

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

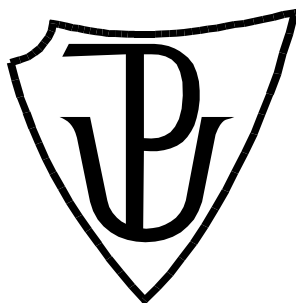
Olomouc 2016

Vendula Večeřová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



ZMĚNY ANATOMIE A METABOLISMU RONS U RAJČETE

Diplomová práce

Vendula Večeřová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016 Vedoucí práce: Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.

Katedra botaniky, PřF UP v Olomouci

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Vendula Večeřová
Název práce	Změny anatomie a metabolismu RONS u rajčete
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů PřF UP a AV ČR
Vedoucí práce	doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D. Katedra botaniky PřF UP v Olomouci
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	Diplomová práce byla věnována studiu anatomie a fyziologie dvou genotypů rajčete, <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Rutgers (WT) a jeho mutantní formy <i>7B-1</i> , jež se vyznačuje samčí sterilitou. Mikroskopické studium anatomie samčích reprodukčních orgánů odhalilo rozdíly ve vývoji prašníků v květech rostlin WT a mutantu <i>7B-1</i> . U mutantní rostliny rajčete byly pozorovány nerovnoměrně se vyvíjející prašníky, abnormálně vyvinuté tapetum, pozastavený vývoj mikrospor, snížená degradace kalózy a změny v lokalizaci RONS. Po inokulaci plísni <i>Phytophthora infestans</i> byly v listech stanoveny změny hladiny H ₂ O ₂ . Rozdíly v reakci na infekci byly pozorovány pouze 120 hpi, kdy u mutantu <i>7B-1</i> došlo k poklesu koncentrace, kdežto u WT k nárůstu
Klíčová slova	kalóza, konfokální mikroskopie, <i>Phytophthora infestans</i> , prašníky, reaktivní formy kyslíku a dusíku, <i>Solanum</i> spp., spektrofotometrie
Počet stran	69
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Vendula Večeřová
Title of thesis	Changes in anatomy and metabolism of RONS in tomato
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic
Supervisor	assoc. prof., Dr. Michaela Sedlářová Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
The year of presentation	2016
Abstract	My thesis focused on the anatomy and physiology of two tomato genotypes, <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Rutgers (WT) and mutant <i>7B-1</i> , which is characterized by male-sterility. Microscopy revealed differences in anther development between WT and mutant <i>7B-1</i> . Several defects were observed in the male reproductive organs of mutant <i>7B-1</i> , including uneven development of anthers, abnormal tapetum, cessation of microspore development, decreased callose degradation and changes in RONS localisation. Levels of H ₂ O ₂ in the leaves of both genotypes were measured following inoculation by <i>Phytophthora infestans</i> . Differences in host reactions were observed only 120 hpi, when hydrogen peroxid levels decreased in mutant <i>7B-1</i> while these increased in WT
Keywords	anthers, callose, confocal microscopy, <i>Phytophthora infestans</i> , reactive oxygen and nitrogen species, <i>Solanum</i> spp., spectrophotometry
Number of pages	69
Number of appendices	0
Language	Czech

Práce byla podpořena interními granty Univerzity Palackého v Olomouci IGA_PrF_2015_001 a IGA_PrF_2016_001.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a uvedla veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. z Katedry botaniky PřF UP za cenné rady, poskytnutí studijních materiálů, odborné vedení a hlavně trpělivost během mé práce.

Mé poděkování patří také kolektivu Katedry biochemie PřF UP, především Mgr. Tereze Tiché a členům Skupiny molekulární fyziologie, zejména Mgr. Renátě Plotzové a Vahidu Omidvarovi, Ph.D. za pomoc při experimentech.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mi byla oporou po celou dobu mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. CÍLE PRÁCE	9
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
3.1. Vývoj rostliny.....	10
3.1.1. Reprodukční orgány krytosemenných rostlin.....	10
3.1.1.1 Ontogeneze květu	11
3.1.1.2. Anatomie květu	12
3.1.1.2.1. Samičí reprodukční orgány	13
3.1.1.2.2. Samčí reprodukční orgány	14
3.2. Vliv stresových faktorů	16
3.3. Modelové organismy.....	17
3.3.1. <i>Solanum lycopersicum</i> L.	17
3.3.2. Mutantní rostlina rajčete <i>7B-1</i>	19
3.3.3. <i>Phytophthora infestans</i>	20
3.5. Metabolismus a role reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) u rostlin.....	22
3.5.1. Reaktivní formy kyslíku	22
3.5.2. Reaktivní formy dusíku	25
3.5.3. Role RONS v obranných mechanismech infikovaných rostlin	29
3.6. Metody studia RONS	32
3.6.1. Mikroskopické metody	32
3.6.1.1. Fluorescenční mikroskopie	37
3.6.1.2. Konfokální mikroskopie	38
3.6.2. Spektrofotometrické metody	39
3.6.3. EPR.....	41
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
4.1. Materiál	42
4.1.1. Rajče	42
4.1.2. <i>Phytophthora infestans</i>	42
4.2. Metody	42
4.2.1. Studium anatomie květů	42
4.2.1.1. Příprava poly-L-lysinových skel.....	43
4.2.1.2. Zalévání a řezání	43
4.2.1.3. Barvení a detekce kalózy fluorescenční mikroskopií	44
4.2.2. Histochemická detekce RONS konfokální mikroskopií.....	45
4.2.3. Inokulace rostlin	46
4.2.4. Stanovení hladiny peroxidu vodíku v infikovaných listech	47
5. VÝSLEDKY	48
5.1. Studium anatomie květů.....	48
5.2. Lokalizace RONS v prašnicích	52
5.3. Stanovení hladiny peroxidu vodíku v infikovaných listech	54
6. DISKUSE	56
7. LITERATURA	61
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	69

1. ÚVOD

Pro vědecké studie v rostlinné fyziologii a genetice se často využívají modelové rostliny a od nich odvozené mutantní linie. Jedním z oblíbených modelů je i *Solanum lycopersicum* L., rajče jedlé. Mutant *7B-1* se samčí sterilitou byl izolován z populace rajčete cv. Rutgers (dále jen „wild-type“, WT). Bylo prokázáno, že mutant *7B-1* je odolnější vůči biotickému a abiotickému stresu, zejména díky nadprodukci kyseliny abscisové, a že tolerance vůči stresu se zvyšuje působením modrého světla.

Ve své diplomové práci se zaměřuji na rozdíly ve vývoji prašníků v květech rostlin WT a mutantu *7B-1*. V různých časových intervalech byl mikroskopicky sledován vývoj a stavba květů, detekována kalóza a reaktivní formy kyslíku a dusíku. Byla provedena i předběžná studie změn hladiny peroxidu vodíku po infekci listů plísní *Phytophthora infestans*.

2. CÍLE PRÁCE

Cíle této diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Zpracování literární rešerše k dané problematice: reprodukční orgány krytosemenných rostlin; metabolismus a role reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) v ontogenezi rostlin; role RONS během infekce rostlin; charakteristika fytoftor
2. Studium anatomie během vývoje samčích reprodukčních orgánů u rajčete – srovnání WT a mutantní rostliny *7B-1*; histochemická lokalizace kalózy a RONS fluorescenční a konfokální laserovou skenovací mikroskopií
3. Studium symptomů a patofyziologie rajčete (spektrofotometrické stanovení změn hladin peroxidu vodíku) po infekci *Phytophthora infestans* – srovnání u WT a mutantu *7B-1*

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Vývoj rostliny

Individuální vývoj rostliny neboli ontogeneze je období od jejího vzniku až po její úhyn. Během tohoto období dochází ke kvalitativním změnám ve stavbě, látkové přeměně i aktivitě rostliny i jejích částí. U vyšších rostlin ontogeneze zahrnuje vývoj embrya od vzniku zygoty až po dozrání semen, klíčení semen, tvorbu vegetativních orgánů, vegetativní rozmnožování, tvorbu pohlavních buněk, pohlavní rozmnožování a stárnutí. Rostliny mohou také procházet obdobím vegetačního klidu tzv. dormancí, kdy se zastavuje jejich růst a výrazně se utlumí jejich metabolická aktivita.

Růst rostliny je spojen s dělením buněk, jejich zvětšováním a následnou diferenciací. Tyto procesy jsou ovlivněny řadou faktorů, které rozlišujeme na faktory vnější a vnitřní. K nejvýznamnějším vnitřním faktorům se řadí fytohormony (růstové regulátory), které buď růst povzbuzují (stimulátory) nebo ho mohou brzdit (inhibitory). V současné době máme nejvíce informací o fytohormonech patřících do skupin auxinů, gibberelinů a cytokininů. K dalším významným fytohormonům se řadí kyselina abscisová a etylén. Působení fytohormonů není jednotné, je závislé na vývojovém stavu jednotlivých orgánů, na interakcích s dalšími fytohormony a na mnoha dalších vnitřních a vnějších faktorech. Proto se nedá zobecňovat vliv jednotlivých fytohormonů na růstové procesy. Dále je růst rostlin v přírodě ovlivňován desítkami různých fyzikálně-chemických faktorů, které jsou ve vzájemných interakcích. Mezi nejdůležitější vnější faktory patří záření, teplota, množství vody a živin (Pavlová L., 2006).

3.1.1. Reprodukční orgány krytosemenných rostlin

K reprodukci krytosemenných rostlin slouží květ, který představuje soubor specializovaných orgánů určených k pohlavnímu rozmnožování. Úplný květ se skládá z květních obalů a vlastních reprodukčních orgánů – tyčinek a pestíků (Vinter, 2008).

Květy jsou značně variabilní, a to především z hlediska velikosti, tvaru, barvy, délky a doby kvetení. Nejmenší květy dosahují velikosti kolem 0,5 mm, naopak největší květy mohou být velké 1,5 m a jejich hmotnost se pohybuje kolem sedmi kilogramů. Doba kvetení se u krytosemenných rostlin liší od několika minut po půl roku (Novák *et* Skalický, 2008).

3.1.1.1 Ontogeneze květu

Květy se tvoří ve formě květních primordií z periferních apikálních meristémů stonku. V první fázi se zakládají květní obaly, následně tyčinky a nakonec pestík. Zakládání květních orgánů je vysoce řízený proces, který je ovlivňován řadou faktorů vnitřních (fytohormony) a vnějších (délka dne). Jemné regulační mechanismy zajišťují časovou posloupnost a přesné prostorové uspořádání jednotlivých částí květu. Vývoj tyčinek a pestíků ovlivňují rostlinné hormony auxiny, cytokininy a gibereliny (Vinter, 2008).

Současné chápání ontogeneze květu vychází z nejnovějších znalostí o genetickém základu tvoření květních orgánů. Podle genetických poznatků byl vytvořen tzv. „ABC MADS-box“ model vývoje květu, představující univerzální vysvětlení vzniku a diferenciaci jednotlivých květních orgánů. Studie u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) odhalily změny v morfologii květu v důsledku mutací. Zjistilo se, že za uspořádání květních částí zodpovídají tři skupiny genů orgánové identity, tzv. „MADS-box geny“. Produktem těchto skupin genů jsou transkripční faktory, které regulují expresi genů, zodpovídajících za vývoj jednotlivých květních orgánů. Exprese genů skupiny A vede ke vzniku kalichu, kombinovaná exprese skupin genů A, B vede ke vzniku koruny, exprese B a C ovlivňuje vývoj andrecea a geny skupiny C tvorbu gynecea (Campbell *et* Reece, 2006). Další výzkumy na mutantních rostlinách *Arabidopsis* byly provedeny pro zjištění, které látky v rostlině aktivují a dále ovlivňují kvetení. Vědci označili za potenciální aktivátory kvetení geny CONTANS (CO) a FLOWERING LOCUS T (FT), které se nacházejí v listech a ostatních vegetativních částech rostliny. Gen FT neboli florigen ovlivňuje zakládání generativních orgánů, s tím i nástup kvetení. Florigen je dále regulován nadřazeným genem CO. Regulační dráha kvetení byla objasněna u topolu (*Populus*). U topolu zodpovídá za vnímání délky dne fytohormon A, který reguluje činnost genu CO a ten následně spouští produkci genu FT. Tato kaskáda genů ovlivňuje proces anatomických změn v růstovém vrcholu a zakládání květů a reprodukčních orgánů. Dalším prozkoumaným genem je TERMINAL FLOWER LIKE1, který je velice podobný genu FT, ale jeho účinky jsou opačné, jeho činností je nástup kvetení blokován (Smýkal, 2008).

3.1.1.2. Anatomie květu

Klasický květ je složen z květních obalů a vlastních reprodukčních orgánů – samičích pestíků a samčích tyčinek. Květní obal (periant) je soubor přeměněných listů, jeho funkcí je ochrana tyčinek a pestíků, láká opylovače a dále se může podílet na stavbě plodu. Podle utváření květních obalů lze květy rozlišit na achlamydeické (květní obaly nevytvářejí), homochlamydeické (mají nerozlišené květní obaly, vytvářejí tzv. okvětí (perigon)). Heterochlamydeické květy mají květní obaly rozlišené na kalich (calyx) a korunu (corolla).

Rostliny se dále rozdělují na jednopohlavné nebo oboupohlavné podle přítomnosti či nepřítomnosti tyčinek a pestíků. Květy oboupohlavných rostlin (obr. 1) mají funkční pestíky i tyčinky, naopak rostliny jednopohlavné obsahují jen pestíky nebo tyčinky. Vyskytují-li se na rostlině zároveň květy samčí i samičí jedná se o rostlinu jednodomou. Dvoudomá rostlina vytváří na jedné rostlině pouze květy samčí nebo samičí (Campbell *et* Reece, 2006, Vinter *et* Macháčková, 2013).



Obr. 1 : Schéma oboupohlavného květu krytosemenných rostlin

3.1.1.2.1. Samičí reprodukční orgány

Pestík (pistillum) je samičí pohlavní orgán krytosemenných rostlin. Vzniká srůstem jednoho nebo více plodolistů (karpelů), které představují samičí výtrusné listy neboli megasporofyty. V květu se obvykle vyskytuje větší počet plodolistů, jejich soubor se nazývá gyneceum. Nachází-li se v květu více jednoplodolistových pestíků, hovoříme o tzv. apokarpním gyneceu, jako například u jahodníku (*Fragaria*). Srůstá-li větší počet plodolistů v jeden pestík, jedná se o tzv. cenokarpní gyneceum, které je typické například pro rajče (*Solanum lycopersicum*).

Pestík je složen ze semeníku (ovarium) obsahujícího vajíčka, čnělky (stylus) a blizny (stigma). Čnělka prodlužuje pestík a tím umožňuje blizně dosáhnout vhodnějšího postavení pro opylení. Její velikost je různá a v některých případech může zcela chybět. Svrchní část pestíku tvoří blizna. Její funkcí je zachycení a vyklíčení pylového zrna. Vajíčko (ovulum) je mnohobuněčný útvar vyvíjející se z placenty, představující dělivé pletivo plodolistu. Povrch vajíčka chrání obaly (integumenty), pod nimi se nachází pletivné jádro (nucellus), ve kterém se vyvíjí zárodečný vak. Integumenty kryjí celý povrch vajíčka až na tzv. klový otvor (mikropyle), kterým při oplození prorůstá pylová láčka. Vaječná buňka (oosféra) představuje nepohyblivou samičí gametu. Vývoj samičího gametofytu se skládá ze dvou fází, tj. megasporogeneze (vývoj haploidní megaspory) a megagametogeneze (vývoj oosféry). Megaspóra se tvoří meiózou z mateřské buňky – megasporocytu, která je diferencována v podpokožkové vrstvě nucellu blízko mikropyle. Megaspóra dále zvětšuje svůj objem a vyvíjí se z ní zralý zárodečný vak s oosférou (Kubát *et al.*, 2003; Vinter, 2008; Pazourek *et Votrubová*, 1997).

3.1.1.2.2. Samčí reprodukční orgány

Tyčinka (stamen) je samčí pohlavní orgán krytosemenných rostlin představující samčí výtrusné listy neboli mikrosporofyly. V květu se většinou vyskytuje větší počet tyčinek a jejich soubor se nazývá andreceum. Tyčinky můžeme zpravidla rozdělit na 3 základní části – nitku (filamentum), spojidlo (konektiv) a prašník (anthera).

Nitka je sterilní spodní část tyčinky, nejčastěji bývá tenká, u některých druhů lupenitě rozšířená. Konektiv je tvořen sterilním parenchymatickým pletivem, které spojuje prašné váčky. Na konci nitky se vyskytuje prašník (obr. 2), který sestává z dvou prašných váček (theca). Každý váček běžně obsahuje dvě prašná pouzdra (loculamentum), jež jsou homologická mikrosporangiu. Povrch prašníku je pokryt epidermis, označovanou jako exothecium. Pod touto vrstvou se nachází endothecium, které utváří vrstva silnostěnných, radiálně protažených buněk. Zásluhou vysychání buněk endothecia v době zralosti prašníku dochází k praskání prašných pouzder, tzv. dehiscenci. Prašná pouzdra vyplňuje tapetum, které poskytuje výživné a stavební látky pylu, produkuje enzym katalázu, jehož zásluhou dochází k uvolňování mikrospor z tetrad.



Obr. 2: Řez prašníkem rajčete. A: exothecium (epidermis), B: endothecium, C: tapetum, D: cévní svazek, E: pylová zrna v prašném pouzdře, F: konektiv.

Vývoj samčích gamet je dvoufázový proces, první fáze mikrosporogeneze představuje vývoj mikrospory (pylového zrna), druhá fáze mikrogametogeneze prezentuje vývoj samčích gamet (spermatických buněk). Mateřské buňky mikrospor tzv. mikrosporocyty vznikají mitotickým dělením sporogenních buněk prašného pouzdra. Meiotickým redukčním dělením vznikají z mikrosporocytů pylová zrna za vzniku čtyř haploidních jader. Pylová zrna jsou v tetradách spojena kalózou, u většiny rostlin však bývá kalóza rozrušena enzymem katalázou a dochází k rozpadu tetrad. Mladá mikrospora následně roste a dále se dělí asymetrickou mitózou na větší buňku vegetativní a menší buňku generativní. Generativní buňka může být rozdělena na dvě spermatické buňky a to již v prašném pouzdře, v takovém případě vzniká trojbuněčné pylové zrno. Dvoubuněčná pylová zrna jsou však u krytosemenných rostlin typičtější, k dělení generativní buňky v tomto případě dochází až v pylové láčce (siphu). U dvoubuněčných pylových zrn se po určité době po vyklíčení pylové láčky generativní buňka dělí ve dvě buňky spermatické, nacházející se při vrcholu pylové láčky. Vegetativní buňka neustále obklopuje generativní buňky a po opylení vytváří pylovou láčku (obr. 3), což je struktura nezbytná pro přenos spermatických buněk k vajíčku (Kubát *et al.*, 2003; Vinter, 2008; Pazourek *et Votrubová*, 1997).



Obr. 3 : Klíčící pyl okurky (foto: M. Sedlářová)

3.2. Vliv stresových faktorů

Rostliny jsou během svého životního cyklu značně ovlivňovány prostředím, ve kterém se nacházejí. Vnější prostředí neustále podléhá změnám, které výrazně ovlivňují fyziologické procesy rostlin. Stresem se označuje stav, kdy na rostliny působí stresové faktory (tzv. stresory), které mohou vést k poškození rostlinných buněk, orgánů a v krajním případě až k jejich smrti. Stres může být povahy abiotické, vznikající vlivem přemíry či deficitu fyzikálních či chemických vlivů. Jako příklad lze uvést nízké či vysoké teploty, vodní deficit, stupeň zasolení, intenzivní ozáření viditelným nebo UV světlem, vystavení chemickým látkám nebo těžkým kovům a jiné (Procházka, 1998).

Biotický stres je vyvolán napadením rostliny patogeny nebo negativním působením okolních organismů stejného či odlišného druhu. Patogenem můžeme nazývat organismus, který svoji ontogenezi nebo aspoň její část prožije ve vzájemném působení s rostlinou. Patogen rostlinu využívá a poškozuje, následkem vzájemného působení vzniká onemocnění či choroba. Patogeny nutričně závislé na hostitelské rostlině, jsou zároveň označovány jako parazité, podle způsobu výživy je můžeme rozdělit do několika skupin. První skupinou jsou biotrofní patogeny, u kterých je zdrojem živin pouze živá buňka hostitele. Nekrotrofní patogeny intoxikují a usmrcují buňku a následně se živí jejími zbytky. Poslední skupinou jsou patogeny, které se zpočátku chovají jako biotrofní, ale po čase hostitelskou buňku zabijí, takové patogeny nazýváme hemibiotrofní. Obecně mezi patogeny rostlin řadíme viry, viroidy, fytoplazmy, bakterie, prvoky, houby a hlístice (nematoda) (Kůdela *et al.*, 1989).

Rostliny se proti působícím stresorům mohou chránit pasivně, kdy vytvářejí mechanickou bariéru, nejčastěji v podobě silné kutily na listech a impregnace buněčných stěn nebo aktivně, kdy k zmírnění negativního vlivu stresových faktorů dochází až po interakci s plazmatickou membránou buněk a symplastem. Při působení stresoru na rostlinu vzniká tzv. stresová reakce, která je ovlivněna řadou faktorů, jako jsou intenzita a doba působení stresoru na rostlinu, stádium vývoje rostliny, její vitalita, genotyp, adaptační schopnosti aj. V přírodě na rostliny může působit i více stresorů najednou. Pokud stresor působí na část rostliny, dochází v této části k lokální stresové reakci, ta následně může vyvolat stres i na dalších orgánech, tak vzniká systémová stresová reakce (Pavlová, 2006).

Rostliny mohou svoji odolnost vůči stresu zvyšovat. Jedním z možných způsobů je aklimatizace (otužování), kdy dochází k morfologickému nebo fyziologickému přizpůsobení konkrétní rostliny. Narůstá syntéza zásobních látek (například škrob a lipidy) nebo se snižuje obsah vody v buňkách. Dalším způsobem jak se bránit proti stresovým faktorům je adaptace, která přináší genetické změny v celé populaci rostlin. Všechny stresové faktory způsobují zvýšení produkce RONS jako signálních drah nebo obranných mechanismů (Procházka, 1998; Pavlová, 2006).

3.3. Modelové organismy

3.3.1. *Solanum lycopersicum* L.

Solanum lycopersicum L. neboli rajče jedlé (obr. 4) náleží do čeledi lilkovitých Solanaceae. Jde o vytrvalou bylinu pocházející z Jižní Ameriky, která byla do Evropy přivezena začátkem 16. století. Dorůstá výšky 1-3 m, stonek je pokryt žláznatými trichomy, lichozpeřené listy mají pilovitý okraj, květenstvím vrcholík (tvořen 3-12 květy, které mají 5 korunních plátků), plodem je dužnatá bobule (Acquaah, 2002).



Obr. 4: Morfologie listů, květů, plodů a rostliny *Solanum lycopersicum* L.

Pěstování rajčete jedlého se v Evropě během středověku rozšířilo, byly vyřazeny linie produkující zvýšené množství toxického alkaloidu solaninu. Postupně bylo vyšlechtěno široké spektrum odrůd rajčete lišících se vzhledem, velikostí, barvou a chutí plodů (Allen, 2008). Dříve bylo rajče řazeno do rodu *Lycopersicon*, na základě molekulárních studií však došlo k přeřazení do r. *Solanum* sekce *Lycopersicum* (Spooner *et al.*, 1993). Rod *Solanum* dnes zahrnuje 1500-2000 druhů. V posledních letech se rajče jedlé stalo jedním z modelových organismů díky možnostem pěstování v různých podmínkách, poměrně krátkému životnímu cyklu, relativně malému genomu a snadné kontrole opylení a hybridizace (Bergougnoux, 2014). Šlechtění nových odrůd rajčete se nyní zaměřuje hlavně na rezistence k různým chorobám a škůdcům, kterých je u rajčete známo více než 200 (výběr viz tabulka I).

Tabulka I: Výběr chorob a škůdců rajčete jedlého (upraveno z: Bergougnoux, 2014).

Mykózy	
Černá hniloba	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Stemphylium botryosum</i> , <i>Pleosporatarada</i> , <i>Stemphylium herbarum</i> , <i>Pleospora herbarum</i> , <i>Ulocladium consortiale</i>
Hnědá skvrnitost rajčat	<i>Alternaria solani</i>
Padlí rajčatové	<i>Oidium neolycopersici</i> , <i>Oidium lycopersici</i>
Plíseň bramborová	<i>Phytophthora infestans</i>
Plíseň šedá	<i>Botrytis cinerea</i> (telemorfa <i>Botryotinia fuckeliana</i>)
Fusariové vadnutí	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
Nematoda, paraziti	
Háďátko kořenové	<i>Meloidogyne</i> spp.
	<i>Belonolaimus longicaudatus</i>
	<i>Paratrichodorus</i> spp., <i>Trichodorus</i> spp.
Bakteriózy	
Bakteriální vadnutí rajčete	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>michiganensis</i>
Bakteriální skvrnitost rajčete	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Bakteriální tečkovitost rajčete	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Bakteriální hniloba	<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>
Virózy	
Virus mozaiky rajčete	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)
Virus bronzovitosti rajčete	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)

3.3.2. Mutantní rostlina rajčete *7B-1*

Mutant *7B-1* byl izolována z populace *S. lycopersicum* cv. Rutgers (dále WT, wild-type) pro svou samčí sterilitu, která se projevuje pouze při fotoperiodě 16 hodin světlo/8 hodin tma (Sawhney, 1997). Vlivem zmíněné fotoperiody se v květech mutantních rostlin vyvíjejí sraštělé tyčinky vytvářející mikrospory, které mají velmi nízkou životnost. Pokud se doba osvitů zkrátí na 8 hodin, rostliny rajčete *7B-1* se stávají fertálními a vytvářejí plody. Mutantní rostlina *7B-1* je vyšší než WT (obr. 5) a její květy se vyznačují nápadně dlouhým pestíkem vyčnívajícím z koruny. Bylo prokázáno, že mutant *7B-1* je odolnější vůči biotickému a abiotickému stresu, zejména díky nadprodukci kyseliny abscisové (ABA) (Fellner *et Sawhney*, 2001; Fellner *et al.*, 2001; Bergougnoux *et al.*, 2009), bylo dokázáno, že tolerance vůči stresu se zvyšuje působením modrého světla (Fellner *et Sawhney*, 2002). V signální dráze kyseliny abscisové je zapojen i oxid dusnatý, potlačení klíčení semen způsobené vysokou hladinou ABA nebo osmotickým stresem je do jisté míry spojeno se sníženou koncentrací NO v semenech rajčete. Na rozdíl od WT byla u mutantu *7B-1*, jehož klíčící semena byla vystavena osmotickému stresu prokázána vyšší koncentrace NO. Vlivem osmotického stresu přispívá defekt v genu *7B-1* ke snížené akumulaci ABA a zároveň ke zvýšené akumulaci NO, tím se aktivuje katabolismus ABA a následně dochází ke snížení její endogenní hladiny (Piterková *et al.*, 2012). Naopak endogenní hladiny dalších rostlinných hormonů, jako jsou ethylen, kyselina indolyl-3-octová a gibereliny, jsou účinkem mutace *7B-1* sníženy (Fellner *et al.*, 2001; Fellner *et al.*, 2005; Bergougnoux *et al.*, 2012).



Obr. 5: Porovnání mutantní rostliny rajčete *7B-1* s WT. Vlevo rostlina mutantu, vpravo WT.

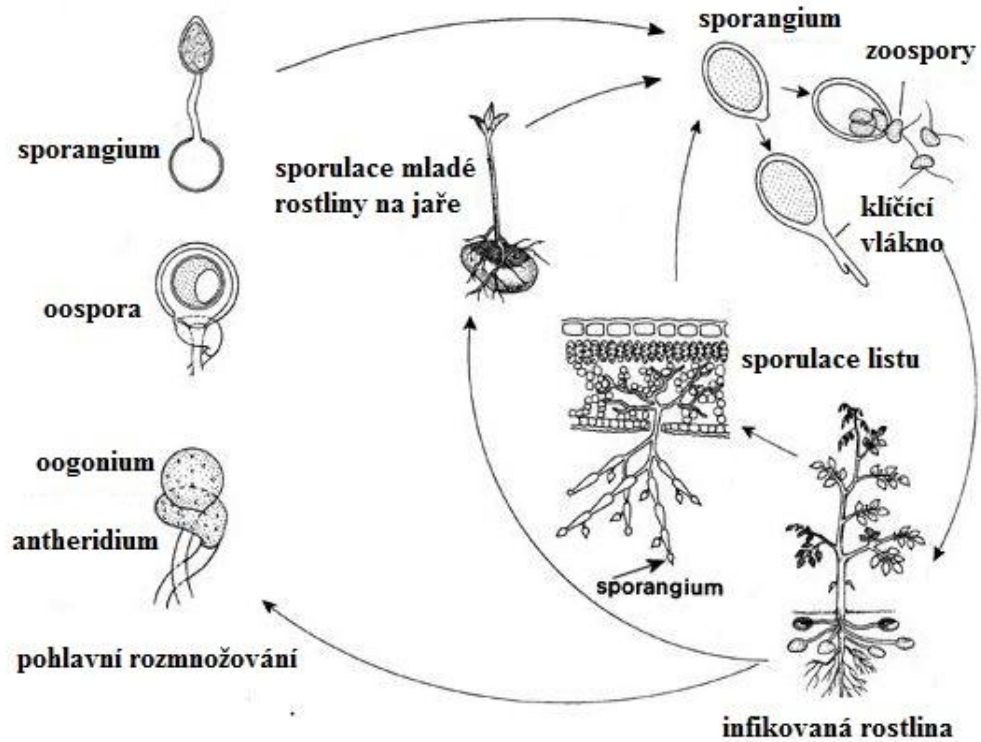
3.3.3. *Phytophthora infestans*

Původce chorob plísňě bramboru a rajčete *Phytophthora infestans* je v současnosti řazen do říše Chromista (Cavalier-Smith, 1998), oddělení Peronosporomycota, třídy Peronosporomycetes, čeledi Pythiaceae, rodu *Phytophthora*. Tyto mikroskopické houbám podobné organismy jsou hemibiotrofními patogeny vyšších rostlin. Do r. 1998 byla skupina tzv. oomycet řazena do říše hub, od kterých se však liší řadou molekulárních znaků, ale i přítomností diploidních jader ve stélce, buněčnou stěnou (obsahuje celulosu, ne chitin jako u hub, a zásobní látku mykolaminaran (β -1,3-glukan)) a produkcí rostlinných sterolů (Kalina *et* Váňa, 2005).

Nepohlavní rozmnožování *P. infestans* (obr. 6) se děje prostřednictvím sporangií, která klíčí buď přímo pomocí klíčícího vlákna (při nižší vlhkosti a teplotě nad 15 °C), nebo nepřímo tvorbou zoospor. Ve vodním prostředí a teplotě 12-15 °C se ze sporangií přenesených větrem nebo vodními kapkami na povrch hostitelské rostliny uvolní 3-8 zoospor pohyblivých díky bočně lokalizovaným bičíkům. Zoospory záhy ztrácí bičíky a stávají se nepohyblivými, vytváří klíčící vlákno zakončené apresoriem, které pomocí penetračního hrotu přímo proniká pokožkou, anebo prorůstá do hostitelské rostliny průduchy. Mezibuněčné prostory prorůstají nepřehrádkované hyfy, větví se a vytvářejí haustoria, kterými z buněk získávají živiny. Za příznivých podmínek (teplota a relativní vlhkost) dochází ke sporulaci. Sporangiofory vyrůstají nejčastěji průduchy nebo poraněnou pokožkou, jednotlivě nebo ve svazečcích. Na konci jednotlivých větví se tvoří sporangia oválného tvaru, která jsou po dozrání uvolňována. Volné zoospory mají omezenou životnost, především v suchých podmínkách a při vystavení slunečnímu záření. Zajímavou adaptací je tvorba tlustostěnných somatických chlamydospor, které jsou schopny přežít nepříznivé podmínky během vegetačního období.

Pohlavní rozmnožování *P. infestans* (obr. 6) se děje oogametangiogamií, tj. splývá samčí jednobuněčné antheridium kyjovitého tvaru se samičím oválným oogoniem, které obsahuje pohlavní buňky zvané oosféry a nebylo známo až do doby objevení pohlavního typu A2. Antheridia jsou hormonálně přitahována k oogoniím, kde po vzájemném kontaktu začnou přecházet samčí jádra pomocí kopulačních kanálků do oogonia. Oplozené oosféry se mění v tlustostěnnou oosporu (zygotu). Oospory mají třívrstevnou stěnu (exospor, epispor, endospor), díky které mohou přežívat nepříznivé podmínky (např. velmi nízké teploty, sucho)

a mohou zůstat životaschopné po dobu několika let. Vznikají v pletivech napadených částí rostlin (listy, stonky, hlízy) a přetrvávají po jejich rozkladu v půdě. Oospory klíčí pomocí klíčícího vlákna, které je zakončené terminálním sporangiem (Juroch, 2011).



Obr. 6: Schéma životního cyklu *Phytophthora* spp. (upraveno podle: Courtesy *et al.*, 2000).

P. infestans je jedním z ekonomicky nejvýznamnějších parazitů rostlin. K infekcím dochází, když je vhodná teplota a vlhkost, nejlépe vodní film na povrchu rostlinných orgánů. Primární infekce z půdy se šíří stonkem a příznaky jsou viditelné nejdříve na vegetačních vrcholech. Sekundární infekce se nejprve projevují na listech, kde se objevují nejčastěji od špičky k okrajům čepele nažloutlé až světle zelené skvrny, později šedočerné až černé nekrotické skvrny. Skvrny na listech se rychle zvětšují, zasahují postupně celý list, později přecházejí na řapík a šíří se stonkem do vyšších listových pater, postupně jsou napadány i všechny stonky v trsu. Rostliny rajčete mohou být napadeny až sekundárně sporangii přenesenými větrem z infikovaných porostů bramboru nebo vodními kapkami ze sousedních infikovaných rostlin. Na nadzemních částech vznikají šedozelené vodnaté skvrny, které se pomalu rozrůstají a postupně hnědnou. Skvrny postupně zasychají a během krátké doby usychá celý list. V posledních letech lze sledovat hnědé skvrny na stoncích, stopkách plodů nebo květů. Typickým projevem choroby jsou tmavé skvrny na rajčatech (Juroch, 2011).

3.5. Metabolismus a role reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) u rostlin

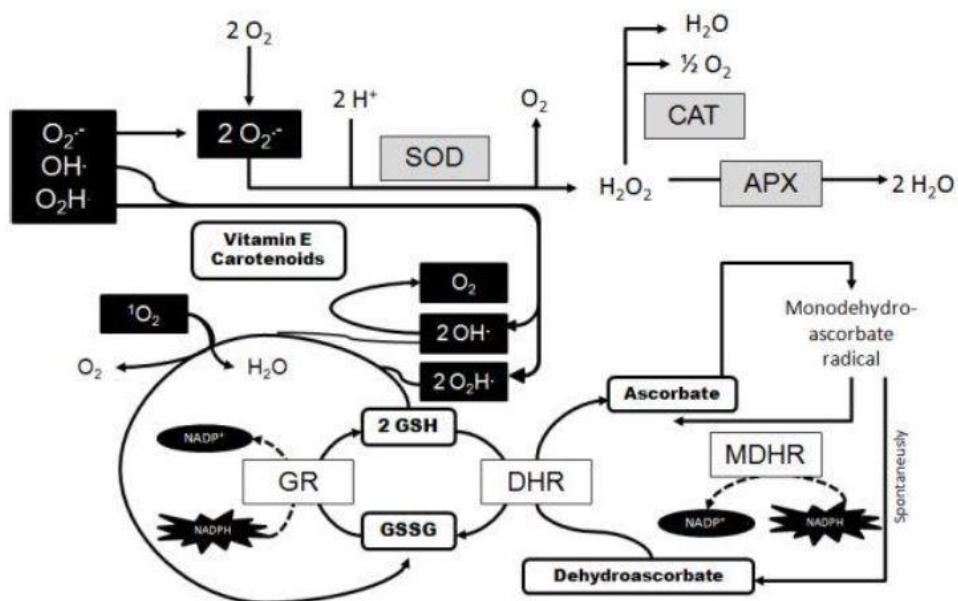
3.5.1. Reaktivní formy kyslíku

Metabolismus a role reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) u rostlin jsou v posledních letech předmětem mnohých výzkumů. Mezi nejčastěji studované reaktivní formy kyslíku patří peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový anion (O_2^-), hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$) a singletní kyslík ($^1\text{O}_2$) (Dat *et al.*, 2000; Halliwell, 2006). Tyto molekuly kyslíku jsou vysoce reaktivními látkami a ve vyšších koncentracích jsou toxické, mohou způsobit oxidační poškození buňky, například peroxidaci lipidů (Asada, 2006). Pro zachování své existence si rostliny vytvořily obranné mechanismy, které umožňují přežít toxický účinek ROS. Reaktivní formy kyslíku jsou klíčovými regulátory mnoha biologických procesů a některé z nich rostliny využívají jako signální molekuly (Apel *et Hirt*, 2004; Bailey-Serres *et Mittler*, 2006; Mittler *et al.*, 2004; Van Breusegem *et al.*, 2008).

Reaktivní formy kyslíku vznikají při fotolýze vody v chloroplastech nebo při dýchání v mitochondriích díky elektron transportním řetězcům. Dále jsou produkovány peroxizomy, což jsou organely s vysoce oxidační metabolickou aktivitou nebo s intenzivní rychlostí elektronového toku (Dat *et al.*, 2000). Produkce ROS v těchto organelách může být zodpovědná za spouštění různých signálních kaskád. Za specifických stresových podmínek je hlavním producentem superoxidového anionu v mitochondriích elektronový transportní řetězec. Zdrojem ROS v rostlinných buňkách jsou detoxikační reakce, které jsou katalyzované cytochromy v endoplazmatickém retikulu nebo v cytoplazmě. V peroxizomech je produkován superoxid pomocí xanthinoxidasy (Miller *et al.*, 2008; Piterková, 2010). Koncentrace ROS v buňkách je za normálních podmínek nízká, působením stresových faktorů na rostlinu se jejich produkce výrazně zvyšuje, a tím se narušuje buněčná homeostáza. Nerovnováha mezi tvorbou a odbouráváním ROS vede k tzv. oxidačnímu stresu s možným následkem buněčné smrti (Piterková *et al.*, 2005).

K ochraně buněk před oxidačním poškozením slouží neenzymové a enzymové obranné mechanismy, znázorněné na obrázku 7. Aby byl biologický antioxidant účinný, musí být v buňce přítomen v přiměřeném množství, musí reagovat s různými volnými radikály, musí být vhodný pro regeneraci buňky a zároveň ji nesmí poškozovat. Jedním z nejvýznamnějších antioxidantů je kyselina L-askorbová (známější jako vitamín C), dalšími β -karoten, redukovaný glutation a α -tokoferol (vitamín E) (Chen *et Gallie*, 2004; Shalata

et al., 2011). Askorbát redukuje řadu volných radikálů a tím zabraňuje vzniku oxidačního stresu, dále může přímo „odstranit“ některé reaktivní formy kyslíku (superoxid, hydroxylové radikály, singletní kyslík) a je schopen redukovat peroxid vodíku na vodu (Piterková *et al.*, 2005). Karotenoidy jsou schopny velice rychle odstraňovat singletní kyslík z protein-pigmentových komplexů chloroplastů.

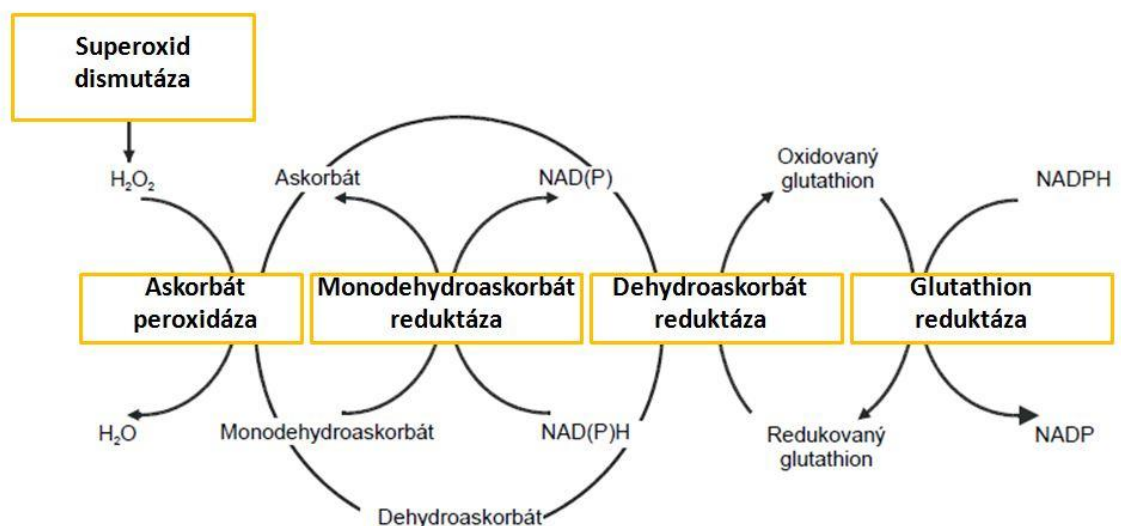


Obr. 7: Schéma enzymových a neenzymových obranných mechanismů proti oxidačnímu poškození buněk (převzato z: Ceron-Garcia *et al.*, 2012).

Nejvšestrannější ochranu proti možnému oxidačnímu poškození ve všech částech buňky zajišťují enzymy a některé enzymové systémy. K těmto enzymům podílejícím se na katabolismu ROS patří superoxiddismutáza (SOD, EC 1.15.1.1), kataláza (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidáza (EC 1.11.1.7), glutathionperoxidázy a enzymy askorbát-glutathionového cyklu (Piterková *et al.*, 2005; Kranner *et Birtić*, 2005).

Superoxiddismutáza (SOD, EC 1.15.1.1) patří do skupiny oxidoreduktáz a je jedním z nejvýznamnějších antioxidantních enzymů. Vyskytuje se u aerobních organismů ve všech buněčných strukturách citlivých na oxidační stres, zejména v cytoplasmě, peroxizomech, chloroplastech a mitochondriích (Piterková *et al.*, 2005, Grace *et al.*, 2000). Jednou z hlavních funkcí SOD je katalytická přeměna superoxidového radikálu na peroxid vodíku ($2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \leftrightarrow 2H_2O_2 + O_2$), který je následně odstraněn katalázami a peroxidázami (Březinová Belcredi *et al.*, 2007). Ve všech aerobních eukaryotech je v peroxizomech

přítomen enzym kataláza (CAT, EC 1.11.1.6). Podle lokalizace v různých částech rostliny rozlišujeme 3 její isoformy - CAT1, CAT2 a CAT3. V listech se nachází CAT1, jejíž funkcí je degradace peroxidu vodíku během fotorespirace, CAT2 nalezneme především v cévních svazcích a CAT3 je přítomna v semenech a mladých semenáčcích, kde je nápomocna při degradaci peroxidu vodíku z glyoxyzomů (Dat *et al.*, 2000). CAT se vyznačuje dvojím typem aktivity, katalázovou a peroxidázovou. V prvním případě katalyzuje CAT přímý rozklad peroxidu vodíku, zatímco peroxidázová aktivita vyvolává oxidaci metanolu, etanolu, formaldehydu nebo formátu. Na odstraňování peroxidu vodíku v místech, kde není přítomna kataláza, se podílí antioxidanty askorbát-glutathionového cyklu, např. askorbátperoxidáza (APOX, EC 1.11.1.11) nebo glutathionreduktáza (GSNOR, EC 1.6.4.2) (Piterková *et al.*, 2005). Askorbát-glutathionový cyklus znázorňuje obrázek 8.



Obr. 8: Schéma askorbát-glutathionového cyklu (upraveno podle: Piterková *et al.*, 2005).

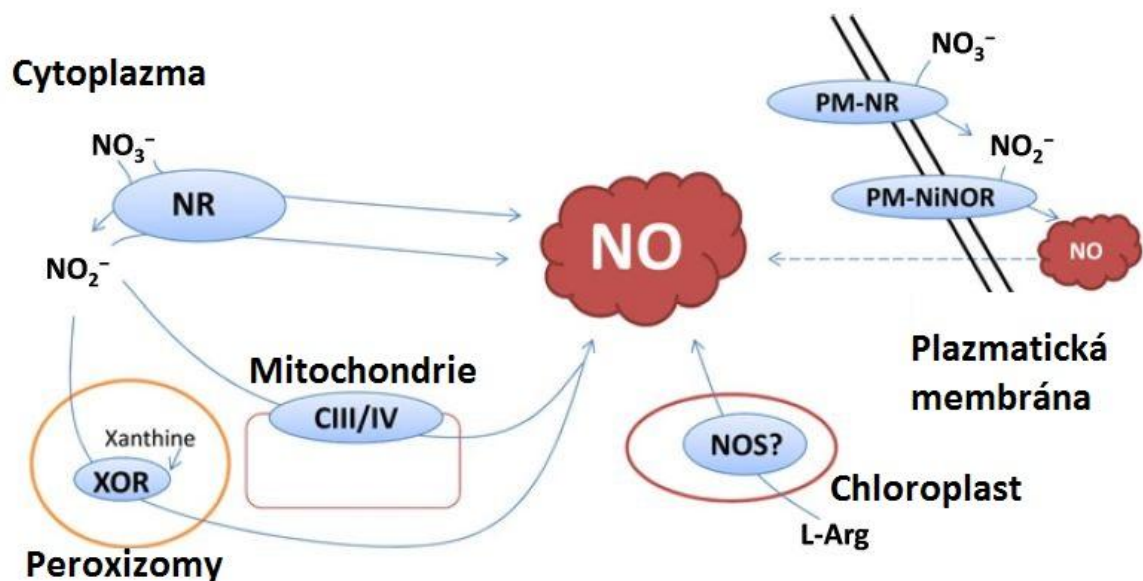
3.5.2. Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species, RNS) jsou dalšími reaktivními nízkomolekulárními látkami s funkcí signálních molekul. Můžeme je rozdělit na oxid dusnatý (NO) a oxid dusičitý (NO₂), vyskytující se formě volných radikálů a na skupinu látek, mezi které patří kyselina dusitá (HNO₂), oxid dusitý (N₂O₃), peroxyinitrit (ONOO⁻), alkylperoxyinitrit (ROONO).

Oxid dusnatý (NO) figuruje v celé řadě fyziologických a patologických procesů rostlin, účastní se otvírání a zavírání průduchů (Garcia-Matta *et Lamattina*, 2001), regulace senescence, růstu, kvetení, dormance semen (Belgini *et Lamattina*, 2000), má vliv na aktivitu nitrát reduktázy (Planchet *et al.*, 2006) a na programovanou buněčnou smrt. V neposlední řadě je také součástí signálních drah a obranných mechanismů v odpovědi rostliny na různé stresové faktory (Delledone *et al.*, 2001).

Existují dvě cesty vzniku NO v buňkách, enzymová a neenzymová. U živočichů se na vzniku NO podílí enzym NO-syntáza (NOS, EC 1.14.13.39), existující ve třech isoformách, které se odlišují subcelulární lokalizací, kinetikou a způsobem aktivace. Všechny tři formy - neuronální (nNOS), indukovatelná (iNOS) a endoteliální (eNOS) oxidují L-arginin na L-citrulin a NO. Průkaz NOS aktivity u rostlin je předmětem mnohých studií, zatím bylo prokázáno, že s produkcí NO souvisí pouze nepřímo (Pirerková *et al.*, 2008; Zemojtel *et al.*, 2006). Byl ovšem nalezen analog tohoto enzymu označovaný „NOS-like enzyme“. Ten způsobuje tvorbu L-citrulinu z L-argininu a navíc reaguje na inhibitory živočišné NOS. Přítomnost „NOS-like“ enzymu byla dokázána v peroxizomech a chloroplastech v listech hrachu, dále v cytosolu buněk meristematické zóny a v jádrech buněk prodlužovací zóny kořene u kukuřice (Wendehenne *et al.*, 2001). Dalším enzymem podílejícím se na tvorbě NO u rostlin je nitrátreduktáza (NR, EC 1.7.1.1.), jejíž funkcí je katalýza NAD(P)H-dependentní dvouelektronové redukce dusičnanu na dusitan (Yamasaki *et Sakihama*, 1999). Lokalizace NR byla popsána v plasmatické membráně kořenových buněk tabáku společně s kořenově specifickou nitrit:NO oxidoreduktázou (Ni-NOR), která katalyzuje redukci dusitanu na NO. V produkci NO u rostlin se uplatňují další enzymy jako je křenová peroxidáza katalyzující tvorbu NO *in vitro* za účasti peroxidu vodíku z N-hydroxyargininu (Piterková *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2014). Vysoká tvorba NO byla prokázána v peroxizomech za účasti enzymu

xanthinoxidázy (XOD). Zde reaguje NO se superoxidem za vzniku peroxidusitanu (Corpas *et Barroso*, 2014). Obrázek 9 představuje zdroje podílející se na tvorbě oxidu dusnatého.

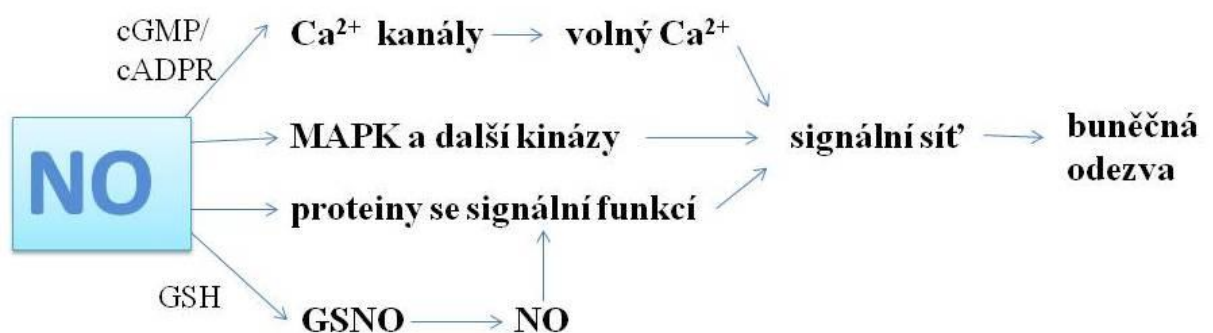


Obr. 9: Schéma znázorňující zdroje NO (upraveno podle: Yu *et al.*, 2014)

Neenzymatická cesta produkce NO zahrnuje několik reakcí. Vlivem nízkého pH v apoplastu dochází k dismutaci dusitanu na NO a dusičnan, při fyziologických hodnotách pH se může dusitan chemicky redukovat kyselinou askorbovou na NO a kyselinu dehydroaskorbovou. Světlem poháněná redukce dusitanů na NO katalyzovaná karotenoidy byla popsána v membránách chloroplastů (Piterková, 2008).

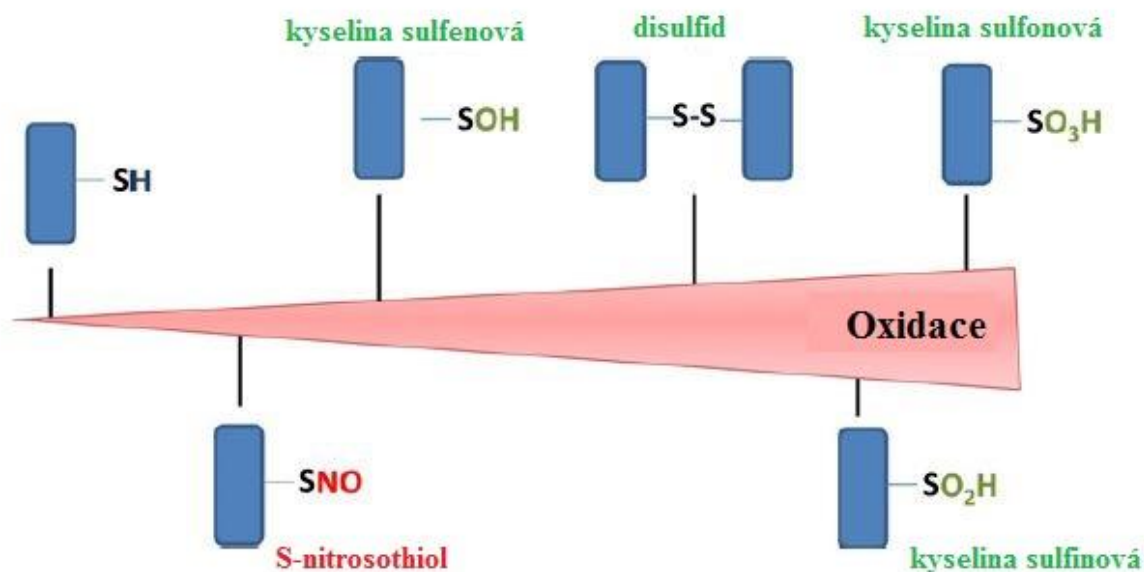
Signální dráhy NO (obr. 10) v rostlinách můžeme rozdělit na cGMP-dependentní dráhy a cGMP-independentní dráhy. Mechanismus cGMP-dependentní dráhy stojí na navázání oxidu dusnatého na hemovou prosthetickou skupinu guanylatecyklázy. Konformační změna zvýší aktivitu enzymu a dochází ke vzniku cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), jehož vyšší hladina způsobuje regulaci aktivity cGMP-dependentních proteinkináz, cGMP-dependentních iontových kanálů a fosfodiesteráz. cGMP hraje roli při indukci genů syntetizujících obranné látky, dále v regulaci iontových kanálů a úzce souvisí s přestavbou cytoskeletu. (Bruckdorfer, 2005; Walden, 1998). Účinek cyklické ADP-ribózy (cADPR) na uvolnění Ca^{2+} z vakuoly do cytoskeletu byl popsán v klíčové studii na rostlinách tabáku infikovaných virem tabákové mozaiky (Durner *et al.*, 1998). V novější studii (Gould *et al.*, 2003) byl popsán vliv NO na zvýšení volných Ca^{2+} iontů v cytosolu indukci hyperosmotického stresu a mikrobiálním elicitorem kryptogéinem u buněk tabáku. Mezi

cGMP-independentní dráhy u rostlin patří aktivace proteinkináz aktivovaných mitogenem (MAPK). Tato aktivace vyvolává reversibilní fosforylaci enzymů, a tím ovlivňuje jejich aktivitu. Ke stimulaci MAPK aktivity dochází externí aplikací NO v listech *A. thaliana* a v listech tabáku. U tabáku může dojít ke stimulaci MAPK aktivity i peroxidem vodíku a kyselinou salicylovou, aplikace kyseliny jasmonové a ethylenu ke stimulaci MAPK nevedla (Klessig *et al.*, 2000, Piterková *et al.*, 2008). Aktivace MAPK kaskády v rostlinách tak pravděpodobně představuje společný bod signálních drah aktivovaných v reakci na různé typy stresu.



Obr 10: Schéma znázorňující signální dráhy NO u rostlin, primární cíle NO zahrnují mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) a Ca^{2+} kanály regulované prostřednictvím změn hladin cGMP a cADPR. NO reguluje aktivitu proteinů nitrosylací thiolových skupin. Stabilní metabolit *S*-nitrosoglutathion (GSNO) může sloužit jako přenašeč signálu NO pro jeho uvolnění a interakce ve vzdálených cílech (upraveno podle: Piterková *et al.*, 2008).

Signální dráhy NO mohou být také zprostředkovány kovalentními modifikacemi proteinů (obr. 11) jako jsou nitrosylace cysteinů a nitrace tyrosinů (Piterková *et al.*, 2008). Princip *S*-nitrosylace je uskutečněn kovalentní vazbou $-\text{NO}$ skupiny na skupinu $-\text{SH}$ v cysteinu (Hoffmann *et al.*, 2003). Nitrace tyrosinu je realizována připojením skupiny $-\text{NO}_2$ do polohy *ortho* na aromatickém kruhu tyrosinového zbytku. Zároveň dochází ke změně struktury, což vede k porušení aktivity a k zabránění fosforylace proteinu (Hnízdová *et al.*, 2009).

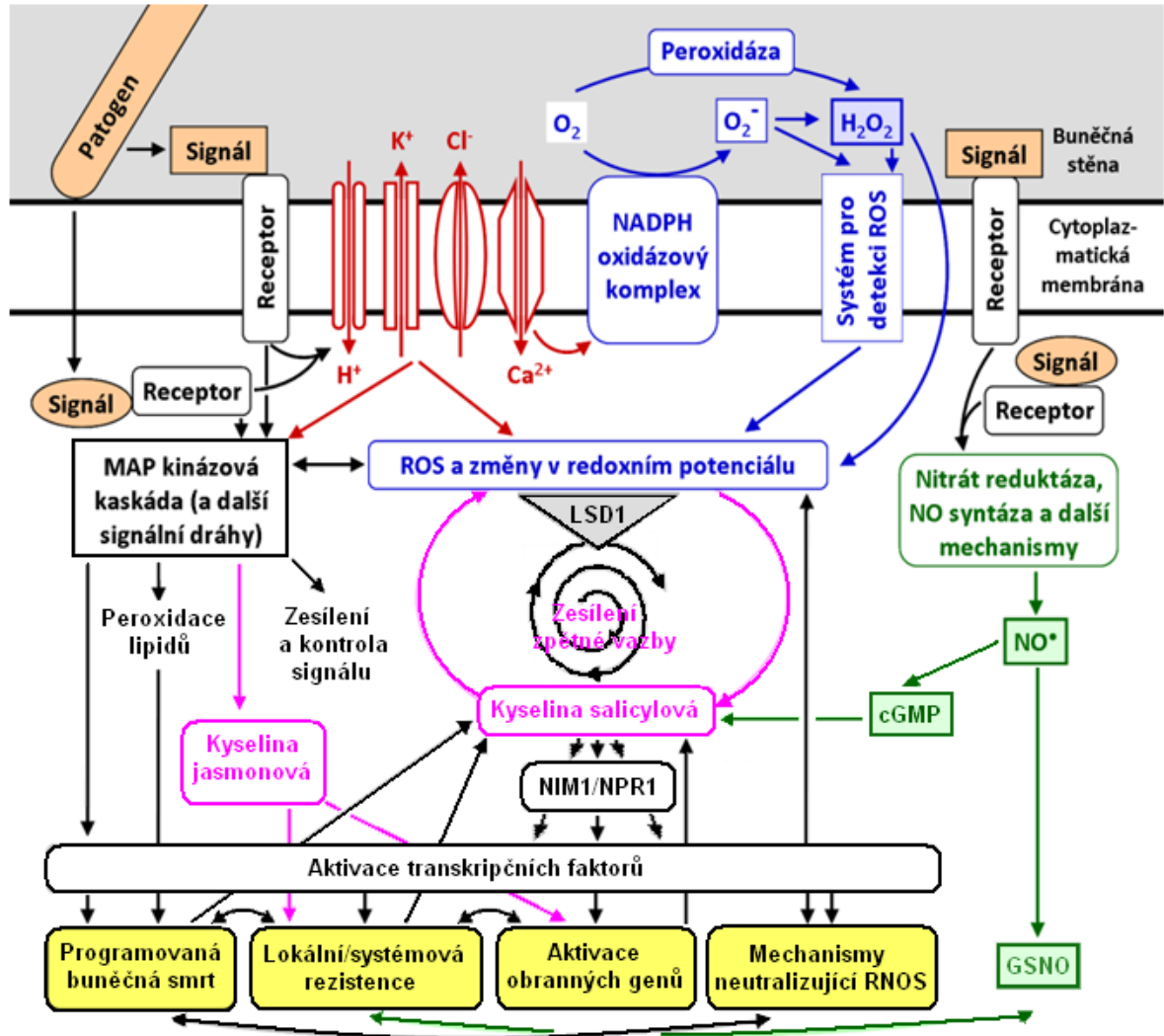


Obr. 11: Schéma oxidačních posttranslačních modifikací (upraveno podle: Yu *et al.*, 2014)

Oxid dusnatý je velice reaktivní plynný radikál, který snadno difunduje přes buněčné membrány. Je značně nestabilní, poločas jeho rozpadu v živé buňce se pohybuje kolem ≈ 6 s především díky reakci s aktivními formami kyslíku (Thomas *et al.*, 2001; Misra *et al.*, 2010). Z biologického pohledu jsou nejpodstatnější reakce se superoxidovým anionradikálem za vzniku peroxodusitanu, který dále reaguje s proteiny, lipidy a DNA za vzniku příslušných nitroso- a nitroderivátů (Szabo *et al.*, 2007). Kvůli již zmíněné vysoké reaktivitě je experimentální detekce a kvantifikace NO *in vivo* obtížná. Účinky NO závisí na jeho koncentraci a jeho přesná detekce je nezbytná pro objasnění jeho role v mnoha buněčných procesech. Pro detekci NO se využívá celá řada technik, například: laserová fotoakustická spektroskopie, EPR spektroskopie, chemiluminiscence nebo hmotnostní spektrometrie (Vandelle *et Delledonne*, 2008). Pro histochemickou lokalizaci produkce NO se využívají specifické fluorescenční sondy a fluorescenční nebo konfokální mikroskopy (Piterková *et al.*, 2008).

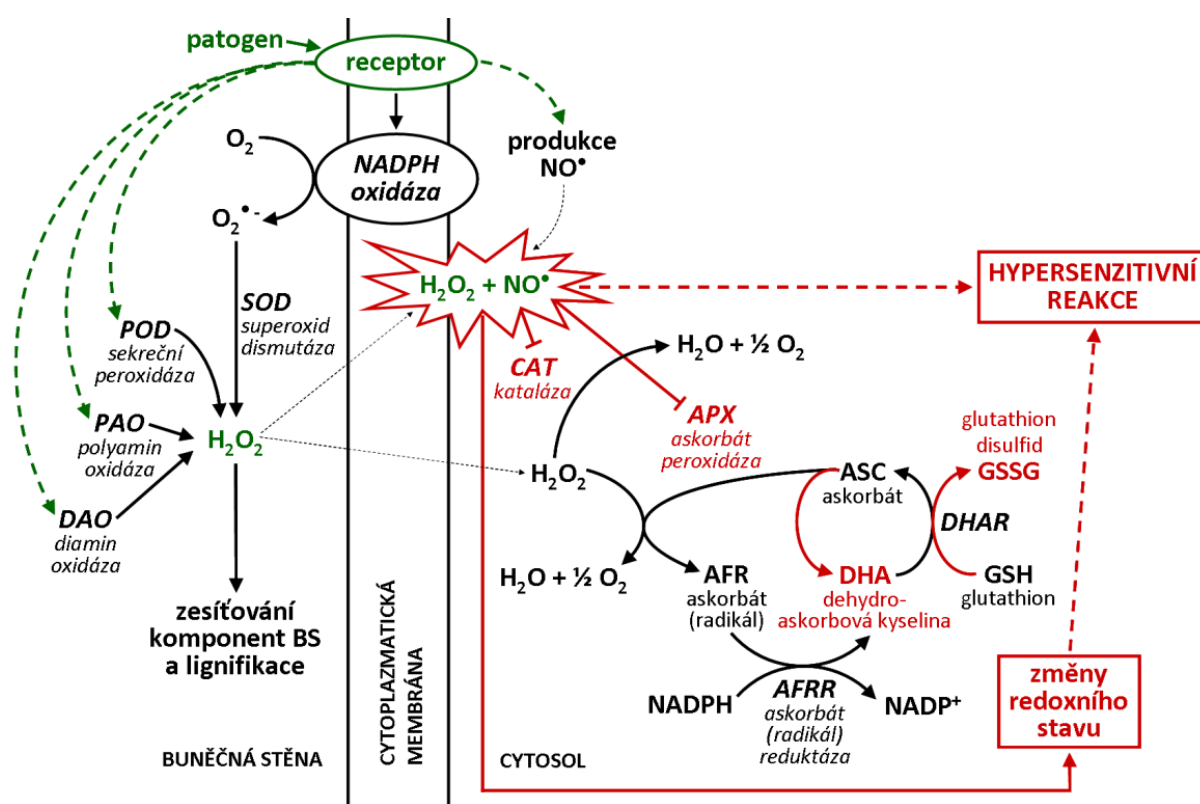
3.5.3. Role RONS v obranných mechanismech infikovaných rostlin

Rostliny na obranu proti patogenům vyvinuly nesespecifické a specifické obranné mechanismy, které brzdí nebo zcela zastaví vývoj patogenu, či jeho fruktifikaci.



Obr. 12: Schéma zapojení RONS do obrany rostliny proti patogenu a hypersenzitivní reakce (upraveno podle: Jabs, 1999)

Nezbytnou schopností rostlin je rozpoznání cizorodé buňky od své vlastní, k tomu slouží důmyslný systém receptorů zakotvených v cytoplazmatické membráně. Receptory jsou specifické pro struktury, které se nacházejí na povrchu patogenů fungujících jako elicitory. Elicitory jsou látky produkované patogenem (PAMPs), mikroorganismy obecně (MAMPs) nebo samotným hostitelem, na který působí patogen. Elicitory jsou rozpoznávány receptory hostitele a vyvolávají obrannou reakci proti patogenu prostřednictvím komplexní soustavy signálních drah rostliny. Z chemického hlediska jde o pestrú skupinu látek lipidového, proteinového a polysacharidového charakteru. Na konci signální dráhy se obvykle vyskytuje transkripční faktor, který se po fosforylaci váže na DNA a spouští expresi genů spojených s obrannou reakcí. V průběhu rané fáze obranné reakce (obr. 12) se často mění propustnost cytoplazmatické membrány pro určité ionty, do buněčné cytoplazmy prochází ionty H^+ , Ca^{2+} (influx) a ionty K^+ , Cl^- proudí z cytoplazmy ven (eflux). Podle množství Ca^{2+} proniklého do buňky a rozsahu alkalizace extracelulárního prostoru dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku. Hlavně zvýšená koncentrace vápenatých iontů je považována za velmi důležitou pro spuštění obranné reakce (Lochman *et al.*, 2005, Boller *et Felix*, 2009, Lebrun-Garcia *et al.*, 1998).



Obr. 13 : Změny hladiny RONS během hypersenzitivní reakce (upraveno podle De Gara *et al.*, 2003)

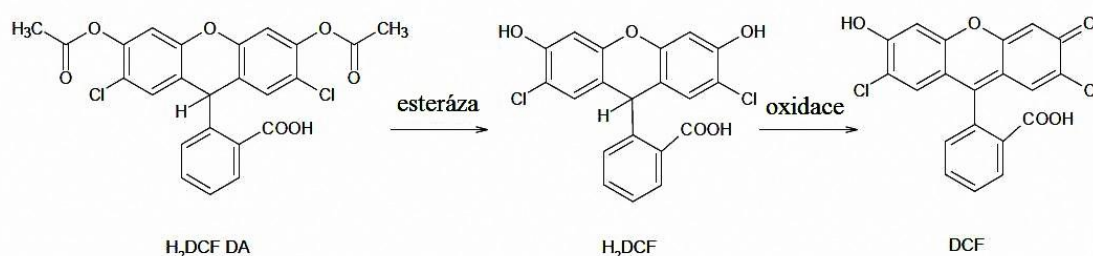
S procesem patogeneze je spojena zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku, které se zde uplatňují jako obranné nebo signální molekuly. Jednou z obranných reakcí rostliny proti infekci je tzv. hypersenzitivní reakce (HR). Při hypersenzitivní reakci (obr. 13) dochází k eliminaci infikovaných buněk, případně i buněk v okolí místa infekce, procesem zvaným programovaná buněčná smrt. Tím je zabráněno šíření infekce organismem. HR je regulována kyselinou salicylovou, kyselinou jasmonovou a ethylenem (Delledonne *et al.*, 2001; Greenberg, 1997). V některých patosystémech může po HR následovat indukce systémově získané rezistence (SAR). SAR se vyznačuje vysokou odolností rostliny proti celé škále patogenů (virulentním, avirulentním), kterou rostlina získala po předcházející infekci vyvolané patogenem. Zásadní roli v rozšiřování systémové i lokální rezistence má kyselina salicylová (Delledonne *et al.*, 2001).

3.6. Metody studia RONS

3.6.1. Mikroskopické metody

RONS je možné detekovat histochemickým barvením, při kterém se používají specifické fluorochromy pro dané molekuly (tab. II). Barva pohlceného i vyzářeného světla závisí na vlastnostech fluorochromu, které se od sebe liší excitačními i emisními vlnovými délkami. Existuje celá škála fluorochromů pokrývajících celé spektrum viditelného světla s přesahy do UV i IR oblasti. Z chemického hlediska se jedná zejména o xantonové a akridinové heterocyklické sloučeniny.

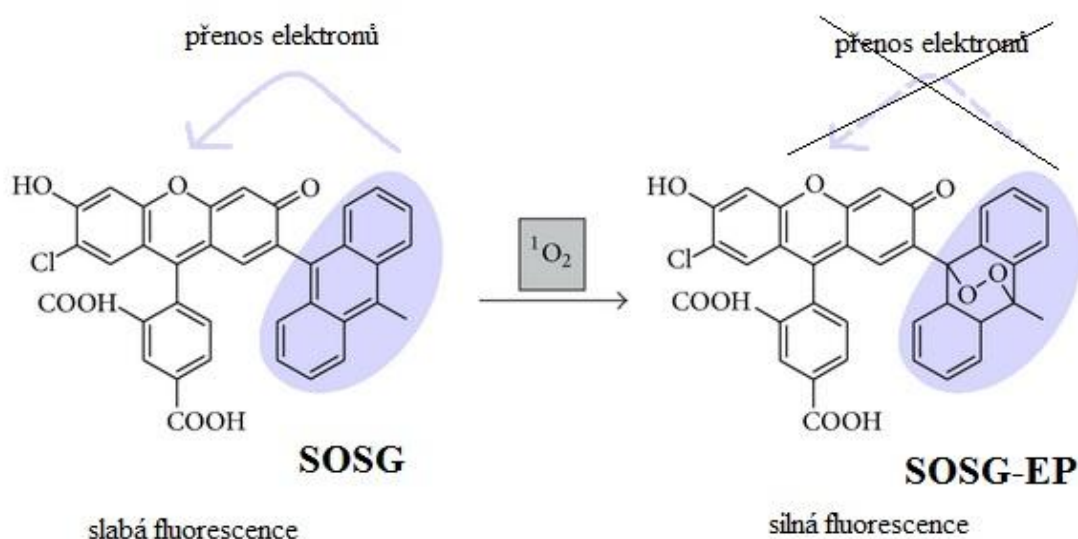
Dnes často používaným fluorochromem pro detekci H_2O_2 je 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H2DCF DA) neboli dichlorofluoresceindiacetát (obr. 14). Ukázalo se, že tato sonda není dostatečně selektivní, a že také reaguje s jinými druhy ROS a některými RNS. H2DCF DA sám o sobě fluorescenční signál neposkytuje, tuto schopnost má jeho derivát 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF). DCF vzniká štěpením H2DCF DA pomocí intracelulárních esteráz a oxidací volnými radikály, především $\cdot OH$, $CO_3^{\cdot -}$, NO_2^{\cdot} a thiolovými radikály (Catalá *et al.*, 2010).



Obr. 14: Přeměna fluorescenční sondy H₂DCF DA na jeho fluorescenční derivát DCF.

Pro detekci hydroxylového radikálu a peroxidusitanu se využívá dvou fluorochromů s podobnými vlastnostmi, ale vyšší stabilitou a specifitou. Těmito fluorochromy jsou 3'-(*p*-aminofenyl)fluorescein (APF) a 3'-(*p*-hydroxyfenyl)fluorescein (HPF). Mají shodné hodnoty maxima excitace (490 nm) a emise (515 nm), mimo to jsou oba poměrně odolné vůči oxidaci světlem. Jejich reakce s iontem $^{\cdot}OCl$ je však odlišná, u APF se intenzita fluorescence po reakci s $^{\cdot}OCl$ výrazně zvyšuje, u HPF tomu tak není. Proto při současném použití obou fluorochromů je umožněna selektivní detekce anionu chlornanu (Setsukinai, 2002).

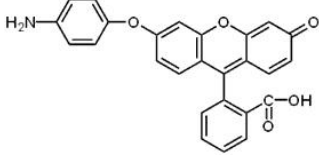
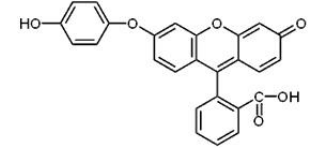
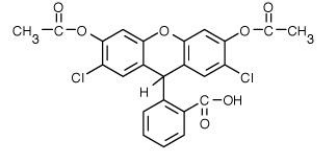
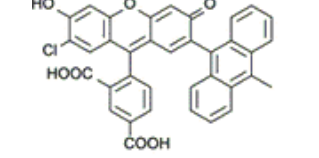
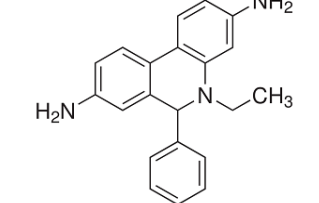
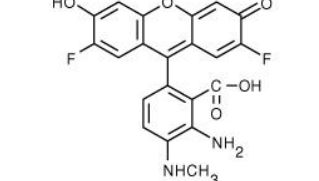
V současné době má velký význam rozvoj efektivních a selektivních fluorescenčních sond pro reaktivní formy kyslíku, zejména pro singletní molekulární kyslík, který je velmi špatně detekovatelný zejména kvůli vysoké reaktivitě dané velmi krátkým poločasem rozpadu v biologických systémech. Jedním z významných fluorochromů je Singlet Oxygen Sensor Green® (SOSG), jenž byl aplikován u řady biologických systémů známých tvorbou singletního kyslíku (Gollmer, 2011). Podle výrobce by SOSG neměl vykazovat citlivou odpověď na hydroxylové radikály a superoxid. Původně byl dodáván pro extracelulární detekci, nicméně bylo zjištěno, že prochází do nitra buněk. V přítomnosti singletního kyslíku SOSG emituje zelenou fluorescenci s excitačními/emisními maximy při $\lambda \sim 504$ nm a 525 nm (Flors, 2006). Tato interakce dále vede k přerušení přenosu elektronů a tvorbě endoperoxidu, který vykazuje silnou fluorescenci (obr. 15).

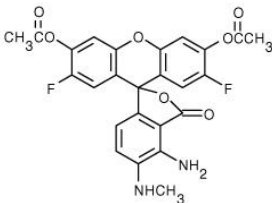
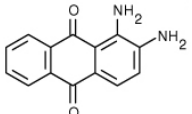
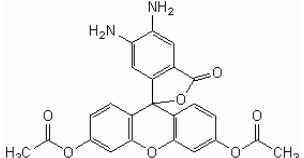
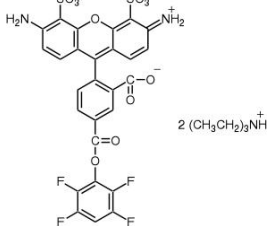
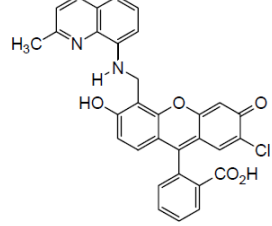
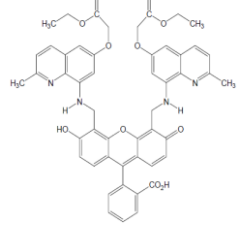
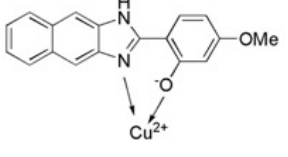


Obr. 15: Přeměna SOSG se slabou fluorescencí na SOSG-EP se silnou fluorescencí (upraveno podle: Gollmer *et al.*, 2010)

Nejpoužívanějšími fluorochromy pro detekci NO jsou 4,5-diaminofluorescein diacetát (DAF-2 DA) a 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA). Obě sondy prochází membránami a po vstupu do buňky jsou vnitrobuněčnými esterázami deacetylovány. Vznikající nefluoreskující 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) a 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM) reagují s oxidačními produkty NO za vzniku vysoce fluorescenčních triazofluoresceinů, které jsou zachyceny v cytoplazmě. DAF-FM je oproti DAF-2 fotostabilnější a citlivější, a vykazuje stabilní a silnou fluorescenci v širokém rozmezí pH (Kojima *et al.*, 1999; Itoh *et al.*, 2000). Fluorescenční signály pozorujeme při excitační/emisní vlnové délce 495/515 nm.

Tabulka II: Přehled vlastností fluorochromů využívaných pro detekci RONS.

Název	Struktura	Použití pro detekci	barva	Vlnová délka (nm)		citace
				Excitace	Emise	
APF 3'-p-(aminofenyl)fluorescein		Hydroxylový radikál (OH [•]), peroxydusitan (ONOO ⁻), chlornanový anion (OCl ⁻)	zelená	490	515	Invitrogen, 2015
HPF 3'-(p-hydroxyfenyl)fluorescein		Hydroxylový radikál (OH [•]) a peroxydusitan (ONOO ⁻)	zelená	490	515	Invitrogen, 2015
H2 DCF DA 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát		Peroxid vodíku (H ₂ O ₂) a další ROS	zelená	498	522	Invitrogen, 2015
SOSG Singlet Oxygen Sensor Green®		Singletní kyslík (¹ O ₂)	zelená	504	525	Invitrogen, 2015
DHE Dihydroethidium		Superoxid (O ₂ ^{-•})	oranžová	510	590	Zhao et al., 2005
DAF-FM 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein		Oxid dusnatý (NO) a další RNS	zelená	495	515	Invitrogen, 2015

Název	Struktura	Použití pro detekci	barva	Vlnová délka (nm)		Citace
				Excitace	Emise	
DAF-FM DA 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát		Oxid dusnatý (NO) a další RNS	zelená	495	515	Invitrogen, 2015
DAA 1,2-diaminoantrachinon		Oxid dusnatý (NO)	zelená	264	494	Invitrogen, 2015
DAF-2 DA 4,5-diaminofluorescein diacetát		Oxid dusnatý (NO)	zelená	495	515	Valderrama et al., 2007
AF488 Alexa fluor 488		S-nitrosothiol (RONS)	zelená	495	519	Valderrama et al., 2007
CuFL Kovový fluorofor s mědí v molekule (CuFL ₅)		Oxid dusnatý (NO) a další RONS	zelená	488	516	Albers, 2008
FL2E Kovový fluorofor		Oxid dusnatý (NO) a další RONS	zelená	495	520	http://www.strem.com/uploads/tech_tech_n_notes/96-0293tech.pdf , McQuade et Lippard, 2010
MNIP-Cu		Oxid dusnatý (NO) a další RONS	zelená	490	492	Ouyang et al., 2008

Mezi další metody studia RONS patří imunohistochemická detekce enzymů, které jsou zapojeny do metabolismu RONS. Jedná se o metodu zkoumající ve vzorku přítomnost určitých antigenů pomocí specifických protilátek. Používané metody se rozdělují na přímé, nepřímé dvoustupňové a nepřímé trojstupňové. Využívají se protilátky monoklonální nebo polyklonální, které mohou být značené kovem, enzymem nebo fluorochromem.

Nejjednodušší, ale ne příliš citlivou metodou, je metoda přímá. Lze ji použít pro antigeny hojně zastoupené ve vzorku, kdy značka bývá navázána přímo na primární protilátku. Citlivější metodou je nepřímá dvoustupňová metoda, kdy se použije neoznačená primární protilátka, která je specifická proti prokazovanému antigenu. Následně se použije značená sekundární protilátka, která je specifická proti imunoglobulinům zvířete, které bylo původcem primární protilátky. Pokud je množství antigenu ve vzorku příliš nízké, využívá se nepřímá trojstupňová metoda. V první řadě se použije specifická primární protilátka proti studovanému antigenu, následně specifická protilátka proti imunoglobulinům zvířete, které bylo dárce primární protilátky a protilátky využívané ve třetí fázi. Ve třetí fázi se nanese značený komplex (například peroxidáza-antiperoxidázový komplex).

Příkladem nepřímé dvoustupňové metody je detekce GSNO i GSNOR. V prvním kroku se jako primární protilátka využívá komerční polyklonální krysí protilátka proti GSNO. Fluorescenčně značená sekundární protilátka je komerční králičí protilátka proti imunoglobulinům křesy. Fluorescenční značka se pozoruje při excitační/emisní vlnové délce $\lambda \sim 493/518$ nm. Pro lokalizaci GSNOR slouží jako primární protilátka v prvním kroku laboratorně připravená polyklonální králičí protilátka proti GSNOR. Fluorescenčně značenou sekundární protilátkou je komerční kozí protilátka proti imunoglobulinům králíka. Fluorescenční značka se pozoruje při excitační/emisní vlnové délce $\lambda \sim 493/518$ nm (Kubienová, 2012).

3.6.1.1. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie využívá tzv. luminiscenčního jevu, jenž se vyznačuje schopností vyzařovat do svého okolí světlo. Existují dvě formy luminiscence, v prvním případě látka vydává světlo na základě chemické reakce, jde o tzv. chemiluminiscenci. Druhou formou luminiscence je fotoluminiscence, kde se jedná o reakci látky na světlo, do této kategorie se řadí i fluorescence. Principem fluorescence je schopnost atomů nebo molekul absorbovat množství energie, tzv. excitační energie a vzápětí tuto energii opět vyzářit v podobě světelného emisního záření o větší vlnové délce. Fluorescence je pouze krátkodobým jevem, s přibývajícím časem odeznívá schopnost fluorochromu (fluorescenčního barviva) emitovat světlo. Dalším možným problémem při mikroskopování je intenzivní osvětlení, při kterém je preparát špatně pozorovatelný. Řada látek je schopna tzv. autofluorescence, jde o emitování světla biologických struktur (mitochondrie, lysozomy, chlorofyl), které se následně chovají jako fluorochromy. Podle polohy zdroje světla rozlišujeme dva typy fluorescenčních mikroskopů. U trans-fluorescenčního mikroskopu (Transmission light fluorescent microscope) světlo prochází excitačním filtrem a dopadá na preparát zespodu, tzn. že zástinový kondenzor odráží světlo tak, že dopadá na preparát z boku a díky tomu excitační světlo prochází mimo objektiv. Do objektivu se tak dostává pouze emitovaná fluorescence. Naopak u epi-fluorescenčního mikroskopu (Reflected light fluorescent microscope) dochází k osvětlení preparátu přes objektiv. Emisní světlo se vrací zpět do objektivu, proto je nutné použít tzv. dichroické zrcadlo, které zaručí odražení excitačního světla do objektivu a propuštění emitovaného světla do okuláru (Olympus America Inc, 2012).

3.6.1.2. Konfokální mikroskopie

Velkou výhodou konfokálního mikroskopu je jeho vysoká rozlišovací schopnost, která je daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Rozlišení je asi 1,4x-1,6x vyšší než u klasického světelného mikroskopu s obdobnou optikou. Signál z rovin pod a nad rovinou zaostření je potlačen, tím se nabízí možnost snímat sérii optických řezů, díky kterým lze rekonstruovat pozorovaný objekt v 3D projekci (Kubínová, 2006). Vynález konfokálního mikroskopu si nechal patentovat americký vědec Marvin Minsky v roce 1957, ale funkční přístroj sestrojili až prof. M. Petráň a doc. M. Hadravský z Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni v roce 1965 (Claxton *et al.*, 2004 - 2009).

Jedním z nejčastěji používaných typů konfokálního mikroskopu je rastrovací konfokální mikroskop „Confocal Laser Scanning Microscope“ (CLSM) využívající jako zdroj světla laser. Laserový paprsek tvořící bodový zdroj světla je fokusován na clonku, dále proniká objektivem a dopadá až na samotný vzorek, kde je obraz clonky fokusován do bodu, jehož průměr odpovídá difrakční neboli rozlišovací mezi. Přes tentýž objektiv prochází světlo odražené, rozptýlené, případně fluorescence. Sekundární paprsky prochází přes clonku, jejíž bodový obraz je díky děliči paprsků umístěn před fotonásobič. Tam se nachází druhá konfokální bodová clonka, která filtruje světlo procházející z oblasti mimo ohniskovou rovinu mikroskopu. Základním principem CLSM je to, že se obraz nevytváří najednou, ale vzniká řádkováním bod po bodu. Řádkováním jsou snímány optické body v rovině XY a díky přesně definovanému posunu v ose Z i jednotlivé optické řezy. Rastrování bod po bodu může probíhat třemi různými způsoby, rozmítáním laserového paprsku, příčným posuvem vzorku před objektivem nebo posunem samotného objektivu. Po skenování je počítač schopen sestavit obraz celého preparátu (Kubínová, 2004).

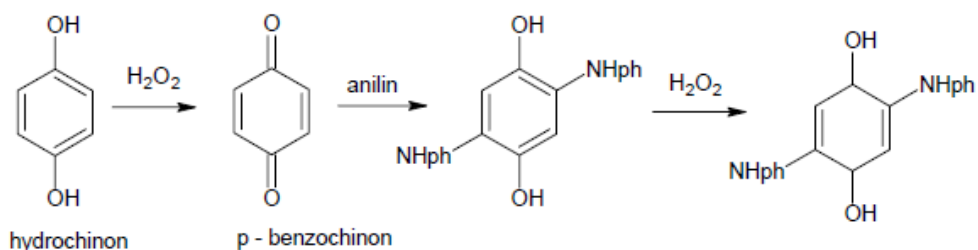
Dalším typem konfokálního mikroskopu je tandemový skenovací mikroskop „Tandem scanning confocal microscope“, který využívá pro skenování rotující disk tzv. Nipkowův kotouč. Jedná se o rotující perforovanou destičku, která zajišťuje usměrnění laserového světla na body preparátu. Kotouč obsahuje desítky až stovky tisíc otvorů v Archimedových spirálách. Tandemové skenovací mikroskopy se využívají zejména pro pozorování živých preparátů, jejich výhodou je rychlé snímání, díky kterému na pozorovaný objekt působí nižší intenzita světla, a tím se snižuje vybělování preparátu tzv. photobleaching (Hibbs, 2004). Konfokální mikroskopie umožňuje pozorování optických řezů vzorkem, preparát se pozoruje buď v režimu viditelného světla, nebo v režimu fluorescence.

3.6.2. Spektrofotometrické metody

Mezi nepřímé metody stanovení NO a jeho metabolitů patří spektrofotometrie. Spektrofotometrické stanovení dusitanů spočívá na Griessově metodě, využívající nitrátreduktázu a Griessovo činidlo (sulfanilamid). Dusitany reagují se sulfanilamidem za vzniku diazoniové soli sulfanilamidu, která dále reaguje s Griessovým činidlem II. (naftylethyldiaminem) za vzniku produktu charakteristického zbarvení, který se stanovuje spektrofotometricky. V první fázi spektrofotometrické analýzy se ve vzorku stanovuje obsah dusitanů, ve druhé fázi součet dusičnanů a dusitanů. Dusičnany, vzniklé reakcí NO a hemoglobinu, se na dusitany převádějí jednak díky enzymu nitrát reduktáze, nebo chemicky na mědi potažených kadmiových kuličkách, detekce probíhá při $\lambda \sim 540$ nm (Kupková *et al.*, 2004).

Spektrofotometrické metody se také využívají pro staovení peroxidu vodíku v rostlinách. První možností detekce H_2O_2 je metoda využívající jodid draselný. Jodid draselný reaguje s peroxidem vodíku ve stechiometrii 1:1 za tvorby jódu, který lze stanovit měřením absorpance při 390 nm (Klapheck *et al.*, 1990).

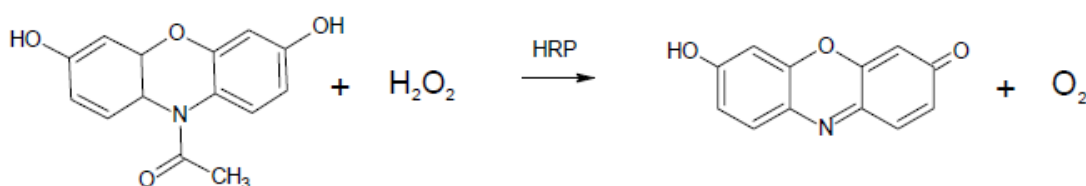
Princip další metody spočívá v reakci hydrochinonu, jenž se za přítomnosti H_2O_2 oxiduje na *p*-benzochinon (obr. 16). Vzniklý meziproduct reaguje s anilinem na výsledný produkt, který je spektrofotometricky měřen při 550 nm. Jako katalyzátor se využívá molybdenan amonný. Tato metoda je lineární do koncentrace peroxidu vodíku 0,4 $\mu\text{mol/l}$ (Elnemma, 2004).



Obr. 16: Reakce hydrochinonu s anilinem (převzato z: Petřivalský *et al.*, 2010)

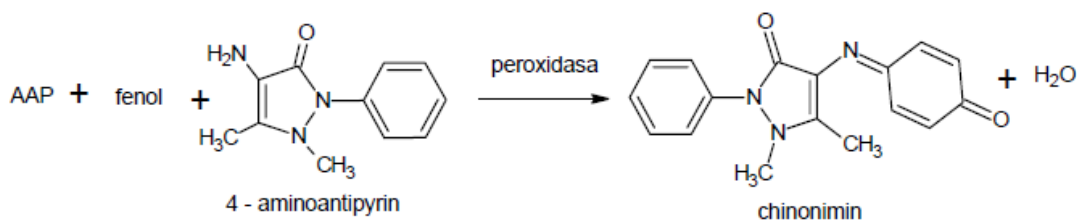
Principem metody s xylenolovou oranží (FOX) je oxidace železa (II) na železo (III) peroxidem vodíku za přítomnosti katalyzátoru, kterým je v tomto případě sorbitol. Železo (III) tvoří s xylenolovou oranží fialový komplex, který je spektrofotometricky měřitelný při 560 nm. Metoda je lineární do koncentrace 2 μM peroxidu vodíku (Petřivalský, 2010).

Metoda s Amplex Red (obr. 17) je založena na reakci Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) s peroxidem vodíku v přítomnosti peroxidázy ve stechiometrii 1:1 za tvorby resorufinu, který lze stanovit měřením absorbance při 570 nm nebo fluorescence (excitační filtr: 530/25, emisní filtr 590/35). Pro vzorky obsahující nízkou koncentraci peroxidu vodíku je vhodné použít fluorescenční měření, které je lineární do 0,004 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace peroxidu vodíku a je citlivější. Naopak při vyšších koncentracích je vhodné použít měření absorbance, tato metoda je lineární do 0,3 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace peroxidu vodíku (Zhou et al., 1997).



Obr. 17: Reakce Amplex Red s peroxidem vodíku (převzato z: Petřivalský *et al.*, 2010)

Další metoda spočívá v reakci aminoantipyrinu s peroxidem vodíku a fenolem za přítomnosti peroxidázy (obr. 18). Barevný produkt této reakce lze určit měřením absorbance při 505 nm. Metoda je lineární do koncentrace 6 nM peroxidu vodíku (Seki *et al.*, 2004).



Obr. 18: Reakce aminoantipyrinu s peroxidem vodíku (převzato z: Petřivalský *et al.*, 2010)

Poslední metodou je metoda s aminoantipyrinem a 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonovou kyselinou, jejíž princip spočívá v reakci oxidovaného aminoantipyrinu s dichlorhydroxybenzensulfonovou kyselinou (DCHBS). Produkt má růžovofialové zbarvení a lze jej stanovit měřením absorbance při 515 nm (Petřivalský *et al.*, 2010).

3.6.3. EPR

Elektronová paramagnetická rezonanční (EPR) spektroskopie, také nazývaná elektronová spinová rezonanční (ESR) spektroskopie, patří mezi nejefektivnější metody pro detekci molekul obsahujících nepárové elektrony (paramagnetické ionty, kyslíkové radikály, organické radikály). Paramagnetismus atomů a molekul je nutnou podmínkou aplikace EPR spektroskopie.

Tato metoda je založena na přechodech mezi energetickými hladinami vzniklými působením magnetického pole na nepárový elektron. Předmětem zkoumání jsou vysoce rozlišená EPR spektra paramagnetických systémů v roztocích. Například NO obsahuje v molekule 11 valenčních elektronů, ale EPR spektrum vzniká u volné molekuly NO pouze za předpokladu, je-li v excitovaném stavu. Pro stanovení NO se používá metoda tzv. záchytu spinu, kdy reaguje radikál s diamagnetickou látkou, která je citlivá k vytvoření komplexu, vznikne radikál s delším biologickým poločasem a lepší detekovatelností. NO vytváří takovéto komplexy například s přechodnými kovy, thioly nebo s reaktivními formami kyslíku (Kupková *et al.*, 2004, Večeřová, 2013).

Výhodou metody EPR spektroskopie je její vysoká citlivost, kdy v příznivých podmínkách lze měřit paramagnetické systémy s koncentrací až $10^{-9} \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$, dále její výpověď o reaktivitě a molekulové struktuře.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál

4.1.1. Rajče

Experimenty byly prováděny u rajčete *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (WT) a jeho mutantní formy *7B-1* (Sawhney, 1997). Spontánní recesivní „single gene“ mutant *7B-1* byl vyselektován pro samčí sterilitu, projevující se za dlouhého dne (fotoperioda 16 h světlo, 8 h tma). Za krátkého dne (fotoperioda 8 h světlo, 16 h tma) jsou rostliny fertily (Sawhney, 1997). Mutovaný gen není dosud znám, podle dosažených výsledků však lze předpokládat defekt v signální dráze modrého světla (Fellner *et al.* 2002; Hlavinka *et al.*, 2013).

4.1.2. *Phytophthora infestans*

Pro inokulaci rajčat byly použity kmeny *Phytophthora infestans* VŽ 14/14 a V1 4/14 poskytnuté ze sbírky Katedry ochrany rostlin FAPPZ ČZU v Praze. *P. infestans* byla pěstována na pevných médiích V8 a z rajčatové šťávy při teplotě 25 °C. Základem kultivačních médií pro *P. infestans* jsou přírodní zeleninové šťávy, V8 (směs džusů z 8 druhů zeleniny) nebo 100% rajčatový džus. 350 ml džusu je třeba pufrovat 5 g CaCO₃ za stálého míchání po dobu několika minut. Následuje centrifugace po dobu 20 minut při 6000g. Supernatant se ředí destilovanou vodou v poměru 1:5. K přípravě pevného média se přidává 2-3% agar (w/v). Media se poté autoklavují při 120 °C po dobu 20 minut. Po vychladnutí na cca 90 °C se nalévají v aseptických podmínkách do sterilních Petriho misek. Po ztuhnutí se uchovávají v lednici při 4°C.

4.2. Metody

4.2.1. Studium anatomie květů

Pro experimenty byla používána poupata 3 měsíce starých rostlin rajčat WT a *7B-1*, pěstované za dlouhého dne (fotoperioda 16 hodin světlo, 8 hodin tma), teplotě 22 °C. Poupata se sbírala v různých velikostech, od 3 do 8 mm.

4.2.1.1. Příprava poly-L-lysinových skel

Předem očištěná podložní skla byla vložena do vlhké komůrky, mezi 2 skla bylo napipetováno 60 μ l poly-L-lysinu, inkubace probíhala 30 minut při pokojové teplotě. Skla byla očištěna destilovanou vodou a nechána uschnout přes noc v pokojové teplotě.

4.2.1.2. Zalévání a řezání

Proces zalévání pupat do bločků probíhal 7 po sobě následujících dní. První den byla nasbíraná poupata ponořena do čerstvého fixačního roztoku 4% paraformaldehydu (PFA) a umístěna na ledu ve vakuu (500 mm Hg) po dobu 15-20 minut. Tento postup byl opakován s čerstvým PFA dokud se všechna poupata v roztoku neponořila. Následně byl vyměněn fixační roztok a poupata byla ponechána přes noc v lednici ve 4°C.

Druhý den byla poupata dvakrát omyta v PBS po dobu 30 minut. Dále byla rostlinná pletiva odvodněna v etanolu následujícím způsobem:

10 % etanol	30 minut
30 % etanol	30 minut
50 % etanol	1 hodina
70 % etanol	1 hodina
85 % etanol	1 hodina
95 % etanol	1 hodina
100 % etanol	1 hodina ...opakování 3x

Následně byly vzorky uloženy přes noc v lednici ve 4°C v roztoku toluidinové modři (0,1 % v 100 % etanolu).

Třetí den byly vzorky vyndány z lednice a hodinu ponechány při pokojové teplotě. Etanol byl postupně nahrazen HistoClear:

Etanol/HistoClear (3:1, V/V)	1 hodina
Etanol/HistoClear (1:1, V/V)	1 hodina
Etanol/HistoClear (1:3, V/V)	1 hodina
HistoClear	1 hodina ... opakování 3x

Na konci dne byla ke vzorku přidána $\frac{1}{4}$ objemu Paraplastu Plus, vzorky byly umístěny do 60°C přes noc.

Čtvrtý den se postupně sléval Histoclear a byl nahrazován Paraplastem, který se přidával po celý den postupně každou hodinu. Na konci dne byl všechn Paraplast se zbytky Histoclearu nahrazen čistým zalévacím médiem a vzorky byly ponechány přes noc v 60°C.

Pátý a šestý den se přibližně po 4 hodinách 3 krát vyměnil Paraplast vždy za čerstvý, vzorky byly uchovávány v 60°C.

Sedmý den byla poupata přelita do misek a zalita čerstvým Paraplastem a srovnána pro následné nařezání. Po ztuhnutí byly vzorky skladovány v lednici ve 4°C (Javelle *et al.*, 2011).

Vzorky byly pomocí skalpelu nařezané na bločky obsahující jednotlivá poupata. Bločky byly následně pomocí roztaveného Paraplastu upevněny na dřevěnou kostku (nosič) a použity k přípravě řezů na mikrotomu (Mikrotom HM 200, Ergostar, Zeiss, Německo). Řezy tlusté 8 μm byly umístěny na předem nachystaná poly-L-lysinová podložní skla do kapky destilované vody. Pro přichycení řezů byla skla umístěna na termodesku.

4.2.1.3. Barvení a detekce kalózy fluoresceční mikroskopii

Před barvením řezů byl odstraněn Paraplast inkubací skel následujícím postupem:

Histoclear	20 sekund ...2x
100% etanol	30 sekund ...2x
95% etanol	30 sekund ...2x
70% etanol	30 sekund ...2x

Následně byla skla barvena Anilinovou modří (1% v destilované vodě).

Anilinová modř	3 minuty
Destilovaná voda	15 sekund ...2x
75% etanol	3 minuty

Skla s řezy byla vysušena v termostatu při 40°C a před mikroskopováním skladována v lednici ve 4°C.

Lokalizace kalózy ve vzorcích byla provedena fluorescenčním mikroskopem BX 60 (WU filtr; excitace 330-385 nm, emise 420 a více nm) a dokumentovány CCD kamerou DP73 (Olympus, Japonsko).

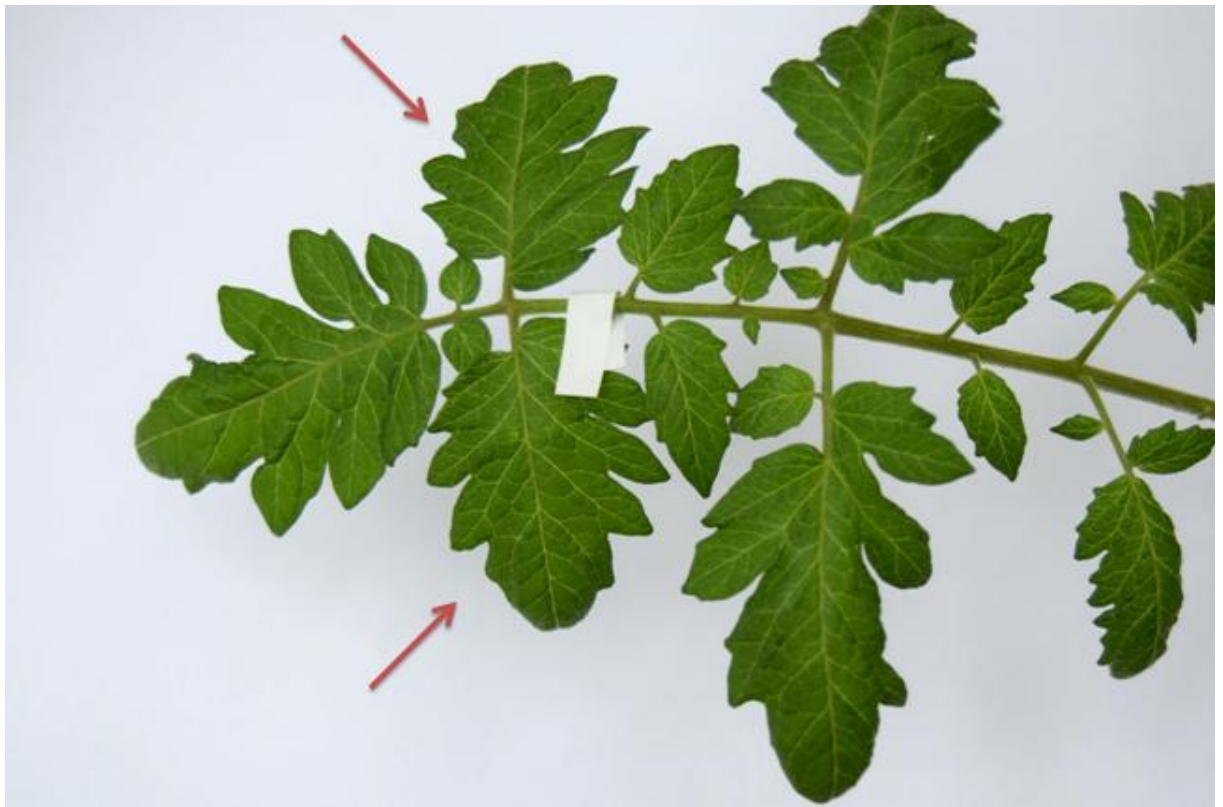
4.2.2. Histochemická detekce RONS konfokální mikroskopii

Čerstvě natrhaná poupata *S. lycopersicum* (WT a 7B-1) byla zalita do 4 % agarózy o teplotě asi 40°C. Po ztuhnutí byly bločky agarózy se vzorkem uprostřed nalepeny vteřinovým lepidlem na držák vzorku. Vibratomem (BangCo, 1000 Plus, Brno, Česká republika) byly zhotoveny příčné řezy poupaty o tloušťce 100 µm. Povrch agarózového kvádrů i žiletka byly během řezání průběžně zvlhčovány destilovanou vodou. Řezy byly přeneseny do kapky destilované vody na podložní skla. Následně byla voda odsána a nahrazena 20 µmol H₂DCF DA. Barvení probíhalo 10 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po uběhnutí časového limitu inkubace byly vzorky promyty destilovanou vodou a překryty krycím sklem. Následně byly vzorky pozorovány konfokálním laserovým rastrovacím mikroskopem.

Lokalizace molekul RONS byla zobrazena konfokálním laserovým rastrovacím mikroskopem Olympus FluoView 1000 (konfokální jednotka kombinovaná s invertovaným mikroskopem IX 81). Pro pozorování preparátů byl použit Normanského kontrast (DIC) a fluorescence (buzení 100W Hg výbojkou). K detekci signálu výše uvedeného fluorochromu byla použita vlnová délka 488nm excitačního argonového laseru (457nm, 488 nm, 515 nm) s celkovým výkonem 30 mW a také laser diodový (blízký UV 405 nm) s celkovým výkonem 20 mW. Detekce signálu probíhala v rozmezí vlnových délek emise 505-525nm. Pro následné zobrazování a snímání preparátů byl užit počítačový software FV10-ASW Viever (Olympus, Japonsko).

4.2.3. Inokulace rostlin

Pět rostlin každého genotypu (*S. lycopersicum* cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1*) bylo inokulováno zoosporami *P. infestans* (6. pravý lichozpeřený list rostliny, 2 lístky; viz obrázek 19). Inokulace byla provedena infiltrací injekční stříkačkou bez jehly. Pokožkou spodní strany listu rajčete lehce narušenou plastovou špičkou byla jemně vtlačena suspenze zoospor *P. infestans* do mezofylu listu. Nad vybraným listem byla pomocí žiletky mírně narušena pokožka stonku a nanesena kapka suspenze zoospor patogena. Pět kontrolních rostlin bylo ošetřeno stejně, jen destilovanou vodou. Odběry listů byly provedeny 24, 48, 120 a 168 hodin po inokulaci (hpi). Zamražený materiál byl do provedení experimentů uchováván v -80°C .



Obr. 19: Inokulovaný lichozpeřený list rajčete (šipky označují naočkované listy)

4.2.4. Stanovení hladiny peroxidu vodíku v infikovaných listech

Koncentrace peroxidu vodíku v infikovaných listech rajčete byla stanovena spektrofotometricky (Mikrodestičkový spektrofotometr, Reader Synergy HT, BioTek Instruments, USA) metodou s jodidem draselným (KI). Listy byly v třetí misce homogenizovány v 0,1 % trichloroctové kyselině (TCA) v poměru 1:10 (w/v). Extrakt byl v mikrozkušnicích Eppendorf centrifugován 15 minut při 14000 g a 4°C. Následně bylo 0,5 ml získaného supernatantu napipetováno do nové mikrozkušnice a byl přidán 1ml 1M KI a směs homogenizována na třepače (Tománková *et al.*, 2006).

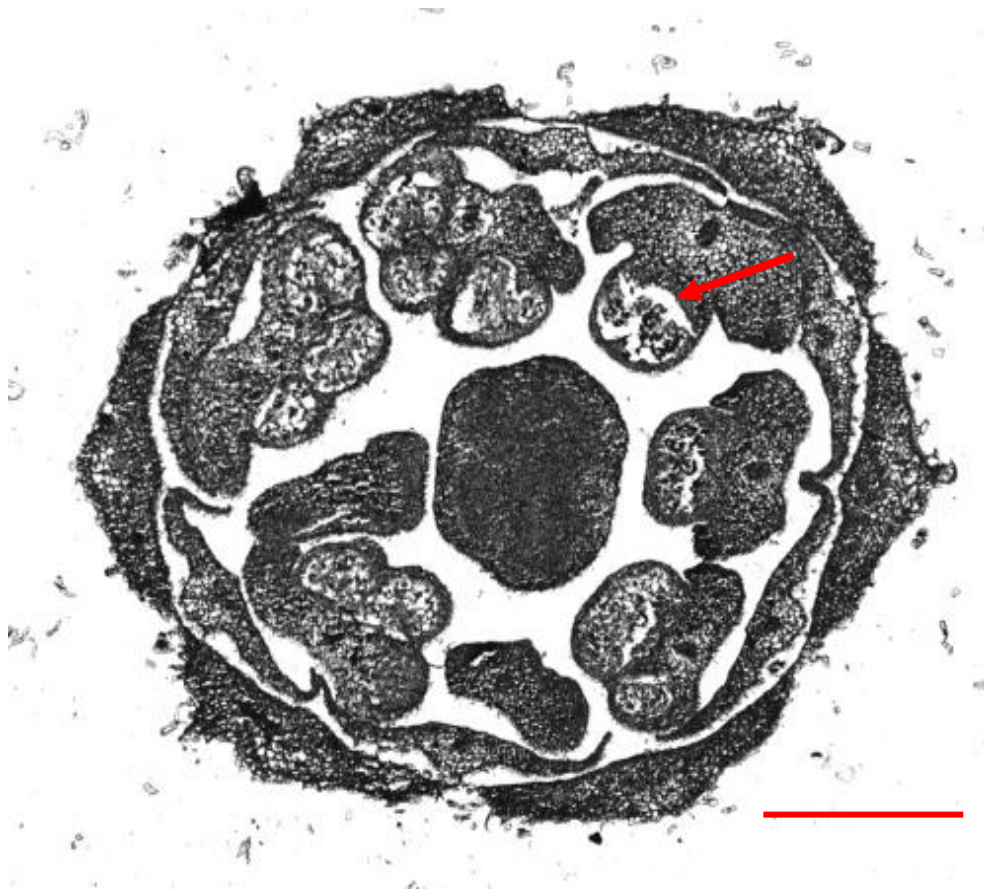
Kalibrační křivka koncentrace peroxidu vodíku byla naměřena pro rozsah koncentrací peroxidu vodíku 1-50 μmol . Do mikrotitrační destičky byl postupně pipetován roztok standardu H_2O_2 (koncentrace 0, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μmol) a činidlo (1 ml KI) o celkovém objemu 150 μl . Do dalších jamek bylo následně pipetováno vždy 150 μl studovaného vzorku s 1M KI. Absorbance byla změřena při 390 nm (Petřivalský, 2010). Měření absorbance bylo pro každý vzorek (genotyp – s / bez inokulace – čas) prováděna nejméně v triplicátu.

Koncentrace H_2O_2 byla vypočtena z rovnice lineární regrese, $y = kx + q$ (kde y – hodnota absorbance vzorků, x – hodnota koncentrace H_2O_2 , k – směrnice přímky, q – druhá souřadnice průsečíku přímky s osou y), která byla získána z kalibrační křivky vytvořené vynesáním absorbancí kalibračních standardů proti koncentraci peroxidu vodíku. Výsledný obsah peroxidu vodíku ve vzorku byl vztažen na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu (FW). Ke zpracování grafů byl použit program Microsoft Office Excel 2007.

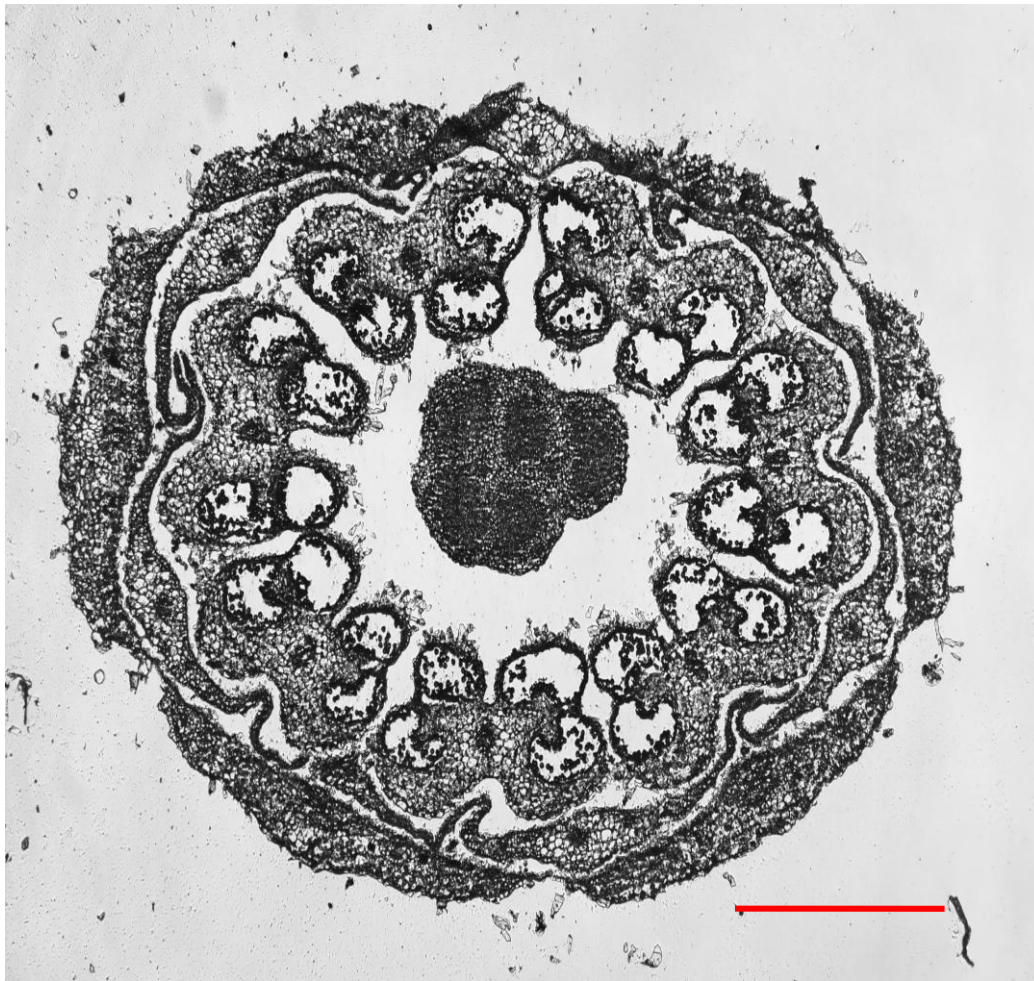
5. VÝSLEDKY

5.1. Studium anatomie květů

Mikroskopické studium květů prokázalo, že mutantní rostliny *7B-1*, známé samčí sterilitou, vykazují několik abnormalit ve vývoji prašníků. Řez květem mutantu (obr. 20) dokazuje, že jednotlivé prašníky se vyvíjí nerovnoměrně a dochází ke změnám ve velikosti a tvaru ve srovnání s WT (obr. 21). Dalším nápadným znakem u mutantu *7B-1* je abnormálně vyvinuté tapetum u některých prašných váčků (šipka v obr. 20). Pozastavený vývoj mikrospor a špatná degradace kalózy u mutantu *7B-1* naznačuje možný problém v průběhu meiózy.



Obr. 20: Řez květem *S. lycopersicum* cv. Rutgers mutant *7B-1* ukazuje nerovnoměrný vývoj prašníků. Červená šipka poukazuje na abnormálně vyvinuté tapetum. Měřítko 400 μm .



Obr. 21: Rovnoměrný vývoj prašníků na řezu květem *S. lycopersicum* cv. Rutgers (WT). Měřítka 400 μm .

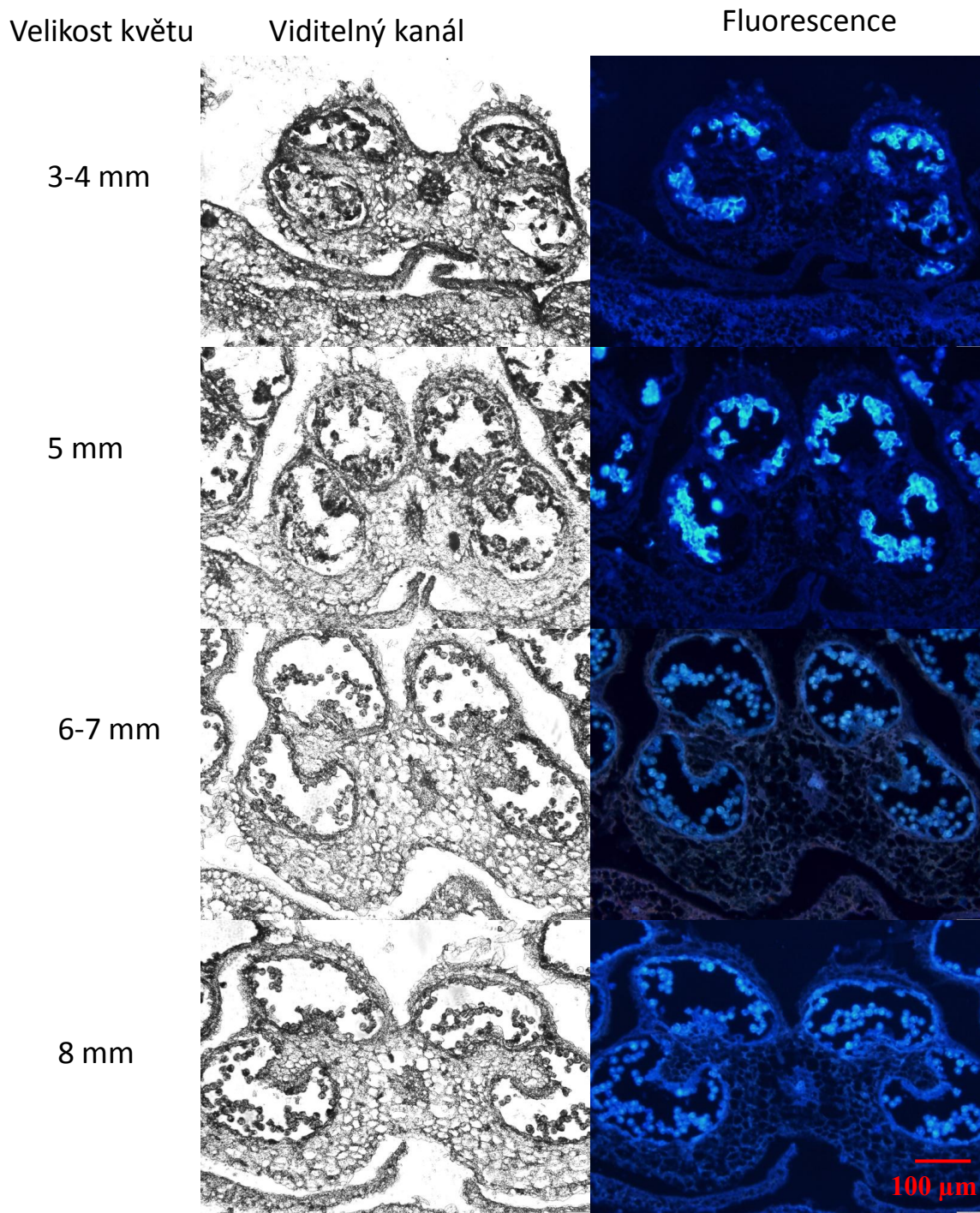
Intenzita fluorescenčního signálu kalózy detekované během vývoje květu je vyjádřena v tabulce III a ilustrována obrázky (obr. 22, obr. 23). U rostlin *7B-1* je signál v pozdějších fázích vývoje intenzivnější, což naznačuje, že dochází k pomalejší degradaci kalózy než u rostlin WT.

Tabulka III: Intenzita signálu kalózy v prašnicích *S. lycopersicum* cv. Rutgers WT a *7B-1*

Velikost květu	Rostlina	
	WT	<i>7B-1</i>
3-4 mm	+++	+++
5 mm	+++	+++
6-7 mm	+	++
8 mm	+	++

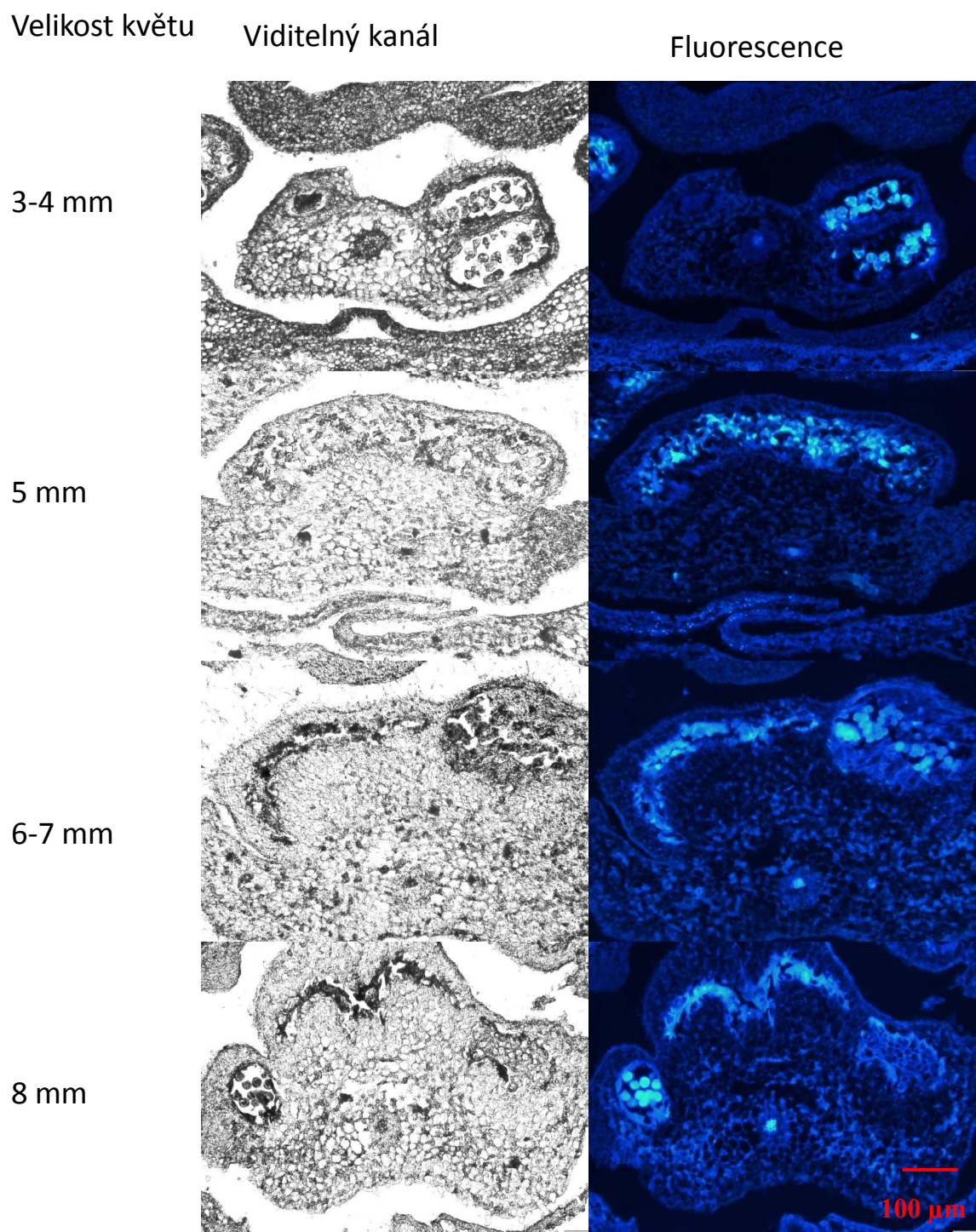
+ - nízká intenzita, ++ - střední intenzita, +++ vysoká intenzita

Rajče WT - detail



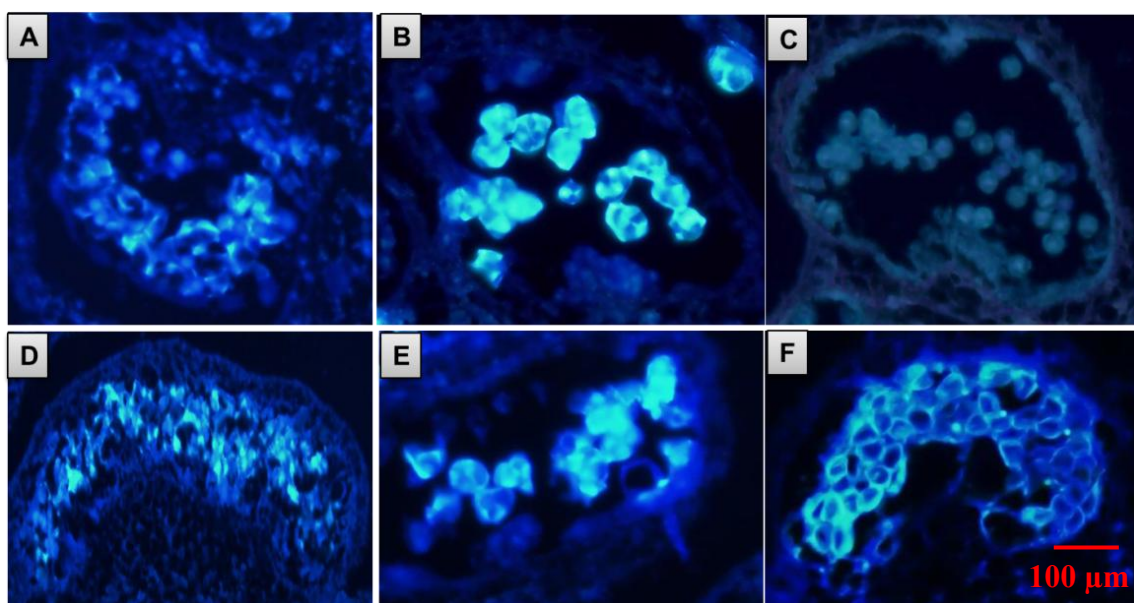
Obr. 22: Detail prašníků *S. lycopersicum* cv. Rutgers WT ve viditelném kanále (vlevo) a fluorescenční signál pro kalózu ve stejném materiálu (vpravo). Srovnání jednotlivých stádií vývoje květu (velikost 3-8 mm).

Rajče 7B-1



Obr. 23: Detail prašníků *S. lycopersicum* cv. Rutgers mutanta 7B-1 ve viditelném kanále (vlevo) a fluorescenční signál pro kalózu ve stejném materiálu (vpravo). Srovnání jednotlivých stádií vývoje květu (velikost 3-8 mm).

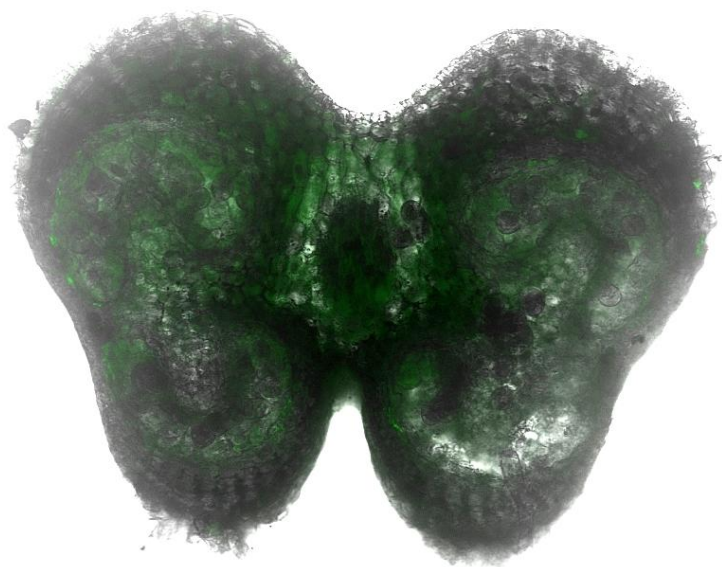
Dále byla pozorována lokalizace kalózy v prašnicích u WT i mutantu *7B-1* ve vztahu k procesu meiózy (obr. 24). V raném stádiu meiózy byla kalóza detekována kolem pylové mateřské buňky (PMC) v prašnicích jak u WT, tak u mutantních rostlin (obr. 24-A, D). U obou rostlin byla kalóza shodně detekována také kolem tetrád (obr. 24-B, E). Rozdíl nastal až ve fázi uvolnění mikrospor z tetrád, kdy u WT byla kalóza zcela degradována (obr. 24-C), což se u mutantní rostliny *7B-1* nestalo (obr. 24-F).



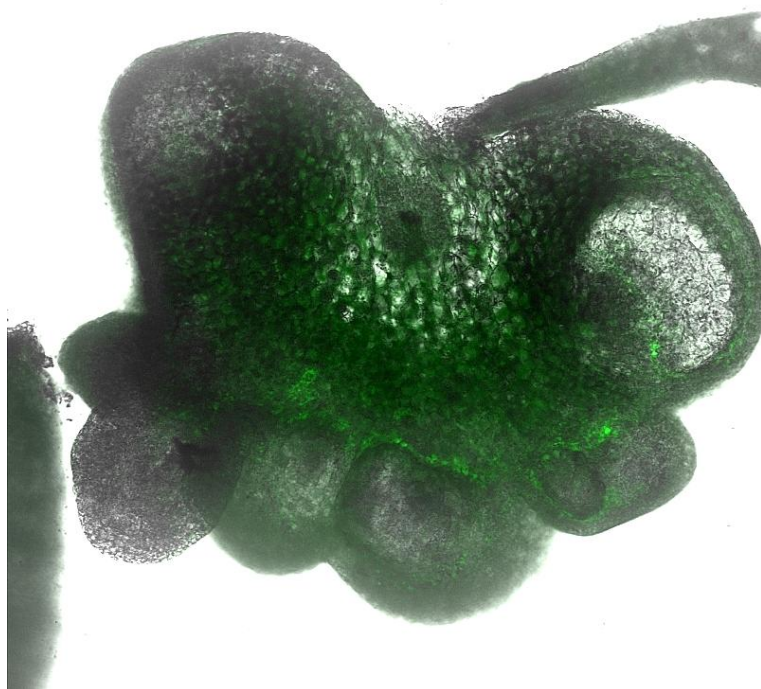
Obr. 24: Lokalizace kalózy v prašniku *S. lycopersicum* cv. Rutgers WT (A-C) a *7B-1* (D-F). Obrázky A, D symbolizují rané stádium meiózy; B, E značí tvorbu tetrád a C, F reprezentují fázi uvolňování mikrospor.

5.2. Lokalizace RONS v prašnicích

Histochemická detekce peroxidu vodíku a dalších RONS byla provedena u celých poupat a jejich příčných řezů fluorescenční sondou H₂DCF DA a signál byl zobrazen konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Signál byl lokalizován kolem prašných váčků, okolo cévního svazku a v oblasti konektivu, a to jak u WT (obr. 25), tak u mutantní rostliny *7B-1* (obr. 26). U mutantní rostliny *7B-1* byl signál intenzivnější v pletivech okolo prašných váčků.



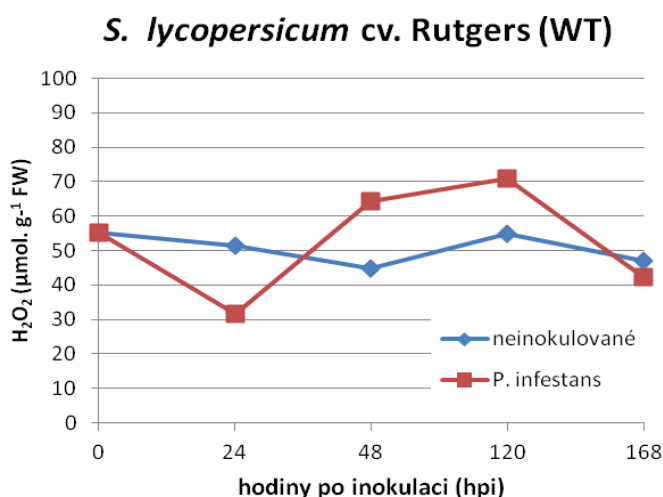
Obr. 25: Lokalizace peroxidu vodíku a dalších RONS v prašníku *S. lycopersicum* cv. Rutgers (WT). Obrázek je kombinací viditelného kanálu a fluorescenčního signálu pro RONS po obarvení H2DCF DA, 100x zvětšeno.



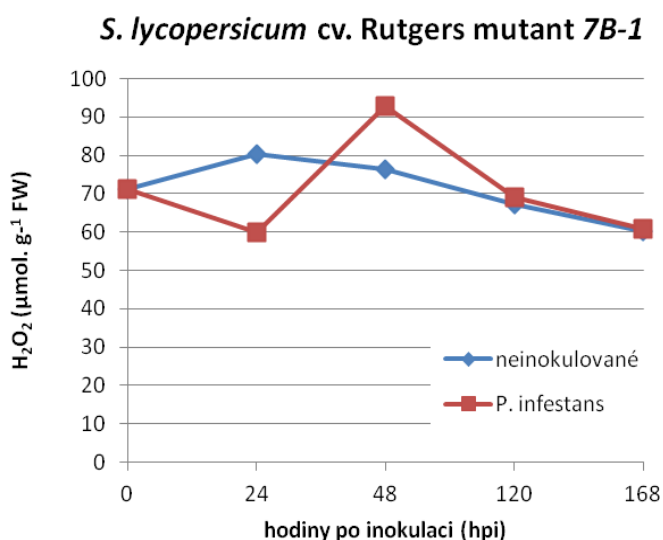
Obr. 26: Lokalizace peroxidu vodíku a dalších RONS v prašníku *S. lycopersicum* cv. Rutgers mutant *7B-1*. Obrázek je kombinací viditelného kanálu a fluorescenčního signálu pro RONS po obarvení H2DCF DA, 100x zvětšeno.

5.3. Stanovení hladiny peroxidu vodíku v infikovaných listech

Naměřené koncentrace H_2O_2 vztažené na 1 g FW („fresh weight“ = čerstvé váhy) se pohybovaly u zdravých rostlin od 45 do 55 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW u *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers (WT) (obr. 27) a od 60 do 80 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW u mutantu *S. lycopersicum* cv. Rutgers 7B-1 (obr. 28).



Obr. 27: Změny koncentrace H_2O_2 v listu *S. lycopersicum* cv. Rutgers (WT) během 168 hodin po inokulaci *P. infestans*. Absorbance byla měřena při 390 nm.



Obr. 28: Změny koncentrace H_2O_2 v listu *S. lycopersicum* cv. Rutgers mutant 7B-1 během 168 hodin po inokulaci *P. infestans*. Absorbance byla měřena při 390 nm.

U obou genotypů po infekci *P. infestans* došlo 24 hpi k poklesu hladiny peroxidu vodíku ve srovnání s neinokulovaným listem, následně 48 hpi jeho koncentrace vzrostla. Rozdíl v reakci obou genotypů se projevil 120 hpi, kdy hladina H₂O₂ u mutantu *7B-1* klesla na úroveň neinokulovaného pletiva (obr. 28), zatímco u WT ještě vzrostla (obr. 27). 168 hpi shodně u obou genotypů došlo k poklesu hladiny H₂O₂ na úroveň neinokulovaného listu

6. DISKUSE

Rajče je významnou plodinou pěstovanou na celém světě, ale je i modelovou rostlinou pro studium patofyziologických procesů. Spontánní mutant rajčete *7B-1* (*Solanum lycopersicum* cv. Rutgers) byl již dříve popsán jako samčí sterilní linie závislá na fotoperiodě (Sawhney 1997, Sawhney, 2004). Bylo prokázáno, že mutant *7B-1* je odolnější vůči biotickému a abiotickému stresu, zejména díky nadprodukcí kyseliny abscisové (ABA) (Fellner *et al.*, 2001; Fellner *et al.*, 2001; Bergougnoux *et al.*, 2009), tolerance vůči stresu se zvyšuje působením modrého světla (Fellner *et al.*, 2002). Naopak hladiny dalších rostlinných hormonů, jako jsou ethylen, kyselina indolyl-3-octová a gibereliny, jsou u mutanta *7B-1* sníženy (Fellner *et al.*, 2001; Fellner *et al.*, 2005; Bergougnoux *et al.*, 2012). V dlouhých dnech (LD) mají květy *7B-1* scvrklé tyčinky produkujícími neživotaschopné mikrospóry, zatímco v krátkých dnech (SD) jsou rostliny plodné a produkují normální tyčinky s funkčním pylem. Tato práce se zaměřila na bližší studium anatomie a role kalózy a ROS během vývoje prašníků u rostlin wildtypu a mutantních linií *7B-1*. Květy mutantních rostlin *7B-1* se vyznačovaly nerovnoměrně se vyvíjejícími prašníky, abnormálně vyvinutým tapetem v prašnicích, změnami ve vývoji mikrospor a špatnou degradací kalózy.

Samčí plodnost závisí na správném vývoji prašníků, zvláště důležitými procesy při tvorbě pylu jsou meióza a vývoj tapeta. Základními typy samčí sterility jsou sterilita modifikační, virová, růstová, jaderná, cytoplazmatická a chromozomová (Řepková, 2015). Růstová sterilita je spjata s fytohormony, hormonální nerovnováha (zejména v tyčinkách) může být způsobena jednak mutacemi různých genů nebo může být ovlivněna nepříznivými podmínkami vnějšího prostředí (např. teplota, fotoperioda, vlhkost). Základní buněčné defekty jsou vysoce variabilní a mohou zahrnovat například cytoskeletální změny, nesrovnalosti tapeta, změny metabolismu cukrů, hromadění reaktivních forem kyslíku (oxidační stres) a změny v programované buněčné smrti, vše záleží na druhu a délce působení stresorů (De Storme *et al.*, 2014). Samčí sterilita může být také způsobena poruchami vývoje mikrospory a pylového zrna (samčího gametofytu), stejně jako poruchami degenerace tapeta nebo dehiscence (otevření) prašníku (Smith *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1992). Degenerace tapeta v pozdní fázi vývoje pylu, způsobená programovanou buněčnou smrtí („programmed cell death“, PCD), umožňuje tvorbu a dozrávání pylových zrn. Během meiózy podstupují buňky tapeta PCD a uvolňují enzym β -1,3-glukanázu, jež hydrolyzuje kalózu z tetrad (Scott *et al.*, 2004). Omidvar *et al.* (2016)

zjistil u mutantního rajčete *7B-1* zpoždění v PCD buněk tapeta oproti WT, kde byl tento jev zaznamenán již ve stádiu tvorby tetrad. Podobným příkladem opožděné PCD a degradace tapeta je sterilní mutant rýže *TDR* (Li *et al.* 2006). Abnormální ukládání či rozpouštění kalózy může vést k poruše vývoje mikrospor, což následně vede k samčí sterilitě (Lu *et al.*, 2014). V této diplomové práci byla lokalizována kalóza v prašnicích *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers WT a jeho mutantní formě *7B-1* v procesu meiózy. Bylo zjištěno, že v prvních fázích meiózy nejsou rozdíly v ukládání kalózy mezi WT a mutantem *7B-1*. V pozdější fázi meiózy se však u mutantu *7B-1* kalóza nerozkládala, čímž tetrády pylových zrn zůstávaly spojeny. Tento defekt zamezuje uvolnění jednotlivých pylových zrn, znesnadňuje jejich přenos a klíčení. Za špatnou degradaci kalózy u mutantu *7B-1* v těchto pozdějších fázích nejpravděpodobněji stojí nedostatek enzymu β -1,3-glukanázy (Omidvar *et al.*, 2016). Defekt v rozkladu kalózy v tetradách pylových zrn byl podobně pozorován také v samčích sterilních prašnicích *Brassica napus* (Zhu *et al.*, 2010). U *A. thaliana* byla zaznamenána degradace tapeta ve fázi mitotického dělení pylu (Sanders *et al.*, 1999; Parish *et al.*, 2010). Dále bylo prokázáno, že PCD tapeta může být také ovlivněna prostřednictvím hladin ROS a defekty odbourávání ROS vedou k samčí sterilitě (Xie *et al.*, 2014). K tvorbě peroxidu vodíku v tapetu přispívá NADPH oxidáza, která je kódována geny „respiratory burst oxidase homolog“ (RBOH). Xie *et al.*, (2014) ukázali, že mutace v genech RBOH u *A. thaliana* ovlivnily načasování PCD v tapetu, což mělo za následek samčí sterilitu. Silnější signál pro RONS, pozorovaný v mé DP v podpůrném pletivu okolo prašníků u mutantních rostlin *7B-1*, může souviset s deformacemi tyčinek. Nižší signál pro RONS v oblasti prašníků u mutantu pak může souviset s abnormalitami v PCD. Tato hypotéza však zatím nebyla potvrzena.

Během ontogeneze je však také důležitá souhra v tvorbě/rozkladu kalózy a změn hladin jednotlivých ROS. U kvetoucích rostlin byly tyto procesy studovány na několika modelových rostlinách. U rýže byla prokázána role genu MADS3 v regulaci pozdních fází vývoje prašníků a tvorby pylu prostřednictvím snížení hladiny ROS. MADS3 je exprimován během pozdní fáze vývoje prašníku v tapetu a mikrosporech. Samčí sterilní mutant rýže *mads3-4* se vyznačuje narušeným vývojem pylu v důsledku oxidačního stresu. Abnormálně zvýšená hladina ROS, nárůst počtu peroxizomů, aktivit superoxid dismutázy a peroxidázy v *mads3-4* rostlinách v pozdější fázi vývoje prašníku je pravděpodobně výsledkem změněné exprese genů, které se podílejí na udržení hladiny ROS (Hu *et al.*, 2011). Další autoři dospěli k podobným výsledkům u pšenice (Ba *et al.*, 2013), bavlníku (Jiang *et al.*, 2007) a papriky (Deng *et al.*, 2012).

Ve vývoji prašníků hrají důležitou roli hormony, zejména gibereliny. Významným zdrojem biologicky aktivních giberelinů v prašnicích je tapetum (Kaneko *et al.*, 2003). Změna hladiny kyseliny giberelové (GA) je často spojována s abnormalitami ve vývoji prašníků, a také s pylovou sterilitou. GA- deficientní mutanty rajčat (Jacobsen *et Olszewski*, 1991), *Arabidopsis* (Plackett *et al.*, 2012) a rýže (Aya *et al.*, 2009) vykazují společné defekty PCD buněk tapeta, které vedou k pozastavení pozdní fáze meiózy v samčích sterilních tyčinkách (Omidvar *et al.*, 2016). Sawhney *et al.* (1988) dokázal aplikací GA obnovit samčí fertilitu u mutanta rajčete *SL-2* (Sawhney *et Bhadula*, 1988). K částečné obnově samčí fertility došlo po aplikaci GA také u námi studovaného mutanta *7B-1*. Je tedy pravděpodobné, že GA reguluje zahájení PCD v buňkách tapeta (Omidvar *et al.*, 2016). V souvislosti se samčí sterilitou byla u mutantní rostliny rajčete *SL-2* v minulosti zkoumána role kyseliny abscisové (ABA). Sterilní mutantní rostliny obsahovaly větší množství ABA než rostliny kontrolní. Bylo prokázáno, že na hormonální nerovnováhu mají vliv i faktory vnějšího prostředí, u mutanta *SL-2* se zkoumal vliv nízké teploty na fertilitu rostliny. Působení nízké teploty způsobilo u mutanta *SL-2* snížení hladiny ABA v tyčinkách a tím došlo k obnově samčí fertility (Singh *et Sawhney*, 1998).

Nicméně role kyseliny abscisové ve vývoji samčích orgánů není ve srovnání s vlivem GA tak jednoznačná. Studie prokázaly, že hladina ABA je během jednotlivých fází vývoje proměnlivá. Správný vývoj prašníků a s ním spojená samčí fertilita jsou závislé na hladině ABA v jednotlivých stádiích vývoje (Shu *et al.*, 2014). Otázkou však stále zůstává role hormonů v produkci a rozkladu kalózy a hladinami RONS během vývoje samčích květů. Nezaznamenala jsem studie, které by přinesly jednoznačné vysvětlení těchto procesů u rostlin. Řada autorů studovala souvislost mezi produkcí kalózy a ROS u rostlin vystavených různým abiotickým stresorům, např. těžkým kovům (Jones *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2004; Ueki *et Citovsky*, 2002; Kartusch, 2003). Další studie se zabývají faktory biotickými, například bylo zkoumáno jaká je role kyseliny abscisové v rezistenci rostlin vůči patogenům v souvislosti s hladinami ROS a ukládáním kalózy. Výsledky u jednotlivých patosystémů a mutantních rostlin jsou však protichůdné. Jednou z možností je, že ABA zvyšuje náchylnost rostlin potlačením ukládání kalózy a ligninu, které během patogeneze zesilují buněčnou stěnu hostitele (Spoel *et Dong*, 2008). Naopak ABA může rezistenci i zvyšovat, a to u rostlin, kde se tvoří papila jako bariéra proti invazi patogenu (většinou padlí). Nicméně, ABA depozici strukturních polysacharidů nereguluje přímo, ale má vliv na rychlost a intenzitu tohoto procesu (Flors *et al.*, 2005). Ještě komplikovanější je vztah mezi ABA a ROS. Luna

et al. (2011) ve svých studiích na *A thaliana* uvádí, že díky ABA se zvyšuje množství kalózy, které následně vede k akumulaci H₂O₂. Naopak další studie (Ghassemian *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2008) předpokládají, že zvýšená koncentrace ABA způsobuje hromadění H₂O₂, což vede k ukládání kalózy (García-Andrade *et al.*, 2011).

Dalším předmětem mé diplomové práce bylo stanovení koncentrace peroxidu vodíku v listech obou studovaných genotypů, *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1*, během 168 hodin po inokulaci (hpi) plísní *Phytophthora infestans*. Peroxid vodíku má klíčovou roli v interakci rostlina-patogen, a to jak v signalizaci, tak v přímé obraně vůči patogenu. Ve studii Tománková *et al.* (2006) byla hladina H₂O₂ sledována u tří genotypů rajčete po inokulaci *O. neolycopersici*. Po infekci se hladina peroxidu vodíku zvýšila u všech zkoumaných genotypů. Koncentrace H₂O₂ v infikovaném pletivu citlivého *S. lycopersicum* cv. Amateur byla nižší než 70 μmol g⁻¹ FW, zatímco u odolnějšího *S. chmielewskii* hodnoty dosahovaly 50–150 μmol g⁻¹ FW a u rezistentního *S. habrochaites* 110–380 μmol g⁻¹ FW. U rezistentního genotypu byla koncentrace H₂O₂ zvýšena ve dvou fázích, brzy po naočkování (6-8 hpi, dvojnásobný nárůst) a 20-48 hpi (trojnásobný nárůst). Oproti tomu u citlivého genotypu byl pozorován pouze pozdní vzestup hladiny H₂O₂ a to 20-24 hpi (Tománková *et al.*, 2006). Dá se předpokládat, že vysoká koncentrace H₂O₂ u rezistentních genotypů *Lycopersicon* spp. může souviset s intenzivní hypersenzitivní reakcí po infekci padlí (Mlíčková *et al.*, 2004).

V mé práci byly v neinokulovaných listech hladiny peroxidu vodíku podobné jako v práci Tománková *et al.* (2006). U *S. lycopersicum* cv. Rutgers (WT) se jeho koncentrace v listech pohybovala okolo 50 μmol g⁻¹ FW, u mutantní formy byla vyšší, asi 60-70 μmol g⁻¹ FW. 24 hodin po infekci *P. infestans* došlo u obou genotypů k poklesu koncentrace o 20-30 %, kdežto po infekci padlí nebyl zaznamenán pokles koncentrace H₂O₂ pod hladinu neinokulovaného listu (Tománková *et al.*, 2006). Tento rozdíl může souviset se životní strategií patogenů (*O. neolycopersici* je biotrof, zatímco *P. infestans* je hemibiotrof). Tato problematika i ve vztahu ke strukturním změnám, například ukládání kalózy, však zasluhuje další výzkum. Peng *et al.* (2015) ve své studii na rajčeti (*S. lycopersicum*) sledovali *SISOBIR1* a *SISOBIR1-like* geny zapojené do obranné reakce proti *Phytophthora parasitica*. Umlčení těchto genů mělo za následek zvýšenou náchylnost rajčete díky nerozpoznání *P. parasitica*. Podrobnější studium fyziologických změn ukázalo, že depozice kalózy, tvorba ROS a exprese PTI markerových genů byly sníženy u rostlin s umlčenými geny *SISOBIR1* a *SISOBIR1* (Peng *et al.*, 2015)

7. ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo porovnání anatomie květu a metabolismu RONS mezi *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers (WT) a jeho mutantní formou *7B-1*, vyznačující se samčí sterilitou. Byla provedena histochemická lokalizace kalózy a RONS fluorescenční a konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Dále byla měřena hladina peroxidu vodíku v listech obou rostlin po infekci *Phytophthora infestans*.

Mikroskopické pozorování potvrdilo očekávané defekty ve vývoji prašníků u mutantu *7B-1*. Kromě nerovnoměrně se vyvíjejících prašníků v květu bylo u mutantní rostliny rajčete zaznamenáno abnormálně vyvinuté tapetum, pozastavený vývoj mikrospor a špatná degradace kalózy. Histochemická detekce peroxidu vodíku a dalších RONS byla provedena u celých pupat a jejich příčných řezů fluorescenční sondou H2DCF DA a signál byl zobrazen konfokální laserovou skenovací mikroskopií. U obou rostlin byl signál lokalizován kolem prašných váčků, okolo cévního svazku a v oblasti konektivu, u mutantní rostliny *7B-1* byl signál intenzivnější v pletivech okolo prašných váčků. Tyto aspekty naznačily možný problém v procesu meiózy.

Spektrofotometrické stanovení hladiny peroxidu vodíku v listech u obou zkoumaných genotypů rajčete bylo provedeno metodou s jodidem draselným. Hodnoty naměřených koncentrací odpovídaly dříve publikovaným výsledkům u *S. lycopersicum*. Rozdíly v reakci na infekci způsobenou *P. infestans* byly pozorovány pouze 120 hpi, kdy u mutantu *7B-1* došlo k poklesu koncentrace H_2O_2 , kdežto u WT k nárůstu. Tyto předběžné výsledky ukazují na další fyziologické odlišnosti mutantu *7B-1*.

7. LITERATURA

- Acquaah G. (2002): Horticulture: Principles and Practices. Prentice Hall, New Jersey, 816 s.
- Albers A. E., Dickinson B.C., Miller E.W., Chang Ch. J. (2008): A red-emitting naphthofluorescein-based fluorescent probe for selective detection of hydrogen peroxide in living cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18: 5948–5950.
- Allen A. [online] (2008) [cit. 18.4 2016]: A Passion for Tomatoes. *Smithsonian Magazine*. Dostupné z: <www.smithsonianmag.com/science-nature/passion-for-tomatoes.html>
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399.
- Asada K. (2006): Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391-396.
- Aya K., Ueguchi-Tanaka M., Kondo M., Hamada K., Yano K., Nishimura M., Matsuoka M. (2009): Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of *GAMYB*. *Plant Cell* 21(5):1453–1472.
- Ba Q. S., Zhang G. S., Wang J. S., Che H. X., Liu H. Z., Niu N., Ma S. C., Wang J. W. (2013): Relationship between metabolism of reactive oxygen species and chemically induced male sterility in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Canadian Journal of Plant Science* 93: 675-681.
- Bailey-Serres J., Mittler R. (2006): The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology* 141: 311.
- Beligni M.V., 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 M.V., Lamattina L. (2001): Nitric oxide: A non-traditional regulator of plant growth. *Trends in Plant Science* 6: 508-509.
- Bergougnoux V., Hlaváčková V., Plotzová R., Novák O., Fellner M. (2009): The *7B-1* mutation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) confers a blue light-specific lower sensitivity to coronatine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal of Experimental Botany* 60: 1219-1230.
- Bergougnoux V., Zalabák D., Jandová M., Novák O., Wiese-Klinkengerg A., Fellner M. (2012): Effect of blue light on endogenous isopentenyladenine and endoreduplication during photomorphogenesis and de-etiolation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings. *PLoS ONE* 7: e45455.
- Bergougnoux V. (2014): The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances* 32: 170-189.
- Boller T., Felix G. (2009): A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60: 379-406.
- Bruckdorfer R. K., Dooley A., Truelove E., Low S. Y., Gao B., Abraham D. (2005): Nitric oxide and antioxidants as regulators of collagen biosynthesis: relevance to systemic sclerosis. *Inflammation Research* 54: 126-126.
- Březinová Belcredi N., Ehrenbergerová J., Prýma J., Havlová P. (2007): Stanovení aktivity enzymu superoxidodismutasy pomocí soupravy ransod v rostlinném materiálu. *Chemické listy* 101: 504-508.
- Campbell A. N., Reece B. J. (2006): *Biologie*. Computer Press, Brno, 1245 s. ISBN 80-251-1178-4
- Catalá, M., Gasulla, F., E Pradas del Real, A., García-Breijo, F., Reig-Arminana, J., Barreno, E. (2010): Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. *BMC Microbiology*, 10: 297-300.
- Cavalier-Smith T. (1998): A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73(3):203-66.
- Ceron-Garcia A., Vargas-Arispuro I., Aispuro-Hernandez E., et al. (2012): Oligoglucan elicitor effects during plant oxidative stress. In *Cell metabolism - Cell homeostasis and stress response*. Paula Bubulya (Ed.), InTech. ISBN: 978-953-307-978-3

Claxton N.S., Fellers T.J., Davidson M.W. [online] 2004-2009 [cit. 12.4 2016]: Laser scanning confocal microscopy. Dostupné z: www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf

Corpas, F. J., Barroso, J. B. (2014): Functional implications of peroxisomal nitric oxide (NO) in plants. *Frontiers in plant science, Plant Cell Biology* 5:1-3.

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. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779-795.

De Storme N., Geelen D. (2014): The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. *Plant, Cell and Environment* 37: 1–18

Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C. (2001): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.

Delledonne M., Zeier J., Marocco A., et al. (2001): Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 13454-13459.

Deng M.H., Wen J.F., Huo J. L., Zhu H. S., Dai X. Z., Zhang Z. Q., Zhou H., Zou X. X. (2012): Relationship of metabolism of reactive oxygen species with cytoplasmic male sterility in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae* 134: 232-236.

Durner J., Wendehenne D., Klessig D. F. (1998): Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 10328-10333.

Elnemma E. M.(2004):Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide by a hydroquinone-aniline system catalyzed by molybdate. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 25: 127-129.

Fellner M., Sawhney V. K. (2001): Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 215-221.

Fellner M., Zhang R., Pharis R. P., Sawhney V. K. (2001): Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in a tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous levels of, abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 52: 725-738.

Fellner M., Sawhney V. K. (2002): The *7B-1* mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta* 214: 675-682.

Fellner M., Franklin J. A., Reid D. M., Sawhney V. K. (2005): Increased Sensitivity to, and Reduced Production of Ethylene in an ABA-overproducing Tomato Mutant. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 47: 205-212.

Flors C., Fryer M. J., Waring J., Reeder B., Bechtold U., Mullineau P. M., Nonell S., Wilson M. T., Baker N. R. (2006): Imaging the production of singlet oxygen *in vivo* using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green. *Journal of Experimental Botany* 57: 1725–1734.

Flors V., Ton J., Jakab G., Mauch-Mani B. (2005): Abscisic Acid Against Pathogens? *Journal of Phytopathology* 153: 377-383.

Foyer C.H., Lelandais M.,Kunert K.J. (1994): Photooxidative stress in plants. *Physiologum Plantarum* 92: 696–717.

García-Andrade J., Vicente Ramírez V., Victor Flors V., Vera P. (2011): Arabidopsis ocp3 mutant reveals a mechanism linking ABA and JA to pathogen-induced callose deposition. *The Plant Journal* 67: 783–794.

García-Mata C., Lamattina L. (2001): Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology* 126: 1196-1204.

Ghassemian M., Lutes J., Chang H.S., Lange I., Chen W., Zhu T., Wang X., Lange B.M. (2008): Abscisic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry* 69: 2899–2911.

Gollmer A., Arnbjerg J., Blaikie F. H., Pedersen B. W., Breitenbach T., Daasbjerg K., Glasius M., Ogilby P. R. (2011): Singlet Oxygen Sensor Green: Photochemical behavior in solution and in a mammalian cell. *Photochemistry and Photobiology* 87: 671-679.

Gould K. S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A., Wendehenne D. (2003): Nitric oxide production in Tobacco leaf cells; a generalized stress response? *Plant, Cell and Environment* 26: 1851-1862.

Grace S. C., Logan B. A. (2000): Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *The Royal Society* 355:1499-1510.

Greenberg J. T. (1997): Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 525-545.

Guo R.X., Sun D.F., Tan Z.B., Rong D.F., Li C.D. (2006): Two recessive genes controlling thermoperiod-sensitive male sterility in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 112:1271-1276.

Guo T.R., Zhang G.P., Zhou M.X., Wu F.B., Chen J.X.(2004):Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. *Plant and Soil* 258: 241-248.

Halliwell B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.

Hibbs, A.R. (2004): Confocal microscopy for biologist. BIOCON Melbourne, AUS Springer,474 p, 27.

Hlavinka J., Nauš J., Fellner M. (2013): Spontaneous mutation *7B-1* in tomato impairs light-induced stomatal opening. *Plant Science* 209: 75-80.

Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009): Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické Listy* 103: 788-794.

Hoffmann J., Dimmeler S., Haendeler J. (2003): Shear stress increases the amount of S-nitrosylated molecules in endothelial cells: important role for signal transduction. *FEBS Letters* 551: 153-158.

Hu L., Liang W., Yin Ch., Cui X., Zong J., Wang,X., Hu J., Zhanga D. (2011): Rice MADS3 Regulates ROS Homeostasis during Late Anther Development. *The Plant Cell* 23: 515-533.

Chen Z., Gallie D. R. (2004): The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *The Plant Cell* 16:1134.

Chen X. Y., Kim J. Y. (2009): Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling and Behavior* 4: 489-492.

Invitrogen [online]. 2010 [cit. 7.4.2016]. Probes for nitric oxide research - Section 18.3. Dostupné z [www: <invitrogen.com>](http://www.invitrogen.com).

Itoh Y., Ma F. H., Hoshi H., Oka M., Noda K., Ukai Y., Kojima H., Nagano T., Toda N. (2000): Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry. *Analytical Biochemistry* 287: 203-209.

Jacobsen S.E., Olszewski N.E. (1991): Characterization of the arrest in anther development associated with gibberellin deficiency of the *gib-1* mutant of tomato. *Plant Physiology* 97:409-414.

Javelle M., Marco C. F., Timmermans M. (2011): In situ hybridization for the precise localization of transcripts in plants. *Journal of Visualized Experiments* 57: e3328.

Jiang P., Zhu Y., Wang X., Zhu W., Zhang X., Xie H., Wang X. (2007): Metabolism of Reactive Oxygen Species in the Cytoplasmic Male-Sterile Cotton Anther. *Agricultural Sciences in China* 6: 275-280.

Jones D.L., Kochian L.V., Gilroy S. (1998): Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. *Plant Physiology* **116**: 81-89.

Jones D.L., Blancaflor E.B., Kochian L.V., Gilroy S. (2006): Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment* 29: 1309-1318.

Juroch J. (2011): *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary původce chorob plísně bramboru a rajčete, MZE ČR, Praha, 2-8 s.

- Kaneko M., Itoh H., Inukai Y., Sakamoto T., Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., et al. (2003): Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants? *Plant Journal* 35:104–115.
- Kartusch R. (2003): On the mechanism of callose synthesis induction by metal ions in onion epidermal cells. *Protoplasma* 220: 219–225.
- Klapheck S., Zimmer I., Cosse H. (1990): Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiology* 31: 1005-1013.
- Klessig D. F., Durner J., Noad R., Navarre D. A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J. M., Shah J. (2000): Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 8849-8855.
- Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T. (1999) Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angewandte Chemie. International Edition*. 38: 3209-3212.
- Kranner I. , Birtić S. (2005): A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology* 45: 734 - 740.
- Kubát, K. (2003): Botanika. Scientia, Praha, 232 s.
- Kubienová L. [online] (2012) [cit. 22. 4. 2016]: Dostupné z: http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/emorr/17_RNS_GSNO_GSNOR.pdf
- Kubínová L. (2006): Pohledy do trojrozměrného mikrosvěta: konfokální a dvoufotonová mikroskopie. *Živa* 6: 245-248.
- Kúdela et al. (1989): Obecná fytopatologie, Academia Praha, s. 388.
- Kupková Z., Beneš L. (2004): Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chemické listy* 98: 116-122.
- Lebrun-Garcia A., Ouaked F., Chiltz A., Pugin A. (1998): Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *The Plant Journal* 15: 773-781.
- Li N., Zhang D.S., Liu H.S., Yin C.S., Li X.X., Liang W.Q., et al. (2006): The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell* 18: 2999–3014.
- Lochman J., Kašparovský T., Damborský J., Osman H., Marais A., Chaloupková R., Ponchet M., Blein J. P., Mikeš V. (2005): Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *American Chemical Society* 44: 6565-6572.
- Lu P., Maofeng C., Jiange Y., Gang N, Guoliang W., Hong M. (2014): The Arabidopsis CALLOSE DEFECTIVE MICROSPORE1 gene is required for male fertility through regulating callose metabolism during microsporogenesis. *Plant Physiology* 164:1893–1904.
- Luna E., Pastor V., Robert J., Flors V., Mauch-Mani B., Ton J. (2011): Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 183–193.
- McQuade L. E. and Lippard S. J.(2010): Fluorescence-based nitric oxide sensing by Cu(II) complexes that can be, trapped in living cells. *Inorganic Chemistry* 49: 7464–7471.
- Mieslerová B., Lebeda A., Kennedy R. (2004): Variation in *Oidium neolycopersici* development on host and non-host plant species and their tissue defence responses. *Annals of Applied Biology* 144: 237-248.
- Miller G., Shulaev V., Mittler R. (2008): Reactive oxygen signalling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 133: 481-489.
- Misra A. N., Misra M., Singh R. (2010): Nitric oxide biochemistry, mode of action and signaling in plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 25: 2729-2739.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004): Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 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 Physiology and Biochemistry* 42: 753-761.

- Novák J., Skalický M. (2008): Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika. Powerprint, Praha, 344 s.
- Omidvar V., Mohorianu I., Dalmay T., Zheng Y., Fei Z., Pucci A., Mazzucato A., Večeřová V., Sedlářová M., Fellner M. (2016): Transcriptional regulation of male-sterility in *7B-1* male-sterile tomato mutant. *The Plant Genome* (submitted)
- Olympus [online] 2012 [cit. 4. 4. 2016]: Applications in confocal microscopy. Dostupné z www: <olympusfluoview.com/applications/flimintro.html>
- Ouyang J., Hong H., Shen C., Zhao Y., Ouyang C., Dong L., Zhu J., Guo Z., Zeng K., Chen J., Zhang C., Zhang J. (2008): A novel fluorescent probe for the detection of nitric oxide in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine* 10:1426-1436.
- Parish R.W., Li S.F. (2010): Death of a tapetum: A programme of developmental altruism. *Plant Science* 178: 73–89.
- Pavlová L. (2006): Fyziologie rostlin. Karolinum, Praha, s. 253.
- Pazourek J., Votrubová O. (1997): Atlas of Plant Anatomy. Peres Publishers, Prague, 447 p.
- Peng K.V., Wang C.W., Wu C.H., Huang C. T., Liou R. F. (2015): Tomato SOBIR1/EVR Homologs Are Involved in Elicitor Perception and Plant Defense Against the Oomycete Pathogen *Phytophthora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 28: 913-926.
- Peralta I.E., Spooner D. M., Knapp S. (2008): Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sections *Lycopersicoides*, *Juglandifolia*, *Lycopersicon*; *Solanaceae*) *Systematic Botany Monographs* 84: 1-186.
- Petřivalský M. *et al.* (2010): Experimentální metody studia obranné reakce rostlin. Olomouc, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie.
- Plackett A.R.G., Powers S.J., Fernandez-Garcia N., Urbanova T., Takebayashi Y., Seo M., et al. (2012): Analysis of the developmental roles of the Arabidopsis gibberellin 20-oxidases demonstrates that GA20ox1, -2, and -3 are the dominant paralogs. *Plant Cell* 24:941–960.
- Planchet E., Kaiser W. M. (2006): Nitric oxide production in plants. *Plant Signalling and Behavior* 1: 46-51.
- 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. (2010): Studium reaktivních forem dusíku a kyslíku u rostlin vystavených působení stresových faktorů. Disertační práce, 93 s. Depon. In: Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Procházka S. (1998): Fyziologie rostlin. Academia, Praha, s. 484.
- Piterková J., Luhová L., Hofman J., Turečková V., Novák O., Petřivalský M., Fellner M. (2012): Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany* 110: 767-776.
- Řepková J. [online] (2015) [cit. 28. 4. 2016]: Samčí sterilita. Dostupné z : https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/Bi7240/um/Samci_sterilita_Text.pdf
- Sanders P.M., Bui A.Q., Weterings K., McIntire K.N., Hsu Y.C., Lee P.Y., Truong M.T., Beals T.P., Goldberg R.B. (1999): Anther developmental defects in Arabidopsis thaliana male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction* 11: 297–322.
- Sawhney V.K. (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 V.K., Bhadula S.K. (1988): Microsporogenesis in the normal and malesterile stamenless-2 mutant of tomato. *Canadian Journal of Botany* 66:2013–2021.

- Sawhney V.K. (2004): Photoperiod-sensitive male-sterile mutant in tomato and its potential use in hybrid seed production. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79:138–141.
- Seki M., Iida K., Saito M., Nakayama H., Yoshida S. (2004): Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: Involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. *Journal of Bacteriology* 186: 2046-2051.
- Scott R.J., Spielman M., Dickinson H.G. (2004): Stamen structure and function. *Plant Cell* 16: 46-60.
- Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima K. H. and Nagano T. (2002): Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 3170–3175.
- Shalata A, Mittova V., Volokita M, Guy M, Tal M. (2011): Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum* 112: 487 s.
- Shu K., Wu Y., Yang W., Xie Q. (2014): Concurrent Deficiency of Gibberellins and Abscisic Acid Causes Plant Male Sterility. *Journal of Genetics and Genomics* 41: 601-604.
- Singh S., Sawhney V.K.(1992): Cytokinins in a normal and the *ogura* (*ogu*) cytoplasmic male-sterile line of rapeseed (*Brassica napus*). *Plant Science* 86:147–154.
- Singh S., Sawhney V.K., Pearce D.W.. (1992): Temperature effects on endogenous indole-3-acetic acid levels in leaves and stamens of the normal and male sterile ‘stamenless 2’ mutant of tomato. *Plant Cell Environment* 15:373–377.
- Singh S., Sawhney V. K. (1998): Abscisic acid in a male sterile tomato mutant and its regulation by low temperature. *Journal of Experimental Botany* 49: 199–203.
- Smith M.B., Horner H.T., Palmer R.G. (2001): Temperature and photoperiod effects on sterility in a cytoplasmic male-sterile soybean. *Crop Science* 41:702–704.
- Smykal P. (2008): Čas květů – tajemný florigen nalezen. *Vesmír, Praha*. 87: 231–235.
- Spoel S.H., Dong X. (2008): Making Sense of Hormone Crosstalk during Plant Immune Responses. *Cell Host and Microbe* 3: 348-351.
- Spooner D.M., Anderson G.J., Jansen R.K. (1993): Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (Solanaceae). *American Journal of Botany* 80:676–688.
- Szabo C., Ischiropoulos H., Radi R. (2007): Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 6: 662.
- Thomas D. D., Liu X., Kantrow S. P., Lancaster J. R. (2001): The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 355-360.
- Ueki S. et Citovsky V. (2002): The systemic movement of a tobamovirus is inhibited by a cadmium-ion-induced glycine-rich protein. *Nature Cell Biology* 4: 478–485.
- Van Breusegem F., Bailey-Serres J., Mittler R. (2008): Unravelling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. *Plant Physiology* 147: 978-984.
- Večeřová V. (2013): Reaktivní formy kyslíku a dusíku při stresu rostlin. Bakalářská práce. Depon. In: Katedra botaniky. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Vinter V. (2008): Rostliny pod mikroskopem – Základy anatomie cévnatých rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 191 s.
- Vinter V., Macháčková P. (2013): Přehled morfologie cévnatých rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci, 199 s.
- Walden R. (1998): The alfabet soup of plant intracellular signalling: enter cyclic nucleotides. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 419.
- Wendehenne D., Pugin A., Klessig D. F., Durner J. (2001): Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 177-183.

Xie H. T., Wan Z. Y., Li S., Zhang Y. (2014): Spatiotemporal Production of Reactive Oxygen Species by NADPH Oxidase Is Critical for Tapetal Programmed Cell Death and Pollen Development in Arabidopsis. *The Plant Cell* 26: 2007-2023.

Xing Y., Jia W., Zhang J. (2008): AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in Arabidopsis. *Plant Journal*: 54: 440–451.

Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S. (1999): An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science* 4: 128-129.

Yu M., Lamattina L., Spoel S. H., Loake G. J. (2014): Nitric oxide fiction in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist* 4: 1142-1156.

Zemojtel T., Frohlich A., Palmieri M. C. (2006): Plant nitric oxide synthase: A never-ending story? *Trends in Plant Science* 11: 524-525.

Zhou M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R. (1997): A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Application in detecting the activity phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry* 253: 162-168.

Zhu Y., Xiaoling D., Zhengfu Z., Shengqian X., Bin Y., Wen J., et al. (2010): Separation defect of tapetum cells and microspore mother cells results in male sterility in *Brassica napus*: the role of abscisic acid in early anther development. *Plant Molecular Biology* 72:111–123.

Zdroje obrázků:

Obr. 1-2.

Večeřová V., 2015

Obr. 3.

Sedlářová M., 2015

Obr. 4.

Večeřová V., 2015

Obr. 5.

Večeřová V., Omidvar V., 2015

Obr. 6.

Courtesy G.L. Schumann, D'Arcy C.J. (2000): Late blight of potato and tomato. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0724-01.

Obr. 7.

Ceron-Garcia A., Vargas-Arispuro I., Aispuro-Hernandez E., et al. (2012): Oligoglucan elicitor effects during plant oxidative stress. In *Cell metabolism - Cell homeostasis and stress response*. Paula Bubulya (Ed.), InTech. ISBN: 978-953-307-978-3

Obr. 8.

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.

Obr. 9.

Yu M., Lamattina L., Spoel S. H., Loake G. J. (2014): Nitric oxide fiction in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist* 4: 1142-1156.

Obr. 10.

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

Obr. 11.

Yu M., Lamattina L., Spoel S. H., Loake G. J. (2014): Nitric oxide fiction in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist* 4: 1142-1156.

Obr. 12.

Jabs T. (1999): Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology* 57: 231-245.

Obr. 13.

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.

Obr. 14.

Catalá, M., Gasulla, F., E Pradas del Real, A., García-Breijs, F., Reig-Arminana, J., Barreno, E. (2010): Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. *BMC Microbiology*, 10: 297-300.

Obr. 15.

Gollmer A., Arnbjerg J., Blaikie F. H., Pedersen B. W., Breitenbach T., Daasbjerg K., Glasius M., Ogilby P. R. (2011): Singlet Oxygen Sensor Green: Photochemical behavior in solution and in a mammalian cell. *Photochemistry and Photobiology* 87: 671-679.

Obr. 16-18.

Petřivalský M. *et al.* (2010): Experimentální metody studia obranné reakce rostlin. Olomouc, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie.

Obr. 19. – 28.

Večeřová V., 2015-2016

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

7B-1	mutantní forma <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Rutgers
ABA	kyselina abscisová
APF	3'-(<i>p</i> -aminofenyl)fluorescein
APOX	askorbát peroxidáza
cADPR	cyklická adenosindifosfát ribóza
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CAT	kataláza
DAF-2	4,5-diaminofluorescein
DAF-2 DA	4,5-diaminofluorescein diacetát
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetát
FDA	fluorescein diacetát
GA	gibereliny
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-glutathion reduktáza
H2DCF	2',7'-dichlorodihydrofluorescein
H2DCF DA	2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetát
MAPK	mitogenem aktivované protein kinázy
NiNOR	nitrit:NO reduktáza
NOS	NO syntáza
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RNS	reaktivní formy dusíku
SOD	superoxid dismutáza
SOSG	Singlet oxygen sensor green®
WT	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Rutgers, wilde-type