

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium reaktivních forem dusíku a kyslíku u rostlin
vystavených působení stresových faktorů**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Jana Piterková

Školitel: doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Marek Petřivalský, Dr.

Olomouc
2010

"Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně za použití citované literatury."

V Olomouci dne 15.4.2010

Poděkování

Ráda bych srdečně poděkovala své školitelce doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za odborné a přitom velice milé vedení. Dále jí děkuji za cenné rady, připomínky i pomoc při experimentální činnosti, za poskytnutí potřebné literatury, za konzultace a rady pro konečné zpracování této práce.

Můj velký dík patří také Mgr. Marku Petřivalskému, Dr. za jeho ochotu kdykoliv poradit a zejména obrovskou pomoc při publikační činnosti. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Martinovi Fellnerovi, Ph.D.; RNDr. Barboře Mieslerové, Ph.D.; doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. a RNDr. Boženě Navrátilové, Ph.D. za všestrannou pomoc v rámci experimentální části a také kolektivům Katedry biochemie, Katedry buněčné biologie a genetiky a Katedry botaniky, Oddělení fytopatologie a mikrobiologie za vytvoření příjemné pracovní atmosféry a pomoc při překonávání nesnází při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Mgr. Jana Piterková
Název práce	Studium reaktivních forem dusíku a kyslíku u rostlin vystavených působení stresových faktorů
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010

Abstrakt:

Cílem disertační práce bylo studium úlohy reaktivních forem dusíku (RNS) a kyslíku (ROS) v rámci reakce rostlin na stres vyvolaný infekcí biotrofním patogenem, změnou teploty, zvýšenou koncentrací solí, přítomností manitolu, toxických kovů, případně kombinací vybraných stresových faktorů. Modelovými systémy, na kterých byly realizovány experimenty zaměřené na studium reakce rostliny v průběhu patogeneze, byly genotypy *Solanum* spp. lišící se stupněm rezistence na infekci patogenem *Oidium neolyopersici* a dále genotypy *Lactuca* spp. infikované patogenem *Bremia lactucae*. V prvním řešeném projektu bylo potvrzeno zapojení oxidu dusnatého a enzymu s NO synthasovou aktivitou v obranné reakci rostliny během počáteční fáze infekce a v rámci systémové odpovědi rostliny na stres. Následující práce byla zaměřena na studium vlivu NO na vývoj patogenu. Histochemická detekce odhalila akumulaci NO v penetrovaných buňkách rezistentních genotypů *Solanum* spp. vztahující se k iniciaci hypersenzitivní reakce, a také v klíčnicích vláknech a apresoriích patogenu, což naznačuje významnou roli NO při průniku *O. neolyopersici* do buňky. V projektu řešícím problematiku úlohy reaktivních forem dusíku a kyslíku v reakci rostliny vystavené krátkodobému teplotnímu stresu a následně infikované patogenem byl zaznamenán vliv NO na produkci heat shock proteinů (Hsp70) v závislosti na schopnosti genotypu aktivovat obranné mechanismy. Druhá tématická část disertační práce řešící problematiku úlohy ROS a RNS při regeneraci protoplastů a vlivu toxických kovů na buněčnou suspenzi, byla realizována na modelovém systému *Cucumis sativus*. Pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie byla prokázána lokalizace produkce NO v průběhu regenerace protoplastů v chloroplastech, ROS v cytoplasmě a pravděpodobně v peroxisomech. Byla prokázána účast RNS a ROS při regeneraci protoplastů *C. sativus*. Při vyšších koncentracích NO byl pozorován jeho antioxidační účinek. Z dosažených výsledků je zřejmý regulační vliv NO na regenerační proces po izolaci protoplastů a na intenzitu buněčného dělení. Získané výsledky dále potvrzují roli NO jako mediátora signalizace a odezvy rostlinných buněk na krátkodobé a dlouhodobé působení kadmia. Třetím tématickým okruhem bylo studium úlohy RNS a ROS v reakci rostlin na osmotický a salinitní stres. Pro tento experiment byl vybrán specifický model dvou genotypů *Solanum lycopersicum* Mill. – WT a mutant *7B-1*. Experimenty byly realizovány za různých světelných podmínek (tma, modré nebo bílé světlo). Byl detekován zesilující a kontrolní vliv modrého světla na obranné reakce zprostředkované oxidem dusnatým u rostlin vystavených osmotickému a salinitnímu stresu. Jednoznačně byla potvrzena esenciální regulační funkce NO v procesu klíčení rostlinných semen.

Klíčová slova	heat shock proteiny, osmotický stres, oxid dusnatý, patogeneze, protoplast, reaktivní formy dusíku, reaktivní formy kyslíku, salinitní stres, teplotní stres
Počet stran	164
Počet příloh	9
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Mgr. Jana Piterková
Title	Study of reactive nitrogen and oxygen species in plants exposed to stress factors
Type of thesis	Ph.D.
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2010

Abstract:

The aim of Ph.D. thesis was to study the role of reactive nitrogen (RNS) and oxygen (ROS) species in plant responses to stress elicited by biotrophic pathogen infection, temperature changes, high salt concentration, mannitol presence and toxic heavy metals, eventually by combinations of chosen stress factors. The model systems, on which experiments focused on the study of plant defence responses during pathogenesis were realized, were *Solanum* spp. genotypes differing in the level of resistance to *Oidium neolycopersici* and *Lactuca* spp. genotypes infected by *Bremia lactucae*. In the first project, the involvement of nitric oxide and enzyme with NO synthase-like activity in plant defence response during the initial stages of infection and in systemic acquired response of plant to stress was confirmed. The following work was aimed at the study of the influence of NO to the development of pathogen. The histochemical detection revealed NO accumulation in the penetrated cells of resistant *Solanum* spp. genotypes, relating to the initiation of hypersensitive reaction, as well as in the germ tubes and appressorium of pathogen, indicating an essential role of the molecule for the penetration of biotrophic pathogen. In the project tackling the role of RNS and ROS in the plant response to short term exposure to temperature stress and subsequent inoculation by pathogen, the influence of NO on the heat shock proteins (Hsp70) depending on the ability of genotype to activate the defence mechanisms was detected. The second thematic part of this thesis, focused to the study of the role of ROS and RNS in protoplast regeneration and influence of toxic heavy metals to cell suspension, was realized on *Cucumis sativus* model system. Using fluorescence and confocal microscopy, the localization of NO production in chloroplasts and ROS in cytoplasm and probably in peroxisomes during cucumber protoplast regeneration was detected. The implication of RNS and ROS in *C. sativus* protoplast regeneration was proved. In higher NO concentration, the antioxidant effect of this molecule was observed. The regulatory influence of NO on the regeneration process after protoplast isolation and on the cell division intensity is evident from obtained results. The results obtained in our study also confirm the proposed role of NO as a crucial mediator of signalling and responses of plant cell to cadmium both in short- and long-term treatment. The third thematic sphere of action was the study of RNS and ROS role in the plant responses to osmotic and salinity stress. For this experiment, a specific model of two genotypes of *Solanum lycopersicum* Mill. – WT and *7B-1* mutant was chosen. Experiments were realized under different light conditions (dark, blue light and white light). The amplifying and controlling influence of the blue light on the NO-mediated defence reactions of tomato plants under the drought and salinity stress was detected. The essential regulatory function of NO in the process of the plant seed germination was evidently proved.

Keywords	heat shock proteins, nitric oxide, osmotic stress, pathogenesis, protoplast, reactive nitrogen species, reactive oxygen species, salinity stress, temperature stress
Number of pages	164
Number of appendices	9
Language	Czech

OBSAH

Bibliografická identifikace	3
Bibliographical identification	4
Cíle práce	7
1. Stresové faktory	8
2. Reaktivní formy kyslíku	8
2.1 Produkce reaktivních forem kyslíku u rostlin	9
2.2 Katabolismus reaktivních forem kyslíku u rostlin	9
2.3 Peroxid vodíku	10
3. Reaktivní formy dusíku	14
3.1 Oxid dusnatý	14
Příloha 1: Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách	16
4. Úloha ROS a RNS v procesu patogeneze	24
4.1 Výsledky	26
Příloha 2: Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection	28
Příloha 3: Dual role of nitric oxide in <i>Solanum</i> spp. - <i>Oidium neolycopersici</i> interactions	42
Příloha 4: Influence of nitric oxide and reactive oxygen species on development of lettuce downy mildew in <i>Lactuca</i> spp.	55
5. Kombinace teplotního stresu a patogeneze	70
5.1 Výsledky	71
Příloha 5: Nitric oxide influences Hsp70 accumulation in tomato leaves in response to mechanical injury, heat shock and pathogen infection	72
6. Studium úlohy reaktivních forem kyslíku a dusíku při regeneraci protoplastů a obranné reakci vyvolané působením těžkých kovů	89
6.1 Výsledky	91
Příloha 6: Interplay of reactive nitrogen and oxygen species in the regeneration and growth of cucumber cells from isolated protoplasts	93
Příloha 7: Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress	109
Příloha 8: Nitric oxide and reactive oxygen species are involved in early and long-term responses of cucumber cells to cadmium	117
7. Role oxidu dusnatého v procesu klíčení v prostředí salinitního a osmotického stresu	132
7.1 Výsledky	133

Příloha 9: Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions	134
Závěr	149
Literatura	151
Seznam použitých zkratk	159
Seznam autorských prací	161
Prezentace výsledků na konferencích	162
Životopis	164

CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše zadaného problému
2. Úloha ROS a RNS v procesu patogeneze
 - Studium úlohy oxidu dusnatého při biotickém stresu *Solanum* spp. x *Oidium neolycopersici*
 - Studium úlohy oxidu dusnatého při vývoji patogenu *Oidium neolycopersici*
 - Studium role NO a ROS u modelového patosystému *Lactuca sativa* x *Bremia lactucae*
3. Kombinace teplotního stresu a patogeneze
 - Vliv teplotního stresu na produkci signálních molekul
 - Vliv teplotního stresu na produkci Hsp70 v listech a listových discích rajčete
 - Vliv modulátorů ROS a RNS na produkci Hsp70 v listových discích vystavených teplotnímu stresu a následně inokulovaných patogenem
4. Studium úlohy ROS a RNS při regeneraci protoplastů a jeho zapojení do obranné reakce rostlin vyvolané působením těžkých kovů
5. Role oxidu dusnatého v procesu klíčení semen v prostředí salinitního a osmotického stresu

1. Stresové faktory

Rostliny jsou během svého života vystaveny měnícím se podmínkám vnějšího prostředí. Tyto změny mohou zpomalovat životní funkce rostlin a při překročení určité hranice (tzv. hranice tolerance) dochází k poškození jednotlivých orgánů nebo dokonce k uhynutí (Procházka *et al.*, 1998). Trvalé působení nevhodných podmínek vnějšího prostředí na rostliny vede ke stresu (Bohnert & Sheveleva, 1998). Jako stres je obvykle označován stav, kdy se rostlina nachází pod vlivem stresorů (stresových faktorů), které mohou být povahy abiotické nebo biotické. V rostlinách je biotický stres způsoben biotickými faktory, mezi které řadíme herbivorní živočichy, patogenní mikroorganismy, parazitismus a alelopatii. Abiotický stres je způsoben převážně extrémními klimatickými podmínkami (vysoké a nízké teploty, sucho) a nevhodným složením půdy (zasolení, nedostatek živin) (Mittler, 2006). Rostliny, které jsou v průběhu svého života vystaveny působení různých biotických i abiotických stresů, vyvinuly účinné obranné mechanismy potřebné pro přežití v jejich přirozeném prostředí. Na přenosu informace o působení stresového faktoru a následném spuštění obranných reakcí se podílí řada signálních molekul. Významnou roli hrají reaktivní formy kyslíku (ROS) - zejména peroxid vodíku a reaktivní formy dusíku (RNS) - v poslední době intenzivně studovaný oxid dusnatý.

2. Reaktivní formy kyslíku

Od doby, kdy byl molekulární kyslík uvolněn do zemské atmosféry činností kyslík-uvolňujících fotosyntetických organismů, tedy přibližně před 2,7 biliony lety, se reaktivní formy kyslíku staly nežádoucím produktem aerobního života (Halliwell, 2006; Halliwell & Guteridge, 1999). Druhy reaktivních forem kyslíku, které byly studovány u rostlin zahrnují peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový anion (O_2^-), hydroxylový radikál ($OH\cdot$) a singletový kyslík (1O_2) (Dat *et al.*, 2000; Halliwell, 2006). Ve srovnání s molekulárním kyslíkem jsou tyto částečně redukované nebo aktivované deriváty kyslíku velmi reaktivní a toxické a mohou způsobit oxidační poškození buněk (Asada, 2006; Asada & Takahashi, 1987). Z toho vyplývá, že úspěšná evoluce rostlin, stejně jako aerobních organismů, na Zemi byla závislá na vývoji účinných ROS-detoxifikujících mechanismů. Tyto mechanismy umožnily organismům překonat toxický účinek ROS a využít některé tyto molekuly jako signální přenašeče (Van Breusegem *et al.*, 2008; Mittler *et al.*, 2004; Bailey-Serres & Mittler, 2006). ROS tedy hrají u rostlin dvojí roli, toxických sloučenin a klíčových regulátorů mnoha biologických procesů (Foyer & Noctor, 2005; Apel & Hirt, 2004; Mittler *et al.*, 2004). ROS snadno reagují s dalšími molekulami, jako jsou lipidy, nukleové kyseliny a proteiny, což může být pro buňku velmi škodlivé nebo dokonce fatální (Inzé & Van Montagu, 1995; Matés, 2000; Mittler, 2002). Podrobné informace

o produkci a degradaci ROS v rostlinném organismu jsou publikovány v přehledném článku Piterková *et al.*, 2005.

2.1 Produkce reaktivních forem kyslíku u rostlin

Hlavními zdroji produkce ROS v rostlinných buňkách jsou organely s vysoce oxidační metabolickou aktivitou nebo s intenzivní rychlostí elektronového toku, jako jsou chloroplasty, mitochondrie a peroxisomy. Produkce ROS lokalizovaná v těchto organelách nebo ve specifických odděleních, např. apoplastu nebo špičce polarizovaných buněk, může spouštět různé signální kaskády. Produkce ROS Mehlerovou reakcí a anténovými pigmenty v chloroplastech je zvýšená za podmínek limitujících fixaci CO₂, jako je sucho, salinitní stres a teplotní stres, nebo kombinace těchto podmínek a stresu nadbytkem světla (Miller *et al.*, 2008). Během patogeneze nebo poranění je produkce ROS lokalizovaná zejména v apoplastu, zatímco během salinitního stresu, mohou být ROS uvolňovány z endosomů NADPH oxidasou (Leshem *et al.*, 2006). U C3 rostlin mohou podmínky limitující CO₂ aktivovat fotorespiraci (del Río *et al.*, 2006). Součástí této dráhy je produkce peroxidu vodíku v peroxisomech enzymem glykolát oxidasou. V mitochondriích je za specifických stresových podmínek hlavním zdrojem produkce superoxidového anionu elektronový transportní řetězec (Möller, 2001). Dalšími zdroji ROS v rostlinných buňkách jsou detoxifikační reakce katalyzované cytochromy jak v cytoplasmě, tak v endoplasmatickém retikulu, nebo produkce superoxidu xanthinoxidasou v peroxisomech (Corpas *et al.*, 2008; Mittler *et al.*, 2004; Van Breusegem *et al.*, 2008).

Předmětem intenzivního výzkumu jsou NADPH-dependentní oxidasy plasmatické membrány (Torres & Dangl, 2005; Torres *et al.*, 2006) hrající klíčovou roli v ROS signalizaci, a obsahující flavocytochromy, které tvoří elektronový transportní řetězec umožňující redukci kyslíku na superoxid. Kromě NADPH oxidas jsou ROS v apoplastu produkovány také pH-dependentními peroxidasami buněčné stěny, oxalát oxidasami a aminoxidasami (Mittler *et al.*, 2004; Van Breusegem *et al.*, 2008).

2.2 Katabolismus reaktivních forem kyslíku u rostlin

Enzymy katabolizující ROS, jako je superoxid dismutasa (SOD), askorbátperoxidasa (APX), katalasa (CAT) a glutathionreduktasa (GPX) spolu s antioxidanty, kyselinou askorbovou a glutathionem, poskytují buňkám vysoce účinný mechanismus detoxifikace superoxidového anionu a peroxidu vodíku (Foyer & Noctor, 2005; Apel & Hirt, 2004; Mittler *et al.*, 2004). Tyto mechanismy spolu s chelatací kovových iontů zamezují tvorbě vysoce toxického hydroxylového radikálu cestou Haber-Weissovy nebo Fentonovy reakce (Asada, 2006; Asada & Takahashi, 1987). Antioxidanty, kyselina askorbová a glutathion, jsou udržovány v redukovaném stavu řadou enzymů využívajících NAD(P)H pro regeneraci oxidovaného stavu enzymu (např. monodehydroaskorbátreduktasa, dehydroaskorbátreduktasa a

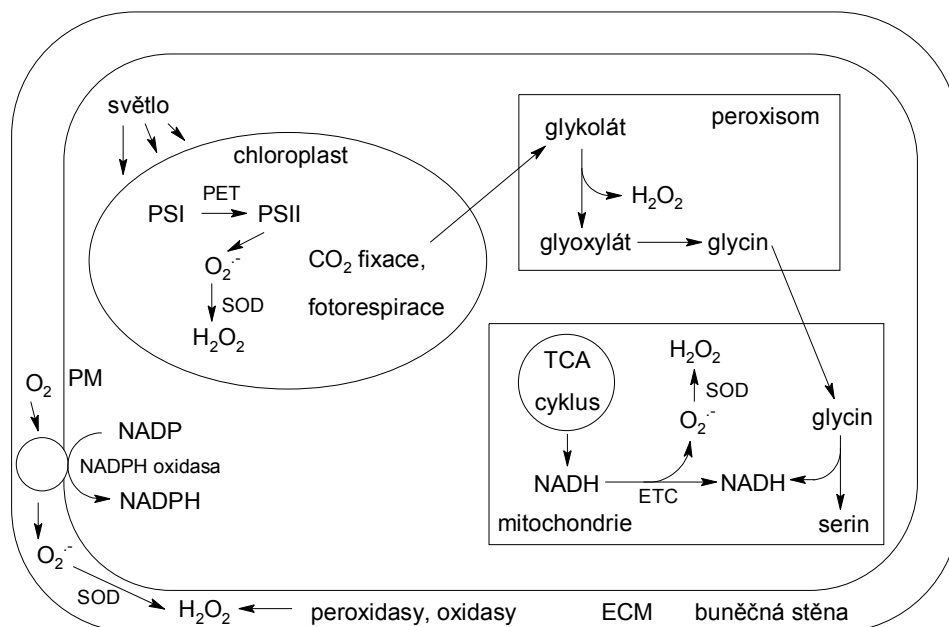
glutathionreduktasa). Monodehydroaskorbátový radikál může být opět redukován na kyselinu askorbovou prostřednictvím ferredoxinu s využitím elektronů fotosyntetického aparátu (Asada, 2006). Odstranění peroxidu vodíku může být u rostlin zprostředkováno také rostlinnými peroxidasami za využití různých redukčních činidel. Membrány jsou velmi citlivé na oxidativní stres. V rostlinných buňkách jsou chráněny fosfolipid-specifickými glutathionperoxidasami a α -tokoferolem (vitaminem E), který je udržován v redukováném stavu poolem redukované kyseliny askorbové. Ochrana buněk před působením singletového kyslíku je zprostředkována karotenoidy (Asada & Takahashi, 1987).

V poslední době je potvrzováno významné postavení peroxiredoxinů, glutaredoxinů a thioredoxinů jakožto sloučenin detoxifikujících ROS (Cheng *et al.*, 2006; Dos Santos & Rey, 2006). Nedávno byla také navržena nová funkce peroxiredoxinu PrxII E v odstranění peroxynitritového anionu, silného oxidačního a nitračního činidla vznikajícího reakcí oxidu dusnatého se superoxidem (Romeo-Puertas *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2008). Peroxiredoxiny jsou navíc také známy jako redoxní senzory, spojující buněčnou redoxní a ROS signalizaci (Dietz, 2008). Nové poznatky o interakcích mezi různými ROS a ROS detoxifikujícími mechanismy byly také získány ze studií dvojitých nebo trojitých mutantů postrádajících ROS katabolizující enzymy v různých subcelulárních lokalitách (Giacomelli *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2007) a zkoumáním interakcí mezi různými ROS jako např. singletovým kyslíkem a peroxidem vodíku (Laloi *et al.*, 2007).

2.3 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je produktem dvouelektronové redukce kyslíku. Patří mezi reaktivní formy kyslíku, není však volným radikálem (Halliwell, 2006). Ve srovnání se superoxidem a hydroxylovým radikálem je peroxid vodíku relativně bezpečný. V nepřítomnosti přechodných kovů je stabilní a nereaktivní, a to dokonce i v koncentracích mnohem vyšších než jaké může kdy biologický systém produkovat. Tato vlastnost mu poskytuje větší mobilitu v pletivech, a potenciální využití nejen jako substrátu různých reakcí, ale také jako molekuly zapojené v ROS signalizaci. U rostlin je produkován v relativně velkém množství v mitochondriích, chloroplastech, peroxisomech/glyoxysomech, na plasmatické membráně a buněčné stěně. H_2O_2 není produkován jen disproporcionační reakcí katalyzovanou SOD, ale také redukcí superoxidového anion radikálu redukčními činidly jako jsou např. askorbát, thioly, ferredoxiny a další (Asada & Takahashi, 1987). Hladina H_2O_2 v buňce je takto přímo spojená s produkcí superoxidu. H_2O_2 je však uvolňován i dalšími oxidasami, např. glykolát oxidasami, glukóza oxidasami, aminokyselina oxidasami nebo sulfíto oxidasami (Asada & Takahashi, 1987; Asada, 1999). Byly také identifikovány další enzymové zdroje $O_2^- \cdot / H_2O_2$, např. peroxidasy vázané na buněčnou stěnu, oxalát oxidasy, aminooxidasy a NADPH oxidasy plasmatické membrány (Obr. 1; Wojtaszek, 1997; Halliwell & Gutteridge, 1999; Bolwell *et al.*, 2002;

Svedružić *et al.*, 2005). H_2O_2 je produkován také mnoha reakcemi zahrnutými ve fotosyntéze a respiraci, což znamená, že H_2O_2 a jiné ROS jsou nežádoucími vedlejšími produkty normálního aerobního metabolismu (Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2002).



Obr. 1

Hlavní zdroje H_2O_2 v různých částech buňky. Poměr produkce H_2O_2 v chloroplastech a peroxisomech je 1:2,5; a v chloroplastech/peroxisomech a mitochondriích 35:1. Tyto hodnoty byly stanoveny z rychlosti produkce H_2O_2 podle Foyer & Noctor (2003). ECM, extracelulární matrix; ETC, elektronový transportní řetězec; PET, fotosyntetický elektronový transportní řetězec; PM, plasmatická membrána; PSI a PSII, fotosystém I a fotosystém II; SOD, superoxidodismutasa; TCA, cyklus trikarboxylových kyselin (převzato a upraveno z Šlesak *et al.*, 2007).

H_2O_2 je produkován také v cytoplasmě, plasmatické membráně a extracelulární matrix. Hlavní podíl H_2O_2 /ROS v cytoplasmě pochází z elektronového transportního řetězce spojeného s endoplasmatickým retikulem. Zde redukované formy cytochromu P450 a cytochromP450reduktasa (oxidační a hydroxylační procesy) a cytochrom *b5* a cytochrom*b5*reduktasa (desaturace mastných kyselin), předávají elektrony kyslíku za tvorby superoxidu. Cytosolická forma SOD může přeměnit superoxid na H_2O_2 (Bartosz, 1997; Mittler *et al.*, 2004).

Nejintenzivněji studovaným oxidasovým systémem je NADPH oxidasa plasmatické membrány rostlinných buněk. NADPH-dependentní oxidasový systém katalyzuje produkci superoxidového anion radikálu jedoelektronovou redukcí kyslíku s využitím NADPH jako

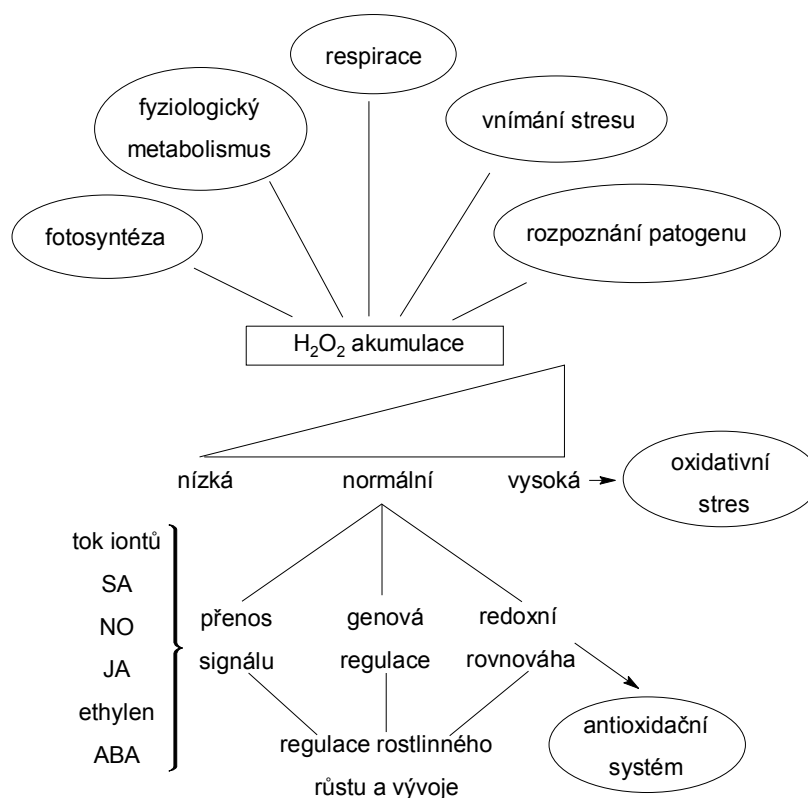
donoru elektronu (Desikan *et al.*, 2003; Mahalingam & Federoff, 2003; Apel & Hirt, 2004). Superoxidový anion radikál je tvořen v apoplastovém prostoru a následně je přeměněn na H₂O₂ buď spontánně, nebo působením extracelulární SOD (Obr. 1; Karpinska *et al.*, 2001; Bolwell *et al.*, 2002). Extracelulární matrix (ECM) vyšších rostlin je tvořena celulosou, hemicelulosou, pektiny nebo ligninem a obsahuje také enzymy produkující nebo odstraňující H₂O₂. Řada enzymů ECM (např. pH-dependentní peroxidasy buněčné stěny, germin-like oxalát oxidasy a aminoxidasy) byla navržena jako zdroj H₂O₂ v apoplastu (Lane, 1994; Bolwell *et al.*, 2002; Kacperska, 2004).

Role H₂O₂ v rostlinné biochemii a fyziologii a jeho různé funkce u rostlin byly popsány v mnoha přehledných článcích (Neill *et al.*, 2002a; 2002b; Apel & Hirt, 2004; Hung *et al.*, 2005). Centrální role H₂O₂ v reakcích na různé biotické a abiotické stresy u rostlin byla velmi dobře zdokumentována. Tato molekula kontroluje různé stresové reakce a fyziologické přizpůsobení, včetně buněčné ROS/hormonální rovnováhy. V řadě studií byla prokázána zvýšená koncentrace H₂O₂ po vystavení rostliny stresu (přehledné články: Neill *et al.*, 2002a; Kacperska, 2004). Rychlost produkce H₂O₂ závisí na intenzitě a délce působení stresu. Navíc se v závislosti na typu stresu produkce H₂O₂ v různých částech buňky liší, např. stres z nadbytečného světla způsobuje nadprodukcí H₂O₂ zejména v chloroplastu (Karpinski *et al.*, 1999; Karpinska *et al.*, 2000; Šlesak *et al.*, 2003). V porovnání s živočišnými buňkami jsou rostliny rezistentnější k vysokým koncentracím H₂O₂. Peroxid vodíku je toxický pro většinu živočišných buněk v koncentracích 10 - 10² μM (Halliwell & Gutteridge, 1999). Experimenty s rostlinným materiálem prokázaly, že rostlinná pletiva mohou tolerovat vysoké koncentrace H₂O₂, a to až v rozmezí 10² - 2x10⁵ μM. Navíc, rostliny předinkubované s H₂O₂ byly odolnější k nadbytku světla a chladovému stresu (Prasad *et al.*, 1994; Karpinski *et al.*, 1999; Karpinska *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003).

H₂O₂ hraje u rostlin dvojí roli: v nízkých koncentracích působí jako signální molekula při spouštění aklimatizační tolerance na různé abiotické a biotické stresy (Fukao & Bailey-Serres, 2004; Laloi *et al.*, 2004; Mittler *et al.*, 2004), nadměrná akumulace peroxidu vodíku může vést k oxidativnímu stresu, který spouští buněčnou smrt (Dat *et al.*, 2000). H₂O₂ se účastní mnoha obranných reakcí, např. zesílení rostlinné buněčné stěny (lignifikace, zesíťování strukturních proteinů buněčné stěny), produkce fytoalexinů a zvýšení rezistence k různým stresům (Dempsey & Klessig, 1995). Dále byla prokázána úloha H₂O₂ jako klíčového regulátoru širokého spektra fyziologických procesů, jako je senescence (Peng *et al.*, 2005), fotorespirace a fotosyntéza (Noctor & Foyer, 1998), pohyb stomat (Bright *et al.*, 2006), buněčný cyklus (Mittler *et al.*, 2004), růst a vývoj (Foreman *et al.*, 2003). Evoluce všech aerobních organismů je závislá na vývoji účinných H₂O₂ odstraňujících mechanismů (Arora *et al.*, 2002). Eliminace H₂O₂ je spojena s odstraněním ostatních ROS. Rovnovážný stav hladiny buněčného H₂O₂ závisí na redoxním stavu buňky (Karpinski *et al.*, 2003; Mateo *et al.*, 2006). V rostlinných buňkách je

proces produkce a odstranění H_2O_2 přísně regulován a koordinován ve stejných nebo různých částech buňky. Rostliny vlastní vícestupňový antioxidační systém, skládající se z antioxidantů (askorbát, α -tokoferol nebo glutathion) a celé řady ROS detoxifikujících enzymů (askorbátperoxidasa, glutathionperoxidasa, superoxididismutasa, enzymy askorbát-glutathionového cyklu, katalasa) (Apel & Hirt, 2004).

Většina studií dokazuje, že samotný H_2O_2 je u rostlin klíčovou signální molekulou zprostředkovávající řadu reakcí (Desikan *et al.*, 2003) a aktivující mnoho dalších důležitých signálních molekul, jako je Ca^{2+} , kyselina salicylová (SA), kyselina abscisová (ABA), kyselina jasmonová (JA), ethylen, oxid dusnatý (Gundlach *et al.*, 1992; Dempsey & Klessig, 1995; Liu *et al.*, 2004; Desikan *et al.*, 2004; Wendehenne *et al.*, 2004). Tyto signální molekuly hrají komplexní roli v přenosu signálu, v procesu obranné reakce, růstu a vývoji rostlin (Obr. 2).



Obr. 2

Akumulace endogenního peroxidu vodíku během normálního metabolismu (fotosyntéza, respirace, růst, senescence, pohyb stomat) a různých biotických a abiotických stresových podmínek. Nadbytečný H_2O_2 může indukovat oxidativní stress poškozující rostlinné buňky. Pokud je množství H_2O_2 udržováno na běžné hladině antioxidačními molekulami a enzymy, poté H_2O_2 funguje jako sekundární přenašeč a spolupracuje s dalšími důležitými signálními molekulami. Společně poté chrání rostliny před stresy a regulují rostlinný růst a vývoj (převzato a upraveno z Quan *et al.*, 2008). SA kyselina salicylová, NO oxid dusnatý, JA kyselina jasmonová, ABA kyselina abscisová.

3. Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku můžeme rozdělit do dvou skupin: skupina volných radikálů (oxid dusnatý ($\cdot\text{NO}$) a oxid dusičitý ($\cdot\text{NO}_2$)) a skupina látek, do které patří kyselina dusitá (HNO_2), oxid dusitý (N_2O_3), peroxynitrit (ONOO^-), alkylperoxynitrit (ROONO). Nejznámější formou RNS je oxid dusnatý (NO).

3.1 Oxid dusnatý

NO je velmi rozšířeným vnitrobuněčným a mezibuněčným poslem se širokým spektrem regulačních funkcí mnoha fyziologických i patologických procesů (Wendehenne *et al.*, 2001, Lamattina *et al.*, 2003, Neill *et al.*, 2003, del Río *et al.*, 2004). Znalosti funkcí NO v rostlinných systémech jsou ve srovnání s živočišnými systémy relativně malé. Emisi NO u rostlin poprvé zaznamenal Klepper v roce 1975 (Klepper, 1979). Teprve nedávné studie potvrdily úlohu NO jako důležitého efektoru rostlinného růstu, vývoje a rostlinných obranných reakcí. Řada z publikovaných prací byla zaměřena na roli NO v iniciaci nebo propagaci rostlinné hypersenzitivní reakce a programované buněčné smrti v místě infekce (Zaninotto *et al.*, 2006; Mur *et al.*, 2006). Byla prokázána účast NO na indukci exprese komplementární sady rostlinných obranných genů, včetně dvou klíčových enzymů fenylpropanoidní dráhy, která reguluje produkci různých sekundárních sloučenin, včetně ligninu a nízkomolekulárních antimikrobiálních sloučenin známých jako fytoalexiny (Dixon, 2001).

NO je vysoce reaktivní molekula, snadno difundující přes buněčné membrány. Je to volný radikál, který může buď získat, nebo ztratit elektron pro vytvoření energeticky výhodnějších struktur, např. nitrosoniový kation (NO^+) a nitroxylový radikál (NO^-) (Durner *et al.*, 1998). Poločas života NO v biologických tkáních byl stanoven na méně než 6 s (Thomas *et al.*, 2001). Takto krátký poločas života odráží vysoce reaktivní povahu NO . NO reaguje přímo s kovovými komplexy a dalšími radikály a nepřímo jakožto reaktivní druh oxidu dusíku s DNA, proteiny, a lipidy (Wink & Mitchell, 1998). U rostlin byly popsány jak cytotoxické tak cytoprotektivní vlastnosti NO (Beligni & Lamattina, 2001).

Navzdory znalosti řady procesů kontrolovaných nebo indukovaných vlivem NO u rostlin zůstávají přesné molekulární mechanismy syntézy tohoto radikálu u různých rostlin za různých podmínek stále předmětem intenzivní diskuse. V současnosti bylo popsáno celkem šest enzymů, které mohou katalyzovat syntézu NO v rostlinných buňkách (Crawford, 2006). Ke vzniku NO v rostlinách může vést také řada dalších neenzymových reakcí vycházejících z anorganických sloučenin dusíku.

Dosud známé a potvrzené informace o oxidu dusnatém, jeho produkci a zapojení v signálních drahách byly shrnuty v přehledném článku, který byl publikován v časopise *Chemické listy* v roce 2008 (viz. Příloha 1).

Oxid dusnatý je látka s velice krátkou dobou života, která rychle reaguje zejména s reaktivními radikály kyslíku, peroxidy lipidů, thiolovými a hemovými skupinami. Reaktivita NO a jeho metabolitů *in vivo* a *in vitro* značně omezuje přímé metody jejich detekce. Přímé stanovení NO je možno provést chemiluminiscenční metodou po reakci s ozonem v plynné fázi, nebo elektrochemickou detekcí pomocí specifických amperometrických elektrod v roztoku. Obě zmíněné metody jsou však velmi náročné z hlediska ceny použitého přístrojového vybavení, navíc v rostlinném materiálu se vyskytuje celá řada látek, které s těmito metodami interferují. U živočišných systémů jsou konečnými produkty metabolismu NO v aerobním prostředí dusitany a dusičnany, které lze jednoduše stanovit spektrofotometricky. Naproti tomu je metabolismus dusíkatých látek u rostlin daleko bohatší, což omezuje použití celé řady metod a interpretaci získaných hodnot. Pro stanovení produkce NO lze použít specifické sondy na bázi derivátů diaminonaftalenu, diaminofluoresceinu a diaminorhodaminu, které reagují s reaktivními radikály dusíku vzniklými z NO v aerobním prostředí za vzniku vysoce fluoreskujících derivátů. Tyto sondy neprocházejí přes membrány buněk a jsou proto použitelné pro měření NO v buněčných extraktech nebo v extracelulárním médiu buněčných kultur. Jejich esterové deriváty lze naopak použít pro vnitrobuněčné sledování vznikajícího NO, protože k reakci s metabolity NO a zvýšení fluorescence dochází až po rozštěpení esterové vazby vnitrobuněčnými esterasami. Přes svou jednoduchost mají fluorescenční metody detekce NO určitá omezení v důsledku možných nespecifických reakcí v rostlinném materiálu a proto je nutno všechny metody optimalizovat pro konkrétní rostlinný model.

Pro měření aktivity synthasy oxidu dusnatého v případě nízkých aktivit byla zavedena metoda využívající radioaktivně značený substrát [¹⁴C]-L-arginin, při které se stanovuje množství značeného produktu L-citrulinu po separaci na kolonce katexu. Tato metoda ovšem opět vyžaduje specializované přístrojové vybavení a navíc není z důvodů práce s radioaktivním materiálem vhodná pro studentské vědecké práce. Alternativně je možno sledovat tvorbu citrulinu v reakční směsi spektrofotometrickými metodami, které dosahují řádově cca μM citlivosti. Často využívanou metodou stanovení aktivity NO synthasy je oxyhemoglobinová metoda, založená na reakci NO s oxyhemoglobinem za vzniku methemoglobinu.

PŘÍLOHA 1

Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách

Jana Piterková, Lenka Luhová a Marek Petřivalský

Chemické Listy 102: 410-416 (2008)

SIGNÁLNÍ DRÁHY OXIDU DUSNATÉHO V ROSTLINÁCH

JANA PITERKOVÁ, LENKA LUHOVÁ
a MAREK PETŘIVALSKÝ

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity
Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
marek.petrivalsky@upol.cz*

Došlo 30.10.07, přijato 31.1.08.

Klíčová slova: oxid dusnatý, reaktivní formy dusíku, syntéza oxidu dusnatého, nitrátreduktasa, rostlinné hormony

Obsah

1. Úvod
2. Enzymová syntéza NO v rostlinách
3. Neenzymové dráhy syntézy NO v rostlinách
4. Reaktivita a detekce NO v rostlinných buňkách
5. Signální dráhy NO v rostlinách závislé na cGMP a cADPR
6. Signální dráhy NO v rostlinách nezávislé na cGMP
7. Vztah signálních drah NO a rostlinných hormonů
8. Závěr

1. Úvod

Oxid dusnatý (NO) je velmi rozšířeným vnitrobuněčným a mezibuněčným poslem se širokým spektrem regulačních funkcí mnoha fyziologických i patologických procesů v různých typech organismů. Poprvé byl popsán u savců, u kterých se účastní procesů vasorelaxace, neurotransmise, cytotoxicity, regulace imunitního systému a celé řady dalších buněčných a tkáňových pochodů¹. Poznatky o funkci NO v rostlinných systémech byly donedávna ve srovnání s živočišnými systémy velmi omezené, přestože emise NO u rostlin byla poprvé zaznamenána již v roce 1979 (cit.²). Po zveřejnění několika průlomových publikací o úloze NO v signálních drahách a obranném mechanismu rostlin při infekci^{3,4} se studium metabolismu NO v rostlinách stalo středem pozornosti. Výsledky výzkumu publikované v posledních letech potvrzují úlohu NO jako důležité signální molekuly podílející se na regulaci řady rostlinných fyziologických procesů i obranných reakcí ve stresových podmínkách (tab. I). NO se účastní procesů klíčení, růstu, kvetení, pohybu průduchů, zrání, senescence a programované buněčné smrti^{5,6}. Ve stresových podmínkách se podílí na rostlinné odpovědi a mechanismech odolnosti na různé formy biotického a abiotického stresu⁷.

2. Enzymová syntéza NO v rostlinách

V savcích buňkách je NO produkován zejména pětielektronovou oxidací guanidinového dusíku L-argininu enzymy nazývanými NO synthasy (NOS, EC 1.14.13.39). Produkty této reakce jsou L-citrulin a NO. NO synthasy jsou hemoproteiny příbuzné rodině cytochromů P450. Tyto enzymy byly původně charakterizovány jako homodimery, ale protože je pro enzymovou aktivitu potřebná navíc vazba dvou monomerů kalmmodulinu mezi malou a velkou podjednotku NOS, je funkční holoenzym ve skutečnosti heterotetramer⁸. Kromě kalmmodulinu je pro katalytický mechanismus NOS nutná současná účast dalších 4 kofaktorů, zahrnujících hem, FAD, FMN a tetrahydrobiopterin. V živočišných buňkách byly popsány tři isoformy NOS: konstitutivní formy endoteliální NOS a neuronální NOS, a indukovaná forma iNOS. Podle nejnovějších poznatků mohou být formy NOS v různé míře současně exprimovány v jednom typu buněk různých tkání v závislosti na stavu vývoje buňky či vnějších podmínkách⁹.

V posledním desetiletí hledalo mnoho rostlinných biologů analogický enzym produkující NO reakčním mechanismem obdobným NO syntasám savčích buněk. Výsledkem je rostoucí počet publikací naznačujících přítomnost NOS aktivity v rostlinách, ale existence tohoto enzymu nebyla doposud přesvědčivě experimentálně prokázána. Proto navzdory znalosti řady procesů kontrolovaných nebo indukovaných vlivem NO u rostlin zůstávají přesné molekulární mechanismy syntézy tohoto radikálu u různých rostlin za různých podmínek stále předmětem intenzivní diskuse. V současnosti bylo popsáno celkem šest enzymů, které mohou katalyzovat syntézu NO v rostlinných buňkách¹⁰ (tab. II). Ke vzniku NO v rostlinách může vést také řada dalších neenzymových reakcí vycházejících z anorganických sloučenin dusíku (obr. 1).

Prvním jednoznačně identifikovaným enzymovým zdrojem NO v rostlinách byla nitrátreduktasa¹¹ (NR, EC 1.7.1.1.). NR je homodimerní protein s molekulovou hmotností mezi 200 a 250 kDa v závislosti na rostlinném zdroji, přičemž každý monomer obsahuje tři prostetické skupiny: FAD, hem a molybdenový kofaktor. Aktivita NR je posttranslačně regulována reverzibilní fosforylací. Hlavní rolí NR v rostlinách je katalýza NAD(P)H-dependentní dvouelektronové redukce dusičnanu na dusitan. Experimentálně bylo potvrzeno, že za určitých podmínek může docházet k jedoelektronové redukci dusitanu na NO, případně NR může produkovat souběžně s NO také reaktivní nitrační činidlo peroxodusitan¹².

V peroxisomech hrachu byla popsána specifická forma enzymu podobného živočišným NO syntasám¹³. Peroxisomální enzym produkující NO vykazoval podobnou substrátovou a inhibiční specifitu a reagoval s protilátkami připravenými proti indukovatelné formě iNOS. Zatím však

Tabulka I
Souhrn funkcí NO ve fyziologických a patofyziologických procesech u rostlin

Funkce		Lit.
Fyziologické pochody	růst a vývoj	44,56
	klíčení	5,6
	vývoj kořenového systému	22
	pohyb svěřacích buněk průduchů	42,52
	senescence a programovaná buněčná smrt	54
	lignifikace buněčné stěny	53
	metabolismus buněčných organel	13,26
Funkce v buněčných organelách		
Chloroplasty	biosyntéza chlorofylu, fotofosforylace	28
Mitochondrie	regulace cytochrom <i>c</i> oxidasy	32
Peroxisomy	regulace katalasy a askorbátperoxidasy	58
Cytosol	regulace akonitasy	49
Biotický stres	programovaná buněčná smrt	45
	hypersenzitivní reakce	3,4,36,43
	systémová odezva	48
Abiotický stres	poranění	57
	salinita	41
	vysoká teplota	41
	sucho	41
	těžké kovy	34,51

nebyla dále objasněna přesná identita příslušného proteinu či genu a peroxisomální NOS aktivita nebyla potvrzena na žádném jiném pracovišti.

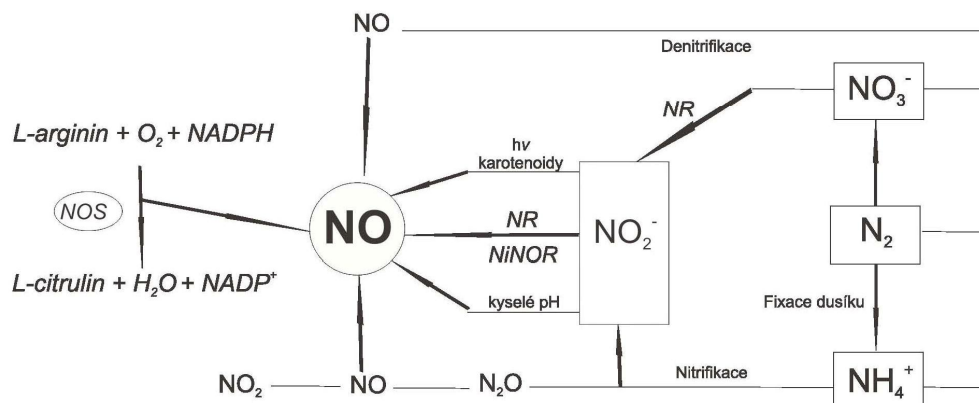
V roce 2003 byla v tabáku popsána indukovatelná forma NO synthasy, jejíž aktivita se výrazně zvyšovala po napadení rostlin virem tabákové mozaiky¹⁴. Stejná skupina popsala podobný enzym i u rajčete v souvislosti s odolností na bakteriální patogen¹⁵, posléze se však tyto výsledky nepodařilo potvrdit a zmíněné publikace byly autory odvolány¹⁶. Stejný osud stihl i nadějný kandidát na konstitutivní formu rostlinné NO synthasy popsané v roce 2003 v *Arabidopsis thaliana*¹⁷. U objeveného proteinu AtNOS1 byla popsána lokalizace v mitochondriích a úloha v obraně rostlinných buněk proti oxidativnímu poškození¹⁸. V navazujících experimentech na spolupracujících pracovištích však bylo zpochybněno, že protein AtNOS1 má NO-synthasovou aktivitu^{19,20} a byl proto přejmenován na

AtNOA1 („nitric-oxide associated“)²¹. Vztah AtNOA1 k biosyntéze a signální roli NO v rostlinách je předmětem aktuálního výzkumu s využitím mutantů *atnoa1* u *A. thaliana*.

Nitrit:NO reduktasa je dalším specifickým rostlinným enzymem podílejícím se na syntéze NO. Tento enzym byl doposud popsán pouze v plasmatické membráně kořenových buněk tabáku společně s kořenově-specifickou formou nitrátreduktasy. Nitrit:NO reduktasa katalyzuje redukcí dusitanu na NO, přičemž příslušný donor elektronů *in vivo* zatím nebyl identifikován. Předpokládá se, že NO hraje důležitou roli jako signální molekula během vývoje kořenového systému a rozvoje symbiotických interakcí s půdními bakteriemi na povrchu kořenů²². Kromě zmíněných enzymů byly u rostlin popsány další potenciální enzymatické zdroje produkce NO, ale jejich fyziologický význam je zatím velmi nejasný. Křenová peroxidasa kata-

Tabulka II
Enzymové zdroje NO v rostlinných buňkách

Zdroj	Substrát	Kofaktor(y)	Lit.
Enzym podobný NOS	L-arginin	NADPH, FAD, FMN, tetrahydrobiopterin	3, 4, 13
Nitrátreduktasa	NO ₃ ⁻ (NO ₂ ⁻)	NADH	11
Nitrit:NO reduktasa	NO ₂ ⁻	NADH	22
Xanthinoxidasa	Hydroxymočovina		25
Křenová peroxidasa	N-hydroxyarginin	NADH	23
Cytochrom P450	NO ₂ ⁻	Cytochrom <i>c</i>	24



Obr. 1. **Zdroje NO v rostlinách;** NO je produkován činností nitrátoreduktasy (NR), nitrit:NO reduktasy (NiNOR) a NO synthasy (NOS). Dalšími generátory NO jsou neenzymové reakce NO_2^- : redukce za kyselého pH a světlem poháněná redukce v přítomnosti karotenoidů. NO může vznikat také jako vedlejší produkt denitrifikace, nitrátové asimilace, nebo respirace

lyzuje tvorbu NO *in vitro* za účasti peroxidu vodíku z *N*-hydroxyargininu nebo hydroxymočoviny²³. Další hemoproteiny vyskytující se v rostlinných buňkách jako cytochromy P450, hemoglobiny a katalasa jsou schopny *in vitro* produkovat NO a další oxidy dusíku katalyzou oxidace *N*-hydroxyargininu kumylhydroperoxidem²⁴.

V živočišných buňkách byla také prokázána tvorba NO účinkem xanthinoxidasy obsahující molybden (XOD, cit.²⁵). XOD existuje ve dvou vzájemně proměnných formách: xanthinoxidasa (produkující superoxid, forma O; EC 1.1.3.22) a xanthindehydrogenasa (forma D; EC 1.1.1.204). XOD aktivita byla nalezena v peroxisomech listů hrachu, které jsou pravděpodobně jedním z míst aktivní tvorby NO v rostlinných buňkách^{13,26}.

3. Neenzymové dráhy syntézy NO v rostlinách

K syntéze NO v rostlinách mohou za určitých podmínek významně přispívat také neenzymové procesy. Nízké pH v apoplastu podporuje neenzymovou redukci dusitanu, kdy dusitan dismutuje na NO a dusičnan²⁷. Dusitan může být také chemicky redukován kyselinou askorbovou při fyziologických hodnotách pH na NO a kyselinu dehydroaskorbovou²⁸. Další neenzymový mechanismus navržený pro tvorbu NO v membránách chloroplastů je světlem zprostředkovaná přeměna NO_2^- na NO katalyzovaná karotenoidy²⁹.

4. Reaktivita a detekce NO v rostlinných buňkách

NO je velmi reaktivní volný radikál, jehož poločas života v biologických tkáních se pohybuje řádově

v sekundách³⁰. Konkrétní reaktivita NO v buňkách je značně ovlivněna množstvím a vzájemnou lokalizací vznikajícího NO a potenciálních reaktantů. Typickou reakcí NO v aerobním prostředí je relativně pomalá oxidace molekulárním kyslíkem na NO_2 , tato reakce je však kvantitativně méně významná v buněčných kompartmentech s nízkou koncentrací kyslíku. NO velmi rychle reaguje s jinými radikály zejména ze skupiny reaktivních forem kyslíku. Z biologického hlediska je nejvýznamnější reakce se superoxidovým anionradikálem za vzniku peroxodusitanu. Peroxodusitan jako silné nitrační činidlo dále reaguje s proteiny, lipidy a DNA za vzniku příslušných nitroso- a nitroderivátů³¹.

Další významnou reakcí NO, podobně jako u živočišných buněk, je tvorba nitrosylových komplexů s atomy kovů. Biologicky významnou interakcí je vazba NO na atom Fe^{2+} hemových kofaktorů enzymů, kde nejdůležitějším příkladem je regulace aktivity guanylátcyklasy podrobněji zmíněná v následující kapitole. Podobně se NO může vázat např. na atomy železa v aktivním místě cytochrom c oxidasy a v komplexech nehemového železa Fe-S proteinů dýchacího řetězce mitochondriálních membrán³².

Hydrofobní povaha a malé rozměry molekuly NO usnadňují její pohyb a případné lokální zvýšení koncentrace v prostředí buněčných membrán, což následně podporuje reaktivitu NO s lipofilními látkami, jako jsou radikálové meziprodukty peroxidace membránových lipidů³³. Podobně jako v živočišných buňkách byl také v rostlinných membránách popsán při různých stresových podmínkách antioxidantní a ochranný vliv NO snižující rozsah lipidní peroxidace³⁴. V rostlinách se vyskytuje řada dalších látek s vysokou reaktivitou vzhledem k NO, ty se však většinou za normálních podmínek nachází v jiném buněčném oddílu (např. fenolické látky ve vakuolách) a k jejich kontaktu

s NO dochází až při působení určitého stresového podnětu.

Vzhledem k vysoké reaktivitě je experimentální detekce a kvantifikace NO *in vivo* obtížná. Metody používané u rostlin pocházejí ze studií prováděných v živočišných systémech pouze s adaptací na podmínky rostlinných pletiv. Monitorování NO u rostlin zahrnuje metody jako chemiluminiscence, EPR spektroskopie, elektrochemické sensory, kolorimetrie a fluorimetrie (přehledně shrnuto v cit.³⁵). Pro histochemickou lokalizaci produkce NO fluorescenční nebo konfokální mikroskopii se používají nejčastěji deriváty 4,5-diaminofluoresceinu, specifické fluorescenční sondy pro NO a jeho reaktivní metabolity³⁶, i když jejich specifita a vhodnost pro sledování NO v rostlinných buňkách vzhledem k přítomnosti interferujících látek byla nedávno zpochybněna³⁷.

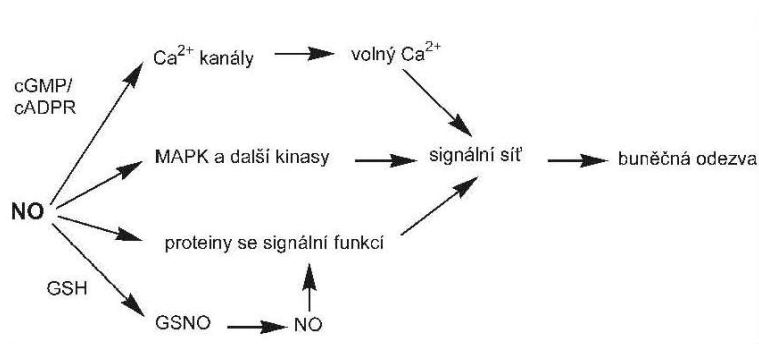
4. Oxid dusnatý jako signální molekula v rostlinách

Přes narůstající počet publikovaných poznatků je naše pochopení signálních funkcí NO u rostlin teprve v počátcích. Podařilo se již identifikovat některé složky přenosových kaskád zprostředkovaných NO, které jsou známé u živočichů (obr. 2). Signální reakce NO v rostlinách zahrnují syntézu sekundárních přenašečů, jako jsou cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a cyklická adenosindifosfát ribosa (cADPR), které vedou ke změně hladiny cytosolického vápníku. Signální funkce NO jsou také zprostředkovány kovalentními modifikacemi proteinů jako nitrosylace cysteinů a nitrace tyrosinů a fosforylace prostřednictvím MAP kinas. NO specificky ovlivňuje expresi četných genů kódujících proteiny se vztahem k obranným reakcím, metabolismu, buněčné detoxifikaci, transportu, homeostázi železa, signalizaci, kvetení a biosyntéze ligninu³⁸.

5. Signální dráhy NO v rostlinách závislé na cGMP

V živočišných buňkách je jedním z hlavních mechanismů vnitrobuněčné reakce na NO zvýšení hladiny druhého posla cGMP. NO se váže na hemovou prostetickou skupinu enzymu guanylátcyklasy a následná konformační změna struktury zvyšuje aktivitu guanylátcyklasy o několik řádů. Zvýšená hladina cGMP reguluje aktivity cGMP-dependentních proteinkinás, cGMP-dependentních iontových kanálů a fosfodiesteras. Signální kaskáda zprostředkovaná NO/cGMP hraje centrální roli v regulaci řady fyziologických i patologických procesů. Také u rostlin byla prokázána signální funkce cGMP v řadě procesů, přestože existence rostlinné guanylátcyklasy nebyla dosud jednoznačně potvrzena. Je známa účast cGMP např. v regulaci iontových kanálů nebo indukci genů syntetizujících obranné látky v rostlinách³⁹.

U živočichů aktivuje cyklická ADP-ribosa (cADPR) ryanodinový receptor na membráně endoplasmatického retikula, což vede k mobilizaci iontů Ca^{2+} uložených v retikulu a následnému zvýšení koncentrace volných iontů Ca^{2+} v cytosolu. U rostlin byl popsán také obdobný účinek cADPR na uvolnění Ca^{2+} z vakuoly do cytosolu⁴⁰. V klíčové studii na rostlinách tabáku infikovaných virem tabákové mozaiky prokázali Durner a spol., že aktivace obranných genů je vyvolána zvýšenou syntézou NO v rostlinné buňce a tento mechanismus je zprostředkován cADPR-závislým zvýšením koncentrace cytoplasmatického vápníku⁴. V buňkách tabáku má NO vliv na zvýšení cytosolického volného Ca^{2+} indukovaného hyperosmotickým stresem a mikrobiálním elicitorem kryptoginem⁴¹. Podobně podporují výsledky experimentálních studií hypotézu o roli cytosolického Ca^{2+} ve zprostředkování účinků NO vedoucích k uzavření stomat⁴². Exogenní aplikace NO nebo zvýšení intracelulární produkce NO po kontaktu s mikrobiálním elicitorem vede ke zvýšení intracelulárního Ca^{2+} v buňkách *Vicia faba* a buňkách tabáku⁴³. Tyto vý-



Obr. 2. Schématické znázornění signálních drah NO v rostlinných buňkách; primární cíle NO zahrnují mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK) a Ca^{2+} kanály regulované prostřednictvím změn hladin cGMP a cADPR. NO moduluje aktivitu proteinů nitrosylací thiolových skupin. Stabilní metabolit *S*-nitrosogluthation (GSNO) může sloužit jako přenašeč signálu NO pro jeho uvolnění a interakce ve vzdálených cílech

sledky potvrzují funkci NO jako intracelulární sloučeniny mobilizující Ca^{2+} v rostlinných buňkách. Obdobné procesy byly popsány i u živočichů. Řada studií prokazuje, že primárními cíli NO jsou kanály propouštějící Ca^{2+} , včetně napětím ovládaných Ca^{2+} kanálů v plasmatické membráně, Ca^{2+} kanálů synchronizovaných cyklickým nukleotidem, a inositoltrifosfátový a ryanodinové receptory. NO moduluje jejich aktivity přímo nitrosylací nebo nepřímo přes signální dráhy zahrnující cGMP anebo cADPR. cADPR syntetizovaný z $\beta\text{-NAD}^+$ v reakci katalyzované ADP-ribosylcyklasou je rozšířeným aktivátorem ryanodinového receptoru⁴⁴. Antagonisté cADPR, inhibitory ryanodinového receptoru a inhibitory cGMP syntézy potlačují u rostlin nárůst koncentrace cytosolického Ca^{2+} vyvolaný NO (cit.⁴³). Přestože z aktuálních poznatků jasně vyplývá významná úloha signální dráhy NO/cGMP v rostlinách⁴⁵, zůstávají vlastnosti enzymů generujících cGMP a cADPR a příslušných Ca^{2+} kanálů modulovaných zvýšenou koncentrací NO neznámé. Mechanismus syntézy cGMP v rostlinách nebyl dosud objasněn. V genomu *A. thaliana* byl identifikován pouze jediný strukturálně příbuzný gen AtGC1, exprimovaný protein s guanylátcyklasovou aktivitou však postrádá vazebné místo pro hem a nebylo u něj pozorováno zvýšení aktivity účinkem NO typické pro rozpustné guanylátcyklasy u živočichů⁴⁶. Nedávno byla popsána guanylátcyklasová aktivita i u strukturálně odlišného membránového proteinu AtBR11, receptoru pro brassinosteroidy⁴⁷.

6. Signální dráhy NO v rostlinách nezávislé na cGMP

Další významnou signální dráhou NO v rostlinných buňkách je aktivace kaskády proteinkinasy aktivovaných mitogenem (MAPK). Aktivace MAPK vede k reverzibilní fosforylaci enzymů regulující jejich aktivitu. Externí aplikace NO stimuluje MAPK aktivity v listech tabáku a *A. thaliana*⁴⁸. Je také známo, že stejné MAPK mohou být v tabáku aktivovány také dalšími chemickými signály jako kyselina salicylová nebo peroxid vodíku. Aktivace MAPK kaskády v rostlinách tak pravděpodobně představuje společný bod signálních drah aktivovaných v reakci na různé typy stresu.

NO může také nitrosylovat thiolové skupiny cysteinů a tak reverzibilně regulovat strukturu proteinů a enzymovou aktivitu. Typickým příkladem je inhibice aktivity akonitasy nitrosylací popsaná v buňkách tabáku⁴⁹. Dle současných poznatků je nitrosylace cysteinů považována za jednu z nejvýznamnějších posttranslačních modifikací proteinů v rostlinných buňkách, která navíc hraje stěžejní úlohu v obranných reakcích rostlin při napadení patogeny⁵⁰. NO reaguje s glutathionem za tvorby relativně stabilního S-nitrosoglutathionu, který může sloužit jako transportní donor NO v jiných částech buňky nebo rostliny⁵¹.

7. Vztah signálních drah NO a rostlinných hormonů

Současné znalosti o úloze a funkci NO v rostlinách prokazují vzájemnou propojenost signálních drah NO s drahami různých rostlinných hormonů a růstových regulátorů. Často se také ukazuje, že NO společně s dalšími reaktivními formami dusíku a kyslíku zprostředkovává buněčné účinky hormonů na molekulární úrovni. Např. NO produkovaný enzymem nitrátreduktasou zprostředkovává uzavření stomat vyvolané aplikací kyseliny abscisové⁵². Podstatou tohoto jevu je regulace iontových kanálů svěracích buněk vlivem NO prostřednictvím změn intracelulární koncentrace vápníku⁴². Podobně auxinový hormon kyselina indolctová indukuje syntézu NO v kořenech okurky⁵³. Naopak interakce mezi NO a ethylenem při dozrávání a senescenci rostlinných pletiv naznačuje antagonistickou činnost obou plynů během těchto období rostlinného vývoje⁵⁴.

Cytokininy indukují syntézu NO v různých rostlinách a NO může zprostředkovávat proces programované buněčné smrti indukované aplikací cytokininů⁵⁵. Podobně polyaminy v růstovém médiu indukují zvýšenou syntézu NO v semenáčcích *A. thaliana*⁵⁶. NO také moduluje syntézu kyseliny salicylové, kyseliny jasmonové a ethylenu během rostlinné odpovědi na vnější stresové faktory⁵⁷.

8. Závěr

Aktuální publikované poznatky potvrzují významnou signální funkci NO v rostlinných buňkách, přestože přesný mechanismus a lokalizace syntézy NO nebyly vždy jednoznačně popsány. V současnosti je velká pozornost věnována studiu vzájemného vztahu a propojení signálních drah NO a dalších reaktivních forem dusíku se signálními drahami reaktivních forem kyslíku a rostlinných hormonů a regulátorů. Řada zásadních výsledků je získávána s využitím dostupných mutantů *A. thaliana*, ve kterých byla ovlivněna exprese enzymů podílejících se na syntéze nebo metabolismu NO. V popředí zájmu stojí také úloha NO a jeho stabilnějších metabolitů v obranných a adaptačních mechanismech rostlin v reakci na vnější stresové podněty.

Tato práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 6198959215.

Seznam zkratk

cADPR	cyklická adenosindifosfát ribosa
cGMP	cyklický guanosiin-3',5'-monofosfát
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
MAPK	proteinkinasy aktivované mitogenem

NO	oxid dusnatý
NOS	synthasa oxidu dusnatého
NR	nitrátreduktasa
XOD	xanthinoxidasa

LITERATURA

- Ignarro L.: *J. Physiol. Pharmacol.* **53**, 503 (2002).
- Klepper L.: *Atmosph. Environ.* **13**, 537 (1979).
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C.: *Nature* **394**, 585 (1998).
- Durner J., Wendehenne D., Klessig D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 10328 (1998).
- Crawford N. M., Guo F. Q.: *Trends Plant Sci.* **10**, 195 (2005).
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T.: *J. Exp. Bot.* **53**, 1237 (2002).
- Wendehenne D., Gould K., Lamotte O., Durner J., Vandelle E., Lecourieux D., Courtois C., Barnavon L., Bentejac M., Pugin A.: *BMC Plant Biol.* **5**, S35 (2005).
- Knowles R. G., Moncada S.: *Biochem. J.* **298**, 249 (1994).
- Kavya R., Saluja R., Singh S., Dikshit M.: *Nitric Oxide* **15**, 280 (2006).
- Crawford N. M.: *J. Exp. Bot.* **57**, 471 (2006).
- Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S.: *Trends Plant Sci.* **4**, 128 (1999).
- Yamasaki H., Sakihama Y.: *FEBS Lett.* **468**, 89 (2000).
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Sandalio L. M., Valderrama R., Palma J. M., Lupianez J. A., del Río L. A.: *J. Biol. Chem.* **274**, 36729 (1999).
- Chandok M. R., Ytterberg A. J., van Wijk K. J., Klessig D. F.: *Cell* **113**, 469 (2003).
- Chandok M. R., Ekengren S. K., Martin G. B., Klessig D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 8239 (2004).
- Klessig D. F., Ytterberg A. J., van Wijk K. J.: *Cell* **119**, 445 (2004).
- Guo F. Q., Okamoto M., Crawford N. M.: *Science* **302**, 100 (2003).
- Guo F. Q., Crawford N. M.: *Plant Cell* **17**, 3436 (2005).
- Zemojtel T., Frohlich A., Palmieri M. C., Kolanczyk M., Mikula I., Wyrwicz L. S., Wanker E. E., Mundlos S., Vingron M., Martasek P., Durner J.: *Trends Plant Sci.* **11**, 524 (2006).
- Guo F. Q.: *Trends Plant Sci.* **11**, 527 (2006).
- Crawford N. M., Galli M., Tischner R., Heimer Y. M., Okamoto M., Mack A.: *Trends Plant Sci.* **11**, 526 (2006).
- Stohr C., Stremlau S.: *J. Exp. Bot.* **57**, 463 (2006).
- Huang J., Kim-Shapiro D. B., King S. B.: *J. Med. Chem.* **47**, 3495 (2004).
- Boucher J. L., Genet A., Vadon S., Delaforge M., Mansuy D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1158 (1992).
- Zhang Z., Naughton D., Winyard P. G., Benjamin N., Blake D. R., Symons M. C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 767 (1998).
- Del Río L. A., Corpas F. J., Sandalio L. M., Palma J. M., Barroso J. B.: *IUBMB Life* **55**, 71 (2003).
- Stohr C., Ullrich W. R.: *J. Exp. Bot.* **53**, 2293 (2002).
- Yamasaki H.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355**, 1477 (2000).
- Cooney R. V., Harwood P. J., Custer L. J., Franke A. A.: *Environ. Health Perspect.* **102**, 460 (1994).
- Thomas D. D., Liu Z. P., Kantrow S. P., Lancaster J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 355 (2001).
- Szabo C., Ischiropoulos H., Radi R.: *Nature Rev. Drug Discovery* **6**, 662 (2007).
- Brown G. C., Borutaite V.: *Free Radical Biol. Med.* **33**, 1440 (2002).
- Rubbo H., Freeman B. A.: *Methods Enzymol.* **269**, 385 (1996).
- Hsu Y., Kao C. H.: *Plant Growth Regul.* **42**, 227 (2004).
- Taha Z. H.: *Talanta* **61**, 3 (2003).
- Foissner I., Wendehenne D., Langebartels C., Durner J.: *Plant J.* **23**, 817 (2000).
- Planchet E., Kaiser W. M.: *J. Exp. Bot.* **57**, 3043 (2006).
- Parani M., Rudrabhatla S., Myers R., Weirich H., Smith B., Leaman D. W., Goldman S. L.: *Plant Biotech. J.* **2**, 359 (2004).
- Walden R.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 419 (1998).
- Allen G. J., Muir S. R., Sanders D.: *Science* **268**, 735 (1995).
- Gould K. S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A., Wendehenne D.: *Plant Cell Environ.* **26**, 1851 (2003).
- Garcia-Mata C., Gay R., Sokolowski S., Hills A., Lamattina L., Blatt M. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 11116 (2003).
- Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Sequeira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A., Wendehenne D.: *Plant. Physiol.* **135**, 516 (2004).
- Eu J. P., Xu L., Stamlor J. S., Meissner G.: *Biochem. Pharmacol.* **57**, 1079 (1999).
- Vandelle E., Poinssot B., Wendehenne D., Bentejac M., Alain P.: *Mol. Plant. Microbe Interact. MPMI* **19**, 429 (2006).
- Ludidi N., Gehring C.: *J. Biol. Chem.* **278**, 6490 (2003).
- Kwezi L., Meier S., Mungur L., Ruzvidzo O., Irving H., Gehring C.: *PLoS ONE* **2**, 449 (2007).
- Capone R., Tiwari B. S., Levine A.: *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 425 (2004).
- Navarre D. A., Wendehenne D., Durner J., Noad R., Klessig D. F.: *Plant Physiol.* **122**, 573 (2000).
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J.: *Plant Physiol.* **137**, 921 (2005).
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Rodriguez-Serrano M., Esteban F. J., Fernandez-Ocana A., Chaki M., Romero-Puertas M. C., Valderrama R., Sandalio L. M., del Río L. A.: *J. Exp. Bot.* **57**, 1785 (2006).

52. Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16314 (2002).
53. Pacoda D., Montefusco A., Piro G., Dalessandro G.: J. Plant. Physiol. 161, 1143 (2004).
54. Leshem Y. Y., Wills R., Veng-Va Ku V.: Plant Physiol. Biochem. 36, 825 (1998).
55. Tun N. N., Holk A., Scherer G. F.: FEBS Lett. 509, 174 (2001).
56. Tun N. N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E. I., Scherer G. F.: Plant Cell Physiol. 47, 346 (2006).
57. Huang X., Stettmaier K., Michel C., Hutzler P., Mueller M. J., Durner J.: Planta 218, 938 (2004).
58. Clark D., Durner J., Navarre D. A., Klessig D. F.: Mol. Plant-Microbe Interact 13, 1380 (2000).

J. Píterková, M. Petřivalský, and L. Luhová
 (Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc): **Signalling Pathways of Nitric Oxide in Plants**

Purpose of Review

Similarly to animals, nitrous oxide (NO) has emerged recently as a key signalling molecule in many physiological and pathological processes in plants. This review summarizes the current knowledge and understanding of the molecular mechanisms of NO synthesis and signalling in plant cells.

Findings

NO has been shown to participate in vital developmental processes in plants like germination, tissue differentiation, growth, flowering and senescence. NO functions as a signalling molecule in plant responses to abiotic and biotic external stimuli. NO can be produced by several different enzymatic and non-enzymatic reactions, depending on the plant cell type. Actually, the identity and role of plant homologues of animal NO synthases has not been clearly described, while nitrite-dependent NO production by nitrate reductase has been demonstrated in several plant species. High reactivity and mobility of NO in plant cell is the basis for its complex reactions and a wide array of plausible molecular targets. Intracellular downstream NO signalling includes cGMP- and cADP-ribose cascade leading to changes in the intracellular Ca^{2+} level. NO signalling can be mediated by microtubule-associated protein (MAP) kinases or effected by covalent protein modifications such as cysteine nitrosylation.

Conclusions

Despite considerable advances in plant NO research, our understanding of NO signalling pathways is still very limited. Current research is focused on the identification of tissue and subcellular specific NO synthesis and its fate as well as on the crosstalk of NO with signalling pathways of reactive oxygen species and plant hormones. The employment of *Arabidopsis thaliana* mutants with altered expression of enzymes involved in NO synthesis or metabolism will substantially contribute to the elucidation of the NO role in plant cell signalling.

4. Úloha ROS a RNS v procesu patogeneze

Rostliny, které jsou v průběhu svého života vystaveny působení různých potenciálních patogenů, vyvinuly účinné obranné mechanismy potřebné pro přežití v jejich přirozeném prostředí. Přestože pasivní obranné mechanismy vůči patogenům, jako je např. vosková kutikula nebo zásoba antimikrobiálních sloučenin, mohou rostlinu částečně ochránit proti infekci, hlavní a účinnější je aktivní obrana, která zahrnuje transkripci specifických genů a tvorbu obranných sloučenin. Výsledkem působení obranných mechanismů je snížení rychlosti nebo úplné potlačení vývoje patogenu, případně zamezení jeho sporulace. Na přenosu informace o působení stresového faktoru a následném spuštění obranných reakcí se podílí řada signálních molekul. V mnoha interakcích rostlina-patogen je indukce obranné reakce spojena s produkcí ROS a RNS, které mají různé signální a obranné role během patogeneze (Bolwell & Wojtaszek, 1997; Delledonne *et al.*, 2002; Mur *et al.*, 2008; Neill *et al.*, 2002b; Wendehenne *et al.*, 2004). Zvýšená produkce ROS infikovanou buňkou je přímo spojena s procesem hypersenzitivní reakce (HR), zesílení rostlinné buněčné stěny a antibakteriální aktivitou (Shetty *et al.*, 2008).

Významná funkce oxidu dusnatého v signalizaci a rezistenci rostlin napadených patogeny byla velmi dobře zdokumentována u celé řady modelových patosystémů (Durner *et al.*, 1998; Modolo *et al.*, 2005; Mur *et al.*, 2005; Petřivalský *et al.*, 2007; Prats *et al.*, 2005). Signální role NO zahrnuje iniciaci a vývoj rostlinné HR, akumulaci "pathogenesis-related" (PR) proteinů a modifikaci genové exprese (Mur *et al.*, 2006; Wendehenne *et al.*, 2004; Zaninotto *et al.*, 2006). HR je obrannou strategií rostlin, kdy infikovaná buňka nebo několik buněk v blízkém okolí místa infekce podléhají programované buněčné smrti, čímž eliminují přímé zdroje energie a výživy pro vstupující patogen (Low & Merida, 1996; Greenberg, 1997). HR je charakteristická prudkou akumulací ROS (Keller *et al.*, 1998) a NO (Delledonne *et al.*, 1998). Synergistické působení NO a H₂O₂ vede k lokalizované buněčné smrti a omezuje invazi patogenu (Zaninotto *et al.*, 2006), přestože mechanismus interakce mezi NO a ROS je stále předmětem debaty (De Gara *et al.*, 2003; Delledonne *et al.*, 2003; Mur *et al.*, 2006; Tada *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2008). Přímou chemickou reakcí NO s H₂O₂ vzniká buď vysoce reaktivní singletový kyslík nebo hydroxylový radikál (Noronhadutra *et al.*, 1993), který může indukovat buněčnou smrt. Reakcí NO s O₂⁻ je produkován silný oxidant, peroxyinitrit (ONOO⁻). NO indukuje také řadu rostlinných obranných genů, včetně fenylalaninamoniaklyasy a chalkonsynthasy, dvou klíčových enzymů fenylpropanoidní dráhy, produkující sekundární sloučeniny, jako např. prekurzory fytoalexinů a ligninu (Dixon, 2001).

Systematicky získaná rezistence (SAR) u zdravých rostlinných tkání je obvykle aktivovaná buněčnou smrtí v inkompatibilních interakcích rostlina-patogen lokálně infikovaných rostlin. Spouští se uvolnění mobilních signálních molekul na krátkou a dlouhou

vzdálenost, včetně kyseliny salicylové, jasmonové, metylsalicylátu, a stále málo definovaných lipidových a peptidových efektorů (Heil & Ton, 2008; Vlot *et al.*, 2008). Během vývoje SAR byl pozorován vzájemný vztah mezi NO, H₂O₂ a kyselinou salicylovou (Delledonne *et al.*, 2001; Song & Goodman, 2001). Externí aplikace NO indukovala endogenní akumulaci SA a jejich konjugátů v tabáku (Durner *et al.*, 1998).

Hlavním modelovým systémem, na kterém byly realizovány experimenty zaměřené na studium reakce rostliny v průběhu patogeneze byly zejména tři genotypy *Solanum* spp. lišící se stupněm rezistence na infekci patogenem *Oidium neolycopersici*. Padlí rajčatové, *Oidium neolycopersici*, je biotrofní epifytní patogen způsobující vážné onemocnění rajčat pěstovaných ve skleníku zejména v Evropě a Severní Americe (Kiss *et al.*, 2001; Lebeda & Mieslerová, 1999). Většina vypěstovaných kultivarů rajčete (*Solanum lycopersicum*) je velmi citlivá na padlí. Intenzivní screening však odhalil mnoho potencionálních zdrojů rezistence mezi divokými rajčaty (např. *S. habrochaites*, *S. chilense*, *S. parviflorum*, *S. peruvianum* a *S. pennellii*) (Mieslerová *et al.*, 2004). Podle dřívějších studií je rezistence patosystému *Solanum* spp.–*O. neolycopersici* dána monogenními geny (Bai *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2007). Dominantní geny rezistence (*Ol-1*, *Ol-3*, *Ol-4*, *Ol-5* a *Ol-6*) zprostředkovávají druhově závislou rezistenci omezením růstu patogenu aktivací hypersenzitivní reakce hostitelských epidermálních buněk, zatímco recesivní gen *ol-2* udává rezistenci cestou tvorby papil (Bai *et al.*, 2005). Dřívější experimenty prokázaly intenzivnější HR u středně rezistentního genotypu rajčete v porovnání s vysoce rezistentním genotypem. Výsledky potvrdily variabilitu intenzity a načasování produkce ROS a exprese antioxidantních enzymů ve vztahu k odlišným schopnostem rezistence studovaných genotypů rajčete (Mlíčková *et al.*, 2004; Tománková *et al.*, 2006). V interakcích tohoto patosystému jsou zahrnuty i jiné obranné mechanismy, jako je např. produkce nízkomolekulárních obranných sloučenin (alkaloidů, saponinů, fenolických sloučenin a fytoalexinů) (Mieslerová *et al.*, 2004).

Druhým studovaným modelovým systémem byla *Lactuca* spp. infikovaná patogenem *Bremia lactucae*. Plíseň salátová je infekční choroba způsobená obligátně-biotrofním parazitem *Bremia lactucae*, která způsobuje významné škody při pěstování salátů (Lebeda *et al.*, 2002). Infekční proces *B. lactucae* zahrnuje v raném stádiu adhesi konidií na povrchu listu, klíčení a diferenciaci klíčného vlákna v apresorium a penetrační hrot. Kolonizace buněk listu je zahájena tvorbou primárních a sekundárních hyf, které prorůstají mezi epidermálními buňkami a mesofylem. Nakonec dochází k ustavení těsného kontaktu patogenu s živými hostitelskými buňkami prostřednictvím haustorií, které umožňují řízený transport organických látek z rostlinné buňky do patogenu (Lebeda *et al.*, 2006). Díky své vysoké genotypické a fenotypické variabilitě je tento patosystém široce používaným modelem pro studium interakcí

rostlina-biotrofní oomyceta (Lebeda *et al.*, 2008a,b). Role ROS a antioxidačních enzymů v těchto interakcích byla publikována v článku Sedlářová *et al.*, 2007.

4.1 Výsledky

Výsledky jsou detailně prezentovány formou článků, které tvoří přílohy 2, 3 a 4.

V první části tohoto projektu byla studována možná role NO a enzymu s NO synthasovou aktivitou v interakci rostlina-patogen během počáteční fáze infekce se zaměřením na možnou úlohu NO v systémové reakci u modelového systému *Solanum* spp. - *O. neolycopersici*. Byla stanovena produkce NO oxyhemoglobinovou metodou u tří genotypů *Solanum* spp. lišících se rezistencí k uvedenému patogenu, a to u *S. lycopersicum* cv. Amateur (citlivý), *S. habrochaites* f. *glabratum* (vysoce rezistentní) a u *S. chmielewskii* (středně rezistentní), během prvních 216 h po inokulaci. Specifický dvoufázový nárůst produkce NO byl pozorován v extraktech infikovaných listů středně a vysoce rezistentních genotypů. Dále byla detekována systematická odezva ve formě narůstající produkce NO v intaktních listech sousedících s listy inokulovanými. Výsledky naznačují, že hlavním zdrojem NO v pletivech rajčete byla aktivita enzymu závislého na argininu, která byla inhibována kompetitivními reversibilními a ireversibilními inhibitory živočišné NO synthasy, nikoliv však inhibitorem rostlinné nitrátreduktasy. U rezistentních genotypů rajčete byla v infikovaných tkáních lokalizována zvýšená produkce NO konfokální laserovou mikroskopií s využitím fluorescenční sondy 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetátu. Produkce NO pozorovaná v extraktech z patogenních konidií, spolu se zvýšenou produkcí NO lokalizovanou ve vyvíjejících se hyfách patogenu, demonstruje komplexní roli NO v interakcích rostlina-patogen. Na základě získaných výsledků lze předpokládat zapojení NO v obranné reakci studovaných genotypů *Solanum* spp. vůči infekci patogenem *O. neolycopersici*, probíhající s různou intenzitou a mechanismem v závislosti na stupni odolnosti jednotlivých genotypů. Výsledky byly publikovány v časopise *Molecular Plant Pathology* (viz. Příloha 2). Na základě výsledků zde prezentovaných a výsledků získaných v předešlém výzkumu zaměřeném na metabolismus ROS v interakci rostlina-patogen (Mlíčková *et al.*, 2004) můžeme předpokládat možné synergistické působení NO a H₂O₂ v reakci rajčete na padlí. NO a H₂O₂ tak pravděpodobně tvoří důležitou část molekulárních mechanismů rezistence rajčete k *O. neolycopersici*.

V navazujícím experimentu byl sledován vliv NO na vývoj biotrofního patogenu *O. neolycopersici* na modelovém systému tří genotypů *Solanum* spp. studovaných v první části tohoto projektu. Vliv donoru NO (SNP), lapače NO (PTIO) a inhibitoru NO synthasy (L-NAME) na klíčivost konidií a vývoj patogenních struktur na listových discích testovaných genotypů byl sledován 8, 24, 48 a 72 hodin po inokulaci. Výsledek působení SNP na vývoj

patogenu se mezi studovanými genotypy výrazně lišil. U všech tří genotypů rajčete byl zaznamenán na vývoj patogenu pozitivní vliv inkubace listových disků s PTIO a naopak negativní s L-NAME. Distribuce NO v tkáních listů a infekčních strukturách patogenu byla studována konfokální laserovou mikroskopií s využitím fluorescenční sondy 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetátu. Histochemická detekce odhalila akumulaci NO v penetrovaných buňkách rezistentních genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* f. *glabratum*, vztahující se k iniciaci HR, a také v klíčních vláknech a apresoriích patogenu, což naznačuje významnou roli NO při průniku *O. neolyopersici* do buňky. Na základě získaných výsledků lze předpokládat zapojení NO v obranné reakci studovaných genotypů *Solanum* spp. vůči infekci patogenem *O. neolyopersici*, ale s různou intenzitou a mechanismem v závislosti na stupni odolnosti jednotlivých genotypů. Získané výsledky byly sepsány formou článku a jsou připraveny k odeslání do redakce (viz. Příloha 3).

V rámci tohoto projektu byla také studována role NO a ROS, molekul zahrnutých v signálních drahách a obranných reakcí rostlin, u modelového systému *Lactuca* spp. x *B. lactucae*. S využitím modelového systému listových disků byl pomocí světelné mikroskopie studován vliv různých sloučenin ovlivňujících metabolismus a hladinu NO v rostlinách. Nitroprusid sodný (SNP), modelový donor NO, snižoval rychlost klíčení konidií patogenu a silně inhiboval jeho další růst z hlediska vývoje infekčních struktur apresoria, primárních a sekundárních váčků. Naproti tomu PTIO, specifický lapač NO, urychlil penetraci *B. lactucae*, neměl však další vliv na interakci rostlina-patogen. Inhibitory enzymů produkujících NO, L-NAME (inhibitor NO synthasy) a Na₂WO₄ (inhibitor nitrátreduktasy) neměly na vývoj patogenu významný vliv. U listových disků inkubovaných s rutinem, lapačem reaktivních radikálů kyslíku a dusíku, byl také pozorován silný inhibiční vliv na vývoj patogenu ve všech stádiích. Produkce NO stanovená oxyhemoglobinovou metodou výrazně vzrostla brzy po vystavení rezistentního genotypu *L. virosa* infekci *B. lactucae*. Stejně jako u modelového systému *Solanum* spp.-*O. neolyopersici*, tak i v tomto případě byla pomocí konfokální mikroskopie pozorována akumulace NO v penetrovaných buňkách, a špičkách klíčních vláken a apresoriích patogenu *B. lactucae*. Změny endogenních hladin rutinu a kvercetinu v extraktech z listů *Lactuca* spp. jsou diskutovány ve spojení s jejich úlohou v antioxidačních mechanismech, které ovlivňují citlivost nebo rezistenci rostlin k plísni salátové. Získané výsledky naznačují úlohu NO jak v odpovědi *Lactuca* spp. na infekci patogenem *B. lactucae*, tak i v rámci metabolismu buněk patogenu během jeho klíčení a růstu. Výsledky této studie byly publikovány v časopise *European Journal of Plant Pathology* (viz. Příloha 4).

PŘÍLOHA 2

Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection

Jana Piterková, Marek Petřivalský, Lenka Luhová, Barbora Mieslerová,
Michaela Sedlářová and Aleš Lebeda

Molecular Plant Pathology 10(4): 501-513 (2009)

Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection

JANA PITERKOVÁ¹, MAREK PETŘIVALSKÝ^{1,*}, LENKA LUHOVÁ¹, BARBORA MIESLEROVÁ², MICHAELA SEDLÁŘOVÁ² AND ALEŠ LEBEDA²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc, Czech Republic

²Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc, Czech Republic

SUMMARY

Various genetic and physiological aspects of resistance of *Lycopersicon* spp. to *Oidium neolycopersici* have been reported, but limited information is available on the molecular background of the plant–pathogen interaction. This article reports the changes in nitric oxide (NO) production in three *Lycopersicon* spp. genotypes which show different levels of resistance to tomato powdery mildew. NO production was determined in plant leaf extracts of *L. esculentum* cv. Amateur (susceptible), *L. chmielewskii* (moderately resistant) and *L. hirsutum* f. *glabratum* (highly resistant) by the oxyhaemoglobin method during 216 h post-inoculation. A specific, two-phase increase in NO production was observed in the extracts of infected leaves of moderately and highly resistant genotypes. Moreover, transmission of a systemic response throughout the plant was observed as an increase in NO production within tissues of uninoculated leaves. The results suggest that arginine-dependent enzyme activity was probably the main source of NO in tomato tissues, which was inhibited by competitive reversible and irreversible inhibitors of animal NO synthase, but not by a plant nitrate reductase inhibitor. In resistant tomato genotypes, increased NO production was localized in infected tissues by confocal laser scanning microscopy using the fluorescent probe 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate. NO production observed in the extracts from pathogen conidia, together with elevated NO production localized in developing pathogen hyphae, demonstrates a complex role of NO in plant–pathogen interactions. Our results are discussed with regard to a possible role of increased NO production in pathogens during pathogenesis, as well as local and systemic plant defence mechanisms.

INTRODUCTION

The induction of the plant defence response in response to stress stimuli is facilitated by a number of signalling pathways. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) have been shown to be crucial components of the plant stress response (De Gara *et al.*, 2003; Delledonne *et al.*, 2001, 2002; Mur *et al.*, 2008; Wendehenne *et al.*, 2004; Yoshioka *et al.*, 2008; Zaninotto *et al.*, 2006). Although nitric oxide (NO) has been the focus of plant stress physiology and biochemistry research during the past decade, the exact origin, fate and function of NO in plants under different physiological and stress conditions still remain to be determined (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007; Neill *et al.*, 2008; Planchet and Kaiser, 2006b; Planchet *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2008). Several enzymes have been shown to produce NO in plants: NO synthase (NOS)-like enzyme, nitrate reductase and nitrite: NO reductase (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007; Crawford *et al.*, 2006; Guo, 2006; del Río *et al.*, 2004; Zemojtel *et al.*, 2006).

The prominent function of NO in both signalling and resistance of plants infected by pathogens has been well documented in a number of model pathosystems, for example, interactions of plants with viruses (Durner *et al.*, 1998), bacteria (Delledonne *et al.*, 1998; Modolo *et al.*, 2005; Mur *et al.*, 2005), oomycetes (Petřivalský *et al.*, 2007) and fungi (Prats *et al.*, 2005; Tada *et al.*, 2004). Extensive research has focused on the signalling role of NO in the initiation and progress of the plant hypersensitive response (HR), accumulation of pathogenesis-related (PR) proteins and modification of gene expression (Mur *et al.*, 2006; Wendehenne *et al.*, 2004; Zaninotto *et al.*, 2006). HR, attributed especially to race-specific interactions, is conditioned by the rapid accumulation of ROS (Keller *et al.*, 1998) and NO (Delledonne *et al.*, 1998). The synergistic action of NO and H₂O₂ is believed to orchestrate the localized cell death response and restrict pathogen invasion (Zaninotto *et al.*, 2006), although the mechanism of interaction between NO and ROS is still a matter of debate (De Gara *et al.*, 2003; Delledonne *et al.*, 2003; Mur *et al.*, 2006; Tada *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2008). Direct

*Correspondence: E-mail: marek.petřivalsky@upol.cz

chemical reaction between NO and H₂O₂ produces either highly reactive singlet oxygen or hydroxyl radicals (Noronhadutra *et al.*, 1993), which can induce the processes of cell death. Reaction of NO with O₂⁻ leads to the formation of a strong oxidant compound, peroxyxynitrite (ONOO⁻), although it seems to be relatively non-toxic to plant cells, in contrast with studies conducted with animal cells. Peroxyxynitrite is not an essential signal for cell death in soybean cell culture (Delledonne *et al.*, 2001), although it has been reported to induce PR-1 accumulation in tobacco leaves (Durner and Klessig, 1999) and to modulate the cell redox state through protein nitration (Delledonne *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2006). NO is also known to induce a set of plant defence genes, including phenylalanin amonia-lyase and chalcone synthase, two key enzymes of the phenylpropanoid pathway, leading to the production of secondary compounds, such as phytoalexins and lignin precursors (Dixon, 2001).

Systemic acquired resistance (SAR) in healthy plant tissue is usually activated by cell death in incompatible plant–pathogen interactions of locally infected plants. This triggers the release of short- and long-distance mobile signal molecules, including salicylic acid, methyl salicylate, jasmonic acid and yet poorly defined lipid and peptide effectors (Heil and Ton, 2008; Vlot *et al.*, 2008). Signalling relationships between NO, H₂O₂ and salicylic acid, starting in the vicinity of pathogen attack to the final induction of SAR in distal tissues, have been observed during the development of SAR (Delledonne *et al.*, 2001; Song and Goodman, 2001). The external application of NO induces endogenous accumulation of SA and its conjugates in tobacco, conditioning the establishment of SAR (Durner *et al.*, 1998).

Powdery mildew *Oidium neolycopersici*, a biotrophic epiphytic pathogen, causes serious epidemics, mainly in glasshouse tomato crops in Europe and North America (Kiss *et al.*, 2001; Lebeda and Mieslerová, 1999). According to previous studies, the resistance in the pathosystem *Lycopersicon* spp.–*O. neolycopersici* is conferred by monogenic genes (Bai *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2007). The dominant resistance genes (*Ol-1*, *Ol-3*, *Ol-4*, *Ol-5* and *Ol-6*) confer race-specific resistance by hampering the fungal growth via HR of the host epidermal cells, whereas the recessive gene *ol-2* confers resistance via papilla formation (Bai *et al.*, 2005). Our previous experiments have shown a relationship between ROS production and *Lycopersicon* spp. resistance to tomato powdery mildew (Mlíčková *et al.*, 2004; Tománková *et al.*, 2006). This work aimed to determine the possible role of NO in plant–pathogen interactions as well as the local and systemic resistance of tomato. Three *Lycopersicon* spp. genotypes, *L. esculentum* cv. Amateur (susceptible), *L. chmielewskii* (LA 2663, moderately resistant) and *L. hirsutum* f. *glabratum* (LA 2128, highly resistant) (Mieslerová *et al.*, 2004), were studied during the course of 216 h post-inoculation (hpi) by *O. neolycopersici*.

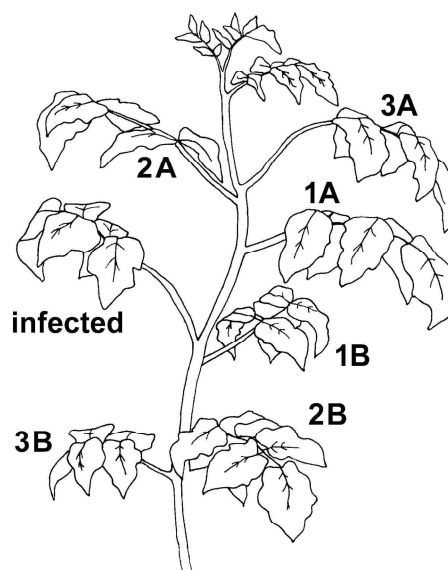


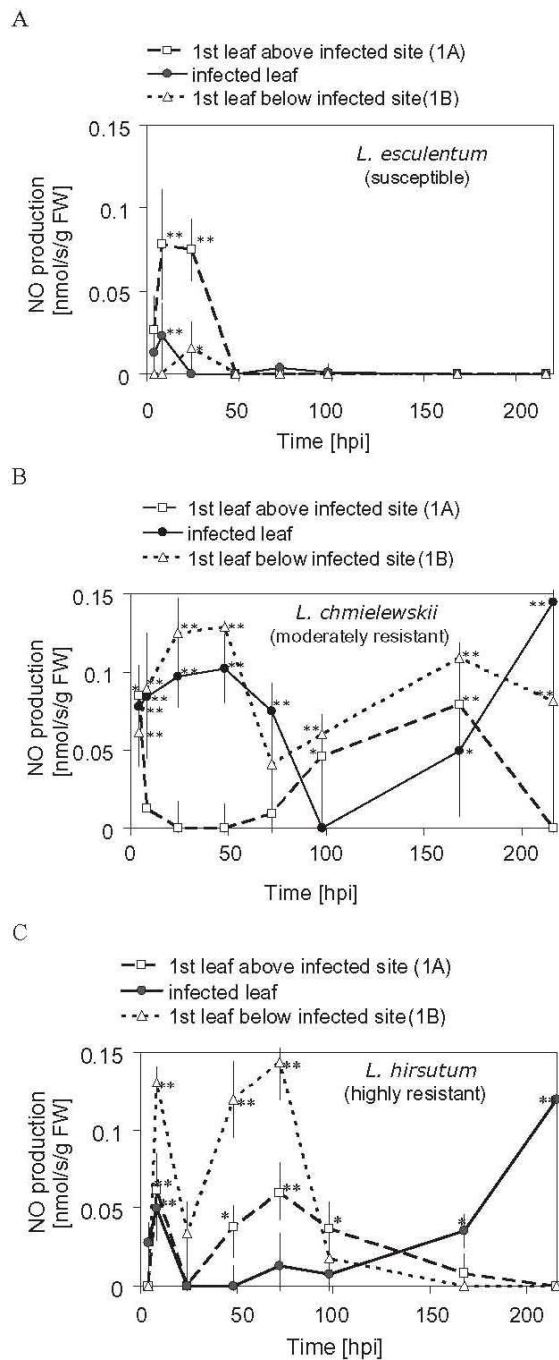
Fig. 1 Schematic diagram of *Lycopersicon esculentum* cv. Amateur plant with labelled leaves of interest: 1A, 2A, 3A, first, second and third leaves above the inoculation site; 1B, 2B, 3B, first, second and third leaves below the inoculation site.

RESULTS

The study of tomato reactions to powdery mildew infection was focused on the determination of NO production in the leaf extracts, estimated as arginine-dependent NO generation by the oxyhaemoglobin method. Tomato plants at the stage of eight true leaves were used for the experiments; only the fourth true leaf counted from the base up was inoculated with conidia of *O. neolycopersici*. During 216 hpi, NO production was monitored separately in extracts of inoculated leaves and of three leaves above and below the inoculated leaf (Fig. 1).

Local response to infection: NO production in the extracts of inoculated leaves

Significant differences in the extent and timing of the increase in NO production were found between susceptible and resistant tomato genotypes. In the susceptible genotype *L. esculentum* cv. Amateur, elevated NO production was observed only during the early interval following inoculation, at 4–8 hpi (Fig. 2A). However, a two-phase increase in NO production was detected in the leaf extracts of both resistant genotypes (Fig. 2B, C). For *L. chmielewskii* (LA 2663), the first phase was detected between 4 and 72 hpi, with a maximum at 24–48 hpi, whereas, for *L. hirsutum* f. *glabratum* (LA 2128), the first phase culminated at 8 hpi. A pronounced and continual increase in NO production started from 96 hpi for both *L. chmielewskii* and *L. hirsutum*, and lasted up to the end of the studied interval at 216 hpi.



Systemic response to infection: NO production in the extracts of uninoculated leaves

The temporal changes in NO production varied in individual *Lycopersicon* spp. during the course of *O. neolycopersici* patho-

Fig. 2 Time course of relative changes in nitric oxide (NO) production within the extracts of leaves of *Lycopersicon* spp. genotypes inoculated by *Oidium neolycopersici* and in adjacent leaves below and above the inoculated leaf. Data represent the differences between infected and control plants. A, *Lycopersicon esculentum* cv. Amateur (susceptible); B, *L. chmielewskii* (LA 2663) (moderately resistant); C, *L. hirsutum* f. *glabratum* (LA 2128) (resistant). □, adjacent leaf above inoculation site; ●, inoculated leaf; △, adjacent leaf below inoculation site. Results are given as the mean \pm standard deviation ($n = 9$), and values statistically significantly different from the zero time point are marked as * $P = 0.05$ or ** $P = 0.01$.

genesis. For the first time, to our knowledge, we have demonstrated a plant systemic response to pathogen infection in the form of increased NO production in the extracts of uninoculated distal leaves (Figs. 2A–C, 3A–C). In susceptible *L. esculentum*, a peak of NO production was detected in the uninoculated leaf above the inoculated leaf at 8 hpi (Fig. 2A), whereas hardly any difference was recorded in the leaves below the inoculated leaf. No changes were found at later stages of infection (Figs. 2A, 3). However, a biphasic increase in NO production was detected in the moderately resistant and resistant plants, although with different timing. In *L. chmielewskii*, the timing of NO production changes differed between adjacent leaves above and below the inoculated leaf (Fig. 2B). An earlier increase in NO production with a maximum at 4 hpi was observed in the upper adjacent leaf in *L. chmielewskii*, whereas the enhancement of NO production in the lower adjacent leaf continued until the first maximum at 48 hpi, analogous to the inoculated leaf. The timing of the second maximum of NO production was similar for adjacent leaves both above and below the inoculated leaf at 168 hpi. In *L. hirsutum*, the changes recorded in uninoculated leaves close to the infection site were parallel for both the upper and lower leaves, but differed in intensity. The first prominent increase in NO production occurred at 8 hpi in all inoculated and adjacent uninoculated leaves. However, the second maximum occurred at 72 hpi for uninoculated leaves (Fig. 2C), with a subsequent decline at later stages, whereas, in the inoculated leaf, the second increase was found at 168 and 216 hpi. In both resistant tomato genotypes, the elevation of NO production was stronger in the extracts of older (lower) leaves than younger leaves (from the upper part of the plants).

Variation among *Lycopersicon* spp. genotypes with regard to changes in NO production in the extracts of both inoculated and adjacent uninoculated leaves should be interpreted with respect to the resistance mechanisms and dynamics of pathogen growth. Two main phases of powdery mildew development can be recognized: (i) early germ tube development [including conidia germination (3–9 hpi), development of appressoria (6–12 hpi), formation of haustoria (12–24 hpi) and the initiation of intensive mycelium branching (48–72 hpi)]; and (ii) late stages—mycelium expansion or retardation by HR at 72–216 hpi (Fig. 3A–C). In compatible interactions (*L. esculentum*–*O. neolycopersici*), char-

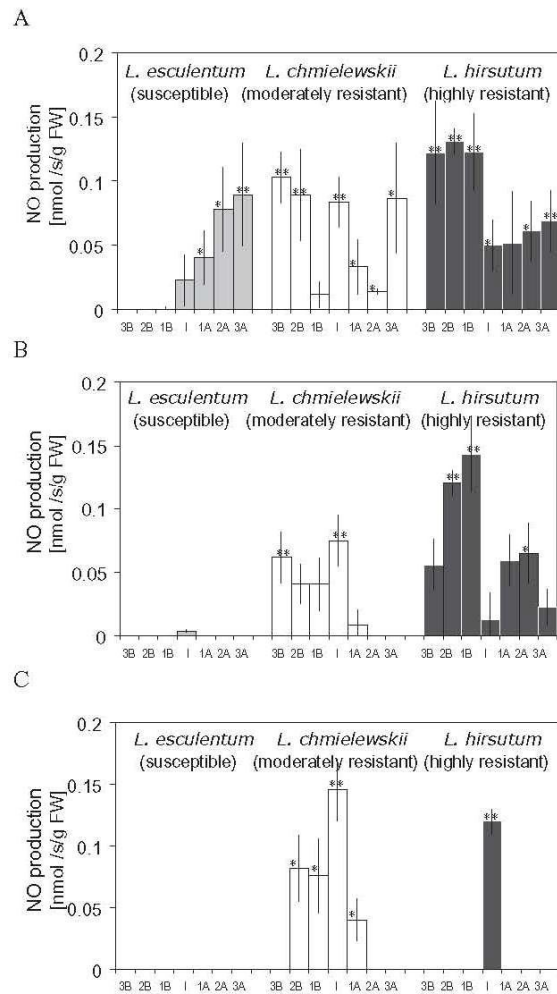


Fig. 3 Increase in nitric oxide (NO) production in the extracts of leaves of *Lycopersicon* spp. genotypes inoculated by *Oidium neolyopersici*, and in three leaves below and above the inoculated leaf. The results are expressed as the difference between infected and control healthy plants at 4 hpi (A), 72 hpi (B) and 216 hpi (C). *Lycopersicon esculentum* cv. Amateur (grey column), *L. chmielewskii* (LA 2663) (dotted column), *L. hirsutum* f. *glabratum* (LA 2128) (black column). 1A, 2A, 3A, first, second and third leaves above the inoculation site; I, inoculated leaf; 1B, 2B, 3B, first, second and third leaves below the inoculation site (see Fig. 1). Results are given as the mean \pm standard deviation ($n = 9$), and values statistically significantly different from the zero time point are marked as * $P = 0.05$ or ** $P = 0.01$.

acterized by rapid pathogen growth and no HR, the increase in NO production in leaf extracts was recorded only during pathogen germination in the inoculated leaf and the upper uninoculated leaves (Fig. 3A). In incompatible interactions (*L. chmielewskii*, *L. hirsutum*–*O. neolyopersici*), typified by the expansion of HR, NO production in leaf extracts increased in the whole plant body with pathogen germination (Fig. 3A). During later stages of

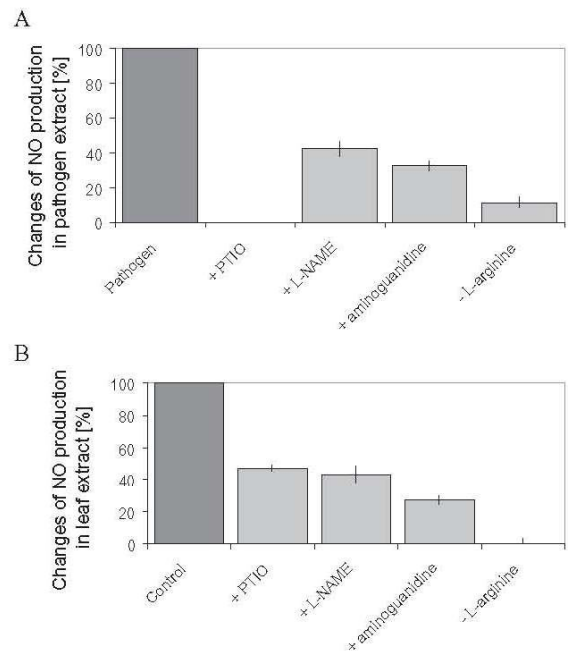


Fig. 4 Relative changes in *in vitro* nitric oxide (NO) production in a conidial extract of the pathogen (A) and in an extract of *Lycopersicon chmielewskii* (LA 2663) inoculated leaves at 24 hpi (B), and the effect of pretreatments with NO-modulating compounds. The extracts were pre-incubated with 1 mM 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) (specific NO scavenger), 1 mM *N*⁶-nitro-L-arginine methylester (L-NAME) or 5 mM aminoguanidine [nitric oxide synthase (NOS) inhibitors] for 5 min prior to the measurement of enzyme activity. In the last variant, L-arginine (NOS substrate) was omitted from the reaction mixture. The data represent the percentage of NO production in pathogen (A) or plant (B) extracts in optimal reaction conditions (100%). The results are given as the mean \pm standard deviation ($n = 3$ independent treatments).

pathogenesis, the reaction varied with the degree of host resistance (Fig. 3B,C). At the end of the studied interval (216 hpi), the enhancement of NO production was detected in the inoculated leaves of both resistant genotypes, and in the moderately resistant *L. chmielewskii* also in uninoculated leaves close to the infected leaf (Fig. 3C).

NO production in the extracts of pathogen infection structures

The oxyhaemoglobin method was used to determine NO production in extracts from *O. neolyopersici* conidia (Fig. 4A). NO production in the extracts of pathogen conidia, used as inoculum, reached 1.0 nmol/sg fresh weight (FW) (Table 1). Furthermore, an estimation of the contribution of pathogen NO production to the total value measured in the extracts from inoculated leaves was performed. The amount of pathogen

Table 1 Comparison of *in vitro* nitric oxide (NO) production in the leaf extracts of control and inoculated plants (8 hours post-inoculation, hpi) and the extracts of pathogen conidia.

	NO production (nmol/s/g FW)	
	<i>L. esculentum</i> cv. Amateur	<i>L. chmielewskii</i> (LA 2663)
Control leaf	0.146 ± 0.011	0.169 ± 0.013
Inoculated leaf 8 hpi	0.172 ± 0.031	0.256 ± 0.042
Pathogen	0.0010 ± 0.0003	

conidia transferred to leaves of *L. esculentum* cv. Amateur by surface contact during inoculation was estimated to be 1–2 mg by the weight difference, which corresponds to 0.001–0.002 nmol/s of pathogen NO production per gram of FW of the inoculated leaves. At the time of inoculation, this value represents approximately 0.7% of the NO production in the extract of an uninoculated leaf of *L. esculentum* cv. Amateur and 0.6% of the activity in *L. chmielewskii*.

Identification of NO source in pathogen infection structures and inoculated tomato leaves

The identity of NO as the compound reacting with oxyhaemoglobin in the assay was confirmed by the complete loss of production potential when the extract was incubated with the NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (cPTIO). Arginine-dependent enzyme activity as an important source of NO was suggested by a 90% loss of activity in experiments in which the NOS substrate L-arginine was omitted from the reaction mixture (Fig. 4A). The competitive inhibitor of animal NOS, *N*^G-nitro-L-arginine methylester (L-NAME), decreased the activity to 42%, and aminoguanidine, an irreversible inhibitor of animal NOS, to 32%.

The effect of several pretreatments was tested to unveil the NO origin in leaf extracts of *L. chmielewskii* (24 hpi) by the oxyhaemoglobin method (Fig. 4B). *In vitro* NO production in the extracts of inoculated leaves was decreased to 47% by the addition of the NO scavenger cPTIO. Similar results were obtained with the application of L-NAME, which reduced the activity to 43%, whereas aminoguanidine decreased NO production to 27% (Fig. 4A, B). NO production was totally abolished in the reaction mixture in the absence of the NOS substrate L-arginine.

Histochemical localization of NO

In control, inoculated and systemic leaves of *L. esculentum* and *L. chmielewskii* (8–216 hpi), the *in vivo* localization of NO was followed by confocal laser scanning microscopy (Fig. 5). The distribution of NO was studied by incubation with the cell-permeable NO probe 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA). Usually, there was no fluorescence signal detected within the plant tissues at 8 hpi (Fig. 5A), or very weak in rare cases for *L. chmielewskii* (Fig. 5E).

However, an intense green fluorescence of the NO probe was found in germinating conidia, germ tubes and appressoria of *O. neolyopersici* (Fig. 5A, E). The specificity of the fluorescence signal was confirmed by pre-incubation of leaf samples with the NO scavenger cPTIO (Fig. 5C, G). The same results were obtained after tissue pre-incubation with the NOS competitive inhibitor L-NAME, which almost completely abolished the fluorescence signal. The spatial distribution of the fluorescence signal inside pathogen invasive structures was demonstrated by '2.5D' software modelling, as illustrated by the volume model in Fig. 6.

No dramatic changes in NO localization were revealed during the course of *O. neolyopersici* pathogenesis, as demonstrated at 168 hpi (Fig. 7) and 216 hpi (Fig. 8). NO was localized within pathogen mycelium (especially the tips of hyphae and haustoria) in susceptible *L. esculentum* cv. Amateur (Figs 7A, 8A), whereas, in *L. chmielewskii*, the fluorescence signal for the NO probe also occurred in epidermal cells either in intimate contact with the pathogen or adjacent to the infection site (Figs 7C, 8C). NO was not detected in any of the adjacent uninoculated leaves below or above the inoculation site by DAF-FM DA staining.

DISCUSSION

In this work, an increase in NO production was found in all *Lycopersicon* spp. genotypes inoculated with *O. neolyopersici*, although in a different manner with regard to intensity and timing. A relationship between the developmental stage of the pathogen, the timing of the increase in NO production and H₂O₂ accumulation, as well as the subsequent HR, has been shown by previous and present experimental data. We have shown previously that key periods of *O. neolyopersici* pathogenesis involve: conidia germination (3–9 hpi); development of appressoria (6–12 hpi); formation of haustoria (12–24 hpi); and the initiation of intensive mycelium branching (48–72 hpi) (Mieslerová *et al.*, 2004; Mlíčková *et al.*, 2004). In all tomato genotypes, the first increase in NOS-like activity is observed at 4–8 hpi, concurrent with the oxidative burst (Tománková *et al.*, 2006). This analogous increase in NO production and accumulation of H₂O₂ within plant tissues is linked to the germination of conidia and the formation of appressoria (Mieslerová *et al.*, 2004). This pattern of increase in NO production is similar to that detected by the oxyhaemoglobin assay in soybean and tobacco cell suspensions challenged with an incompatible strain of *Pseudomonas syringae*, where NO accumulation reaches a maximum approximately

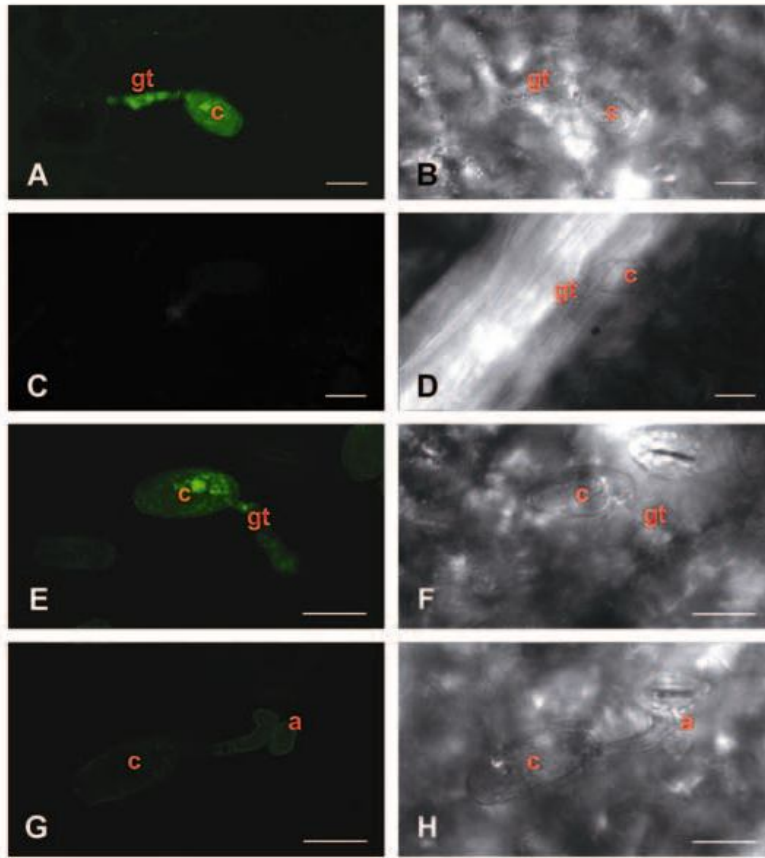


Fig. 5 Histochemical detection of nitric oxide (NO) production in the leaves of *Lycopersicon* spp. inoculated with *Oidium neolycopersici* (8 hpi). Confocal fluorescence (A, C, E, G) and light differential interference contrast (B, D, F, H) micrographs of *L. esculentum* cv. *Amateur* (A–D) and *L. chmielewskii* (LA 2663) (E–H) leaf tissues incubated with the cell-permeable NO-sensitive fluorescent dye 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA). Control specimens (C, D, G, H) were pre-incubated with the specific NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (cPTIO). Infection structures: a, appressorium; c, conidium; gt, germ tube. Bar, 20 μ m.

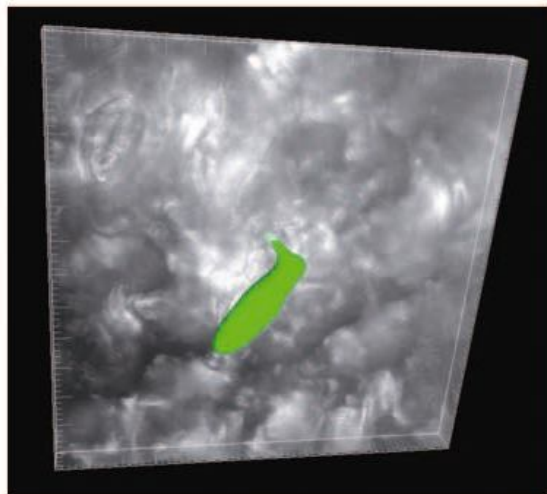


Fig. 6 Spatial distribution of nitric oxide (NO)-specific fluorescence signal within the germinating conidium of *Oidium neolycopersici* (8 hpi). The 2.5D¹ volume model was reconstructed from a series of 10 cross-sections in LCS Imaris 5.0.3. software.

1 hpi and is followed by a more intensive second burst of NO at 4–8 hpi (Delledonne *et al.*, 1998). Early NO production, known as the NO burst, seems to be closely related to the process of recognition in race-specific interactions (Bennett *et al.*, 2005; Mur *et al.*, 2006). The second and more intense increase in NO production and H₂O₂ levels is coincident with the period of mycelium branching, as the retardation of pathogen growth on resistant plant leaves can be observed earlier than HR symptoms (Mieslerová *et al.*, 2004; Mlíčková *et al.*, 2004). Similarly, a transient NO burst is observed in barley epidermal cells infected by the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) just prior to their HR-associated collapse (Prats *et al.*, 2005). The timing of increased NO production and H₂O₂ production within tissues of resistant tomato genotypes is consistent with the hypothesis of essential cooperation of the two molecules in the HR process, as shown in other pathosystems (Delledonne *et al.*, 2002). This is also supported indirectly by data obtained for the susceptible *L. esculentum* cv. *Amateur*, where increased NO production was recorded only early after inoculation and H₂O₂ accumulation only during the later phase of *O. neolycopersici* pathogenesis. In a similar manner, an early NO burst and a subsequent wave of NO

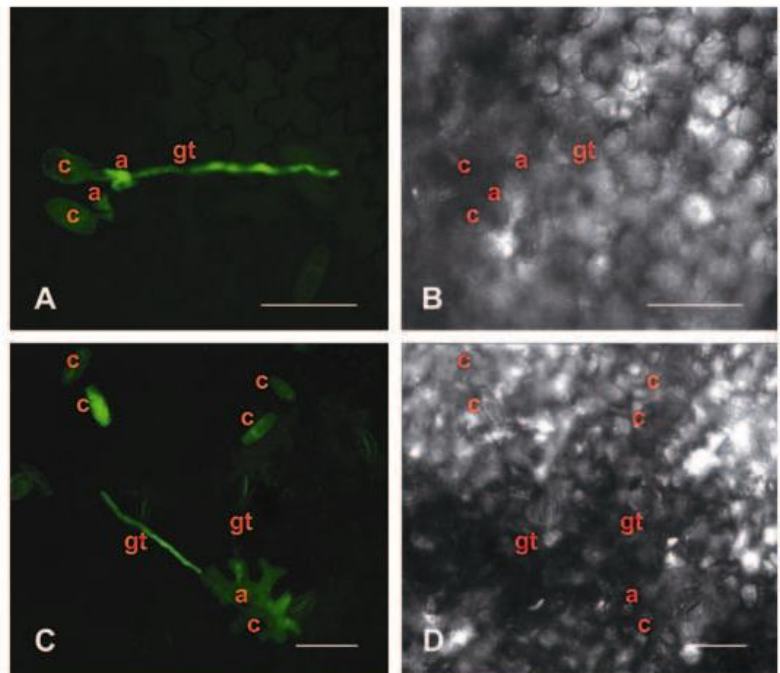


Fig. 7 Localization of nitric oxide (NO) at later stages of *Oidium neolycopersici* pathogenesis (168 hpi) on *Lycopersicon esculentum* cv. Amateur (A, B) and *L. chmielewskii* (LA 2663) (C, D). Confocal fluorescence (A, C) and bright-field differential interference contrast (B, D) micrographs of tissues stained with 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA). Infection structures: a, appressorium; c, conidium; gt, gem tube. Bar, 50 μ m.

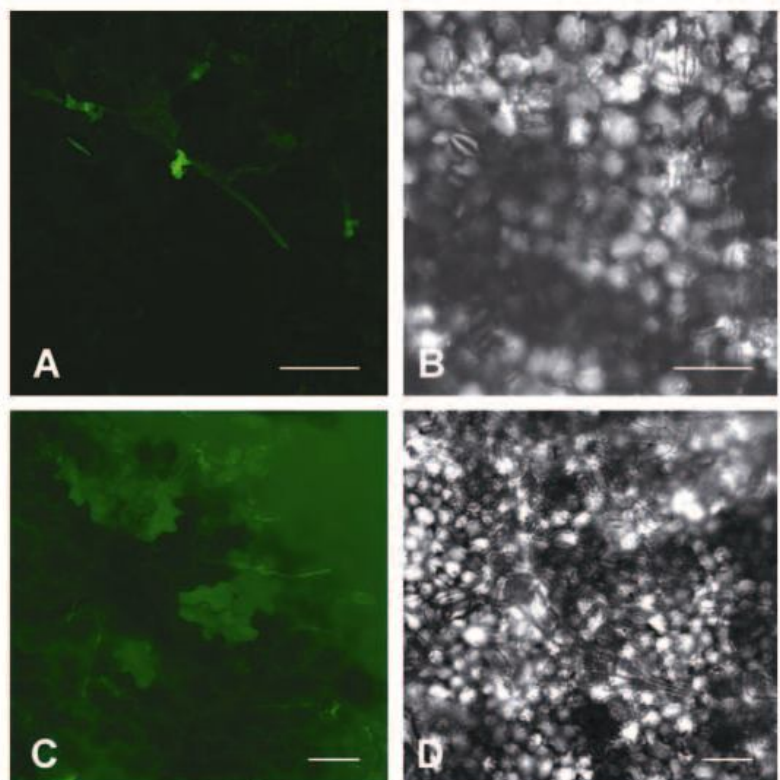


Fig. 8 Localization of nitric oxide (NO) at late stages of *Oidium neolycopersici* pathogenesis (216 hpi) on *Lycopersicon esculentum* cv. Amateur (A, B) and *L. chmielewskii* (LA 2663) (C, D). Confocal fluorescence (A, C) and bright-field differential interference contrast (B, D) micrographs of tissues stained with 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA). Bar, 50 μ m.

generation enhance the resistance of pelargonium to the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2007).

The results of a study on the influence of the NO scavenger cPTIO and the superoxide dismutase (SOD)-catalysed dismutation of O_2^- to H_2O_2 has indicated that, in oat leaves, NO and O_2^- may not trigger hypersensitive cell death in infected cells; however, they play an important role in the induction of apoptosis in adjacent cells (Tada *et al.*, 2004). In our host–pathogen interaction, the highest production of O_2^- was detected histochemically in the inoculated leaves of susceptible *L. esculentum* cv. Amateur during the first several hours after inoculation (Mlíčková *et al.*, 2004). The role of the possible synchronous production of both O_2^- and NO by increased NOS-like activity is not so clear in this case. A slightly increased content of O_2^- was also detected in the moderately resistant *L. chmielewskii*, whereas the O_2^- signal was low in the leaf tissues of resistant *L. hirsutum* (Mlíčková *et al.*, 2004). The small amount of O_2^- detected in the tissue of resistant plants might be related to its rapid reaction, with possibly increased amounts of generated NO. Recently, the formation of structural barriers by cell wall modifications has been suggested to be controlled by the balance of NO, H_2O_2 and O_2^- production in the initial phases of the interaction of *L. esculentum* with *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of anthracnose (Wang and Higgins, 2005a). The generation of H_2O_2 during the development of *O. neolycopersici* was shown to be strongly associated with HR and papilla formation, and thus involved in tomato resistance to powdery mildew (Li *et al.*, 2007). In contrast with our results, increased levels of NO, decreased H_2O_2 levels and, hence, accelerated infection development were reported in *L. esculentum* (cv. Perkoz), susceptible to the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* (Malolepsza and Rozalska, 2005).

The study of NO production in tomato leaf extracts was complemented by *in vivo* NO imaging of inoculated and systemic tomato leaves, following incubation of the tissues with the cell-permeable NO fluorescence probe DAF-FM DA. The data on NO distribution acquired by confocal microscopy *in vivo* are generally consistent with the results obtained by the spectroscopic oxyhaemoglobin method *in vitro*. In moderately resistant *L. chmielewskii*, a weak fluorescence signal for NO was detected in a few cells in contact with the pathogen structures at 8 hpi, whereas, at a later stage of the *O. neolycopersici* infection process (216 hpi), more intense fluorescence was recorded. The production of NO in plant cells within infected leaves presumably relates to the activation of local resistance mechanisms that involve an increase in NO production. However, no fluorescence signal was recorded in systemic leaves in which an *in vitro* increase in NO production potential was determined. This could be explained by the hypothesis that, in the systemic response, the increase in NO-generating enzyme activity was not transduced into an increased NO level, or

that the increased NO amount was evenly distributed within the whole leaf tissue and low NO concentrations were not sufficient to produce a detectable fluorescence signal. As for susceptible *L. esculentum*, NO was not localized in host tissues, but was documented within the pathogen mycelium and haustoria (Fig. 8C). *In vivo*-recorded NO production by *O. neolycopersici* was confirmed by the oxyhaemoglobin method in extracts from pathogen conidia (Table 1, Fig. 4A). The involvement of the enzyme with arginine-dependent NO-generating activity in the pathogen production of NO was suggested in experiments in the absence of the NOS substrate L-arginine; moreover, NO production in pathogen extracts was decreased by the application of NOS inhibitors (Fig. 4A). Thus, NO production by the endogenous pathogen was expected to contribute to changes in total NO production measured in homogenized tissues of inoculated leaves (Table 1). To distinguish the NO production of the pathogen from that originating in plant leaves, a measurement performed on the separate extracts of both partners is required. Unfortunately, we were unable to separate the growing mycelium without damage, as the biotrophic pathogen lives in intimate contact with host tissues. At least for the early stage after inoculation, the contribution of pathogen conidia was estimated from the specific NO-generating activities and the mean mass of pathogen conidia transferred during inoculation, which seems to represent 0.6–0.7% of total NO production. This is very low and the results of confocal microscopy indicate an intense increase in NO production within the mycelium during the infection process. Unfortunately, this could not be measured *in vitro* as it is not possible to cultivate viable biotrophs on artificial medium for longer time periods. However, a notable conclusion is that the specific enzyme NO-generating activity, when expressed per grams of FW, is one order of magnitude higher in pathogen conidia in comparison with untreated leaves. This may explain why an NO-positive signal was observed in pathogen structures, but was not detectable in tomato leaves using the DAF-FM DA probe (Fig. 5).

Our findings indicate the importance of endogenous NO production during powdery mildew development, as already reported for lettuce downy mildew, *Bremia lactucae* (Petřivalský *et al.*, 2007). Similarly, exogenous application of NO delayed the germination of *Colletotrichum coccodes* conidia, and treatment with NO inhibitors accelerated germination, suggesting that NO may have a regulatory effect on the processes of fungal pathogen germination (Wang and Higgins, 2005b). NO produced by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* was detected recently by 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA) and confocal microscopy, and was shown to be a pathogenesis determinant on barley required for the formation of fungal appressoria (Prats *et al.*, 2008). Currently, we are addressing this issue on the model system of tomato leaf discs to investigate specific effects of various NOS inhibitors and NO scavengers or donors on

O. neolycopersici development. However, based on our experience, as well as discussions on the appropriate methodology (Jourdeuil *et al.*, 2005; Planchet and Kaiser, 2006a; Planchet *et al.*, 2006), we strongly suggest more careful interpretation of the data obtained exclusively by confocal microscopy using diamino fluorescein derivatives.

In vitro NO production in the extracts of uninoculated leaves was related to the level of tomato genotype resistance, and points to a possible role of NO in the process of systemic signal transduction throughout *Lycopersicon* spp. plants. The biphasic timing of the increase in NO production seems to be characteristic only for moderately resistant and highly resistant tomatoes. The second phase of the NO production increase in the extracts of uninoculated leaves shifts to earlier time intervals in highly resistant *L. hirsutum* compared with moderately resistant *L. chmielewskii*. This conditions the presumption of NO participation, especially in the initiation of resistance mechanisms, which are triggered rapidly by *L. hirsutum*. However, the moderately resistant genotype *L. chmielewskii* showed increased NO production in the extracts of adjacent leaves compared with the inoculated leaf at 216 hpi also, when no systemic response was recorded in the other genotypes (Fig. 3C). In both moderately and highly resistant genotypes, the increase in NO production was detectable at 4 hpi in relatively long-distance plant organs, up to the third leaf above and below the inoculated leaf (Fig. 3). These results support the hypothesis that the capacity to rapidly and continuously increase local and systemic NO production by an arginine-dependent NO-generating enzyme, as a response to pathogen challenge, forms a part of the molecular basis of tomato resistance to biotrophic fungi, at least to powdery mildew. NO is likely to play both signalling and defence roles in the systemic resistance of tomato plants. NO has been reported to be involved in phytoalexin accumulation in potato tubers (Nori-take *et al.*, 1996), and the application of NO triggered the biosynthesis of antimicrobial flavonoids in elicitor-treated soybean cotyledons (Modolo *et al.*, 2002). Systemic accumulation of phytoalexins is one of the defence mechanisms suggested for *L. hirsutum* (Mansfield, 2000).

This study did not address directly the nature and fate of long-distance signals transferred from inoculated to distal uninoculated parts of a plant under pathogen attack. In some host-pathogen interactions, it has been shown that interplay between NO, salicylic acid and its conjugates plays a fundamental role in SAR (Durner *et al.*, 1998; Song and Goodman, 2001), although the underlying mechanism has not been elucidated fully. Tomato plants show spiral phyllotaxy, and the third leaf above is the nearest orthostichous leaf to the inoculated leaf. Indeed, at 4 hpi, the highest systemic increase in NOS-like activity in susceptible and moderately resistant genotypes was observed in the third leaf above the inoculated leaf, whereas the resistant geno-

type showed an even stronger response in all three leaves below the inoculation site (Fig. 3A). At later time intervals, the relationship of the systemic response to vascular architecture is much less clear and deserves further investigation. Similarly, the systemic induction of proteinase inhibitor on tomato leaf wounding was strongest in the third leaf above and lowest in the first leaf above the wounded leaf (Orians *et al.*, 2000). Concerning the downward movement of systemic signals, electrical signals have been described as important mediators of tomato systemic response in both directions, as demonstrated for heat stimuli and mechanical wounding (Heil and Ton, 2008; Peña-Cortés *et al.*, 1995; Stankovic and Davies, 1998).

Several experiments were performed in order to confirm the involvement of the NO-generating enzyme as the source of increased NO production after tomato inoculation. Enzyme and non-enzyme source(s) of NO in plant cells have been the subject of a long-lasting debate with controversial results published repeatedly (Crawford *et al.*, 2006; Guo, 2006; Planchet and Kaiser, 2006b; del Río *et al.*, 2004; Zemojtel *et al.*, 2006). Using the specific NO scavenger cPTIO, we aimed to confirm the reliability of our experimental method based on the interaction of NO with oxyhaemoglobin. Even at high cPTIO concentrations in reaction buffer (up to 1 mM), we did not observe complete inhibition of methaemoglobin production. This could be explained by the much higher rate constant for the NO-oxyhaemoglobin reaction than the NO-cPTIO reaction, and therefore much more efficient scavenging of NO by oxyhaemoglobin in the reaction buffer. As reported previously, NO-mediated oxidation of oxyhaemoglobin to methaemoglobin proceeds with a specific rate constant of $3.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Gow *et al.*, 1999), whereas the rate constant for the reaction of nitronyl nitroxides with cPTIO has been reported in the range $(0.5-16) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Goldstein *et al.*, 2003). In our host-pathogen interaction, NO is likely to be synthesized, in major part, by an arginine- and NADPH-dependent enzyme(s) that could be inhibited by pretreatment with the competitive inhibitor of animal NOS, L-NAME, and the irreversible inhibitor of animal NOS, aminoguanidine. The involvement of arginine-dependent enzyme activity in NO production was confirmed by the results obtained in the absence of L-arginine and NADPH in the reaction mixture. Similar results to those obtained by oxyhaemoglobin assay were determined by the fluorimetric method using DAF-FM DA, both with respect to differences between the activity values of control and infected plants, and to their sensitivity to the NOS scavenger cPTIO and NOS inhibitors L-NAME and aminoguanidine (data not shown). However, the participation of other enzymatic and non-enzymatic sources in basal or increased NO production in tomato leaves cannot be excluded. We can conclude that the identification of NO sources in *O. neolycopersici* pathogenesis on tomato deserves further detailed study, with special focus on the nature and localization of NO-generating enzyme activities in both leaf

and pathogen cells, and the evaluation of the possible involvement of other NO sources.

To summarize the results discussed above, our study has confirmed the role of increased NO production, probably generated in major part by an arginine-dependent enzyme activity, in the model pathosystem *Lycopersicon* spp.–*O. neolyopersici*. For the first time, we have demonstrated a systemic plant response to biotrophic pathogen infection in the form of increased NO production *in vitro* in the extracts of adjacent and distant uninoculated leaves. The possible synergistic action of NO and H₂O₂ in the tomato response to powdery mildew can be hypothesized on the basis of the results presented here and previous investigations focused on ROS metabolism in the plant–pathogen interaction (Mličková *et al.*, 2004). In resistant genotypes, increased NO production was observed on infection, in parallel with increased amounts of H₂O₂, and in two specific time periods in both inoculated and distant uninoculated leaves. Thus, NO and H₂O₂ are likely to form an important part of the molecular mechanism of tomato resistance to *O. neolyopersici*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Pathogen isolate

Oidium neolyopersici Kiss (isolate C-2) from the Czech National Collection of Microorganisms UPOC (Olomouc) was used for the experiments. The isolate originates from natural infections of *L. esculentum* cv. Lucy plants grown in glasshouses of the State Phytosanitary Administration (SPA, Olomouc, Czech Republic) (Mieslerová *et al.*, 2004). The pathogen was maintained and multiplied on 5–8-week-old plants of susceptible *L. esculentum* cv. Amateur, grown under plastic covers in a growth chamber with a 12-h photoperiod (light intensity, 100 µmol/m²) and day/night temperature of 20/18 °C (Tománková *et al.*, 2006).

Plant material

Three *Lycopersicon* spp. genotypes, *L. esculentum* (syn. *Solanum lycopersicum*) cv. Amateur, *L. chmielewskii* (*S. chmielewskii*) (LA 2663), *L. hirsutum* (*S. habrochaites*) f. *glabratum* (LA 2128), expressing differential phenotypes of resistance to *O. neolyopersici* (Mieslerová *et al.*, 2004), were studied. Seeds were sown on moistened Perlite (Agroperlite, Nový Jičín, Czech Republic) and seedlings were transferred to a garden soil–peat mixture (2 : 1, v/v) in plastic pots (7 cm in diameter). Plants were grown in a growth chamber with a 12-h photoperiod (light intensity, 100 µmol/m²) and day/night temperature of 20/18 °C. Plants aged approximately 10 weeks (at the stage of eight true leaves, Fig. 1) were subjected to the following experiments.

Procedures of inoculation, incubation and sample collection

Freshly sporulating mycelium (8 days post-inoculation) of *O. neolyopersici* (isolate C-2) was used as the source of inoculum. The fourth oldest true leaf per plant was inoculated by surface contact (dusting/tapping) with conidia of *O. neolyopersici*. Both inoculated and control plants of each genotype were kept under plastic covers in a growth chamber at 20/18 °C with a 12-h/12-h light/dark photoperiod. The inoculated leaf as well as three leaves above and three leaves below the inoculated leaf were collected separately at 4, 8, 24, 48, 72, 96, 168 and 216 hpi, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Plant growing and inoculation procedures were repeated in three independent experiments, and for each data point corresponding leaves from three plants were collected.

Preparation of plant extracts

Frozen leaf tissues were homogenized in chilled mortar with ice-cold 20 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulphonic acid (HEPES) buffer (pH 7.5) containing 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.5% polyvinylpyrrolidone and 10% glycerol in a ratio of 1 : 2 (w/v). Prior to homogenization, 5 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM aprotinin and 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride were added to the extraction buffer. Leaf homogenates were centrifuged at 16 000 *g* for 15 min at 4 °C, and the supernatants were used immediately for the determination of NOS-like activity.

Preparation of pathogen extracts

Extracts were prepared from frozen *O. neolyopersici* conidia dabbed off 50 leaves of *L. esculentum* cv. Amateur with freshly sporulating mycelium (8 dpi). Approximately 50 mg of pathogen conidia was collected, frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Conidia were processed as described for plant tissues, except that homogenization with HEPES was performed in the ratio of 1 : 10 (w/v).

Pretreatment of leaf and pathogen extracts

Prior to the measurement of NOS-like activity by the oxyhaemoglobin method, the extracts were pre-incubated with 1 mM cPTIO, 1 mM L-NAME or 5 mM aminoguanidine for 5 min.

Determination of NO production

NO production in plant or pathogen extracts was determined spectrophotometrically by the oxyhaemoglobin method based on the reaction of NO with oxyhaemoglobin to yield methaemoglobin and nitrate (Hevel and Marletta, 1994). The reaction medium

contained 10 μM oxyhaemoglobin, 1 mM L-arginine, 1 mM CaCl_2 , 1 mM Mg^{2+} , 1 μM calmodulin, 140 μM NADPH, 1 μM flavin adenine dinucleotide (FAD), 1 μM flavin mononucleotide (FMN) and 10 μM tetrahydrobiopterin in 100 mM HEPES buffer, pH 7.5. Norvaline as a competitive inhibitor of potentially interfering tomato arginase was added at a final concentration of 1 mM. SOD (50 U) and catalase (100 U) were added to prevent interference by O_2^- and H_2O_2 . All measurements were performed at 37 °C, and changes in absorbance were followed at $\lambda = 401$ nm every 15 s for 10 min on a Synergy HT microplate reader (Biotek, USA). All measured values were subtracted from the blank values, where the extracts were replaced in the reaction mixture by the same volume of extraction buffer. For each variant, three measurements for each of the above-mentioned three independent sets of samples were conducted, i.e. nine values were obtained. The data are presented as the mean \pm standard deviation.

NO production in the extracts was determined spectrophotometrically also using the NO probe DAF-FM DA. The reaction medium contained 10 μM DAF-FM DA, 1 mM L-arginine, 1 mM CaCl_2 , 1 mM Mg^{2+} , 1 μM calmodulin, 140 μM NADPH, 1 μM FAD, 1 μM FMN, 10 μM tetrahydrobiopterin, 1 mM norvaline, superoxide dismutase (50 U) and catalase (100 U) in 100 mM HEPES buffer, pH 7.5. Fluorescence was measured in 10-min intervals for 1 h in the dark at 37 °C by a Synergy HT microplate reader (Biotek; excitation filter, 485/20 nm; emission filter, 516/20 nm).

Histochemical localization of NO

Pieces of tissue (approximately 1 \times 1 mm) were cut off the control and inoculated leaves of *L. esculentum* cv. Amateur and *L. chmielewskii* (LA 2663) at 8, 24, 48, 72, 168 and 216 hpi. Samples were incubated in a solution of the NO probe 10 μM DAF-FM DA for 30 min, mounted on microscopic slides and subjected to confocal laser scanning microscopy (Fluoview 1000 attached to an inverted microscope IX81; Olympus C&S, Czech Republic). Excitation was provided by a 488-nm line of an argon ion laser. Dye emission was recorded using a 505–525-nm band-pass filter. To adjust the correct intensity of the lasers, samples from control uninoculated plants were examined at the beginning of the experiment. Leaf samples treated for 30 min with 0.1 mM cPTIO prior to staining served as negative control. To exclude sources of NO other than the enzyme with NOS-like activity, the tissues were pretreated with 10 mM L-NAME (competitive inhibitor of animal NOS) and 10 mM aminoguanidine (irreversible inhibitor of animal forms of NOS) for 30 min before staining.

Digital image processing

The spatial distribution of the NO-positive signal within samples was studied by '2.5D' reconstructions from cross-section series in LCS Imaris 5.0.3. software (Bitplane, Switzerland).

Statistical analysis

The experimental data were analysed by the one-way analysis of variance mode of the commercial software Statistica CZ v.8.0. The homogeneity of experimental groups at individual time points was compared by *post hoc* analysis of the corresponding mean values by Fisher's least statistical difference procedure. The significantly different values at the 0.05 and 0.01 probability levels are marked in the figures by single and double asterisks, respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

The cooperation with Olympus C&S (Prague, Czech Republic) is gratefully acknowledged. This research was supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (MSM 6198959215).

REFERENCES

- Arasimowicz, M. and Floryszak-Wieczorek, J. (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.* **172**, 876–887.
- Bai, Y., van der Hulst, R., Bonnema, G., Marcel, T.C., Meijer-Deckens, F., Niks, R.E. and Lindhout, P. (2005) Tomato defense to *Oidium neolycopersia*: dominant *Oi* genes confer isolate-dependent resistance via a different mechanism than recessive *ol-2*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**, 354–362.
- Bennett, M., Mehta, M. and Grant, M. (2005) Biophoton imaging: a nondestructive method for assaying R gene responses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**, 95–102.
- Crawford, N.M., Galli, M., Tischner, R., Heimer, Y.M., Okamoto, M. and Mack, A. (2006) Response to Zemojtel *et al.*: plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci.* **11**, 526–527.
- De Gara, L., de Pinto, M.C. and Tommasi, F. (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 863–870.
- Delledonne, M., Murgia, I., Ederle, D., Sbicego, P., Biondani, A., Polverari, A. and Lamb, C. (2002) Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signalling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 605–610.
- Delledonne, M., Polverari, A. and Murgia, I. (2003) The functions of nitric oxide-mediated signalling and changes in gene expression during the hypersensitive response. *Antioxid. Redox Signal.* **5**, 33–41.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, **394**, 585–588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. and Lamb, C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13454–13459.
- Dixon, R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, **411**, 843–847.
- Durner, J. and Klessig, D.F. (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 369–374.

- Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10328–10333.
- Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz, M., Milczarek, G., Jelen, H. and Jackowiak, H. (2007) Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen. *New Phytol.* **175**, 718–730.
- Goldstein, S., Russo, A. and Samuni, A. (2003) Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with NO, NO₂ and O₂. *J. Biol. Chem.* **278**, 50949–50955.
- Gow, A.J., Luchsinger, B.P., Pawloski, J.R., Singel, D.J. and Stamler, J.S. (1999) The oxyhaemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9027–9032.
- Guo, F.G. (2006) Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: AtNOS1 is just the beginning. *Trends Plant Sci.* **11**, 527–528.
- Heil, M. and Ton, J. (2008) Long-distance signalling in plant defence. *Trends Plant Sci.* **13**, 264–272.
- Hevel, J.M. and Marletta, M.A. (1994) Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol.* **233**, 250–258.
- Huang, C.C., Hoefs-van de Putte, P.M., Haanstra-van der Meer, J.G., Meijer-Deckens, F. and Lindhout, P. (2000) Characterization and mapping of resistance to *Oidium lycopersicum* in two *Lycopersicon hirsutum* accessions: evidence for close linkage of two Ol-genes on chromosome 6 of tomato. *Heredity*, **85**, 511–520.
- Jourd'heuil, D., Jourd'heuil, F.L., Lowery, A.M., Hughes, J. and Grisham, M.B. (2005) Detection of nitrosothiols and other nitroso species *in vitro* and in cells. In: *Methods in Enzymology* (Packer, L. and Cadenas, E., eds), pp. 118–131. New York: Academic Press.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91(phox) subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell*, **10**, 255–266.
- Kiss, L., Cook, R.T.A., Saenz, G.S., Cunningham, J.H., Takamatsu, S., Pascoe, I., Bardin, M., Nicot, P.C., Sato, Y. and Rossman, Y. (2001) Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolyopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. *Mycol. Res.* **105**, 684–697.
- Lebeda, A. and Mieslerová, B. (1999) Identification, occurrence and host range of tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*) in the Czech Republic. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* **34**, 13–25.
- Li, C., Bonnema, A.B., Che, D., Dong, L., Lindhout, P., Visser, R.G.F. and Bai, Y. (2007) Biochemical and molecular mechanisms involved in monogenic resistance responses to tomato powdery mildew. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 1161–1172.
- Malolepsza, U. and Rozalska, S. (2005) Nitric oxide and hydrogen peroxide in tomato resistance. Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in o-hydroxyethylrutin-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 623–635.
- Mansfield, J. (2000) Antimicrobial compounds and resistance. In: *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* (Slusarenko, A.J., Fraser, R.S.S. and van Loon, L.C., eds), pp. 325–370. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Mieslerová, B., Lebeda, A. and Kennedy, R. (2004) Variation in *Oidium neolyopersici* development on host and non-host plant species and their tissue defence responses. *Ann. Appl. Biol.* **144**, 237–248.
- Mličková, K., Luhová, L., Lebeda, A., Mieslerová, B. and Peč, P. (2004) Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolyopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 753–761.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M., Magalhaes, J.R. and Salgado, I. (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett.* **579**, 3814–3820.
- Modolo, L.V., Cunha, F.Q., Braga, M.R. and Salgado, I. (2002) Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiol.* **130**, 1288–1297.
- Mur, L.A., Carver, T.L. and Prats, E. (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* **57**, 489–505.
- Mur, L.A., Santosa, I.E., Laarhoven, L.J., Holton, N.J., Harren, F.J. and Smith, A.R. (2005) Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars. *Plant Physiol.* **138**, 1247–1258.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H. and Prats, E. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* **59**, 501–520.
- Neill, S., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J. and Wilson, I. (2008) Nitric oxide evolution and perception. *J. Exp. Bot.* **59**, 25–35.
- Noritake, T., Kawakita, K., Doke, N. (1996) Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol.* **37**, 113–116.
- Noronhadutra, A.A., Epperlein, M.M. and Woolf, N. (1993) Reaction of nitric-oxide with hydrogen-peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing. *FEBS Lett.* **321**, 59–62.
- Orians, C.M., Pomerleau, J. and Ricco, R. (2000) Vascular architecture generates fine scale variation in systemic induction of proteinase inhibitors in tomato. *J. Chem. Ecol.* **26**, 471–485.
- Peña-Cortés, H., Fisahn, J. and Willmitzer, L. (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4106–4113.
- Petřiválský, M., Kočičová, J., Sedlářová, M., Piterková, J., Luhová, L. and Lebeda, A. (2007) On the role of nitric oxide in *Bremia lactucae* pathogenesis on *Lactuca sativa*. In: *Advances in Downy Mildew Research*, Vol. 3 (Lebeda, A. and Spencer-Phillips, P.T.N., eds), pp. 175–184. Olomouc and Kostelec na Hané, Czech Republic: Palacký University in Olomouc and JOLA.
- Planchet, E. and Kaiser, W.M. (2006a) Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *J. Exp. Bot.* **57**, 3043–3055.
- Planchet, E. and Kaiser, W.M. (2006b) Nitric oxide production in plants: facts and fictions. *Plant Signal. Behav.* **1**, 46–51.
- Planchet, E., Sonoda, M., Zeier, J. and Kaiser, W.M. (2006) Nitric oxide (NO) as an intermediate in the cryptogam induced hypersensitive response—a critical re-evaluation. *Plant Cell Environ.* **29**, 59–69.
- Prats, E., Carver, T.L.W. and Mur, L.A.J. (2008) Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus *Blumeria graminis*. *Res. Microbiol.* **159**, 476–480.

- Prats, E., Mur, L.A.J., Sanderson, R. and Carver, T.L.W. (2005) Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Mol. Plant Pathol.* **6**, 65–78.
- del Rio, L.A., Corpas, F.J. and Barroso, J. (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry*, **65**, 783–792.
- Saito, S., Yamamoto-Katou, A., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K. (2006) Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* **47**, 689–697.
- Song, F. and Goodman, R.M. (2001) Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signalling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **14**, 1458–1462.
- Stankovic, B. and Davies, E. (1998) The wound response in tomato involves rapid growth and electrical responses, systemically up-regulated transcription of proteinase inhibitor and calmodulin and down-regulated translation. *Plant Cell Physiol.* **39**, 268–274.
- Tada, Y., Mori, T., Shinogi, T., Yao, N., Takahashi, S., Betsuyaku, S., Sakamoto, M., Park, P., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and Mayama, S. (2004) Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **17**, 245–253.
- Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P. and Lebeda, A. (2006) Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolyopersicid*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **68**, 22–32.
- Vlot, A.C., Klessig, D. and Park, S.W. (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 436–442.
- Wang, J. and Higgins, V.J. (2005a) Nitric oxide modulates H₂O₂-mediated defenses in the *Colletotrichum coccodes*–tomato interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **67**, 131–137.
- Wang, J. and Higgins, V.J. (2005b) Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Gen. Biol.* **42**, 284–292.
- Wendehenne, D., Durner, J. and Klessig, D.F. (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 449–455.
- Wilson, I.D., Neill, S.J. and Hancock, J.T. (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* **31**, 622–631.
- Yoshioka, H., Bouteau, F. and Kawano, T. (2008) Discovery of oxidative burst in the field of plant immunity: looking back at the early pioneering works and towards the future development. *Plant Signal. Behav.* **3**, 153–155.
- Zaninotto, F., La Camera, S., Polverari, A. and Delledonne, M. (2006) Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol.* **141**, 379–383.
- Zemojtel, T., Frohlich, A., Palmieri, M.C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L.S., Wanker, E.E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P. and Durner, J. (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci.* **11**, 524–525.

PŘÍLOHA 3

Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp. - *Oidium neolycopersici* interactions

Jana Piterková, Jakub Hofman, Marek Petřivalský, Barbora Mieslerová,
Michaela Sedlářová, Aleš Lebeda and Lenka Luhová

Environmental and Experimental Botany

PŘÍLOHA 4

Influence of nitric oxide and reactive oxygen species on development of lettuce downy mildew in *Lactuca* spp.

Michaela Sedlářová, Marek Petřivalský, Jana Piterková, Lenka Luhová,
Jindra Kočířová and Aleš Lebeda

European Journal of Plant Pathology 128(1): v tisku (2010)

Influence of nitric oxide and reactive oxygen species on development of lettuce downy mildew in *Lactuca* spp.

Michaela Sedlářová^{1*}, Marek Petřivalský², Jana Piterková², Lenka Luhová², Jindra Kočířová², Aleš Lebeda¹

¹ Department of Botany, ² Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic

*Corresponding author:

Tel: +420 58 563 4804, Fax: +420 58 563 4824

E-mail: michaela.sedlarova@upol.cz (M. Sedlářová)

Running title

NO and ROS in *Bremia lactucae* pathogenesis

Keywords

Antioxidants . *Bremia lactucae* . *Lactuca sativa* . *Lactuca saligna* . *Lactuca virosa* . Oomycete . Oxidative stress . Quercetin . Rutin . Sodium nitroprusside

Abstract

The role of nitric oxide and reactive oxygen species, molecules indispensable for plant-pathogen signalling, was studied in the *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae* pathosystem. Using a leaf disc model the translaminal effect of various compounds affecting the metabolism was studied by light microscopy. Time course studies revealed a slowdown in the development of *B. lactucae* (race BL16) infection structures by rutin (scavenger of reactive nitrogen and hydrogen species) and SNP (NO donor) within 48 h post inoculation, followed by a retardation of sporulation. Application of the specific NO scavenger, PTIO, accelerated penetration of *B. lactucae* but had no further effects on the plant-pathogen interaction. Inhibitors of NO synthase (L-NAME) and nitrate reductase (sodium tungstate) did not influence pathogen development. Our results suggest that drastic change in the NO: hydrogen peroxide ratio seems to determine the pathogens' fate. NO synthase-like activity significantly increased early after *B. lactucae* challenge in resistant *L. virosa*. Confocal laser scanning microscopy revealed the accumulation of nitric oxide in the penetrated cells, pointing to a role in the initiation of the hypersensitive reaction. The tips of germ tubes and appressoria of *B. lactucae* also accumulated NO, also suggesting an essential role for this molecule in penetration of the biotrophic pathogen. Additionally, temporal changes in endogenous levels of rutin and quercetin in extracts from *Lactuca* spp. leaves will be discussed in connection to their role as part of the antioxidative machinery that influences the plants' susceptibility/resistance to lettuce downy mildew.

Abbreviations

DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate
hpi	hours post inoculation
HR	hypersensitive response
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine-methylester
NOS	nitric oxide synthase
NR	nitrate reductase
PTIO	2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide
PV	primary vesicle
ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
SNP	sodium nitroprusside
SD	standard deviation
SV	secondary vesicle

Introduction

Throughout their co-evolution, plants and pathogens have continually confronted each other in a struggle for growth and survival. Numerous components involved in pathogen perception, signal generation and transmission, and activation of defence responses have already been identified whilst others wait to be understood. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) rank among the crucial components of signalling pathways in stressed plants (Delledonne et al. 2001, 2002; De Gara et al. 2003; Wendehenne et al. 2004; Yoshioka et al. 2009; Zaninotto et al. 2006).

Nitric oxide (NO) is an essential regulatory molecule of plant immunity in synergy with reactive oxygen species (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek 2007). Induction of local biochemical defence responses in plant cells surrounding the infection site correlates with the accumulation of RNS. NO as a significant component of signalling networks is able to diffuse through membranes thanks to its hydrophobicity and small size (De Gara et al. 2003). The production of NO in plants was shown to be catalyzed by nitrate reductase (EC 1.7.1.1.) and nitric oxide synthase-like enzyme(s). However, the identity and structure of plant NO synthase has not been elucidated so far (Corpas et al. 2009; Wilson et al. 2008). NO can be also generated in plant cells by non-enzymatic processes like NO_2^- dismutation or reduction (Cooney et al. 1994; Stöhr and Ullrich 2002; Yamasaki 2000). In interactions with fungal pathogens *sensu lato* ROS and RNS are required for the initial signalling between both partners as well as for the activation of plant defence. Local generation of ROS is a typical feature of fungal pathogenesis, related to the active penetration of host cells (Sedlářová et al. 2007; Tománková et al. 2006). In resistant plants ROS and RNS modulate gene expression, induce structural defences or a local cell death, i.e. hypersensitive reaction (HR). Since the HR is accompanied by the generation of excess amounts of oxidative molecules, the fate of cells surrounding the infection site is determined by their ability to buffer this oxidative stress (Mur et al. 2008). Host cell collapse generally coincides with cessation of the attempted colonization, thus biotrophic pathogens must avoid triggering this process by, for example, elicitors released during cell wall penetration (Panstruga 2003). Additionally, ROS have direct antimicrobial effects (Shetty et al. 2008). The strategy of biotrophs may involve reduction of oxidative stress in the penetrated cell, e.g. by peroxidase production in the infection structures (Sedlářová et al. 2007). Antioxidant mechanisms involve specialized enzymes (superoxide dismutase (EC 1.15.1.1), peroxidase (EC 1.11.1.7) and catalase (EC 1.11.1.6)), as well as non-enzymatic systems (ascorbate, glutathion, α -tocopherol, β -caroten, phenolic compounds) (Blokchina et al. 2003; De Gara et al. 2003; Grace 2005).

Lettuce and its wild relative *Lactuca* spp. are threatened by *Bremia lactucae* infection that causes downy mildew with enormous economic losses in crop yield (Lebeda et al. 2002). Due to its high genotypic and phenotypic variability, this pathosystem is a widely used model to study plant-biotrophic oomycete interactions from field to molecular level (Lebeda et al. 2008a,b). The role of ROS and antioxidative enzymes in these interactions has been already shown (Sedlářová et al. 2007). An intensive accumulation of H_2O_2 early after inoculation was linked to race-specific resistance by initiation of HR, although variations in timing and intensity were found among genotypes. The tissues surrounding the HR showed an induction in antioxidative capacity, mainly due to an increased POX activity. This allowed the confinement of the HR cells with their excess in ROS. H_2O_2 and POX were also observed in *B. lactucae* infection structures during initial stages of the infection process (Sedlářová et al. 2007). Recently, accumulation of NO in germ tubes, appressoria and penetration pegs of powdery mildew, was proposed as an important determinant for successful invasion into host tissues (Piterková et al. 2009; Prats et al. 2008).

Our recent work describes the role of NO in the development of infection structures of downy mildew, *Bremia lactucae*, as well as in interacting host cells of *Lactuca* spp. The effect of external application of compounds modulating NO levels was studied in a series of experiments involving four *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae* interactions with differential phenotype of susceptibility or resistance.

Materials and methods

Pathogen isolate

The experiments were performed with *Bremia lactucae* Regel race BL 16 (sextet code EU-A63/31/02/00) from the collection of the Department of Botany, Palacký University in Olomouc, included in the Czech National Collection of Microorganisms (collection number UPOC-FUN-013). The isolate was maintained and multiplied on seedlings of susceptible lettuce, *L. sativa* (cv. Cobham Green or cv. British Hilde), grown as reported previously (Sedlářová et al. 2001, 2007).

Plant material and cultivation

Eight-week-old plants of *Lactuca* spp. genotypes with different phenotypes of response to *B. lactucae* (race BL16) were used: susceptible *L. sativa* L. (UCDM2) and resistant *L. sativa* L. (Mariska), *L. saligna* L. (CGN 05271) and *L. virosa* L. (NVRS 10.001 602). Histology of these plant genotype-pathogen race interactions has been described previously (Sedlářová et al. 2007). Plants were grown in a soil/peat (2:1, v/v) mixture in a growth chamber at 18/15 °C (day/night), 12 h photoperiod, irradiance of 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provided by warm-white fluorescent lamps. Following inoculation, the cultivation temperature was decreased to 15/10 °C and the plants were kept in dark during first 24 h to establish optimal conditions for pathogen development.

Inoculation, incubation and collection of samples

Whole plants/leaf discs were inoculated by spraying with a suspension of *B. lactucae* conidia in distilled water (approx. $5\times 10^5 \text{ ml}^{-1}$) and further incubation followed previously described procedures (Sedlářová et al. 2007). The 4th to 6th youngest leaves per plant were harvested 0, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 168 or 216 h post inoculation (hpi), and either subjected to histochemical staining followed by confocal microscopy or frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until enzyme activity or concentration of antioxidants was studied in the leaf extract.

For light microscopy experiments, leaf discs (12 mm in diameter), derived from 4th-6th youngest leaf of a plant, were placed abaxial side up on wet filter paper in Petri dishes and subsequently inoculated.

Modulation of NO levels

Most of the following chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Czech Republic, except the glycerol (Tanda, Czech Republic) and NO-specific probe (Axxora, U.S.A.).

Different NO level modulators were applied to the filter papers under the leaf tissues in Petri dishes. The filters were saturated with 10 ml of the solution to be tested. The final concentrations of the studied substances were 0.1 mM SNP (NO donor), 0.1 mM PTIO (NO scavenger), 0.1 mM rutin (NO/ROS scavenger), 1 mM L-NAME (NOS inhibitor), and 5 mM Na_2WO_4 (inhibitor of nitrate reductase). In case of enzyme inhibitors, the tissues were pre-incubated 1 h in vacuum prior to the inoculation, other variants were inoculated directly. The control leaf discs were incubated with deionised water. Leaf discs were collected 4, 8, 24 and 48 hpi. Each Petri dish contained five leaf discs from one plant for each time interval and three Petri dishes per solution variant were used, i.e. each sample contained 15 leaf discs.

Light microscopy of *B. lactucae* development and *Lactuca* spp. tissue reactions

Leaf discs were fixed in 100% acetic acid for 2 days and then transferred and stored in 85% glycerol. Prior to observation the specimens were stained with 1% Aniline Blue (w/v). Pathogen development and host tissue reactions were examined by light microscopy (Olympus BX-60) and documented with a CCD camera (Olympus DP70; Olympus C&S, Prague, Czech Republic). In each variant 5 leaf disc and 15 spores/infection sites per leaf disc were randomly evaluated. The results were expressed as a mean frequency and standard deviation for each substance and time interval.

Statistical analysis

For each genotype the effect of the treatment on pathogen development and tissue response was statistically analyzed using NCSS 2001 software (Kaysville, UT, U.S.A.). The frequency of infection structures or hypersensitive cells was analyzed by ANOVA applying the Tukey-Kramer multiple-comparison test. Significantly different mean values (at 0.05 level) were marked by asterisks in Figs. 2-5.

Localisation of NO production by confocal microscopy

Small pieces of *Lactuca* spp. leaf tissues were cut off plants or leaf discs incubated with either water or modulators of NO production, incubated in 20 μ M solution of DAF-FM DA (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate) (Axxora, U.S.A.) for 30 min, washed with buffer and mounted in 20 mM K-phosphate buffer (pH 7.0) on microscopic slides and subjected to confocal laser scanning microscopy (Olympus Fluorview 1000 attached to inverted microscope IX81). Excitation was provided by the 488 nm line of an argon ion laser; a 505-nm dichroic filter and 519-nm longpass emission filter were applied to detect the signal. The base intensity of lasers was set according to samples from uninoculated plants at the beginning of each experiment. Negative controls were pre-treated with NO scavenger (0.1 mM c-PTIO) or NO synthase inhibitor (10 mM L-NAME) for 30 min prior to staining. The positive control was pre-incubated with a NO generator (0.1 mM SNP) (Piterková et al. 2009).

Preparation of plant extracts

Frozen leaf tissues were homogenized (1:2; w/v) with ice-cold 20 mM HEPES buffer, (pH 7.5), containing 2 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 0.5% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) and 10% glycerol in a chilled mortar. Prior to homogenisation, 5 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM aprotinin and 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) were added to the extraction HEPES buffer. Leaf homogenates were centrifuged (16 000 \times g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) and supernatants immediately used for the determination of NO production.

Determination of NOS-like activity

NOS-like activity in plant extracts was determined spectrophotometrically by an oxyhemoglobin method based on the reaction of NO with oxyhemoglobin to yield methemoglobin and nitrate (Hevel and Marletta 1994) as previously described in tomato (Piterková et al. 2009). The reaction medium contained 10 μ M oxyhemoglobin, 1 mM L-Arg, 1 mM CaCl₂, 1 mM Mg²⁺, 1 μ M calmodulin, 140 μ M NADPH, 1 μ M FAD, 1 μ M FMN and 10 μ M tetrahydrobiopterin in 100 mM HEPES buffer, pH 7.5. Norvaline as a competitive inhibitor of potentially interfering arginase was added to give a final 1 mM concentration. Superoxide dismutase (50 U) and catalase (100 U) were added to prevent interference by O₂⁻ and/or H₂O₂. All measurements were performed at 37 $^{\circ}$ C and the absorbance was determined at λ = 401 nm on a microplate reader Synergy (Biotek, U.S.A.). The blank values were subtracted from all measured values (leaf extracts replaced by the same volume of buffer in the reaction mixture). For each variant, three measurements for each of the above mentioned three independent sets of samples were conducted, i.e. nine values were obtained. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD).

Rutin and quercetin content in leaves

Leaf samples were frozen in liquid nitrogen and lyophilised. Dried leaf samples were pulverized in a chilled mortar and transferred to plastic microtubes. Samples were extracted with 2 ml of 70% methanol by sonication (5 min) and incubation for 1h, followed by centrifugation (13000 \times g, 10 min, RT). Supernatants of methanol extracts were transferred to clean microtubes and evaporated at 40 $^{\circ}$ C under a nitrogen stream. Samples were analysed by HPLC (system Gold; Beckman, U.S.A.) on HS PEG column (150 \times 4 mm, 5 μ m, Supelco, U.S.A.), using isocratic elution with the mobile phase 50% methanol in 0.1 M formic acid at 30 $^{\circ}$ C. The retention time of rutin and quercetin was 2.1 and 6.8 min, respectively. The amount of rutin and quercetin in leaf extracts was quantified using a calibration set of commercial rutin and

quercetin standards. Results were expressed as molar concentration per dry weight and represent mean of 9 measurements and standard deviation.

Results

Development of *B. lactucae* infection structures and reaction of *Lactuca* spp. tissues

Germination and development of *Bremia lactucae* (race BL16) primary infection structures was studied on leaf discs incubated with solutions of compounds that influenced NO concentration within host tissues (Fig. 1). Pathogen spores usually germinate and form appressoria few hours after inoculation (Fig. 1a, b). Penetration of epidermal cell is followed by development of primary and secondary vesicles (Fig. 1c, e) and either 1/ further intercellular growth with abundant haustoria formation in susceptible host tissues (Fig. 1d); or 2/ cessation of pathogen growth in resistant plants often followed by hypersensitive reaction (Fig. 1f).

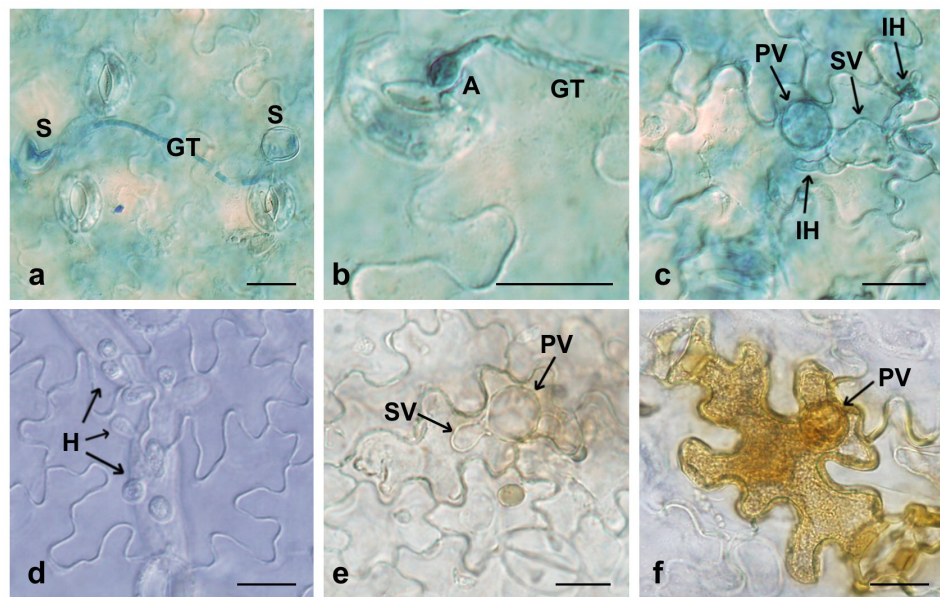


Fig. 1 Infection structures of *Bremia lactucae* (race BL16) and response of *Lactuca* spp. tissues. **a.** Germination. **b.** Detail of germ tube with appressorium on *L. virosa* (NVRS 10.001 602) 24 hpi. **c, d.** Epidermal cells of susceptible *L. sativa* (UCDM2) penetrated by: **c,** primary infection structures 24 hpi and **d,** haustoria 168 hpi. **e.** Onset of hypersensitive reaction in *L. saligna* (CGN 05271) 48 hpi. **f.** Late stage of hypersensitive reaction in *L. virosa* (NVRS 10.001 602) 48 hpi. Infection structures: spore (S), germ tube (GT), appressorium (A), primary vesicle (PV), secondary vesicle (SV), intracellular hypha (IH), haustorium (H). The bar corresponds to 20µm.

Pathogen germination on susceptible *L. sativa* (UCDM2) and resistant *L. sativa* (Mariska), *L. saligna* (CGN 05271) and *L. virosa* (NVRS 10.001 602) was recorded at 4 and 8 hpi (Fig. 2). Application of the NO donor SNP reduced conidial germination. Rutin had an even stronger inhibitory effect on germ tube formation in all genotypes, namely 4 hpi. Similarly, these compounds reduced the penetration rate in all genotypes from 8 hpi on (data not shown). The application of rutin had the opposite effect on *L. saligna*, where it intensified *B. lactucae* penetration 24 hpi (Fig. 3). The frequency of primary vesicles was increased in PTIO (a specific NO scavenger) - treated tissues, in all genotypes from 24 hpi (Fig. 3). The NOS inhibitor L-NAME and the NR inhibitor sodium tungstate had no significant effect on *B. lactucae* germination and primary vesicle development (Figs. 2, 3).

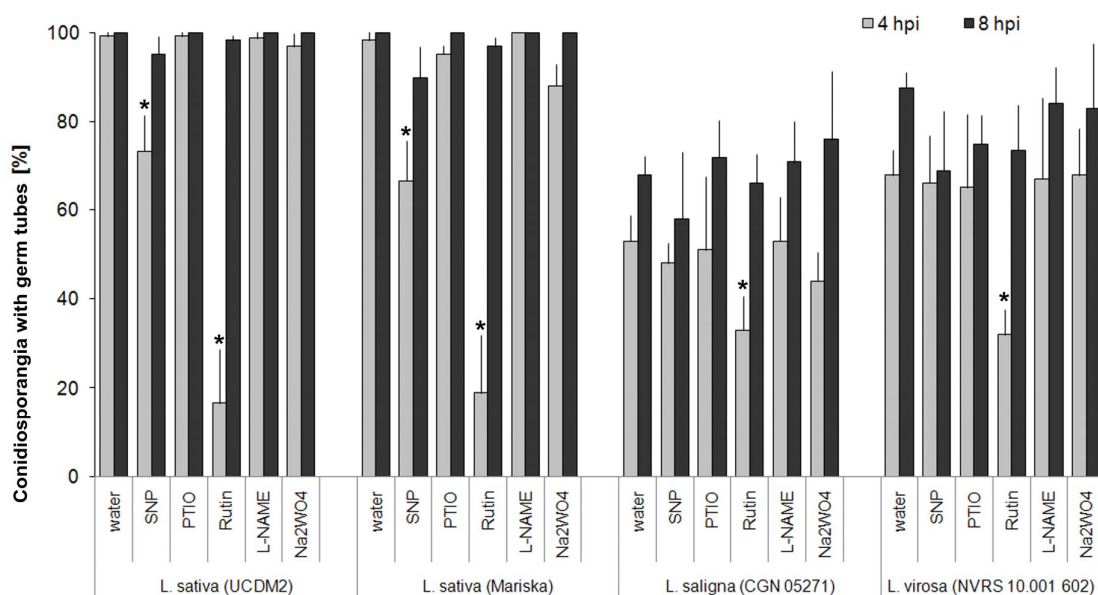


Fig. 2 Germination of *B. lactucae* (race BL16) conidiosporangia on leaf discs of *Lactuca sativa* (UCDM2, and Mariska), *L. saligna* (CGN 05271) and *L. virosa* (NVR5 10.001 602) incubated on distilled water (control) and solutions of substances modulating RNOS level (SNP, PTIO, rutin, L-NAME and sodium tungstate) 4 and 8 hpi. Data are given as mean \pm SD, n=15.

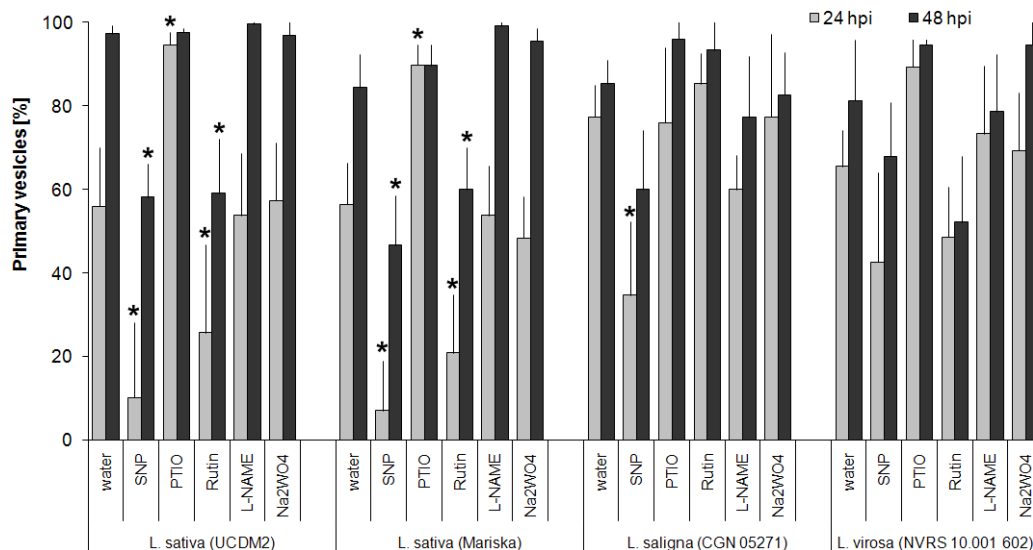


Fig. 3 Penetration rate of *B. lactucae* (race BL16), expressed as percentage of epidermal cells in contact with pathogen that contained primary vesicles. Leaf discs of *Lactuca sativa* (UCDM2, and Mariska), *L. saligna* (CGN 05271) and *L. virosa* (NVR5 10.001 602) incubated on distilled water (control) and solutions of substances modulating RNOS level (SNP, PTIO, rutin, L-NAME and sodium tungstate) are compared 24 and 48 hpi. Data are given as mean \pm SD, n=15.

Development of secondary vesicles was not affected by PTIO; all other compounds delayed growth and decreased frequency of secondary vesicles, especially in *L. sativa* genotypes (Fig. 4). The strongest effect was recorded for rutin and SNP both 24 and 48 hpi. Additionally,

variation in expression of HR (Fig. 1e, f) was evaluated by light microscopy in all samples. Significant differences were recorded only for *L. virosa* (NVRS 10.001 602) 48 hpi, as presented in Fig. 5. The proportion of infection sites with hypersensitively responding cells (Fig. 5a) was significantly lowered by application of SNP, PTIO, L-NAME and strongest by rutin. The average number of cells per HR (Fig. 5b) was increased by the enzyme inhibitors.

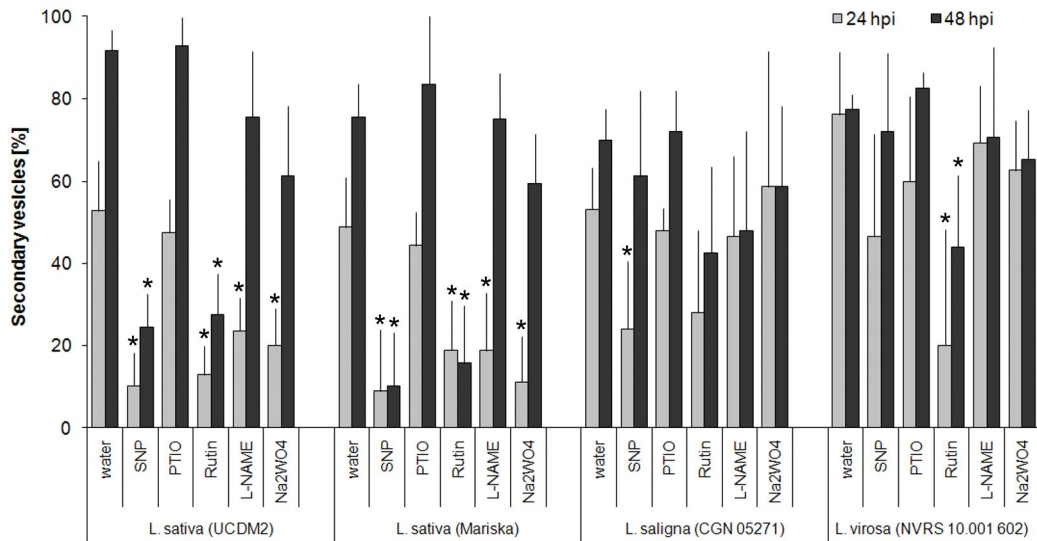


Fig. 4 Proportion of epidermal cells with developed secondary vesicle of *B. lactucae* (race BL16). Data recorded for leaf discs of *Lactuca sativa* (UCDM2, and Mariska), *L. saligna* (CGN 05271) and *L. virosa* (NVRS 10.001 602) incubated on distilled water (control) and solutions of substances modulating RNOS level (SNP, PTIO, rutin, L-NAME and sodium tungstate) are compared 24 and 48 hpi. Data are given as mean±SD, n=15.

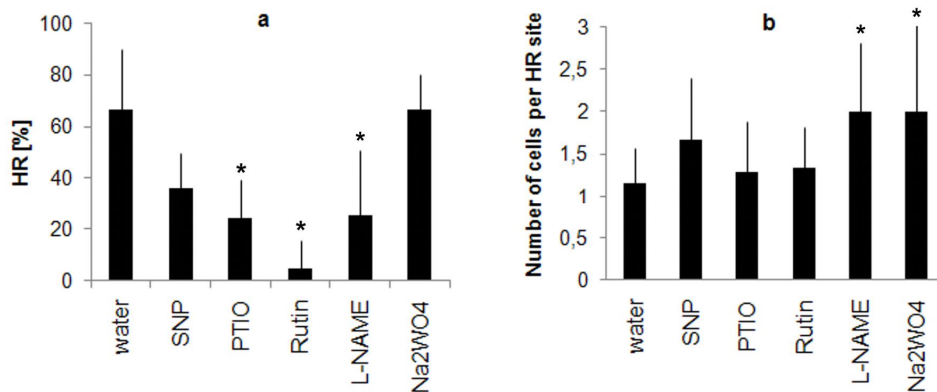


Fig. 5 *L. virosa* (NVRS 10.001 602)-*B. lactucae* (race BL16) interaction 48 hpi: **a**, proportion of infection sites with hypersensitive response of epidermal cells; **b**, average number of cells per HR. Leaf discs were incubated on distilled water (control) and solutions of substances modulating RNOS level (SNP, PTIO, rutin, L-NAME and sodium tungstate). Data are given as mean±SD, n=45.

Histochemical localization of NO in inoculated leaves

Localization of nitric oxide within tissues of *Lactuca* spp. and infection structures of *Bremia lactucae* (race BL16) was studied by confocal laser scanning microscopy following staining with the fluorescent probe DAF-FM DA (Fig. 6). Production of NO was observed in the

infection structures of *B. lactucae* grown both on susceptible and resistant genotypes, although these differed in timing of the pathogen development. An intensive signal in the tip of the germ tube and appressorium (Fig. 6a) indicates an essential role of the molecule in the process of pathogen infection structures growth and penetration. A weaker NO signal was detected also in developing primary and secondary vesicles (Fig. 6f), intracellular hyphae and in haustoria on susceptible *L. sativa* (UCDM2) (Fig. 6d). In *L. virosa* (NVRS 10.001 602), a genotype with an abundant hypersensitive response, NO was frequently localized in penetrated cells undergoing HR before occurrence of detectable necrosis (Fig. 6b, c).

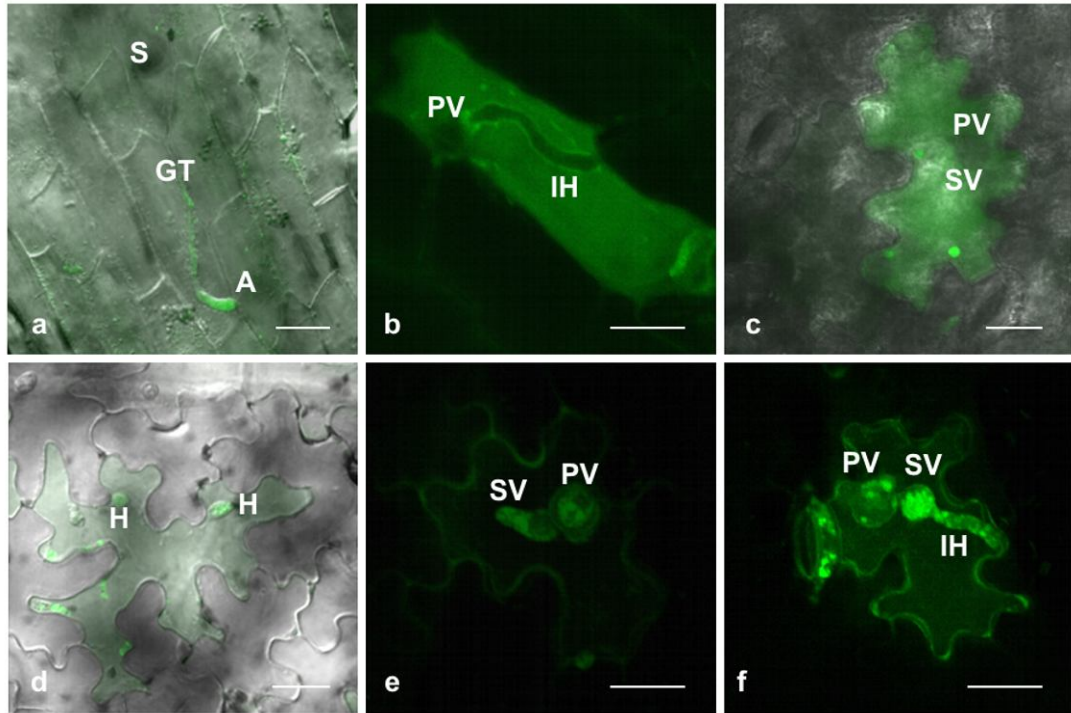


Fig. 6 Nitric oxide production in lettuce downy mildew and challenged host epidermal cells visualized by confocal laser scanning microscopy. **a.** During germination the signal for NO was detected in *B. lactucae* germ tubes and appressoria, *L. virosa* (NVRS 10.001 602) 24 hpi. **b, c.** In resistant genotypes NO accumulates in pre-necrotic cells 24hpi: **b.** *L. saligna* (CGN 05271); **c.** *L. virosa* (NVRS 10.001 602). **d.** Interestingly, signal for NO was found in epidermal cells of susceptible *L. sativa* (UCDM2) stressed by formation of pathogen haustoria 168 hpi. **e.** At late stages of infection the autofluorescence of infection structures within HR co-localized with **f.** a signal of NO-sensitive fluorescent dye DAF-FM DA, *L. virosa* (NVRS 10.001 602) 168 hpi. Infection structures: spore (S), germ tube (GT), appressorium (A), primary vesicle (PV), secondary vesicle (SV), intracellular hypha (IH), haustorium (H). Bar corresponds to 20µm.

Changes of NOS-like activity in leaves inoculated by *B. lactucae*

NOS-like activity was determined as L-arginine and NADPH-dependent NO production by the oxyhemoglobine method in extracts of 4th-6th youngest plant leaves during 216 hpi (Fig. 7). Four *Lactuca* spp. genotypes involved in our study were characterized by differential basal levels of NOS-like activity. The highest activity was found in non-infected plants of the resistant genotypes of *L. virosa* (NVRS 10.001 602) and *L. saligna* (CGN 05271) whereas almost no activity was detected in *L. sativa* genotypes 0 hpi (Fig. 7). Following inoculation, a rapid increase in NOS-like activity was recorded in *L. virosa* (NVRS 10.001 602), to 300% of constitutive level at 4 and 8 hpi. The activity rapidly decreased from 24 hpi to the level of uninoculated plants. The resistant *L. sativa* (Mariska) displayed an increased activity of NOS-like enzyme upon inoculation with a maximum between 48-168 hpi. On the other hand, the NOS-like activity in resistant *L. saligna* (CGN 05271) with reduced hypersensitivity moderately increased at 4 hpi but was lower again at later stages of infection process. Minor

fluctuation of NOS-like activity characterized also susceptible *L. sativa* (UCDM2), with moderate increase between 4-24 hpi and 72-216 hpi.

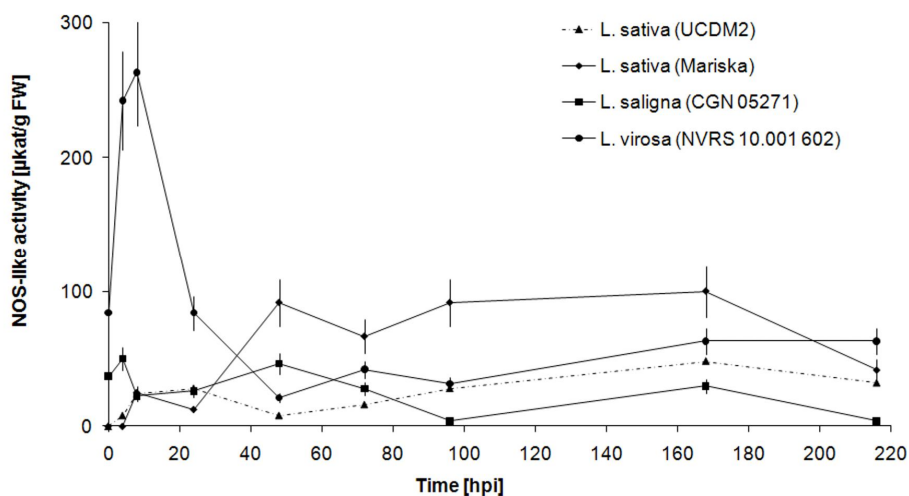


Fig. 7 Changes in NOS-like activity in leaves of *Lactuca* spp. plants infected with *B. lactucae* (BL 16) during 216 hpi. Data are given as mean±SD, n=9.

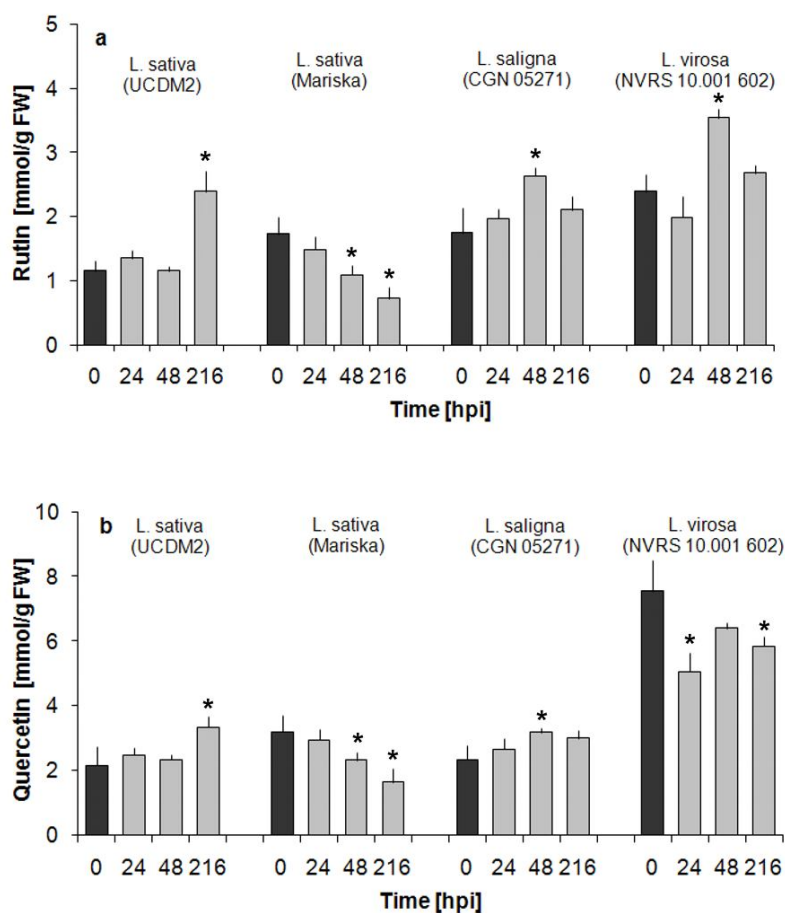


Fig. 8 Content of rutin (a) and quercetin (b) in leaf extracts from plants infected with *B. lactucae* (BL 16) during 216 hpi. Controls are non-infected plants 0 hpi (black column). Data are given as mean±SD, n=9.

Rutin and quercetin content in leaves

Contents of rutin and its aglycone form, flavonol quercetin, were determined by HPLC analysis in leaf extracts of *Lactuca* spp. plants during 216 h following inoculation by *B. lactucae*. The highest level of rutin and quercetin, 2.4 and 7.5 mmol/g FW, respectively, was detected in leaf tissues of *L. virosa* (Fig. 8). Rutin content decreased 24 hpi, however, increased during 48-216 hpi. Susceptible *L. sativa* (UCDM2) was characterized by rather low constitutive level of both compounds which increased at late stages of infection, 216 hpi. During pathogenesis of *B. lactucae* on resistant *L. sativa* (Mariska) the content of both substances gradually decreased to approx. 50% amount at 216 hpi. Intermediate levels of rutin and quercetin were found in intact tissues of *L. saligna* (CGN 05271) which increased in infected plants starting at 24 hpi and peaking at 48 hpi (Fig. 8).

Discussion

Histological and biochemical features of the *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae* interaction, a model plant-biotrophic oomycete pathosystems, have been studied intensively in our laboratory for two decades (Lebeda et al. 2001, 2002, 2008b). It is a well accepted fact that spore germination of the pathogen isolates reaches the highest rate on genotypes of the original host plant species (e.g. Sedlářová et al. 2001). Thus, in the present study almost 100% of the conidiosporangia of *B. lactucae* (race BL16) germinated on lettuce leaf tissues (cvs. UCDM2 and Mariska), whereas on wild *Lactuca* spp. plants, *L. saligna* (CGN 05271) and *L. virosa* (NVRs 10.001 602), the number was reduced to approx. 60%. *B. lactucae* germ tubes also had a reduced length on the wild *Lactuca* spp. compared to *L. sativa* genotypes and the interspecific breeding lines (Lebeda and Pink 1998), and significant differences in the length of germ tubes between seedlings and adult plants of *L. sativa* were described (Lebeda and Reinink 1991). This can be explained by leaf surface characteristics (composition of waxes, abundance of trichomes) that modify attachment of spores and shorten water availability for their germination (Lebeda et al. 2001).

Although oxidative processes are considered as vital for plant resistance, including *Lactuca* spp. (reviewed in Lebeda et al. 2008b), the importance of NO and ROS for oomycete pathogenesis has not been reported in detail yet. In previous work (Petřivalský et al. 2007) we found that the processes localized outside of the leaves, e.g. germination and appressoria formation are affected by the compounds infiltrated into leaves to a limited extent. Here, we report that the number of germ tubes was significantly decreased only in tissues treated with rutin 4 hpi. During penetration, the local concentrations of NO and ROS change due to a release by both pathogen infection structures and host cells. Application of a NO donor or a strong antioxidant (rutin) reduced the development of primary as well as secondary vesicles. The only exception was an increase of the downy mildew penetration rate in *L. saligna* upon rutin treatment. On the opposite, lower NO concentrations after PTIO application led to an increase in frequency of primary vesicles.

The response of the individual lettuce genotypes to *B. lactucae* (race BL16) infection was reported in a previous study (Sedlářová et al. 2001), where initiation of the HR was shown to correlate with pathogen developmental stages rather than with real time of pathogenesis. Here we show that application of NO level modulators mainly altered the response of plant genotypes with a pronounced HR response, i.e. *L. virosa* (NVRs 10.001 602). NO level modulators lowered the proportion of infection sites with HR but had only a minor effect on the extent of the HR (Fig. 5). The synergistic action of NO and H₂O₂ is believed to orchestrate the HR and restrict pathogen invasion (Zaninotto et al. 2006), although the interactions between NO and ROS are still a matter of discussion (Delledonne et al. 2003; Wilson et al. 2008). Interaction of NO and H₂O₂ leads to the production of either highly reactive singlet oxygen or hydroxyl radicals, both of which can induce the processes of cell death. Reaction of NO with O₂⁻ leads to the formation of a strong oxidant compound, peroxynitrite (ONOO⁻; Saito et al. 2006). Accumulation of superoxide has not been recorded in the *Lactuca* spp.-*B. lactucae* interactions, however, H₂O₂ production colocalizes with NO (Sedlářová et al. 2007). Excess amounts of antioxidant, in the form of rutin solution applied to leaf tissues, diminished the HR in *L. virosa* and concurrently retarded pathogen growth. A spectrum of methodological approaches to study NO is available although the specificity of some is not yet clear (Miller and Chang 2007;

Vandelle and Delledonne 2008). We localized NO in the infected cells of resistant *Lactuca* spp. before expression of symptoms as visualized by DAF FM-DA staining (Fig. 6b-d) which is in agreement with previous experiments based on application of the most sensitive assays (reviewed by Mur et al. 2006). This early NO burst has been reported to precede H₂O₂ generation, and in a plant-powdery mildew model it occurred about 6 h before the first visible signs of cell death (Mur et al. 2006). There are indications that NO can affect the generation of ROS, which are closely associated with the HR in plants. Zeier et al. (2004) demonstrated that the pathogen-challenged nitric oxide dioxygenase transgenic lines of *Arabidopsis* exhibited not only reduced NO generation, but also a reduced oxidative burst (decreased H₂O₂ levels) and a blockage of phenylalanine ammonia lyase expression in incompatible interactions with *Pseudomonas syringae*. Interestingly, NO can influence apoptosis at many points and can be either pro- or anti-apoptotic. In plants, there have also been reports of NO suppressing cell death (Bethke et al. 2004). The relative concentrations of particular ROS and NO appear to be vital in the initiation or suppression in cell death. Our results confirm the need for NO in plant race-specific defence to oomycetes. However, no activation of host NO production has been found in interactions between animals and pathogenic oomycetes (Phillips et al. 2008).

Recently, a special emphasis has been put on approaches taking into account the life strategy of pathogens because huge differences exist in pathogen biology, physiology, toxicology and the reactions of host plants (Glazebrook 2005). Nitric oxide was shown to participate not only in plant resistance to biotrophic pathogens but also to necrotrophs. NO and oxidative bursts were induced during compatible interaction of *Nicotiana benthamiana* with the necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. NO was shown to play a pivotal role also in basal defence against *B. cinerea* and *PR-1* gene expression in *N. benthamiana*. By contrast, ROS had a negative function in resistance, i.e. had a positive role in expansion of disease lesions during the *B. cinerea*-*N. benthamiana* interaction (Asai and Yoshioka 2009).

Both partners in plant-fungus interactions have been shown to produce NO (Mur et al. 2006; Prats et al. 2008), thus, we expected a similar phenomenon in oomycete pathogenesis. Our experiments showed a strong signal for NO in the apical parts of *B. lactucae* mycelium, tips of germ tubes and appressoria, which is prerequisite for penetration (Fig. 6a). In compatible interactions NO was detected also in haustoria (Fig. 6d) which indicates an involvement of NO in pathogen development. Sources of NO in oomycetes have not been studied but the presence of an enzyme similar to NOS is highly probable. Nevertheless, one methodological aspect of our work may be a matter of discussion. We are aware that we measured NOS-like activity in extracts of infected leaves that covers the enzyme activity from both organisms. However, *B. lactucae* is biotrophic endoparasite which makes its cultivation or detachment off infected tissues impossible (Lebeda et al. 2008b). Thus, we presume that application of constant inoculum concentration and standard cultivation conditions diminished the variation among genotypes. On the other hand, the influence of pathogen-derived enzyme activity might increase with increasing pathogen biomass during infection, especially in the susceptible genotype *L. sativa* (UCDM2) or the resistant *L. saligna* (CGN 05271), where *B. lactucae* (BL16) is arrested at later stages of development (Sedlářová et al. 2001). However, tissue and cell responses of non-host resistance of *L. saligna* accessions (Lebeda et al. 2001, 2002) are different from race-specific and field resistance of *L. sativa* (Lebeda and Reinink 1994). In *L. saligna* (CGN 05271) at 48 hpi significantly lower frequencies of hyphae and haustorium formation were observed, however, higher a frequency of HR in infection sites, in comparison with susceptible *L. sativa* (Lebeda and Reinink 1994). Nevertheless, there is also a large variation in formation and development of infection structures and tissue response in different accessions of *L. saligna* (Lebeda and Pink 1998; Lebeda and Reinink 1994; Lebeda et al. 2006) showing delicate differences in metabolic pathways (including ROS and RNS metabolism) in individual host genotype-pathogen race interactions (Sedlářová et al. 2007) primarily due to the genetic background of these interactions (Zhang et al. 2009).

Our results suggest that plants use multiple ways for the synthesis of NO, the critical molecule in plant-pathogen communication. Nitric oxide (NO) is a highly diffusible and short-lived physiological messenger. Despite its diffusible nature, NO modifies thiol groups of specific cysteine residues in target proteins and alters protein function via S-nitrosylation.

Tyrosine nitration of proteins by NO was recently reported to be increased in susceptible but not in the resistant cultivar of sunflower following downy mildew (*Plasmopara halstedii*) infection. Therefore, post-translational protein modifications were proposed as a marker of nitrosative stress in the plant–pathogen interaction (Chaki et al. 2009).

External application of rutin had a striking impact on *B. lactucae* development so we analyzed the *in planta* concentrations among *Lactuca* spp. genotypes. Rutin, a plant flavonoid glycoside with antioxidant properties utilized in human medicine, is composed of flavonol quercetin and the disaccharide rutinose. Rutin helps to maintain levels of the biological antioxidant reduced glutathione. Importantly, following nitrosation, both molecules may become pro-oxidants (Laughton et al. 1989). Only minor increases in levels of both rutin and quercetin in *L. saligna* tissues were recorded. Generally, there is no need to overstimulate the antioxidant machinery in this genotype characterized by reduction of downy mildew without large expression of HR (Lebeda and Pink 1998; Lebeda and Reinink 1994; Sedlářová et al. 2001). On the opposite, *L. virosa* is generally showing a high proportion of infection sites with HR (Lebeda and Pink 1998; Lebeda et al. 2006), expressed also phenotypically as tissue necrosis (Lebeda et al. 2002; Norwood et al. 1981). Tissues of this species are rich in both rutin and quercetin as there is a necessity to protect tissue surrounding HR cells. Higher levels of both antioxidants were found in the resistant cv. Mariska that decreased during the course of downy mildew infection. In the susceptible cv. UCDM2, an increase was found very late after inoculation (216 hpi), probably induced in order to buffer oxidative stress linked to *B. lactucae* intercellular growth. Our results show evidence for a dual (dose-dependent and balanced) role of NO and ROS in this host-pathogen interaction, summarized as follows. In *L. virosa* (NVRS 10.001 602) high levels of rutin together with phenolic acids (Grúz and Sedlářová, unpublished), and peroxidase activity (Sedlářová et al. 2007) are important components of resistance mechanisms that buffer oxidative molecules released in relation to: 1/ *B. lactucae* penetration of epidermal cells to limit formation of infection structures; 2/ the onset of HR following *B. lactucae* recognition in the cytoplasm. Intensive hydrogen peroxide release in *L. virosa* leads to HR which often involves more than one cell from not only epidermal but also mesophyll tissue, in comparison to other resistant *Lactuca* spp. genotypes (Lebeda and Pink 1998; Lebeda et al. 2006; Sedlářová et al. 2001). On the other hand, still little is known about the physiology and biochemistry of resistance mechanisms of *L. saligna* to downy mildew, which is primarily characterized by limited HR (Lebeda and Reinink 1994; Lebeda et al. 2001, 2002) and minor changes in all of parameters investigated so far (Sedlářová et al. 2007; this paper). However, recent genetic investigations suggest that non-host resistance in *L. saligna* is the results of cumulative effects of many QTLs (at least 15) differentially operating at various developmental stages (Zhang et al. 2009). This is also supporting our recent biochemical data and their variation.

In many plants, resistance has been associated with a higher activity of antioxidant enzymes (peroxidase, catalase, superoxidismutase) or antioxidant substances (Bolwell and Daudi 2009). However, there is no such direct link between any of the above-mentioned traits and susceptibility/resistance in *Lactuca* spp.-*B. lactucae*. Lettuce genotypes differ from other wild relative *Lactuca* spp. in many physiological features (Lebeda et al. 2008b). These differences demand further detailed study of specific host-pathogen interactions and various developmental stages. HR-based resistance in *L. virosa* as well as non-HR resistance in *L. saligna* is promising alternatives to be utilized in lettuce resistance breeding (Lebeda et al. 2009).

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Mrs. Danuše Krátká and M.A. Iveta Hnízdová for proceeding of light microscopy samples, and Dr. Brigitte Mauch-Mani (Université de Neuchâtel, Switzerland) for critical reading of the manuscript. Provision of *Lactuca virosa* seeds by Prof. D. A. C. Pink (Warwick HRI, Warwick University, U.K.) as well as cooperation with Olympus Czech Group (Prague, Czech Republic) is gratefully acknowledged. The work was financed by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (grants No. MSM 6198959215 and 2E08018).

References

- Arasimowicz, M., & Floryszak-Wieczorek, J. (2007). Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, *172*, 876–887.
- Asai, S., & Yoshioka, H. (2009). Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *22*, 619–629.
- Bethke, P. C., Badger, M. R., & Jones, R. L. (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, *16*, 332–341.
- Bolwell, G. P., & Daudi, A. (2009). Reactive oxygen species in plant–pathogen interactions. In L. A. del Río, & A. Puppo (Eds.), *Reactive oxygen species in plant signalling* (pp. 113–133). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, *91*, 179–194.
- Chaki, M., Fernández-Ocaña, A. M., Valderrama, R., Carreras, A., Esteban, F. J., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M. V., Begara-Morales, J. C., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2009). Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower–mildew interaction. *Plant and Cell Physiology*, *50*, 665–679.
- Cooney, R. V., Harwood, P. J., Custer, L. J., & Franke, A. A. (1994). Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives*, *102*, 460–462.
- Corpas, F. J., Hayashi, M., Mano, S., Nishimura, M., & Barroso, J. B. (2009). Peroxisomes are required for *in vivo* nitric oxide (NO) accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology*, doi: 10.1104/pp.109.146100
- De Gara, L., de Pinto, M. C., & Tommasi, F. (2003). The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, *41*, 863–870.
- Delledonne, M., Murgia, I., Ederle, D., Sbicego, P., Biondani, A., Polverari, A., & Lamb, C. (2002). Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signalling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiology and Biochemistry*, *40*, 605–610.
- Delledonne, M., Polverari, A., & Murgia, I. (2003). The functions of nitric oxide-mediated signalling and changes in gene expression during the hypersensitive response. *Antioxidants and Redox Signalling*, *5*, 33–41.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., & Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*, 13454–13459.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *43*, 205–227.
- Grace, S. C. (2005). Phenolics as antioxidants. In N. Smirnoff (Ed.), *Antioxidants and reactive oxygen species in plants* (pp. 141–168). Oxford: Blackwell Scientific Publishers.
- Hevel, J. M., & Marletta, M. A. (1994). Nitric-oxide synthase assays. *Methods in Enzymology*, *233*, 250–258.
- Laughton, M. J., Halliwell, B., Evans, P. J., Robin J., & Hoult, S. (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical Pharmacology*, *38*, 2859–2865.
- Lebeda, A., Doležalová, I., Křístková, E., Kitner, M., Petřelová, I., Mieslerová, B., & Novotná, A. (2009). Wild *Lactuca* germplasm for lettuce breeding: current status, gaps and challenges. *Euphytica*, *170*, 15–34.
- Lebeda, A., Petřelová, I., & Maryška, Z. (2008a). Structure and variation in the wild-plant pathosystem: *Lactuca serriola*-*Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology*, *122*, 127–146.
- Lebeda, A., Pink, D. A. C., & Astley, D. (2002). Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). In P. T. N. Spencer-Phillips, U. Gisi, & A. Lebeda (Eds.), *Advances in downy mildew research* (pp. 85–117). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Lebeda, A., & Pink, D. A. C. (1998). Histological aspects of the response of wild *Lactuca* spp. and their hybrids, with *L. sativa* to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). *Plant Pathology*, *47*, 723–736.
- Lebeda, A., Pink, D. A. C., & Mieslerová, B. (2001). Host-parasite specificity and defense variability in the *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae* pathosystem. *Journal of Plant Pathology*, *83*, 25–35.
- Lebeda, A., & Reinink, K. (1991). Variation in the early development of *Bremia lactucae* on lettuce cultivars with different levels of field resistance. *Plant Pathology*, *40*, 232–237.
- Lebeda, A., Sedlářová, M., Petřivalský, M., & Prokopová, J. (2008b). Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: A case study of *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology*, *122*, 71–89.
- Lebeda, A., Sedlářová, M., Lynn, J., & Pink, D. A. C. (2006). Phenotypic and histological expression of different genetic backgrounds in interactions between lettuce, wild *Lactuca* spp., *L. sativa* × *L. serriola* hybrids and *Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology*, *115*, 431–441.
- Miller, E. W., & Chang, C. J. (2007). Fluorescent probes for nitric oxide and hydrogen peroxide in cell signalling. *Current Opinion in Chemical Biology*, *11*, 620–625.
- Mur, L. A. J., Carver, T. L., & Prats, E. (2006). NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, *57*, 489–505.
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., & Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, *59*, 501–520.
- Norwood, J. M., Crute, I. R., & Lebeda, A. (1981). The location and characteristics of novel sources of resistance to *Bremia lactucae* Regel (Downy mildew) in wild *Lactuca* L. species. *Euphytica*, *30*, 659–668.

- Panstruga, R. (2003). Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 320–326.
- Petřivalský, M., Kočířová, J., Sedlářová, M., Piterková, J., Luhová, L., & Lebeda, A. (2007). On the role of nitric oxide in *Bremia lactucae* pathogenesis on *Lactuca sativa*. In A. Lebeda, & P. T. N. Spencer-Phillips (Eds.), *Advances in downy mildew research, Vol. 3* (pp. 175–184). Olomouc and Kostelec na Hané, Czech Republic: Palacký University in Olomouc and JOLA Publishers.
- Piterková, J., Petřivalský, M., Luhová, L., Mieslerová, B., Sedlářová, M., & Lebeda, A. (2009). Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Molecular Plant Pathology*, 10, 501–513.
- Phillips, A. J., Anderson, V. L., Robertson, E. J., Secombes, C. J., & van West, P. (2008). New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology*, 16, 13–19.
- Prats, E., Carver, T. L. W., & Mur, L. A. J. (2008). Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus *Blumeria graminis*. *Research in Microbiology*, 159, 476–480.
- Saito, S., Yamamoto-Katou, A., Yoshioka, H., Doke, N., & Kawakita, K. (2006). Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiology*, 47, 689–697.
- Sedlářová, M., Lebeda, A., & Pink, D. A. C. (2001). The early stages of interaction between effective and non-effective race-specific genes in *Lactuca sativa*, wild *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae* (race NL16). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 108, 477–489.
- Sedlářová, M., Luhová, L., Petřivalský, M., & Lebeda, A. (2007). Localization and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 607–616.
- Shetty, N. P., Jørgensen, H. J. L., Jensen, J. D., Collinge, D. B., & Shetty, H. S. (2008). Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 267–280.
- Stöhr, C., & Ullrich, W. R. (2002). Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany*, 53, 2293–2303.
- Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P., & Lebeda, A. (2006). Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in interaction *Lycopersicon* spp.-*Oidium neolycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68, 22–32.
- Vandelle, E., & Delledonne, M. (2008). Methods for nitric oxide detection during plant–pathogen interactions. *Methods in Enzymology*, 437, 573–592.
- Wendehenne, D., Durner, J., & Klessig, D. F. (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 449–455.
- Wilson, I. D., Neill, S. J., & Hancock, J. T. (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment*, 31, 622–631.
- Yamasaki, H. (2000). Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355, 1477–1488.
- Yoshioka, H., Asai, S., Yoshioka, M., & Kobayashi, M. (2009). Molecular mechanisms of generation for nitric oxide and reactive oxygen species, and role of the radical burst in plant immunity. *Molecules and Cells*, 28, 321–329.
- Zaninotto, F., La Camera, S., Polverari, A., & Delledonne, M. (2006). Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiology*, 141, 379–383.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M., & Lamb, C. (2004). Genetic elucidation of nitric oxide signalling in incompatible plant–pathogen interactions. *Plant Physiology*, 136, 2875–2888.
- Zhang, N. W., Lindhout, P., Niks, R. E., Jeuken, M. J. W. (2009). Genetic dissection of *Lactuca saligna* nonhost resistance to downy mildew at various lettuce developmental stages. *Plant Pathology*, 58, 923–932.

5. Kombinace teplotního stresu a patogeneze

Na rostliny často působí současně různé abiotické a biotické stresové faktory. Jedním z nejdůležitějších vnějších fyzikálních faktorů ovlivňujících vývoj a růst rostlin je teplotní a chladový stres. Vystavení rostlin těmto stresovým podmínkám vede ke zvýšení tvorby reaktivních forem kyslíku a dusíku. Důsledkem vystavení rostlin chladovému stresu je zpomalení metabolismu, a modifikace membránových lipidů a dalších důležitých molekul. Za chladných a mrazivých podmínek byla také pozorována změna exprese některých genů a detekována syntéza nových proteinů zahrnutých v rezistenci rostlin vůči těmto stresům (Foyer *et al.*, 2002; Thomashow, 1999).

Teplotní stres spolu s dalšími stresy způsobuje denaturaci nebo agregaci proteinů vedoucí až k buněčné smrti a indukuje zvýšenou expresi "heat shock" proteinů (Hsp) (Lindquist & Craig, 1988; Parsell & Lindquist, 1993). Většina Hsp je v živých organismech přítomna konstitutivně. Zvýšenou produkci Hsp indukují různé podněty, např. přírodní nebo stresové podmínky (vysoké teploty, těžké kovy nebo detergenty) nebo patofyziologické podmínky (virová infekce). U vyšších rostlin je produkce Hsp indukovaná teplotami kolem 38 – 40 °C (Iba, 2002). Heat shock proteiny, jejichž zvýšená produkce je charakteristická pro teplotně stresované organismy, působí v regulaci membránové fluidity a homeostáze proteinů a v ochraně před buněčnou smrtí (Parsell & Lindquist, 1993). Hsp fungují jako molekulární chaperony, které jsou důležité pro správné posttranslační složení proteinů, a stimulují opravné mechanismy. Spolu s Hsp jsou v rostlinné obranné reakci na teplotní stress exprimovány také LEA proteiny, dehydriny a ubiquitin (Huang & Xu, 2008). Vysoká teplota u rostlin indukuje oxidativní stress jako důsledek akumulace ROS a RNS (Larkindale & Knight 2002; Vacca *et al.*, 2004). Vyšší obsah NO byl pozorován v buňkách listů tabáku vystaveného vysoké teplotě (Gould *et al.*, 2003). Vliv krátkodobého teplotního stresu na zvýšenou produkci NO byl také zaznamenán u vojtěšky (Leshem, 2001). Byla navržena role NO jakožto signální molekuly aktivující obranný antioxidační systém v obraně rostlin vůči oxidativnímu stresu vyvolanému teplotním stresem (Song *et al.*, 2006).

Hsp jsou klasifikovány do pěti tříd na základě jejich molekulové hmotnosti: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 a nízkomolekulární Hsp (Becker & Craig, 1994; Raška & Weigl, 2005; Wang *et al.*, 2004). Hsp70 patří mezi jedny z nejdůležitějších stresových proteinů indukovaných teplotním stresem, hrají totiž roli v ochraně proteinů před agregací, jsou zapojeny do skládání proteinů a tvorby jejich nativní konformace. Hsp70 se účastní transportních procesů, usnadňují proteolytickou degradaci nestabilních proteinů jejich nasměrováním do lysosomů nebo proteasomů (Frydman, 2001; Hartl, 1996; Iba, 2002). Řada proteinů Hsp70 rodiny je zapojena do transportu a translokace proteinů do chloroplastů a mitochondrií (Huang *et al.*, 1999; Zhang & Glaser, 2002) a do mezibuněčného přenosu proteinů přes plasmodesmata (Aoki *et al.*, 2002).

5.1 Výsledky

Výsledky jsou detailně prezentovány formou článku, který tvoří přílohu 5.

Druhý tématický projekt řeší problematiku reakce rostlin vystavených působení současnému, případně následnému vlivu různých stresových faktorů. Po vystavení genotypů *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. chmielewskii* krátkodobému působení teplotního stresu byly rostliny, případně listové disky inokulovány patogenem *O. neolycopersici*. Zaměřili jsme se na detekci vlivu teplotního stresu a patogenezu na produkci signálních molekul NO a H₂O₂ a Hsp70. Dále byl studován vliv modulátorů koncentrace ROS a RNS na reakci rostlin (produkci Hsp) vystavených působení daných stresových faktorů. Získané výsledky byly sepsány formou článku a jsou připraveny k odeslání do redakce (viz. Příloha 5).

Experimenty byly provedeny na listových discích na základě metodických postupů realizovaných ve fytopatologických laboratořích, umožňujících aplikaci testovaných látek k listovému pletivu. Vliv mechanického poškození pletiva při přípravě listových disků byl testován v experimentu porovnávacím produkci Hsp70 po aplikaci krátkodobého teplotního stresu u intaktních rostlin a listových disků. V případě listových disků byl detekován nárůst produkce Hsp70 jako důsledek mechanického poškození rostlinného pletiva. Po aplikaci teplotního stresu byl zaznamenán další významný nárůst produkce Hsp70. Metodou Western blot byl prokázán vliv abiotického stresu, biotického stresu a jejich kombinace a regulační vliv koncentrace ROS a RNS na expresi Hsp70. Během experimentu byly detekovány dva proteiny Hsp70 rodiny lišící se molekulovou hmotností: teplotně-inducibilní protein Hsp72 a konstitutivně exprimovaný protein Hsp75. Vlivem mechanického poškození a patogenezu docházelo ke zvýšení exprese Hsp75, teplotní stres aktivoval zejména produkci Hsp72. Byla nalezena korelace mezi působením ROS a RNS a expresí Hsp70.

PŘÍLOHA 5

Nitric oxide influences Hsp70 accumulation in tomato leaves in response to mechanical injury, heat shock and pathogen infection

Jana Piterková, Zuzana Matulková, Lenka Luhová, Barbora Mieslerová and
Marek Petřivalský

Plant Cell and Environment

6. Studium úlohy reaktivních forem kyslíku a dusíku při regeneraci protoplastů a obranné reakci vyvolané působením těžkých kovů

Protoplast je rostlinná buňka zbavená buněčné stěny. Protoplasty mohou být izolovány mechanicky nebo enzymaticky (Davey *et al.*, 2005; Navrátilová, 2004). K enzymatické degradaci buněčné stěny slouží zejména celulasy (EC 3.2.1.4) a hemicelulasy (EC 3.1.1.73), které rozruší vlastní buněčnou stěnu, a pektinasy (EC 3.2.1.15) zajišťující rozpuštění střední lamely a tím rozpad pletiva na jednotlivé buňky (Davey *et al.*, 2005; Navrátilová, 2004). K izolaci protoplastů lze použít také macerozym R-10 (směs pektinasy, celulasy a hemicelulasy) (Navrátilová, 2004) a driselasu (EC 3.2.1.23) (Gajdová *et al.*, 2007). Protoplasty je možno izolovat z různých rostlinných pletiv a orgánů, všechny buňky v rostlinném organismu jsou totipotentní. Nejvhodnějším zdrojem buněk pro protoplastové kultury jsou však málo diferenciované buňky, např. embryonální nebo meristematické (Petřek *et al.*, 2006; Davey *et al.*, 2005). Úspěšnost izolace protoplastů je ovlivněna řadou faktorů. Patří mezi ně např. rostlinný materiál (druh, kultivar) a jeho fyziologický stav, teplota, složení enzymatických směsí, doba působení enzymů, pH a osmotické podmínky během izolace (Navrátilová, 2004; Davey *et al.*, 2005). Proces regenerace rostlin z izolovaných protoplastů zahrnuje tři na sebe navazující fáze: fáze iniciační, diferenciační a kořenící. Tyto fáze jsou definované složením kultivačních médií s rozdílným obsahem auxinů, cytokininů a osmotik (Nagata & Takebe, 1971). Protoplasty buněk jsou ve fázi G0. K jejich navrácení do buněčného cyklu je třeba specifických podnětů fyzikálního nebo chemického charakteru (např. složení média – vhodná koncentrace růstových látek). Tyto podněty mohou být příčinou, proč se nedaří vždy indukovat buněčné dělení (Navrátilová, 2003).

Protoplasty mají po jejich izolaci a následné kultivaci schopnost dediferenciace, mohou znovu vstoupit do buněčného cyklu, a poté proliferovat nebo se regenerovat v různé orgány, nebo dát vzniknout novým rostlinám (Grafí, 2004; Davey *et al.*, 2005). Dediferenciace protoplastů je charakterizována rovnováhou mezi rozvolněnou a kondenzovanou (heterochromatinem) částí genomu. Dekondenzace heterochromatinu protoplastů *Arabidopsis* je doprovázena strukturním uvolněním centromerních (180bp), pericentromerních a 5S rDNA repetíci, a také transpozónů lokalizovaných na chromocentrech listů (Tessadori *et al.*, 2007). Přestože dekonenzace heterochromatinu v protoplastech byla již popsána (Tessadori *et al.*, 2007; Ondřej *et al.*, 2009), důvody této relaxace (plus proces rekondenzace a vliv na diferenciaci protoplastů) jsou stále předmětem debaty.

Rostlinné protoplasty představují unikátní a jednoduchý buněčný systém, který je vhodný pro výzkum v mnoha oblastech moderní biotechnologie. Nejčastěji jsou protoplastové kultury využívány např. při studiu syntézy buněčné stěny a transportu přes buněčnou stěnu. Používají se také při somatické hybridizaci (fúze protoplastů), inkorporaci exogenního genetického materiálu (cybridizace) nebo genové transformaci rostlin (Navrátilová, 2004; Davey *et al.*, 2005). Rostlinné protoplasty jsou také používány při studiu abiotického stresu, např. stresu těžkými kovy (Parys *et al.*, 1998), teplotního (Dong *et al.*, 2007) a salinitního stresu (Lynch *et al.*, 1989). Čerstvě izolované protoplasty byly také využívány jako univerzální buněčný systém pro studie mechanismů buněčné signalizace u rostlin (Sheen, 2001).

Protoplastové kultury byly již připraveny z řady druhů jednoděložných i dvouděložných rostlin (Davey *et al.*, 2005). Rod *Cucumis* zahrnuje několik agronomicky důležitých plodin, které by mohly využívat vlastností jiných divokých druhů *Cucumis* spp.. Kvůli velkému množství problémů však běžné křížení u nich není možné. Použití somatické hybridizace pro tok genů mezi druhy je závislé na schopnosti protoplastů regenerovat buněčnou stěnu, podléhat buněčnému dělení a regenerovat se v rostlinu. Na rozdíl od rodů *Solanum* a *Brassica*, u kterých byl potvrzen přenos rezistence nebo nových kvalitativních vlastností u somatických hybridů, byly pokusy použití této metody u *Cucurbitaceae* pro přenos rezistence z divokých druhů značně neúspěšné (Lebeda, 1999). Jedním z důvodů tohoto neúspěchu může být během kultivace nebo izolace protoplastů vznikající oxidativní stres (Papadakis & Roubelakis-Angelakis, 2002).

Životní prostředí dnes obsahuje velké množství toxických látek. Kadmium, rtuť a jiné kovy, unikající z průmyslových provozů, znečišťují vodu, půdu i vzduch. Rostliny jsou tak vystaveny vyšším koncentracím kovů, což ovlivňuje jejich růst a produktivitu. Aby rostliny přežily v prostředí těžkých kovů vyvinuly různé adaptační mechanismy. Rostlinné strategie, jak omezit fytotoxicitu těžkých kovů zahrnují snížení příjmu kovových iontů, jejich uložení do vakuoly, chelataci s proteiny bohatými na cystein jako jsou fytochelatiny nebo metalothioneiny, nebo oprava poškozených buněčných složek (Clemens, 2001; Hall, 2002; Wang *et al.*, 2004). Kadmium je neesenciální kov známý svým silným fytotoxickým účinkem. Rostliny mohou kadmium přijímat velmi rychle přes Ca^{2+} kanály nebo přenašeče (Clemens, 2001) nebo přenašeče jiných kovů, např. zinku (Korshunova *et al.*, 1999). V buňce je kadmium akumulováno ve vakuole nebo okolí buněčné stěny (Ma *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2002). Kadmium ovlivňuje příjem vody a živin z půdy, otevírání stomat a aktivitu fotosyntetického aparátu (Clemens, 2006). Kadmium je také schopné vytěsnit vápenaté ionty z kalmodulinu a interferovat tak s buněčnou signální kaskádou (Rivetta *et al.*, 1997). Jedním z předpokládaných mechanismů toxicity kadmia je zvýšená produkce ROS a oxidativní stres. Indukce oxidativního

stresu kadmiem zahrnuje zvýšenou produkci peroxidu vodíku a superoxidu a podporu lipidové peroxidace (Garnier *et al.*, 2006; Kopyra *et al.*, 2006; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006).

6.1 Výsledky

Výsledky jsou detailně prezentovány formou článků, které tvoří přílohy 6, 7 a 8.

Experimenty v rámci tohoto projektu, který řeší problematiku úlohy ROS a RNS při regeneraci protoplastů a vlivu toxických kovů na buněčnou suspenzi, byly realizovány na modelovém systému *Cucumis sativus*. Úloha NO v regeneračním procesu protoplastů byla studována s využitím modulátorů koncentrace aktivních forem kyslíku a dusíku v kultivačním mediu. Byla prokázána účast RNS a ROS při regeneraci protoplastů *C. sativus* a úzký vztah mezi produkcí oxidu dusnatého a tvorbou RNS a ROS. Při vyšších koncentracích NO byl pozorován jeho antioxidační účinek. Intenzivní tvorba mikrokalusů byla detekována v kultivačním mediu se sníženou hladinou NO. Z dosažených výsledků je zřejmý regulační vliv NO na regenerační proces po izolaci protoplastů a na intenzitu buněčného dělení. Získané výsledky byly sepsány formou článku a jsou připraveny k odeslání do redakce (viz. Příloha 6).

V rámci řešení disertační práce jsem se také zapojila do studie vlivu oxidativního stresu na rekondenzaci repetitivních sekvencí v jádru rostlinného protoplastu. V tomto experimentu byla vedle porovnávání hladiny rekondenzace chromatinu s úrovní oxidativního stresu, ovlivněného aplikací antioxidantů případně schopnostmi aktivace antioxidačních systémů protoplastů během prvních 72 hodin jejich kultivace, sledována také de- a re-kondenzace satelitní DNA typu I a 5S rDNA repetitivních sekvencí. Bylo demonstrováno, že kultivace protoplastů s kyselinou askorbovou nejen snížila hladinu oxidativního stresu, ale také pozitivně stimulovala expresi askorbátperoxidasy a katalasy, vedla k větší rekondenzaci chromatinu ve srovnání s protoplasty kultivovanými bez kyseliny askorbové, a navíc také podporovala buněčnou proliferaci. Z výsledků vyplývá, že rozsáhlá relaxace genomu je spíše spojená s oxidativním stresem než s rozsáhlými změnami genové exprese. Výsledky této studie byly publikovány v časopise *Journal of Experimental Botany* (viz. Příloha 7).

Dále byla studována role ROS a RNS v reakci buněčné suspenze *C. sativus* na přítomnost kadmia v růstovém mediu. Zkoumali jsme produkci RNS a ROS a vliv látek známých jako modulátory koncentrace RNS a ROS na růst a životnost buněk okurky seté. V ranné fázi reakce buněk vystavených působení kadmia byla pozorována zvýšená produkce RNS a ROS a intenzivní buněčná smrt. Po delším vystavení buněk působení kadmia došlo k poklesu produkce RNS a ROS. Kadmiem indukovaný nárůst produkce NO byl lokalizován v chloroplastech a ROS zejména v cytoplasmě. Pro stanovení zapojení RNS a ROS v reakci buněk *C. sativus* na stres kadmiem byl použit lapač NO cPTIO, inhibitor NO synthasy

L-NAME a donor NO GSNO. Pozorované změny životnosti a růstu buněk nebyly přímo spojeny se změnami produkce RNS a ROS. Dlouhodobé vystavení působení kadmia inhibovalo buněčné dělení a dediferenciaci. Zvýšená produkce NO patří k ranným reakcím rostlinných buněk vystavených kadmiu a je spojena s činností enzymu s NO syntasovou aktivitou. Výsledky této studie potvrzují roli NO jakožto mediátora signalizace a odezvy rostlinných buněk na krátkodobé a dlouhodobé působení kadmia. Naše poznatky také přispívají k porozumění fytotoxicity kadmia a mechanismům účinku kadmia na růst a vývoj rostlinných buněk. Výsledky získané v tomto experimentu byly sepsány formou článku a jsou připraveny k odeslání do redakce (viz. Příloha 8).

PŘÍLOHA 6

Interplay of reactive nitrogen and oxygen species in the regeneration and growth of cucumber cells from isolated protoplasts

Marek Petřivalský, Pavla Vaničková, Markéta Ryzí, Božena Navrátilová,
Jana Piterková and Lenka Luhová

Plant Cell Reports

PŘÍLOHA 7

Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress

Vladan Ondřej, Božena Navrátilová, Iva Protivánková, Jana Piterková,
Michaela Sedlářová, Lenka Luhová and Aleš Lebeda

Journal of Experimental Botany: doi:10.1093/jxb/erq067 (2010)

RESEARCH PAPER

Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress

Vladan Ondřej^{1*}, Božena Navrátilová¹, Iva Protivánková¹, Jana Píterková², Michaela Sedlářová¹, Lenka Luhová² and Aleš Lebeda¹

¹ Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, Olomouc 783 71, Czech Republic

² Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, Olomouc 783 71, Czech Republic

* To whom correspondence should be addressed: E-mail: vladan.ondrej@upol.cz

Received 21 January 2010; Revised 4 February 2010; Accepted 4 March 2010

Abstract

Protoplast cultures are remarkable examples of plant cell dedifferentiation. The state of dedifferentiation is evidenced by changes in cell morphology, genome organization, as well as by the capability of protoplasts to differentiate into multiple types of cells (depending on the type of the stimulus applied). The first change in the genome structure is connected with large-scale chromatin decondensation, affecting chromocentres involving various types of these repetitive sequences. This paper describes not only the de- and recondensation of satellite DNA type I and 5S rDNA repetitive sequences, but it also compares the recondensation level of chromatin with the levels of oxidative stress which were decreased by using an antioxidant, as well as the capabilities of the antioxidative systems within protoplasts, during the first 72 h of their culture. It is demonstrated that the treatment of protoplasts with ascorbic acid not only decreased the level of oxidative stress but also positively stimulated the expression of the ascorbate peroxidase and catalase. It also led to a greater recondensation of the chromatin (when compared to the untreated protoplasts); in addition, it supported cell proliferation. It is concluded that large-scale genome relaxation is more directly connected with oxidative stress than with large changes in the expression of genes; and further, that its recondensation is related to the start of (as well as the level of) protection by the antioxidative systems.

Key words: Chromatin, nuclear organization, oxidative stress, protoplasts.

Introduction

Plant protoplasts (plant cells devoid of a cell wall) represent a very spectacular example of cell dedifferentiation. After their isolation and subsequent culture they have the capability to dedifferentiate, re-enter the cell cycle, and then proliferate or regenerate into the various organs. They can also make new plants in the same way as zygotes (Grafí, 2004). This is one reason that protoplast cultures are such valuable tools for biotechnological applications such as somatic hybridization, increasing genetic variability by somaclonal variability, and genetic transformation (Debeaujon and Branchard 1992; Rakoczy-Trojanowska, 2002; Navrátilová *et al.*, 2006). However, in many plant species, a high level of protoplast recalcitrance occurs (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2002).

Protoplast dedifferentiation is characterized by a new balance between the less-dense portion of the genome and that which is condensed and with transcription repressed (heterochromatin). The heterochromatin decondensation of *Arabidopsis* protoplasts is accompanied by the structural relaxation of centromeric (180 bp), pericentromeric, and 5S rDNA repeats, as well as transposons localized at the chromocentres of leaves (Tessadori *et al.*, 2007). Although the phenomenon of heterochromatin decondensation in protoplasts has recently been clearly described (Tessadori *et al.*, 2007; Ondřej *et al.*, 2009), the reasons for this relaxation (plus the process of the recondensation, together with its influence on protoplast differentiation) remain an open question.

Abbreviations: AI, after isolation; ROS, reactive oxygen species; APX, ascorbate peroxidase; CAT, catalase; H₂DCF DA, 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate.
© 2010 The Author(s).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study is supportive of the hypothesis that there is a correlation between the recondensation of the chromatin in protoplast nuclei with the levels of oxidative stress in the protoplast cultures. As is generally known, oxidative stress, resulting from an imbalance between reactive oxygen species (ROS) generation and the antioxidant capacity of cells, has been proposed as contributing to the recalcitrance of plant protoplasts (reviewed in Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2002). The ROS superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals ($\cdot OH$) are inevitably produced in higher plant cells during normal metabolism. Their production is enhanced during situations of stress such as drought, salinity, high and low temperatures, UV or ozone stress, as well as pathogen infections. ROS limit the spread of the pathogen by a strengthening of the plant cell walls and/or the killing of the pathogens directly; however, they also act as signalling molecules during biotic and abiotic stresses. In the same way as during a pathogen attack, ROS is generated during the enzymic maceration of the cell walls during protoplast isolation (reviewed in Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2002).

Materials and methods

Protoplast isolation and culture

Seeds of *Cucumis sativus* L. (cv. Marketer; SEMO Ltd., Smržice, Czech Republic) were sown, under sterile conditions, on half-strength MS medium (Duchefa). After germination, the seedlings were planted on MS medium (supplemented with 20 g l^{-1} sucrose, 0.8% agar, $0.049\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, and $0.044\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ BA) in plastic boxes. The plants were cultivated in a culture room with a 16 h day (light intensity $32\text{--}36\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), and a temperature of $22\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$.

The leaves of the plantlets were chopped and digested in a maceration enzyme mixture containing 1% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 (Duchefa) and 0.25% (w/v) Macerozyme R-10 (Duchefa), and then dissolved in PGly washing solution (Debeaujon and Branchard, 1992). The pieces of leaves were incubated in the enzyme mixture for 16–17 h in the dark at $27\text{ }^\circ\text{C}$. The protoplasts were isolated according to Gajdová *et al.* (2007), and then resuspended (2×10^5 protoplasts ml^{-1}) in LCM1 culture medium (Debeaujon and Branchard, 1992) supplemented with 0, 100, and 200 mg l^{-1} of ascorbic acid in order to get the experimental series.

Fixation, fluorescence in situ hybridization (FISH), image acquisition

Freshly isolated protoplasts and cells from protoplast cultures at 24, 48, and 72 h after protoplasts isolation were fixed in ethanol:acetic acid (3:1 v/v) (EAA), and prepared for FISH. Cells from the cultures were treated with a solution of 1% Pectinase and 2% Cellulase Onozuka R-10 (Duchefa) for 15 min at $37\text{ }^\circ\text{C}$, to remove newly synthesized cell walls. Young leaves were also fixed in EAA, and then macerated in a solution of 1% Pectinase from *Aspergillus niger* (Serva) and 2% Cellulase for 30 min at $37\text{ }^\circ\text{C}$. They were then gently squashed in 45% acetic acid, next washed in 96% ethanol, and then dried and prepared for FISH.

FISH was carried-out on the interphase nuclei of the leaves, protoplasts, and protoplast-derived cells, with the slight modifications of the hybridization protocol used by Ondřej *et al.* (2008). The probe for telomere-associated regions was prepared by PCR amplification of the satellite DNA type I repeats (Ganal *et al.*, 1986) from genomic DNA using primers: forward 5'-CTGGGTGGCCTCATTTTG-3' and reverse 5'-GACCTTTGGCACCGTTGT-3'. The PCR products were identified by electrophoresis

on 2% agarose gel, then purified (Gene Elute PCR Clean-Up Kit, Sigma), and finally labelled with a Biotin-nick translation kit (Roche) according to the manufacturer's protocol. The probe for 5S rDNA was prepared by DIG-labelled PCR using primers: forward 5'-GATCCCATCAGAACTCC-3' and reverse 5'-GGTGCTTATAGTCTGGTAT-3'. The hybridized probes were detected using mouse anti-digoxin rhodamine red-X-conjugated antibody and extravidin conjugated with FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Nuclei were counterstained using DAPI, diluted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA), in order to reduce photobleaching.

Image acquisition was carried out with a fluorescent microscope (Olympus BX 60) fitted with a CCD camera (Cool Snap, Photometrics). The images were analysed with ImageJ freeware (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). The relative signal area was calculated as a percentage of the signal area (yellow or red signals of satellite DNA type I and 5S rDNA) in relation to the total area of DAPI stained nuclei. The data were presented as the mean plus errors and treated by one-way ANOVA analyses (Daniel's XL Toolbox version 2.57; <http://xltoolbox.sourceforge.net>).

ROS measurement

The concentration of H_2O_2 in the cell suspension of protoplasts was determined fluorimetrically using the fluorescent probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate ($H_2DCF\text{ DA}$). $H_2DCF\text{ DA}$ can permeate through the cell membrane into the cell, where it can there be metabolized by cell esterase into H_2DCF . Then, H_2DCF is oxidized by reactive oxygen species into fluorescent DCF (Gomes *et al.*, 2006). The H_2O_2 assessments were performed on a Synergy microplate reader (Biotek, USA). Into $100\text{ }\mu\text{l}$ of cell suspension, $5\text{ }\mu\text{l}$ of 0.2 mM fluorescent probe $H_2DCF\text{ DA}$ was added. The fluorescent signal ($\lambda_{\text{exc}}=485\text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}}=515\text{ nm}$) was measured immediately after the probe's addition, as well as after 1 h of cell suspension incubation at $26\text{ }^\circ\text{C}$ in the dark. For each variant, three measurements, for each of the above-mentioned three independent sets of samples, were conducted (i.e. nine values were obtained). The data were presented as a mean±standard deviation.

Localization of ROS production

The sedimented protoplasts were resuspended in PBS (pH 7.0) and then incubated in 1 mM Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, USA) for 20 min to stain the nuclei and in $20\text{ }\mu\text{M}$ solution of $H_2DCF\text{ DA}$ (Axxora, USA) for 10 min to visualize H_2O_2 inside the cells. Samples were subjected to confocal laser scanning microscopy (Olympus Fluorview 1000 attached to inverted microscope IX81). Excitation was provided by the 405 nm diode laser (for DNA staining) and the 488 nm line of an argon ion laser (for H_2O_2 detection). Dye emissions were recorded using 430–470 nm and 505–525 nm band-pass filters, respectively. To adjust the correct intensity of the lasers, control samples without fluorescent probes were examined at the beginning of experiment.

Real-time PCR of ascorbate peroxidase and catalase

Total RNA was isolated from the young leaves of plantlets cultivated under sterile conditions and from freshly isolated protoplasts derived from protoplasts cultured using the Spectrum Total RNA isolation Kit (Sigma), and subsequently treated by RNase free DNase (Promega). RNA was reversely transcribed into cDNA by oligo dT(18) primers and a Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit (Roche). In order to describe the expression level of the cytosolic ascorbate peroxidase (accession number D88649) and catalase (accession number D63385) at each time point of the media series, a LightCycler 2.0 instrument (Roche) was used. The quantified cDNA was used as a template in order to perform the series of amplification analyses using a SYBR Green I containing kit and specific primers: APX,

forward 5'-CTCTGGTGGTCACACATTGG-3' and reverse 5'-CCTCATCGGCAGCATATTTT-3'; CAT, forward 5'-TTGACGATATTGGCATCC-3' and reverse 5'-TAGCATCTTCCTC-CAGCA-3'. The LightCycler Software 4.1 was used to get Cp, amplification, and the melting curves. The relative quantification was performed, in which the measured Cp for the leaves was taken as the standard.

Results

Oxidative stress in protoplasts

The protoplasts of cucumber were isolated from the mesophyll tissues originating from the young leaves of plantlets cultured *in vitro*. The viability of the isolated protoplasts was about 80% (estimated by FDA staining). Protoplasts were obtained in normal yields ($2\text{--}5 \times 10^6$ cells g^{-1} of donor tissue) and were of normal size and shape (spherical). Immediately after isolation of the protoplasts, the ascorbate acid antioxidant was added to the culture media, in order to obtain the concentration series of 0, 100, and 200 mg l^{-1} of media. The detection of ROS was performed for the whole concentration series at four time points 0, 24, 48, and 72 h after isolation (AI). The results (summarized in Fig. 1A) demonstrate a decreasing tendency of the ROS level in the protoplasts in relation to the AA

concentration and the time of culture. Only for the protoplast cultures without AA, were the highest levels of ROS measured 24 h AI. Protoplasts cultivated for 24 h in the medium with 100 mg l^{-1} of AA showed the same level of ROS as measured in freshly isolated protoplasts. Histochemical detection of ROS using confocal microscopy (Fig. 1B) not only showed ROS decreasing during protoplast cultivation, as described by fluorimetric ROS detection, but it was possible to localize ROS within the cells. The ROS were mostly found in the cytosol, chloroplasts, as well as in the nuclei.

Thus, real-time PCR for the quantification of the cytosolic ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) transcripts was performed. The results show that the transcript level of APX in freshly isolated protoplasts decreased in relation to the leaves (Fig. 2A). Moreover, the expression of ascorbate peroxidase was not detected at 24 h AI, throughout all of the concentration series. The expression of CAT was not detected in freshly isolated protoplasts or in protoplasts 24 h AI in all of the concentration series (Fig. 2A–C). These facts correlate with the ROS measurement where protoplasts in the medium without AA display the highest level of ROS; indicating that the stress defence apparatus is not switched on at that time. At the following two time points, protoplast cultures with the addition of AA differed from cultures without AA in both their

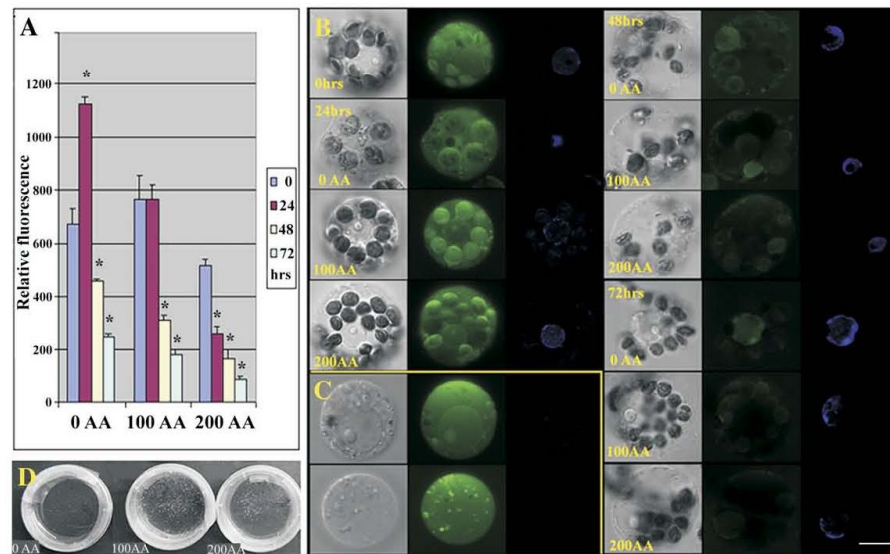


Fig. 1. The ROS measurement and cellular localization. The subset (A) shows measurements of ROS during protoplast culture (72 h) in relation to AA treatments (0, 100, and 200 mg l^{-1}). The values marked with an asterisk were significantly different from values obtained in freshly isolated protoplasts ($P < 0.05$). The subset (B) shows not only the level of ROS in the cells, in relation to the time of culture and AA concentration, but also demonstrates the localization of ROS within cells. The highest intensity signals of the ROS (green) are visible in freshly isolated protoplasts and protoplasts at 24 h AI localized mostly in chloroplasts, cytoplasm, peroxisomes, and also in nuclei that were stained by Hoechst (blue). The subset (C) demonstrates a part of the protoplast populations in cultures without AA and 100 mg l^{-1} AA occurring between 24–48 h AI. These types of protoplasts are characterized by high ROS content and enlarged weakly stained nuclei or without nuclei. The subset (D) displays, separately, a proliferation for 2 week cultures of protoplast-derived cells, compared to the AA treatment. Application of AA led to the increasing amounts of microcalli. The scale bar=10 μm .

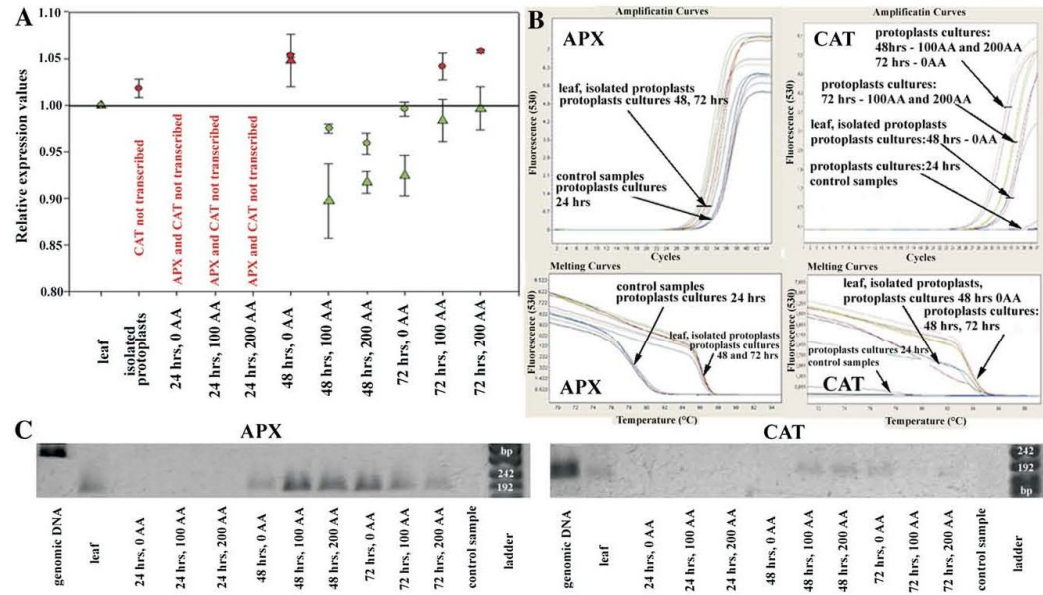


Fig. 2. APX and CAT expression profile in protoplast cultures, treated and untreated with AA. The subset (A) demonstrates the relative quantification of the APX (circles) and CAT (triangles) transcription by RT-PCR for protoplasts, during their culture and AA application. The transcription level was related to the expression measured in the leaves. The circles and triangles (marked in red) demonstrate down-regulation of AP expression; the green ones up-regulation. The subset (B) shows amplification and melting curves from RT-PCR experiments and (C) shows the size of RT-PCR products of APX and CAT for leaves (L) and protoplasts at 72 h AI (P). The PCR products of APX and CAT using genomic DNA as a APX template displaying intron are also shown.

expression level and tendency. Protoplasts not treated with AA started slowly to switch on the expression of APX and CAT at 48 h AI, and reached the expression level of leaves at 72 h AI. By contrast, protoplasts treated with AA rise above the APX and CAT expression level of leaves at 48 h AI, and the low level of ROS led to the down-regulation of APX and CAT expression at 72 h AI (Fig. 2A–C).

The level of the AA also influenced the subsequent proliferation of the cultivated protoplasts. As demonstrated in Fig. 1D, the highest proliferation capacity was observed for protoplasts cultivated in medium supplemented by 100 mg l^{-1} of AA. Lower concentrations decreased the level of proliferation.

Chromatin de- and recondensation

To study the level of the changes of chromatin condensation, both the satellite type I and 5S rDNA repetitive sequences were selected. Figures 3 and 4 demonstrate and summarize the relative level of de- and recondensation of the studied repeats in leaves, protoplasts at the same time-points, as well as the concentration series when the levels of ROS and antioxidant enzymes expression were measured. Freshly isolated protoplasts and protoplasts up to 24 h after their isolation showed as significant the highest levels of 5S rDNA and satellite type I DNA decondensation, compared with leaf nuclei and satellite type I DNA and also in

relation to other time points of protoplast cultivation (Figs 3, 4). Satellite type I DNA also displayed four huge signals at the nuclear periphery (characteristic for this period of protoplast culture). This signal configuration became condensed into smaller ones during subsequent culturing (Fig. 3). Increases in the relative amounts of 5S rDNA signals in the protoplast nuclei at 48 h after isolation is significantly connected with replication during the S phase, through which the protoplasts had passed. 5S rDNA showing double dots at this time (Fig. 3) are replicated earlier than satellite DNA type I (of heterochromatin origin) at a time when the nuclear volume (in this case area) had not fully increased (as the result of whole genome replication). This could misrepresent the relative area of 5S rDNA at this time point. The strongest recondensation levels for both types of DNA were achieved at 72 h AI, at the time when the S phase had finished (double dots signals, two nucleolei) (Figs 3, 4). The changes in chromatin de- and recondensation levels at most time points were statistically significant (Fig. 4A).

The AA treatment supported recondensation of both types of repetitive sequences (statistically significant for the 72 h time point); however, the nuclei of protoplasts treated with 200 mg l^{-1} of AA displayed higher levels of chromatin decondensation than that measured for the 100 mg l^{-1} concentration. The highest level of repetitive DNA decondensation was observed during the period from protoplast

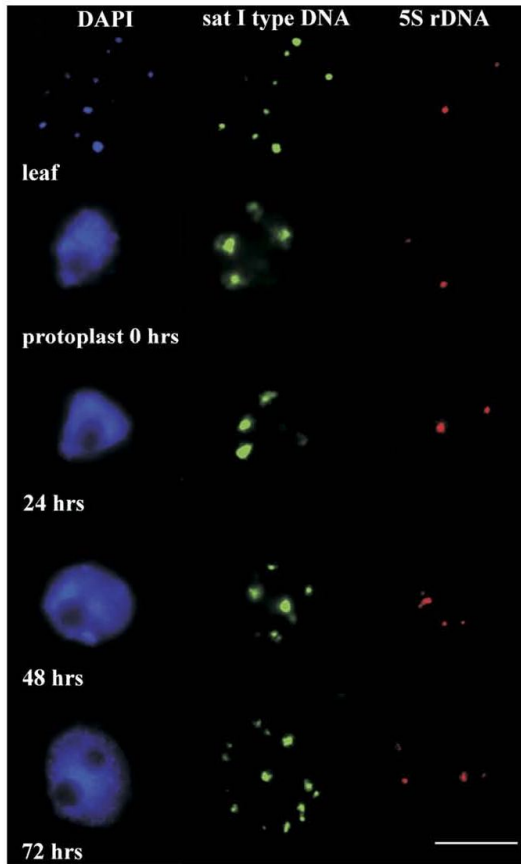


Fig. 3. The de- and recondensation of satellite DNA type I and 5S rDNA sequences in protoplast nuclei during the first 72 h of the culture and leaf nucleus. The figure shows nuclei (blue), satellite DNA type I (green), and 5S rDNA (red) condensation levels. Satellite DNA type I (green) display the highest decondensation after protoplast isolation, and during the first 24 h of the culture. The massive signals were located at four locations within the cell nucleus. Subsequently, these signals started to disintegrate and to form a greater number of smaller signals. The relaxation of 5S rDNA (red) was not as extensive as that observed for satellite DNA type I; the largest relaxation occurred at 24 h and 48 h into the culture. The double-dot signals indicate that the S-phase has passed and were observed at 48 h and 72 h AI. The scale bar=10 μm .

isolation, until 24 h AI. This period corresponds to the time of the highest level of ROS, and the lowest expression of APX and CAT; revealing the connection between chromatin decondensation and oxidative stress in protoplasts. The period between 24 h and 48 h AI is characterized by a high variability of chromatin recondensation within the cell population (Fig. 4B). The cell population could be divided into two groups: the less condensed (6% with more of the relative area for satellite type I repeats, and 1% and greater

for 5S rDNA) and more condensed ones (less than 6% of the relative area for satellite type I repeats and less than 1% for 5S rDNA). The highest number of the cells with more condensed chromatin was found for protoplast cultures treated with 100 mg l^{-1} of A and the lowest for cultures without AA (Fig. 4B). ROS localization by the confocal microscopy also revealed protoplasts with high levels of ROS across the whole cell and with totally decondensed, enlarged, and weakly stained nuclei (or without them); indicating the degradation of nuclei including chromatin in protoplasts undergoing high oxidative stress (Fig. 1C).

Discussion

The results presented here demonstrate that chromatin de- and recondensation correlate with the level of oxidative stress as well as the reactivation of the antioxidative systems. A common feature of *in vitro* cultures, including protoplasts, is the increased rate of ROS production, and also the accumulation of ROS. The extent of damaging effects of ROS depends upon the effectiveness of the antioxidative systems, which include low molecular mass antioxidants (ascorbate, glutathione, carotenoids), as well as several antioxidative enzymes (ascorbate peroxidase, glutathione reductase, catalase, superoxide dismutase) (reviewed in Bat'ková *et al.*, 2008). In agreement with the results reviewed by de Marco and Roubelakis-Angelakis (1999), the application of ascorbate reduced the ROS level in protoplasts during the cultivation period; the reactivation of APX and catalase followed. However, a decrease of cytosolic APX expression in AA-treated protoplasts 72 h AI was determined; this could be connected with the ascorbate cycle in the cells. Protoplasts treated with AA displayed reduced ROS levels. This could lead to the depletion of the reduced ascorbate, on which the APX activity depends.

Moreover, it has been proposed that a reduced form of ascorbate, in contrast to an oxidized one, is required for cell division and to promote cell cycle progression in competent cells (Potters *et al.*, 2000). Thus, protoplast cultures without AA treatment lack ascorbate to protect themselves from oxidative stress. They also did not proliferate in the experiments as much as was observed for AA treatments. However, the expression of APX at 72 h AI was reduced. The preservation of the ROS and levels of the reduced form of ascorbate were sufficient for the rapid cell proliferation of the AA-treated protoplasts.

Oxidative stress has been proposed as the main factor responsible for the recalcitrance of plant protoplast differentiation. It has been demonstrated that oxidative stress could cause cell death of protoplasts in a manner similar to the hypersensitivity responses during plant pathogen attacks (Maccarone *et al.*, 2000; Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2002). Cell death is clearly characterized by DNA fragmentation and ladder formation during DNA electrophoresis (Maccarone *et al.*, 2000). In this work, the chromatin changes under oxidative stress were studied directly in the cell nucleus. It was noted that heterochromatin organized in

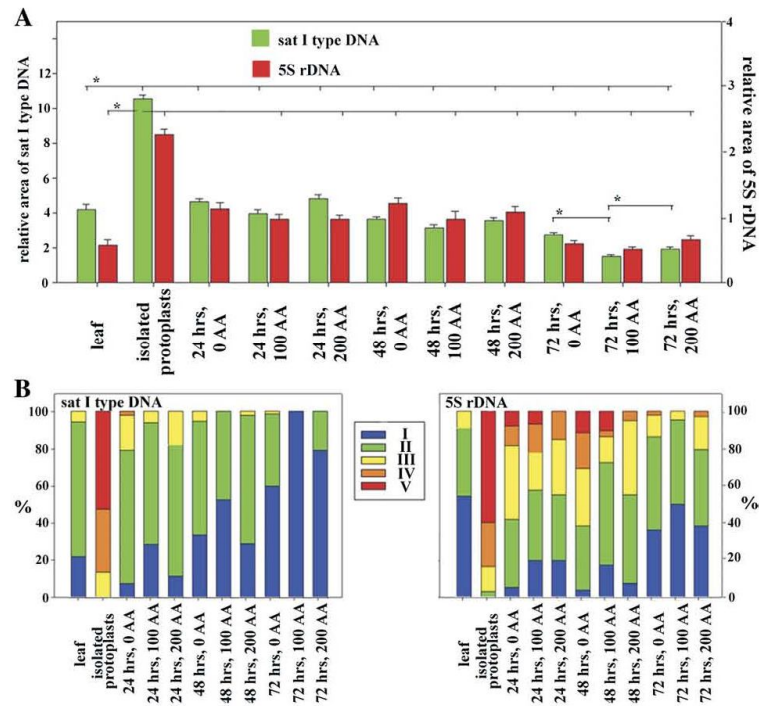


Fig. 4. The subset (A) shows the calculated differences in the condensation level (mean of relative area of the signals+standard errors) of the studied sequences in relation to the time of culture and AA treatments (0, 100, and 200 mg l⁻¹). For statistical analysis, cells from multiple experiments were pooled together for each experimental group and a one-way ANOVA test was performed. The statistically significant differences of condensation levels (marked by bracket with an asterisk = $P < 0.05$) were found for most of the time points, freshly isolated protoplasts and leaves. The condensation levels in relation the concentration of AA significantly differs just for 72 h and for satellite DNA type I repeats. The subset (B) shows protoplast population variability during the time of cultivation and AA treatment. The protoplasts were divided into five categories according to the condensation level (relative area of the signals) of satellite DNA type I (categories: I, 0>3.00; II, 3.01–6.00; III, 6.01–8.00; IV, 8.01–10.00; V, 10.01<) and 5S rDNA (categories: I, 0>0.50; II, 0.51–1.00; III, 1.01–1.50; IV, 1.51–2.00; V, 2.01<).

the chromocentres had undergone intense decondensation during protoplast isolation, and this had been observed for protoplasts of several species (Zhao *et al.*, 2001; Tessadori *et al.*, 2007; Ondřej *et al.*, 2009). As shown here, this decondensation persists at an extreme level for the first 2 d of the cultivation, timed with maximum ROS occurrence; thereafter, the chromocentres started to reassemble, when the S-phase had passed. Subsequently, the protoplast-derived cells re-enter into the cell cycle and began to divide (Ondřej *et al.*, 2009).

Several theories have been proposed to explain such massive chromatin decondensation. The decondensation is often connected with cell reprogramming and dedifferentiation at this stage of protoplast regeneration (Exner and Hennig, 2008). However, it has been documented that decondensation of the chromatin did not dramatically change the expression profile of protoplasts, and the up-regulation of the expression is connected with genes involving cell wall reconstruction and the cell cycle. Moreover, the chromocentres that were mainly affected by decondensation

represent the constitutive heterochromatin—gene pure and the silent parts of the genome (Avramova, 2002; van Driel and Fransz, 2004). Further, the decondensed chromatin still retains its characteristics, with unchanged epigenetic markers (Tessadori *et al.*, 2007). It has been demonstrated here that two repetitive sequences (5S rDNA satellite DNA type I located in chromocentres) are significantly less decondensed in relation to AA treatment, ROS level, and the reactivation of the antioxidative systems. It has also been shown that oxidative stress is connected with DNA damage, not only in the chloroplasts (Kim *et al.*, 2000), but also in cell nuclei (Mancini *et al.*, 2006) and in reaction to pathogen attacks (Sedlářová *et al.*, 2007). Thus, large-scale decondensation of the chromatin could promote DNA damage as a response to cell wall degradation; or as a response to substances occurring in enzyme solution for cell wall degradation, which could behave as pathogen elicitors.

Overall, the results of this work have shown that large-scale decondensation of the chromatin within protoplast nuclei and the subsequent reassembly is connected with the

levels of oxidative stress and the antioxidative systems. Reassembly of chromocentres (Ondřej *et al.*, 2009) and an adequate dose of antioxidants could promote the re-entry into the cell cycle and the subsequent proliferation rate. It is hypothesized that the limitation of large-scale chromatin decondensation can also reduce the induction of changes in the genome, leading to the somaclonal variation known from plant biotechnologies. These changes are often associated with cytogenetic abnormalities, including changes in the ploidy level, chromosomal rearrangement, activation of transposons and retrotransposons, leading to mutations when transposed into genic regions (Grafi, 2009).

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (MSM 6198959215 and 2E08018).

References

- Avramova ZJ.** 2002. Heterochromatin in animals and plants. Similarities and differences. *Plant Physiology* **129**, 40–49.
- Bat'ková P, Pospíšilová J, Synková H.** 2008. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. *Biologia Plantarum* **52**, 413–422.
- Debeaujon I, Branchard M.** 1992. Induction of somatic embryogenesis and callogenesis from cotyledons and leaf protoplasts-derived colonies of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Reports* **12**, 37–40.
- de Marco A, Roubelakis-Angelakis KA.** 1999. Specific features of the ascorbate/glutathione cycle in cultured protoplasts. *Plant Cell Reporter* **18**, 406–411.
- Exner V, Hennig L.** 2008. Chromatin rearrangements in development. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 64–69.
- Gajdová J, Navrátilová B, Smolná J, Lebeda A.** 2007. Factors affecting protoplast isolation and cultivation of *Cucumis* spp. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **81**, 1–6.
- Ganal M, Riede I, Hemleben V.** 1986. Organization and sequence analysis of two related satellite DNAs in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Molecular Evolution*. **23**, 23–30.
- Gomes A, Fernandes E, Lima JFC.** 2006. Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review. *Journal of Fluorescence* **16**, 119–139.
- Grafi G.** 2004. How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Developmental Biology* **268**, 1–6.
- Grafi G.** 2009. The complexity of cellular dedifferentiation: implications for regenerative medicine. *Trends in Biotechnology* **27**, 329–332.
- Kim JH, Shin SH, Cho SH, Lee WS.** 2000. DNA endonuclease- and active oxygen-associated degradation of chloroplast DNA in response to paraquat-induced oxidative stress. *Journal of Plant Biology* **43**, 226–231.
- Maccarrone M, Van Zadelhoff G, Veldink GA, Vliegenthart JFG, Finazzi-Agró A.** 2000. Early activation of lipoxygenase in lentil (*Lens culinaris*) root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. *European Journal of Biochemistry* **267**, 5078–5084.
- Mancini A, Buschini A, Restivo FM, Rossi C, Poli P.** 2006. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Science* **170**, 845–852.
- Navrátilová B, Greplová M, Vyvadilová M, Klíma M, Gajdová J, Skálová D.** 2006. Electrofusion of protoplasts in selected vegetables of *Brassica*, *Cucumis*, and *Solanum* genera. *Acta Horticulturae* **725**, 801–805.
- Ondřej V, Lukášová E, Krejčí J, Matula P, Kozubek S.** 2008. Lamin A/C and polymeric actin in genome organization. *Molecules and Cells* **26**, 356–361.
- Ondřej V, Kitner M, Doležalová I, Nádvorník P, Navrátilová B, Lebeda A.** 2009. Chromatin structural rearrangement during dedifferentiation of protoplasts of *Cucumis sativus* L. *Molecules and Cells* **27**, 443–447.
- Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA.** 2002. Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 549–559.
- Potters G, Horemans N, Caubergs RJ, Asard H.** 2000. Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in a tobacco cell suspension. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 531–540.
- Rakoczy-Trojanowska M.** 2002. Alternative methods of plant transformation: a short review. *Cellular and Molecular Biology Letters* **7**, 849–858.
- Sedlářová M, Luhová L, Petřiválský M, Lebeda A.** 2007. Localization and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 607–616.
- Tessadori F, Chupeau MCh, Chupeau Y, Knip M, Germann S, van Driel R, Franz P, Gaudin V.** 2007. Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated *Arabidopsis* cells. *Journal of Cell Science* **120**, 1200–1208.
- van Driel R, Franz P.** 2004. Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both? *Experimental Cell Research* **296**, 86–90.
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT.** 2008. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* **31**, 622–631.
- Zhao J, Morozova N, Williams L, Libs L, Avivi Y, Grafi G.** 2001. Two phases of chromatin decondensation of plant cells. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 22772–22778.

PŘÍLOHA 8

Nitric oxide and reactive oxygen species are involved in early and long-term responses of cucumber cells to cadmium

Jana Piterková, Markéta Ryzí, Lenka Luhová, Božena Navrátilová,
Michaela Sedlářová and Marek Petřivalský

Plant Cell Physiology

7. Role oxidu dusnatého v procesu klíčení v prostředí salinitního a osmotického stresu

Stres ze sucha (také osmotický stres) je jedním z faktorů negativně ovlivňujících produktivitu zemědělských plodin. Klesající vakuolární turgor indukuje syntézu ABA, která následně stimuluje produkci NO v buňkách průduchů. U některých rostlinných druhů způsobila aplikace donoru NO uzavření průduchů, což vedlo ke snížení transpirace (Garcia-Mata & Lamattina, 2001). Je pravděpodobné, že v procesu uzavírání průduchů NO nefunguje sám, ale interaguje s dalšími signálními molekulami (např. H_2O_2). Existují důkazy o tom, že interakcí ROS s NO dochází k indukci biosyntézy ABA (Neill *et al.*, 2003). Aktivita NADPH-dependentní oxidasy (EC 1.6.3.1) indukovaná kyselinou abscisovou byla spojena s nárůstem koncentrace ROS v kukuřici během osmotického stresu (Jiang & Zhang, 2002), což demonstruje úzký vztah mezi ABA, ROS a NO. Další faktor negativně ovlivňující pěstování plodin je salinitní stres. Je způsoben vysokou koncentrací soli v růstovém mediu (Rao *et al.*, 2002). Zvýšená produkce NO v buněčné suspenzi tabáku vystaveného působení osmotického stresu, salinitního stresu, vysokých teplot a nadbytku světla byla prokázána s využitím světelné mikroskopie. Výsledky experimentu s kalusy dvou druhů rákosu lišících se salinitní tolerancí naznačují, že NO slouží jako signál v indukci salinitní rezistence, která vykazuje vyšší poměr $K^+ : Na^+$ iontů (K^+ je méně toxický než Na^+). Tento nárůst je vysvětlen vyšší aktivitou membránové H^+ -ATPasy (EC 3.6.3.7), která se podílí na transportu iontů do rostliny (Zhao *et al.*, 2004).

Jak předčasné klíčení, tak prodloužená dormance jsou nevhodné pro plodiny vyrůstající ze semen. Výzkum semen různých druhů naznačuje, že NO je složkou signální sítě, která kontroluje dormanci semen. Je také známo, že dormanci a klíčení semen mohou ovlivnit rostlinné hormony. Např. ABA inhibuje klíčení (Gubler *et al.*, 2005), zatímco kyselina gibberelová (GA) klíčení podporuje (Zentella *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2004). Aplikace donorů NO snížila nebo odstranila dormanci semen u *A. thaliana* (Batak *et al.*, 2002; Bethke *et al.*, 2004; Bethke *et al.*, 2006), *Hordeum vulgare* (Bethke *et al.*, 2004), *Paulownia tomentosa* (Giba *et al.*, 1998), a *L. sativa* (Beligni & Lamattina, 2000). Výsledky získané u *Arabidopsis* naznačují, že NO může snížit citlivost semen na ABA (Bethke *et al.*, 2006), vztah mezi signalizací NO a GA však nebyl stanoven.

Recesivní „single gene“ mutant rajčete (*Solanum lycopersicum* Mill.), *7B-1*, byl selektován na základě samčí sterility závislé na fotoperiodě. Za dlouhých dní (16/8h světlo/tma) a letních podmínek, vykazují rostliny *7B-1* samčí sterilitu; květy obsahují tyčinky, které jsou zakrnělé a neprodukují životaschopné mikrospory (Sawhney, 1997). Za krátkých dní (8/16h světlo/tma) jsou květy mutantu schopny reprodukce a tvoří normální tyčinky a životaschopný

pyl. Mutant *7B-1* disponuje některými pleiotrofními vlastnostmi, jako např. snížením deetiolace hypokotylu za dlouhých dní, zvýšenou velikostí a váhou semen a sníženou rychlostí transpirace. Významnou vlastností *7B-1* je zvýšená rezistence vůči působení abiotických stresorů, jako jsou osmotika, různé soli a nízké teploty (Fellner & Sawhney, 2001). Tyto vlastnosti podpořily význam mutanta jakožto atraktivního systému pro použití v programu pěstování rajčat (Shawney, 2004). Ve srovnání s divokým druhem rajčete (WT) je klíčivost semen mutanta relativně rezistentnější k inhibičnímu účinku manitolu a různých solí, včetně NaCl. Inhibiční účinek různých stresů může být částečně nebo úplně překonán působením fluridonu, inhibitoru biosyntézy ABA (Fellner & Sawhney, 2001). Informace naznačují, že semena *7B-1* mají vyšší hladinu ABA, která poskytuje rezistenci k různým stresům (Fellner & Sawhney, 2001, 2002).

7.1 Výsledky

Výsledky jsou detailně prezentovány formou článku, který tvoří přílohu 9.

Následující projekt byl zaměřen na studium úlohy RNS a ROS v reakci rostlin na různé formy abiotického stresu. Pro tento experiment byl vybrán specifický model dvou genotypů *S. lycopersicum* Mill. – WT a mutant *7B-1*, který vykazuje vyšší odolnost vůči působení řady abiotických stresů (osmotický, salinitní, teplotní stres). Mutant *7B-1* představuje cenný model pro studie interakcí světlo/rostlinné hormony. Experimenty zaměřené na studium úlohy NO při klíčení a vývoji zvolených rostlinných modelů byly realizovány za různých světelných podmínek (tma, modré nebo bílé světlo), u rostlin vystavených salinitnímu a osmotickému stresu, v přítomnosti, případně absenci modulátorů koncentrace RNS a ROS. Při studiu vzájemného propojení mechanismu působení NO a rostlinných hormonů podílejících se na regulaci procesu klíčení, jako je např. kyselina abscisová, byly do media aplikovány zvýšené koncentrace daného hormonu, případně inhibitoru jeho produkce, fluridonu. Vedle klíčivosti a základních parametrů charakterizujících vývoj rostlin (váha, délka kořene a nadzemní části rostliny) byla stanovena produkce NO, obsah dusitanů a obsah ABA. Naše výsledky potvrdily zahrnutí NO v obranných reakcích rajčete vystaveného působení abiotických stresů. Byl navržen úzký vztah mezi světelnými podmínkami a obrannou reakcí spojenou s NO. Celkově nižší aktivita enzymu podobného NO synthase a obsah dusitanů u mutantu ve srovnání s WT mohou být spojeny s vysokou koncentrací ABA nebo poruchou vnímání modrého světla u tohoto genotypu. Detekovali jsme zesilující a kontrolní vliv modrého světla na obranné reakce zprostředkované oxidem dusnatým u rostlin rajčete vystavených osmotickému a salinitnímu stresu. Jednoznačně byla potvrzena esenciální regulační funkce NO v procesu klíčení rostlinných semen. Získané výsledky byly sepsány formou článku a jsou připraveny k odeslání do redakce (viz. Příloha 9).

PŘÍLOHA 9

Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions

Jana Piterková, Lenka Luhová, Jakub Hofman, Veronika Turečková,
Ondřej Novák, Marek Petřivalský and Martin Fellner

Journal of Experimental Botany

ZÁVĚR

Výsledky získané v rámci prvního projektu naznačují, že hlavním zdrojem NO v pletivech rajčete je aktivita enzymu závislého na argininu, která byla inhibována kompetitivními reversibilními a ireversibilními inhibitory živočišné NO synthasy, nikoliv však inhibítorem rostlinné nitrátreduktasy. Specifický dvoufázový nárůst produkce NO byl pozorován v extraktech infikovaných listů středně a vysoce rezistentních genotypů. Aktivita enzymu podobnému NO synthase výrazně vzrostla také brzy po vystavení rezistentního genotypu *L. virosa* infekci *B. lactucae*. Dále byla pozorována systémová odezva rajčete ve formě narůstající produkce NO v intaktních listech sousedících s listy inokulovanými. U obou studovaných modelových systémů odhalila histochemická detekce akumulaci NO v penetrovaných buňkách, vztahující se k iniciaci HR, a také v klíčních vláknech a apresoriích patogenu, což naznačuje významnou roli NO při průniku patogenu do buňky. Na základě získaných výsledků lze předpokládat zapojení NO v obranné reakci studovaných patosystémů a také v klíčení a růstu patogenů *O. neolycopersici* a *B. lactucae*. Paralelně s nárůstem produkce NO byl pozorován u rezistentních genotypů nárůst množství H_2O_2 , taktéž ve dvou specifických časových periodách jak v inokulovaných tak ve vzdálených neinokulovaných listech. NO a H_2O_2 tak pravděpodobně tvoří důležitou část molekulárních mechanismů rezistence rajčete k *O. neolycopersici*. Lze předpokládat synergistické působení NO a H_2O_2 v reakci rajčete na padlí.

V případě listových disků byl detekován nárůst produkce Hsp70 jako důsledek mechanického poškození rostlinného pletiva. Metodou Western blot byl prokázán vliv abiotického stresu, biotického stresu a jejich kombinace a regulační vliv koncentrace ROS a RNS na expresi Hsp70. Během experimentu byly detekovány dva proteiny Hsp70 rodiny lišící se molekulovou hmotností, a to teplotně-inducibilní protein Hsp72 a konstitutivně exprimovaný protein Hsp75. Vlivem mechanického stresu, patogeneze nebo působením modulátorů koncentrace ROS a RNS docházelo ke zvýšení exprese Hsp75 proteinu. Byla nalezena korelace mezi ROS a RNS a expresí Hsp70 proteinu.

Dále byla prokázána úloha ROS a RNS v procesu regenerace protoplastů *C. sativus* a v obranné reakci jejich buněčné suspenze vystavené působení kadmia. Z dosažených výsledků je zřejmý regulační vliv NO na regenerační proces po izolaci protoplastů a na intenzitu buněčného dělení. Buněčná suspenze *C. sativus* byla také použita pro studium vlivu oxidativního stresu na rekondenzaci repetitivních sekvencí v jádru rostlinného protoplastu. Kultivace protoplastů s kyselinou askorbovou nejen snížila hladinu oxidativního stresu, ale také pozitivně stimulovala expresi askorbátperoxidasy a katalasy, vedla k větší rekondenzaci chromatinu ve srovnání s protoplasty kultivovanými bez kyseliny askorbové, a navíc také podporovala buněčnou proliferaci. Kadmiem indukovaný nárůst produkce NO byl lokalizován

v chloroplastech, a celkových ROS a RNS v cytoplasmě. Zvýšená produkce NO patří k ranným reakcím rostlinných buněk vystavených kadmiu a je spojena s činností enzymu s NO synthasovou aktivitou. Výsledky této studie potvrzují roli NO jakožto mediátora signalizace a odezvy rostlinných buněk na krátkodobé a dlouhodobé působení kadmia.

Výsledky disertační práce dále potvrdily zapojení NO v obranných reakcích rajčete vystaveného působení abiotických stresů. Pro genotypy *Solanum lycopersicum* Mill. – WT a mutant *7B-1* byl navržen úzký vztah mezi světelnými podmínkami a obrannou reakcí spojenou s NO. Zesilující a kontrolní vliv modrého světla na obranné reakce zprostředkované oxidem dusnatým byl detekován u rostlin rajčete vystavených osmotickému a salinitnímu stresu. Jednoznačně byla také potvrzena esenciální regulační funkce NO v procesu klíčení semen.

LITERATURA

- Aoki K, Kragler F, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ (2002) A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16342-16347
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci* 82: 1227-1234
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391-396
- Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle DJ, Osmond BJ, Arntzen CJ, eds. *Photoinhibition*. Amsterdam: Elsevier, pp. 227-287
- Bai Y, van der Hulst R, Bonnema G, Marcel TC, Meijer-Deckens F, Niks RE, Lindhout P (2005) Tomato defense to *Oidium neolyopersici*: dominant *Ol* genes confer isolate-dependent resistance via a different mechanism than recessive *ol-2*. *Mol Plant-Microbe Interact* 18: 354-362
- Bailey-Serres J, Mittler R (2006) The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol* 141: 311
- Bartosz G (1997) Oxidative stress in plants. *Acta Physiol Plant* 19: 47-64
- Batak I, Devic M, Giba Z, Grubisic D, Poff K, Konjevic R (2002) The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A and phytochrome B- specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Sci Res* 12: 253-259
- Becker J, Craig EA (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 219: 11-23
- Beligni MV, Lamattina L (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221
- Beligni MV, Lamattina L (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ* 24: 267-278
- Bethke PC, Gubler F, Jacobsen JV, Jones RL (2004) Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* 219: 847-855
- Bethke PC, Libourel IGL, Reinöhl V, Jones RL (2006) Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* 223: 805-812
- Bohnert HJ, Sheveleva E (1998) Plant stress adaptations – making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol* 1: 267-274
- Bolwell GP, Wojtaszek P (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol* 51: 347-366
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* 53: 1367-1376
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ (2006) ABA induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J* 45: 113-122
- Cheng NH, Liu JZ, Brock A, Nelson RS, Hirschi KD (2006) AtGRXcp, an *Arabidopsis* chloroplastic glutaredoxin, is critical for protection against protein oxidative damage. *J Biol Chem* 281: 26280-26288
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486
- Clemens S (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707-1719

- Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, Valderrama R, Barroso JB, del Río LA (2008) Peroxisomal xanthine oxidoreductase: Characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *J Plant Physiol* 165: 1319-1330
- Crawford NM (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot* 57: 471-478
- da Silva EA, Toorop PE, van Aelst AC, Hilhorst HW (2004) Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv Rubi) seed germination. *Planta* 220: 251-261
- del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65: 783-792
- del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol* 141: 330-335
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *CMLS Cell Mol Life Sci* 57: 779-795
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC (2005) Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol Adv* 23: 131-171
- De Gara L, de Pinto MC, Tommasi F (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiol Biochem* 41: 863-870
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13454-13459
- Delledonne M, Murgia I, Ederle D, Sbicego P, Biondani A, Polverari A, Lamb C (2002) Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signalling in the plant hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol Biochem* 40: 605-610
- Delledonne M, Polverari A, Murgia I (2003) The functions of nitric oxide-mediated signalling and changes in gene expression during the hypersensitive response. *Antioxid Redox Signal* 5: 33-41
- Dempsey DA, Klessig DF (1995) Signals in plant disease resistance. *Bull Inst Pasteur* 93: 167-186
- Desikan R, Hancock JT, Neill SJ (2003) Oxidative stress signalling. *Top Curr Genet* 4: 129-149
- Desikan R, Cheng MK, Clarke A, Golding S, Sagi M, Fluhr R (2004) Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Funct Plant Biol* 31: 913-920
- Dietz K-J (2008) Redox signal integration: From stimulus to networks and genes. *Physiol Plant* 133: 459-468
- Dixon RA (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847
- Dong MA, Bufford JL, Oono Y, Church K, Dau MQ, Michels K, Houghton M, Tallman G (2007) Heat suppresses activation of an auxin-responsive promoter in cultured guard cell protoplasts of tree tobacco. *Plant Physiol* 145: 367-377
- Dos Santos C, Rey P (2006) Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends Plant Sci* 11: 329-334
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10328-10333
- Fellner M, Sawhney VK (2001) Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *Theor Appl Genet* 102: 215-221
- Fellner M, Sawhney VK (2002) The *7B-1* mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta* 214: 675-682
- Foreman J, Bothwell JH, Demidchik V, Mylona P, Miedema H, Torres MA (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446

- Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signalling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875
- Foyer CH, Vanacker H, Gómez LD, Harbinson J (2002) Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. *Plant Physiol Biochem* 40: 659-668
- Frydman J (2001) Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 70: 603-647
- Fukao T, Bailey-Serres J (2004) Plant responses to hypoxia-is survival a balancing act. *Trends Plant Sci* 9: 449-456
- Gajdová J, Navrátilová B, Smolná J, Lebeda A (2007) Factors affecting protoplast isolation and cultivation of *Cucumis* spp. *J Appl Bot Food Qual* 81: 1-6
- Garcia-Mata C, Lamattina L (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* 126: 1196-1204
- Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel JP, Plein JP, Ranjeva R, Montillet JL (2006) Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant Cell Environ* 29:1956-1969
- Giacomelli L, Masi A, Ripoll DR, Lee MJ, van Wijk KJ (2007) *Arabidopsis thaliana* deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Mol Biol* 65: 627-644
- Giba Z, Grubisic D, Todorovic S, Sajc L, Stojakovic D, Konjevic T (1998) Effect of nitric oxide - releasing compounds on phytochrome - controlled germination of Empress tree seeds. *Plant Growth Regul* 26: 175-181
- Gould KS, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells; a generalized stress response? *Plant Cell Environ* 26: 1851-1862
- Grafi G (2004) How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Dev Biol* 268: 1-6
- Greenberg JT (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 525-545
- Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV (2005) Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Curr Opin Plant Biol* 8: 1-5
- Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2389-2393
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53: 1-11
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141: 312-322
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. In *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, pp. 36-104
- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-579
- Heil M, Ton J (2008) Long-distance signalling in plant defence. *Trends Plant Sci* 13: 264-272
- Hong JK, Yun BW, Kang JG, Raja MU, Kwon E, Sorhagen K, Chu C, Wang Y, Loake GJ (2008) Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J Exp Bot* 59: 147-154
- Huang B, Xu CH (2008) Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. *J Interact Plant Biol* 50: 1230-1237
- Huang S, Ratliff KS, Schwarz MP, Spenner JM, Matouschek A (1999) Mitochondria unfold precursor proteins by unraveling them from their N-termini. *Nat Struct Biol* 6: 1132-1138
- Huang CC, Hoefs-van de Putte PM, Haanstra-van der Meer JG, Meijer-Deckens F, Lindhout P (2000) Characterization and mapping of resistance to *Oidium lycopersicum* in two *Lycopersicon hirsutum* accessions: evidence for close linkage of two *Ol*-genes on chromosome 6 of tomato. *Heredity* 85: 511-520

- Hung S-H, Yu C-W, Lin CH (2005) Hydrogen peroxide function as a stress signal in plants. *Bot Bull Acad Sin* 46: 1-10
- Iba K (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 53: 225-245
- Inzé D, Van Montagu M (1995) Oxidative stress in plants. *Curr Biol* 6: 153-158
- Jiang M, Zhang J (2002) Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta* 215: 1022-1030
- Kacperska A (2004) Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? *Physiol Plant* 122: 159-168
- Karpinska B, Wingsle G, Karpinski S (2000) Antagonistic effects of hydrogen peroxide and glutathione on acclimation to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *IUBMB Life* 50: 21-26
- Karpinska B, Karlsson M, Schinkel H, Streller S, Süß K-H, Melzer M, Wingsle G (2001) A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. Expression, regulation, and protein localization. *Plant Physiol* 126: 1668-1677
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P (1999) Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284: 654-657
- Karpinski S, Gabryś H, Mateo A, Karpinska B, Mullineaux PM (2003) Light perception in plant disease defence signalling. *Curr Opin Plant Biol* 6: 390-396
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91(phox) subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* 10: 255-266
- Kiss L, Cook RTA, Saenz GS, Cunnington JH, Takamatsu S, Pascoe I, Bardin M, Nicot PC, Sato Y, Rossman Y (2001) Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. *Mycol Res* 105: 684-697
- Klepper L (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmos Environ* 13: 537-542
- Kopyra M, Stachon-Wilk M, Gwózdź EA (2006) Effects of endogenous nitric oxide on the antioxidant capacity of cadmium-treated soybean cell suspension. *Acta Physiol Plantarum* 28: 525-536
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* 40: 37-44
- LaIoi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol* 7: 323-328
- Laloi C, Stachowiak M, Pers-Kamczyc E, Warzych E, Murgia I, Apel K (2007) Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signalling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 672-677
- Lamattina L, Garcia-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* 54: 109-136
- Lane BG (1994) Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *FASEB J* 8: 294-301
- Larkindale J, Knight MR (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol* 128: 682-695
- Lebeda A (1999): *Pseudoperonospora cubensis* on *Cucumis* spp. and *Cucurbita* spp. - resistance breeding aspects. *Acta Hort* 492: 363-370
- Lebeda A, Mieslerová B (1999) Identification, occurrence and host range of tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*) in the Czech Republic. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 34: 13-25
- Lebeda A, Pink DAC, Astley D (2002) Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). In P. T. N. Spencer-Phillips, U. Gisi, & A. Lebeda (Eds.), *Advances in downy mildew research*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 85-117

- Lebeda A, Sedlářová M, Lynn J, Pink DAC (2006) Phenotypic and histological expression of different genetic backgrounds in interactions between lettuce, wild *Lactuca* spp., *L. sativa* × *L. serriola* hybrids and *Bremia lactucae*. *Eur J Plant Pathol* 115: 431-441
- Lebeda A, Petrželová I, Maryška Z (2008a) Structure and variation in the wild-plant pathosystem: *Lactuca serriola*-*Bremia lactucae*. *Eur J Plant Pathol* 122: 127-146
- Lebeda A, Sedlářová M, Petřivalský M, Prokopová J (2008b) Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: A case study of *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae*. *Eur J Plant Pathol* 122: 71-89
- Leshem YY (2001) Nitric oxide in plants. Kluwer Academic Publishers, London
- Leshem Y, Melamed-Book N, Cagnac O, Ronen G, Nishri Y, Solomon M, Cohen G, Levine A (2006) Suppression of *Arabidopsis* vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂ - containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18008-18013
- Li C, Bonnema AB, Che D, Dong L, Lindhout P, Visser RGF, Bai Y (2007) Biochemical and molecular mechanisms involved in monogenic resistance responses to tomato powdery mildew. *Mol Plant-Microbe Interact* 20: 1161-1172
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Gene* 22: 631-677
- Liu Q, Yu ZG, Kuang WC (2004) Ethylene signal transduction in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol Mol Biol* 30: 241-250
- Low PS, Merida JR (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol Plant* 96: 533-542
- Lynch J, Polito VS, Lauchli A (1989) Salinity stress increases cytoplasmic Ca activity in maize root protoplasts. *Plant Physiol* 90: 1271-1274
- Ma JF, Ueno D, Zhao FJ, McGrath SP (2005) Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 220: 731-739
- Mahalingam R, Federoff N (2003) Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. *Physiol Plant* 119: 56-68
- Mateo A, Funck D, Mühlenbock P, Kular B, Mullineaux PM, Karpinski S (2006) Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *J Exp Bot* 57: 1795-1807
- Matés JM (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153: 83-104
- Mieslerová B, Lebeda A, Kennedy R (2004) Variation in *Oidium neolycopersici* development on host and non-host plant species and their tissue defence responses. *Ann Appl Biol* 144: 237-248
- Miller G, Suzuki N, Rizhsky L, Hegie A, Koussevitzky S, Mittler R (2007) Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiol* 144: 1777-1785
- Miller G, Shulaev V, Mittler R (2008) Reactive oxygen signalling and abiotic stress. *Physiol Plant* 133: 481-489
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11: 15-19
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498
- Mlíčková K, Luhová L, Lebeda A, Mieslerová B, Peč P (2004) Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiol Biochem* 42: 753-761
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IM, Magalhaes JR, Salgado I (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett* 579: 3814-3820
- Möller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 561-591

- Mur LA, Santosa IE, Laarhoven LJ, Holton NJ, Harren FJ, Smith AR (2005) Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars. *Plant Physiol* 138: 1247-1258
- Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signalling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* 140: 249-262
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* 59: 501-520
- Nagata T, Takebe I (1971) Planting of isolated tobacco mesophyll protoplasts on organic medium. *Planta* 99: 12-20
- Navrátilová B (2003) Konstrukce a biologická charakteristika mezirodového somatického hybridu *Armobrassica*. Doktorská disertační práce. Olomouc, pp. 9-14
- Navrátilová B (2004) Protoplast cultures and protoplast fusion focused on *Brassicaceae* – a review. *Hort Sci* 31: 140-157
- Neill S, Desikan R, Hancock J (2002a) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 388-395
- Neill S, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock J (2002b) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53: 1237-1247
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol* 159: 11-35
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-279
- Noronhadutra AA, Epperlein MM, Woolf N (1993) Reaction of nitric-oxide with hydrogen-peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing. *FEBS Lett* 321: 59-62
- Ondřej V, Kitner M, Doležalová I, Nádvorník P, Navrátilová B, Lebeda A (2009) Chromatin structural rearrangement during dedifferentiation of protoplasts of *Cucumis sativus* L. *Mol Cells* 27: 443-447
- Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA (2002) Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. *Plant Physiol Biochem* 40: 549-559
- Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27: 437-496
- Parys E, Romanowska E, Siedlecka M, Poskuta JW (1998) The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiol Plant* 20: 313-322
- Peng LT, Jiang YM, Yang SZ, Pan SY (2005) Accelerated senescence of fresh-cut Chinese water chestnut tissues in relation to hydrogen peroxide accumulation. *J Plant Physiol Mol Biol* 31: 527-532
- Petřek J, Vlašínová H, Havel L, Adam V, Babula P, Víteček J, Bartůček K, Potěšil D, Kizek R (2006) Organizace embryí ve shlucích raných somatických embryí smrku stepilého (*Picea albies* /L./ Karst.). *Sborník MendelNet04Agro.*: 104-109
- Petřivalský M, Kočířová J, Sedlářová M, Piterková J, Luhová L, Lebeda A (2007) On the role of nitric oxide in *Bremia lactucae* pathogenesis on *Lactuca sativa*. In: *Advances in Downy Mildew Research*, Vol. 3 (Lebeda, A. and Spencer-Phillips, P.T.N., eds), pp. 175-184. Olomouc and Kostelec na Hané, Czech Republic: Palacký University in Olomouc and JOLA
- Piterková J, Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P (2005) Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem Listy* 99: 455-466
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and regulatory role of hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74
- Prats E, Mur LAJ, Sanderson R, Carver TLW (2005) Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Mol Plant Pathol* 6: 65-78

- Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J, a kol. (1998) Fyziologie rostlin. Academia, Praha, pp. 412-431
- Quan L-J, Zhang B, Shi W-W, Li H-Y (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J Integr Plant Biol* 50: 2-18
- Ramos I, Esteban E, Lucena JJ, Gárate A (2002) Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. *Plant Sci* 162: 761-767
- Rao DLN, Giller KE, Yeo AR, Flowers TJ (2002) The effects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann Bot* 89: 563-570
- Raška M, Weigl E (2005) Heat shock proteins in autoimmune diseases. *Biomed Pub Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149: 243-249
- Rivetta A, Negrini N, Cocucci M (1997) Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ* 20: 600-608
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum Sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ* 29:1532-1544
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Mattè A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AME, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz K-J, Delledonne M (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* 19: 4120-4130
- Sawhney VK (1997) Genetic male sterility. In: Shivanna KR, Sawhney VK (eds) Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 183-198
- Sawhney VK (2004) Photoperiod-sensitive male-sterile mutant in tomato and its potential use in hybrid seed production. *J Horti Sci Biotech* 79: 138-141
- Sedlářová M, Luhová L, Petřivalský M, Lebeda A (2007) Localization and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. *Plant Physiol Biochem* 45: 607-616
- Sheen J (2001) Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* 127: 1466-1475
- Shetty NP, Jørgensen HJL, Jensen JD, Collinge DB, Shetty HS (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur J Plant Pathol* 121: 267-280
- Song F, Goodman RM (2001) Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signalling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Mol Plant-Microbe Interact* 14: 1458-1462
- Song L, Ding W, Zhao M, Sun B, Zhang L (2006) Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Sci* 171: 449-458
- Svedružić D, Jónsson S, Toyota CG, Reinhardt LA, Ricagno S, Lindquist Y, Richards NGJ (2005) The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 433: 176-192
- Ślesak I, Karpinska B, Surówka E, Miszalski Z, Karpinski S (2003) Redox changes in the chloroplast and hydrogen peroxide are essential for regulation of C3-CAM transition and photooxidative stress responses in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Physiol* 44: 573-581
- Ślesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica* 54: 39-50
- Tada Y, Mori T, Shinogi T, Yao N, Takahashi S, Betsuyaku S, Sakamoto M, Park P, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2004) Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 245-253

- Tessadori F, Chupeau MCh, Chupeau Y, Knip M, Germann S, van Driel R, Fransz P, Gaudin V (2007) Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated *Arabidopsis* cells. *J Cell Sci* 120: 1200-1208
- Thomas DD, Liu ZP, Kantrow SP, Lancaster JR (2001) The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 355-360
- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 571-599
- Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P, Lebeda A (2006) Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiol Mol Plant Pathol* 68: 22-32
- Torres MA, Dangl JL (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* 8: 397-403
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signalling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141: 373-378
- Vacca RA, de Pinto MC, Valenti D, Passarella S, Marra E, De Gara L (2004) Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol* 134: 1100-1112
- Van Breusegem F, Bailey-Serres J, Mittler R (2008) Unravelling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. *Plant Physiol* 147: 978-984
- Vlot AC, Klessig D, Park SW (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr Opin Plant Biol* 11: 436-442
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 9: 244-251
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signalling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* 6: 177-183
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defense responses. *Curr Opin Plant Biol* 7: 449-455
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ* 31: 622-631
- Wink DA, Mitchell JB (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biol Med* 25: 434-456
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322: 681-692
- Yu C-W, Murphy TM, Lin C-H (2003) Hydrogen peroxide- induced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation. *Funct Plant Biol* 30: 955-963
- Zaninotto F, Camera SL, Polverari A, Delledonne M (2006) Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol* 141: 379-83
- Zentella R, Yamauchi D, Ho TH (2002) Molecular dissection of the gibberellin/abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in barley aleurone cells. *Plant Cell* 14: 2289-2301
- Zhang X-P, Glaser E (2002) Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci* 7: 14-21
- Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B, Zhang L (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol* 134: 849-857

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina askorbová
ABA	kyselina abscisová
APX	askorbátperoxidasa
BM	základní medium
cADPR	cyklická adenosindifosfát ribosa
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
cPTIO	2-(4-karboxy-2-fenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
CAT	katalasa
DAF-2 DA	4,5-diaminofluoresceindiacetát
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceindiacetát
DPI	difenyliodonium
DTT	dithiotreitol
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
ETC	elektronový transportní řetězec
FAD	flavinadeninukleotid
FDA	fluorescein diacetát
FMN	flavinmononukleotid
FW	čerstvá váha
GA	kyselina gibberelová
GPX	glutathionperoxidasa
GSNO	S-nitrosoglutathion
hpi	hodin po inokulaci
H ₂ DCF DA	2',7'-dichlorofluorescein diacetát
HR	hypersenzitivní reakce
Hsp	"heat shock" protein
HS	teplotní stres
JA	kyselina jasmonová
L-NAME	N(G)-nitro-L-argininmethylester
LEA proteiny	"late embryogenesis abundant" protein
NiNOR	nitrit:NO reduktasa
MAPK	proteinkinasy aktivované mitogenem
MS	mechanický stres
MS medium	medium Murashige and Skoog
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NO	oxid dusnatý
NOS	synthasa oxidu dusnatého

NR	nitrátreduktasa
PCD	programovaná buněčná smrt
PET	fotosynthetický elektronový transportní řetězec
PM	plasmatická membrána
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
POX	peroxidasa
Prx	peroxiredoxin
PR protein	patogenezi příbuzný protein
PS	stres vyvolaný působením patogenu
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
PTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
PV	primární váček
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SA	kyselina salicylová
SAR	systemově získaná rezistence
SD	směrodatná odchylka
SNG	S-nitrosoglutathion
SNP	nitroprusid sodný
SOD	superoxiddismutasa
SV	sekundární váček
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin
WT	divoký druh ("wild type")
XOD	xanthinoxidasa

SEZNAM AUTORSKÝCH PRACÍ

Publikované a přijaté články

Piterková J, Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P (2005) Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické Listy* 99, 455-466

Piterková J, Luhová L, Petřivalský M (2008) Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické listy* 102, 410-416

Piterková J, Petřivalský M, Luhová L, Mieslerová B, Sedlářová M, Lebeda A (2009) Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Molecular Plant Pathology* 10(4), 501-513

Ondřej V, Navrátilová B, Protivánková I, Piterková J, Sedlářová M, Luhová L, Lebeda A (2010) Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 1-7, doi:10.1093/jxb/erq067

Sedlářová M, Petřivalský M, Piterková J, Kočířová J, Luhová L, Lebeda A (2010) Influence of nitric oxide and reactive oxygen species on development of lettuce downy mildew in *Lactuca* spp. *European Journal of Plant Pathology* 128(1), v tisku.

Články připravené k publikování

Piterková J, Ryzí M, Luhová L, Navrátilová B, Sedlářová M, Petřivalský M (2010) Nitric oxide and reactive oxygen species are involved in early and long-term responses of cucumber cells to cadmium. *Plant Cell Physiology*

Petřivalský M, Vaníčková P, Ryzí M, Navrátilová B, Piterková J, Luhová L (2010) Interplay of reactive nitrogen and oxygen species in the regeneration and growth of cucumber cells from isolated protoplasts. *Plant Cell Reports*

Piterková J, Hofman J, Petřivalský M, Mieslerová B, Sedlářová M, Lebeda A, Luhová L (2010) Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp. - *Oidium neolycopersici* interactions. *Environmental and Experimental Botany*

Piterková J, Matulková Z, Luhová L, Mieslerová B, Petřivalský M (2010) Nitric oxide influences Hsp70 accumulation in tomato leaves in response to mechanical injury, heat shock and pathogen infection. *Plant Cell and Environment*

Piterková J, Luhová L, Hofman J, Turečková V, Novák O, Petřivalský M, Fellner M (2010) Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*

PREZENTACE VÝSLEDKŮ NA KONFERENCÍCH

(Osobní účast označena *)

1. XI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, 31. 1. - 1. 2. 2007:
 - J. Piterková*, L. Luhová, M. Petřivalský: Studium katabolismu polyaminů v podmínkách salinitního stresu u hrachu setého. Poster
 - M. Petřivalský, J. Piterková*, L. Luhová: Úloha oxidu dusnatého při biotickém stresu rostlin. Prezentace, přednášející M. Petřivalský
2. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin, Praha, 21. 3. - 22. 3. 2007:
 - J. Piterková*, L. Luhová, M. Petřivalský, B. Mieslerová, J. Hofman, Š. Adámková, A. Lebeda: Studium úlohy oxidu dusnatého v průběhu patogeneze u *Lycopersicon* spp.. Poster
 - M. Petřivalský, J. Kočířová, M. Sedlářová, J. Piterková*, L. Luhová, A. Lebeda: Studium úlohy oxidu dusnatého v průběhu patogeneze u *Lactuca* spp.. Prezentace, přednášející M. Petřivalský
3. 11. dny fyziologie rostlin aneb Konference experimentální biologie rostlin, Olomouc, 9. 7. - 12. 7. 2007:
 - V. Vinter, M. Sedlářová, J. Piterková*, L. Luhová, M. Petřivalský: Signální role oxidu dusnatého při klíčení pylu *Cucumis sativus*. Poster
 - J. Piterková*, B. Gunsé, Ch. Poschenrieder, J. Barcelo, L. Luhová, M. Petřivalský: Studium vlivu salinitního stresu na růst, osmotický potenciál, vodní poměr, fotosyntézu a akumulaci iontů v hrachu. Poster
 - J. Hofman, L. Luhová, J. Piterková*, M. Petřivalský, M. Fellner: Úloha oxidu dusnatého při klíčení mutanta *7B-1 Lycopersicon esculentum* Mill. v podmínkách osmotického stresu. Poster
4. ROS in plants: Reactive oxygen and nitrogen species in plants, Ghent, Belgie, 12. 9. - 14. 9. 2007:
 - J. Piterková, B. Mieslerová, M. Sedlářová, L. Luhová, M. Petřivalský: The role of nitric oxide in local and systemic defense response of *Lycopersicon* spp. to *Oidium neolyopersici* infection. Poster
5. XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, 6. 2. - 7. 2. 2008:
 - J. Piterková*, J. Hofman, L. Luhová, B. Mieslerová, M. Petřivalský: Účast aktivních forem kyslíku a dusíku v průběhu patogeneze *Oidium neolyopersici* na listových discích *Lycopersicon* spp.. Poster
 - J. Piterková*, L. Luhová, M. Petřivalský, J. Hofman, M. Fellner: The role of nitric oxide in defence mechanisms of tomato during osmotic and salinity stress. Přednáška
6. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin, Praha, 12. 2. - 13. 2. 2008:
 - J. Piterková*, J. Hofman, L. Luhová, B. Mieslerová, M. Petřivalský: Účast aktivních forem kyslíku a dusíku v průběhu patogeneze *Oidium neolyopersici* na listových discích *Lycopersicon* spp.. Poster
7. International Conference on Plant Biotic Interaction (ICBPI), Brisbane, Austrálie, 27. 3. - 29. 3. 2008:
 - J. Prokopová, B. Mieslerová, J. Piterková, V. Hlaváčková, J. Hlavinka, M. Špundová, J. Nauš: Effect of heat shock pre-treatment of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* cv. Amateur) on their resistance to biotrophic pathogen (*Oidium neolyopersici*) infection. Poster

- H. Kyseláková, J. Prokopová, J. Nauš, L. Luhová, J. Piterková, M. Sedlářová, O. Novák, P. Ilík, M. Navrátil: Photosynthetic and oxidative responses of pea leaves to progressive infection due to *Pea enation mosaic virus* (PEMV). Poster
8. XVIth Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB), Tampere, Finsko, 17. 8. - 22. 8. 2008:
 - J. Piterková*, J. Hofman, M. Petřivalský, L. Luhová, B. Mieslerová, A. Lebeda: The involvement of nitric oxide in the development of *Oidium neolycopersici* on the leaf discs of *Lycopersicon* spp.. Poster
 9. 2nd International Plant NO Club Workshop, Dijon, Francie, 21. 7. - 22. 7. 2008:
 - M. Sedlářová, M. Kitner, A. Lebeda, J. Piterková, L. Luhová, M. Petřivalský, H. Kyseláková, M. Navrátil, L. Švábová: Reactive nitrogen and oxygen species in pea responses to biotic stress stimuli. Poster
 10. XXI. Biochemický sjezd České polečnosti pro biochemii a molekulární biologii a Slovenské společnosti pre biochemii a molekulárnu biológiu, České Budějovice, 14. 9. - 17. 9. 2008:
 - J. Piterková*, Z. Matulková, L. Luhová, M. Petřivalský, B. Mieslerová, A. Lebeda: The comparison of the development of *Oidium neolycopersici* on the leaf and leaf discs of *Lycopersicon* spp. exposed to heat and cold shock pre-treatment. Poster
 11. XIII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, 14. 4. - 15. 4. 2009:
 - J. Piterková*, P. Moricová, L. Luhová, M. Petřivalský, M. Fellner: The relationship between nitric oxide production and plant hormone gibberelic acid during germination and growth of tomato exposed to osmotic stress. Poster
 12. Annual Main Meeting of the Society for Experimental Biology, Glasgow, UK, 28. 6. - 1. 7. 2009:
 - J. Piterková*, P. Moricová, L. Luhová, M. Petřivalský, M. Fellner: The relationship between nitric oxide production and plant hormone gibberelic acid during germination and growth of tomato exposed to osmotic stress. Poster
 13. Plant ROS 2009, Helsinki, Finsko, 8. 7. - 10. 7. 2009:
 - J. Piterková, M. Ryzí, P. Škapová, L. Luhová, B. Navrátilová, M. Sedlářová, M. Petřivalský: The role of reactive nitrogen and oxygen species in responses of cucumber cells to cadmium. Poster
 - M. Sedlářová, M. Petřivalský, L. Luhová, J. Piterková, B. Mieslerová, A. Lebeda: RNOS in pathogenesis of biotrophic fungal plant pathogens. Poster
 14. The 6th International Symposium – Nitric Oxide, Tucepi, Chorvatsko, 16. 9. - 21. 9. 2009:
 - J. Piterková*, L. Luhová, M. Petřivalský: The study of reactive nitrogen species in plants exposed to stress factors treatment. Prezentace
 15. X. Mezioborové setkání mladých vědeckých a výzkumných pracovníků, hotel Devět skal v CHKO Žďárské vrchy, 25. 5. - 28. 5. 2010:
 - J. Piterková*, L. Luhová, M. Petřivalský, Z. Matulková, B. Mieslerová: Vliv oxidu dusnatého na produkci heat shock proteinů. Poster
 16. XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB), Valencia, Španělsko, 4. 7. - 9. 7. 2010:
 - J. Piterková*, L. Luhová, M. Petřivalský, Z. Matulková, B. Mieslerová: Hsp70 expression in *Lycopersicon* spp. in response to abiotic and biotic stresses and their combination. Poster

ŽIVOTOPIS

Jana Piterková

Vzdělání

2001 – 2010 Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, obor Biochemie

» Doktorské prezenční studium

Státní doktorská zkouška úspěšně složena v roce 2009

Obhajoba disertační práce: předpokládaný termín červen 2010

Disertační práce na téma: „Studium reaktivních forem dusíku a kyslíku u rostlin vystavených působení stresových faktorů“

» Magisterské studium, titul Mgr. získán 2006

Diplomová práce na téma: „Studium vlivu salinitního stresu na aktivitu enzymu aminoaldehyddehydrogenasy v hrachu setém“

» Bakalářské studium, titul Bc. získán 2004

Bakalářská práce na téma: „Úloha enzymů v oxidativním stresu rostlin“

1995 – 2001 Slovanské gymnázium Olomouc, přírodovědná větev

Pracovní zkušenosti

- » 2007 – 2010 Univerzita Palackého, Olomouc
Pozice: vědecký pracovník (Výzkumný záměr MSM 6198959215)
Náplň práce: výzkum v oblasti zapojení aktivních forem kyslíku a dusíku v obranných reakcích rostlin

Řešené projekty

- » Projekt OPVK - CZ.1.07/2.3.00/09.0018, AescuLab – systematické laboratorní vzdělávání studentů a pracovníků VaV v oblasti Life Sciences s podporou e-learningu (2009-2010), řešitel doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D., Katedra biochemie PřF UP, autorka dvou modulů
- » Výzkumný záměr MSM 6198959215 – Variabilita složek a interakcí v rostlinném patosystému a vliv faktorů prostředí na jejich projev (2007-2009), řešitel prof. RNDr. Aleš Lebeda, DrSc., Katedra botaniky PřF UP, členka řešitelského týmu
- » Fond rozvoje vysokých škol G4/1442/2008 – Lokalizace a kvantifikace produkce oxidu dusnatého u rostlin vystavených působení stresových faktorů (2008), hlavní řešitelka

Pracovní pobyt v zahraničí

- » Universitat Autònoma de Barcelona, Laboratori de Fisiologia Vegetal, Barcelona, Španělsko, březen – červen 2007, zahraniční stáž v rámci projektu Sokrates – Erasmus