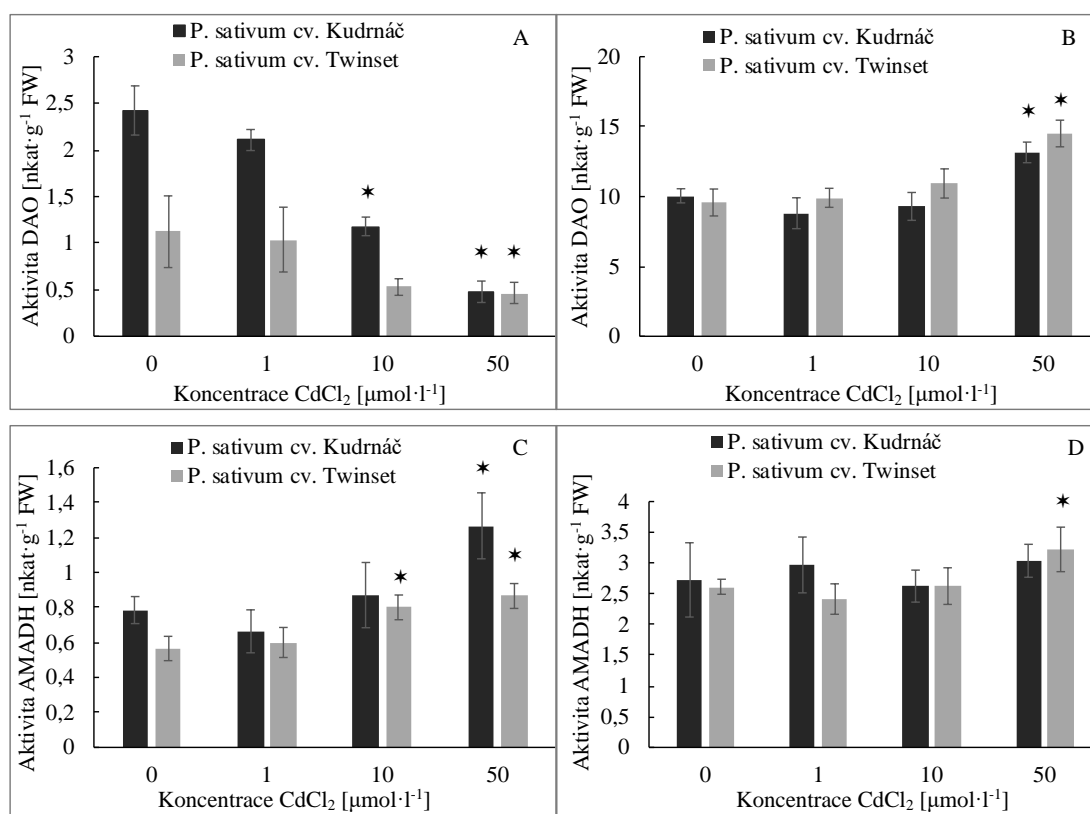
4.5.1 Stanovení aktivity enzymu diaminooxidasy a aminoaldehyddehydrogenasy

Byl stanoven vliv přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na aktivitu DAO a AMADH v kořenové a nadzemní části rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 (Obr. 17A–D).

Při porovnání stanovených hodnot aktivity DAO v kořenové a nadzemní části kontrolních rostlin je patrné, že aktivita DAO je v kořenové části přibližně 4×, resp. 8× nižší než v nadzemní části rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč, resp. *P. sativum* cv. Twinset. V kořenové části *P. sativum* cv. Kudrnáč byla detekována dvojnásobná aktivita DAO v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset. V nadzemní části byla stanovena u obou genotypů srovnatelná aktivita DAO (Obr. 17A,B). Koncentrace 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu neměla významný efekt na aktivitu DAO v kořenové části. V případě 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 došlo u obou genotypů ke snížení aktivity DAO na polovinu. Pouze v případě *P. sativum* cv. Kudrnáč byl zaznamenán další významný inhibiční efekt Cd^{2+} na aktivitu DAO (5× snížení aktivity) při pěstování rostlin v prostředí 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 17A). Naopak v nadzemní části rostlin obou genotypů hrachu setého lze pozorovat 30–50% zvýšení aktivity DAO, ale až u rostlin pěstovaných v růstovém médiu obsahující 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 17B).

Detekovaná aktivita AMADH u kontrolních rostlin byla 3,5×, resp. 4,5× nižší v kořenové části rostlin ve srovnání s nadzemní částí rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč, resp. *P. sativum* cv. Twinset. V kořenové části *P. sativum* cv. Kudrnáč byla detekována o cca 40 % vyšší aktivita AMADH v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset. V nadzemní části

byla stanovena u obou genotypů srovnatelná aktivita AMADH podobně jako v případě DAO (Obr. 17C,D). V kořenové části obou genotypů hrachu setého byla pozorována zvýšená aktivita AMADH se zvyšující se koncentrací CdCl₂ v růstovém médiu. V případě rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč pěstovaných v růstovém médiu s 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂ byla v kořenech detekována o cca 60 % zvýšená aktivita AMADH. Cca 50% nárůst aktivity AMADH byl detekován u rostlin *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu jen s 10 μmol·l⁻¹ CdCl₂. Další navýšení CdCl₂ v médiu již významně neovlivnilo aktivitu AMADH u tohoto genotypu. V nadzemní části u obou genotypů byla detekovaná pouze 10–20% změna v aktivitě AMADH v důsledku přítomnosti 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂ v růstovém médiu.



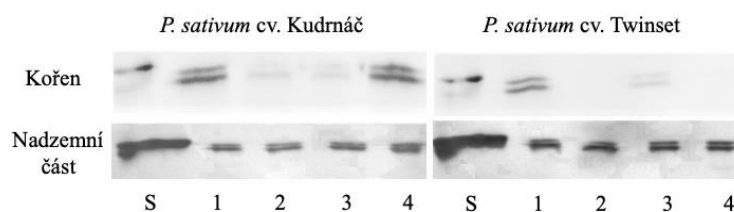
Obr. 17 Vliv přítomnosti Cd²⁺ v médiu na aktivitu enzymu diaminooxidasy (DAO) (A,B) a aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) (C,D) v kořenové (A,C) a nadzemní části (B,D) rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * (p ≤ 0,05).

4.5.2 Detekce aminoaldehyddehydrogenasy metodou Western blot

Metabolická oxidace přirozeně se vyskytujících ω-aminoaldehydů včetně produktů oxidace polyaminů je katalyzována NAD⁺ dependentními aminoaldehyddehydrogenasami (AMADH; EC 1.2.1.19). Izoenzymy AMADH1 a 2 ze semen hrachu setého

(PsAMADH1 a PsAMADH2), které patří do rodiny ALD10, katalyzují oxidaci ω -aminoaldehydů na odpovídající ω -aminokyseliny. Nejvhodnějšími substráty pro AMADH jsou 1-amino-3,3-diethoxypropan (APAL) a 4-aminobutyraldehyd (ABAL), vzniká β -alanin a kyselina γ -aminomáselná (GABA), což naznačuje vztah k metabolismu polyaminů (Frömmel *et al.*, 2012).

Detekce AMADH metodou Western blot byla provedena v kořenové a nadzemní části rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 (Obr. 18). Přítomnost CdCl_2 v růstovém médiu neměla významný vliv na proteinové zastoupení AMADH v nadzemní části rostlin. V kořenové části byl detekován pokles zastoupení AMADH v důsledku přítomnosti CdCl_2 v médiu. Pouze v případě *P. sativum* cv. Kudrnáč bylo v kořenovém extraktu detekováno mírně zvýšené zastoupení proteinu AMADH u rostlin pěstovaných v růstovém médiu obsahující 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v porovnání s kontrolním experimentem.



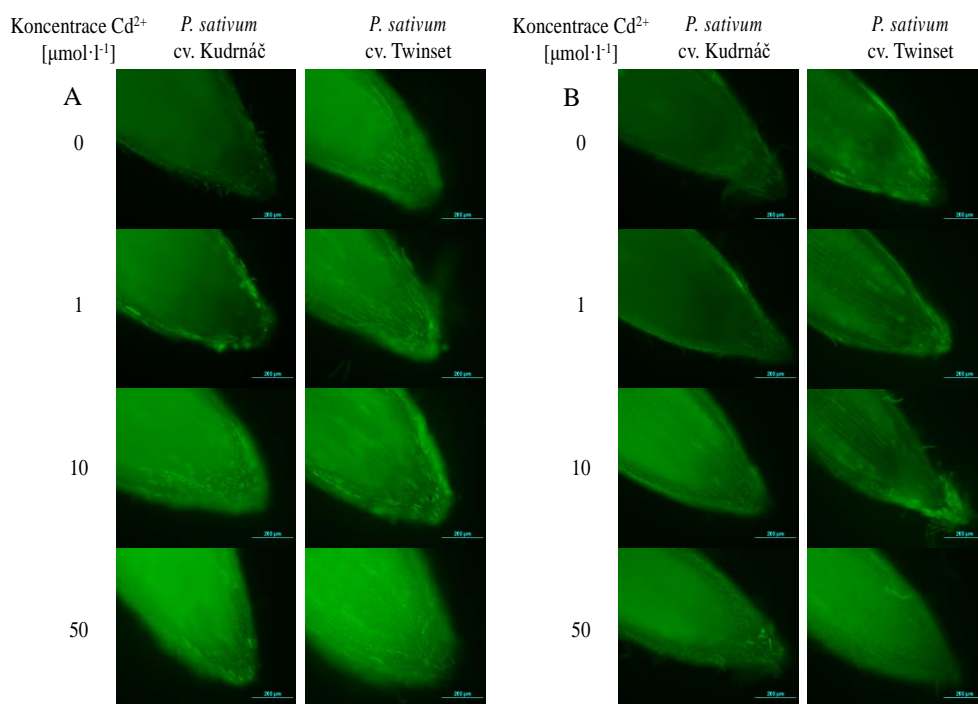
Obr. 18 Detekce aminoaldehyddehydrogenasy metodou Western blot v kořenové a nadzemní části rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . S: standard AMADH1; 1–4: 0, 1, 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu.

4.6 Vliv Cd^{2+} v médiu na produkci oxidu dusnatého

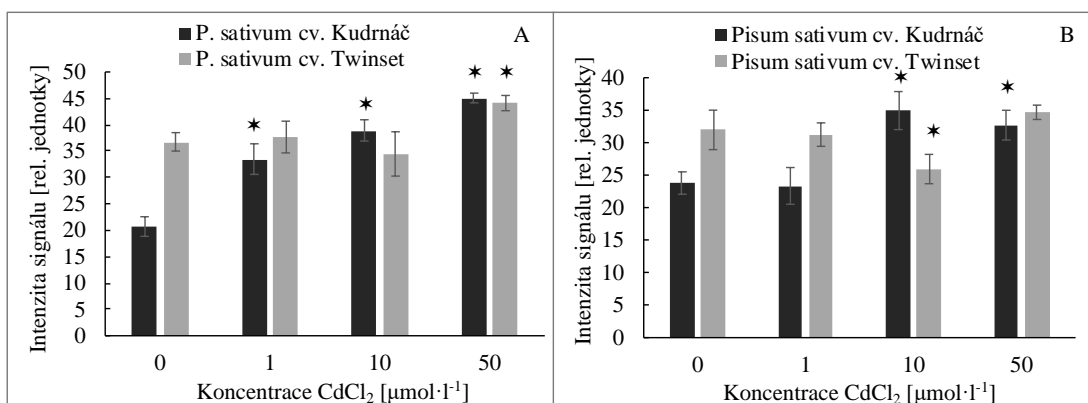
4.6.1 Histochemická detekce produkce oxidu dusnatého

Histochemická detekce vlivu přítomnosti Cd^{2+} v médiu na produkci oxidu dusnatého (NO) za použití fluorescenční sondy DAF-FM DA byla provedena v apikální části hlavních (Obr. 19A) a postranních kořenů (Obr. 19B) sedmidenních rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Ze získaných snímků z fluorescenčního mikroskopu fy. Olympus BX50 (hranol U-MWB2: excitační filtr 460–490 nm, emisní filtr 520 nm) je možné pozorovat rozdíly v produkci NO ve vztahu ke koncentraci CdCl_2 v růstovém médiu (Obr. 19A,B). Změna intenzity fluorescenčního signálu v závislosti na koncentraci CdCl_2 v růstovém médiu je uvedena na obrázku 20A,B. Výrazně vyšší hladina NO o cca 70 %, resp. 45 % byla detekována v apikálních částech hlavního, resp. postranního kořene

kontrolních rostlin *P. sativum* cv. Twinset v porovnání s *P. sativum* cv. Kudrnáč (Obr. 19, 20). Významné změny v produkci NO v důsledku zvýšené koncentrace CdCl_2 v růstovém médiu byly detekovány zejména v hlavním kořenu *P. sativum* cv. Kudrnáč, kdy při nejvyšší koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 došlo ke zdvojnásobení fluorescenčního signálu vůči kontrolnímu vzorku. Podobný efekt, ale pouze navýšení intenzity signálu o 40 % byl zaznamenán v postranním kořenu. Naopak změny v produkci NO u *P. sativum* cv. Twinset v prostředí $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 byly minimální (navýšení signálu cca o 10–20 %) v porovnání s kontrolními rostlinami. V případě postranních kořenů *P. sativum* cv. Twinset byl zaznamenán postupný pokles produkce NO cca o 25 % v růstovém médiu s $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . V případě $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu byla produkce NO v postranních kořenech *P. sativum* cv. Twinset srovnatelná s kontrolními rostlinami. Z dosažených výsledku je zřejmé, že zvýšená koncentrace CdCl_2 v růstovém médiu měla významnější efekt na produkci NO u *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset.



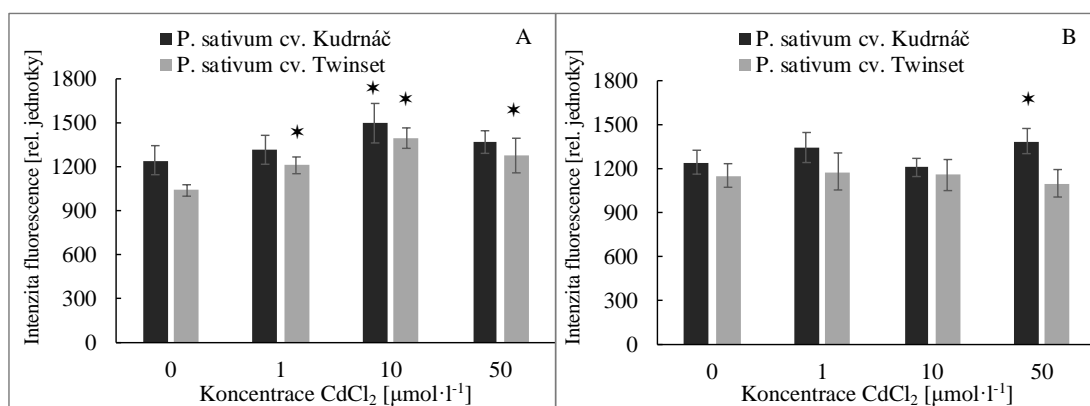
Obr. 19 Histochemická detekce vlivu přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na produkci oxidu dusnatého. Detekce NO fluorescenční sondou DAF-FM DA o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v apikálních částech hlavních (A) a postranních (B) kořenů rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Měřítka 200 μm .



Obr. 20 Vliv přítomnosti Cd²⁺ v růstovém médiu na produkci oxidu dusnatého. Vyhodnocení intenzity fluorescenčního signálu po detekci oxidu dusnatého fluorescenční sondou DAF-FM DA o koncentraci 10 µmol·l⁻¹ v apikálních částech hlavních (A) a postranních (B) kořenů rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 µmol·l⁻¹ CdCl₂. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * (p ≤ 0,05). Vyhodnoceno programem ImageJ.

4.6.2 Fluorimetrické stanovení oxidu dusnatého

Pro kvantifikaci produkce NO byla použita detekce NO pomocí fluorescenční sondy DAF-FM dle metodiky uvedené v práci Demecsová *et al.* (2019). Byla stanovena změna fluorescenčního signálu po interakci DAF-FM s NO produkovaným apikálními částmi 15-ti hlavních a 15-ti postranních kořenů sedmidenních rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 µmol·l⁻¹ CdCl₂ (Obr. 21A,B). V hlavních kořenech obou genotypů hrachu setého lze pozorovat shodný trend, a to mírný nárůst relativní intenzity fluorescence do koncentrace 10 µmol·l⁻¹ CdCl₂ s následným mírným poklesem při koncentraci 50 µmol·l⁻¹ CdCl₂ v růstovém médiu (Obr. 21A). V postranních kořenech u obou genotypů hrachu setého nedošlo k významným rozdílům v relativní intenzitě fluorescence v porovnání s kontrolními rostlinami, s výjimkou rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč pěstovaných v růstovém médiu s 50 µmol·l⁻¹ CdCl₂, u kterých bylo pozorováno mírné zvýšení intenzity signálu (Obr. 21B).



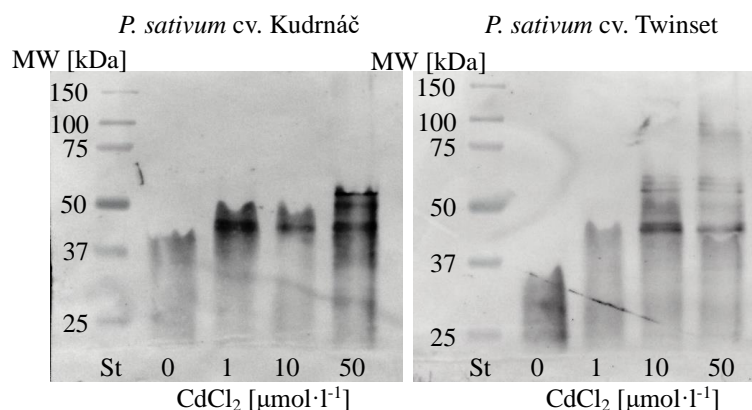
Obr. 21 Vliv přítomnosti Cd²⁺ v růstovém médiu na produkci oxidu dusnatého. Vyhodnocení intenzity fluorescenčního signálu po detekci oxidu dusnatého fluorescenční sondou DAF-FM o koncentraci 5 μmol·l⁻¹ v apikálních částech hlavních (A) a postranních (B) kořenů rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * (p ≤ 0,05).

4.7 Vliv Cd²⁺ v médiu na produkci S-nitrosothiolů

Jak již bylo uvedeno v teoretické části diplomové práce, při vystavení rostlin působení Cd²⁺ dochází ke zvýšené tvorbě NO (Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2011). NO může dále reagovat s dalšími redoxními molekulami a potenciálně regulovat biologickou aktivitu proteinů prostřednictvím řady různých mechanismů (Fancy *et al.*, 2017). Jedním z těchto mechanismů je S-nitrosylace, reverzibilní kovalentní modifikace, ke které dochází interakcí NO s thiolovou skupinou cysteinu v molekule např. glutathionu nebo cystein obsahujících proteinů za vzniku příslušného S-nitrosothiolu (Hogg, 2000; Spadaro *et al.*, 2010).

4.7.1 Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch

Metodou biotin-switch byl stanoven vliv přítomnosti Cd²⁺ v růstovém médiu na zastoupení S-nitrosylovaných proteinů v kořenové části rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂ (Obr. 22). Se zvyšující se koncentrací CdCl₂ v růstovém médiu byla detekována zvýšená intenzita S-nitrosylace proteinů v porovnání s kontrolními vzorky u obou genotypů. Z dosažených výsledků je patrná významně intenzivnější S-nitrosylace proteinů v důsledku přítomnosti CdCl₂ v růstovém médiu u *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s genotypem *P. sativum* cv. Twinset. V důsledku reakce na stres byla pozorována intenzivní S-nitrosylace proteinů s vyšší molekulovou hmotností, a to zejména u genotypu *P. sativum* cv. Twinset.

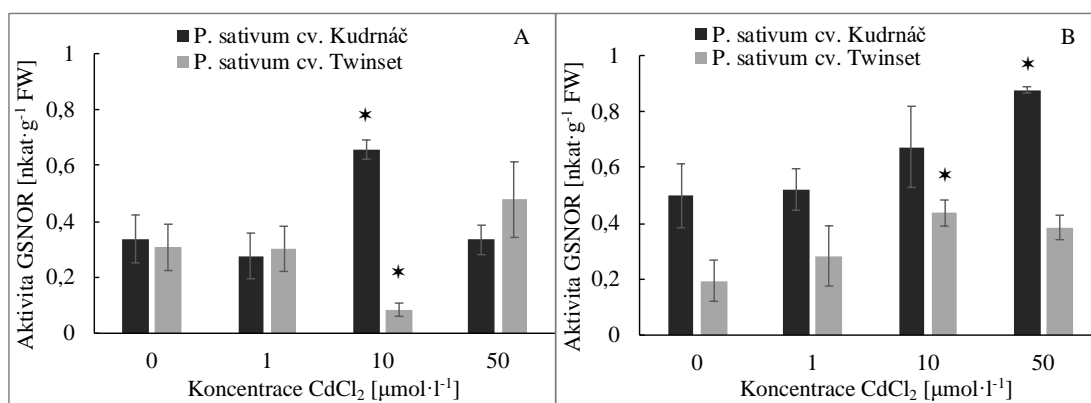


Obr. 22 Vliv přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na zastoupení S-nitrosylovaných proteinů v kořenové části rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch. St: standard molekulové hmotnosti; MW: molekulová hmotnost.

4.7.2 Vliv Cd^{2+} v médiu na aktivitu enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy

S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) je důležitý enzym podílející se na regulaci buněčné S-nitrosylace. GSNOR reguluje hladiny S-nitrosothiolů (SNOs) katabolismem S-nitrosoglutathionu (GSNO), který může fungovat jako intracelulární rezervoár NO v rostlinné buňce (Liu *et al.*, 2001).

Byl stanoven vliv přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na aktivitu enzymu GSNOR v kořenové a nadzemní části rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 23A,B). Z dosažených výsledků lze pozorovat rozdíly v aktivitě enzymu GSNOR v závislosti na části rostlin (kořenová/nadzemní část), stejně tak v závislosti na genotypu hrachu setého. V kořenové části kontrolních vzorků byla aktivita GSNOR srovnatelná, v nadzemní části byla aktivita GSNOR cca 2,5× vyšší u *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset. V kořenové části byly detekovány významné změny v aktivitě GSNOR pouze u rostlin pěstovaných v růstovém médiu s 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 , kdy došlo k téměř dvojnásobnému nárůstu aktivity GSNOR u *P. sativum* cv. Kudrnáč, a naopak k cca 3násobnému poklesu GSNOR aktivity u *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 23A). V nadzemní části obou genotypů hrachu bylo zaznamenáno významné zvýšení aktivity GSNOR se zvyšující se koncentrací CdCl_2 v růstovém médiu (Obr. 23B).



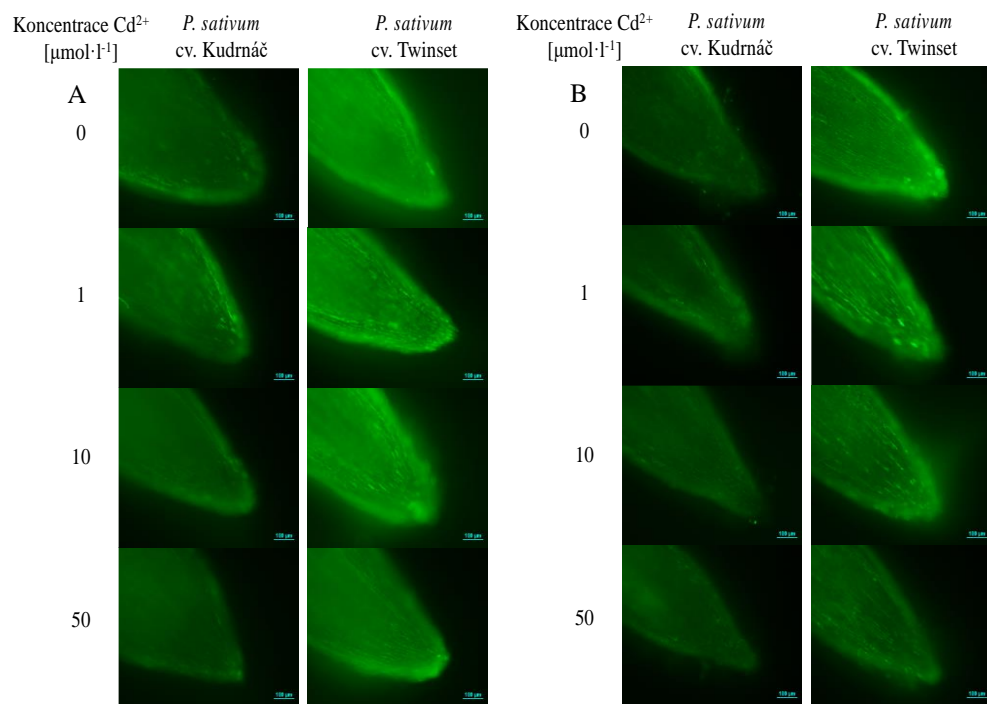
Obr. 23 Vliv přítomnosti Cd²⁺ v růstovém médiu na aktivitu enzymu S-nitrosogluthationreduktasy (GSNOR) v kořenové (A) a nadzemní části (B) rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * (p ≤ 0,05).

4.8 Vliv Cd²⁺ v médiu na produkci reaktivních forem kyslíku

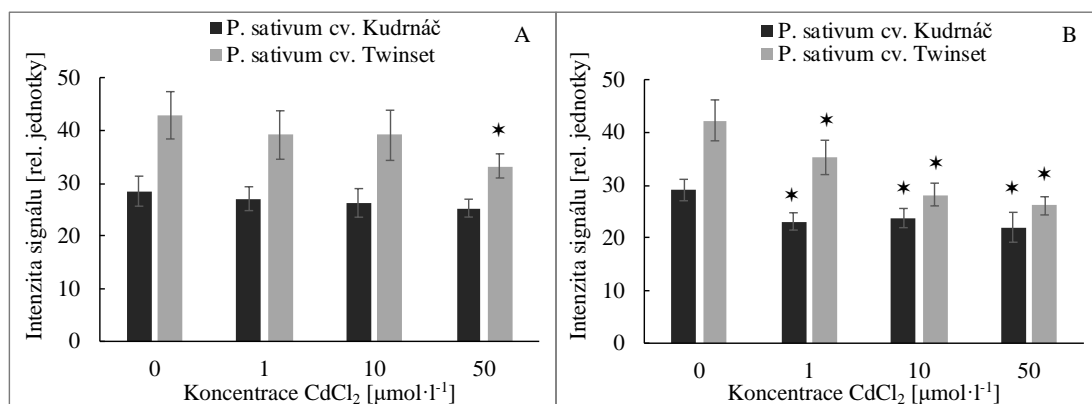
Toxicita těžkých kovů indukuje u rostlin produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) jako je superoxidový radikál, hydroxylový radikál, peroxid vodíku a singletový kyslík. Jedná se o vysoce reaktivní molekuly, které interagují s různými buněčnými složkami, což může vést k oxidačnímu poškození makromolekul. Produkce ROS způsobuje oxidační stres a poškození buněčných membrán v rostlinných buňkách, které v krajních případech může vést až k buněčné smrti (Gadjev *et al.*, 2008).

4.8.1 Histochemická detekce produkce reaktivních forem kyslíku

Histochemická detekce vlivu přítomnosti Cd²⁺ v médiu na produkci reaktivních forem kyslíku za použití fluorescenční sondy H₂DCF-DA byla provedena v apikální části hlavních (Obr. 24A) a postranních (Obr. 24B) kořenů sedmidenních rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Ze získaných snímků z fluorescenčního mikroskopu fy. Olympus BX50 (hranol U-MWB2: excitační filtr 460–490 nm, emisní filtr 520 nm) je zřejmé, že u kontrolních vzorků *P. sativum* cv. Twinset je produkce ROS 1,5× větší v porovnání s *P. sativum* cv. Kudrnáč (Obr. 24A,B a 25A,B). Výraznější pokles produkce ROS v důsledku zvyšující se koncentrace CdCl₂ v růstovém médiu byl detekován zejména u *P. sativum* cv. Twinset. Fluorescenční signál se snížil cca o 25 %, resp. 40 % v hlavním, resp. postranním kořenu rostlin pěstovaných v médiu obsahující 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂ v porovnání s kontrolními rostlinami *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 25A,B).



Obr. 24 Histochemická detekce vlivu přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na produkci reaktivních forem kyslíku. Detekce ROS fluorescenční sondou $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v apikálních částech hlavních (A) a postranních (B) kořenů rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující $0, 1, 10$ a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Měřítka $100 \mu\text{m}$.



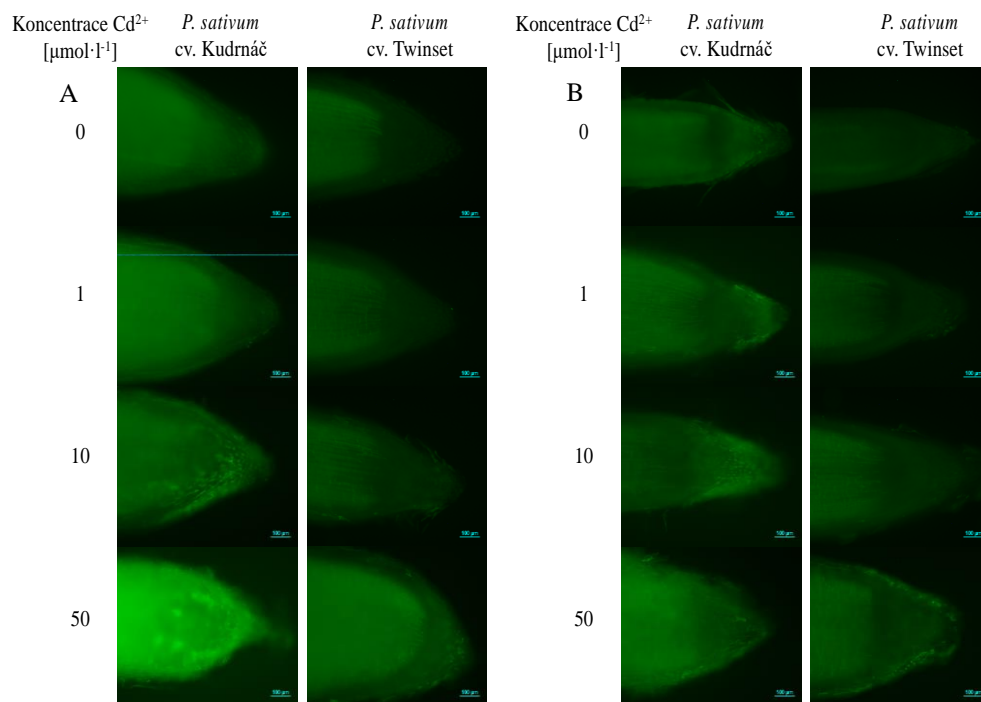
Obr. 25 Vliv přítomnosti Cd^{2+} v médiu na produkci ROS. Vyhodnocení intenzity fluorescenčního signálu po detekci ROS fluorescenční sondou $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v apikálních částech hlavních (A) a postranních (B) kořenů rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující $0, 1, 10$ a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Data představují průměr \pm SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($p \leq 0,05$). Vyhodnoceno programem ImageJ.

Z dosažených výsledků je patrné, že zvýšená koncentrace CdCl_2 v růstovém médiu měla významnější negativní efekt na produkci ROS detekovanou $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ v případě genotypu *P. sativum* cv. Twinset v porovnání s *P. sativum* cv. Kudrnáč.

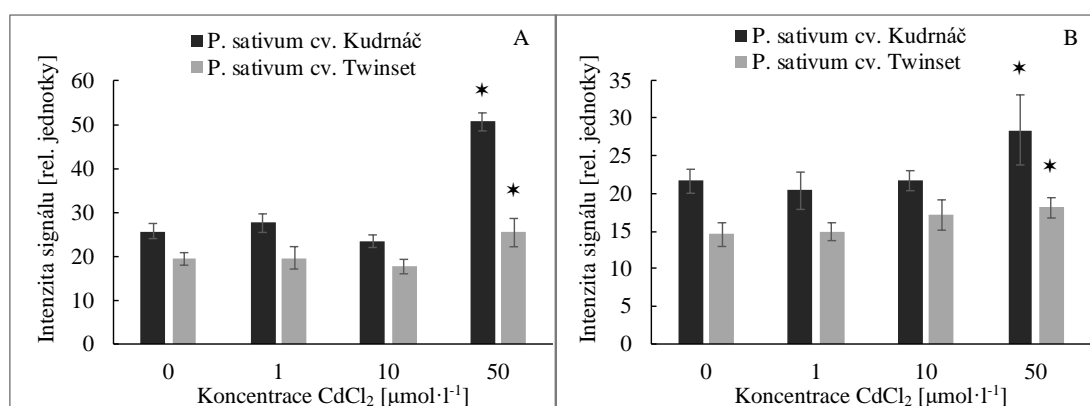
4.8.2 Histochemická detekce produkce vysoce reaktivních forem kyslíku pomocí aminofenylfluoresceinu

Pro detekci vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS) lze využít činidlo aminofenylfluorescein (APF). Aminofenylfluorescein reaguje především s hydroxylovými radikály, peroxyinitrem a kyselinou chlornanovou (HClO) (Soh, 2006).

Histochemická detekce vlivu přítomnosti Cd^{2+} v médiu na produkci vysoce reaktivních forem kyslíku za využití fluorescenční sondy APF byla provedena v apikální části hlavních (Obr. 26A) a postranních (Obr. 26B) kořenů sedmidenních rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Ze získaných snímků z fluorescenčního mikroskopu fy. Olympus BX50 (hranol U-MWB2: excitační filtr 460–490 nm, emisní filtr 520 nm) je zřejmé, že u kontrolních vzorků *P. sativum* cv. Kudrnáč je produkce hROS detekovaná APF větší v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 26A,B a 27A,B). Významný vliv na produkci hROS detekovanou fluorescenční sondou APF měla $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrace CdCl_2 , kdy byl zaznamenán dvojnásobný nárůst intenzity signálu u *P. sativum* cv. Kudrnáč v apikální části hlavního kořene v porovnání s kontrolními rostlinami. V hlavním kořenu *P. sativum* cv. Twinset a v postranních kořenech obou genotypů nebyla změna intenzity fluorescenčního signálu tak vysoká. Z dosažených výsledků je patrné, že zvýšená koncentrace CdCl_2 v růstovém médiu měla významnější efekt na produkci hROS detekovanou APF v případě genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset.



Obr. 26 Histochemická detekce vlivu přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na produkci vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS) fluorescenční sondou aminofenylfluorescein (APF) o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v apikálních částech hlavních (A) a postranních (B) kořenů rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Měřítka 100 μm .

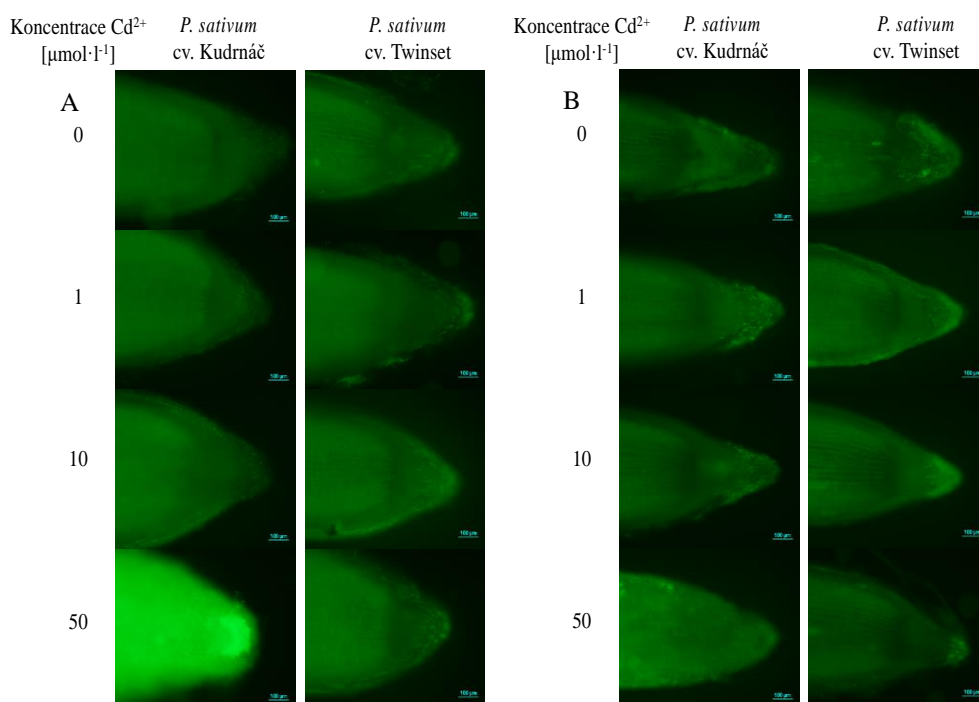


Obr. 27 Vliv přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na produkci vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS). Vyhodnocení intenzity fluorescenčního signálu po detekci hROS fluorescenční sondou APF o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v apikálních částech hlavních (A) a postranních (B) kořenů rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Data představují průměr \pm SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($p \leq 0,05$). Vyhodnoceno programem ImageJ.

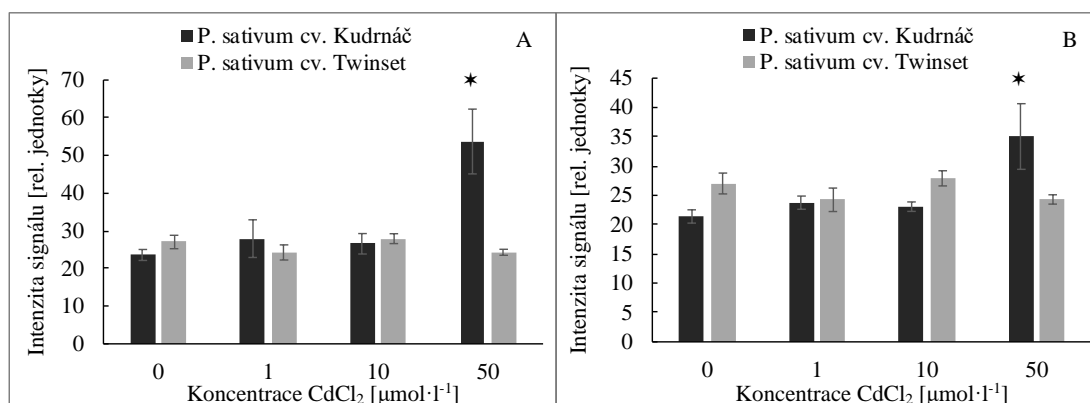
4.8.3 Histochemická detekce produkce vysoce reaktivních forem kyslíku pomocí hydroxyfenylfluoresceinu

Pro detekci vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS) lze také využít fluorescenční sondu hydroxyfenylfluorescein (HPF), který reaguje především s hydroxylovými radikály a peroxynitrirem (Soh, 2006).

Histochemická detekce vlivu přítomnosti Cd^{2+} v médiu na produkci vysoce reaktivních forem kyslíku za využití fluorescenční sondy HPF byla provedena v apikální části hlavních (Obr. 28A) a postranních (Obr. 28B) kořenů sedmidenních rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Ze získaných snímků z fluorescenčního mikroskopu fy. Olympus BX50 (hranol U-MWB2: excitační filtr 460–490 nm, emisní filtr 520 nm) je zřejmé, že u kontrolních vzorků nejsou významné rozdíly v produkci hROS (detekované HPF) mezi oběma genotypy *P. sativum* (Obr. 28A,B a 29A,B). K významnému nárůstu v relativní intenzitě fluorescence došlo pouze u *P. sativum* cv. Kudrnáč při vystavení rostlin nejvyšší koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu, kdy u hlavních kořenů relativní intenzita fluorescence vzrostla více než $2,5\times$ a u postranních kořenů více než $1,5\times$ v porovnání ke kontrolnímu vzorku (Obr. 28, 29). V hlavních ani postranních kořenech *P. sativum* cv. Twinset nebyla detekována změna intenzity fluorescenčního signálu. Z dosažených výsledků je patrné, že zvýšená koncentrace CdCl_2 v růstovém médiu měla významný efekt na produkci hROS detekovanou HPF pouze v případě genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč.



Obr. 28 Histochemická detekce vlivu přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na produkci vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS) fluorescenční sondou hydroxyfenylfluorescein (HPF) o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v apikálních částech hlavních (A) a postranních (B) kořenů rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Měřítka 100 μm .

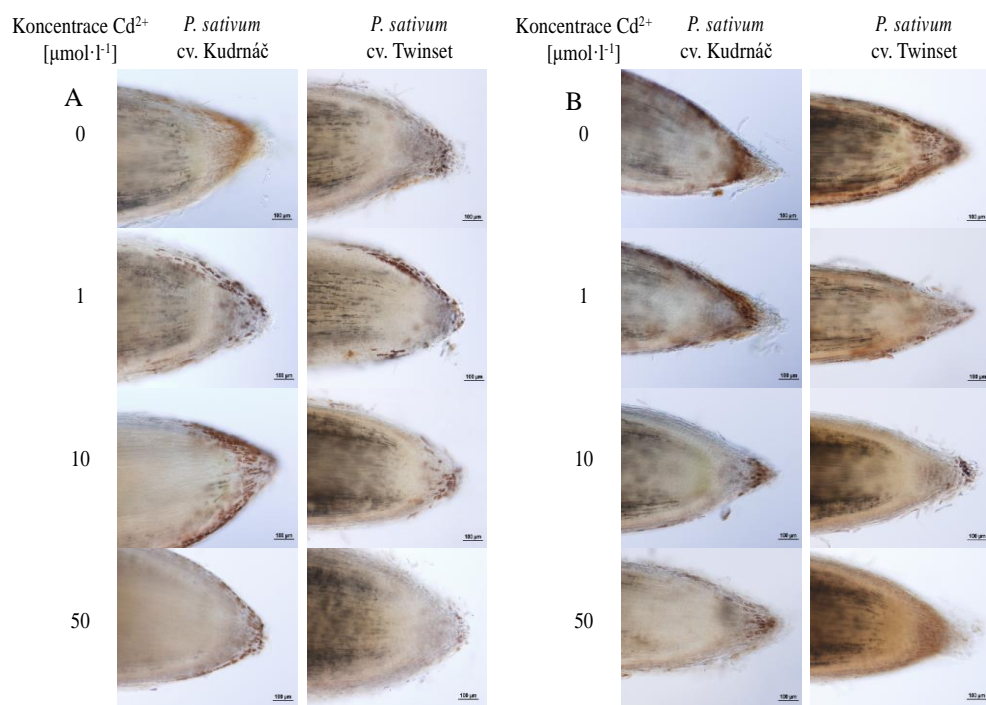


Obr. 29 Vliv přítomnosti Cd²⁺ v růstovém médiu na produkci vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS). Vyhodnocení intenzity fluorescenčního signálu po detekci hROS fluorescenční sondou HPF o koncentraci 10 μmol·l⁻¹ v apikálních částech hlavních (A) a postranních (B) kořenů rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * (p ≤ 0,05). Vyhodnoceno programem ImageJ.

4.8.4 Histochemická detekce produkce peroxidu vodíku pomocí diaminobenzidinu

Peroxid vodíku lze v rostlinných buňkách detekovat pomocí barviva 3,3'-diaminobenzidinu (DAB). DAB v přítomnosti peroxidu vodíku a rostlinných peroxidas se oxiduje za vzniku tmavě hnědého produktu (Daudi a O'Brien, 2012).

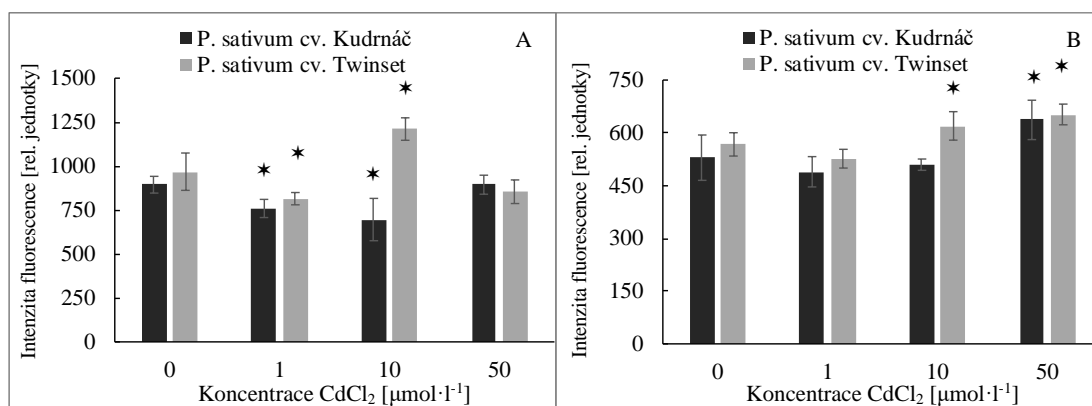
Histochemická detekce vlivu přítomnosti Cd²⁺ v médiu na produkci peroxidu vodíku metodou využívající barviva 3,3'-diaminobenzidinu (DAB) byla provedena v apikální části hlavních (Obr. 30A) a postranních (Obr. 30B) kořenů sedmidenních rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Ze získaných snímků ze světelného mikroskopu u hlavních i postranních kořenů *P. sativum* cv. Kudrnáč, pěstovaných v růstovém médiu obsahující 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂, lze pozorovat pokles v intenzitě zastoupení vzniklého tmavě hnědého produktu v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 30A,B). Z dosažených výsledků je patrné, že zvýšená koncentrace CdCl₂ v růstovém médiu měla významnější negativní efekt na produkci peroxidu vodíku detekovaného pomocí 3,3'-diaminobenzidinu v případě genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset.



Obr. 30 Histochemická detekce vlivu přítomnosti Cd²⁺ v růstovém médiu na produkci peroxidu vodíku s využitím barviva 3,3'-diaminobenzidinu (DAB) v apikálních částech hlavních (A) a postranních (B) kořenů rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂. Měřítka 100 μm.

4.8.5 Fluorimetrické stanovení peroxidu vodíku

Pro kvantifikaci produkce peroxidu vodíku byla použita detekce pomocí fluorescenční sondy Amplex Red dle metodiky uvedené v práci Demecsová *et al.* (2019). Byla stanovena změna fluorescenčního signálu po interakci Amplex Red s H₂O₂ produkovaným apikálními částmi 15-ti hlavních a 15-ti postranních kořenů sedmidenních rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂ (Obr. 31A,B). Vyšší hodnoty relativní intenzity fluorescence, prokazující intenzivnější produkci H₂O₂, byly detekovány v hlavních kořenech v porovnání s postranními kořeny u obou genotypů hrachu setého. V případě hlavních kořenů *P. sativum* cv. Kudrnáč bylo pozorováno signifikantní snížení produkce H₂O₂ u rostlin pěstovaných v růstovém médiu obsahující 1 a 10 μmol·l⁻¹ CdCl₂. V případě hlavních kořenů *P. sativum* cv. Twinset došlo nejprve při 1 μmol·l⁻¹ CdCl₂ k poklesu relativní intenzity fluorescence a poté k nárůstu při 10 μmol·l⁻¹ CdCl₂ v růstovém médiu. V případě postranních kořenů *P. sativum* cv. Kudrnáč byl patrný nárůst relativní intenzity fluorescence pouze při nejvyšší koncentraci 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂, kdežto u *P. sativum* cv. Twinset již při 10 μmol·l⁻¹ CdCl₂ v růstovém médiu.



Obr. 31 Vliv přítomnosti Cd²⁺ v růstovém médiu na produkci peroxidu vodíku. Vyhodnocení intenzity fluorescenčního signálu po detekci peroxidu vodíku fluorescenční sondou Amplex Red o koncentraci 50 μmol·l⁻¹ v apikálních částech hlavních (A) a postranních (B) kořenů rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * (p ≤ 0,05).

5 DISKUZE

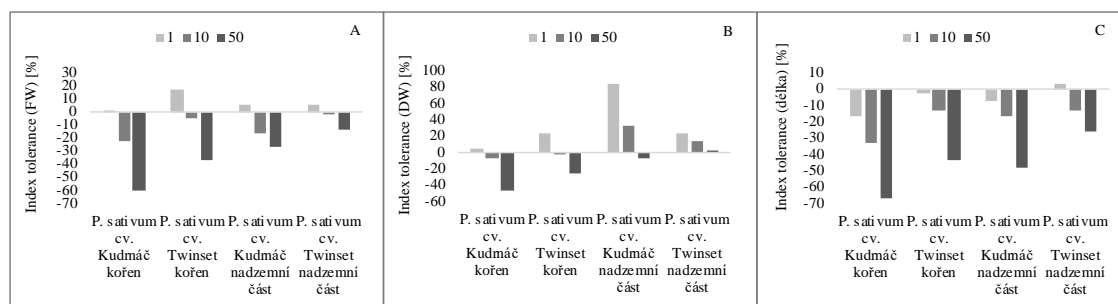
Cd je těžký kov, který v rostlinách nemá žádnou metabolickou funkci. Za běžných podmínek se Cd přirozeně vyskytuje v půdě v nízkých koncentracích. Mezi hlavní zdroje zvýšeného výskytu Cd v půdě řadíme fosfátová hnojiva, splaškové kaly, aplikace pesticidů, těžbu a průmyslové emise (Pinto *et. al.*, 2004; Kuriakose a Prasad, 2008). Ve srovnání s jinými těžkými kovy je Cd rostlinami velmi dobře absorbováno (Varo *et al.*, 1980). Těžké kovy jsou látky znečišťující životní prostředí a jejich toxicita je problémem především z ekologických a environmentálních důvodů. V půdě se vyskytují těžké kovy v různých chemických formách v závislosti na příslušném kovu, pH a přítomnosti dalších iontů (Das *et al.*, 1997). Dle přílohy č. 1 k vyhlášce č. 153/2016 Sb. preventivní hodnota obsahu Cd v zemědělské půdě je $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ půdy. Indikační hodnota prvku Cd, při jejímž překročení může být ohroženo zdraví lidí a zvířat, je stanovena na $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ půdy. Pokud jde o potenciální toxicitu kadmia pro půdní organismy a půdní mikrobiální procesy, Duxbury (1985) klasifikoval Cd jako prvek „střední“ toxicity. Přes rozdílnou mobilitu kovových iontů v rostlinách je obsah kovů obecně vyšší v kořenových než v nadzemních částech rostlin (Ramos *et al.*, 2002). Ve většině případů Cd nejprve vstupuje z půdy do kořenů rostlin a poté proniká do nadzemní části. Jakmile Cd vstoupí do kořenů, může být xylémem transportováno apoplastickou a/nebo symplastickou cestou, komplexací s několika ligandy, jako jsou organické kyseliny a/nebo fytochelatiny (Senden *et al.*, 1994; Salt a Rauser, 1995). Pro zjištění míry absorpce množství Cd rostlinou z růstového média byl v experimentální části diplomové práce stanoven obsah kadmia v kořenové a nadzemní části rostlin dvou genotypů hrachu setého pěstovaných při různých koncentracích CdCl_2 v růstovém médiu. V souladu se studiemi (Ramos *et al.*, 2002; Metwally *et al.*, 2005) byl pozorován výrazně vyšší obsah Cd v kořenových než v nadzemních částech rostlin pěstovaných v růstovém médiu obsahující $0\text{--}50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CdCl_2 , např. v případě $50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CdCl_2 byl obsah Cd^{2+} v kořenu vyšší než v nadzemní části rostlin cca 40×, resp. 20× u *P. sativum* cv. Kudrnáč, resp. *P. sativum* cv. Twinset. Krupa a Baszyński (1995) i Siedlecka a Krupa (1996) uvádějí, že z celkového množství Cd přijatého rostlinou se asi 60 % ukládá v kořenech, 15 % v listech, 10 % ve stoncích a 15 % v semenech. Ionty Cd jsou tedy akumulovány v kořenech a jen malá množství jsou transportována do nadzemních částí. Obecně platí, že obsah Cd v rostlinách klesá v pořadí: kořeny > stonky > listy > plody > semena (Blum, 1997). Dle analýzy obsahu Cd u různých genotypů hrachu setého pěstovaných

hydroponicky Metwally *et al.* (2005) detekovali v případě aplikace $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 do růstového média výrazný nárůst koncentrace Cd v kořenové části rostlin (4–20× v závislosti na typu genotypu hrachu setého) v porovnání s nadzemní částí rostlin. Rozdíl ve schopnosti absorbovat Cd dvou genotypů hrachu setého studovaných v předložené práci se projevil až při aplikaci nejvyšší testované koncentrace $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu, kdy stanovený obsah Cd byl v kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč o cca 20 % vyšší v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset (maximální koncentrace byla cca $1,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) a naopak byl v nadzemní části rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč o cca 40 % nižší než u *P. sativum* cv. Twinset (maximální koncentrace byla cca $60 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Zvyšující se množství Cd v životním prostředí ovlivňuje různé fyziologické a biochemické procesy v rostlinách (Sanità di Toppi a Gabrielli, 1999). U rostlin dochází k morfologickým i anatomickým změnám. Jedním z charakteristických účinků Cd na rostliny je inhibice růstu kořenové i nadzemní části, snížení počtu a délky postranních kořenů v důsledku změny v rychlosti fotosyntézy a distribuci makro a mikroživin (Sandalio *et al.*, 2001; Benavides *et al.*, 2005; Metwally *et al.*, 2005; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006). Výše popsaný inhibiční efekt zvýšené koncentrace Cd v růstovém médiu byl potvrzen experimenty realizovanými v rámci řešení předložené diplomové práce, kdy byl sledován vliv přítomnosti CdCl_2 v růstovém médiu v koncentracích 0, 1, 10 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 na fyziologické parametry dvou genotypů hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč, *P. sativum* cv. Twinset). Jednotlivé genotypy hrachu se mohou významně lišit citlivostí na přítomnost Cd^{2+} v růstovém médiu (Metwally *et al.*, 2005). V naší studii je z porovnání indexu tolerance pro FW, DW i délky kořene a nadzemní části rostlin zřejmý výrazně větší inhibiční efekt Cd^{2+} na růst a vývoj *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 32A–C). Dle Rodríguez-Serrano *et al.* (2006) byla u kořenů hrachu setého vystavených působení Cd pozorována inhibice růstu a vznik menších cév. Podobně Popova *et al.* (2008) prokázali, že Cd způsobuje na koncentraci závislou redukci růstu kořenové i nadzemní části hrachu setého. V předložené diplomové práci bylo stanoveno snížení délky kořenové, resp. nadzemní části rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč, resp. *P. sativum* cv. Twinset v přítomnosti $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu o 65 %, resp. 50 % a u *P. sativum* cv. Twinset o 45 %, resp. 25 % v porovnání s kontrolními rostlinami. Inhibici růstu lze pozorovat i u jiných druhů rostlin např. u sóji (Pérez Chaca *et al.*, 2014), *Arabidopsis thaliana* (Suzuki, 2005), ječmene (Wu *et al.*, 2004), slunečnice (Groppa *et al.*, 2007) a pšenice (Ranieri *et al.*, 2005).

Ve studii Lozano-Rodríguez *et al.* (1997) bylo prokázáno, že po 11denní expozici hrachu setého $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kadmiu došlo k redukci hmotnosti čerstvého materiálu (FW) kořenové, resp. nadzemní části o 80 %, resp. 70 %. V naší studii po 7denní expozici dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč, resp. *P. sativum* cv. Twinset $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 došlo k redukci FW kořenové, resp. nadzemní části rostlin o 60 %, resp. 35 % a u *P. sativum* cv. Twinset o 35 %, resp. 15 %. Dixit *et al.* (2001) uvedli, že po 7denní expozici hrachu setého $4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ bylo pozorováno snížení hmotnosti suchého materiálu (DW) o 21 %. Při vyšší koncentraci $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ v růstovém médiu došlo ke snížení DW o 52 %. Vliv $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu na redukci DW u *P. sativum* cv. Kudrnáč, resp. *P. sativum* cv. Twinset byl u kořenové, resp. nadzemní části o 45 %, resp. 10 % a u *P. sativum* cv. Twinset o 25 %, resp. 10 %. Charakteristickou vlastností působení Cd při vysokých koncentracích v růstovém médiu ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 po dobu 14 dní) na rostliny hrachu setého je redukce počtu postranních kořenů (Sandalio *et al.*, 2001). Z orientačního stanovení počtu postranních kořenů došlo k redukci u *P. sativum* cv. Kudrnáč, resp. *P. sativum* cv. Twinset o 85 %, resp. 50 %.

Z indexu tolerance FW, DW a délky kořene a nadzemní části je zřejmý jednoznačný větší inhibiční efekt zvýšené koncentrace CdCl_2 v růstovém médiu na vývoj *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 32A–C).



Obr. 32 Index tolerance hmotnosti (FW) čerstvého materiálu (A), hmotnosti (DW) suchého materiálu (B), délky (C) kořenové a nadzemní části rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v přítomnosti CdCl_2 o koncentracích 1, 10 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výpočet indexu tolerance byl proveden dle metodiky uvedené v práci Metwally *et al.* (2005).

Přítomnost Cd^{2+} v růstovém médiu má vliv na celkový obsah proteinů zastoupených v rostlinném materiálu, tzn. může dojít k ovlivnění syntézy proteinů (Bavi *et al.*, 2011). Ewais (1997) uvedl, že přítomnost Cd^{2+} v růstovém médiu má významnější vliv na kořenové části rostlin než nadzemní. Ze stanovení celkového obsahu proteinů dle studie Lozano-Rodríguez *et al.* (1997) bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací Cd v růstovém médiu (10 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) dochází ke zvýšené produkci proteinů v kořenové

i nadzemní části hrachu setého. Toto tvrzení je v souladu s experimentální částí předložené diplomové práce, kde byl stanoven vliv Cd^{2+} o různých koncentracích na celkový obsah proteinů v kořenové a nadzemní části rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. U obou genotypů pěstovaných při nejvyšší testované koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu v porovnání s kontrolními rostlinami byl detekován cca o 20–25 % zvýšený obsah proteinů v nadzemní části a v případě *P. sativum* cv. Twinset i v kořenu. V kořenu *P. sativum* cv. Kudrnáč byla stanovena dvojnásobně vyšší hladina proteinů v porovnání s kontrolními rostlinami.

Polyaminy (PA) jsou přítomny ve všech živých buňkách, mají nízkou molekulovou hmotnost a jsou polykationtové povahy (Mutlu a Yürekli, 2015). Nejběžněji se vyskytujícími volnými PA v rostlinách jsou spermidin (Spd, triamin), spermin (Spm, tetramin) a jejich prekurzor putrescin (Put, diamin), který hraje klíčovou roli v regulaci řady vývojových a fyziologických procesů rostlin (Kusano *et al.*, 2007). Vystavení rostlin různým stresovým faktorům, jako je např. osmotický stres, salinita, teplo, chlad, UV záření a přítomnost těžkých kovů, může vést ke změnám v metabolismu PA (Bouchereau *et al.*, 1999; Groppa *et al.*, 2003). Groppa *et al.* (2003) uvedli, že v při vystavení listových disků pšenice Cd může docházet k akumulaci putrescinu. Zvýšená produkce byla podpořena současným zvýšením aktivity arginindekarboxylasy (ADC), ornithindekarboxylasy (ODC) a inhibicí aktivity diaminooxidasy (DAO) (Groppa *et al.*, 2003). Ve studii Mutlu a Yürekli (2015) bylo detekováno zvýšení hladin spermidinu a sperminu po 72 h inkubace listových disků pšenice v médiu s $9 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdSO_4 . Změny byly výraznější u citlivého kultivaru *Triticum aestivum* L. cv. Quality, kdy byla stanovena i významně vyšší produkce putrescinu, v porovnání s kultivarem tolerantním k přítomnosti Cd *Triticum aestivum* L. cv. Sönmez-2001. Podobně u hrachu setého v přítomnosti zvýšené koncentrace Cd byla detekována v kořenovém systému výrazně vyšší hladina putrescinu (putrescin byl abundantní polyamin v prostředí $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2). Na akumulaci putrescinu se podílela zvýšená aktivita ADC a ODC a snížená aktivita DAO, podobně jak bylo výše uvedeno na příkladu pšenice (Groppa *et al.*, 2003; Balestrasse *et al.*, 2005). Z výsledků experimentální části diplomové práce je zřejmé, že bazální hladina PA putrescinu a kadaverinu je výrazně vyšší v kořenové části genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset, u kterého byla prokázána rezistence vůči padlí, fusariovému vadnutí a viru hrachové mozaiky PSbM a menší inhibiční efekt Cd na růst rostliny. V souladu se již dříve provedenými studiemi

se vzrůstající koncentrací CdCl_2 v růstovém médiu byla detekována zvyšující se produkce putrescinu v kořenové části systému (v $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 byla hladina putrescinu u obou genotypů dvojnásobná v porovnání s kontrolou), tento efekt velmi dobře koreluje s detekovaným intenzivním poklesem DAO aktivity (cca dvojnásobný pokles u rostlin v médiu s $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2). Produkce kadaverinu byla u obou genotypů výrazně ovlivněna pouze v přítomnosti $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Výsledky stanovení obsahu putrescinu a zejména kadaverinu jsou zatíženy poměrně velkými směrodatnými odchylkami, proto je nutné tyto výsledky považovat za orientační. Z důvodu pandemie a uzavření laboratoří na vysokých školách nebylo možné zrealizovat proměření dalších sad vzorků. Se zvyšující se koncentrací CdCl_2 byla pozorována zvýšená produkce sperminu v kořenech pouze u *P. sativum* cv. Kudrnáč, kdežto u *P. sativum* cv. Twinset nedošlo k významným změnám, podobně jako u produkce spermidinu u obou genotypů hrachu setého. V nadzemní části byla zaznamenána změna v obsahu PA pouze v případě putrescinu (cca dvojnásobný nárůst koncentrace) u *P. sativum* cv. Twinset v přítomnosti $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu. Polyaminy jsou schopné chránit rostliny před oxidačním poškozením způsobeným těžkými kovy, jako jsou Cd a Cu (Groppa *et al.*, 2001). Borrell *et al.* (1997) zjistili, že polyaminy inhibovaly peroxidaci lipidů v listech ovsu. Na úzký vzájemný vztah mezi PA a oxidačním stresem poukazuje i vliv exogenně aplikovaných PA vedoucí k potlačení tvorby nekrózy listů rajčete způsobené ozonem (Ormrod a Beckerson, 1986). Zvýšení koncentrací PA ve stresovaných rostlinách může být spojeno s jejich pozitivním účinkem na buňky, jako je kontrola pH, udržování iontové a osmotické rovnováhy a schopnost stabilizovat membrány a detoxikovat ROS (Piterková *et al.*, 2012).

Katabolismus polyaminů probíhá oxidační deaminací za pomoci enzymů aminooxidas, které převádějí biogenní polyaminy na odpovídající aminoaldehyd. DAO katalyzuje oxidační deaminaci putrescinu a spermidinu, za vzniku 4-aminobutyraldehydu (ABAL) a 1-amino-3,3-diethoxypropan (APAL) za současného uvolňování amoniaku a peroxidu vodíku (Medda *et al.*, 1995). PAO oxiduje spermidin a spermin za vzniku ABAL, APAL a peroxidu vodíku (Šebela *et al.*, 2001b). Oba enzymy jsou lokalizovány především v buněčné stěně rostlinných buněk, kde produkují peroxid vodíku potřebný pro suberinizaci a lignifikaci k zajištění její pevnosti (Angelini a Federico, 1989). DAO se ve vysokých koncentracích vyskytuje především ve dvouděložných rostlinách, a to zejména v hrachu, cizrně, čočce nebo sóji (Bagni a Tassoni, 2001). Naopak PAO

je vysoce exprimována zejména v jednoděložných rostlinách (Kakkar a Sawhney, 2002). U hrachu setého se DAO skládá ze dvou identických podjednotek o molární hmotnosti 70–95 kDa (McGuirl *et al.*, 1994). Dle Tipping a McPherson (1995) bylo analýzou Northern blot prokázáno, že hladina DAO mRNA v sazenicích čočky vzrostla ve tmě, což korelovalo s vysokou enzymovou aktivitou. Podobně dle studie Luhová *et al.* (2003) byla stanovena výrazně vyšší aktivita DAO v etiolovaných rostlinách různých genotypů hrachu setého v porovnání s rostlinami pěstovanými za kontrolovaných světelných podmínek (12h fotoperioda). U hrachu setého byla také pozorována výrazně vyšší aktivita DAO v důsledku mechanického poškození rostliny (Petřivalský *et al.*, 2007). Aktivita DAO může být rovněž ovlivněna přítomností těžkých kovů v růstovém médiu. V práci Choudhary *et al.* (1999) byl prokázán inhibiční efekt Cd^{2+} iontů na aktivitu DAO. Groppa *et al.* (2007) sledovali časový průběh účinku CdCl_2 a CuCl_2 o různých koncentracích (0,1; 0,5 a $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v médiu na aktivitu DAO v nadzemní části slunečnice po dobu 16 dnů. Cd inhibovalo aktivitu DAO od 7. dne v závislosti na použité koncentraci. Poslední den experimentu (16 den) enzymová aktivita klesla v porovnání s kontrolními vzorky až o 80 % v přítomnosti $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Naopak aktivita DAO v přítomnosti $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CuCl_2 vzrostla v porovnání s kontrolními vzorky o 42 %. Cu^{2+} ionty jsou součástí aktivního místa DAO. V hlízách a kořenech sóji v přítomnosti $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu byly stanoveny zvýšené hladiny putrescinu a současně snížená aktivita DAO (Balestrasse *et al.*, 2005). V rámci experimentální části diplomové práce byly pozorovány rozdílné změny aktivity DAO v kořenové a nadzemní části rostlin obou genotypů hrachu setého. V kořenové části obou genotypů hrachu byl zaznamenán pokles aktivity DAO se zvyšující se koncentrací CdCl_2 v médiu. V případě genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč byl detekován významnější inhibiční efekt Cd^{2+} na aktivitu DAO (5× snížení aktivity) v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset (pouze snížení aktivity o 50 %) při pěstování rostlin v prostředí $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Naopak v nadzemní části rostlin obou genotypů hrachu setého lze pozorovat 30–50 % zvýšení aktivity DAO, ale až u rostlin pěstovaných v růstovém médiu obsahující $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v porovnání s kontrolními rostlinami.

V rostlinách se degradační produkty katabolismu polyaminů dále metabolizují NAD^+ dependentními aminoaldehyddehydrogenasami (AMADH, EC 1.2.1.19 nebo EC 1.2.1.54) na aminokyseliny, např. 1-amino-3,3-diethoxypropan (APAL) a 4-aminobutyraldehyd (ABAL) na β -alanin a kyselinu γ -aminomáselnou (GABA) (Awal

et al., 1997). AMADH byla původně nalezena v bobovitých (*Fabaceae*) a lipnicovitých (*Poaceae*) rostlinách společně s aminooxidázami (Flores a Filner, 1985). Hrách setý obsahuje dva izoenzymy AMADH 1 a 2 (PsAMADH1 a PsAMADH2), které patří do rodiny ALD10 (Frömmel *et al.*, 2012). Za nativních podmínek má enzym podobu tetrameru (4×57 kDa) obsahující cysteinový zbytek v aktivním místě (Šebela *et al.*, 2000; Brauner *et al.*, 2003). Ačkoliv AMADH z hrachu setého není schopna oxidovat betainaldehyd, její N-terminální aminokyselinová sekvence se podobá sekvencím různých rostlinných betainaldehyddehydrogenas (BADH, EC 1.2.1.8) (Šebela *et al.*, 2000). Rostlinné BADH jsou známé jako intracelulární enzymy katalyzující tvorbu glycinbetainu, který se v buňkách využívá jako kompatibilní osmolyt (Weretilnyk a Hanson, 1990). Glycinbetain je v některých druzích rostlin akumulován v reakci na abiotické stresové podmínky, jako např. salinitu a sucho (Nuccio *et al.*, 1999). Aktivita hrachové AMADH byla histochemicky lokalizována v kambiu a pericyklu (Šebela *et al.*, 2000; Šebela *et al.*, 2001a). Ve studii Piterková *et al.* (2012) pozorovali vliv rozdílných koncentrací solí (NaCl/KCl) na aktivitu AMADH v kořenové a nadzemní části rostlin hrachu setého. Zvýšená koncentrace solí vedla k postupnému zvyšování aktivity AMADH. Také mechanické poškození vyvolalo zvýšení aktivity AMADH u hrachu setého se současným zvýšením obsahu putrescinu, kadaverinu, spermidinu a GABA (Petřivalský *et al.*, 2007). Jedním z dílčích cílů diplomové práce bylo stanovení vlivu Cd^{2+} na aktivitu AMADH. V souladu se studií Piterková *et al.* (2012) byla detekovaná aktivita AMADH nižší v kořenové než v nadzemní části rostlin obou genotypů hrachu setého. V kořenové i nadzemní části obou genotypů hrachu setého byla pozorována zvýšená aktivita AMADH se zvyšující se koncentrací $CdCl_2$ v růstovém médiu. V kořenech byly změny výraznější s nárůstem aktivity o cca 50–60 % v důsledku přítomnosti $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $CdCl_2$ v růstovém médiu. V nadzemní části u obou genotypů byla detekovaná pouze 10–20% změna v aktivitě AMADH.

Reaktivní formy dusíku (RNS) představují ústřední molekuly pro regulaci řady buněčných procesů v rostlinách, které jsou nedílnou součástí jejich vývoje a reakcí na biotické a abiotické stresové podmínky (Umbreen *et al.*, 2018). Mnoho studií uvádí, že hladiny NO jsou ovlivněny nejrůznějšími faktory prostředí, včetně biotických a abiotických stresových podmínek (Kopyra a Gwózdź, 2004; Arasimowicz a Floryszak-Wieczorek, 2007; Besson-Bard *et al.*, 2008). Bylo prokázáno, že Cd, jeden z nejvíce toxických prvků znečišťující životní prostředí, může interferovat s nejdůležitějším

zástupcem RNS oxidem dusnatým a ovlivňovat jeho hladiny v rostlinných buňkách (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006). Produkce NO u rostlin vystavených působení Cd závisí na jeho koncentraci a době expozice (Gill *et al.*, 2013). Cd je schopné vyvolat syntézu NO v kořenech rostlin během prvních několika hodin trvání stresu. Při analýze produkce NO v časných stádiích expozice (po 3 hodinách) v $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl₂ v kořenech pšenice vzrostla hladina NO přibližně o 73 % (Mahmood *et al.*, 2009). V kořenech *A. thaliana* po 7 hodinách působení $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdSO₄ došlo k silné produkci NO (Besson-Bard *et al.*, 2009). Valentovičová *et al.* (2010) uvedli, že vystavení kořenů ječmene po dobu 24 hodin $1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl₂ vedlo ke zvýšení produkce NO v kořenových špičkách, především v pericyklu a parenchymatických buňkách. Tyto změny byly doprovázeny zvýšením cytosolické aktivity NADPH-diaforasy, známé jako marker NOS aktivity u savců. V kořenech rostlin *Brassica juncea* a *P. sativum* vystavených působení $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl₂ začala akumulace NO po 24 hodinách a zvýšená produkce NO byla pozorována také po dlouhodobé 5denní expozici kadmiu (Bartha *et al.*, 2005). Dlouhodobé vystavení rostlin hrachu setého (14 dní) $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl₂ vedlo k významnému snížení obsahu NO v kořenech (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006). Jak uvedli Ma *et al.* (2010), v této pozdní fázi působení stresu může dojít k odumírání velké části kořenového pletiva, a proto je pravděpodobné, že byla délka expozice Cd příliš dlouhá pro zaznamenání intenzivní produkce NO. Nesrovnalosti v produkci NO jsou často vysvětlovány použitím různých koncentrací Cd, doby expozice a různých druhů rostlin v odlišných vývojových fázích v jednotlivých studiích (Groppa *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2010). Možné vysvětlení zvýšené produkce NO navrhl Besson-Bard *et al.* (2009). Cd vstupuje do kořenových buněk prostřednictvím transportéru železa (železem regulovaný transportér: IRT1). Konkurence mezi Cd²⁺ a Fe²⁺ vede ke snížení vnitrobuněčného obsahu železa a následně podporuje syntézu NO. Současně akumulovaný NO iniciuje up-regulaci exprese genů souvisejících se získáváním železa (gen pro železem regulovaný transportér 1 (IRT1), oxidasu redukující oxid železitý (FRO2) a transkripční faktor indukovaný nedostatkem železa (FIT)). Na druhé straně odpovídající proteiny syntetizované *de novo* zesilují vychytávání Cd. V diplomové práci byl sledován vliv Cd²⁺ v médiu na produkci oxidu dusnatého za využití fluorescenční sondy DAF-FM DA v apikálních částech hlavních a postranních kořenů rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl₂ po dobu 7 dnů. U *P. sativum* cv. Kudrnáč bylo prokázáno, že podobně jako v práci Bartha *et al.* (2005) se zvyšující se koncentrací CdCl₂

v růstovém médiu došlo ke zvýšení produkce NO v hlavních kořenech. V případě hlavních kořenů *P. sativum* cv. Twinset nebyly pozorovány výrazné změny v produkci NO. V případě postranních kořenů obou genotypů došlo pouze k mírným změnám v produkci NO. Vliv Cd^{2+} v médiu na produkci NO byl významnější u citlivého genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset.

NO je důležitá signální molekula zapojená do mnoha vývojových procesů a odpovědi na různé stresové podmínky u rostlin (Tichá *et al.*, 2017a). Nedávno bylo prokázáno, že poté co je NO produkováno v rostlinných pletivech má schopnost interagovat s jinými redoxními molekulami a potenciálně regulovat biologické procesy modifikací proteinů (Fancy *et al.*, 2017). Jedná se o proces tzv. S-nitrosylace, reverzibilní kovalentní modifikace, ke které dochází interakcí NO s thiolovou skupinou cysteinu v molekule např. glutathionu nebo cystein obsahujících proteinů za vzniku příslušného S-nitrosothiolu (Hogg, 2000; Spadaro *et al.*, 2010). Je dobře známo, že v rostlinách je za fyziologických a stresových podmínek S-nitrosylovaná celá řada proteinů (Lindermayr a Durner, 2009). Bylo provedeno několik proteomických studií pro identifikaci cílů S-nitrosylace v rostlinách. V extraktech buněčných kultur *A. thaliana* ošetřených GSNO a NO bylo identifikováno více než 100 proteinů (Lindermayr *et al.*, 2005), kdy 16 z nich bylo odlišně S-nitrosylovaných v souvislosti s hypersenzitivní reakcí *Arabidospis* (Romero-Puertas *et al.*, 2008). V *B. juncea* bylo identifikováno 20 S-nitrosylovaných proteinů, kdy některé z nich byly modulovány nízkou teplotou (Abat a Deswal, 2009). Bylo prokázáno, že různé fyziologické procesy, jako je biosyntéza ethylenu, obranné reakce rostlin proti biotickému a abiotickému stresu, antioxidační obrana rostlin, fotosyntéza atd. jsou regulovány S-nitrosylací klíčových enzymů zapojených v těchto procesech (Ortega-Galisteo *et al.*, 2012). Ziogas *et al.* (2013) studovali vliv 6 různých abiotických stresových faktorů (nepřetržité světlo, tma, teplo, chlad, sucho a salinita) na intenzitu S-nitrosylace v listech rostliny *Citrus aurantium* L. Bylo zjištěno, že intenzivní S-nitrosylace byla vyvolána teplem, chladem a suchem, naopak potlačena byla u rostlin vystavených salinitě a tmě. Ve studii Ortega-Galisteo *et al.* (2012) zkoumali vliv přítomnosti $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu na zastoupení S-nitrosylovaných proteinů v nadzemní části hrachu setého, kdy z dosažených výsledků nezjistili žádné rozdíly v S-nitrosylaci. V předložené diplomové práci byl stanoven vliv přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na zastoupení S-nitrosylovaných proteinů v kořenové části rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při různých koncentracích

CdCl₂. Se zvyšující se koncentrací CdCl₂ v růstovém médiu byla detekována zvýšená intenzita S-nitrosylace proteinů v porovnání s kontrolními vzorky u obou genotypů. Rozdíl v intenzitě S-nitrosylace může být pravděpodobně způsoben rozdílnou reakcí různých druhů rostlin na abiotické stresové podmínky, které vedou k nitrosačnímu stresu (Ortega-Galisteo *et al.*, 2012). Studii bude nutné doplnit kvantifikací změn na úrovni S-nitrosylace s využitím NO analyzátoru a detekcí S-nitrosylovaných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.

Nejhojněji zastoupeným S-nitrosothiolem je S-nitrosoglutathion (GSNO), který je generován S-nitrosylační reakcí NO s glutathionem (GSH) (Hasanuzzaman *et al.*, 2018). Buněčná homeostáza S-nitrosoglutathionu (GSNO) je řízena NADH-dependentní S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR) patřící do skupiny alkoholdehydrogenas III. třídy (EC 1.1.1.1) (Tichá *et al.*, 2017a). Aktivita GSNOR byla prokázána v mnoha druzích rostlin včetně *A. thaliana* (Martínez *et al.*, 1996), hrachu (Shafqat *et al.*, 1996; Barroso *et al.*, 2006), kukuřici (Fliegmann a Sandermann, 1997) a slunečnici (Chaki *et al.*, 2009). Mutace v genu pro GSNOR mohou vést ke vzniku zakrslých rostlin, zvýšení počtu květenství a zhoršené signalizaci auxinu (Kwon *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2015). Zdá se tedy, že GSNOR je nezbytná pro normální vývoj rostlin (Leterrier *et al.*, 2014). Aktivita GSNOR a následně hladiny GSNO jsou modulovány během vývoje a reakcí rostlin na různé stresové podmínky prostředí (Ziogas *et al.*, 2013; Kubienová *et al.*, 2014; Tichá *et al.*, 2017a). Změny aktivity GSNOR byly zkoumány v několika druzích rostlin vystavených různým podmínkám abiotického stresu. Například Ziogas *et al.* (2013) studovali vliv řady abiotických stresových faktorů (nepřetržité světlo, tma a chlad) na aktivitu GSNOR v listech rostlin *Citrus aurantium* L. Nepřetržité světlo a tma způsobily zvýšení aktivity GSNOR, naopak chlad vedl ke snížení enzymové aktivity. Současně se snížením aktivity GSNOR po vystavení rostlin nízké teplotě (−8 °C) došlo k silné down-regulaci hladin transkriptu GSNOR. Naopak v nadzemní části rostlin hrachu setého vystavených nízké teplotě (8 °C) po dobu 48 hodin došlo k nárůstu aktivity GSNOR o 67 % ve srovnání s kontrolními rostlinami (Corpas *et al.*, 2007). U rostlin pepře (*Capsicum annuum* L.) vystavených nízké teplotě (8 °C) po dobu 24 hodin byl trend podobný, kdy aktivita GSNOR vzrostla o 32 % (Airaki *et al.*, 2012). Dle studie Barroso *et al.* (2006) došlo v nadzemní části hrachu setého v přítomnosti 50 μmol·l⁻¹ CdCl₂ ke snížení aktivity GSNOR o 31 %. Rozdílné výsledky aktivity GSNOR za různých podmínek abiotického stresu naznačují, že aktivita GSNOR je diferencovaně regulována

v závislosti na typu stresu (Ziogas *et al.*, 2013). V experimentální části diplomové práce byl stanoven vliv přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu na aktivitu GSNOR v kořenové a nadzemní části rostlin dvou genotypů hrachu setého pěstovaných při různých koncentracích CdCl_2 . V kořenové části byly detekovány významné změny v aktivitě GSNOR pouze u rostlin pěstovaných v růstovém médiu s $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 , kdy došlo k téměř dvojnásobnému nárůstu aktivity GSNOR u *P. sativum* cv. Kudrnáč, a naopak k cca 3násobnému poklesu GSNOR aktivity u *P. sativum* cv. Twinset. V nadzemní části obou genotypů hrachu setého bylo zaznamenáno významné zvýšení aktivity GSNOR se zvyšující se koncentrací CdCl_2 v růstovém médiu.

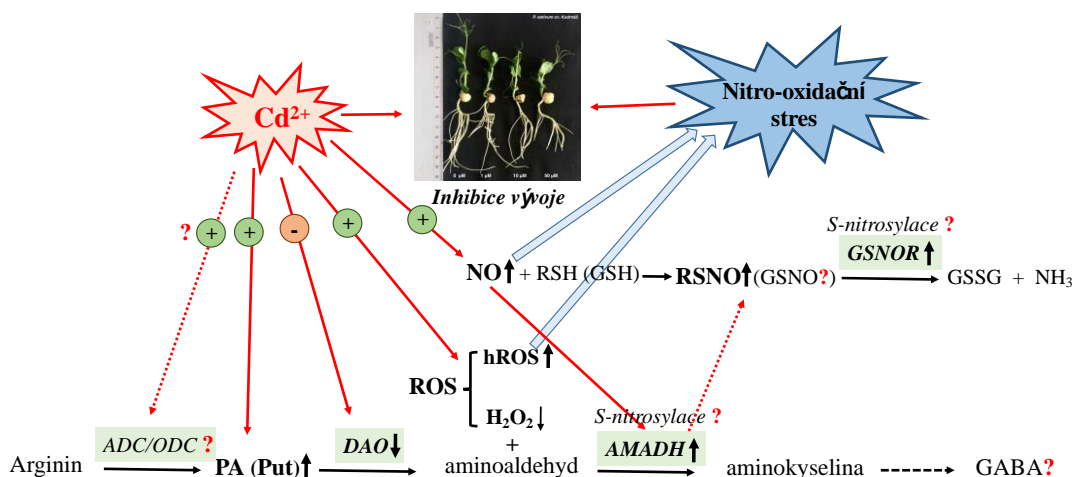
Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou částečně redukované nebo excitované formy atmosférického kyslíku. Mezi zástupce ROS řadíme superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydroxylový radikál (OH^{\bullet}), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) nebo peroxid vodíku (H_2O_2). Je dobře známo, že vysoké koncentrace těžkých kovů mohou způsobit nadměrnou produkci ROS vedoucí k oxidačnímu stresu u rostlin (Cho a Seo, 2005). Oxidační stres může vést k peroxidaci lipidů, poškození DNA, redoxní nerovnováze a denuraci buněčných struktur a membrán, což může v konečném důsledku vést k aktivaci drah programované buněčné smrti (Emamverdian *et al.*, 2015). Nadměrná produkce ROS, zejména H_2O_2 , byla široce pozorována v souvislosti s expozicí rostlin těžkými kovy (Hossain *et al.*, 2015). Důkazem toho je zvýšená peroxidace lipidů u rostlin. Například po vystavení *Solanum nigrum* kadmiu došlo k nahromadění malondialdehydu (MDA), jednoho z produktů rozkladu polynenasycených mastných kyselin biomembrán, což naznačuje zvýšenou oxidaci membránových lipidů pomocí ROS (Deng *et al.*, 2010). Bylo prokázáno, že stres způsobený Cd vede ke zvýšené produkci MDA u různých druhů rostlin, kdy ve většině případů zvýšený obsah H_2O_2 koreloval s vyšší hladinou MDA (Hossain *et al.*, 2010). Cd má také schopnost vázat se na thiolové skupiny a tím inaktivovat enzymy obsahující thiol, jako např. glutathionreduktasu nebo askorbátperoxidasu. Současně Cd může inhibovat enzymy podílející se na odstraňování H_2O_2 , tj. GSH/GR, CAT a APX a může zvyšovat aktivitu SOD vedoucí ke vzniku O_2 ale také H_2O_2 , což může vést k jeho akumulaci (Schützendübel *et al.*, 2001). Romero-Puertas *et al.* (2004) studovali účinek těžkého kovu Cd na produkci H_2O_2 a $\text{O}_2^{\bullet-}$ u listů hrachu setého po 2týdenní expozici $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Cd za využití histochemické detekce pomocí diaminobenzidinu (DAB) a nitrotetrazoliové modři (NBT). Subcelulární lokalizace těchto reaktivních forem kyslíku byla studována pomocí cytochemie za využití CeCl_3

a Mn/DAB barvení s následným pozorováním elektronovým mikroskopem. U listů hrachu setého v přítomnosti $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 došlo ve srovnání s kontrolními rostlinami 6× ke zvýšení obsahu H_2O_2 , kdy hromadění H_2O_2 bylo pozorováno především v plazmatické membráně transferových, mesofylových a epidermálních buněk. Akumulace H_2O_2 byla také histochemicky detekována v kořenech borovice a hrachu setého vystavených působení Cd (Schützendübel *et al.*, 2001; Romero-Puertas *et al.*, 2003). V diplomové práci bylo využito několik fluorescenčních sond a barviv k histochemické detekci ROS ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$), hROS (APF, HPF) a H_2O_2 (DAB) v hlavních a postranních kořenech rostlin dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných při různých koncentracích CdCl_2 v růstovém médiu. Z dosažených výsledků histochemické detekce ROS za využití fluorescenční sondy $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ nebyly v hlavních ani postranních kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč pozorovány rozdíly se zvyšující se koncentrací CdCl_2 v růstovém médiu, naopak u *P. sativum* cv. Twinset došlo k poklesu v produkci ROS. Podobně histochemickou detekcí peroxidu vodíku za využití barviva 3,3'-diaminobenzidinu bylo zjištěno, že u hlavních i postranních kořenů obou genotypů hrachu setého došlo k postupnému snížení v produkci H_2O_2 . Naopak v případě histochemické detekce hROS byla pozorována významně zvýšená produkce při nejvyšší koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 , ale pouze u hlavních a postranních kořenů *P. sativum* cv. Kudrnáč.

Získané výsledky v rámci řešení diplomové práce, společně s již publikovanými daty nám umožňují nastínit komplexní pohled na reakce rostliny vystavené působení zvýšené koncentrace Cd v prostředí na úrovni metabolismus polyaminů a ROS s RNS vedoucí k nitro-oxidačnímu stresu (Obr. 33). PA se podílí na snížení oxidačního stresu, inhibice DAO vede ke snížení produkce H_2O_2 , současně dochází k intenzivní produkci hROS. Zvýšená produkce NO může ovlivnit S-nitrosylací aktivitu AMADH (dosud nepublikované výsledky: Vrbová, 2019) i GSNOR (Begara-Morales *et al.*, 2018) a řadu enzymů podílejících se na metabolismu ROS (Noctor *et al.*, 2016).

Bylo by vhodné v rámci řešení daného projektu se dále zaměřit na stanovení vlivu Cd na aktivitu ADC, ODC a na intenzitu produkce GABA. Prokázat, zda dochází k S-nitrosylaci AMADH a GSNOR metodou biotin-switch s využitím vhodných protilátek a případně s využitím hmotnostní spektrometrie. Stanovit intenzitu oxidačního stresu, např. stanovením lipidické peroxidace.

Intenzity změn detekovaných parametrů metabolismu PA, ROS a RNS se významně lišily u studovaných genotypů hrachu. Změny byly významnější u genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset, u kterého byla prokázána rezistence vůči padlí, fusariovému vadnutí a viru hrachové mozaiky PSbM a menší inhibiční efekt Cd na růst rostliny. Vyšší produkce NO a ROS, intenzivnější S-nitrosylace v kořenech poukazují na významnější zapojení nitro-oxidačního stresu u genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč v reakci rostliny na přítomnost Cd v růstovém médiu vedoucí k větší inhibici vývoje rostlin.



Obr. 33 Vliv zvýšené koncentrace Cd²⁺ iontů v růstovém médiu na metabolismus polyaminů, produkci ROS, RNS, iniciaci nitro-oxidačního stresu vedoucí k inhibici vývoje rostliny (pro kořenový systém *P. sativum* cv. Kudrnáč).

6 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše se zaměřením na úlohu reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) v obranných reakcích aktivovaných u rostlin vystavených působení těžkého kovu kadmia. Byla popsána role ROS a RNS v regulaci rozmanitých biologických procesů prostřednictvím oxidace, nitrace a S-nitrosylace proteinů. Popsána byla také role polyaminů a enzymů podílejících se na jejich metabolismu (diaminooxidasy a aminoaldehyddehydrogenasy) v reakci na abiotický stres.

Experimentální práce byla realizována na modelovém systému dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset lišících se rezistencí vůči patogenům. V experimentální části diplomové práce byl pro zjištění míry absorpce Cd rostlinou z růstového média stanoven obsah kadmia v kořenové a nadzemní části rostlin pěstovaných v růstovém médiu obsahující 0, 1, 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl₂. Dále byl stanoven vliv přítomnosti Cd²⁺ v růstovém médiu na fyziologické parametry rostlin. Pro zjištění role polyaminů a enzymů podílejících se na jejich metabolismu v reakci na abiotický stres byl studován vliv Cd²⁺ na produkci polyaminů a aktivitu enzymů (DAO a AMADH) podílejících se na jejich degradaci. Vliv Cd²⁺ na produkci ROS a RNS byl stanoven histochemickou detekcí. Věnována byla také pozornost vlivu Cd²⁺ na zastoupení S-nitrosylovaných proteinů v kořenové části rostlin obou genotypů. V souvislosti s regulací buněčné S-nitrosylace byl stanoven vliv Cd²⁺ na aktivitu S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR), enzymu katabolismu S-nitrosoglutathionu (GSNO).

Z dosažených výsledků experimentální části diplomové práce lze vyvodit následující dílčí závěry:

1. Obsah Cd byl výrazně vyšší v kořenové, než v nadzemní části rostlin u obou genotypů pěstovaných v růstovém médiu obsahující 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl₂.
2. Byl stanoven inhibiční efekt zvýšené koncentrace Cd v růstovém médiu na fyziologické parametry rostlin obou genotypů. Výrazně větší inhibiční efekt Cd²⁺ na růst a vývoj byl pozorován u *P. sativum* cv. Kudrnáč (citlivý genotyp) v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset.

3. Vystavení rostlin různým koncentracím CdCl_2 vedlo ke změnám v produkci polyaminů (zejména putrescinu) v kořenové a nadzemní části obou genotypů hrachu setého.
4. Zvyšující se koncentrace CdCl_2 v růstovém médiu způsobila inhibici aktivity DAO v kořenové části rostlin obou genotypů hrachu setého. Naopak v nadzemní části rostlin došlo k aktivaci enzymu.
5. Stres způsobený přítomností Cd^{2+} v růstovém médiu vedl k aktivaci enzymu AMADH v kořenové i nadzemní části rostlin obou genotypů hrachu setého.
6. Přítomnost CdCl_2 v růstovém médiu neměla významný vliv na proteinové zastoupení AMADH v nadzemní části rostlin. V kořenové části byl detekován pokles zastoupení AMADH s výjimkou mírně zvýšeného zastoupení proteinu AMADH u rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč pěstovaných v růstovém médiu obsahující $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 .
7. Zvyšující se koncentrace CdCl_2 v růstovém médiu vedla k zvýšené produkci NO v hlavních i postranních kořenech 7denních rostlin obou genotypů hrachu setého.
8. Se zvyšující se koncentrací CdCl_2 v růstovém médiu byla detekována zvýšená intenzita S-nitrosylace proteinů v porovnání s kontrolními vzorky u obou genotypů. Významně intenzivnější S-nitrosylace proteinů je patrná u *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s genotypem *P. sativum* cv. Twinset.
9. Vystavení rostlin různým koncentracím CdCl_2 vedlo ke změnám v aktivitě GSNOR. V kořenové části byly pozorovány odlišné reakce dvou genotypů hrachu na přítomnost CdCl_2 v růstovém médiu (nárůst aktivity u *P. sativum* cv. Kudrnáč, naopak pokles aktivity u *P. sativum* cv. Twinset v přítomnosti $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2). V nadzemní části obou genotypů hrachu bylo zaznamenáno významné zvýšení aktivity GSNOR se zvyšující se koncentrací CdCl_2 v růstovém médiu.
10. V důsledku zvyšující se koncentrace CdCl_2 v růstovém médiu došlo u hlavních i postranních kořenů obou genotypů hrachu setého k poklesu v produkci H_2O_2 , a naopak byla pozorována zvýšená produkce hROS v přítomnosti $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 v růstovém médiu.

11. Výraznější efekt přítomnosti Cd^{2+} v růstovém médiu byl pozorován u citlivého genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s genotypem *P. sativum* cv. Twinset.

Díleč získané výsledky vedly k vytvoření hypotetického modelu vzájemné provázanosti změn v produkci PA, ROS, RNS a regulace enzymových aktivit S-nitrosylací. Pro dokončení studie je nutné zejména zrealizovat detekci S-nitrosylovaných proteinů se zaměřením na AMADH a GSNOR.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abat J. K., Deswal, R. (2009): Differential modulation of S-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: Change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *Proteomics* **9**(18), 4368–4380.
- Acosta C., Pérez-Amador M. A., Carbonell J., Granell A. (2005): The two ways to produce putrescine in tomato are cell-specific during normal development. *Plant Sci* **168**, 1053–1057
- Airaki M., Leterrier M., Mateos R. M., Valderrama R., Chaki M., Barroso J. B., del Río L. A., Palma J. M., Corpas F. J. (2012): Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant, Cell & Environment* **35**(2), 281–295.
- Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A. F. (2010): Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* **231**(6), 1237–1249.
- Alfenito M. R., Souer E., Goodman C. D., Buell R., Mol J., Koes R., Walbot V. (1998): Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione-S-transferases. *Plant Cell* **10**(7), 1135–1149.
- Ameziane-El-Hassani R., Dupuy C. (2013): Detection of intracellular Reactive Oxygen Species (CM-H₂DCFDA). *Bio Protocol* **1**(3).
- Angelini R., Federico R. (1989): Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *Journal Of Plant Physiology* **135**(2), 212–217.
- Anwar R., Mattoo A. K., Handa A. K. (2015): Polyamine interactions with plant hormones: crosstalk at several levels. *Int. J. Hydrogen Energy* **38**, 1039–1051.
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Of Plant Biology* **55**(1), 373–399.
- Arasimowicz M., Floryszak-Wieczorek J. (2007): Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science* **172**(5), 876–887.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Gwóźdź E. A. (2011): The message of nitric oxide in cadmium challenged plants. *Plant Science* **181**(5), 612–620.
- Asgher M., Per T. S., Masood A., Fatma M., Freschi L., Corpas F. J., Khan N. A. (2017): Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress. *Environmental Science And Pollution Research* **24**(3), 2273–2285.
- Awal H. M. A., Kinoshita T., Yoshida I., Doe M., Hirasawa E. (1997): Aminoaldehyde dehydrogenase of pea epicotyls. *Phytochemistry* **44**, 997–1000.
- Aziz A., Martin-Tanguy J., Larher F. (1999): Salt stress-induced proline accumulation and changes in polyamine and tyramine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Sci* **145**, 83–91
- Bagni N., Tassoni A. (2001): Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**(3), 301–317.
- Balestrasse K. B., Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L. (2005): Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant And Soil* **270**(1), 343–353.
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F. J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M. C., Valderrama R., Sandalio L. M., del Río L. A. (2006): Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal Of Experimental Botany* **57**(8), 1785–1793.
- Bartha B., Kolbert Z., Erdei L. (2005): Nitric oxide production induced by heavy metals in *Brassica juncea* L. Czern. and *Pisum sativum* L. *Acta Biologica Szegediensis* **49**(1–2), 9–12.
- Bavi K., Kholdebarin B., Moradshahi A. (2011): Effect of cadmium on growth, protein content and peroxidase activity in pea plants. *Pakistan Journal Of Botany* **43**(3).
- Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A., Freeman B. A. (1990): Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **87**(4), 1620–1624.

- Begara-Morales J. C., Chaki M., Valderrama R., Sánchez-Calvo B., Mata-Pérez C., Padilla M. N., Corpas F. J., Barroso J. B. (2018): Nitric oxide buffering and conditional nitric oxide release in stress response. *Journal Of Experimental Botany* **69**(14), 3425–3438.
- Begara-Morales J. C., Sanchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Perez C., Corpas F. J., Barroso J. B. (2016): Protein S-nitrosylation and S-glutathionylation as regulators of redox homeostasis during abiotic stress response. In: *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses* (Gupta D. K., Palma J. N., Corpas F. J. eds.), Springer, Switzerland, 365–386.
- Beligni M., Lamattina L. (1999): Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* **208**(3), 337–344.
- Benavides M. P., Gallego S. M., Tomaro M. L. (2005): Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal Of Plant Physiology* **17**(1), 21–34.
- Benhar M., Forrester M. T., Stamler J. S. (2009): Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**(10), 721–732.
- Besson-Bard A., Courtois C., Gauthier A., Dahan J., Dobrowolska G., Jeandroz S., Pugin A., Wendehenne D. (2008): Nitric Oxide in Plants: Production and Cross-talk with Ca²⁺ Signaling. *Molecular Plant* **1**(2), 218–228.
- Besson-Bard A., Gravot A., Richaud P., Auroy P., Duc C., Gaymard F., Taconnat L., Renou J. P., Pugin A., Wendehenne D. (2009): Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology* **149**(3), 1302–1315.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003): Antioxidants, oxidative samage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals Of Botany* **91**(2), 179–194.
- Blum W. H. (1997): Cadmium uptake by higher plants. In: *Proceedings of extended abstracts from the Fourth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements* (Islandar I. K. ed.), University of California, USA, 109–110.
- Borková M. (2008): *Hodnocení obsahu glutathionu v rostlinách jako markeru znečištění životního prostředí těžkými kovy*. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Česká republika.
- Borrell A., Carbonell L., Farras R., Puig-Parellada P., Tiburcio A. F. (1997): Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. *Physiologia Plantarum* **99**(3), 385–390.
- Boucher J. L., Genet A., Vadon S., Delaforge M., Henry Y., Mansuy D. (1992): Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of ω-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **187**(2), 880–886.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999): Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* **140**(2), 103–125.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1–2), 248–254.
- Brauner F., Šebela M., Snégaroff J., Peč P., Meunier J. C. (2003): Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Physiology And Biochemistry* **41**(1), 1–10.
- Bricker T. J., Pichtel J., Brown H. J., Simmons M. (2001): Phytoextraction of Pb and Cd from a superfund soil: Effects of amendments and croppings. *Journal Of Environmental Science And Health, Part A* **36**(9), 1597–1610.
- Brumbarova T., Le C. T., Bauer P. (2016): Hydrogen peroxide measurement in *Arabidopsis* root tissue using Amplex Red. *Bio-protocol* **6**(21), 1999.
- Cassia R., Nocioni M., Correa-Aragunde N., Lamattina L. (2018): Climate change and the impact of greenhouse gasses: CO₂ and NO, friends and foes of plant oxidative stress. *Frontiers In Plant Science* **9**.
- Corpas F. J., Carreras A., Esteban F. J., Chaki M., Valderrama R., del Río L. A., Barroso J. B. (2008): Localization of S-nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and S-nitrosoglutathione reductase activity in plants. In: *Globins and Other Nitric Oxide-Reactive Proteins* (Poole R. K. ed.), Elsevier, 561–574
- Corpas F. J., del Río L. A., Barroso J. B. (2007): Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends In Plant Science* **12**(10), 436–438.

- Correa-Aragunde N., Foresi N., del Castello F., Lamattina L. (2018): A singular nitric oxide synthase with a globin domain found in *Synechococcus* PCC 7335 mobilizes N from arginine to nitrate. *Scientific Reports* **8**(1).
- Das P., Samantaray S., Rout G. R. (1997): Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution* **98**(1), 29–36.
- Das S. K., Patra J. K., Thatoi H. (2016): Antioxidative response to abiotic and biotic stresses in mangrove plants: A review. *International Review Of Hydrobiology* **101**(1–2), 3–19.
- Daudi A., O'Brien J. A. (2012): Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves. *Bio Protocol* **2**(18).
- del Río L. A., Sandalio L. M., Corpas F. J., Palma J. M., Barroso J. B. (2006): Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **141**(2), 330–335.
- Demecsová L., Bočová B., Zelinová V., Tamás L. (2019): Enhanced nitric oxide generation mitigates cadmium toxicity via superoxide scavenging leading to the formation of peroxynitrite in barley root tip. *Journal Of Plant Physiology* **238**, 20–28.
- Demiral T., Türkan I. (2005): Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental And Experimental Botany* **53**(3), 247–257.
- Deng X., Xia Y., Hu W., Zhang H., Shen Z. (2010): Cadmium-induced oxidative damage and protective effects of N-acetyl-l-cysteine against cadmium toxicity in *Solanum nigrum* L. *Journal Of Hazardous Materials* **180**, 722–729.
- Dismukes G. C., Klimov V. V., Baranov S. V., Kozlov Y. N., Gupta J., Tyryshkin A. (2001): The origin of atmospheric oxygen on earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **98**(5), 2170–2175.
- Dixit V., Pandey V., Shyam R. (2001): Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal Of Experimental Botany* **52**(358), 1101–1109.
- Duxbury T. (1985): Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. *Advances in Microbial Ecology* **8**, 185–235.
- Edwards R., Dixon D. (2005): Plant glutathione transferases. *Methods in Enzymology* **401**, 169–186.
- Edwards R., Dixon D. P., Walbot V. (2000): Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Sciences* **5**, 193–198.
- Eller M. H., Warner A. L., Knap H. T. (2006): Genomic organization and expression analyses of putrescine pathway genes in soybean. *Plant Physiology And Biochemistry* **44**(1), 49–57.
- Emamverdian A., Ding Y., Mokhberdorran F., Xie Y. (2015): Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The Scientific World Journal*, 1–18.
- Ewais E. A. (1997): Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. *Biologia Plantarum* **39**(3), 403–410.
- Fancy N. N., Bahlmann A. K., Loake G. J. (2017): Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* **40**(4), 462–472.
- Fariduddin Q., Varshney P., Yusuf M., Ahmad A. (2013): Polyamines: potent modulators of plant responses to stress. *Journal Of Plant Interactions* **8**(1), 1–16.
- Farnese F. S., Menezes-Silva P. E., Gusman G. S., Oliveira J. A. (2016): When bad guys become good ones: The key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Frontiers In Plant Science* **7**.
- Fliegmann J., Sandermann J. H. (1997): Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase cDNA: a novel plant gene of detoxification. *Plant Molecular Biology* **34**(6), 843–854.
- Flores H. E., Filner P. (1985): Polyamine catabolism in higher plants: Characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regulation* **3**, 277–291.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L. (2010): Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *The Plant Cell* **22**(11), 3816–3830.

- Fornazier R. F., Ferreira R. R., Pereira G. J. G., Molina S. M. G., Smith R. J., Lea P. J., Azevedo R. A. (2002): Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect on antioxidant enzymes. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture* **71**(2), 125–131.
- Forrester M. T., Foster M. W., Benhar M., Stamler J. S. (2009): Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. *Free Radical Biology And Medicine* **46**(2), 119–126.
- Foyer C. H., Noctor G. (2005): Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* **17**(7), 1866–1875.
- Frömmel J., Soral M., Tylichová M., Kopečný D., Demo G., Wimmerová M., Šebela M. (2012): Plant aminoaldehyde dehydrogenases oxidize a wide range of nitrogenous heterocyclic aldehydes. *Amino Acids* **43**(3), 1189–1202.
- Gadjev I., Stone J. M., Gechev T. S. (2008): Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International Review Of Cell And Molecular Biology* **270**, 87–144.
- Gao H. J., Yang H. Q., Wang J. X. (2009): Arginine metabolism in roots and leaves of apple (*Malus domestica* Borkh.): The tissue-specific formation of both nitric oxide and polyamines. *Scientia Horticulturae* **119**(2), 147–152.
- Gemperlová L. (2009): *Studium metabolismu polyaminů v buněčném dělení a jejich úloha ve fyziologických pochodech rostlin*. Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika.
- Ghaly A. E., Ramakrishnan V. V. (2015): Nitrogen sources and cycling in the ecosystem and its role in air, water and soil pollution: A critical review. *Journal Of Pollution Effects & Control* **3**(2).
- Gill S. S., Hasanuzzaman M., Nahar K., Macovei A., Tuteja N. (2013): Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology And Biochemistry* **63**, 254–261.
- Gill S. S., Tuteja N. (2014): Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior* **5**(1), 26–33.
- Groppa M. D., Benavides M. P., Tomaro M. L. (2003): Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. *Plant Science* **164**(2), 293–299.
- Groppa M. D., Ianuzzo M. P., Tomaro M. L., Benavides M. P. (2007): Polyamine metabolism in sunflower plants under long-term cadmium or copper stress. *Amino Acids* **32**(2), 265–275.
- Groppa M. D., Rosales E. P., Iannone M. F., Benavides M. P. (2008): Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry* **69**(14), 2609–2615.
- Groppa M. D., Tomaro M. L., Benavides M. P. (2001): Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science* **161**(3), 481–488.
- Gupta K. J., Fernie A. R., Kaiser W. M., van Dongen J. T. (2011): On the origins of nitric oxide. *Trends In Plant Science* **16**(3), 160–168.
- Ha H. C., Sirisoma N. S., Kuppusamy P., Zweier J. L., Woster P. M., Casero R. A. (1998): The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **95**(19), 11140–11145.
- Halliwell B. (2006): Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal Of Neurochemistry* **97**(6), 1634–1658.
- Hao G. P., Zhang J. H. (2010): The role of nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plants under abiotic stress. In: *Nitric Oxide in Plant Physiology* (Hayat S., Mori M., Pichtel J., Ahmad A. eds.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 115–138.
- Hasanuzzaman M., Gill S. S., Fujita M. (2013): Physiological role of nitric oxide in plants grown under adverse environmental conditions. In: *Plant Acclimation to Environmental Stress* (Tuteja N., Singh Gill S. eds.), Springer, New York, 269–322.
- Hasanuzzaman M., Oku H., Nahar K., Bhuyan M. H. M. B., Mahmud J. A., Baluska F., Fujita M. (2018): Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. *Plant Biotechnology Reports* **12**(2), 77–92.

- Hatmi S., Gruau C., Trotel-Aziz P., Villaume S., Rabenoelina F., Baillieul F., Eullaffroy P., Clément C., Ferchichi A., Aziz A. (2015): Drought stress tolerance in grapevine involves activation of polyamine oxidation contributing to improved immune response and low susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Journal Of Experimental Botany* **66**(3), 775–787.
- Hatmi S., Villaume S., Trotel-Aziz P., Barka E. A., Clément C., Aziz A. (2018): Osmotic stress and ABA affect immune response and susceptibility of grapevine berries to gray mold by priming polyamine accumulation. *Frontiers In Plant Science* **9**.
- Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009): Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické Listy* **103**, 788–794.
- Hogg N. (2000): Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radical Biology And Medicine* **28**(10), 1478–1486.
- Hossain M. A., Bhattacharjee S., Armin S. M., Qian P., Xin W., Li H. Y., Burritt D. J., Fujita M., Tran L. P. (2015): Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers In Plant Science* **6**.
- Hossain M. A., Hasanuzzaman M., Fujita M. (2010): Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress. *Physiology And Molecular Biology Of Plants* **16**(3), 259–272.
- Huang J., Sommers E. M., Kim-Shapiro D. B., King S. B. (2002): Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. *Journal Of The American Chemical Society* **124**(13), 3473–3480.
- Chaki M., Fernández-Ocaña A. M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F. J., Luque F., Gómez-Rodríguez M. V., Begara-Morales J. C., Corpas F. J., Barroso J. B. (2009): Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant And Cell Physiology* **50**(2), 265–279.
- Chen D., Shao Q., Yin L., Younis A., Zheng B. (2019): Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Frontiers In Plant Science* **9**.
- Cheng T., Shi J., Dong Y., Ma Y., Peng Y., Hu X., Chen J. (2018): Hydrogen sulfide enhances poplar tolerance to high-temperature stress by increasing S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) activity and reducing reactive oxygen/nitrogen damage. *Plant Growth Regulation* **84**(1), 11–23.
- Cho U. H., Seo N. H. (2005): Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* **168**(1), 113–120.
- Choudhary A., Singh I., Singh R. P. (1999): A thermostable diamine oxidase from *Vigna radiata* seedlings. *Phytochemistry* **52**, 1–5.
- Jastrzab R., Kaczmarek M. T., Nowak M., Trojanowska A., Zabizsak M. (2017): Complexes of polyamines and their derivatives as living system active compounds. *Coordination Chemistry Reviews* **351**, 32–44.
- John R., Ahmad P., Gadgil K., Sharma S. (2008): Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant, Soil And Environment* **54**(6), 262–270.
- Kakkar R. K., Sawhney, V. K. (2002): Polyamine research in plants - a changing perspective. *Physiologia Plantarum* **116**(3), 281–292.
- Karuppanandian T., Moon J., Kim C., Manoharan K., Kim W. (2011): Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal Of Crop Science* **5**(6), 709–725.
- Klein M., Burla B., Martinoia E. (2006): The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *Febs Letters* **580**(4), 1112–1122.
- Koetje D. S., Kononowicz H., Hodges T. K. (1993): Polyamine metabolism associated with growth and embryogenic potential of rice. *J Plant Physiol* **141**, 215–221
- Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T. (1999): Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angewandte Chemie International Edition* **38**(21), 3209–3212.
- Kolbert Z., Feigl G., Freschi L., Poór P. (2019): Gasotransmitters in action: Nitric oxide-ethylene crosstalk during plant growth and abiotic stress responses. *Antioxidants* **8**(6).

- Kopyra M., Gwózdź E. A. (2004): The role of nitric oxide in plant growth regulation and responses to abiotic stresses. *Acta Physiologiae Plantarum* **26**(4), 459–473.
- Krupa Z., Baszynski T. (1995): Some aspects of heavy metal toxicity towards photosynthetic apparatus-direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiol. Plant.* **17**, 177–191.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Mieslerová B., Petřivalský M. (2014): Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosoglutathione reductase in plants. *Planta* **239**, 139–146.
- Kubiš J. (2008): Exogenous spermidine differentially alters activities of some scavenging system enzymes, H₂O₂ and superoxide radical levels in water-stressed cucumber leaves. *Journal Of Plant Physiology* **165**(4), 397–406.
- Kuriakose S. V., Prasad M. N. V. (2008): Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* L. Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes. *Plant Growth Regulation* **54**(2), 143–156.
- Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. (2008): Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**, 367–381.
- Kusano T., Yamaguchi K., Berberich T., Takahashi Y. (2007): Advances in polyamine research. *J. Plant Res* **120**, 345–350.
- Kwon E., Feechan A., Yun B. W., Hwang B. H., Pallas J. A., Kang J. G., Loake G. J. (2012): AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*. *Planta* **236**(3), 887–900.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lamotte O., Bertoldo J. B., Besson-Bard A., Rosnoblet C., Aimé S., Hichami S., Terenzi H., Wendehenne D. (2015): Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants. *Frontiers In Chemistry* **2**.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J. M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2014): Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**(6), 789–793.
- Lindermayr C., Durner J. (2009): S-Nitrosylation in plants: Pattern and function. *Journal Of Proteomics* **73**(1), 1–9.
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. (2005): Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**(3), 921–930.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S. (2001): A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**(6827), 490–494.
- Liu Y., Wang X., Zeng G., Qu D., Gu J., Zhou M., Chai L. (2007): Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate–glutathione cycle in *Beckmeria nivea* L. Gaud. *Chemosphere* **69**(1), 99–107.
- Lozano-Rodríguez E., Hernández L. E., Bonay P., Carpena-Ruiz R. O. (1997): Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *Journal Of Experimental Botany* **48**(306), 123–128.
- Luhová L., Lebeda A., Hedererová D., Peč P. (2003): Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions. *Plant soil and environment* **49**, 151–157.
- Ma W., Xu W., Xu H., Chen Y., He Z., Ma M. (2010): Nitric oxide modulates cadmium influx during cadmium-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells. *Planta* **232**(2), 325–335.
- Mahmood T., Gupta K. J., Kaiser W. M. (2009): Cadmium stress stimulates nitric oxide production by wheat roots. *Pakistan Journal of Botany* **41**, 1285–1290.
- Majeed A., Muhammad Z., Siyar S. (2019): Assessment of heavy metal induced stress responses in pea (*Pisum sativum* L.). *Acta Ecologica Sinica*, **39**(4), 284–288.
- Mansuy D., Boucher J. L. (2002): Oxidation of N-hydroxyguanidines by cytochromes P450 and NO-synthases and formation of nitric oxide. *Drug Metab. Rev.* **34**, 593–606.
- Marrs K. A. (1996): The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology* **47**(1), 127–158.

- Martínez M. C., Achkor H., Persson B., Fernandez M. R., Shafqat J., Farres J., Jornvall H., Pares X. (1996): *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase. Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class p and liver class I alcohol dehydrogenases. *European Journal Of Biochemistry* **241**(3), 849–857.
- Matović V., Buha A., Bulat Z., Đukić-Ćosić D. (2011): Cadmium toxicity revisited: Focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Archives Of Industrial Hygiene And Toxicology* **62**.
- McGuirl M. A., McCahon C. D., McKeown K. A., Dooley D. M. (1994): Purification and characterization of pea seedling amine oxidase for crystallization studies. *Plant Physiology* **106**(3), 1205–1211.
- Medda R., Padiglia A., Floris G. (1995): Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* **39**, 1–9.
- Metwally A., Safronova V. I., Belimov A. A., Dietz K. J. (2005): Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *Journal Of Experimental Botany* **56**(409), 167–178.
- Millar A. H., Mittova V., Kiddle G., Heazlewood J. L., Bartoli C. G., Theodoulou F. L., Foyer C. H. (2003): Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology* **133**(2), 443–447.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. (2010): Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment* **33**(4), 453–467.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends In Plant Science* **7**(9), 405–410.
- Mittler R. (2017): ROS are good. *Trends In Plant Science* **22**(1), 11–19.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., van Breusegem F. (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends In Plant Science* **16**(6), 300–309.
- Moller I. M., Jensen P. E., Hansson A. (2007): Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review Of Plant Biology* **58**, 459–481.
- Morselli L., Brusori B., Passarini F., Bernardi E., Francaviglia R., Gataleta L., Marchionni M., Aromolo R., Benedetti A., Olivieri P. (2004): Heavy metals monitoring at a mediterranean natural ecosystem of central Italy. Trends in different environmental matrixes. *Environment International* **30**(2), 173–181.
- Moschou P. N., Sanmartin M., Andriopoulou A. H., Rojo E., Sanchez-Serrano J. J., Roubelakis-Angelakis K. A. (2008): Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: A novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**(4), 1845–1857.
- Mutlu F., Yürekli F. (2015): Analysis of interactions of nitric oxide and polyamine undercadmium stress in wheat. *Turkish Journal Of Botany* **39**, 778–785.
- Nagajyoti P. C., Lee K. D., Sreekanth T. V. M. (2010): Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **8**(3), 199–216.
- Nambeesan S., AbuQamar S., Laluk K., Mattoo A. K., Mickelbart M. V., Ferruzzi M. G., Mengiste T., Handa A. K. (2012): Polyamines attenuate ethylene-mediated defense responses to abrogate resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiology* **158**(2), 1034–1045.
- Neill S. J., Desikan R., Hancock J. T. (2003): Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* **159**, 11–35.
- Noctor G., Mhamdi A., Foyer C. H. (2016): Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant, Cell & Environment* **39**(5), 1140–1160.
- Nuccio M. L., Rhodest D., McNeil S. D., Hanson A. D. (1999): Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion In Plant Biology* **2**(2), 128–134.
- Ormrod D. P., Beckerson D. W. (1986): Polyamines as antiozonants for tomato. *HortScience* **21**, 1070–1071.
- Ortega-Galisteo A. P., Rodríguez-Serrano M., Pazmiño D. M., Gupta D. K., Sandalio L. M., Romero-Puertas M. C. (2012): S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal Of Experimental Botany* **63**(5), 2089–2103.

- Pál M., Szalai G., Janda T. (2015): Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Science* **237**, 16–23.
- Panda P., Nath S., Chanu T. T., Sharma G. D., Panda S. K. (2011): Cadmium stress-induced oxidative stress and role of nitric oxide in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* **33**(5), 1737–1747.
- Pegg A. E. (2016): Functions of polyamines in mammals. *Journal Of Biological Chemistry* **291**(29), 14904–14912.
- Pérez Chaca M. V., Vigliocco A., Reinoso H., Molina A., Abdala G., Zirulnik F., Pedranzani H. (2014): Effects of cadmium stress on growth, anatomy and hormone contents in *Glycine max* L. Merr. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**(10), 2815–2826.
- Petrov V. D., van Breusegem F. (2012): Hydrogen peroxide a central hub for information flow in plant cells. *Aob Plants*
- Petřivalský M., Brauner F., Luhová L., Gagneul D., Šebela M. (2007): Aminoaldehyde dehydrogenase activity during wound healing of mechanically injured pea seedlings. *Journal of plant physiology* **164**, 1410–1418.
- Pinto A., Mota A., Devarenes A., Pinto F. (2004): Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science Of The Total Environment* **326**, 239–247.
- Píterková J., Luhová L., Zajoncová L., Šebela M., Petřivalský M. (2012): Modulation of polyamine catabolism in pea seedlings by calcium during salinity stress. *Plant Protection Science* **48**, 53–64.
- Píterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005): Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické Listy* **99**, 455–466.
- Popova L. P., Maslenkova L. T., Yordanova R., Krantev A., Szalai G., Janda T. (2008): Salicylic acid protects photosynthesis against cadmium toxicity in pea plants. *General And Applied Plant Physiology* **34**, 133–148.
- Qiao W., Fan L. M. (2008): Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *Journal Of Integrative Plant Biology* **50**(10), 1238–1246.
- Rady M. M., Ahmed S. M. A., Seif El-Yazal M. A., Taie H. A. A. (2019): Alleviation of cadmium stress in wheat by polyamines. In: *Cadmium Tolerance in Plants*, 463–496.
- Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K. (2014): Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Research International*, 1–19.
- Ramos I., Esteban E., Lucena J. J., Gárate A. (2002): Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd–Mn interaction. *Plant Science* **162**(5), 761–767.
- Ranieri A., Castagna A., Scebba F., Careri M., Zagnoni I., Predieri G., Pagliari M., di Toppi L. S. (2005): Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiology And Biochemistry* **43**, 45–54.
- Rejeb I., Pastor V., Mauch-Mani B. (2014): Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: Molecular mechanisms. *Plants* **3**(4), 458–475.
- Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M. C., Pazmiño D. M., Testillano P. S., Risueño M. C., del Río L. A., Sandalio L. M. (2009): Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: Cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology* **150**, 229–243.
- Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M. C., Zabalza A., Corpas F. J., Gomez M., del Río L. A., Sandalio L. M. (2006): Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant, Cell And Environment* **29**(8), 1532–1544.
- Romero-Puertas M. C., Campostrini N., Mattè A., Righetti P. G., Perazzolli M., Zolla L., Roepstorff P., Delledonne M. (2008): Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**(7), 1459–1469.
- Romero-Puertas M. C., Rodríguez-Serrano M., Corpas F. J., Gomez M., del Río L. A., Sandalio L. M. (2004): Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell And Environment* **27**(9), 1122–1134.

- Romero-Puertas M. C., Zabalza A., Rodríguez-Serrano M., Gómez M., del Río L. A., Sandalio L. M. (2003): Antioxidative response to cadmium in pea roots. *Free Radical Research* **37**, 44.
- Roychoudhury A., Basu S., Sengupta D. N. (2012): Antioxidants and stress-related metabolites in the seedlings of two indica rice varieties exposed to cadmium chloride toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum* **34**(3), 835–847.
- Rümer S., Krischke M., Fekete A., Mueller M. J., Kaiser W. M. (2012): DAF-fluorescence without NO: Elicitor treated tobacco cells produce fluorescing DAF-derivatives not related to DAF-2 triazol. *Nitric Oxide* **27**(2), 123–135.
- Salt D. E., Rauser W. E. (1995): MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology* **107**(4), 1293–1301.
- Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gómez M., Romero-Puertas M. C., del Río L. A. (2001): Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal Of Experimental Botany* **52**(364), 2115–2126.
- Sánchez-López J., Camañes G., Flors V., Vicent C., Pastor V., Vicedo B., Cerezo M., García-Agustín P. (2009): Underivatized polyamine analysis in plant samples by ion pair LC coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Plant Physiology And Biochemistry* **47**(7), 592–598.
- Sanità di Toppi L., Gabbriellini R. (1999): Response to cadmium in higher plants. *Environmental And Experimental Botany*, **41**(2), 105–130.
- Saxena I., Srikanth S., Chen Z. (2016): Cross talk between H₂O₂ and interacting signal molecules under plant stress response. *Frontiers In Plant Science* **7**.
- Senden M. H. M. N., Vand der Meer A. J. G. M., Verburg T. G., Woltetbeek H. T. (1994): Effects of cadmium on the behaviour of citric acid in isolated tomato xylem cell walls. *Journal Of Experimental Botany* **45**(5), 597–606.
- Shafqat J., El-Ahmad M., Danielsson O., Martinez M. C., Persson B., Pares X., Jornvall H. (1996): Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active forms (classes I and P). *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **93**(11), 5595–5599.
- Shao H. B., Chu L. Y., Lu Z. H., Kang C. M. (2008): Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal Of Biological Sciences* **4**(1), 8–14.
- Sharma S. S., Dietz K. J. (2006): The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal Of Experimental Botany* **57**(4), 711–726.
- Shi Y. F., Wang D. L., Wang C., Culler A. H., Kreiser M. A., Suresh J., Cohen J. D., Pan J., Baker B., Liu J. Z. (2015): Loss of GSNOR1 function leads to compromised auxin signaling and polar auxin transport. *Molecular Plant* **8**(9), 1350–1365.
- Schützendübel A. (2002): Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal Of Experimental Botany* **53**(372), 1351–1365.
- Schützendübel A., Schwanz P., Teichmann T., Gross K., Langenfeld-Heyser R., Godbold D. L., Polle A. (2001): Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiology* **127**(3), 887–898.
- Siedlecka A., Krupa Z. (1996): Interaction between cadmium and iron. Accumulation and distribution of metals and changes in growth parameters of *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **65**(3), 277–282.
- Skelly M. J., Loake G. J. (2013): Synthesis of redox-active molecules and their signaling functions during the expression of plant disease resistance. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**(9), 990–997.
- Slocum R. D., Kaur-Sawhney R., Galston A. W. (1984): The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **235**(2), 283–303.
- Smith T. A., Barker J. H. A. (1989): The di and polyamine oxidases of plants. In: *Progress in Polyamine Research* (Zappia V., Pegg A. E. eds.), Springer US, Boston, MA, 573–587.
- Soh N. (2006): Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Analytical And Bioanalytical Chemistry* **386**(3), 532–543.

- Souza J. M., Peluffo G., Radi R. (2008): Protein tyrosine nitration – functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology And Medicine* **45**(4), 357–366.
- Spadaro D., Yun B. W., Spoel S. H., Chu C., Wang Y. Q., Loake G. J. (2010): The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. *Physiologia Plantarum* **138**(4), 360–371.
- Stamler J. S., Lamas S., Fang F. C. (2001): Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**(6), 675–683.
- Stohr C., Ullrich W. R. (2002): Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal Of Experimental Botany* **53**(379), 2293–2303.
- Sudhamsu J., Crane B. R. (2009): Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? *Trends In Microbiology* **17**(5), 212–218.
- Suzuki N. (2005): Alleviation by calcium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biotechnology* **22**, 19–25.
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica and Biophysica Acta* **1480**, 329–341.
- Šebela M., Luhová L., Brauner F., Galuszka P., Radová A., Peč P. (2001a): Light microscopic localisation of aminoaldehyde dehydrogenase activity in plant tissues using nitroblue tetrazolium-based staining method. *Plant Physiology And Biochemistry* **39**(10), 831–839.
- Šebela M., Radová A., Angelini R., Tavladoraki P., Frébort I., Peč P. (2001b): FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Science* **160**(2), 197–207.
- Takahashi T., Kakehi J. I. (2010): Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals Of Botany* **105**, 1–6.
- Tamás L., Demecsová L., Zelinová V. (2018): L-NAME decreases the amount of nitric oxide and enhances the toxicity of cadmium via superoxide generation in barley root tip. *Journal Of Plant Physiology* **224**, 68–74.
- Tichá T., Činčalová L., Kopečný D., Sedlářová M., Kopečná M., Luhová L., Petřivalský M. (2017a): Characterization of S-nitrosoglutathione reductase from *Brassica* and *Lactuca* spp. and its modulation during plant development. *Nitric Oxide* **68**, 68–76.
- Tichá T., Lochman J., Činčalová L., Luhová L., Petřivalský M. (2017b): Redox regulation of plant S-nitrosoglutathione reductase activity through post-translational modifications of cysteine residues. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **494**, 27–33.
- Tipping A. J., McPherson M. J. (1995): Cloning and molecular analysis of the pea seedling copper amine oxidase. *Journal Of Biological Chemistry* **270**(28), 16939–16946.
- Tun N. N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E. I. S., Scherer G. F. E. (2002): Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell. Physiol* **47**, 346–354.
- Umbreen S., Lubega J., Cui B., Pan Q., Jiang J., Loake G. J. (2018): Specificity in nitric oxide signalling. *Journal Of Experimental Botany* **69**(14), 3439–3448.
- Valentovičová K., Halušková L., Huttová J., Mistrík I., Tamás L. (2010): Effect of cadmium on diaphorase activity and nitric oxide production in barley root tips. *Journal Of Plant Physiology* **167**, 10–14.
- van Oosten M. J., Pepe O., de Pascale S., Silletti S., Maggio A. (2017): The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical And Biological Technologies In Agriculture* **4**.
- Varo P., Helm O. L., Nuurtamo M., Saari S., Koivi–Stonen P. (1980): Mineral element composition of finnish foods. VII. Potato, vegetables, fruits, berries, nuts, mushrooms. *Acta agriculturae Scandinavica. Supplementum* **22**, 89–113.
- Veitch N. C. (2004): Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**(3), 249–259.
- Vrbová K. (2019): *Úloha reaktivních forem dusíku v regulaci aktivity enzymů S-nitrosylací u hrachu setého*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.

- Vuosku J., Karppinen K., Muilu-Mäkelä R., Kusano T., Sagor G. H. M., Avia K. *et al.* (2018): Scots pine aminopropyltransferases shed new light on evolution of the polyamine biosynthesis pathway in seed plants. *Annals Of Botany* **121**(6), 1243–1256.
- Wagner G. J. (1993): Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy* **51**, 173–212.
- Wang P., Du Y., Li Y., Ren D., Song C. P. (2010): Hydrogen peroxide mediated activation of MAP Kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 2981–2998.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004): Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends In Plant Science* **9**(5), 244–252.
- Weretilnyk E. A., Hanson A. D. (1990): Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **87**(7), 2745–2749.
- Wimalasekera R., Tebartz F., Scherer G. F. E. (2011): Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science* **181**(5), 593–603.
- Wu F. B., Chen F., Wei K., Zhang G. P. (2004): Effect of cadmium on free amino acid, glutathione and ascorbic acid concentrations in two barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) differing in cadmium tolerance. *Chemosphere* **57**(6), 447–454.
- Xiong J., Fu G., Tao L., Zhu C. (2010). Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **497**, 13–20.
- Yadav S. K. (2010): Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal Of Botany* **76**(2), 167–179.
- Yang M. G., Lin X. Y., Yang X. E. (1998): Impact of Cd on growth and nutrient accumulation of different plant species. *Chinese Journal of Applied Ecology* **19**, 89–94.
- Yazaki K. (2006): ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *Febs Letters* **580**(4), 1183–1191.
- Yun B. W., Spoel S. H., Loake G. J. (2012): Synthesis of and signalling by small, redox active molecules in the plant immune response. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects* **1820**(6), 770–776.
- Ziogas V., Tanou G., Filippou P., Diamantidis G., Vasilakakis M., Fotopoulos V., Molassiotis A. (2013): Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions. *Plant Physiology And Biochemistry* **68**, 118–126.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA/BIS	akrylamid-N,N'-methylenbisakrylamid
ABAL	4-aminobutyraldehyd
ADC	arginindekarboxylasa
AIH	agmatiniminohydrolasa
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa
AP	alkalický fosfatasový pufr
APAL	1-amino-3,3-diethoxypropan
APF	aminofenylfluorescein
APS	persíran amonný
APX	askobátperoxidasa
AsA	kyselina askorbová
BSA	hovězí sérový albumin
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát
Cad	kadaverin
CARs	karotenoidy
CAT	katalasa
Cd	kadmium
CPA	karbamoylputrescinaminohydrolasa
DAB	diaminobenzidin
DAF-FM	diaminofluorescein
DAF-FM DA	diaminofluorescein diacetát
DAH	diaminohexan
DAO	diaminooxidasa
DHA	dehydroxyaskorbát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiotreitol
DW	hmotnost suchého materiálu
FIT	gen pro transkripční faktor indukovaný nedostatkem železa
FRO2	gen pro oxidasu redukující oxid železitý
FW	hmotnost čerstvého materiálu
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GPX	guajakolperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSSG	glutathion disulfidu
H ₂ DCF-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HPF	hydroxyfenylfluorescein
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
hROS	vysoce reaktivní formy kyslíku
IRT1	železem regulovaný transportér
MDA	malondialdehyd
MDHAR	monodehydroaskorbátereduktasa

MMTS	methylmethanthiosulfonát
N ₂	atmosférický dusík
N ₂ O	oxid dusný
NADHP	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NBT	nitrotetrazoliová modř
Ni:NOR	nitrit:NO-reduktasa
NO	oxid dusnatý
NOHA	N-hydroxyarginin
NOS	NO synthasa
NR	nitrátreduktasa
O ₂	atmosférický kyslík
¹ O ₂	singletový kyslík
O ₂ ^{•-}	superoxidový radikál
ODC	ornithindekarboxylasa
OONO ⁻	peroxynitrit
OH [•]	hydroxylový radikál
OH ₂ ^{•-}	hydroperoxylový radikál
PA	polyaminy
PAO	polyaminoxidasa
ppb	jednotka hmotnostní koncentrace odpovídající µg·l ⁻¹ (z angl. parts per billion)
Put	putrescin
PVPP	poly(vinylpolypyrrolidon)
PsAMADH1	isoforma aminoaldehyddehydrogenasy <i>Pisum sativum</i>
PsAMADH2	isoforma aminoaldehyddehydrogenasy <i>Pisum sativum</i>
PSbMV	Pea Seed-borne Mosaic Virus
ROONO	alkylperoxynitrit
SAM	S-adenosylmethionin
SAMDC	S-adenosylmethionindekarboxylasa
SDS	dodecylsíran sodný
SNO	S-nitrosothiol
SOD	superoxiddismutasa
Spd	spermidin
SPDS	spermidinsynthasa
Spm	spermin
SPMS	sperminsynthasa
TBS	fyzilogický roztok pufrovaný Tris
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TOCs	tokoferoly
TTBS	TBS s přísávkem Tween-20
v/v	objem na objem
w/v	hmotnost na objem
XO	xantinoxidasa