

VLIV VYBRANÝCH BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK NA AKTIVITU ENZYMU GLUTAMÁTKINÁZY V LISTECH JARNÍ PŠENICE

Ing. Ludmila Vašáková, CSc.

katedra chemie AF

RNDr. Dana Hradecká, CSc.

katedra rostlinné výroby AF, Vysoká škola zemědělská Praha

Vnější ekologické podmínky patří mezi rozhodující faktory, které ovlivňují výši rostlinné produkce. Jedním z významných znaků při adaptaci rostlin na nepříznivé změny prostředí je hromadění prolinu. Prolin je součástí metabolismu kyseliny glutamové a glutaminu. Je výjimečný tím, že je jedinou aminokyselinou, která je zaváděna do bílkovin. Dobře se pohybuje ve vodných i v nevodných mediích, což mu umožňuje snadnou migraci přes biologické membrány buněk a organel. Žádná jiná aminokyselina takovéto vlastnosti nemá (Goring, Thien 1978).

Biosyntéza prolinu vyžaduje adenosintrifosfát-ATP a hydroxynikotinamidadenidinnukleotidfosfát a NADPH^+ a dihydroxynikotinamidadenidinnukleotidfosfát $\text{NADPH}+\text{H}^+$. Mizusaki et al. (1964) zjistili, že biosyntéza prolinu je spojena se světelnou fází fotosyntézy, při které se tyto dvě sloučeniny syntetizují. Zpětnými reakcemi se prolin odbourává na kyselinu glutamovou a ta se dále může přeměňovat na delta-amino-levulovou kyselinu - prekurzor porfyrinu. Z toho vyplývá, že prolin může být za určitých podmínek spojen i s biosyntézou chlorofylu, tudíž opět s fotosyntézou, tj. nejdůležitějším životním pochodem na Zemi. Biosyntéza prolinu je za normálních podmínek udržována na určité úrovni. Prolin si sám na základě inhibice zpětnou vazbou reguluje svoji biosyntézu. Prolin provází nepříznivé vlivy prostředí. Dá se o něm říci, že je indikátorem stresu. Výrazné zvýšení obsahu prolinu bylo poprvé pozorováno při působení nízkých teplot (Procenko a Kolosa 1969, Herber et al. 1971), později například při působení sucha (Pálfi et al. 1973), nadbytku minerálních solí - tzv. solném stresu (Petog 1981).

Co je příčinou zvýšené akumulace prolinu v organismu za stresových podmínek? Výsledky našich pokusů (Vašáková 1980) ukazují na společný mechanismus, odpovídající za akumulaci prolinu a to ten, že při nízkých teplotách (0°C až -20°C), za sucha a při určité koncentraci neutrálních solí dochází ke zrušení inhibičního působení prolinu na enzym glutamátkinázu - GK, první klíčový enzym biosyntetické cesty vzniku prolinu z kyseliny glutamové a biosyntéza

prolinu může probíhat podle potřeby organismu. K čemu je využíván? Je zřejmé, že prolin se účastní fyziologických a biochemických pochodů, které mají vztah k odolnosti rostlin. Odolné rostliny mohou samozřejmě ve zhoršených podmínkách lépe prosperovat. Proto snad nejdůležitější je význam prolinu v bioenergetice, kde je prolin jako vysoce energetický substrát (Woodová 1987) využíván v respiračních řetězcích ke tvorbě ATP. Tuto energii může potom rostlina využít k překonání nepříznivých podmínek a k regeneraci svého organismu. Prolin je významný i při vývojových procesech, například při oplozování, kde opět jako zdroj energie podporuje prorůstání pylové láčky k vajíčku (Britikov 1975). Může tedy působit kladně na tvorbu semen a následně i výnos. Regulace biosyntézy prolinu má nesporně i praktický význam, jak naznačují i dílčí výsledky našich pokusů s ekologicky čistými preparáty a jejich vliv na aktivitu prvního enzymu biosyntézy prolinu, tj. glutamátkinázy.

Materiál a metody

K pokusům byly použity listy jarní pšenice odrůdy Sandra. V prvním případě experiment probíhal s alginátovým přípravkem S-90 a rostlinnou šťávou ze špenátu. Materiál k analýze byl odebrán ve stadiu pěti pravých listů. Tento pokus koresponduje s hodnocením produkční mohutnosti porostů (viz příspěvek s názvem Vliv aplikace seminativních látek na tvorbu výnosu obilnin, uvedený v tomto sborníku). Pro druhý pokus byl materiál odebrán v postflorálním období, deset dní po aplikaci cytokininu topolinu, tj. hydroxybenzyladenosinu. Výsledky korespondují s příspěvkem garantovaným grantem 204/94/0641 v tomto sborníku.

Z listů rostlin byly standardní metodou připraveny acetonové prášky (Ferenčík et al. 1981), které byly extrahovány 0,05 mol.l⁻¹ draselnofosfátovým tlumičem pH = 7,2. Centrifugací (0 °C po dobu 20 min., 22.000 g) byly získány supernatanty, ze kterých byla krystalickým síranem amonným vysolena frakce glutamátkinázy. Vysrážené bílkoviny byly odděleny odstředěním (0 °C, 10 min., 6.000 g). Sediment obsahující aktivní glutamátkinázu byl rozpuštěn v potřebném objemu extrakčního tlumiče. Amonné ionty, které ovlivňují aktivitu glutamátkinázy, byly odstraněny dialýzou (0 °C, 24 hodin) v extrakčním tlumiči (Vašáková 1980). Aktivita glutamátkinázy byla stanovena spektrofotometricky hydroxamátovou metodou (Yoshinaga et al. 1975). K inkubaci byla použita modifikovaná směs o objemu 1 ml (Vašáková 1980) tohoto složení: 0,1 ml 0,2 mol.l⁻¹ ATP, 0,1 ml 0,2 mol.l⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 0,1 ml 4 mol.l⁻¹ L-glutamové kyseliny, 0,2 ml 0,25 mol.l⁻¹ draselnofosfátového tlumiče pH = 7,2 a 0,4 ml enzymového preparátu v 0,05 mol.l⁻¹ draselnofosfátovém tlumiči.

Výsledky a diskuse

Aktivita glutamátkinázy je regulována celou řadou anorganických (Goring, Thien 1978, Vašáková, Vomastková 1989) a organických látek (Vašáková, Vomastková 1990, Táborský, Vašáková 1994), ale i dalšími faktory jako je teplota, světlo, sucho (Herber et al. 1971, Vallée et al. 1977, Vašáková 1980, Petog 1981, Vašáková, Vomastková 1992). V našich pokusech jsme zjistili, že vybrané biologicky aktivní látky velice silně regulovaly aktivitu glutamátkinázy. U prvního pokusu jak špenátová šťáva, tak i alginátový přípravek působily aktivačně, přičemž alginátový přípravek aktivoval na 310,81 % oproti kontrolní variantě (graf 1).

U druhého pokusu, který hodnotil aktivitu cytokininu topolinu v souvislosti s různými rovinami aplikovaného dusíkatého přihnojení (40, resp. 70 kg N na 1 ha), bylo dosaženo rovněž aktivace u všech variant ošetření, a nejlépe se opět, podobně jako při hodnocení metodami produkční analýzy růstu, projevila varianta ošetření s dávkou 40 kg N + cytokinin. Výsledky biochemických analýz korespondují skvěle s růstovou analýzou, která je předmětem již zmíněných samostatných sdělení a osvětlují příčiny dosažených výnosových přírůstků ve sklizni. Ukazuje se, že zkoumané biologicky aktivní látky, které byly vybrány k hodnocení, působí na látkovou přeměnu, metabolismus rostliny, zejména na oblast biochemické přeměny aminokyselin a rozšiřují okruh poznatků o těchto látkách v relaci k výnosotvornému procesu. Mohou být využity při regulaci výnosového potenciálu obilnin.

Řešeno v rámci grantu GA ČR 503 / 93 / 0217

a grantu GA ČR 204 / 94 / 0641 (chemická část).

Poznámka: **Literatura u autorek.**