

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv salinitního stresu na metabolismus polyaminů u hrachu setého (*Pisum sativum*)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Hromádková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské 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

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí své bakalářské práce Mgr. Janě Sekaninové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a všestrannou pomoc při zpracovávání této práce. Děkuji také doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi pomohly tuto práci zkompletovat.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Hromádková
Název práce	Vliv salinitního stresu na metabolismus polyaminů u hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Polyaminy (PA), nízkomolekulární alifatické sloučeniny obsahující dvě a více aminoskupin, v rostlinách stimulují dělení buněk, regulují buněčný cyklus a účastní se obranného mechanismu rostlin před stresovými faktory. Mezi základní zástupce PA se řadí putrescin, spermin a spermidin. Biosyntéza PA vychází z argininu nebo ornithinu. Hlavními enzymy účastnícími se katabolismu PA jsou diaminoxidasy (DAO) a aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH). DAO katalyzují reakce, kdy dochází k oxidaci PA na příslušné aminoaldehydy, které pak mohou být dále katabolisovány na příslušné aminokyseliny prostřednictvím AMADH.

Cílem bakalářské práce bylo stanovení vlivu salinitního stresu, způsobeného přítomností NaCl v růstovém médiu, zejména na změny obsahu PA a aktivity enzymů DAO a AMADH. Zároveň byla v práci stanovena aktivita guajakolperoxidasy (GuPOX), enzymu katalyzujícího rozklad toxického H₂O₂, a byl také stanoven celkový obsah proteinů. Experiment byl proveden na dvou genotypech hrachu setého *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset, které se od sebe liší v odolnosti vůči některým rostlinným patogenním organismům.

Vliv zvýšené koncentrace NaCl v růstovém médiu se projevil u obou genotypů *P. sativum* inhibicí růstu zvláště nadzemních částí. Po aplikaci NaCl byly pozorovány intenzivnější změny aktivit enzymů AMADH a DAO zejména v kořenových částech *P. sativum* cv. Kudrnáč. Naopak změny v aktivitě GuPOX při zvýšené koncentraci NaCl byly zaznamenány převážně v nadzemních částech *P. sativum* cv. Twinset. Výraznější změny v obsahu PA v odpovědi na salinitní stres byly sledovány hlavně v kořenech *P. sativum* cv. Twinset.

Klíčová slova	salinita, <i>Pisum sativum</i> , polyaminy, diaminoxidasa, aminoaldehyddehydrogenasa, guajakolperoxidasa, reaktivní formy dusíku/kyslíku
Počet stran	63
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Tereza Hromádková
Title	Effect of Salinity Stress on Metabolism of Polyamines in Pea (<i>Pisum sativum</i>)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Polyamines (PAs), low-molecular-weight aliphatic compounds with two or more amino groups, stimulate plant cell division, regulate cell cycle and participate in a defense mechanism against plant stress factors. The principal examples of PAs are putrescine, spermine and spermidine. Biosynthesis of PAs starts from arginine or ornithine. Diamine oxidases (DAOs) and aminoaldehyde dehydrogenases (AMADHs) are essential enzymes which take part in catabolism of PAs. DAOs catalyze reactions in which PAs are oxidated into relevant aminoaldehydes. Aminoaldehydes are then catabolized into relevant aminoacids with the use of AMADHs.

The aim of this bachelor thesis was to determine the effect of salt stress, induced by NaCl in growth medium, to changes in the polyamine content and activities of enzymes DAOs a AMADHs. Simultaneously, the activity of guaiacol peroxidases (GuPOXs) and protein content were observed in this thesis. GuPOXs are enzymes which catalyze decomposition of toxic H₂O₂. The experiment was performed on two genotypes of pea *P. sativum* cv. Kudrnáč and *P. sativum* cv. Twinset, which differ from each other in a resistance to some plant pathogenic organisms.

The effect of increased concentration of NaCl in growth medium could be seen in the inhibition of plant growth, especially in shoots, at both of the genotypes of *P. sativum*. After NaCl application, more intensive changes in activities of AMADHs and DAOs could be observed mostly in roots of *P. sativum* cv. Kudrnáč. On the contrary, changes in activities of GuPOXs could be registered mainly in shoots of *P. sativum* cv. Twinset, when the concentration of NaCl was increased. As an answer to salt stress, more significant changes in polyamine content were observed mostly in roots of *P. sativum* cv. Twinset.

Keywords	salinity, <i>Pisum sativum</i> , polyamines, diamine oxidase, aminoaldehyde dehydrogenase, guaiacol peroxidase, reactive oxygen/nitrogen species
Number of pages	63
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Stresové faktory u rostlin	10
2.2 Zasolení půdy	11
2.3 Salinitní stres	12
2.4 Mechanismy salinitní stresové rezistence	13
2.4.1 Tolerance osmotického stresu.....	13
2.4.2 Iontová regulace.....	14
2.4.3 Pletivová tolerance.....	16
2.4.4 Stresové proteiny	16
2.5 Polyaminy.....	17
2.5.1 Ochranná funkce polyaminů.....	18
2.5.2 Biosyntéza polyaminů.....	19
2.5.3 Enzymy katabolismu polyaminů	21
2.6 Oxidační stres	23
2.6.1 Antioxidační systém rostlin	24
2.7 Oxid dusnatý.....	27
2.7.1 Biosyntéza oxidu dusnatého	28
2.7.2 Oxid dusnatý jako signální molekula.....	29
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
3.1 Materiál a přístroje	31
3.1.1 Rostlinný materiál.....	31
3.1.2 Chemikálie	31
3.1.3 Přístroje a vybavení	32
3.2 Metody.....	32
3.2.1 Příprava a zpracování rostlinného materiálu	32
3.2.2 Hodnocení fyziologických parametrů rostlin	33
3.2.3 Příprava rostlinných extraktů.....	33
3.2.4 Stanovení celkových proteinů.....	34
3.2.5 Stanovení aktivit enzymů.....	35
3.2.6 Stanovení volných polyaminů	37
3.2.7 Statistické zpracování dat	38

4 VÝSLEDKY A DISKUZE	39
4.1 Vliv NaCl v růstovém médiu na fyziologické parametry hrachu setého.....	39
4.2 Vliv NaCl v růstovém médiu na obsah proteinů	42
4.3 Vliv NaCl v růstovém médiu na aktivity vybraných enzymů	44
4.4 Vliv NaCl v růstovém médiu na obsah polyaminů	49
5 ZÁVĚR	57
6 LITERATURA.....	59
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	63

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

Zpracování aktuální literatury k danému tématu (klíčová slova: salinita, *Pisum sativum*, aminoaldehyddehydrogenasa, aminoxidasa, polyaminy, reaktivní formy dusíku/kyslíku).

Praktická část:

Stanovení vlivu salinitního stresu na:

- a) fyziologické parametry růstu,
- b) aktivity vybraných enzymů (aminoaldehyddehydrogenasa, diaminoxidasa, peroxidasa),
- c) změnu hladiny polyaminů (spermin, spermidin, putrescin, kadaverin),
- d) produkci reaktivních forem kyslíku/dusíku (z důvodu opatření nařízení vlády související s nákazou Covid-19 nebyla tato část realizována).

1 ÚVOD

Na rostliny v průběhu jejich života působí celá řada biotických i abiotických stresových faktorů. Jedním z těchto faktorů je vysoká koncentrace solí v půdě, která způsobuje tzv. salinitní stres. O salinitním stresu se mluví i v souvislosti s klimatickými změnami. Nárůst okolních teplot vede v první řadě k dehydrataci a suchu a následně dochází ke zvyšování koncentrace solí. Salinita se ve výsledku projeví inhibicí růstu a vývoje rostlin.

Rostliny si vyvinuly různé obranné mechanismy, kterými se vypořádávají se salinitou. Jedním z přímých důsledků salinitního stresu je tzv. oxidační stres, který je pro rostlinu velmi nebezpečný. Rostliny si v obraně proti tomuto stresu vyvinuly účinný antioxidační systém.

Rostlinné polyaminy (PA) jsou nízkomolekulární látky s alifatickým řetězcem, které ve své struktuře obsahují amino a imino skupiny. Ukázalo se, že PA hrají roli při ochraně rostlin proti působení stresových faktorů případně při adaptaci rostlin na nepříznivé podmínky. Akumulace PA je jednou z reakcí na salinitní stres. Zvýšená koncentrace PA může ovlivnit např. syntézu proteinů nebo celistvost membrán. Mezi enzymy účastnící se katabolismu PA patří zejména aminoxidas (AO) a aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH). AO oxidují PA na příslušné aminoaldehydy, amoniak a peroxid vodíku. AMADH oxidují aminoaldehydy, vzniklé z PA, na odpovídající aminokyseliny.

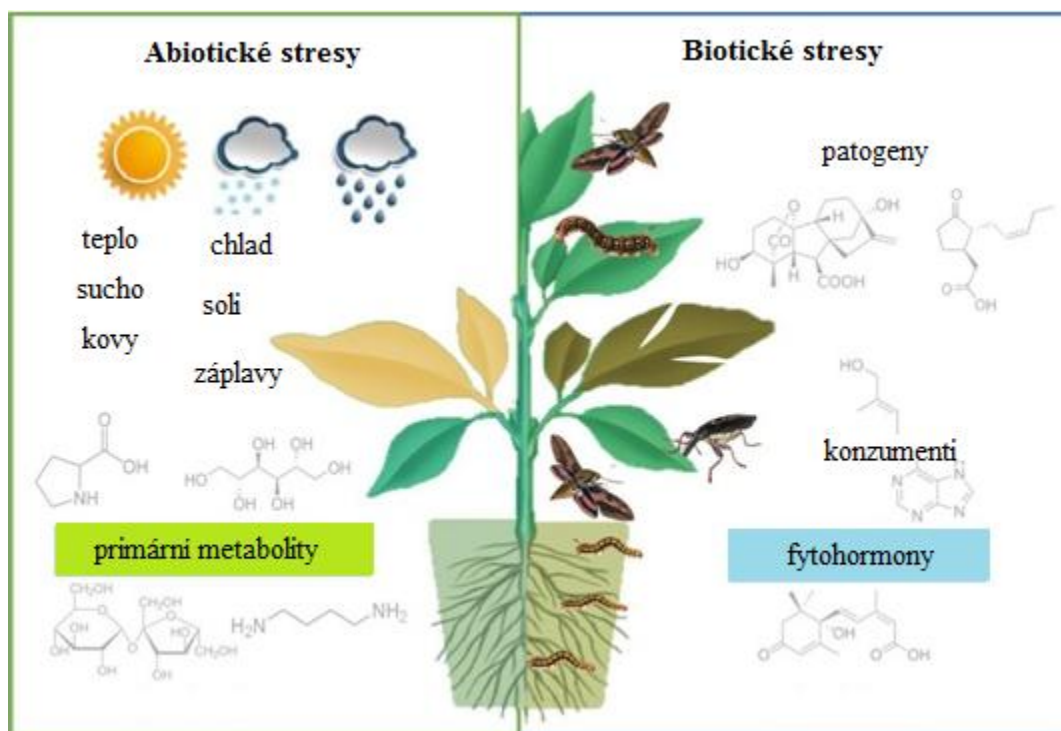
V souvislosti s PA se zkoumá úloha oxidu dusnatého za fyziologických podmínek a zejména po vystavení rostlin působení stresových faktorů. Přestože je NO vysoce reaktivní molekula a pro buňku může mít jeho zvýšená koncentrace toxický efekt, byla potvrzena jeho klíčová role v buněčné signalizaci. Předpokládá se, že NO se účastní signalizace mnoha dějů, jako jsou např. inhibice nebo aktivace enzymů, ovlivnění transkripčních faktorů s následným dopadem na expresi příslušných genů, uzavírání průduchů, stimulace klíčení a obranné reakce rostlin v reakci na stresové faktory.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Stresové faktory u rostlin

Rostliny jsou během svého života ovlivněny řadou biotických a abiotických stresových faktorů. Mezi biotické stresy se řadí interakce rostlin s jinými živými organismy, např. viry, bakteriemi, houbami či konkurujícími rostlinami. Mezi abiotické stresy patří vliv světla, přítomnost těžkých kovů, nedostatek vody, vysoká koncentrace solí – salinita, vysoká teplota, chlad a znečištěné ovzduší (Obr. 1). Jednou ze základních odpovědí na působení těchto stresových činitelů bývá zpravidla zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) či dusíku (RNS), tzv. oxidační/nitrosační stres. Vystavení rostlin stresovým faktorům se projevuje na jejich vnější stavbě, vnitřní struktuře i průběhu metabolických drah (Suzuki *et al.*, 2014).

Na rozdíl od kontrolovaných a regulovatelných podmínek, při kterých se rostliny pěstují ve fytotroních a sklenících, jsou rostliny v přírodě neustále vystaveny měnícímu se vnějšímu prostředí. Za těchto okolností na ně obvykle působí kombinace



Obr. 1 Přehled biotických a abiotických rostlinných stresových faktorů (převzato a upraveno dle OrbitBiotech: <https://orbitbiotech.com/temperature-stress-plants-high-temperature-stress/> (11.11.2019)).

dvou a více stresových faktorů, které zvyšují negativní účinek např. na pěstování plodin, což se může projevit nedostatkem úrody.

V poslední době navíc dosavadní modely předpovídající vývoj podnebí pozorují významný nárůst okolních teplot, kvůli čemuž se v blízké budoucnosti předpokládají zvýšené frekvence a amplitudy výskytu teplotních stresů. Proto vzrůstá potřeba vyšlechtit plodiny, které by byly schopné snášet tyto stresové podmínky (Suzuki *et al.*, 2014).

Vedle již zmíněných klimatických změn rostliny v přirozených podmínkách čelí též infekcím způsobeným patogenními organismy, jako jsou bakterie, houby, viry a hlístice. Abiotické stresové faktory tedy mohou mít přímý dopad na faktory biotické, např. snadnější rozšíření patogenů při zvýšených teplotách. Mimoto se ukázalo, že mnoho abiotických stresů oslabuje schopnost rostliny bránit se patogenům a rostliny následně snadněji podléhají infekcím (Suzuki *et al.*, 2014).

U sucha a salinitního stresu je užitečné rozlišovat primární a sekundární stresové signály způsobené nedostatkem vody nebo přílišným nadbytkem solí. Zatímco některé buněčné odpovědi vyplývají z primárních signálů, jiné vznikají přímo ze signálů sekundárních. Primárním signálem je osmotický stres. Sekundární signály jsou více komplexní a řadí se mezi ně např. oxidační/nitrosační stres. Jedním z dopadů sekundární odpovědi může být např. nefunkčnost řady metabolických procesů. Důležitou odezvou na sucho a salinitu je obecně také nashromáždění fytohormonu kyseliny abscisové (ABA). ABA působí jako antagonist a vůči růstovým hormonům (auxiny, cytokininy, gibereliny), indukuje zavírání průduchů, reguluje zrání semen a navozuje senescenci listů (Zhu, 2016).

2.2 Zasolení půdy

Zasolení půdy a vod je přirozeně způsobováno horninami a minerály, které jsou vystaveny geochemickým procesům a to zejména zvětráváním. V průběhu geologických změn byly minerály v kontaktu s vodou, kyslíkem a oxidem uhličitým. Tyto vlivy umožnily vznik sekundárních minerálů a solí, které byly z části transportovány vodou do oceánů a z části usazeny v půdě. Při zaplavování rozsáhlých pevninových oblastí mořskou vodou docházelo k ukládání minerálů, v důsledku čehož vznikly sedimenty, které se staly hlavním zdrojem solí v půdě. Salinita půdy na pobřeží je ovlivněna převážně pronikáním mořské vody do sladkovodních zdrojů. Také v nadzemních

vodách, nacházejících se dále od moře, mohou být soli detekovány v relativně vysokých koncentracích, jelikož vodstvo je ovlivňováno okolními geochemickými podmínkami. Na územích, kde voda špatně odtéká, čímž dochází k tvorbě mělkých vodních ploch, se opět vyskytuje zvýšená salinita (Maas a Grattan, 1999).

Zastoupení solí v půdě je značně variabilní a jejich přítomnost může snižovat aktivitu živných iontů potřebných pro správný růst rostlin. Anionty, které se podílí na půdní salinitě, jsou nejčastěji Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- a částečně i NO_3^- . Mezi kationty přispívající k salinitě půdy řadíme zejména Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} a K^+ . Soli těchto iontů se v půdě vyskytují ve vysoce proměnlivých koncentracích a poměrech. Soli mohou být původní, nacházející se v půdě přirozeně, nebo mohou být přijaty z vnějších zdrojů, které mnohem více přispívají k celkové koncentraci v půdě (Bernstein, 1975).

Z vnějších zdrojů má na zvýšenou salinitu půdy zásadní vliv zavlažování spolu s odvodňováním. Zavlažovací voda zpravidla obsahuje ionty Ca^{2+} , Mg^{2+} a Na^+ . Jakmile se voda z půdy začne odpařovat, Ca^{2+} a Mg^{2+} ionty se vysráží v podobě uhličitanů. Naproti tomu Na^+ ionty zůstávají v půdě. Následná zvýšená koncentrace Na^+ iontů vede k prudkému zvýšení poměrů $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a Na^+/K^+ a dále k tvorbě vnějšího osmotického potenciálu. Ve výsledku může být narušena celková struktura půdy a dochází ke snížení míry provzdušnění, a proto mohou rostliny v návaznosti na salinitní stres trpět hypoxií (Carillo *et al.*, 2011). Významnou roli v navyšování koncentrace solí v půdě má také sezónní používání posypových solí, které se aplikují na cesty a chodníky za účelem roztátí ledu a sněhu. Používání dalších různých rozpustných materiálů v okolí půdy, může rovněž podpořit nárůst salinity (Amacher *et al.*, 2000).

2.3 Salinitní stres

Salinita je jedním z limitujících faktorů, které mají vliv na rostlinnou produkci. Rostlinné orgány reagují na půdní salinitu dvěma způsoby - kořeny mají sníženou schopnost přijímat vodu a vysoká akumulace solí působí toxicky, což v důsledku vede k inhibici růstu nadzemní části. Působení salinity na kořeny má okamžitý účinek, kdežto toxicita se u rostliny může projevit až časem v závislosti na intenzitě kumulace soli. Ve výsledku rostlina strádá nedostatkem vody, což se dá připodobnit dehydrataci způsobené suchem (Munns a Tester, 2008). Zvýšená koncentrace solí v prostředí způsobuje rostlině hyperosmotický stres, který se projeví snížením vodního potenciálu, inhibicí růstu a při dlouhodobém vystavení dochází k odumírání částí rostlin.

Při salinitním stresu je narušena struktura buněčných membrán. Na⁺ kationty pronikají do cytoplazmy, kde narušují homeostázi a ovlivňují aktivitu řady enzymů. Dalším důsledkem je porucha fotosyntetického aparátu vedoucí k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují oxidační stres. ROS negativně působí na membránové komponenty, zejména na lipidy a proteiny (Mořková *et al.*, 2014). Salinita dále vyvolává změny v transpiraci, regulaci teploty rostliny a celkovém obsahu vody v rostlině. U bobovitých rostlin ovlivňuje vysoká koncentrace soli fixaci dusíku kořenovým systémem za přítomnosti symbiotických hlízkových bakterií (Najafi *et al.*, 2007). Při dlouhodobém vystavení salinitnímu stresu se rostliny musí vypořádat nejen s vodním stresem, ale i osmotickým a iontovým stresem, který způsobuje také dřívější senescenci (Najafi *et al.*, 2006).

S výjimkou halofytů, rostlin schopných přežít přítomnost solí o koncentracích 300-400 mmol l⁻¹, rostliny nedokážou běžně fungovat již při koncentracích NaCl okolo 100-200 mmol l⁻¹. Mechanismus genetické kontroly, díky kterému se rostliny vypořádávají se salinitou, nebyl doposud zcela vysvětlen a prozkoumán. Rostlina se brání různými způsoby proti salinitnímu stresu v závislosti na intenzitě a době působení. Při pozvolném vystavování vysokým koncentracím solí se rostlina může na situaci adaptovat, na rozdíl od náhlého salinitního šoku. Rozsah citlivosti či tolerance na salinitu se u daného druhu může měnit v průběhu ontogeneze (Carillo *et al.*, 2011).

2.4 Mechanismy salinitní stresové rezistence

Mechanismy salinitní tolerance se u rostlin rozdělují na toleranci k osmotickému stresu, iontovou regulaci, pletivovou toleranci a biosyntézu stresových proteinů (Duché *et al.*, 2002; Carillo *et al.*, 2011).

2.4.1 Tolerance osmotického stresu

Osmotická tolerance spočívá ve schopnosti rostliny vypořádat se se suchem, které doprovází salinitu. Na ochranu před osmotickým stresem má pozitivní vliv stomatální vodivost, která se v souvislosti s vyšším osmotickým stresem zvyšuje, čímž dochází k vyšší asimilaci CO₂. Jakmile koncentrace solí překročí danou hranici toxicity, staré listy odumírají a nové se přestávají tvořit. Nicméně rostliny, které mají vyšší toleranci

na osmotický stres, dokážou do jisté míry pokračovat v produkci nových listů za současného zvýšení stomatální vodivosti (Carillo *et al.*, 2011).

2.4.2 Iontová regulace

Homeostáza vnitrobuněčné koncentrace iontů je základní fyziologickou podmínkou pro život rostlinných buněk. Správné proudění iontů je důležitým regulačním prvkem vedoucím ke snížení hladiny toxických iontů a naopak sloužícím k akumulaci esenciálních iontů. Rostliny využívají primárně aktivní transport zprostředkovaný H^+ -ATPasami a sekundárně transportní kanálky. Narušení iontové homeostázy vede ke změně aktivity cytosolových enzymů, narušení membránového potenciálu a osmotického potenciálu (Zhu, 2003).

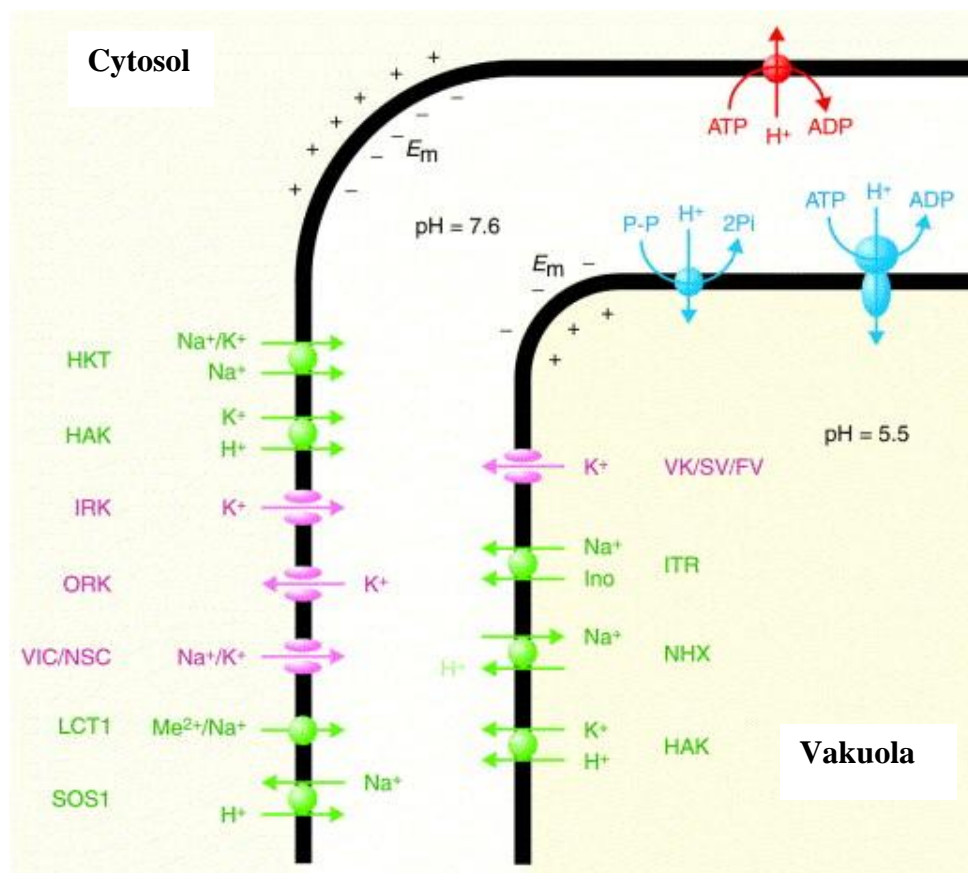
V mnoha případech, kdy je rostlina vystavena vysoké koncentraci solí, dosáhnou Na^+ ionty dříve toxické koncentrace než ionty Cl^- . Dalším z ochranných mechanismů je schopnost rostliny snížit iontový stres minimalizováním obsahu Na^+ iontů, které jsou v buňce nashromážděny. Značnou úlohu zde hrají iontové kanály, díky nimž může být regulace a transport Na^+ iontů realizována. Regulační funkci zde zastává i řada membránových proteinů a receptorů (Carillo *et al.*, 2011).

Rostlinné buňky, na rozdíl od živočišných, nemají Na^+/K^+ -ATPasy, a proto jsou závislé na H^+ -ATPasách, které vytvářejí protonovou hnací sílu důležitou pro transport iontů i metabolitů, a na jiných Na^+ a K^+ přenašečích. Rostliny k ochraně buňky využívají také kompartmentalizaci iontů do vakuoly. Vakuola slouží buňce jako skladovací zásobárna, která je schopna nashromáždit i vydat ionty a různé metabolity podle potřeby. V rostlině se ionty mohou pohybovat také cévními svazky, čímž dochází k omezení akumulace toxických iontů v jednotlivých částech rostliny (Baetz *et al.*, 2016).

Předchůdci rostlin se vyvinuli v oceánech, a proto byli adaptováni na život ve vysokých koncentracích solí. Jakmile se začali přemísťovat na pevniny, postupně ztrácely schopnost vyrovnávat se s vysokými koncentracemi Na^+ . Nicméně se prokázalo, že rostliny do jisté míry stále mají možnost přizpůsobit se nadměrným koncentracím solí, což se považuje za pozůstatek života ve slaných oceánech. Ukázalo se, že při zvýšené salinitě dochází v rostlinách ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu. Úloha Ca^{2+} spočívá ve stabilizaci membrán, v jeho využití jako druhého posla v signálních drahách a v regulaci iontového transportu v rostlinných buňkách.

Akumulované Ca^{2+} ionty následně podpoří aktivitu Ca^{2+} -dependentních proteinových kinas, které hrají významnou roli při reakcích důležitých pro vznik tolerance vůči salinitě (Bressan a Pardo, 1998).

Na tonoplastu (membráně ohraničující vakuolu) se vyskytuje velké množství iontových transportérů, které regulují iontovou homeostázi (Obr. 2). Vnitřní pH vakuoly je 5,5, kdežto pH cytosolu je 7,4. Rozdíl pH je zprostředkováván H^+ -ATPasami a souvisí s rozvojem různých membránových potenciálů.



Obr. 2 Pohyb Na^+ a K^+ iontů prouděním a pomocí transportérů z cytosolu do vakuoly (a naopak) skrze tonoplast. Transport iontů z cytosolu do tonoplastu je zprostředkován pomocí K^+/Na^+ symportů případně Na^+ uniportů (HKT); K^+/H^+ symportů (HAK); vnitřních korigujících K^+ kanálků (IRK); vnějších korigujících K^+ kanálků (ORK); kanálků necitlivých na napětí (VIC); neselektivních kanálků (NSC); přenašečů dvojmocných kationtů nebo Na^+ (LCT1) a Na^+/H^+ antiportů (SOS1). Transport iontů z tonoplastu do vakuoly je umožněn pomocí vakuolových kanálků: pomalu aktivovaných (SV), draselných (VK) a rychle aktivovaných (FV); myoinositol/ Na^+ symportů (ITR); Na^+/H^+ antiportů (NHX) a K^+/H^+ symportů (HAK) (převzato a upraveno dle Serrano a Rodriguez-Navarro, 2001).

Buněčná detoxifikace Na^+ iontů z tonoplastu do vakuoly probíhá s využitím Na^+/H^+ antiportů (NHX), K^+/H^+ symportů (HAK), myoinositol/ Na^+ symportů (ITR) a vakuolových kanálků: pomalu aktivovaných (SV), draselných (VK) a rychle aktivovaných (FV). Do tonoplastu se ionty z cytosolu transportují přes K^+/Na^+ symporty případně Na^+ uniporty (HKT), HAK, vnitřními korigujícími K^+ kanálky (IRK), vnějšími korigujícími K^+ kanálky (ORK), kanálky necitlivými na napětí (VIC), neselektivními kanálky (NSC), přenašeči dvojmocných kationtů nebo Na^+ (LCT1) a Na^+/H^+ antiporty (SOS1) (Serrano a Rodriguez-Navarro, 2001).

2.4.3 Pletivová tolerance

Třetím mechanismem salinitní stresové rezistence je pletivová tolerance, která zahrnuje prodloužení životnosti starých listů. Mechanismus spočívá v kompartmentalizaci sodných a chloridových iontů mimo cytoplazmu a naopak v syntéze kompatibilních rozpuštěných látek. Tyto látky jsou obvykle hydrofilní a mohou nahradit vodu navázanou na proteinech či na membránách. Skládají se z malých molekul, např. aminokyselin, aminů, organických kyselin a cukrů. Rozpuštěné látky také umožňují ochranu buněčné struktury před ROS (Carillo *et al.*, 2011).

2.4.4 Stresové proteiny

Když je buňka vystavena náročným stresovým podmínkám, obvykle pozastaví většinu metabolických drah a začne aktivovat adaptivní mechanismus. Buňka vstoupí do fyziologického stavu, kdy začíná velmi pozvolna syntetizovat proteiny, které se významně odlišují od proteinů přítomných v buňce za normálního stavu. Nové proteiny se následně mohou detekovat pomocí hmotnostní spektrometrie. Při salinitním stresu se detekované proteiny identifikují jako salt shock proteiny (Ssp). Ssp mají velice rychlou, ale přechodnou expresi (Duché *et al.*, 2002).

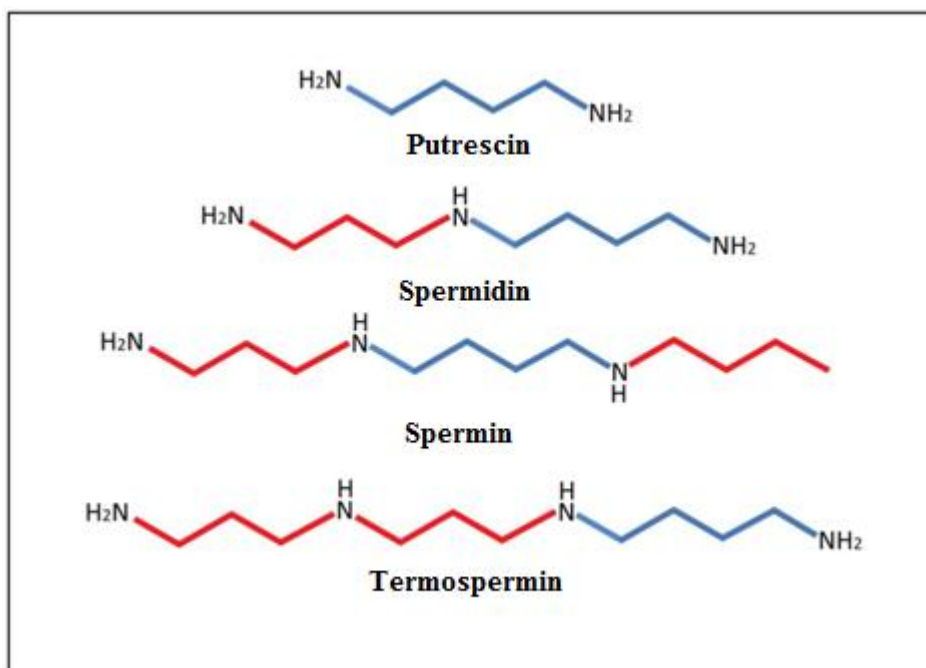
V přírodě bývají rostliny zpravidla vystaveny různým kombinacím stresových faktorů a nikoli pouze jednomu činiteli. Pokud je rostlina vystavena pouze salinitnímu stresu, může se její obranný mechanismus projevit odlišně od mechanismu, kterým by reagovala v případě kombinací více stresových podmínek. Byla provedena studie na rajčatech, které vykazovaly vyšší stupeň tolerance vůči kombinaci salinitního a teplotního stresu než pouze při salinitním stresu. V pokusu byly pozorovány změny

na úrovni transkripce. Ukázalo se, že transkripční profilování bylo změněno při působení dvojitého stresu, ne však při působení pouze jednoho stresového faktoru. Výsledky napovídají, že reakce rostlin jsou regulovány (pozitivně nebo negativně) přes vzájemné interakce mezi různými signálními drahami (Shaar-Moshe *et al.*, 2017).

2.5 Polyaminy

Polyaminy (PA) jsou neproteinové látky s nízkou molekulovou hmotností, které mají alifatický řetězec a obsahují uhlovodíkové sloučeniny s amino a imino skupinami. Účastní se širokého spektra biochemických procesů – buněčného dělení, růstu a vývoje buněk, senescence a odezvy na působení abiotických stresů. Kvůli svému polykationtovému složení ovlivňují svým kladným nábojem za fyziologického pH syntézu proteinů, membránovou integritu a interakci DNA s proteiny. Změny v hladinách volných PA mohou nastat v odpovědi na přítomnost atmosférických polutantů nebo v reakci na stresy teplotní, acidobazické, osmotické, vodní či iontové (Chattopadhyay *et al.*, 2002).

Předpokládá se, že rostliny mají část dějů biochemické syntézy polyaminů zděděnou po sinicových prekurzorech pro chloroplasty. PA se považují za esenciální pro život rostlin. Hlavními zástupci jsou diaminy putrescin (Put) a kadaverin (Cad), triaminy spermidin (Spd) a spermin (Spm) a tetraamin thermospermin (Obr. 3). Vnitrobuněčné hladiny PA jsou regulovány anabolickými i katabolickými procesy (Alcázar *et al.*, 2010).



Obr. 3 Strukturální vzorce základních polyaminů odvozených od putrescinu (modře) (převzato a upraveno dle Bitrián *et al.*, 2012).

2.5.1 Ochranná funkce polyaminů

Bylo dokázáno, že v rostlině dochází k akumulaci polyaminů při vystavení abiotickým stresům, jakými jsou salinita, sucho, teplotní změny, hypoxie, ozón, UV-záření, toxicita těžkými kovy a mechanické poškození. V experimentech, kde byly aplikovány do rostliny exogenní polyaminy, se ukázalo, že rostlina aktivuje biosyntézu PA. Výsledky poukazují na roli těchto sloučenin při adaptaci případně obraně proti různým stresům (Alcázar *et al.*, 2010).

Hromadění PA může být důsledkem syntézy *de novo* nebo snížené degradace. Schopnost rostliny tvořit a shromažďovat PA souvisí s její senzitivitou nebo naopak tolerancí vůči stresovým činitelům. Bylo dokázáno, že kultivar rýže, který měl toleranci vůči salinitě (salt-tolerant), akumuloval vysoké koncentrace Spd a Spm. Na druhou stranu kultivar rýže s nízkou tolerancí vůči salinitě (salt-sensitive) akumuloval pouze Put nikoli však Spd a Spm (Liu *et al.*, 2007).

Jednotlivé polyaminy se patrně liší ve svých ochranných funkcích a následných projevech v odpovědi na stres. Polyaminy Spd a Spm pravděpodobně pomáhají zmírnit poškození způsobené salinitou, kdežto Put má větší úlohu při zeslabení solí-indukovaného oxidačního stresu a zmírnění buněčného poškození způsobeného NaCl (Liu *et al.*, 2007).

Úloha PA při vypořádávání se se stresovými podmínkami byla potvrzena, když se uměle snížila hladina endogenních PA v rostlině. Důsledkem bylo zvýšení citlivosti proti stresům vedoucí k potlačení růstu. Poklesu endogenní koncentrace PA bylo docíleno použitím inhibitorů syntézy PA a použitím mutantu s poruchou syntézy PA. Práce s inhibitory byla do jisté míry omezena kvůli jejich stabilitě a specifitě (Liu *et al.*, 2007).

Ochranná funkce PA byla prokázána při jejich exogenní aplikaci do rostlin, které byly vystaveny různým koncentracím NaCl (0, 50, 100 a 150 mmol l⁻¹). PA použité v tomto experimentu (Put, Spd, Spm) byly aplikovány v různých koncentracích (0, 50, 100 a 150 mg l⁻¹). Studie byla zaměřena na porovnání výšky rostlin, hmotnosti čerstvých a suchých listů, kořenů a nadzemních částí a aktivit enzymů katalasy a peroxidasy. Použité PA zmírňovaly negativní efekt NaCl na rostliny. Nejvýznamnější byla aplikace 150 mg l⁻¹ Spd při nízké koncentraci NaCl, která měla pozitivní efekt na všechny studované parametry (Chokami *et al.*, 2019).

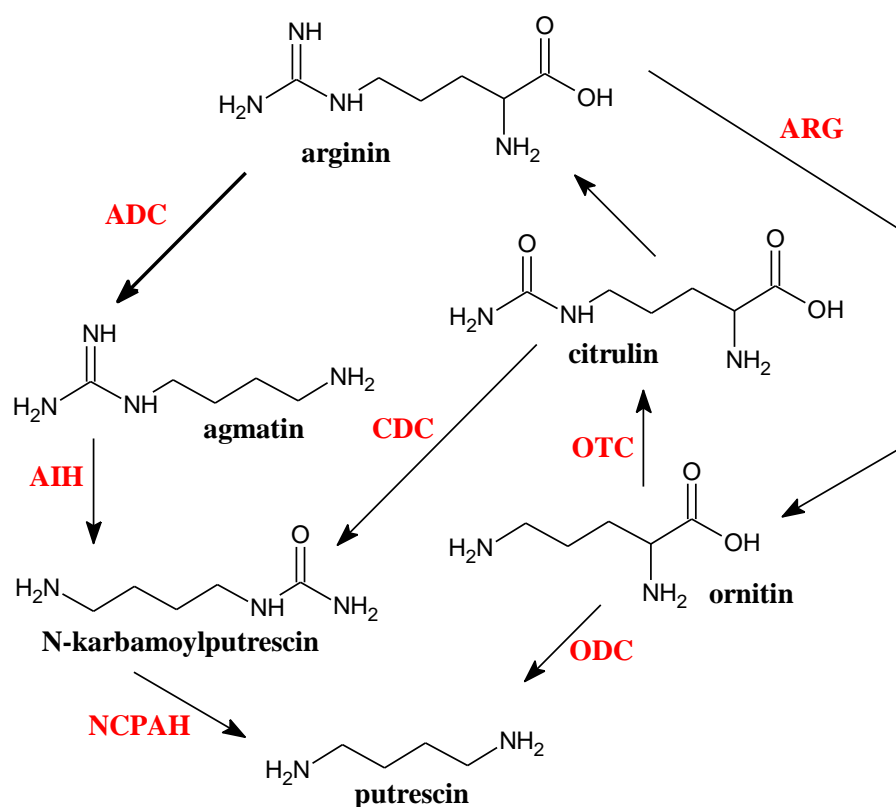
Salinitnímu stresu byly také vystaveny transgenní rostliny s exprimujícími geny zvyšujícími obsah PA (Put, Spd a Spm) v nestresovaných rostlinách, kdy nejhojněji zvyšovaly hladinu Spd. Poté, co byly transgenní rostliny vystaveny salinitnímu stresu (c_{NaCl} = 200 mmol l⁻¹), došlo k významnému zvýšení transkripce sledovaných genů a následně i hladiny PA. Další výsledky experimentu naznačují, že zvýšení endogenních PA v transgenních rostlinách vyvolává toleranci rostlin vůči salinitnímu stresu na základě sledování poškození rostliny na úrovni buněk. Ve studii se také zaměřili na tvorbu ROS v transgenních rostlinách vystaveným salinitnímu stresu. Pozorovali snížení intra- i extracelulárních hladin superoxidového aniontu ve stresovaných transgenních rostlinách oproti stresovaným kontrolním rostlinám (divoký typ). Tyto výsledky naznačují, že endogenní PA mají významný vliv také na reakci rostlin na sekundární signály salinitního stresu, tedy ROS (Seo *et al.*, 2019).

2.5.2 Biosyntéza polyaminů

PA vznikají z aminokyselin jejich dekarboxylací. Hlavní část uhlíkové kostry PA má základ v aminokyselinách ornitinu, argininu a lysinu. K tvorbě Spd a Spm navíc přispívá methionin se svou aminopropylou částí (Bagni a Tassoni, 2001).

Put je přirozeně syntetizován dvěma hlavními drahami – přímo z ornitinu za účasti ornitindekarboxylasy (ODC, EC 4.1.1.17) nebo nepřímo z argininu pomocí

arginindekarboxylasy (ADC, EC 4.1.1.19) (Obr. 4). V této druhé reakci vznikají dva důležité meziprodukty agmatin a N-karbamoylputrescin korespondující se dvěma enzymy agmatininiminohydrolasy (AIH, EC 3.5.3.12) a N-karbamoylputrescinamido-
hydrolasy (NCPAH, EC 3.5.1.53) (Liu *et al.*, 2007).



Obr. 4 Biosyntetické dráhy putrescinu v rostlinách s využitím enzymů: arginindekarboxylasa (ADC), arginasa (ARG), agmatininiminohydrolasa (AIH), N-karbamoylputrescinamido-
hydrolasa (NCPAH), citrulin-dekarboxylasa (CDC), ornitintraskarbamoylasa (OTC) a ornitindekarboxylasa (ODC) (převzato a upraveno dle Bagni a Tassoni, 2001).

Enzym ODC je lokalizován v cytosolu, ale nachází se také v jádře (Smith, 1985). Reakce, kdy ODC přeměňuje ornitin, je závislá na kyslíku a produktem je 4-aminobutanamid. Aktivita ODC je zjišťována v souvislosti s uvolněním CO₂, který vzniká jako vedlejší produkt reakce, a tvorbou Put. V úvahu by se měla vzít také aktivita ornititranskarbamoylasy (OTC, EC 2.1.3.3) – enzymu vysoce účinného ve vyšších rostlinách. OTC přeměňuje ornitin zpět na arginin v rámci ornitinového cyklu (Bagni a Tassoni, 2001).

ADC je lokalizován pouze v cytosolu. Pro správné určení aktivity ADC je nutné zvážit aktivitu arginasy (EC 3.5.3.1), která katalyzuje přeměnu argininu na ornitin, čímž značně ovlivňuje ADC (Bagni a Tassoni, 2001).

Cad je tvořen z lysinu za účasti enzymu lysindekarboxylasy (LDC, EC 4.1.1.18). LDC byla detekována v listech mnoha rostlin (Smith, 1985). Některé rostliny si ovšem tvoří Cad z prekursoru homoargininu přes meziproduct homoagmatin. Cad je v určitých rostlinách brán jako hlavní prekurzor pro syntézu alkaloidů (Bagni a Tassoni, 2001).

Z Put jako prekursoru se dále tvoří Spd a Spm. Vznik Spd je umožněn pomocí putrescin-aminopropyltransferasy (PAPT, EC 2.5.1.16), která katalyzuje kondenzaci Put s dekarboxylovaným S-adenosylmethioninem (dcSAM). Spm vzniká další kondenzací Spd s dcSAM, kdy reakce je katalyzovaná spermidinaminopropyltransferasou (SAPT, EC 2.5.1.22) (Bagni a Tassoni, 2001).

2.5.3 Enzymy katabolismu polyaminů

Aminoxidasy (AO) jsou enzymy, které katalyzují oxidační deaminaci biogenních polyaminů. Rozdělují se na aminoxidasy obsahující měď (CuAO; EC 1.4.3.6) a polyaminoxidasy (PAO) obsahující flavin. CuAO jsou homodiméry, ve kterých je součástí každé podjednotky měď a 2,4,5-trihydroxyfenylalanin chinon (TPQ), který slouží jako kofaktor. CuAO oxidují diaminy putrescin a kadaverin, proto se jim také říká diaminoxidasy (DAO). Produkty této oxidace jsou příslušné aminoaldehydy, amoniak a H₂O₂. PAO katalyzují oxidaci sperminu, spermidinu a jejich acetylovaných derivátů. AO se vyskytují převážně v pletivech, které jsou v průběhu vývoje rostliny podrobeny intenzivní lignifikaci a zpevňování stěn (Cona *et al.*, 2006). Uvádí se, že H₂O₂, vznikající jako produkt reakcí katalyzovaných AO, může vystupovat jako

substrát při enzymových reakcích katalyzovaných peroxidasami, případně v roli druhého posla v signalizaci otevírání průduchů a programování buněčné smrti (Angelini *et al.*, 2010).

Aminoaldehyddehydrogenasa (AMADH; EC 1.2.1.19) je NAD⁺-dependentní enzym účastnící se metabolismu biogenních polyaminů. AMADH oxiduje aminoaldehydy vzniklé při katabolismu PA enzymy aminoxidasami. Produkty této oxidace jsou příslušné aminokyseliny. V přirozených podmínkách se enzym vyskytuje jako tetrametr a nachází se v cévním kambiu a pericyklu (Brauner *et al.*, 2003). AMADH vykazuje širokou substrátovou specifitu, ukázalo se však, že převážně oxidují C3 – C6 aminoaldehydy a několik jejich substitučních derivátů. Na druhou stranu enzym jako substrát nevyužívá sukcinátsemialdehyd, propionaldehyd ani glutaraldehyd. Izolované a purifikované AMADH vykazuje stabilitu v rozmezí pH 6,0 – 9,5 a optimální hodnota je pH 8,5 (Šebela *et al.*, 2000). Významné rozdíly v aktivitě AMADH byly pozorovány v sazenicích hrachu vystavených různým světelným podmínkám, kdy etiolované (pěstované bez přítomnosti světla) sazenice vykazovaly vyšší aktivitu enzymu než sazenice pěstované při 12-ti hodinové fotoperiodě. Nárůst aktivity AMADH byl pozorován také při studiu mechanicky poškozených sazenic (Petřivalský *et al.*, 2007).

Působením CuAO na diaminy vznikne 4-aminobutanal, který může být dále metabolizován AMADH na γ -aminomáselnou kyselinu (GABA). GABA, která může být produkována také v cytosolu glutamátdekarboxylasou (EC 4.1.1.15), je důležitý rostlinný metabolit ovlivňující regulaci cytosolového pH, podílející se na ochraně proti oxidačnímu stresu a buněčné signalizaci (Angelini *et al.*, 2010).

V rostlinách vystavených salinitnímu stresu se ukázala spojitost mezi degradací polyaminů a akumulací GABA. Bylo dokázáno, že rostliny lépe snášejí působení stresových faktorů po exogenní aplikaci GABA při jejich pěstování. Ukázalo se, že v rostlinách vystavených salinitnímu a osmotickému stresu se po přidavku GABA výrazně zlepšily fyziologické parametry a procento klíčivosti oproti kontrolním rostlinám (Sheteiwy *et al.*, 2019). V rostlinách, které byly vystaveny vysoké koncentraci NaCl (100 mmol l⁻¹) a zároveň jim byla exogenně aplikována GABA při pěstování, byl pozorován značný pokles obsahu superoxidového aniontu, H₂O₂ a malondialdehydu (MDA) než v rostlinách, které byly pěstovány při stejných stresových podmínkách avšak bez přidavku GABA. Výsledky poukazují na pozitivní vliv GABA při rostlinné obraně proti oxidačnímu poškození (Cheng *et al.*, 2018).

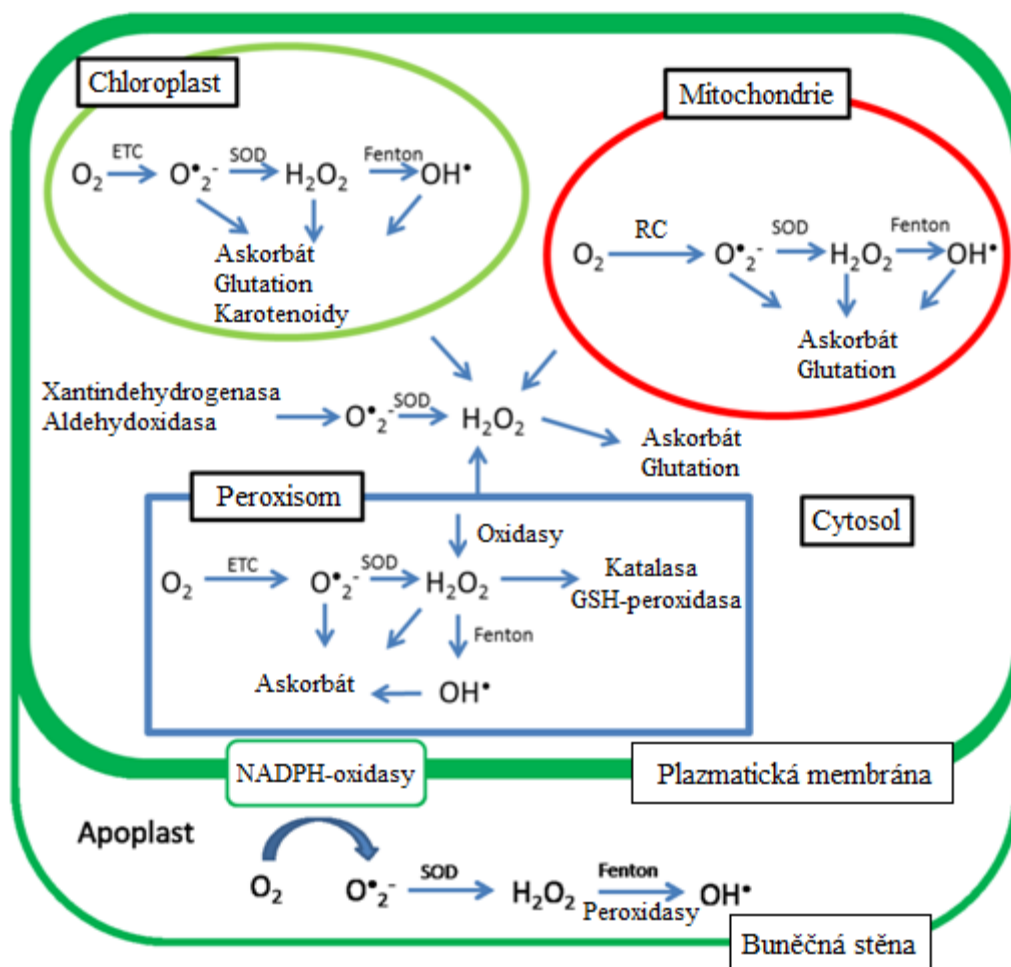
2.6 Oxidační stres

Jednou z přímých reakcí rostlin na vnější abiotické či biotické stresové činitele je oxidační stres. Oxidační stres je způsoben vystavením rostliny působení reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), kam se řadí superoxidový anion $O_2^{\cdot-}$, peroxid vodíku H_2O_2 a hydroxylový radikál OH^{\cdot} . Akumulace velkého množství ROS v rostlinných buňkách má za následek poškození převážně membránových lipidů, proteinů a nukleových kyselin (Mittler, 2002).

Aktivované formy kyslíku jsou velice reaktivní, a proto si rostliny vyvinuly účinný ochranný antioxidační mechanismus. Absence tohoto ochranného systému, případně jeho nedostatečná funkčnost, vede k významnému poškození buňky a ztrátě její funkčnosti (Hernandez *et al.*, 1995).

Na druhou stranu se ROS v rostlině vyskytují i v přirozeném stavu, kdy vznikají během aerobních metabolických procesů, jako je např. fotosyntéza a buněčné dýchání. Za fyziologických podmínek se ROS tvoří v chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech (Obr. 5). Rostlina aktivně produkuje tyto sloučeniny a využívá je jako signální molekuly, které mají důležitou roli při kontrole procesů, jakými jsou programovaná buněčná smrt, odpověď na stresové faktory, obrana proti patogenům a systémová signalizace (Mittler, 2002).

Výskyt ROS souvisí i se senescencí, což je programovaná degradace rostlinných buněk a orgánů. Iniciátory mohou být vnější faktory (světlo, teplota, infekce, nedostatek vody) nebo vnitřní faktory (stáří a fytohormony). Rostliny mohou v reakci na tyto faktory generovat ROS, které mohou být spouštěči fyziologických a metabolických změn. ROS jsou schopny způsobovat neenzymovou lipidovou peroxidaci, která dále přispívá k uskutečnění buněčné smrti. Na druhou stranu jiným důsledkem ROS může být aktivace genů účastnících se ochrany proti světelnému záření a genů přispívajících k expresi proteinů, které se nachází v chloroplastech. Dvojitý účinek – toxický nebo regulační závisí především na koncentraci ROS v buňce (Jajic *et al.*, 2015).



Obr. 5 Vznik reaktivních forem kyslíku (ROS) v různých částech rostlinné buňky. V buněčných organelách dochází ke vzniku ROS v elektronovém transportním řetězci (ETC) a dýchacím řetězci (RC). Reakcí se účastní enzymy superoxiddismutasa (SOD), xantindehydrogenasa (XADH), aldehydoxidasa (ALDOX), oxidasa (OX), katalasa (CAT), GSH-peroxidasa (GSH-POX), peroxidasa (POX) a NADPH-oxidasa (NADPH-OX). V buňkách probíhá i tzv. Fentonova oxidace (Fenton), kdy dochází k reakci mezi Fe^{2+} a H_2O_2 za vzniku Fe^{3+} a hydroxylových radikálů (převzato a upraveno dle Jajic *et al.*, 2015).

2.6.1 Antioxidační systém rostlin

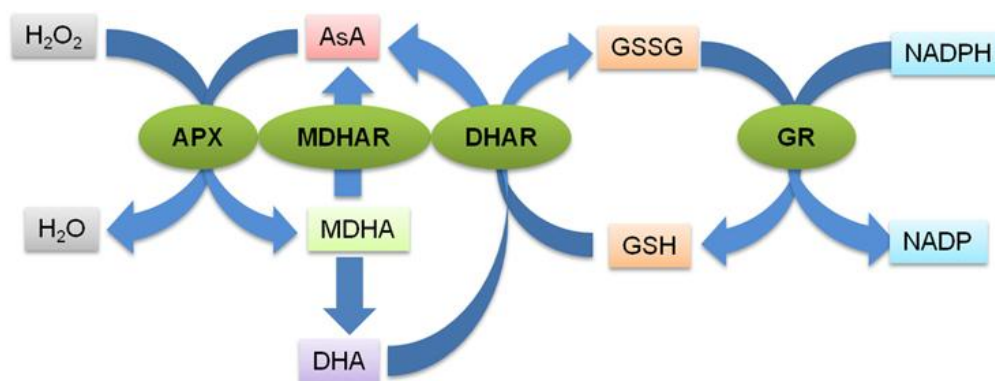
Při akumulaci ROS v buňce se zvyšuje riziko poškození buněčných částí, a proto se rostlina začne bránit svými antioxidačními systémy. Antioxidanty jsou klíčové pro udržení redoxní rovnováhy v rostlině (Halliwell a Gutteridge, 1999). Termín antioxidant odkazuje na molekuly dostatečně stabilní na to, aby odevzdaly nebo přijaly elektron, čímž zneutralizují radikály a sníží tím případné poškození buněk. Antioxidanty ochraňují buňku s využitím různých mechanismů – přímou reakcí s ROS, napravením poškozených částí nebo indukováním biosyntézy jiných antioxidantů

případně obranných enzymů (Tiwari, 2001). Obecně se dá antioxidační systém rostlin rozdělit na enzymový a neenzymový (Li *et al.*, 2016).

2.6.1.1 Neenzymové antioxidanty

Kyselina askorbová (vitamín C, AsA) je ve vodě rozpustný antioxidant. Vyskytuje se ve většině rostlinných pletivech, avšak ve větší míře se nachází ve fotosyntetických buňkách a meristémech (Foyer a Noctor, 2005). AsA má schopnost přímo vyhledat ROS a jejich detoxifikaci dokáže přispět k ochraně membrán. AsA je součástí askorbát-glutationového cyklu a může se účastnit také enzymových obranných reakcí, kde slouží jako kofaktor (Ahmad *et al.*, 2009).

Glutation (GSH) je jedním z nejdůležitějších vnitrobuněčných antioxidantů, kdy chrání buňku před ROS. Jedná se o tripeptid se složením γ -glutamyl-cysteinyl-glycin. Vyskytuje se převážně v redukované formě a je lokalizován v cytosolu, endoplazmatickém retikulu, vakuole, mitochondriích, chloroplastech, peroxisomech a také v apoplastu (Jimenez *et al.*, 1998). Vedle detoxifikační a antioxidační schopnosti má GSH důležitou roli v signálních drahách, při konjugaci metabolitů, transportu sloučenin se sírou a expresi genů v odpovědi na stres aj. Ukázalo se, že se GSH podílí také na růstu a vývoji rostlin, senescenci, buněčné smrti a enzymové regulaci. Ačkoli je samotný GSH účinný antioxidant, spolu s AsA tvoří další významný obranný mechanismus – askorbát-glutationový cyklus (Obr. 6). V oxidované formě tvoří disulfid GSSG (Mullineaux a Rausch, 2005; Ahmad *et al.*, 2009).



Obr. 6 Askorbát-glutationový cyklus. Kyselina askorbová (AsA), askorbát peroxidasa (APX), monodehydroaskorbát (MDHA), monodehydroaskorbát reduktasa (MDHAR), dehydroaskorbát (DHA), dehydroaskorbát reduktasa (DHAR), glutation reduktasa (GR) (převzato z Pandey *et al.*, 2015).

Vitamín E (tokoferol) je antioxidant rozpustný v tucích a účastní se ochrany lipidů před ROS. V rostlinách byly nalezeny čtyři izomery tokoferolů, kdy nejvyšší antioxidační aktivitu vykazuje forma izomeru s třemi methylovými skupinami. Tokoferoly mj. zabraňují lipidové autooxidaci (Kamal-Eldin a Appelqvist, 1996; Ahmad *et al.*, 2009).

Karotenoidy (Car) jsou pigmenty, které lze najít v rostlinách, ale i v určitých mikroorganismech. Car jsou rozpustné v tucích a plní řadu funkcí v rostlinném metabolismu včetně tolerance vůči oxidačnímu stresu. Car jsou lipofilní organické sloučeniny nacházející se v chloroplastech. Ochraňují fotosyntetický aparát před škodlivými ROS, které se běžně při fotosyntéze tvoří, a pomáhají udržovat stabilitu tylakoidní membrány (Siefermann-Harms, 1987; Ahmad *et al.*, 2009).

Flavonoidy patří mezi organické sloučeniny s antioxidační aktivitou. V rostlině se nachází v listech, květech i pylu. Některé flavonoidy působí jako inhibitory enzymů lipoxygenas, využívajících polynenasycené mastné kyseliny jako substrát, a enzymů lipoperoxidas způsobujících oxidační poškození vyšších mastných kyselin (Nijveldt *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2009).

2.6.1.2 Enzymové antioxidanty

Superoxiddismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) je metaloenzym (obsahuje ve své struktuře vázaný atom kovového prvku) přeměňující superoxid na H_2O_2 . Izoenzymy SOD mohou být na bázi mědi a zinku (Cu/ZnSOD), manganu (MnSOD), železa (FeSOD) případně niklu (NiSOD). Cu/ZnSOD je lokalizovaný v cytosolu, kdežto MnSOD se nachází v matrix mitochondrií a v peroxisomech (Kim *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 2010).

Katalasa (CAT; EC 1.11.1.6) je enzym, který přeměňuje H_2O_2 na O_2 a H_2O . Vyskytuje se v peroxisomech a jedná se o tetramerní enzym obsahující hem (Srivalli *et al.*, 2003). Většina rostlin obsahuje více izoform, kdy některé mohou kromě přeměny H_2O_2 také oxidovat určité molekuly, např. metanol, etanol, formaldehyd nebo kyselinu mravenčí. Rostlinné CAT se dělí do tří tříd. Třída 1 se nejvíce vyskytuje ve fotosyntetických pletivech, kde pomáhají odstraňovat H_2O_2 vzniklý během fotorespirace. Třída 2 se nachází v cévních pletivech a pravděpodobně se účastní procesu lignifikace. Třída 3 je přítomna v semenech a mladých rostlinách, kde přeměňuje H_2O_2 tvořící se během degradace mastných kyselin v glyoxylátovém cyklu (Willekens *et al.*, 1994; Ahmad *et al.*, 2010).

Glutathionperoxidasy (GPX; EC 1.11.1.9) je rodina mnoha izoenzymů, které katalyzují redukci H_2O_2 a cytotoxických hydroperoxidů na příslušné alkoholy. Slouží také k detoxifikaci produktů lipidové peroxidace. GPX se rozdělují na tři typy - selen-závislé (GPx), selen-nezávislé fosfolipidové hydroperoxidové (PHGPX) a glutathion-transferasy vykazující glutathionperoxidasovou aktivitu (GST-GPX). GPx a GST-GPX se liší ve svých podjednotkách, způsobem vazby selenu v aktivním místě a mechanismy katalýzy. Nárůst aktivity PHGPX byl pozorován u rostlin vystavených salinitnímu stresu (Ledford *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2010).

Asorbátperoxidasa (APX; EC 1.11.1.1) vycytává H_2O_2 vzniklý v askorbát-glutathionovém cyklu. Redukuje H_2O_2 na vodu a jako donor elektronů využívá AsA (Kangasjärvi *et al.*, 2008). Do rodiny APX se řadí nejméně pět izoform tohoto enzymu lišící se místem výskytu v buňce. Chloroplastová APX je velice nestálá a v nepřítomnosti AsA má poločas rozpadu pouze 30 sekund. Oproti tomu cytosolová izoforma má poločas rozpadu 40-60 minut. Uvádí se, že APX mají vyšší afinitu k H_2O_2 než CAT nebo POX (Miyake a Asada, 1992; Ahmad *et al.*, 2010).

Glutathionreduktasa (GR; EC 1.6.4.2) katalyzuje reakci NADPH-dependentní redukce disulfidové vazby GSSG, a proto je významným enzymem pro udržení a obnovení hladiny redukovaného GSH. GR jsou z velké části lokalizovány ve stromatu chloroplastů, ale nachází se také v mitochondriích, peroxisomech a cytosolu (Edwards *et al.*, 1990). GR katalyzují poslední krok askorbát-glutathionového cyklu, čímž zároveň ovlivňují rychlost celé reakce. Zvýšená hladina GR může zvýšit poměr $NADP^+/NADPH$ v buňce a tím zajistit dostupnost $NADP^+$ jako příjemce elektronů v elektronovém transportním řetězci při fotosyntéze. Za této situace se minimalizuje tok elektronů proudící směrem ke kyslíku a zabraňuje se vzniku superoxidového aniontu (Sudhakar *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2010).

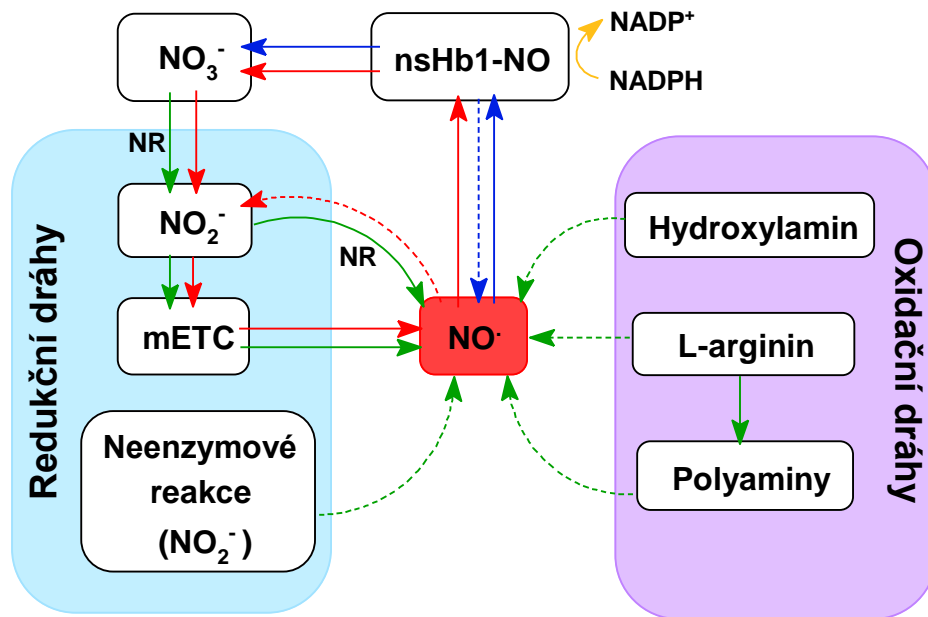
2.7 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je volný radikál s jedním nepárovým elektronem, který se může přeměnit na energeticky výhodnější strukturu přijetím nebo odevzdáním elektronu. Molekula NO je stabilní ale velmi reaktivní, z tohoto důvodu může být pro buňku toxická. NO a jeho metabolity se souhrnně označují jako reaktivní formy dusíku (RNS), které mohou nenávratně modifikovat různé biologické molekuly (Wink *et al.*, 2001).

Na druhou stranu se prokázala role NO jako klíčové molekuly v buněčné signalizaci v reakci na patogenní organismy, regulaci uzavírání průduchů, regulaci aktivity určitých enzymů, expresi genů buněčných cyklů a stimulování klíčení. NO může být generován enzymovými i neenzymovými reakcemi (Wilson *et al.*, 2008).

2.7.1 Biosyntéza oxidu dusnatého

Biosyntetické dráhy NO u rostlin mohou být klasifikovány jako oxidační či redukční. Dráhy zprostředkované přes nitrátreduktasu (NR) a produkce NO spojována s cytoplasmatickou membránou nebo mitochondriálními membránami se označují za redukční reakce, kdežto produkce NO z L-argininu nebo z polyaminů se řadí mezi oxidační dráhy (Obr. 7). Primárními substráty pro vznik NO za účasti NR jsou dusitany, které vznikají z dusičnanů také působením NR. Dráha NR je lokalizována v cytosolu a enzym zpravidla využívá NADH jako hlavního dárce elektronů (Gupta *et al.*, 2011).



Obr. 7 Biosyntetické dráhy (redukční a oxidační) vedoucí k produkci NO v rostlinné buňce. Reakcí katalyzovanou nitrátreduktasou (NR) vznikají z dusičnanů (NO_3^-) dusitany (NO_2^-). Následující redukce NO_2^- na NO může probíhat enzymovými reakcemi pomocí NR nebo v mitochondriálním elektronovém transportním řetězci (mETC), nebo reakcemi neenzymovými. Alternativně probíhá syntéza NO oxidačními dráhami z hydroxylaminu, L-argininu nebo polyaminů. Hladina NO je ovlivněna nesymbiotickým hemoglobinem 1 (nsHb1-NO), který přeměňuje NO na NO_3^- . Červené šipky představují tzv. dusičnan-NO cyklus. Zelené šipky znázorňují biosyntetické reakce. Modré šipky uvádí reakce zapojené v NO homeostázi (převzato a upraveno dle Arc *et al.*, 2013).

2.7.2 Oxid dusnatý jako signální molekula

Jelikož rostliny nemají žádné specifické receptory přímo pro PA, zkoumalo se, jak mohou PA v rostlinné buňce plnit svou funkci. V mnoha případech je účinku PA dosaženo prostřednictvím druhých poslů, např. H_2O_2 . Dalším druhým poslem, jehož produkci PA vyvolávají, je NO. Tato plynná signální molekula se tvoří v mnoha rostlinných pletivech a její efekt je rychlý a bez klidové fáze. V různých rostlinných kulturách bylo dokázáno, že tvorba NO může být indukována také cytokininy. Tyto poznatky mohou v budoucnu posloužit jako podklad pro pochopení souvislosti mezi NO, cytokininy a PA (Yamasaki a Cohen, 2006).

NO jako signální molekula zprostředkovává mnoho obranných odpovědí proti biotickým i abiotickým stresům. Ukázalo se, že exogenně aplikovaný NO, který pravděpodobně působí ve spojení s dalšími signály, se podílí na zvýšení salinitní tolerance v různých rostlinách. Jelikož salinita způsobuje primárně iontovou toxicitu a osmotický stres a sekundárně vyvolává nutriční poruchy a oxidační/nitrosační stres.

NO pomáhá indukovat salinitní toleranci zvyšováním poměru Na^+/K^+ v závislosti na zvýšených aktivitách H^+/ATP v plazmatické membráně i vakuolách, čímž vyvolá regulaci homeostázy Na^+ a přírůstku K^+ (Molassiotis *et al.*, 2010).

V důsledku přítomnosti NO může docházet k řadě postranlačních modifikací (PTM), které mohou ovlivnit probíhající metabolické reakce. Jednou z nich je tzv. nitrosylace – zavedení nitrosylového iontu (NO^-) do molekuly nebo sloučeniny. Při nitrosylaci kovů dochází ke vzniku komplexů NO např. s rostlinnými proteiny obsahujícími kovy. Luštěniny obsahují určitý typ symbiotického hemoglobinu zvaný leghemoglobin (Lb) nacházející se v kořenových hlízkách fixujících dusík. Lb je protein, který pomáhá v hlízkách udržet nízký obsah kyslíku jeho přenášením, což je nezbytné pro efektivní fixaci dusíku, která probíhá za anaerobních podmínek. Uvádí se, že vznik nitrosylového komplexu leghemoglobinu ($\text{LbFe}^{\text{II}}\text{NO}$) se může uplatnit při ochraně hlízek a regeneraci oxyLb (Besson-Bard *et al.*, 2008).

Druhou významnou PTM je S-nitrosylace proteinů, kdy se reverzibilně naváže NO^- na thiolovou skupinu (-SH) cysteinových residuí. Vzniklý S-nitrosothiol (RSNO) slouží jako relativně stabilní transportér a zásobárna formy NO (Kubienová *et al.*, 2013).

V rostlinách, kterým byl aplikován nitroprussid sodný (SNP), sloužící jako exogenní donor NO, se zkoumal vliv NO na salinitní toleranci. Uvádí se, že v rostlinách vystavených vysoké koncentraci NaCl (350 mmol l^{-1}), mohl NO zvýšit obsah fotosyntetických pigmentů. Po aplikaci SNP bylo v rostlině také pozorováno snížení obsahu malondialdehydu (MDA) a H_2O_2 , cytotoxických produktů peroxidace lipidů, které se tvořily v rostlinách vystavených NaCl. Výsledky naznačují, že by se NO mohl podílet na zvyšování tolerance rostlin vůči salinitnímu stresu tím, že snižuje obsah toxických produktů vznikajících při lipoperoxidaci u rostlin vystavených NaCl (Chen *et al.*, 2014).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Rostlinný materiál

Pro experimentální práci byly použity dva genotypy hrachu setého *Pisum sativum* lišící se rezistencí vůči patogenním organismům.

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

3.1.2 Chemikálie

Honeywell Fluka (Rumunsko): diethylether, disodná sůl kyseliny ethylen-diamintetraoctové dihydrát, pefabloc;

Lach-Ner (Česká republika): dihydrogenfosforečnan draselný, ethanol, hydrogenfosforečnan draselný, hydroxid sodný, chlorid draselný, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, methanol, peroxid vodíku, síran měďnatý pentahydrát;

Lachema (Česká republika): dihydrogenfosforečnan amonný, dusičnan draselný, dusičnan vápenatý tetrahydrát, heptamolybdenan amonný tetrahydrát, kyselina boritá, síran hořečnatý pentahydrát, síran zinečnatý heptahydrát;

Penta (Česká republika): síran železnatý heptahydrát;

Serva (Německo): křenová peroxidasa;

Sigma-Aldrich (Německo): 3-aminopropionaldehyd (APAL), benzoylchlorid, Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB), diaminohexan (DAH), guajakol, hovězí sérový albumin (BSA), kyselina mravenčí, kyselina trichloroctová (TCA), nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺), polyvinyl-polypyrrolidon (PVPP), putrescin, síran manganatý pentahydrát, tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl);

Unilever (Česká republika): Savo.

3.1.3 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Denver instrument, USA); automatické pipety (Eppendorf, Německo); centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo); digitální pH metr (XS Instruments, Itálie); digitální předvážky (KERN, Německo); elektromagnetická míchačka (BioSan, Litva); identifikace a kvantifikace polyaminů byly provedeny na Dionex Ultimate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) v on-line spojení s Compact qTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) s ESI ionizací (UHPLC-MS); mikrodestičkový reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mrazicí box (Electrolux, Švédsko); oscilační homogenizátor MM400 (Retsch, Německo); rotační třepačka (BioSan, Litva); rotační vakuová odparka (Eppendorf, Německo); ultrazvukový homogenizátor (Kraintek s.r.o., Slovenská republika); vortex (BioSan, Litva).

3.2 Metody

3.2.1 Příprava a zpracování rostlinného materiálu

Semena studovaných genotypů hrachů (*P. sativum* cv. Kudrnáč a cv. Twinset) byla dezinfikována v naředěném roztoku 4% SAVA (v/v) po dobu 2 minut a poté byla 10x řádně propláchnuta vodou. Semena bobtnala po dobu 24 hod v kádince s vodou. Nabobtnaná semena byla rozprostřena na navlhčené ubrousky v Petriho miskách, kde se nechala 3 dny klíčit při pokojové teplotě. Naklíčená semena byla poté pěstována 7 dnů ve fytotronu při teplotě 24 °C ve 4x zředěném Hoaglandově roztoku (Tab. 1) obsahujícím různé koncentrace NaCl: 0 mmol⁻¹ (kontrola), 10 mmol⁻¹, 30 mmol⁻¹ a 50 mmol⁻¹. Všechna pěstování byla provedena v trojím opakování (3 biologická opakování v týdenních časových rozestupech). Sedmý den pěstování byla provedena fotodokumentace rostlin a zhodnocení fyziologických parametrů kořenových a nadzemních částí rostlin. Všechny části rostlin, jak kořenová, tak nadzemní, byly ihned zamrazeny v tekutém dusíku. Rostlinný materiál byl posléze homogenizován v tekutém dusíku v třecí misce a rozdělen po alikvotech do mikrozkušavek. Vzorokly se před dalším zpracováním skladovaly v mrazáku při -80 °C.

Tab. 1: Příprava Hoaglandova roztoku.

Chemikálie	Koncentrace zásobního roztoku (mmol l ⁻¹)	Molekulová hmotnost (g mol ⁻¹)	Navážka (g l ⁻¹)	Objem (ml l ⁻¹)	Výsledná koncentrace (μmol l ⁻¹)
KNO ₃	1000	101,1	101,1	1,5	1500
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1000	236,16	236,16	1	1000
NH ₄ H ₂ PO ₄	1000	115,08	115,08	0,5	500
MgSO ₄ ·5H ₂ O	1000	246,49	246,49	0,25	250
H ₃ BO ₃	25	61,84	1,55	0,5	12,5
KCl	50	74,5	3,73		50
MnSO ₄ ·5H ₂ O	2	241,08	0,48		2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	287,55	0,58	1	2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5	249,75	0,125		0,5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,5	1235,95	0,618		0,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	20	278,02	5,56		20
Na ₂ EDTA	20	372,24	7,44	1	20

3.2.2 Hodnocení fyziologických parametrů rostlin

Pro stanovení průměrné hodnoty délky a hmotnosti čerstvého materiálu (FW), tj. kořenové a nadzemní části studovaných genotypů, bylo sedmý den pěstování náhodně vybráno 20 rostlin pěstovaných v roztocích o různé koncentraci NaCl. Jednotlivé kořeny i nadzemní části rostlin byly zváženy na analytických vahách a jejich délka byla změřena pravítkem.

3.2.3 Příprava rostlinných extraktů

K alikvotům zhomogenizovaného rostlinného materiálu byl přidán v poměru 1:2 (w/v) extrakční pufr o následujícím složení: 0,1 mol l⁻¹ K-fosfátový pufr o pH = 7, 1% (w/v) PVPP, 0,5 mmol l⁻¹ pefabloc a 2 mmol l⁻¹ EDTA. Extrakce byla realizována na rotační třepačce umístěné v lednici po dobu 20 min. Vzorky byly poté centrifugovány 20 min při 16 000 g a 4 °C. Extrakty byly následně přepipetovány do čistých mikrozkupek a použity pro stanovení proteinů metodou dle Bradforda a měření aktivit vybraných enzymů.

3.2.4 Stanovení celkových proteinů

Proteiny byly stanoveny metodou dle Bradforda (1976), jejíž podstatou je interakce proteinů s barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) v kyselém prostředí. Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky na mikrodestičkovém readeru Synergy HT při $\lambda = 595$ nm.

Nejprve se připravil zásobní roztok CBB. Navážilo se 10 mg CBB a navážka se rozpustila v 5 ml 95% ethanolu a 10 ml 85% H_3PO_4 . Roztok se doplnil destilovanou vodou na 100 ml. Pro vlastní měření se vždy čerstvě připravilo činidlo Bradforda - zásobní roztok CBB se naředil destilovanou vodou v poměru 1:4.

Pro stanovení kalibrační řady se připravil zásobní roztok standardu hovězího sérového albuminu (BSA, $c = 10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Ze zásobního roztoku BSA byly ředěním připraveny roztoky o koncentraci: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 a 1,4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do jamek se postupně pipetovalo 45 μl destilované vody, 5 μl standardu ze všech naředěných roztoků BSA a 200 μl činidla Bradforda. Obsah jamek se nechal po protřepání inkubovat po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Předem byl vytvořen na mikrodestičkovém readeru Synergy HT protokol pro dané měření, ve kterém bylo nastaveno počáteční protřepání obsahu jamek (3 s). Změřila se absorbance při $\lambda = 595$ nm. Ze závislosti absorbance na koncentraci BSA byla odvozena rovnice přímky, která byla dále použita pro výpočet koncentrace proteinů v extraktech připravených z rostlinného materiálu (viz. kapitola 3.2.3).

Stanovení proteinů probíhalo stejným způsobem jako stanovení kalibrační křivky se standardy BSA, do jamek se namísto standardů pipetovalo 5 μl naředěného extraktu. Z naměřených absorbancí se pomocí dříve získané rovnice přímky vypočítala koncentrace proteinů. Měření bylo provedeno v technickém triplicátu.

3.2.5 Stanovení aktivit enzymů

3.2.5.1 Stanovení aktivity aminoaldehyddehydrogenasy

Aktivita AMADH byla měřena spektrofotometricky s využitím Warburgova optického testu (Awal *et al.*, 1997). Při vlastní enzymové reakci dochází k oxidaci substrátu a zároveň se redukuje NAD^+ na NADH, což se projeví nárůstem absorbance při 340 nm. Molární absorpční koeficient pro NADH je $6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Aktivita enzymu AMADH byla stanovena v 96-ti jamkovém mikrodestičkovém uspořádání na readeru Synergy HT. Před vlastním měřením aktivity enzymu byl substrát 3-aminopropionaldehyd (APAL) připraven kyselou hydrolyzou 3-aminopropionaldehydu diethylacetalu. Směs 3,34 μl 3-aminopropionaldehydu diethylacetalu a 1 ml $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl byla inkubována po dobu 5 min v horké lázni. Do jamek bylo postupně pipetováno 165 μl $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufru o $\text{pH} = 9$, 10 μl $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD^+ (čerstvě připraveného těsně před měřením), 15 μl extraktu a 10 μl substrátu ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ APAL) nebo 10 μl blanku ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl). Jednotlivá stanovení probíhala v technickém triplikátu, kdy každý vzorek měl vlastní blank. Předem byl připraven protokol pro dané měření, ve kterém bylo nastaveno přehřátí readeru na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a protřepání obsahu jamek (3 s) před každým měřením. Měřila se kinetika reakce enzymu se substrátem v pravidelných časových intervalech (30 s) po dobu 11 min při $\lambda = 340 \text{ nm}$. Výsledkem byla změna absorbance za jednotku času. Aktivita AMADH byla změřena vždy v kořenech i nadzemních částech obou odrůd a výsledky naměřené v rostlinách pěstovaných v různých koncentracích NaCl byly srovnány s příslušnými kontrolami.

3.2.5.2 Stanovení aktivity diaminoxidasy

Aktivita diaminoxidasy (DAO) byla měřena spektrofotometricky. Při vlastní enzymové reakci dochází k oxidaci diaminu a produktem reakce je příslušný aminoaldehyd, amoniak a H_2O_2 . Vzniklý H_2O_2 je využit jako substrát pro peroxidasu za současné oxidace guajakolu na 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylochín, což se projeví nárůstem absorbance při 436 nm. Molární absorpční koeficient pro 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylochín je $4500 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Angelini *et al.*, 1990).

Aktivita enzymu DAO byla stanovena v 96-ti jamkovém mikrodestičkovém uspořádání na readeru Synergy HT. Reakční směs obsahovala $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátový

pufr (pH = 7), 35 mmol \cdot l⁻¹ guajakol a 0,01% (v/v) peroxidasu. Do jamek bylo postupně pipetováno 155 μ l předem připravené reakční směsi, 15 μ l extraktu a buď 5 μ l substrátu (87,5 mmol \cdot l⁻¹ putrescin) anebo 5 μ l blanku (destilovaná voda). Jednotlivá stanovení probíhala v technickém triplikátu, kdy každý vzorek měl vlastní blank. Předem byl vytvořen protokol pro dané měření, ve kterém bylo nastaveno přehřátí readeru na 30 °C a počáteční protřepání obsahu jamek (3 s). Měřila se kinetika reakce enzymu se substrátem v pravidelných časových intervalech (30 s) po dobu 3 min při λ = 436 nm. Výsledkem byla změna absorbance za jednotku času. Aktivita DAO byla změřena vždy v kořenech i nadzemních částech obou odrůd a výsledky naměřené v rostlinách pěstovaných v různých koncentracích NaCl byly srovnány s příslušnými kontrolami.

3.2.5.3 Stanovení aktivity peroxidasy

Pro stanovení peroxidasové aktivity byla použita spektrofotometrická metoda s guajakolem (Angelini *et al.*, 1990). Při vlastní enzymové reakci je H₂O₂ substrátem pro peroxidasu za současné oxidace guajakolu na 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylochinon, což se projeví nárůstem absorbance při λ = 436 nm. Molární absorpční koeficient pro 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylochinon je 4500 l \cdot mol⁻¹ \cdot cm⁻¹.

Aktivita enzymu guajakolperoxidasy (GuPOX) byla stanovena na mikrodestičkovém readeru Synergy HT v 96-ti jamkovém uspořádání. Reakční směs obsahovala 113 mmol \cdot l⁻¹ K-fosfátový pufr o pH = 6 a 113 mmol \cdot l⁻¹ guajakol. Do jamek bylo postupně pipetováno 155 μ l této reakční směsi, 10 μ l extraktu a buď 10 μ l substrátu (2 mol \cdot l⁻¹ H₂O₂) anebo 10 μ l blanku (destilovaná voda). Jednotlivá stanovení probíhala v technickém triplikátu, kdy každý vzorek měl vlastní blank. Předem byl vytvořen protokol pro dané měření, ve kterém bylo nastaveno přehřátí readeru na 30 °C a počáteční protřepání obsahu jamek (3 s). Pro stanovení aktivity GuPOX byly extrakty 100x zředěny. Měřila se kinetika reakce enzymu se substrátem v pravidelných časových intervalech (10 s) po dobu 1 min při λ = 436 nm. Výsledkem byla změna absorbance za jednotku času. Aktivita GuPOX byla změřena vždy v kořenech i nadzemních částech obou odrůd a výsledky naměřené v rostlinách pěstovaných v různých koncentracích NaCl byly srovnány s příslušnými kontrolami.

3.2.6 Stanovení volných polyaminů

Pro analýzu volných polyaminů (PA) slouží metody využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s různými derivacemi před nebo za kolonou. Pro rychlou, rozlišovací a reprodukovatelnou analýzu byla vyvinuta metoda využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s reverzní fází (RP-HPLC) se zavedenou derivatizací před kolonou pomocí benzoylchloridu (Taibi *et al*, 2000). Tuto citlivou a jednoduchou metodu lze využít k rutinnímu stanovení PA v biologických vzorcích. Stopy kontaminantů, jakými mohou být kyselina benzoová, methylbenzoát a anhydrid kyseliny benzoové, jsou eliminovány promývacími kroky zahrnutými v postupu. Detekce benzoylderivatů polyaminů je provedena při $\lambda = 229$ nm a $\lambda = 254$ nm.

Rostlinný materiál, který byl homogenizován v tekutém dusíku v třecí misce, byl uchován v mikrozkuřavkách při -80 °C. Mikrozkuřavky se vzorky se nechaly přes noc lyofilizovat v lyofilizátoru. Následně byl lyofilizovaný materiál rozvážen do čistých mikrozkuřavek přesně po 5 mg. Z každého vzorku byly takto připraveny tři navážky, aby bylo možné provést následující stanovení ve třech opakováních.

K lyofilizovaným vzorkům se přidalo 250 μ l roztoku 5% TCA s 5 μ mol l^{-1} DAH a pět skleněných kuliček střední velikosti. Vzorky byly homogenizovány v oscilačním homogenizátoru při 27 Hz po dobu 5 min. Následně byly vzorky sonikovány v ultrazvukovém homogenizátoru po dobu 10 min při teplotě 25 °C. Vzorky se zcentrifugovaly při 20 °C a 16 000 g po dobu 10 min. Supernatanty se poté přepipetovaly do čistých mikrozkuřavek a přidalo se k nim 500 μ l 2 mol l^{-1} NaOH a 2,5 μ l benzoylchloridu. Směs se řádně promíchala na vortexu (10 s) a nechala se 40 min stát při laboratorní teplotě.

Ke vzorkům se následně přidalo 500 μ l nasyceného roztoku NaCl a 500 μ l diethyletheru a směs se promíchala na vortexu (10 s). Po ustálení rozhraní mezi vrstvami se horní etherová vrstva přepipetovala do čisté mikrozkuřavky a ke zbylé spodní vrstvě se opět přidalo 500 μ l diethyletheru a extrakce se opakovala. Druhá etherová vrstva se přidala do mikrozkuřavky k první části a po propíchnutí víčka se etherové vrstvy nechaly odpařit ve vakuové odparce při 60 °C po dobu 30 min. Vzniklé odparky se před dalším zpracováním skladovaly při -80 °C. Následně byly odparky rozpuštěny v 200 μ l 0,5% kyseliny mravenčí a v ultrazvukovém homogenizátoru byly sonikovány po dobu 10 min při teplotě 25 °C. Poté proběhla centrifugace 10 min při 16 000 g. Supernatanty jednotlivých vzorků byly přeneseny po 70 μ l do skleněných

vialek k analýze na přístroji Dionex Ultimate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) v on-line spojení s Compact qTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) s ESI ionizací (UHPLC-MS).

3.2.7 Statistické zpracování dat

Studované rostliny byly pěstovány za definovaných podmínek ve třech nezávislých experimentech. Stanovení každého testovaného parametru (koncentrace celkových proteinů, aktivit enzymů a koncentrace polyaminů) bylo provedeno ve třech technických opakováních.

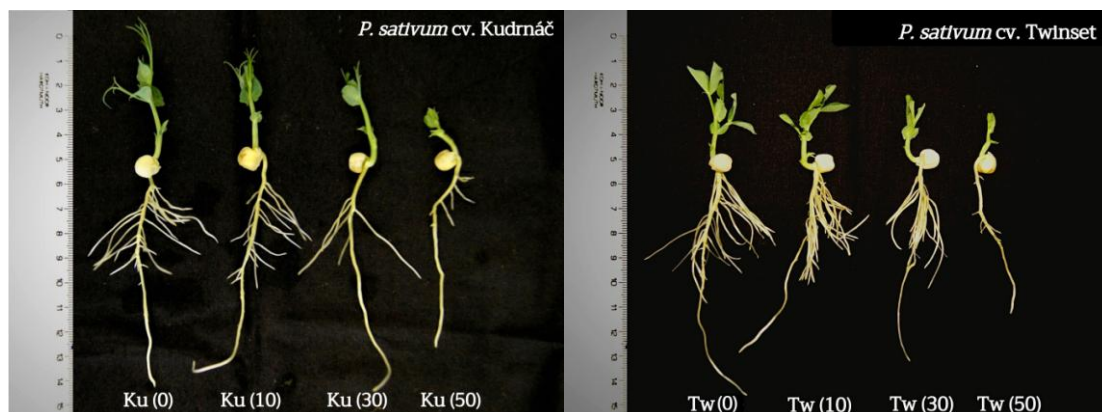
Pro základní výpočty dat pocházejících z popisovaných experimentů byl použit program Microsoft Excel 2010. Pro znázornění výsledků byly použity sloupcové grafy vytvořené v tomtéž programu. Získaná data byla statisticky vyhodnocena v programu Statistica 13.3.0 pomocí metody ANOVA s post-hoc Bonferroniho testem. Významně odlišné hodnoty od kontroly jsou v grafech označeny hvězdičkou (hladina významnosti $\alpha = 0,05$).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

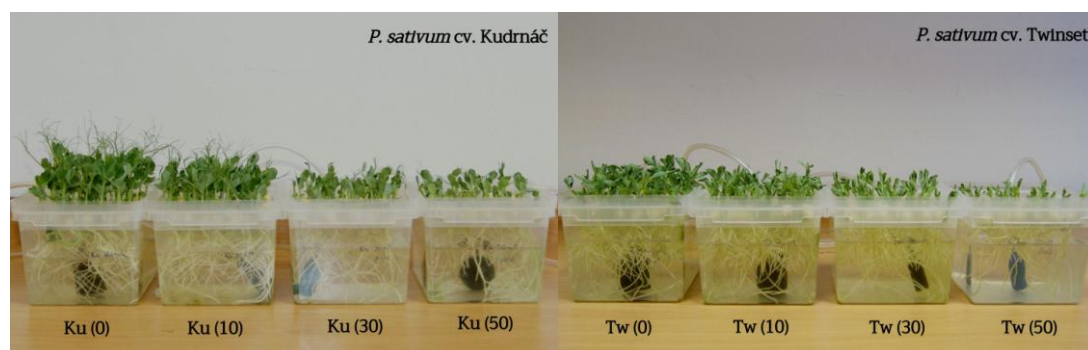
4.1 Vliv NaCl v růstovém médiu na fyziologické parametry hrachu setého

Přítomnost NaCl v půdě při pěstování rostlin způsobuje komplexní změny v oblasti morfologické, fyziologické i biochemické zahrnující klíčení semen, rostlinný růst a příjem vody a živin. Primární salinitní stres způsobuje rostlinám iontovou toxicitu, osmotický stres, nedostatek živin a v neposlední řadě také oxidační stres (Shrivastava a Kumar, 2015).

V experimentální části předložené bakalářské práce byl v první řadě porovnán vliv NaCl na fyziologické změny ve vývoji dvou odrůd hrachu setého *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 8, 9).



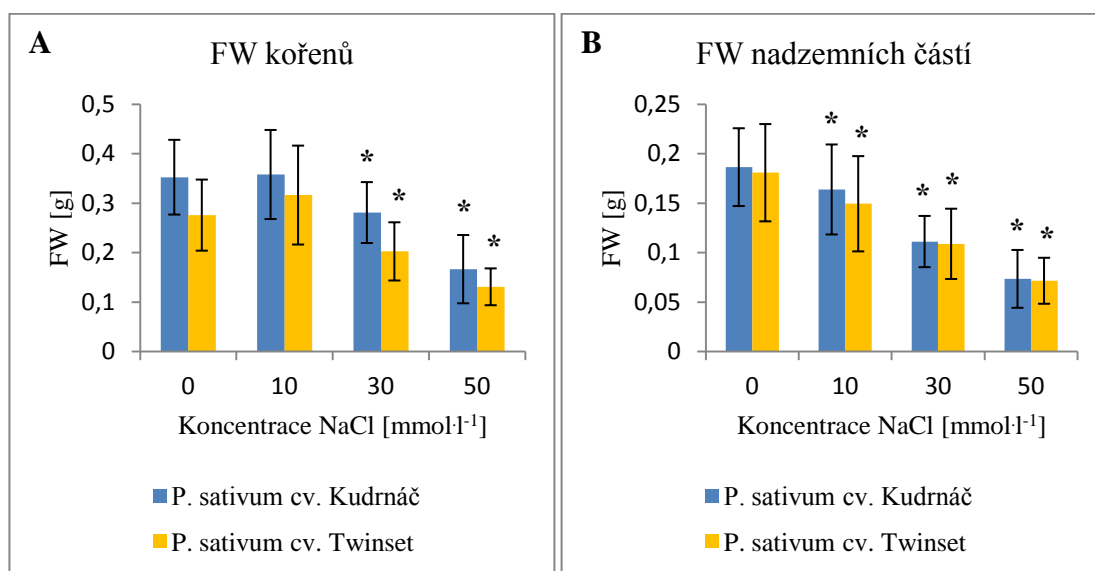
Obr. 8 Fotografie rostlin *Pisum sativum* cv. Kudrnáč (vlevo) a *Pisum sativum* cv. Twinset (vpravo) pěstované v Hoaglandově roztoku s přidávkem různé koncentrace NaCl (čísla v závorkách odpovídají koncentraci NaCl v mmol l^{-1}).



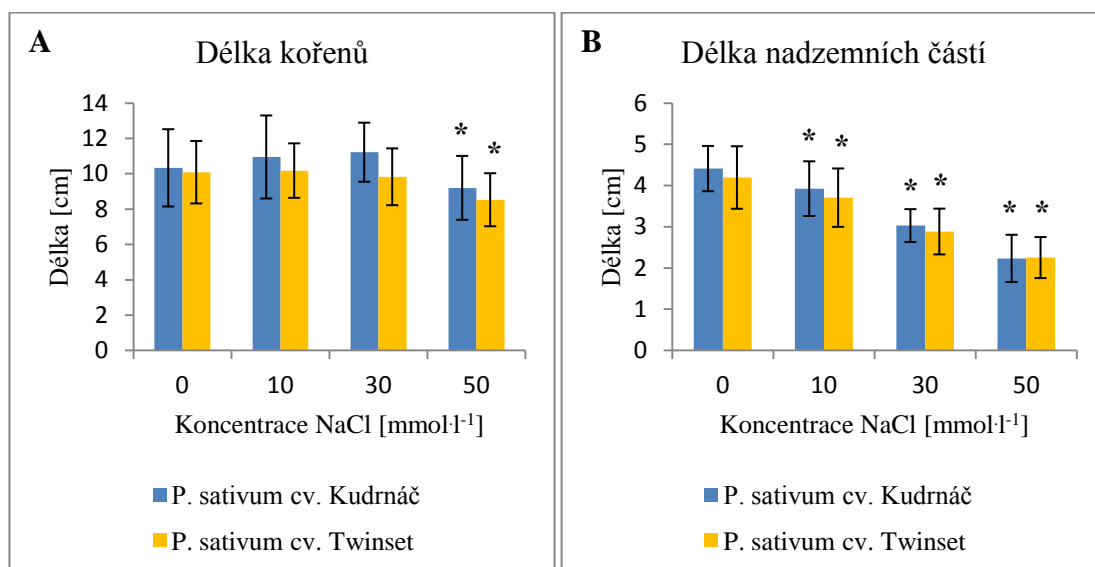
Obr. 9 Fotografie sad rostlin *Pisum sativum* cv. Kudrnáč (vlevo) a *Pisum sativum* cv. Twinset (vpravo) pěstované v Hoaglandově roztoku s přidávkem různé koncentrace NaCl (čísla v závorkách odpovídají koncentraci NaCl v mmol l^{-1}).

Z obr. 8 a 9 je zřejmé, že zvyšující se koncentrace NaCl v růstovém médiu negativně ovlivnila růst nadzemních částí obou studovaných genotypů i růst a tvorbu postranních kořenů.

Zkoumanými fyziologickými parametry u obou odrůd hrachu setého byla hmotnost čerstvého rostlinného materiálu (FW; Obr. 10) a délka kořenové a nadzemní části rostlin (Obr. 11).



Obr. 10 Vliv různé koncentrace NaCl (0, 10, 30 a 50 mmol⁻¹) v růstovém médiu na čerstvou váhu (FW) kořenů (A) a nadzemních částí (B) studovaných genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($\alpha < 0,05$).



Obr. 11 Vliv různé koncentrace NaCl (0, 10, 30 a 50 mmol⁻¹) v růstovém médiu na délku kořenů (A) a nadzemních částí (B) studovaných genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($\alpha < 0,05$).

Z výsledků na obr. 10 je patrný negativní vliv zvyšující se koncentrace NaCl v živném médiu na čerstvou hmotnost jak nadzemní tak kořenové části *P. sativum* cv. Kudrnáč i *P. sativum* cv. Twinset. Významný efekt zvýšené koncentrace NaCl na růst kořene nebyl pozorován pouze v případě 10 mmol⁻¹ NaCl v růstovém médiu. V kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč i *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 10A) byla čerstvá váha v přítomnosti 50 mmol⁻¹ NaCl snížena přibližně o 50 % ve srovnání s kontrolními rostlinami. FW kořenů *P. sativum* cv. Kudrnáč byla naměřena vždy větší než u *P. sativum* cv. Twinset. Čerstvé váhy nadzemních částí (Obr. 10B) se vzájemně mezi oběma odrůdami *P. sativum* výrazně nelišily, přičemž u obou studovaných genotypů došlo v přítomnosti 50 mmol⁻¹ NaCl k poklesu FW přibližně o 60 % ve srovnání s kontrolami.

V práci Najafi *et al.* (2007) bylo u hrachu setého *P. sativum* L, vystaveného při pěstování salinitnímu stresu, zaznamenáno výrazné snížení čerstvé váhy až při vyšších koncentracích NaCl (50 a 70 mmol⁻¹), kdežto při nižších koncentracích NaCl nebyly rozdíly hmotnosti oproti kontrole tak významné.

Na obr. 11, kde je znázorněn vliv zvyšující se koncentrace NaCl v růstovém médiu na délku kořenů a nadzemních částí, lze pozorovat postupné významné zkracování délky pouze u nadzemních částí obou genotypů *P. sativum* se vzrůstající koncentrací NaCl v živném médiu. Délky nadzemních částí (Obr. 11B) se při porovnání obou odrůd *P. sativum* mezi sebou výrazně nelišily, přičemž u obou genotypů došlo v přítomnosti 50 mmol⁻¹ NaCl k poklesu délky přibližně o 50 % ve srovnání s kontrolami. Pokles délky kořenů *P. sativum* cv. Kudrnáč i *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 11A) byl zaznamenán až při aplikaci 50 mmol⁻¹ NaCl do živného média, kdy se délky kořenů obou odrůd snížily pouze cca o 10 % ve srovnání s kontrolními rostlinami. Délka kořenů rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč byly vždy větší v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset.

U nadzemních částí studovaných rostlin *P. sativum* byl pozorován intenzivnější negativní efekt zvyšující se koncentrace NaCl v růstovém médiu na čerstvou váhu i na délku ve srovnání s vlivem na vývoj kořene.

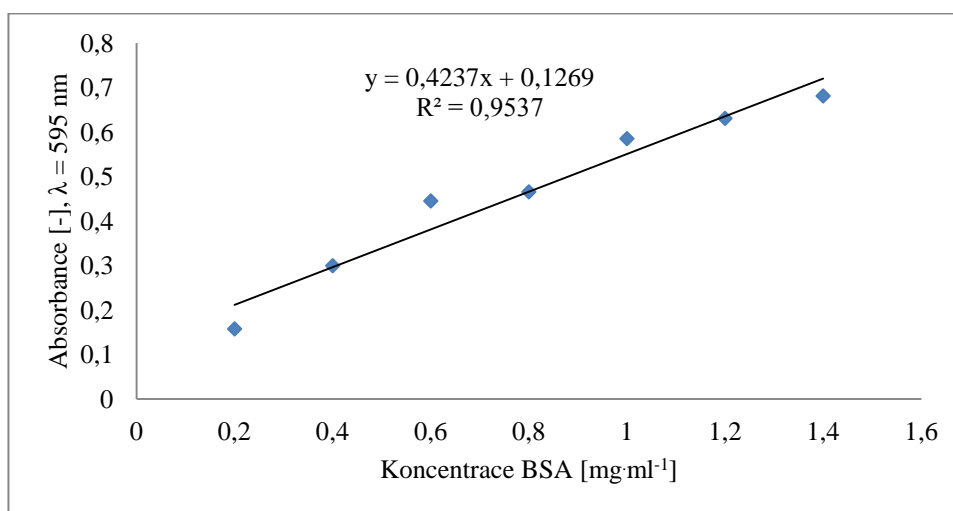
Nebyly pozorovány výrazné změny studovaných fyziologických parametrů mezi jednotlivými genotypy *P. sativum* (Tab. 2). Na základě stanovovaných fyziologických parametrů u obou genotypů pěstovaných v různých koncentracích NaCl nelze říci, že by některý z nich byl více, či méně odolný k salinitnímu stresu.

Tab. 2: Porovnání vlivu 50 mmol l^{-1} NaCl v růstovém médiu na inhibici vývoje rostlin. Pokles stanovovaných fyziologických parametrů (FW, délka) uváděný v % u jednotlivých genotypů hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset).

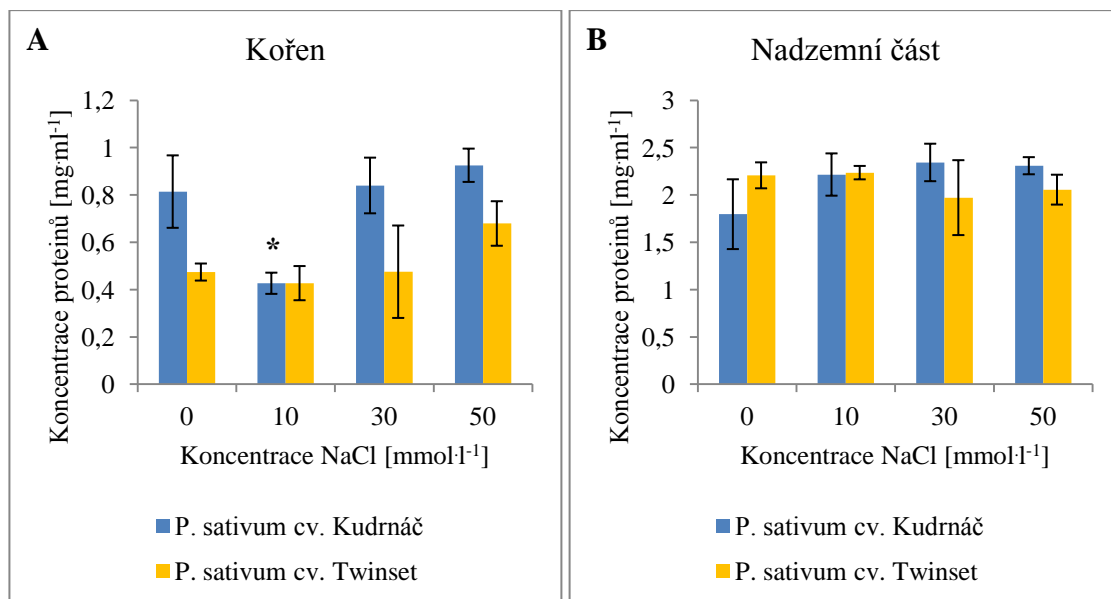
	Kořen <i>P. sativum</i> cv. Kudrnáč	Kořen <i>P. sativum</i> cv. Twinset	Nadzemní část <i>P. sativum</i> cv. Kudrnáč	Nadzemní část <i>P. sativum</i> cv. Twinset
FW	53	53	61	60
Délka	11	15	49	46

4.2 Vliv NaCl v růstovém médiu na obsah proteinů

Pro stanovení celkových proteinů byla sestrojena kalibrační křivka (Obr. 12). Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentracích $0,2 - 1,4 \text{ mg ml}^{-1}$. Z rovnice přímky (Obr. 12) byly následně vypočítané koncentrace proteinů v kořenech (Obr. 13A) i nadzemních částech (Obr. 13B) obou odrůd hrachu setého.



Obr. 12 Kalibrační přímka použitá pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích hrachu setého; rovnice přímky pro výpočet koncentrace proteinů: $y = 0,4237x + 0,1269$.



Obr. 13 Vliv různé koncentrace NaCl v růstovém médiu na celkový obsah proteinů v kořenech (A) a nadzemních částech (B) studovaných genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($\alpha < 0,05$).

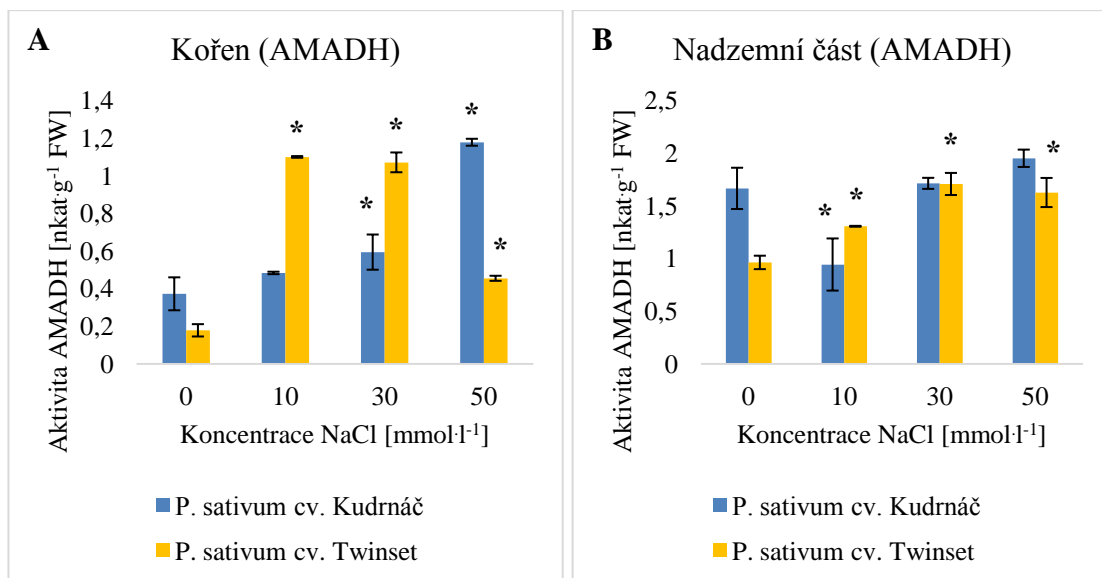
V nadzemních částech rostlin hrachu setého (Obr. 13B) byl detekován vyšší obsah proteinů než v kořenech (Obr. 13A) u obou studovaných genotypů. U *P. sativum* cv. Kudrnáč se mírně zvyšovala koncentrace celkových proteinů se vzrůstající koncentrací NaCl v růstovém médiu jak v kořenových tak v nadzemních částech, s výjimkou kořenových částí rostlin pěstovaných v přítomnosti 10 mmol⁻¹ NaCl, kde byl zaznamenán významný pokles obsahu proteinů. V kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč byla koncentrace celkových proteinů v přítomnosti 50 mmol⁻¹ NaCl přibližně o 10 % vyšší než v kontrolních rostlinách, v nadzemních částech *P. sativum* cv. Kudrnáč byla koncentrace proteinů při 50 mmol⁻¹ NaCl asi o 20 % vyšší než u kontrolních rostlin. V kořenech *P. sativum* cv. Twinset byl zaznamenán postupný nárůst obsahu celkových proteinů vzhledem k rostoucí koncentraci NaCl v růstovém médiu, kdy koncentrace proteinů v přítomnosti 50 mmol⁻¹ NaCl byla asi o 30 % vyšší než u kontrolních rostlin. V nadzemních částech *P. sativum* cv. Twinset byl pozorován opačný trend, kdy se obsah proteinů mírně snižoval se zvyšující se koncentrací NaCl a v přítomnosti 50 mmol⁻¹ NaCl se obsah proteinů snížil přibližně o 10 % oproti kontrolním rostlinám. V kořenových i nadzemních částech *P. sativum* cv. Kudrnáč vystavených působení vyšších koncentrací soli (30 a 50 mmol⁻¹) byl stanoven významně vyšší obsah celkových proteinů ve srovnání s genotypem *P. sativum* cv. Twinset.

V práci Zhao *et al.* (2014) byly rostliny šalvěže (*Salvia miltiorrhiza* L.) vystaveny salinitnímu stresu (0, 25, 50, 75, 100 mmol⁻¹ NaCl) po dobu 30 dní. Po pěstování byl stanoven mj. obsah proteinů ve stresovaných rostlinách, přičemž bylo zjištěno, že obsah proteinů se výrazně zvýšil se zvyšující se koncentrací NaCl. Proteiny spolu s rozpustnými sacharidy, jejichž obsah se ve stresovaných rostlinách také zvýšil, se řadí mezi osmoticky aktivní látky. Zvýšení obsahů těchto látek tedy poukazuje na jejich významnou roli v přizpůsobování se rostlin na osmotický stres vyvolaný stresem salinitním.

4.3 Vliv NaCl v růstovém médiu na aktivity vybraných enzymů

Mezi enzymy účastnícími se katabolismu polyaminů (PA) se řadí aminoxidasa a aminoaldehyddehydrogenasa (AMADH). Diaminoxidasa (DAO) katalyzuje reakce, při kterých dochází k oxidaci diaminů na příslušné aminoaldehydy, NH₃ a H₂O₂ (Angelini *et al.*, 2010). AMADH oxiduje aminoaldehydy, vzniklé při oxidaci diaminů účinkem DAO, na příslušné aminokyseliny (Brauner *et al.*, 2003). H₂O₂, vznikající při katabolismu PA, může sloužit jako substrát v reakcích katalyzovaných peroxidasami.

V této práci byl sledován vliv různé koncentrace NaCl (0, 10, 30, 50 mmol⁻¹) v růstovém médiu na aktivitu enzymů podílejících se na katabolismu PA. Spektrofotometricky byly stanoveny aktivity enzymů aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH, Obr. 14) a diaminoxidasy (DAO, Obr. 15) v kořenových i nadzemních částech rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset.



Obr. 14 Vliv různé koncentrace NaCl v růstovém médiu na aktivitu enzymu aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) v kořenech (A) a nadzemních částech (B) studovaných genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($\alpha < 0,05$).

V kořenech studovaných rostlin *P. sativum* (Obr. 14A) byla naměřena výrazně nižší aktivita AMADH než v nadzemních částech (Obr. 14B) u obou genotypů. S rostoucí koncentrací NaCl v růstovém médiu se zvyšovala aktivita AMADH v kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč. Významný nárůst aktivity byl detekován u rostlin pěstovaných v růstovém médiu s 50 mmol·l⁻¹ NaCl, kdy se aktivita ztrojnásobila v porovnání s kontrolou. V kořenech *P. sativum* cv. Twinset byl zaznamenán nárůst (cca šestinásobný) aktivity AMADH zejména při aplikaci 10 a 30 mmol·l⁻¹ NaCl do růstového média. Je zajímavé, že u rostlin pěstovaných v médiu s 50 mmol·l⁻¹ NaCl aktivita AMADH byla zvýšená pouze cca dvojnásobně. V kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč pěstovaných v médiu v přítomnosti 50 mmol·l⁻¹ NaCl byla naměřena téměř 3x vyšší aktivita AMADH než u *P. sativum* cv. Twinset. Aktivita AMADH v nadzemních částech rostlin *P. sativum* cv. Twinset pěstovaných v živném médiu s 30 a 50 mmol·l⁻¹ NaCl byla srovnatelná. V nadzemních částech *P. sativum* cv. Kudrnáč se aktivita AMADH zvyšovala s rostoucí koncentrací NaCl v růstovém médiu s výjimkou 10 mmol·l⁻¹ NaCl, kdy byla naměřená aktivita přibližně o 50 % nižší než u kontrolních rostlin.

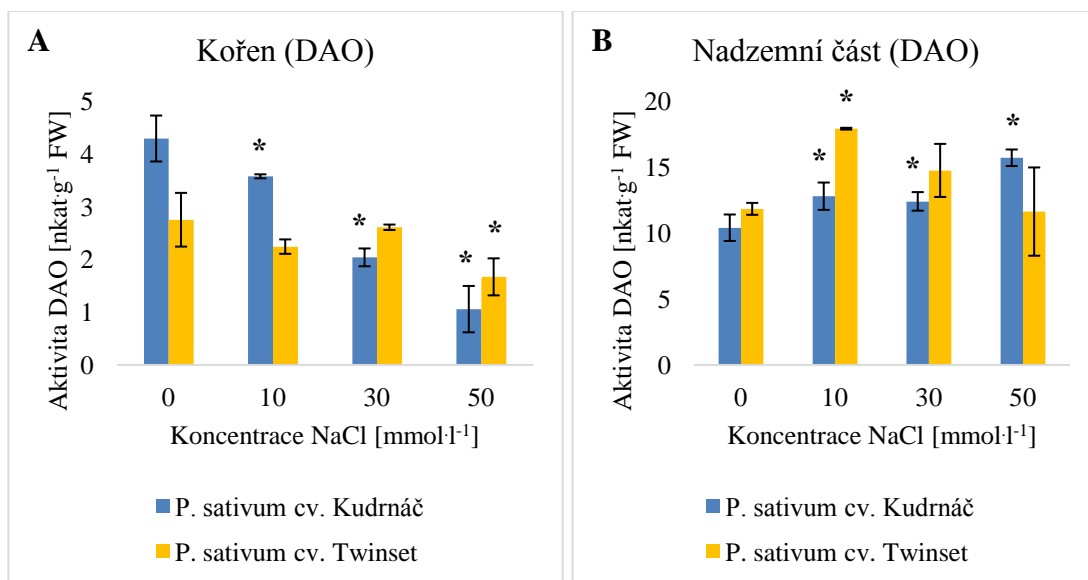
Úloha AMADH je ve fyziologii rostlin zkoumána, jelikož AMADH katalyzují konečný krok katabolismu PA. Rostlinné AMADH však mohou katalyzovat i reakce

spojené s biosyntézou osmoprotektantů, jako je např. glycin betain vzniklý oxidací betinaldehydu ve stromatu chloroplastů (Zarei *et al.*, 2015).

Vliv salinitního stresu na změnu aktivity AMADH byl studován v práci Fang *et al.* (2020) na klíčících rostlinách sóji (*Glycine max* L.). Rostliny byly po dobu 2 nebo 4 dnů vystaveny přítomnosti 50 mmol⁻¹ NaCl v růstovém médiu. Aktivita AMADH se významně zvýšila v odpovědi na salinitní stres. Součástí experimentu byla i exogenní aplikace Spd zároveň s přítomností 50 mmol⁻¹ NaCl. Aplikace Spd neměla významný vliv na změnu aktivity AMADH.

V souvislosti s exogenní aplikací Ca²⁺ ve formě CaCl₂ byl studován v práci Yin *et al.* (2014) vliv salinitního stresu na aktivitu AMADH u sóji (*Glycine max* L.). Po aplikaci Ca²⁺ byla vedle zvýšené aktivity AMADH detekována i vyšší hladina polyaminů a GABA - metabolitů, které mají vliv na potlačení negativních účinků salinitního stresu.

V práci Petřivalský *et al.* (2007) byla prokázána úloha AMADH v procesech adaptace rostlin na jeden z abiotických stresových faktorů (mechanické poškození). Podobně jako ve studiích zaměřených na salinitní stres byla detekována v reakci na mechanické poškození zvýšená aktivita AMADH a současně nárůst obsahu polyaminů a GABA.



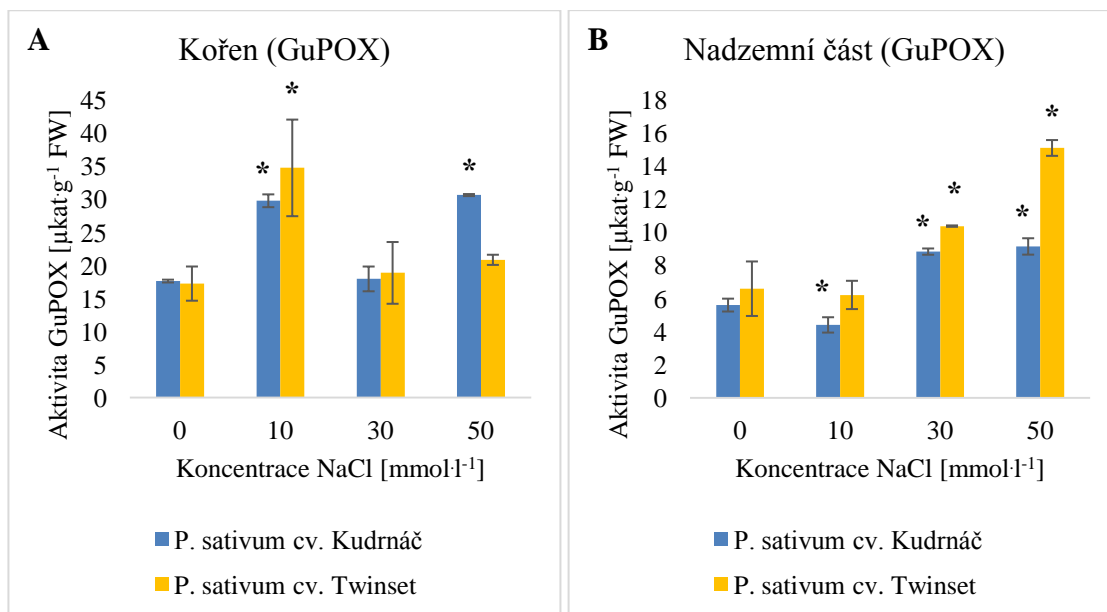
Obr. 15 Vliv různé koncentrace NaCl v růstovém médiu na aktivitu enzymu diaminoxidasy (DAO) v kořenech (A) a nadzemních částech (B) studovaných genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($\alpha < 0,05$).

Druhým studovaným enzymem v této práci, podílejícím se na katabolismu PA, je enzym DAO (Obr. 15). Aktivita DAO stanovená v nadzemních částech byla cca více než 2x resp. 4x vyšší než aktivita DAO v kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč resp. *P. sativum* cv. Twinset. V kořenech rostlin *P. sativum* cv. Twinset byla detekována nižší aktivita DAO v porovnání s *P. sativum* cv. Kudrnáč v přítomnosti vyšší koncentrace NaCl (30 a 50 mmol⁻¹) v růstovém médiu. V nadzemních částech kontrolních rostlin byla aktivita DAO u obou genotypů srovnatelná. Se zvyšující se koncentrací NaCl v růstovém médiu byl detekován významný pokles aktivity DAO v kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč (Obr. 15A). V přítomnosti 50 mmol⁻¹ NaCl se snížila aktivita DAO přibližně o 75 % ve srovnání s kontrolními rostlinami. V případě *P. sativum* cv. Twinset nebyly zaznamenány výrazné změny aktivity DAO v kořenech do 30 mmol⁻¹ koncentrace NaCl v růstovém médiu. Při 50 mmol⁻¹ NaCl se aktivita DAO snížila přibližně o třetinu v porovnání s kontrolou. V nadzemních částech (Obr. 15B) se aktivita DAO u *P. sativum* cv. Kudrnáč zvyšovala se zvyšující se koncentrací NaCl, přičemž při 50 mmol⁻¹ NaCl vzrostla aktivita přibližně o třetinu v porovnání s kontrolou. V nadzemních částech *P. sativum* cv. Twinset byla nejvyšší změna v aktivitě DAO detekována u rostlin pěstovaných v 10 mmol⁻¹ NaCl, kdy byla aktivita DAO přibližně o třetinu vyšší než aktivita kontrolních rostlin.

Vliv salinitního stresu na změnu aktivity DAO byl studován v kořenech rostlin *Zoysia japonica* S. (Li *et al.*, 2017). K nejvyššímu nárůstu aktivity DAO u rostlin pěstovaných v přítomnosti 150 mmol⁻¹ NaCl došlo 4. den pěstování. Aktivita DAO 8. den pěstování byla vyšší než v kontrolních rostlinách, ale nižší než 4. den pěstování. Zároveň byla v kořenech rostlin detekována nižší hladina Put, který je substrátem DAO. Výsledky tedy odpovídají zvýšené aktivitě DAO.

V práci Angelini *et al.* (2010) byla provedena studie na rostlinách sóji, které byly vystaveny salinitnímu stresu. V kořenových extraktech rostlin se aktivita DAO významně zvýšila a zároveň došlo k akumulaci GABA a intenzivnímu zvýšení biosyntézy PA, zejména volného a konjugovaného Put.

Výsledky práce Li S. *et al.* (2016) ukazují, že v kořenech rostlin *Zoysia japonica* S., které byly vystaveny salinitnímu stresu (200 mmol⁻¹ NaCl) a zároveň jim byl exogenně aplikován Spd, se rapidně zvýšila aktivita DAO. Zvýšená aktivita DAO byla potvrzena jak v reakci na salinitní stres, tak i v reakci na mechanické poškození rostliny např. u hrachu setého (Petřivalský *et al.*, 2007) a cizrny (Cona *et al.*, 2006).



Obr. 16 Vliv různé koncentrace NaCl v růstovém médiu na aktivitu enzymu guajakolperoxidasy (GuPOX) v kořenech (A) a nadzemních částech (B) studovaných genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($\alpha < 0,05$).

Vliv různé koncentrace NaCl (0, 10, 30, 50 mmol·l⁻¹) v růstovém médiu na aktivitu enzymů byl také pozorován u guajakolperoxidasy (GuPOX, EC 1.11.1.7), enzymu podílejícího se na antioxidační obraně rostlin. GuPOX katalyzuje reakce, ve kterých vystupuje H₂O₂ jako substrát a přeměňuje jej na O₂ a H₂O. Současně do reakcí vstupuje guajakol, který je peroxidasou oxidován na 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylchinon (Doerge *et al.*, 1997). Aktivita GuPOX (Obr. 16) byla stanovena spektrofotometricky v kořenových i nadzemních částech rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset.

V kořenech studovaných rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč i *P. sativum* cv. Twinset byla naměřena přibližně 3x vyšší aktivita GuPOX, než v nadzemních částech rostlin. Se zvyšující se koncentrací NaCl v živném médiu byl zaznamenán nárůst aktivity GuPOX s různou intenzitou v kořenech a nadzemních částech jednotlivých genotypů. V kořenech rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč pěstovaných v 50 mmol·l⁻¹ NaCl byl nárůst GuPOX aktivity cca o 40 %, naopak u *P. sativum* cv. Twinset byly změny v aktivitě GuPOX nevýrazné (Obr. 16A). Největší změny v aktivitě GuPOX byly detekovány v kořenech rostlin obou genotypů pěstovaných v živném médiu s 10 mmol·l⁻¹ NaCl. Aktivita GuPOX se v nadzemních částech obou odrůd *P. sativum* zvyšovala v závislosti na rostoucí koncentraci NaCl v růstovém médiu (Obr. 16B). V nadzemních částech

P. sativum cv. Twinset byla v přítomnosti 50 mmol l^{-1} NaCl naměřena cca 2x vyšší aktivita GuPOX než u kontrolních rostlin, kdežto v nadzemních částech *P. sativum* cv. Kudrnáč se aktivita zvýšila přibližně o třetinu oproti kontrole.

Aktivita GuPOX je v rostlinách ovlivněna působením řady stresových faktorů. Vliv salinitního stresu na zvýšení aktivity GuPOX, tzn. zapojení tohoto antioxidantního enzymu v obranné reakci rostlin, bylo pozorováno v řadě prací. V práci Boughalleb *et al.* (2020) byl proveden experiment na rostlinách *P. equisetiforme* pěstovaných v přítomnosti různých koncentrací NaCl (0, 100, 200, 300, 400 mmol l^{-1}). V extraktech nadzemních částí byla následně provedena analýza enzymů antioxidantního systému. Výsledky pro GuPOX ukazovaly nárůst aktivity enzymu zejména při nejvyšších koncentracích NaCl, tedy 300 a 400 mmol l^{-1} .

Významná aktivace GuPOX byla detekována v reakci na mechanický stres u hrachu setého, kdy došlo k cca čtyřnásobnému nárůstu aktivity (Petřivalský *et al.*, 2007).

V případě některých studií byl naopak detekován v reakci na salinitní stres pokles aktivity GuPOX. V experimentu Kibria *et al.* (2017) byly rostliny rýže (*Oryza sativa* L.) - citlivé a tolerantní k salinitnímu stresu, vystaveny různým koncentracím NaCl v růstovém médiu (0, 20, 40, 60 mmol l^{-1} NaCl) a po pěstování byla v extraktech listů změřena aktivita enzymů antioxidantního systému rostlin, mj. i GuPOX. S rostoucí koncentrací NaCl v růstovém médiu se aktivita GuPOX významně snížila.

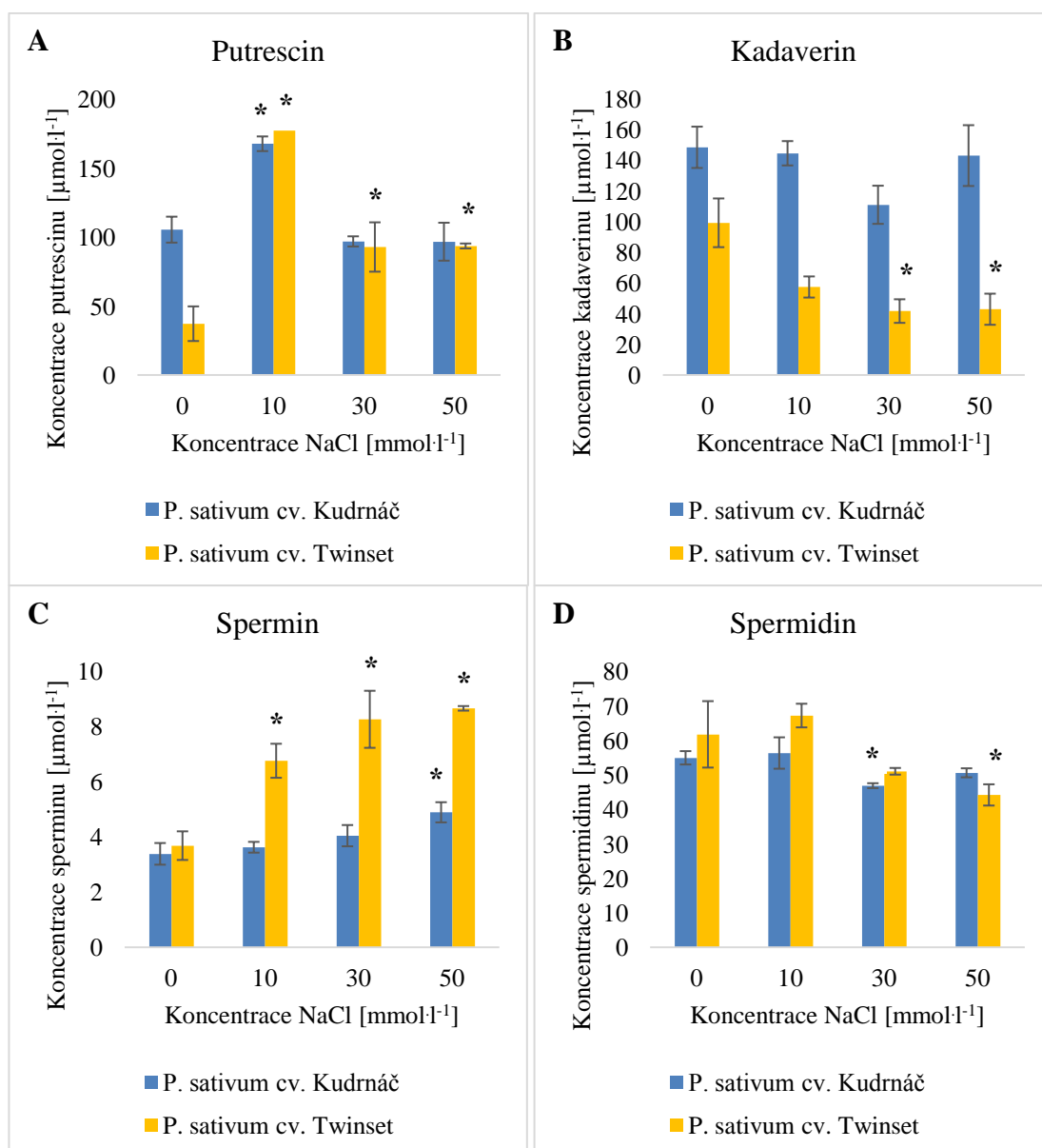
Ve studii Janhohammadi *et al.* (2012) byl pozorován vliv NaCl v růstovém médiu na enzymový antioxidantní systém u *Ricinus communis* L. Rostliny byly po dobu 10 dnů pěstovány v přítomnosti různých koncentrací NaCl (0, 50, 100, 200 mmol l^{-1}). Následně byla v extraktech nadzemních i kořenových částí změřena aktivita GuPOX, která se s rostoucí koncentrací NaCl v růstovém médiu významně snížila. Rostlinné peroxidásové isoenzymy se během vývoje rostlinných buněk odlišně exprimují, takže pozorovaná změna aktivity enzymu může být způsoben rozdílnou citlivostí GuPOX na salinitní stres nebo rozdílnou expresí v různých růstových stádiích.

4.4 Vliv NaCl v růstovém médiu na obsah polyaminů

Biogenní polyaminy mají v rostlinách řadu funkcí za fyziologických podmínek i při adaptaci a obraně rostlin v důsledku působení různých stresových faktorů. Při vystavení rostlin abiotickým stresům, jako je salinita, teplotní změny, hypoxie,

sucho, UV-záření, toxicita těžkými kovy nebo mechanické poškození, dochází v rostlinách k akumulaci polyaminů (Alcázar *et al.*, 2010).

Součástí studie řešené v bakalářské práci byla kvantifikace polyaminů (PA): putrescinu (Put), sperminu (Spm), spermidinu (Spd) a kadaverinu (Cad) u *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset jak v kořenech (Obr. 17), tak i v nadzemních částech (Obr. 18). Obsah PA byl stanovován pomocí UPLC-MS, kdy byl jako vnitřní standard použit diaminohexan (DAH).



Obr. 17 Vliv různé koncentrace NaCl v růstovém médiu na obsah polyaminů v kořenech studovaných genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. A) Putrescin; B) kadaverin; C) spermin; D) spermidin. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($\alpha < 0,05$).

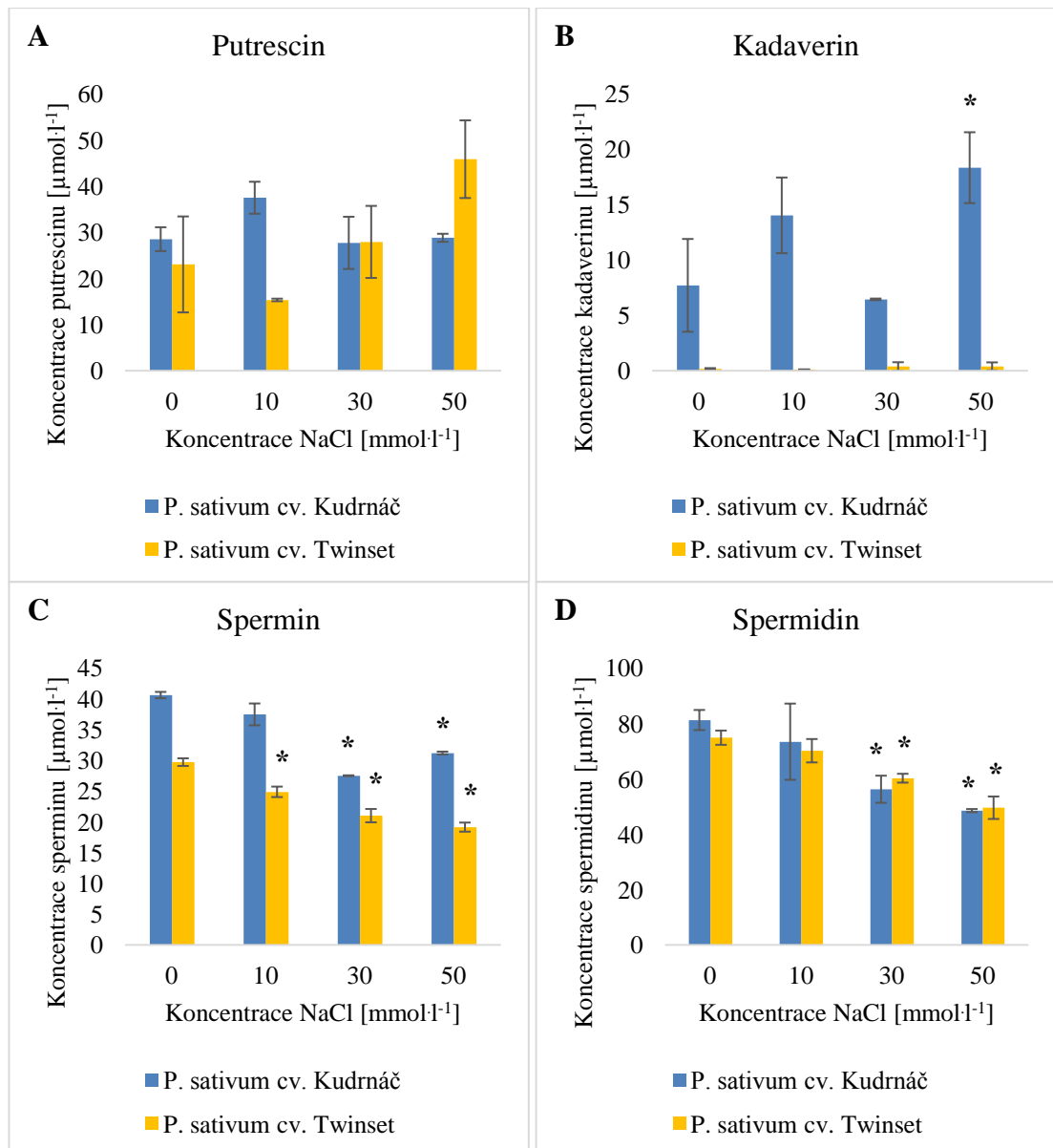
V kořenových částech obou studovaných genotypů *P. sativum* byly naměřené koncentrace Put a Cad několikanásobně vyšší než koncentrace Spd a zejména Spm. Za fyziologických podmínek byla detekována významně vyšší hladina Put a zejména Cad v kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset.

Obsah Put v kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč (Obr. 17A) se v závislosti na rostoucí koncentraci NaCl v růstovém médiu téměř neměnil s výjimkou přítomnosti 10 mmol⁻¹ NaCl v živném médiu, kdy došlo k nárůstu koncentrace Put až o 50 % v porovnání s kontrolními rostlinami. Obsah Put v kořenech *P. sativum* cv. Twinset se v závislosti na rostoucí koncentraci NaCl v růstovém médiu zvýšil. V přítomnosti 10 mmol⁻¹ NaCl v živném médiu došlo u *P. sativum* cv. Twinset k nejvyššímu nárůstu koncentrace Put o téměř 80 % v porovnání s kontrolními rostlinami.

V případě Cad byl detekován výrazný pokles jeho koncentrace se zvyšující se koncentrací NaCl v růstovém médiu, ale pouze v kořenech u *P. sativum* cv. Twinset. V přítomnosti 50 mmol⁻¹ NaCl se v kořenech *P. sativum* cv. Twinset snížil obsah Cad přibližně o 60 % (Obr. 17B). Naopak obsah Cad u *P. sativum* cv. Kudrnáč byl téměř neměnný s výjimkou rostlin pěstovaných v médiu s 30 mmol⁻¹ NaCl, kdy se koncentrace Cad snížila cca o 25 % ve srovnání s kontrolou.

V kořenech kontrolních rostlin obou genotypů hrachu je srovnatelné zastoupení Spm a Spd (Obr. 17C,D). Obsah Spd je více než desetinásobně vyšší než obsah Spm. S rostoucí koncentrací NaCl v živném médiu byl detekován nárůst produkce Spm u obou genotypů hrachu. V přítomnosti 50 mmol⁻¹ NaCl se obsah Spm u *P. sativum* cv. Twinset zdvojnásobil v porovnání s obsahem v kontrolních rostlinách, zatímco u *P. sativum* cv. Kudrnáč se obsah Spm zvýšil pouze cca o 30 % (Obr. 17C).

Koncentrace Spd v kořenech obou studovaných genotypů *P. sativum* (Obr. 17D) se na rozdíl od Spm s rostoucí koncentrací NaCl v růstovém médiu snižovala. Nebyl detekován významný rozdíl ve vlivu salinitního stresu na obsah Spd mezi studovanými genotypy hrachu. V přítomnosti 50 mmol⁻¹ NaCl byl detekován cca 10-20% pokles obsahu Spd v porovnání s kontrolními rostlinami.



Obr. 18 Vliv různé koncentrace NaCl v růstovém médiu na obsah polyaminů v nadzemních částech studovaných genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. A) Putrescín; B) kadaverin; C) spermin; D) spermidin. Data představují průměr ± SD. Statisticky významný rozdíl je označen * ($\alpha < 0,05$).

Koncentrace polyaminů Put, Spm, Spd a Cad byly stanoveny také v nadzemních částech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 18). V nadzemních částech obou studovaných genotypů byl naměřen výrazně vyšší obsah u Spd oproti obsahům Put, Spm a Cad.

V nadzemních částech *P. sativum* cv. Twinset se koncentrace Put (Obr. 18A) zvyšovala s rostoucí koncentrací NaCl v živném médiu. V přítomnosti 50 mmol·l⁻¹ NaCl se v nadzemních částech *P. sativum* cv. Twinset asi 2x zvýšil obsah Put ve srovnání

s kontrolními rostlinami. Salinitní stres měl minimální efekt na obsah Put v nadzemních částech *P. sativum* cv. Kudrnáč.

Obsah Cad v nadzemních částech *P. sativum* cv. Kudrnáč byl několikanásobně vyšší v porovnání se zastoupením Cad v rostlinách *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 18B). U obou genotypů se projevil salinitní stres zvýšením hladiny Cad. V přítomnosti 50 mmol l^{-1} NaCl byl obsah Cad v nadzemních částech *P. sativum* cv. Kudrnáč cca dvojnásobný v porovnání s kontrolou.

Obsah Spm byl vyšší v nadzemních částech *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 18C). S rostoucí koncentrací NaCl v růstovém médiu se snižovala koncentrace Spm v nadzemních částech a to u obou studovaných genotypů *P. sativum*. V přítomnosti 50 mmol l^{-1} NaCl byl obsah Spm v nadzemních částech rostlin obou genotypů nižší cca o 25-35 % ve srovnání s kontrolními rostlinami.

Obsah Spd byl srovnatelný v obou genotypech hrachu setého. V důsledku zvyšující se koncentrace NaCl v růstovém médiu bylo detekováno snížení obsahu Spd (Obr. 18D). V přítomnosti 50 mmol l^{-1} NaCl se obsah Spd v nadzemních částech *P. sativum* cv. Twinset a *P. sativum* cv. Kudrnáč snížil cca o 35-40 % v porovnání s kontrolou.

Obsah volných polyaminů v souvislosti se salinitním stresem byl studován v práci Li S. *et al.* (2016), kdy byla rostlina *Zoysia japonica* S. vystavená 200 mmol l^{-1} NaCl. V kořenových extraktech citlivé odrůdy na salinitní stres byl naměřen nárůst koncentrací Spm a Spd, ale snížení koncentrace Put. V kořenových extraktech odrůdy tolerantní vůči salinitnímu stresu byl naměřen nárůst koncentrací Put, Spm i Spd.

Obsah Put v odpovědi na salinitní stres byl kvantifikován také v práci Ma *et al.* (2018). Rostliny rýže (*Oryza sativa* L.) byly vystaveny salinitnímu stresu (150 mmol l^{-1} NaCl) a v různých časových intervalech (v rozmezí hodin) z nich byly odebírány vzorky listů i kořenů pro analýzu. V experimentu byly porovnávány dva genotypy rýže – citlivý a tolerantní vůči salinitnímu stresu. V tolerantním genotypu došlo po 8 hod pěstování v přítomnosti NaCl ke snížení obsahu Put, zřejmě se jedná o brzkou odpověď rostlin na salinitní stres.

Vliv salinitního stresu na obsah rostlinných polyaminů byl studován i v práci Islam *et al.* (2020). Rostliny rýže (*Oryza sativa* L.) byly pěstovány v živném médiu s 0, 50 a 100 mmol l^{-1} NaCl. V extraktech kořenů i nadzemních částí rostlin došlo k významnému snížení obsahu Put, ale naopak ke zvýšení obsahu Spm i Spd. Další

experimenty provedené v této práci v souvislosti s genovou transkripcí a biosyntézou PA ukázaly, že Put byl zřejmě přeměněn na Spm a Spd.

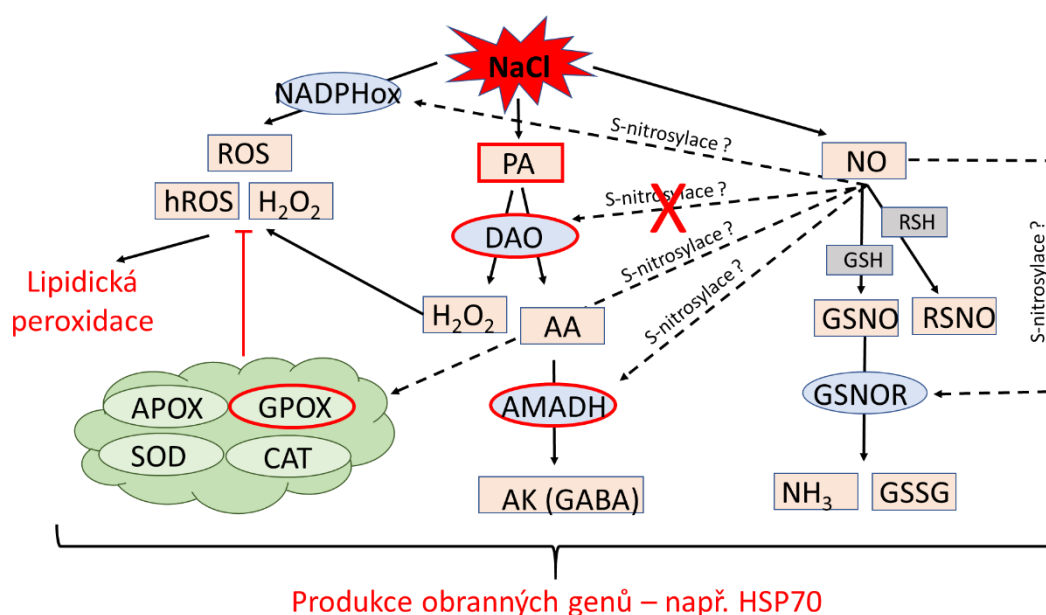
Vliv salinitního stresu na obsah Put, Spm a Spd byl studován v experimentu Yuan *et al.* (2016). Rostliny okurky (*Cucumis sativus* L.) byly pěstovány v růstovém médiu obsahujícím $75 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl po dobu 7 dní. V odpovědi na salinitní stres se obsah volných forem Put, Spm i Spd v kořenech zvýšil v porovnání s kontrolními rostlinami. V experimentu byl dále při pěstování rostlin aplikován exogenní Put a byl zkoumán jeho vliv na salinitní toleranci rostlin. Uvádí se, že Put může mít vliv na regulaci syntézy proteinů, ale i degradaci proteinů poškozených NaCl.

Vliv exogenní aplikace PA na obranu rostlin vůči salinitnímu stresu byl studován v práci Chattopadhyay *et al.* (2002). Uvádí se, že exogenně aplikovaný Spm a Spd spouští u rostlin rýže, vystavených salinitnímu stresu, obranný mechanismus proti buněčnému poškození. Spm a Spd mají pravděpodobně vliv na udržení celistvosti membrán a/nebo na změnu aktivity proteas během stresových podmínek. Role Spm při obraně rostlin proti působení stresových faktorů byla zkoumána také v práci Todorova *et al.* (2016). V experimentu byl hrách (*P. sativum* L.) vystaven vysoké teplotě a zároveň byl rostlinám exogenně aplikován Spm. Ve výsledcích je uvedeno, že Spm by mohl mít pozitivní vliv na schopnost rostliny adaptovat se na teplotní stres.

Aplikace exogenního Cad při pěstování rostlin a jeho vliv na stresové reakce rostlin byl popsán v práci Tomar *et al.* (2013). Experiment byl proveden na rostlinách *Brassica juncea* L., které byly vystaveny salinitnímu stresu, přítomnosti těžkého kovu nebo oběma stresovým faktorům zároveň. Cad měl pozitivní vliv na klíčivost semen v rostlinách vystavených jednotlivým stresům, nikoli však, pokud byly rostliny vystaveny oběma stresům zároveň. Cad měl také pozitivní vliv na délku kořenů i stonků rostlin pěstovaných ve stresových podmínkách. Ochranná funkce Cad může souviset např. se stimulací enzymu nitrátreduktasy (NR), jelikož aktivita NR se po aplikaci Cad výrazně zvýšila.

Exogenní aplikace Spd v rostlinách vystavených salinitnímu stresu byla studována i v práci Parvin *et al.* (2014). Rostliny ženšenu (*P. ginseng* cv. Yunpoong) byly po dobu 7 dnů vystaveny $150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl. Ve stresovaných rostlinách s aplikovaným Spd byl pozorovatelný pozitivní vliv na délku kořene i nadzemní části oproti rostlinám, které byly vystaveny pouze salinitnímu stresu bez aplikace Spd. Ochranná funkce Spd zřejmě souvisí s udržením membránové stability a snížením hladin ROS stimulací obranného antioxidantního systému rostlin.

Experimenty realizované v předložené práci jsou součástí rozsáhlejší studie zaměřené na úlohu S-nitrosylace v regulaci aktivity enzymů zapojených v obranném mechanismu rostlin vystavených abiotickým stresovým faktorům, jako je salinita, sucho, teplotní stres a přítomnost těžkých kovů. Studie je zaměřena zejména na charakterizaci úlohy PA a enzymů jejich metabolismu ve spojení s produkcí ROS a RNS a následné možné regulace aktivity klíčových enzymů, jako je AMADH, DAO, antioxidantní enzymy, NADPH oxidasa a S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR), kontrolující hladinu NO v organismu (Obr.19).



Obr. 19 Vliv salinitního stresu (NaCl) na produkci polyaminů (PA), aktivitu klíčových enzymů spojených s metabolismem PA a s produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) nebo dusíku (RNS). NADPH oxidasa (NADPHox), askorbát peroxidasa (APOX), guajakol peroxidasa (GPOX), superoxiddismutasa (SOD), katalasa (CAT), diaminoxidasa (DAO), aminoaldehydy (AA), aminoaldehyddehydrogenasa (AMADH), aminokyseliny (AK), glutation (GSH), S-nitrosoglutation (GSNO), S-nitrosoglutationreduktasa (GSNOR), thioly (RSH), S-nitrosothioly (RSNO).

V předložené práci byl stanoven vliv salinitního stresu na produkci PA, aktivitu AMADH, DAO a GuPOX v kontextu s efektem na úrovni fyziologických změn. Byla porovnána reakce na salinitní stres dvou genotypů hrachu setého významně se lišících v odolnosti vůči patogenním organismům, kdy *P. sativum* cv. Kudrnáč je citlivý genotyp a *P. sativum* cv. Twinset je genotyp rezistentní vůči padlí, fusariovému vadnutí a viru hrachové mozaiky. Salinitní stres měl jednoznačně negativní efekt na vývoj obou genotypů hrachu setého, nebyl pozorován významný rozdíl mezi genotypy. Při porovnání vlivu salinitního stresu na kořenovém systému byla detekována intenzivnější odezva ve většině sledovaných parametrů u *P. sativum* cv. Kudrnáč v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset. S výjimkou aktivity DAO, kdy byl detekován pokles enzymové aktivity, se aktivity ostatních enzymů v důsledku stresu zvýšily. Významnější změny v zastoupení PA byly detekovány u Cad (pokles hladiny) a Spm (naopak významně zvýšený obsah). Změny na úrovni PA byly výraznější u *P. sativum* cv. Twinset. V nadzemní části na rozdíl od kořenového systému byla DAO aktivita v důsledku salinitního stresu zvýšená a byla naopak detekována zvýšená hladina Cad a snížený obsah Spm. V následujících experimentech bude stanovena produkce NO, tvorba s-nitrosothiolů pomocí NO analyzátoru a s využitím metody biotin-switch budou detekovány změny v intenzitě S-nitrosylace klíčových enzymů. Negativní dopad působení stresu bude dokumentován stanovením lipidické peroxidace.

5 ZÁVĚR

V teoretické části předložené bakalářské práce byla vypracována aktuální literární rešerše se zaměřením na salinitní stres a jeho důsledky na pěstování rostlin. Byly charakterizovány polyaminy (PA), jejich biosyntéza, katabolismus a také jejich role při ochraně rostlin vystavených působení stresových faktorů. Byla popsána úloha enzymů diaminoxidas (DAO) a aminoaldehyddehydrogenas (AMADH), které se účastní katabolismu PA. Součástí teoretické části je charakterizace oxidačního stresu, jako odpovědi rostlin v reakci na vnější stresové faktory, a s tím spojená charakterizace antioxidačního systému rostlin v rámci rostlinné obranné reakce. Dále byly shrnuty poznatky týkající se oxidu dusnatého, jeho biosyntézy a důležité signalizační a regulační funkce v rostlinách.

Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na studium vlivu salinitního stresu na změny fyziologických parametrů – délky a čerstvé váhy kořenů i nadzemních částí, změny v obsahu celkových proteinů, změny v aktivitách vybraných enzymů - DAO, AMADH a GuPOX, a také na změny v obsahu vybraných polyaminů u dvou komerčních odrůd hrachu setého *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset.

Z výsledků daných experimentů vyplývá:

- 1) Salinitní stres inhiboval růst zejména nadzemních částí rostlin. Nebyly pozorovány výrazné rozdíly v intenzitě změn fyziologických parametrů mezi porovnávanými genotypy *P. sativum*.
- 2) Celkový obsah proteinů se v přítomnosti NaCl v růstovém médiu zvýšil u obou studovaných genotypů s výjimkou nadzemní části *P. sativum* cv. Twinset.
- 3) Při zvýšené koncentraci NaCl v růstovém médiu byly převážně v kořenových částech *P. sativum* cv. Kudrnáč pozorovány významnější změny aktivit enzymů DAO a AMADH, kdy se aktivita DAO výrazně snížila, zatímco aktivita AMADH se zvýšila. Naopak změny v aktivitě GuPOX při zvýšené koncentraci NaCl byly zaznamenány zejména v nadzemních částech *P. sativum* cv. Twinset, kdy došlo k významnému nárůstu enzymové aktivity.
- 4) Aplikace NaCl do růstového média vyvolala výraznější změny v obsahu polyaminů Cad a Spm v kořenovém systému a to zejména u *P. sativum* cv. Twinset. Významné zvýšení hladiny Put v důsledku salinitního stresu bylo detekováno pouze v nadzemních částech *P. sativum* cv. Twinset a Cad naopak v nadzemních částech *P. sativum* cv. Kudrnáč.

- 5) Z důvodu opatření souvisejících s nákazou Covid-19 nebylo možné realizovat experimenty spojené s testováním produkce ROS a RNS. Byla stanovena pouze změna aktivity GuPOX v důsledku salinitního stresu. Na základě vyhodnocení výsledků bude nutné v navazujících experimentech ověřit změny v obsahu PA.

6 LITERATURA

- Ahmad P., Jaleel Ch. A., Azooz M. M., Nabi G. (2009): Generation of ROS and Non-Enzymatic Antioxidants During Abiotic Stress in Plants. *Botany Research International* **2**, 11-20.
- Ahmad P., Jaleel Ch. A., Salem M. A., Nabi G., Sharma S. (2010): Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* **30**, 161-175.
- 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**, 1237-1249.
- Amacher J. K., Koenig R., Kitchen B. (2000): Salinity and Plant Tolerance. *All Archived Publications* **43**, 3-11.
- Angelini R., Manes F., Federico R. (1990): Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in Chin-pea stems. *Planta* **182**, 89-96.
- Angelini R., Cona A., Federico R., Fincato P., Tavladoraki P., Tisi A. (2010): Plant amine oxidases “on the move”: An update. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1-5.
- Arc E., Sechet J., Corbineau F., Rajjou L., Marion-Poll A. (2013): ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1-19.
- Awal H. M. A., Kinoshita T., Yoshida I., Doe M., Hirasawa E. (1997): Aminoaldehyde dehydrogenase of pea epicotyls. *Phytochemistry* **44**, 997-1000.
- Baetz U., Eisenach C., Tohge T., Martinoia E., De Angeli A. (2016): Vacuolar Chloride Fluxes Impact Ion Content and Distribution during Early Salinity Stress. *Plant Physiology* **172**, 1167-1181.
- Bagni N., Tassoni A. (2001): Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**, 301-317.
- Bernstein L. (1975): Effects of Salinity and Sodicity on Plant Growth. *Agricultural Research Service*, **556**, 295-312.
- Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D. (2008): New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 21-39. OrbitBiotech: [https://orbitbiotech.com/temperature-stress-plants-high-temperature-stress/\(11.11.2019\)](https://orbitbiotech.com/temperature-stress-plants-high-temperature-stress/(11.11.2019)).
- Bitrián M., Zarza X., Altabella T., Tiburcio A. F., Alcázar R. (2012): Polyamines under Abiotic Stress: Metabolic Crossroads and Hormonal Crosstalks in Plants. *Metabolites* **2**, 516-528.
- Boughalleb F., Abdellaoui R., Mahmoudi M., Bakhshandeh E. (2020): Changes in phenolic profile, soluble sugar, proline, and antioxidant enzyme activities of *Polygonum equisetiforme* in response to salinity. *Turkish Journal of Botany* **44**, doi:10.3906/bot-1908-2.
- 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**, 1-10.
- Bressan R. A., Pardo J. M. (1998): Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends in Plant Science* **3**, 411-412.
- Carillo P., Annunziata M. G., Pontecorvo G., Fuggi A., Woodrow P. (2011): Salinity Stress and Salt Tolerance. *IntechOpen*. <https://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-in-plants-mechanisms-and-adaptations/salinity-stress-and-salt-tolerance>
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006): Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* **11**, 80-88.
- Doerge D. R., Divi R. L., Churchwell M. I. (1997): Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases. *Analytical Biochemistry* **250**, 10-17.
- Duché O., Trémoulet F., Glaser P., Labadie J. (2002): Salt Stress Proteins Induced in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1491-1498.
- Edwards E. A., Rawsthorne S., Mullineaux P. M. (1990): Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**, 278-284.

- Fang W., Qi F., Yin Y., Yang Z. (2020): Exogenous Spermidine Promotes γ -Aminobutyric Acid Accumulation and Alleviates the Negative Effect of NaCl Stress in Germinating Soybean (*Glycine max* L.). *Foods* **9**, www.mdpi.com/journal/foods.
- Foyer C.H., Noctor G. (2005): Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* **28**, 1056-1071.
- 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**, 160-168.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1999): Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford: Clarendon Press*, 1-139.
- Hernandez J. A., Olmos E., Corpas F. J., Sevilla F., del Rio L. A. (1995): Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science* **105**, 151-167.
- Chattopadhyay M. K., Tiwari B. S., Chattopadhyay G., Bose A., Sengupta D. N., Ghosh B. (2002): Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* **116**, 192-199.
- Chen J., Xiao Q., Wang Ch., Wang W-H., Wu F-H., Chen J., He B-Y., Zhu Z., Ru Q-M., Zhang L-L., Zheng H-L. (2014): Nitric oxide alleviates oxidative stress caused by salt in leaves of a mangrove species. *Aegiceras corniculatum*. *Aquatic Botany* **117**, 41-47.
- Cheng B., Li Z., Liang L., Cao Y., Zeng W., Zhang X., Ma X., Huang L., Nie G., Liu W., Peng Y. (2018): The γ -Aminobutyric Acid (GABA) Alleviates Salt Stress Damage during Seeds Germination of White Clover Associated with Na⁺/K⁺ Transportation, Dehydrins Accumulation, and Stress-Related Genes Expression in White Clover. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 1-17.
- Chokami K. N., Abdossi V., Samavat S., Moghadam A. L., Moradi P. (2019): Effect of different polyamines on some physiological traits, growth, and development of basil (*Ocimum basilicum* L.) in salt stress under hydroponic culture conditions. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* **7**, 7-13.
- Islam M. A., Pang J-H, Meng F-W, Li Y-W, Xu N., Yang Ch., Liu J. (2020): Putrescine, spermidine, and spermine play distinct roles in rice salt tolerance. *Journal of Integrative Agriculture* **19**, 643-655.
- Jajic I., Sarna T., Strzalka K. (2015): Senescence, Stress and Reactive Oxygen Species. *Plants* **4**, 393-411.
- Janhohammadi M., Abbasi A., Sabaghnia N. (2012): Influence of NaCl treatments on growth and biochemical parameters of castor bean (*Ricinus communis* L.). *Acta agriculturae Slovenica* **99**, 31-40.
- Jimenez A., Hernandez J. A., Pastori G., del Rio L. A., Sevilla F. (1998): Role of the ascorbateglutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology* **118**, 1327-1335.
- Kamal-Eldin A., Appelqvist L. (1996): The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**, 671-701.
- Kangasjärvi S., Lepistö A., Hännikäinen K., Piippo M., Luomala E. M., Aro E. M., Rintamäki E. (2008): Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoidbound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochemical Journal* **412**, 275-285.
- Kibria M. G., Hossain M., Murata Y., Hoque M. A. (2017): Antioxidant Defense Mechanisms of Salinity Tolerance in Rice Genotypes. *Rice Science* **24**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rsci.2017.05.001>.
- Kim F-J., Kim H-P., Hah Y-C., Roe J-H. (1996): Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn. *European Journal of Biochemistry* **241**, 178-185
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2013): S-nitrosogluthationreduktasa: Klíčový enzym regulace S-nitrosylace. *Chemické Listy* **107**, 202-208.
- Ledford H. K., Chin B. L., Niyogi K. K. (2007): Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* **6**, 919-930.
- Li J-K., Liu X-D., Shen L., Zeng W-M., Qiu G-Z. (2016): Natural plant polyphenols for alleviating oxidative damage in man: Current status and future perspectives. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **15**, 1089-1098.

- Li S., Jin H., Zhang Q. (2016): The Effect of Exogenous Spermidine Concentration on Polyamine Metabolism and Salt Tolerance in Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud) Subjected to Short-Term Salinity Stress. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1221.
- Li S., Cui L., Zhang Y., Wang Y., Mao P. (2017): The Variation Tendency of Polyamines Forms and Components of Polyamine Metabolism in Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) to Salt Stress with Exogenous Spermidine Application. *Frontiers in Physiology* **8**:208, doi: 10.3389/fphys.2017.00208.
- Liu J-H., Kitashiba H., Wang J., Ban Y., Moriguchi T. (2007): Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology* **24**, 117-126.
- Ma N. L., Che Lah W. A., Abd Kadir N., Mustaqim M., Rahmat Z., Ahmad A., Datt Lam S., Ismail M. R. (2018): Susceptibility and tolerance of rice crop to salt threat: Physiological and metabolic inspections. *PLOS one* **13**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192732>.
- Maas E. V., Grattan S. R. (1999): Crop Yields as Affected by Salinity. *Agronomy monograph* **38**, 55-108.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Miyake C., Asada K. (1992): Thylakoid bound ascorbate peroxidase in *Spinach* chloroplasts and photoregeneration of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiology* **33**, 541-553.
- Molassiotis A., Tanou G., Diamantidis G. (2010): NO says more than 'YES' to salt tolerance. *Plant Signaling and Behavior* **5**, 209-212.
- Mořková K., Podlipná R., Vaněk T., Kafka Z. (2014): Halofytní rostliny a jejich možné využití ve fytořemediacích. *Chemické listy* **108**, 586-591.
- Mullineaux P.M., Rausch T. (2005): Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research* **86**, 459-474.
- Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of Salinity Tolerance. *The Annual Review of Plant Biology* **59**, 651-681.
- Najafi F., Khavari-Nejad R. A., Rastgar-jazii F., Sticklen M. (2006): Physiological Changes in Pea (*Pisum sativum* L., cv. Green Arrow) under NaCl Salinity. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **9**, 974-978.
- Najafi F., Khavari-Nejad R. A., Rastgar-jazii F., Sticklen M. (2007): Growth and Some Physiological Attributes of Pea (*Pisum sativum* L.) As Affected by Salinity. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **10**, 2752-2755.
- Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D. E., Boelens P. G., Van Norren K., Van Leeuwen P. A. (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition* **74**, 418-25.
- Pandey P., Singh J., Achary V. M. M., Reddy M. K. (2015): Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway. *Frontiers in Environmental Science* **3**, 1-14.
- Parvin S., Lee O. R., Sathiyaraj G., Khorolragcha A., Kim Y-J, Yang D-Ch (2014): Spermidine alleviates the growth of saline-stressed ginseng seedlings through antioxidative defense system. *Gene* **537**, 70-78.
- 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.
- Rausch T., Wachter A. (2005): Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science* **10**, 503-509.
- Seo S. Y., Kim Y. J., Park K. Y. (2019): Increasing Polyamine Contents Enhances the Stress Tolerance via Reinforcement of Antioxidative Properties. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1-16.
- Serrano R., Rodriguez-Navarro A. (2001): Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 399-404.
- Shaar-Moshe L., Blumwald E., Peleg Z. (2017): Unique Physiological and Transcriptional Shifts under Combinations of Salinity, Drought and Heat. *Plant Physiology* **174**, 421-434.
- Sheteiwy M. S., Shao H., Qi W., Hamoud Y. A., Shaghaleh H., Khan N. U., Yang R., Tang B. (2019): GABA-Alleviated Oxidative Injury Induced by Salinity, Osmotic Stress and their

- Combination by Regulating Cellular and Molecular Signals in Rice. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 1-26.
- Shrivastava P., Kumar R. (2015): Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences* **22**, 123-131.
- Siefermann-Harms D. (1987): The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Plant Physiology* **69**, 561-568.
- Smith T. A. (1985): Polyamines. *Plant Physiology* **36**, 117-143.
- Srivalli B., Chinnusamy V., Khanna-Chopra R (2003): Antioxidant defense in response to abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Biology* **30**, 121–139.
- Sudhakar C., Lakshmi A., Giridarakumar S. (2001): Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science* **16**, 613–619.
- Suzuki N., Rivero R. M., Shulaev V., Blumwald E., Mittler R. (2014): Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* **203**, 32-43.
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1480**, 329-341.
- Taibi G., Schiavo M. R., Gueli M. C., Rindina P. C., Muratore R., Nicotra C. M. A. (2000): Rapid and simultaneous high-performance liquid chromatography assay of polyamines and monoacetylpolyamines in biological specimens. *Journal of Chromatography B* **745**, 431-437.
- Tiwari A. K. (2001): Imbalance in antioxidant defense and human diseases: Multiple approach of natural antioxidant therapy. *Current Science* **8**, 1179-1187.
- Todorova D., Katerova Z., Shopova E., Jodinskiene M., Jurkoniene S., Sergiev I. (2016): Responses of pea plants to heat stress and spermine treatment. *Zemdirbyste-Agriculture* **103**, 99-106.
- Tomar P. C., Lakra N., Mishra S. N. (2013): Effect of cadaverine on *Brassica juncea* (L.) under multiple stress. *Indian Journal of Experimental Biology* **51**, 758-763.
- Willekens H., Villarroel R., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (1994): Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Federation of European Biochemical Societies Letters* **352**, 79–83.
- Wilson I. D., Neill S. J., Hancock J. T. (2008): Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* **31**, 622-631.
- Wink D. A., Miranda K. M., Espey M. G., Pluta R. M., Hewett S. J., Colton C., Vitek M., Feelisch M., Grisham M. B. (2001): Mechanisms of the Antioxidant Effects of Nitric Oxide. *Antioxidants and Redox Signaling* **3**, 203-213.
- Yamasaki H., Cohen M. F. (2006): NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends in Plant Science* **11**, 522-524.
- Yin Y., Yang R., Han Y., Gu Z. (2014): Comparative proteomic and physiological analyses reveal the protective effect of exogenous calcium on the germinating soybean response to salt stress. *Journal of Proteomics*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.023>.
- Yuan Y., Zhong M., Shu S., Du N., Sun J., Guo S. (2016): Proteomic and Physiological Analyses Reveal Putrescine Responses in Roots of Cucumber Stressed by NaCl. *Frontiers in Plant Science* **7**, doi: 10.3389/fpls.2016.01035.
- Zarei A., Trobacher Ch. P., Shelp B. J. (2015): NAD⁺-aminoaldehyde dehydrogenase candidates for 4-aminobutyrate (GABA) and β-alanine production during terminal oxidation of polyamines in apple fruit. *FEBS Letters* **589**.
- Zhao G., Shi Q., Han Y., Li S., Wang Ch. (2014): The Physiological and Biochemical Responses of a Medicinal Plant (*Salvia miltiorrhiza* L.) to Stress Caused by Various Concentrations of NaCl. *PLOS one* **9**, doi:10.1371/journal.pone.0089624.
- Zhu J-K. (2003): Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 441-445.
- Zhu J-K. (2016): Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* **167**, 313-324.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ADC	arginindekarboxylasa
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa
AO	aminoxidasy
APAL	3-aminopropionaldehyd
APX	askorbátperoxidasa
AsA	kyselina askorbová
BSA	hovězí sérový albumin
Cad	kadaverin
Car	karotenoidy
CAT	katalasa
CBB	Coomassie Brilliant Blue G-250
CuAO	aminoxidasy obsahující měď
DAH	diaminohexan
DAO	diaminoxidasa
EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
FW	čerstvá hmotnost
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GPX	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	redukováný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
GuPOX	guajakolperoxidasa
Lb	leghemoglobin
LDC	lysindekarboxylasa
MDA	malondialdehyd
MS	hmotnostní spektrometrie
NR	nitrátreduktasa
ODC	ornitindekarboxylasa
OTC	ornitintranskarbamoylasy
PA	polyaminy
PAO	polyaminoxidasy
POX	peroxidasy
PTM	postranlační modifikace
Put	putrescin
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SNP	nitroprussid sodný
SOD	superoxiddismutasa
Spd	spermidin
Spm	spermin
Ssp	salt shock proteiny (proteiny detekované při salinitním stresu)
TCA	kyselina trichloroctová
UPLC-MS	ultraúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostní spektrometrií