

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**LOKALIZACE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU A DUSÍKU
BĚHEM PATOGENEZE PADLÍ**

Bakalářská práce

Klára Křížková

Studijní program: Fyzika
Studijní obor: Fyzika – Biologie
Forma studia: prezenční

Olomouc 2012

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Děkuji své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. z Katedry botaniky PřF UP za trpělivost, odborné vedení a všestrannou pomoc při práci na teoretické i experimentální části předložené bakalářské práce. Za pomoc při experimentech a možnosti konzultace výsledků děkuji prof. RNDr. Petru Ilíkovi, Ph.D. a RNDr. Pavlu Krchňákovi, Ph.D. († 2012) z Katedry biofyziky PřF UP a Mgr. Janě Piterkové, Ph.D. z Katedry biochemie PřF UP. Děkuji své rodině za podporu během celého mého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Klára Křížková

Název práce: Lokalizace reaktivních forem kyslíku a dusíku během patogeneze padlí

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2012

Abstrakt: Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) jsou významné signální molekuly účastníci se řady biologických a fyziologických procesů. U rostlin vedou k obranným reakcím během působení stresových faktorů, mohou omezit šíření infekce posílením buněčných stěn, a nebo patogena přímo usmrtit. Podílí se na hypersenzitivní reakci charakterizované rychlou a lokalizovanou buněčnou smrtí, která je typická pro inkompatibilní interakci rostlina-patogen. V této bakalářské práci byly RONS lokalizovány histochemickým barvením v listech *Lactuca serriola* během infekce padlí *Golovinomyces cichoracearum* a výsledky pozorovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Singletní kyslík byl detekován 24 h po inokulaci v samotných sporách a v klíčních vláknech padlí. Stejně tomu bylo i v případě detekce peroxidu vodíku. Avšak oxid dusnatý u spor nebyl lokalizován 24 h ani 48 h po inokulaci, což je v rozporu s dříve publikovanými výsledky, proto se domnívám, že došlo k možnému metodickému pochybení. Bioluminiscence u listu *Nicotiana tabacum* cv. Samsung po aplikaci elicitorů byla měřena ultraslabou biofotonovou emisí pomocí CCD kamery. Bylo zjištěno, že patogeneze vede k signální odezvě po 5 h od infiltrace listu modelové rostliny a koresponduje s rozšířením nekrotických skvrn v infiltrovaných segmentech.

Klíčová slova: biofotony, konfokální laserová skenovací mikroskopie, histochemická lokalizace, peroxid vodíku, oxid dusnatý, stres

Počet stran: 44

Počet příloh: 1 (CD)

Jazyk: Čeština

Bibliographic identification:

Autor's first name and surname: Klára Křížková

Title: Localization of reactive oxygen and nitrogen species during pathogenesis of powdery mildew

Type of thesis: Bachelor

Workplace: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: assoc. prof. Michaela Sedlářová, Ph.D.

The year of the presentation: 2012

Abstract: Reactive oxygen and nitrogen species (RONS) are important signal molecules involved in many biological and physiological processes. In stressed plants they lead to defense reactions, they can limit spreading of the infection by strengthening the cell walls or kill the pathogen directly. They participate in hypersensitive reaction characterized by rapid and localized cell death, which is typical for incompatible plant-pathogen interaction. In this bachelor work RONS were localized by histochemical staining in leaves of *Lactuca serriola* during the infection of mildew *Golovinomyces cichoracearum* and studied by confocal laser scanning microscopy. Singlet oxygen and hydrogen peroxide were detected 24 h post inoculation in spores as well as germ tubes. However, nitric oxide was not found neither 24 h nor 48 h post inoculation, which is in contradiction with previously published results. Therefore a methodological mistake is possible. Bioluminescence in leaf *Nicotiana tabacum* cv. Samsung after application of elicitors was measured by ultraweak photon emission using highly sensitive CCD camera. It was found that the pathogenesis leads to signal response after 5 hours of model plant leaf infiltration with elicitors and it corresponds to extension of necrotic spots in the infiltrated segments.

Keywords: biophotons, confocal laser scanning microscopy, histochemical localization, hydrogen peroxide, nitric oxide, stress

Number of pages: 44

Number of appendices: 1 (CD)

Language: Czech

OBSAH

1. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	7
2. ÚVOD	8
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
3.1. Charakteristika a význam RONS u rostlin	9
3.1.1. Reaktivní formy kyslíku	9
3.1.2. Reaktivní formy dusíku	12
3.2. Principy mikroskopie a fluorescence	16
3.2.1. Světelná, fluorescenční a konfokální mikroskopie	16
3.2.1.1. Světelná mikroskopie	16
3.2.1.2. Fluorescenční mikroskopie	18
3.2.1.3. Konfokální mikroskopie	18
3.2.2. Charakteristika fluorochromů	21
3.2.2.1. Fluorochromy pro detekci reaktivních forem kyslíku	21
3.2.2.2. Fluorochromy pro detekci reaktivních forem dusíku	22
3.3. Bioluminiscence a další neinvazivní metody detekce RONS	25
4. MATERIÁL A METODY	28
4.1. Pěstování modelových rostlin lociky kompasové a inokulace padlí čekankového	28
4.2. Pěstování modelových rostlin rajčete a tabáku, aplikace elicitorů	28
4.3. Lokalizace RONS v listech hostitelských rostlin konfokální laserovou skenovací mikroskopii	29
4.4. Měření bioluminiscence rostlinného materiálu	30
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	31
5.1. Lokalizace RONS u <i>Lactuca serriola</i> během infekce <i>Golovinomyces</i> <i>Cichoracearum</i>	31
5.1.1. Detekce singletního kyslíku	31
5.1.2. Detekce peroxidu vodíku a dalších ROS	32
5.1.3. Detekce oxidu dusnatého	32
5.2. Bioluminiscence pletiv rostlin po aplikaci stresorů	35
6. ZÁVĚR	39
7. LITERATURA	40
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	44

1. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem mojí bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši o charakteristice a metabolismu reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) u rostlin s důrazem na jejich úlohu v obraně vůči patogenům. V experimentální části pak použitím konfokální laserové skenovací mikroskopie lokalizovat RONS v infekčních strukturách padlí *Golovinomyces cichoracearum* a listech hostitelských rostlin během infekce. Dále ověřit přítomnost RONS pomocí ultraslabé biofotonové emise u modelových rostlin.

2. ÚVOD

Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) jsou důležité signální molekuly, které jsou přítomny v řadě fyziologických procesů u rostlin a mají významnou roli při obranných reakcích na působení stresových faktorů. V této práci byly RONS lokalizovány v listech hostitelských rostlin během infekce padlí a pozorovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Bioluminiscence rostlinného materiálu po aplikaci stresorů byla měřena ultraslabou biofotonovou emisí pomocí CCD kamery chlazené dusíkem.

Reaktivní formy kyslíku (ROS) mají kladnou úlohu jako signální molekuly při obranných mechanismech a napadení rostliny patogenem, mají důležitou roli v procesu programované buněčné smrti a podílejí se na zesílení buněčné stěny u rostlinných buněk. ROS také můžou vznikat jako nebezpečné produkty a rostliny musí mít účinné mechanismy pro jejich deaktivaci. Pro přežití všech aerobních organismů je nezbytný molekulární kyslík, který se vyskytuje v naší atmosféře. Tento kyslík je však málo reaktivní a proto je v rostlinách, při běžném metabolismu v mitochondriích a peroxisomech, přeměněn na více aktivnější formy – superoxidový anion, singletní kyslík, peroxid vodíku či hydroxylový radikál. Některé z těchto aktivnějších forem molekul, a to zejména hydroxylový radikál, způsobují zánik nukleových kyselin, proteinů nebo lipidů (Piterková a kol., 2005).

Reaktivní formy dusíku (RNS), zejména oxid dusnatý, jsou zapojeny do řady fyziologických procesů u rostlin za běžných růstových situací (klíčení, listová senescence, růst kořenů) a za stresových podmínek (napadení patogenem). NO hraje významnou roli u hypersenzitivních reakcí (HR), které jsou charakteristické rychlou lokalizovanou buněčnou smrtí. U živočichů se účastní procesů vazodilatace, hrají roli v zánětech, trombóze, imunitní odpovědi a přenosu na synapsi. Pro detekci NO existuje řada různých analytických metod pro detekci – spektrometrie, laserová spektroskopie, elektronová paramagnetická rezonance a histochemická lokalizace pomocí diaminofluoresceinů. Přesto je měření produkce NO obtížné, protože jeho vysoká reaktivita vede ke vzniku mnoha druhů reaktivního dusíku (Vandelle a Delledonne, 2008).

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Charakteristika a význam RONS u rostlin

3.1.1. Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) vznikají jako vedlejší produkty buněčného metabolismu, především dýchání v mitochondriích a fotosyntézy v chloroplastech (Dat a kol., 2000). Dále byly ROS lokalizovány v buněčné stěně, plazmatické membráně, peroxisomech a endoplazmatickém retikulu. Molekulární kyslík, který se běžně vyskytuje v naší atmosféře, je poměrně málo reaktivní, avšak některými procesy probíhajícími v rostlinách může být přeměněn na mnohem aktivnější formy (singletní kyslík, superoxidový anion, O_2^-) nebo silně oxidační sloučeniny (hydroxylový radikál OH, peroxid vodíku H_2O_2) (Procházka, 1998). Přehled aktivních forem kyslíku (ROS) je uveden v tabulce 1. K výraznému zvýšení koncentrace aktivních forem kyslíku v buňce dojde tehdy, působí-li na rostlinu stresové faktory, které naruší její buněčnou homeostázi. ROS vznikající ve stresovaných rostlinách mají dvě funkce. Jednak mohou sloužit jako signální molekuly pro expresi genů, jednak jako toxické meziprodukty aerobního metabolismu způsobují poškození či zánik buňky (Piterková a kol., 2005).

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Ty mohou zpomalovat jejich životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést i k jejich uhynutí. Nepříznivé vlivy, které závažně ohrožují rostlinu, označujeme jako stresové faktory (stresory) (Procházka, 1998). Stresové faktory dělíme na abiotické a biotické. Mezi faktory abiotické povahy řadíme působení herbicidů, nadměrné záření a působení extrémních teplot (horko, chlad, mráz). Útok patogenního mikroorganismu (viry, mikrobi, houby), vzájemné ovlivňování, herbivorní živočichové a stárnutí naopak řadíme mezi faktory biotické (Piterková a kol., 2005). Oba typy stresových faktorů jsou spojeny s regulací a signalizací aktivních forem kyslíku a mohou u rostlin vyvolávat oxidativní stres. ROS hrají důležitou roli během patogeneze. Podílí se na hypersenzitivní reakci, která je typická pro inkompatibilní interakci rostlina-patogen. Posílením stěn rostlinných buněk mohou omezit šíření infekce, nebo přímo patogena usmrtit (Dat a kol., 2000). ROS nejsou jen toxické vedlejší produkty metabolismu, ale také slouží jako signální molekuly, které kontrolují obranné procesy rostlinného organismu a mají důležitou úlohu v procesu programované buněčné smrti (Piterková a kol., 2005).

Tabulka 1: Přehled klíčových ROS, mechanismů účinku a jejich buněčných zdrojů. (převzato z: Karuppanandian a kol., 2011; Piterková a kol., 2005).

ROS	Označení	Struktura	Mechanismus účinku	Buněčný zdroj
Superoxidový anion-radikál	$O_2^{\cdot-}$	$[\ddot{O}=\ddot{O}]^-$	Reaguje s dvojnou vazbou obsahující sloučeniny, např. Fe-S shluky proteinů, reaguje s oxidem dusnatým (NO) a vytváří peroxydusitan (ONOO ⁻).	Tvoří se v mnoha fotooxidačních reakcích (flavoprotein), reakce v chloroplastech, v elektronových transportních řetězcích v mitochondriích, peroxisomy a plazmatické membrány. NADPH oxidázy v membránách. Xantinoxidáza a membránové polypeptidy v peroxisomech.
Hydroxylový radikál	OH [•]	$\ddot{O}-H$	Velmi silně reaguje s proteiny, lipidy, DNA a s dalšími makromolekulami.	Reakce H ₂ O ₂ s O ₂ ^{•-} (Haberova-Weissova reakce), reakce H ₂ O ₂ s Fe ²⁺ (Fentonova reakce).
Peroxid vodíku	H ₂ O ₂	H- \ddot{O} - \ddot{O} -H	Oxiduje proteiny; reaguje s O ₂ ^{•-} v Fe katalyzované reakci za vzniku OH [•] .	ETC mitochondrií, chloroplastů, endoplazmatického retikula a plazmatické membrány. Fotorespirace, β-oxidace mastných kyselin a enzymové reakce (SOD) v peroxisomech.
Singletní kyslík	¹ O ₂	O-O:	Přímo oxiduje proteiny, nenasycené mastné kyseliny a DNA.	Fotoinhibice, PSII - reakce elektronového přenosu v chloroplastech.

ROS hrají v rostlinných organismech důležitou roli jako signální molekuly, avšak při nekontrolované a nadměrné tvorbě mohou rostlinné buňky poškozovat. Proto se u rostlin vytvořily účinné obranné mechanismy, které odstraňují ROS a rovněž ochraňují buňky před oxidačním poškozením (Hancock a kol., 2001). K dosažení ochrany buněk přispívají a jsou v buňkách přítomné antioxidanty, zahrnující neenzymové mechanismy přímé deaktivace, a antioxidantní enzymy, tvořící nejuniverzálnější ochranu. Mezi nejúčinnější antioxidanty patří askorbát (vitamin C), β-karoten, redukovaný glutathion nebo α-tokoferol (vitamin E). Udržení rovnováhy mezi redukovanými a oxidovanými formami askorbátu a glutathionu je velmi důležité zejména pro katabolismus ROS. Rovnováha je zachována s využitím redukčních vlastností NADPH enzymy glutathionreduktasa, monodehydroaskorbátoreduktasa a dehydroaskorbátoreduktasa (Piterková a kol., 2005).

K enzymům, které se podílejí na katabolismu ROS, řadíme superoxiddismutasu, peroxidasu, katalasu a glutathionperoxidasu, která slouží jako univerzální ochrana rostlin.

Superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), nejvýznamnější antioxidační enzym, patří do skupiny oxidoreduktas. V rostlinách se vyskytují dokonce tři typy SOD (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD a Fe-SOD) (Procházka, 1998), zejména v aerobních a fakultativně aerobních organismech, dále pak ve všech buněčných strukturách, které jsou citlivé na oxidativní stres (Piterková a kol., 2005). SOD katalyzuje přeměnu superoxidu a vodíku na méně reaktivní peroxid vodíku, který je dále odstraněn katalasami a peroxidasami (Březinová Belcredi a kol., 2007). Katalasa (CAT, EC 1.11.1.6) je přítomna v peroxisomech u všech aerobních eukaryot. Pokud CAT katalyzuje přímý rozpad peroxidu vodíku, jedná se o katalasovou aktivitu. Pokud katalyzuje oxidaci substrátů (methanol, ethanol, formaldehyd, formát a nitrit) peroxidem vodíku, jde o aktivitu peroxidasovou. Podle výskytu dělíme CAT na tři isoformy – CAT1, CAT2 a CAT3. V listech je lokalizována CAT1, která se podílí na odstraňování peroxidu vodíku během fotorespirace. CAT2 nalezneme především v cévních svazcích. CAT3 je přítomna v semenech a mladých semenáčcích a napomáhá odstraňování peroxidu vodíku z glyoxysomů. Dále mezi antioxidačními enzymy patří enzymy askorbát-glutathionového cyklu a glutathionperoxidasy. Enzymy askorbát-glutathionového cyklu odstraňují peroxid vodíku z buněčných oddělení, zejména tam, kde se nevyskytuje CAT. Tento cyklus probíhá v peroxisomech, chloroplastech, cytosolu a mitochondriích, a používá askorbát a glutathion. Příkladem enzymů askorbát-glutathionového cyklu jsou askorbátperoxidasa a glutathionreduktasa. Glutathionperoxidasa využívá glutathion jako redukční činidlo a katalyzuje redukci peroxidu vodíku, peroxidů lipidů a organických peroxidů. Glutathionperoxidasa nachází uplatnění při zamezení peroxidace membránových lipidů (Piterková a kol., 2005).

ROS jsou u hub tvořeny v průběhu metabolické aktivity a jsou zodpovědné za aktivaci a tvorbu velkého množství reaktivních látek. Produkce reaktivních forem kyslíku se v houbách zvyšuje v důsledku různých stresových faktorů (hladovění, mechanické poškození, světelné podmínky nebo interakce s některými jinými živými organismy). Hladina ROS se zvyšuje při infekci u pevně interagujících organismů, zejména v interakci hostitel-parazit. Některé z elicitorů patogenních hub jsou spojeny a lokalizovány na buněčných membránách. Jejich kontakt vzniká poté, co patogenní houby proniknou do buněčných stěn hostitelských rostlin. Tento proces vyžaduje určitý čas. Ve stejnou dobu dojde k vylučování rozpuštěných elicitorů ze spor, což je důsledkem obranné reakce rostliny. Takto uvolněné elicitory, produkované aktivací ROS, mohou být projevem rostlinné rezistence (Gessler a kol., 2007).

Houby představují rozsáhlou skupinu organismů, které mohou žít jako saprofyty, parazité a symbionti. Podobně jako u rostlin, ROS se podílí na všech životně důležitých

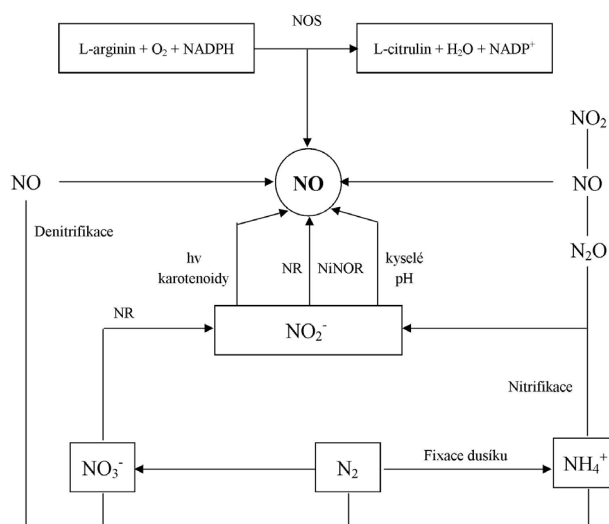
procesech u hub: růst, rozmnožování, mezibuněčná komunikace a ochrana před mezidruhovou konkurencí. V mnoha ohledech jsou tedy ROS ideální signální molekuly. Jejich velkou výhodou jsou malé rozměry a také schopnost se šířit na velmi krátké vzdálenosti (Hancock a kol., 2001). Fytopatogenní houby disponují zvláštními prostředky, které produkují ROS a z velké části určují jejich vzájemné vztahy s hostitelem. Různé zdroje ROS v houbách a jejich detoxikační systémy umožňují houbám si udržet úroveň ROS požadovanou pro signalizaci. Regulace tvorby ROS v buňkách a aktivita v obranných antioxidantních systémech se určuje podle redoxního stavu buňky a závisí na intracelulárních a extracelulárních faktorech. Interakce ROS s cílovými proteiny a vratnost této souhry jsou základem příjmu a přenosu signálu reaktivních forem kyslíku. Buněčná efektivita a zaktivování ROS umožňují houbovým organismům adaptovat se na životní prostředí a přežít i v extrémních podmínkách (Gessler a kol., 2007).

3.1.2. Reaktivní formy dusíku

Oxid dusnatý (NO) je bioaktivní molekula, která se podílí na mnoha biologických procesech v živých organismech. U zvířat se účastní zánětů, trombózy, imunity, vazodilatace nebo neurotransmise. V rostlinách je NO zapojen do různých fyziologických procesů za běžných růstových podmínek (klíčení, listová senescence, růst kořenů, kvetení, pohybu průduchů) a za stresových situací (napadení patogenem) (Wendehenne a kol., 2004). NO hraje důležitou roli u rostlin odolných proti chorobám, zejména při hypersenzitivních reakcích (HR), které jsou charakterizovány rychlou a lokalizovanou buněčnou smrtí (Delledonne a kol., 2001). V živočišných buňkách je hlavním zdrojem NO syntáza oxidu dusnatého (NOS). U rostlinných buněk bylo popsáno několik enzymů, které produkují enzym podobný NOS (NOS-like enzyme), reduktázy dusičnanů a dusitanů. Při napadení rostliny patogenem existují mezi NO a ROS interakce. V tomto případě dojde k rychlému nahromadění NO i ROS a dochází ke specifické interakci – hypersenzitivní reakci. Spolupráce NO a H₂O₂ je pokládána za iniciátora lokalizované buněčné smrti, čímž je omezena invaze patogenů. Dále je NO produkován mikroorganismy, zejména při růstu mycelií. To usnadňuje aktivní pronikání oomycet a hub do hostitelských buněk. Specifická úloha NO se může lišit v různých patosystémech, je ovlivněna metabolismem hostitelské rostliny, záleží na životní strategii patogenu a podmínkách životního prostředí (Piterková a kol., 2011).

NOS (EC 1.14.13.39) je jedním z nejsložitějších známých enzymů a jeho činnost je závislá na 4 kofaktorech: NADPH, FAD, FMN a tetrahydrobiopterin (Durner a kol., 1999). NOS oxiduje L-arginin na L-citrulin a NO. NOS můžeme nalézt ve třech formách – nNOS

(neuronální forma), eNOS (endoteliální forma) a iNOS (indukovaná forma). Syntéza NO v rostlinách může probíhat enzymově a neenzymově (obr. 1). Celkem je popsáno šest enzymů (enzym podobný NOS, nitrátreduktasa, nitrit:NO reduktasa, xanthinoxidasa, křenová peroxidasa a cytochrom P450), které jsou schopny katalyzovat syntézu NO u rostlinných buněk (tabulka 2). Nitrátreduktasa (NR, EC 1.7.1.1.) je homodimerní protein, jehož aktivita je posttranslačně regulována reverzibilní fosforylací. Důležitou funkcí NR v rostlinných buňkách je katalýza NAD(P)H-dependentní dvouelektronové redukce dusičnanu na dusitan (Piterková a kol., 2008). Enzym podobný živočišným NOS byl popsán v peroxisomech hrachu. Dalším specifickým enzymem, který najdeme v rostlinných buňkách je nitrit:NO reduktasa (NiNOR). Tento enzym katalyzuje redukci dusitanu na NO a byl popsán v plasmatické membráně kořenových buněk tabáku. Díky tomuto poznatku se předpokládá, že NO plní důležitou funkci jako signální molekula během vývoje kořenového systému a rozvoje symbiotických interakcí s půdními bakteriemi na povrchu kořenů. Křenová peroxidasa a cytochrom P450 jsou schopny katalyzovat tvorbu NO *in vitro*. V peroxisomech listů hrachu byla objevena xanthinoxidasa (XOD). Peroxisomy jsou s největší pravděpodobností jedním z míst, kde probíhá aktivní tvorba NO v rostlinných buňkách (Piterková a kol., 2008).



Obr. 1: Zdroje NO v rostlinných buňkách; NO je produkován činností nitrátreduktasy (NR), nitrit:NO reduktasy (NiNOR) a NO synthasy (NOS). Dále může být NO generováno neenzymatickou reakcí NO_2^- : nízké hodnoty pH a v přítomnosti karotenoidů světlem poháněná redukce. NO může vznikat i jako vedlejší produkt respirace, nitrátové asimilace nebo denitrifikace (převzato z: Piterková a kol., 2008).

Tabulka 2: Zdroje NO v rostlinných buňkách (převzato a upraveno z: Piterková a kol., 2008).

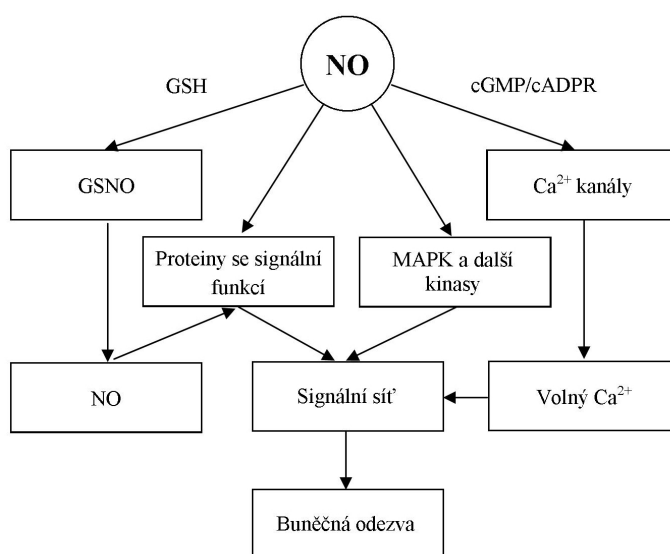
Enzymové zdroje	Substrát	Kofaktor(y)	Poznámka
Enzym podobný NOS	L-arginin	NADPH, FAD, FMN, tetrahydrobiopterin	Popsán v peroxisomech hrachu
Nitrátreduktasa	NO_3^- (NO_2^-)	NADH	
Nitrit: NO reduktasa	NO_2^-	NADH	Popsán v plasmatické membráně kořenových buněk tabáku
Xanthinoxidasa	Hydroxymočovina		Popsán v peroxisomech listů hrachu
Křenová peroxidasa	N-hydroxyarginin	NADH	
Cytochrom P450	NO_2^-	Cytochrom c	

Neenzymové dráhy mohou za určitých podmínek přispívat k syntéze NO. První mechanismus probíhá za nízkých hodnot pH v apoplastu, při kterých je podporována neenzymová redukce dusitanu, kdy dusitan dismutuje na dusičnan a NO. Při fyziologických hodnotách pH může být dusitan chemicky redukován kyselinou askorbovou na NO a kyselinu dehydroaskorbovou. Druhý neenzymový mechanismus probíhá v membránách chloroplastů, kde je světlem zprostředkovaná přeměna NO_2^- na NO, která je katalyzovaná karotenoidy (Piterková a kol., 2008).

Pro detekci NO se používají různé analytické metody. Avšak přesné měření produkce NO je zdoluhavé. NO je plynný radikál s velkou nestabilitou a velmi reaktivními vlastnostmi, které odráží přítomnost nesdíleného elektronu. Jeho rozsáhlé chemické vlastnosti zahrnují interakce mezi třemi druhy sloučenin, které se liší svými fyzikálními vlastnostmi a chemickou reaktivitou: kation dusíku (NO^+), radikál (NO) a nitroxylový anion (NO^-). NO rychle interaguje s O_2 za vzniku několika různých oxidů dusíku (NO_2 , N_2O_3 , NO_2^- a NO_3^-). Množství NO v rostlinách napadených patogenem je závislé na redukčním stavu buňky. U hypersenzitivních reakcí se primárně generuje superoxid (O_2^-) a hromadí se peroxid vodíku (H_2O_2). Tento děj se nazývá „oxidative burst“ a je spolu s NO nezbytný pro spuštění buněčné smrti hostitelské buňky. Během tohoto procesu dojde ke změně redukčního stavu buňky, která přispívá k reaktivitě NO. Nejprve bylo prováděno měření detekce NO na živočišných buňkách, až později na rostlinných. Při testech na detekci NO z buněk bylo prokázáno, že NO má vysokou schopnost šířit se přes membrány, zatímco jiné deriváty (například N_2O_3) využívají vysokého oxidačního metabolismu. Detekce NO je nejčastěji využívána pro zkoumání systému rostlina-patogen (Vandelle a Delledonne, 2008).

Díky mnoha výzkumům se podařilo identifikovat některé části přenosových kaskád zprostředkovaných NO (obr. 2). Signální dráhy NO v rostlinných buňkách zahrnují syntézu

sekundárních přenašečů, příkladem je cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a cyklická adenosindifosfát ribosa (cADPR) (Piterková a kol., 2008). Tyto přenašeče vedou ke změnám hladiny cytosolického vápníku v buňkách průduchů. NO se aktivuje prostřednictvím MAP kinas. U rostlin jsou MAP kinasy aktivovány extracelulárními signály (sucho, chlad, působení rostlinných hormonů, vliv patogena nebo osmotický stres), které mají za následek aktivování signálních drah vedoucích k expresi genů (Neill a kol., 2002). Dále mohou být signální dráhy NO zprostředkovány kovalentními modifikacemi proteinů jako nitrosylace cysteinů a nitrace tyrosinů (Piterková a kol., 2008).



Obr. 2: Schéma - znázornění signálních drah NO u rostlinných buněk; primární cíle NO zahrnují mitogenem aktivované proteinkiny (MAPK) a Ca^{2+} kanály, které jsou regulované prostřednictvím změny hladiny cGMP a cADPR. Pomocí nitrosylace triolových skupin utváří NO aktivitu proteinů. Jako přenašeč signálu NO může sloužit stabilní metabolit s-nitrosoglutathion (GSNO). GSNO se rovněž podílí na uvolnění NO a interakci NO ve vzdálených cílech (převzato z: Piterková a kol., 2008).

NO se podílí na mnoha procesech v organismech a jeho účinky jsou ovlivněny jeho koncentrací. Schopnost přesně detekovat NO je klíčová, zejména pro pochopení jeho role v buněčných procesech. Pro detekci NO existuje mnoho technik (např. chemiluminiscence nebo hmotnostní spektrometrie). NO má vysokou chemickou reaktivitu a vede ke vzniku mnoha typů reaktivního dusíku, jehož přesné stanovení je velmi obtížné. V ideálních případech by měly metody pro detekci NO vykazovat vysoký stupeň citlivosti a měly by umožnit měření hladiny intracelulární a extracelulární hladiny NO v kapalném nebo plynném skupenství (Vandelle a Delledonne, 2008).

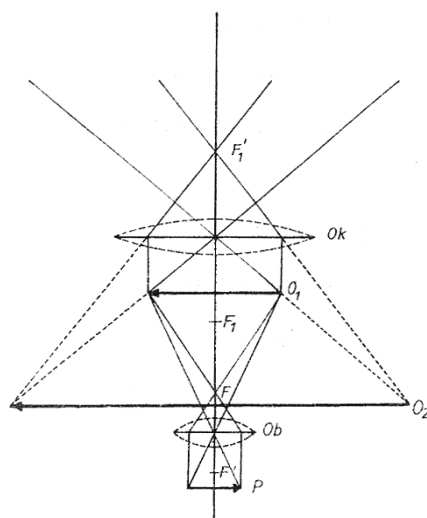
3.2. Principy mikroskopie a fluorescence

3.2.1. Světelná, fluorescenční a konfokální mikroskopie

3.2.1.1. Světelná mikroskopie

První, velmi jednoduchý mikroskop zkonstruovali v roce 1590 Jan a Zachariáš Janssenové z Nizozemí. Za zakladatele mikroskopie jako exaktní vědy je však považován Holanďan Antonius van Leeuwenhoek, který brousil vysoce kvalitní čočky a mikroskopem své konstrukce studoval ve 2. polovině 17. století červené krvinky, bakterie a jiné objekty. Dalším, kdo významně přispěl k rozvoji mikroskopie, byl britský fyzik a astronom Robert Hooke, který jako první využil mikroskopu ke studiu struktury minerálů (Smékal, 1995). Dnes je světelná mikroskopie využívána při pozorování mikroorganismů, tkání živočichů, pletiv rostlin a hub, tj. ve všech biologických a medicínských oborech, kde je hlavním předmětem studia buňka. Řada mikroskopů našla uplatnění i v průmyslu při studiu homogenity použitých materiálů.

Mikroskop se skládá z optické a mechanické části. Optickou část tvoří okulár, objektiv a osvětlovací soustava (zdroj světla, clona a kondenzor), mechanickou částí je podstavec, stojan a stolek s křížovým posunem. Optická soustava mikroskopu je spojená soustava objektivu (Ob) a okuláru (Ok) (obr. 3). Objektiv, soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností, tvoří obraz O_1 předmětu P v horní ohniskové rovině objektivu. Obraz je skutečný, zvětšený a převrácený. Tubusem nastavíme při zaostřování objekt O_1 (nyní předmětem při zobrazení okulárem) do takové polohy, aby byla vzdálenost předmětu menší než ohnisková vzdálenost (vzdálenost čočky od ohniska). Spojná soustava okuláru vytvoří obraz O_2 zdánlivý, zvětšený, přímý. Celkový obraz předmětu P, vytvořený mikroskopem, je převrácený, zdánlivý a zvětšený. Okulár tedy zvětšuje obraz předmětu vytvořený objektivem a přispívá k zobrazení pouze těch podrobností, které jsou obsaženy v obraze vytvořeném objektivem (Smékal, 1995).



Obr. 3: Optická soustava mikroskopů: Ob, objektiv; Ok, okulár (Převzato z: Smékal, 1995).

Zobrazovací optické přístroje jsou založeny na zákonu lomu a odrazu světelných paprsků v prostředí o určitém indexu lomu. Vznik obrazu v optickém mikroskopu popisuje Huygensův princip (citace), který vysvětluje šíření světelného vlnění v izotropním prostředí. Ze zdroje světla se světelné vlnění šíří ve vlnoplochách směrem od zdroje; každý bod na čele šířící se vlny je zdrojem sekundárních vln. Při setkání dvou či více vln v daném bodu prostoru vzniká interference vlnění, která nese informaci o vzhledu osvětleného objektu a vstupuje do objektivu. Sekundární vlny, které rovnoběžně opustí rovinu předmětu, se setkávají v jednotlivých bodech zadní ohniskové roviny objektivu. Dochází k jejich interferenci a podle Huygensova principu se stávají zdrojem nových vln, které v obrazové rovině mikroskopu skládají zvětšený a převrácený obraz (Hampl, 2010).

Mezi důležité parametry mikroskopů patří zvětšení a rozlišovací mez. Celkové zvětšení mikroskopu má úhlový charakter a lze jej zjistit vynásobením údajů zvětšení okuláru a objektivu. Rozlišovací schopnost oka a vlnová délka světla jsou dva faktory vymezující další zvyšování zvětšení u světelných mikroskopů. Rozlišovací mez mikroskopu je podmíněna ohybem světla na objímce objektivu, která působí na procházející světlo jako omezující kruhový otvor. Rozlišovací mez určuje vzdálenost dvou bodů, které ještě mikroskop zobrazí jako dva samostatné body a je rovna polovině vlnové délky záření. U světelného mikroskopu se tato hodnota blíží přibližně 250 nm.

3.2.1.2. Fluorescenční mikroskopie

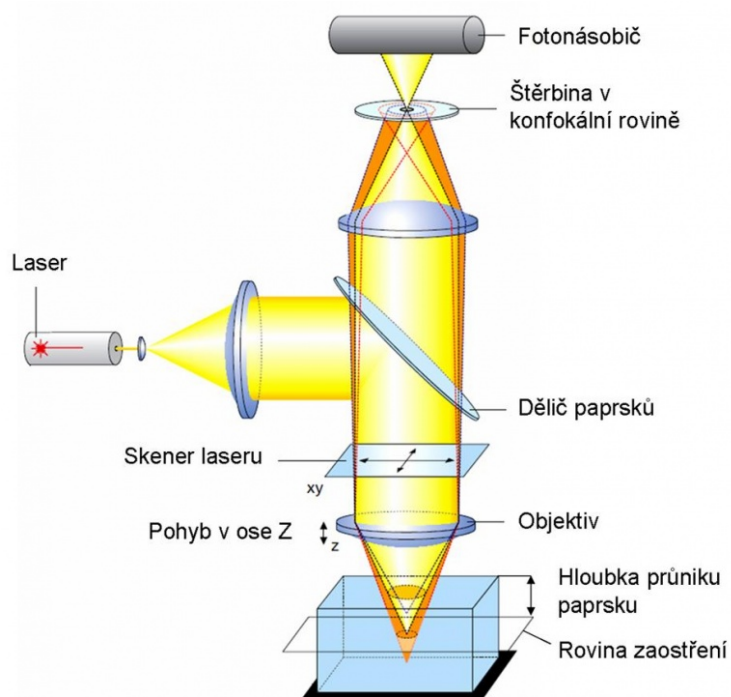
Fluorescenční mikroskopie využívá luminiscenčního jevu, kdy některé látky po dopadu světla o kratší vlnové délce (excitační záření) mají schopnost zářit světlem o vyšší vlnové délce (emisní záření). Fluorescence (fosforescence) je projevem intramolekulární energetické změny, která je vzbuzená zářením absorbovaným v látce. Druhým typem je chemiluminiscence, kdy je změna látky vyvolána chemickými reakcemi. U fluorescence je emise krátká, po zhasnutí excitačního záření ihned ustává. Naopak u fosforescence dochází k emisi i dlouhou dobu po tom, co excitační záření zhasne. Některé látky jsou schopny autofluorescence. Jedná se o emitování světla biologických struktur (mitochondrie, lysozomy nebo chlorofyl), které se potom chovají jako fluorofory. Při fluorescenční mikroskopii postupujeme tak, že některé struktury zbarvíme fluorochromem, látkou schopnou fluorescence (Hejtmánek, 2001).

3.2.1.3. Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie patří mezi novější metody optické mikroskopie, která výrazným způsobem rozšířila možnosti zobrazování biologických objektů. První myšlenka konfokálního mikroskopu pochází od amerického vědce Marvina Minského, který si ji nechal patentovat v r. 1957. V té době však zůstala bez odezvy, neboť Minsky nenašel vhodný dostatečně silný zdroj světla pro konstrukci funkčního přístroje (Plášek, 1995). V roce 1965 sestrojili Mojmir Petráň a Milan Hadravský z Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni konfokální mikroskop na bázi rotujícího Nipkowova kotouče. Tento nový typ konfokálního mikroskopu – mikroskop s dvojitým řádkováním (Tandem Scanning Confocal Microscope) si r. 1968 nechali patentovat (Kubínová, 2004). Pomocí tandemového skenovacího mikroskopu byly poprvé získány kvalitní optické řezy silným preparátem, konkrétně mozkovou tkání (Petráň a Hadravský, 1989). Tento přístroj však v praxi nedoznal většího uplatnění. První konfokální mikroskop s rozmiřtým laserovým paprskem byl zkonstruován až koncem sedmdesátých let 20. století, kdy začíná éra konfokální mikroskopie (Plášek, 1995).

Konfokální mikroskop poskytuje mimořádně ostrý, kontrastní obraz se znamenitým rozlišením. Struktury nacházející se nad a pod rovinou zaostření nemají znatelný vliv na kvalitu obrazu (Hejtmánek, 2001). V současné době je nejpoužívanějším přístrojem tohoto typu laserový rastrovací konfokální mikroskop (Laser Scanning Confocal Microscope), který byl uveden na trh v osmdesátých letech 20. století (Kubínová, 2004). Pozorovaný vzorek v konfokálním mikroskopu je osvětlován bodovým zdrojem světla. Tím je laserový paprsek (obr. 4), který projde přes první konfokální clonku na dělič paprsků (dichromatické zrcadlo).

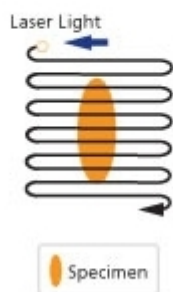
Dělič paprsků odrazí paprsky přes čočku objektivu na vzorek, do bodu, jehož průměr odpovídá rozlišovací schopnosti objektivu (tzv. difrakční mez). Vzorkem odražené světlo je sbíráno objektivem, kterým při zpětném průchodu prochází, a kde vzniká další obraz bodové clonky. Tento obraz je pomocí děliče paprsků lokalizován před fotonásobičem, kde se nachází druhá konfokální bodová clonka. Druhá clonka blokuje průchod světla, které pochází z oblasti vzorku mimo rovinu zaostření. Obraz zaostřené roviny je nakonec snímán skenovacím detektorem a následně předán do počítače. V počítači jsou uloženy informace o souřadnicích X-Y daného bodu, které počítač využívá k sestavení přesného obrazu zkoumaného vzorku (Plášek, 1995).



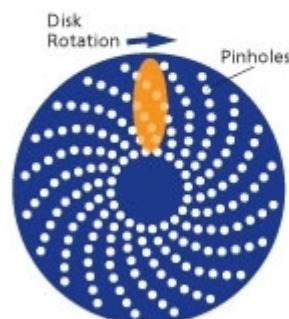
Obr. 4: Schéma laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu. (Převzato z: www.chempoint.cz)

Konfokální mikroskop je vhodný využívat pro fixované vzorky a pomalé děje. Na rozdíl od konfokálního mikroskopu s rotujícím Nipkowovým kotoučem, který je vhodnější pro velmi rychlé procesy (obr. 5). Mezi velké přednosti konfokální mikroskopie, ve srovnání s klasickou optickou mikroskopií, je schopnost vést tenké optické řezy i tlustším vzorkem a tyto digitalizované řezy vzorkem digitálně zaznamenávat. Skládáním jednotlivých řezů na sebe můžeme rekonstruovat trojrozměrné struktury objektů (Kubínová, 2004).

1. Konfokální laserový skenovací mikroskop (CLSM)



2. Konfokální mikroskop s rotujícím Nipkowovým kotoučem



Obr. 5: Srovnání principu snímání vzorků konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem a konfokálním mikroskopem s rotujícím diskem (Nipkowovým kotoučem, na němž je umístěn velký počet navzájem oddělených clonek). (Převzato z: www.biovis.com)

Dvoufotonový mikroskop je nový typ optického mikroskopu, který poprvé představili američtí vědci v čele s Watem W. Webbem z Cornellovy univerzity v Ithace v roce 1990. Dvoufotonový mikroskop umožňuje pozorovat živé buňky a tkáně, přistřevovat vzorky do hloubky několik set mikrometrů. V porovnání s klasickým jednofotonovým konfokálním mikroskopem dochází při dvoufotonové mikroskopii k výrazně menšímu zhášení fluorochromů, to umožňuje snímání kvalitních optických řezů tlustšími vzorky (Kubínová, 2004). Princip dvoufotonového mikroskopu spočívá ve využívání speciálního laseru k excitaci dvěma fotony (dvojnásobek λ_{\max} fluorochromu). Tyto dva fotony jsou absorbovány téměř současně, s šířkou pulzu řádově pouhých 100 femtosekund (Denk, 1990). Pravděpodobnost dvoufotonové excitace je úměrná druhé mocnině intenzity excitačního pole, tj. je nejvyšší v rovině zaostření. Výhodou dvoufotonové mikroskopie je větší hloubka proostření (až do hloubky 400 μm). Tato vlastnost je rovněž patrná i u vzorků, jejichž povrchové vrstvy silně fluoreskují. Další výhodou je zvýšený podíl signálu vůči šumu, tedy i kontrastnější zobrazení, zejména v hlubších vrstvách vzorku. Dvoufotonová mikroskopie umožňuje přesnější studium různých vzorků a struktur při použití vícenásobného barvení. Tím upřesňuje řadu informací v oblastech buněčné a molekulární biologie. Zajímavá a přínosná je rovněž možnost detekce jednotlivých molekul a použitelnost výrazně širší škály fluorescenčních barviv (Kubínová, 2004).

3.2.2. Charakteristika fluorochromů

Fluorochromy jsou využívány při zobrazování konfokální mikroskopii, zejména díky vysokému stupni citlivosti a schopnosti vázat se s biologickými makromolekulami (bílkoviny či nukleovými kyselinami). Fluorochromy mají charakteristická absorpční spektra (excitace) a emise. Tyto spektra zobrazují relativní intenzitu fluorescence. Hodnoty maximální vlnové délky excitace a emise odkazují na dané fluorochromy a jsou pro ně typické. Excitační energie je v rozsahu od ultrafialového spektra přes viditelné světlo a emisní energie pokračuje dále od viditelného světla do infračervené oblasti. Barvení živých vzorků by nemělo výrazněji měnit metabolismus organismu (Semwogerere a kol., 2012). Fluorescenční barviva lokalizují buněčné struktury (mitochondrie, cytoskelet, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum nebo jádro), dynamické procesy, pH a reaktivní formy kyslíku. Dále bylo fluorescenčních barviv využíváno pro genetické mapování a analýzu chromozomů (Claxton a kol., 2009). Zásadní převrat pro buněčnou biologii a optickou mikroskopii nastal objevem zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) z medúzy *Aequorea victoria* (Tsien a kol., 2006). Vedle nejznámějšího zeleného fluorescenčního proteinu existují v současnosti už i jiné formy – žlutá (YFP) a modrozelená (CFP), nebo nepřibuzná červená varianta proteinu (RFP) z mořského korálu *Discosoma*.

Prvním fluorochromem na testování životaschopnosti buněk byl fluorescein diacetát (FDA), který proniká do živých buněk přes plazmatickou membránu. V cytoplazmě je FDA dále hydrolyzován na zeleně fluoreskující fluorescein, který není schopen zpětně projít přes membránu buňky (Fontvieille a kol., 1992). Příkladem dalších tradičních fluorochromů je FITC (fluorescein isothiokyanát), jeden z derivátů fluoresceinu, který se váže na bílkoviny. Fluoreskuje zelenou barvou při excitačním/emisním maximu $\sim 494/520$ nm (Invitrogen, 2012).

3.2.2.1. Fluorochromy pro detekci reaktivních forem kyslíku

Jako indikátor reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňkách se většinou používá 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetát (H_2DCF DA), který je také známý jako dichlorofluorescein diacetát. Po odštěpení acetátových skupin esterázami v cytoplazmě je nefluorescenční H_2DCF DA oxidací volnými radikály přeměněn na vysoce fluorescenční 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Oxidovaný H_2DCF DA není přímo citlivý na singletní kyslík, který ale spolu s kyslíkem může nepřímo přispět k vytvoření DCF, a to prostřednictvím jeho reakcí s buněčnými substráty, které poskytují peroxidové produkty a peroxylové radikály. Ukázalo se, že H_2DCF DA oxiduje na DCF, pomocí peroxydusitanového

anionu (ONOO^-) a v nepřítomnosti peroxidu vodíku peroxidázou a Fe^{2+} . Rovněž DCF sám o sobě může působit jako fotosenzitizer oxidovaného $\text{H}_2\text{DCF DA}$, zejména pro přípravu a urychlování tvorby DCF. Protože oxidací DCF a $\text{H}_2\text{DCF DA}$ se vytváří volné radikály, musí jejich použití při měření produkce volných radikálů podléhat pečlivé kontrole (Invitrogen, 2012a).

Dalším indikátorem vysoce reaktivních forem kyslíku je 3'-p-(aminofenyl)fluorescein (APF) a 3'-p-(hydroxyfenyl)fluorescein (HPF). Tyto dva fluorochromy nabízí větší přesnost a stabilitu než $\text{H}_2\text{DCF DA}$, protože nepodléhají oxidaci vyvolané světlem. Oba tyto deriváty fluoresceinu nejsou fluorescenční, dokud nereagují s hydroxylovým radikálem nebo anionem peroxydusitanu. APF reaguje navíc s anionem chlornanu. Při společném použití tedy tyto dva fluorochromy selektivně detekují anion chlornanu. Po oxidaci vykazují APF i HPF jasně zelenou fluorescence (excitační/emisní maximum $\sim 490/515$ nm) (Invitrogen, 2012a).

K detekci singletního kyslíku se používá SOSG (Singlet Oxygen Sensor Green). Na rozdíl od jiných fluorescenčních a chemiluminiscenčních detekčních činidel pro singletní kyslík SOSG nevykazuje žádnou znatelnou odezvu na hydroxylový radikál nebo superoxid. Tento indikátor zpočátku vykazuje slabou modrou fluorescence, ale v přítomnosti singletního kyslíku se emituje zelená fluorescence (excitační/emisní maximum $\sim 504/525$ nm) (Invitrogen, 2012b).

3.2.2.2. Fluorochromy pro detekci reaktivních forem dusíku

Pro lokalizaci reaktivních forem dusíku existuje celá škála fluorochromů. Mezi nejčastěji používané fluorescenční barviva patří DAF-FM DA (diaminofluorescein diacetát), DAN (2,3-diaminonaftalen), DAR-4M AM (acetoxymethylester diaminorhodamin), DAA (1,2-diaminoantrachinon) a celá řada dalších (Gomes a kol., 2006).

Pro detekci NO se používají deriváty fluoresceinu, diaminofluoresceiny (DAF). Tato metoda je založena na reakci vicinálních aromatických diaminů s NO v přítomnosti O_2 za účelem získání odpovídajících triazenů; odpovídající sloučeniny triazolového kruhu vznikají spontánně z aromatických diaminů v neutrálním prostředí. Nejběžněji se detekce NO provádí pomocí 4,5-diaminofluoresceinu, derivátu fluoresceinu (Vandelle a Delledonne, 2008). Reakce mezi DAF-2 a oxidačním produktem NO vede k vytvoření vysoce fluorescenčního triazolofluoresceinu DAF-2T. Pro intracelulární NO detekci se používá buněčně propustný derivát DAF-2, zejména DAF-2 diacetát (DAF-2 DA), který může proniknout rychle do buněk, kde je hydrolyzován intracelulárními esterázami na DAF-2 (Kojima a kol., 1998). Výhodou je, že intenzita fluorescence triazolových derivátů DAF je

nezávislá na pH. 3-amino-4-(*N*-methylamino)-2',7'-difluorescein (DAF-FM) je zlepšená obdoba DAF, která po reakci s NO dává triazol DAF-FM T, který ukazuje stabilní a intenzivní fluorescenci v širokém rozmezí hodnot pH (Vandelle a Delledonne, 2008). DAF-FM byl poprvé popsán v roce 1998 a jeho charakteristické vlastnosti jsou výhodné pro detekci oxidu dusnatého *in situ*. Pro fluorescenční barvení se více používá jeho diacetátový derivát DAF-FM DA (diaminofluorescein). Tento fluorescein je schopný pronikat plazmatickou membránou, dále generuje silnější fluorescenční signály a v delších vlnových délkách než 2,3-diaminonaftalen (DAN) (Invitrogen, 2012c). Fluorescenční barvivo DAN (2,3-diaminonaftalen) je aromatická diamino sloučenina, ve skutečnosti bez fluorescence, která rychle reaguje s NO. Tato reakce vede ke vzniku vysoce fluorescenční látky 2,3-naftotriazolu (NAT, excitační/emisní maxima ~ 375/415 nm) (Gomes a kol., 2006).

Dalším fluorescenčním indikátorem NO je acetoxymethyl ester DAR-4M (DAR-4M AM). DAR-4M nevratně reaguje s NO v přítomnosti O₂ a produkuje triazolové formy DAR-4M, DAR-4M T (excitační/emisní maxima ~ 560/575 nm) (Gomes a kol., 2006). Pro přímé zjišťování NO se používá 1,2-diaminoantrachinon (DAA, excitační/emisní maxima ~ 264/494 nm), který není fluorescenční, dokud nezačne reagovat s NO, poté červeně fluoreskuje. DAA se používá k detekci změn NO u sítnice potkanů po poranění zrakového nervu. Tato metodika umožňuje testovat působení NO v neurodegeneraci, zánětech a jiných biologických procesech (Invitrogen, 2012c).

Tabulka 3: Přehled a parametry vybraných fluorochromů pro detekci RONS.

Zkratka	Celý název	Použití pro detekci	Vlnová délka [nm]		Citace
			Max. excitace	Emise	
H ₂ DCF DA	2', 7'-dihydrodichlorfluorescein diacetát	peroxid vodíku (H ₂ O ₂) a dalších ROS	498	522	Invitrogen, 2012a
APF	3'-p-(aminofenyl)fluorescein	hydroxylového radikálu (OH [•]), peroxydusitanu (ONOO ⁻) a anionchlornanu (ClO ⁻)	490	515	Invitrogen, 2012a
HPF	3'-p-(hydroxyfenyl)fluorescein	hydroxylového radikálu (OH [•]) a peroxydusitanu (ONOO ⁻)	490	515	Invitrogen, 2012a
SOSG	Singlet Oxygen Sensor Green	singletního kyslíku (¹ O ₂)	504	525	Invitrogen, 2012b
HE	hydroethidin	superoxid (O ₂ ⁻)	510	590	Zhao a kol., 2005
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2', 7'-difluorescein	oxidu dusnatého (NO) a dalších RNS	495	515	Vandelle a Delledonne, 2008
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2', 7'-difluorofluorescein diacetát	oxidu dusnatého (NO) a dalších RNS	495	515	Invitrogen, 2012c
DAN	2,3-diaminonaftalen	oxidu dusnatého (NO)	365	415	Gomes a kol., 2006
DAR-4M AM	acetoxymethylester diaminorhodaminu	oxidu dusnatého (NO) v přítomnosti kyslíku	560	575	Gomes a kol., 2006
DAA	1,2-diaminoantrachinon	oxidu dusnatého (NO)	264	494	Invitrogen, 2012c
DAF-2 DA	4,5-diaminofluorescein diacetát	oxidu dusnatého (NO)	495	515	Valderrama a kol., 2007
AF488	Alexa fluor 488	S-nitrosothiolu (RSNO)	495	519	Valderrama a kol., 2007
CuFL	kovový fluorofor s mědí v molekule (CuFL ₅)	oxidu dusnatého (NO) a dalších RONS	499	520	Albers, 2008

3.3. Bioluminiscence a další neinvazivní metody detekce RONS

Ultraslabá biofotonová emise v živých systémech byla poprvé popsána Alexandrem Gurwitschem v roce 1920. Gurwitsch na morfogenetické teorii pole koreluje „ultraslabé záření“ (fotonová emise 260 nm) buněčného dělení v kvasinkách a u cibule. O polovinu století později došlo k popisu trvalé emise všech biologických systémů na základě jednotlivých fotonů emitovaných ve spektrálním rozsahu přibližně 300 až 800 nm s intenzitou až do několika set fotonů za sekundu na jeden centimetr. Původní popis trvalé emise živých organismů se liší od bioluminiscence (enzymatické generace fotonů, např. zprostředkované luciferázou). Termín biofotony se stále více používá pro popis významné časoprostorové emise biologických systémů, které jsou vystaveny biotickým a abiotickým stresům (Bennett a kol., 2005).

Zobrazování pomocí biofotonů nabízí nové metody pro posouzení fyziologických stavů rostlin. Spontánní ultraslabá fotonová emise (biofotonová emise) pochází z biochemické metabolické reakce živých organismů. Biofotony nevyžadují externí chemiluminiscenční nebo bioluminiscenční činidla. U savčích buněk se biofotonová emise vyskytuje v průběhu imunologických reakcí. Podobně je tomu u rostlin, které generují biofotony jako odpověď vůči patogenům. Biofotonová emise je záření s vlnovými délkami od viditelného po infračervené světlo, které je indukované během elektronicky excitovaných molekul vyskytujících se v živých buňkách. Výsledkem emise je reakce radikálů, která je provázána produkcí ROS. Intenzita emise je $<10^{-15} \text{ W cm}^{-2}$, která je 10^{-3} až 10^{-6} krát menší než je hodnota u viditelného světla. Ačkoli je intenzita emise velmi nízká, fotony se vztahují k metabolické produkci ROS spojené s různými typy fyziologických a patologických živých systémů. Toto je obvykle pozorováno a používáno u rostlin, živočichů a mikroorganismů. Studie byly analyzovány u rostlin a jejich fyziologických reakcí na různé stresové podněty, včetně biotických i abiotických stresů. Velmi citlivý systém byl vyvinut pro zobrazování *in situ* biofotonovou emisí a pro vizualizaci ROS souvisejících s fyziologickými změnami v rostlinách. První snímek zobrazení biofotonovou emisí byl pořízen u virusu mozaiky okurkové (*Vigna unguiculata*) (Kobayashi a kol., 2007).

Rostlinná pletiva reagují na poranění různými způsoby – zvýšené dýchání, syntéza DNA a RNA, syntéza peroxidázy aj. Poraněná rostlinná pletiva vykazují zvýšený oxidační metabolismus, chemiluminiscenci a biofotonovou emisí. U kořenů a stonků *Glycine max* (L.) Merrill cv. Bragg byla chemiluminiscence rozšířena v návaznosti na mechanické poškození, které zapříčinilo prasknutí buněčné stěny a membrány. Peroxidáza (POX) je hojně zastoupena

ve zraněných rostlinných pletivech, což přispívá k silné emisi. Emise byla větší u kořenů než u stonků (Salin a Bridges, 1981). Biofotonová emise souvisí s fyziologickým stavem živých buněk a každá změna (např. mechanický tlak) se zobrazí ve změně biofotonové emise. V experimentu se sazenicemi okurky *Cucurbita pepo* cv. *styriaceae* byla nejsilnější odezva pozorována v místě řezu hypokotylu, kde byly uříznuty primární listy. Vratné poškození homeostázi vede k dlouhodobému zvýšení ultraslabé biofotonové emise. Na rozdíl od nevratného poškození homeostázi, které vede ke smrti buněk. Umírající buňky vykazují poměrně silnou emisi, která nezávisí na příčině smrti a snižuje se nepřetržitě až do chvíle smrti buňky. Nevratné poškození způsobí extrémně rychlé a intenzivní zvýšení ultraslabé biofotonové emise, intenzita a trvání tohoto nárůstu je úzce spojeno s procesem umírání (Winkler a kol., 2009).

Spontánní biofotonová emise byla měřena u různých rostlinných vzorků (kořenů, listů, semen a izolovaných buněk). Emise je zesílena za podmínek, které způsobují vznik reaktivních forem kyslíku a dusíku a oxidační stres (infekce patogenem, mraz, sucho, ošetření herbicidem). Je tedy předpokládáno, že jedním z možných zdrojů spontánní biofotonové emise živých organismů je lipidická peroxidace. Během peroxidace membrány lipidů dochází k tvorbě látek (např. singletního kyslíku a tripletních karbonylů), které mají schopnost vyzářovat fotony. Oxidace lipidů probíhá u rostlin pravděpodobně velmi pomalu, protože biofotonová emise přetrvává poměrně dlouho. Lipidická oxidace je hlavním mechanismem, který se podílí na autoluminiscenčním signálu emitovaném *in vivo* na listech rostlin. Měření ultraslabé dvourozměrné biofotonové emise lze vysoce citlivou CCD kamerou chlazenou dusíkem. Tato metoda byla použita při měření biofotonové emise u listů *Arabidopsis* vystavených fotooxidačnímu stresu za vzniku malondialdehydu, lipidické peroxidace a mastných kyselin s hydroxylovou skupinou. CCD kamerou byla také zachycena hypersenzitivní reakce rostliny na patogen, která korelovala s produkcí ROS a NO. Ultraslabá biofotonová emise má velký potenciál pro neinvazivní metody detekce RONS u rostlin (Birtic a kol., 2011). Metoda měření ultraslabé biofotonové emise pomocí CCD kamery je významná pro včasnou detekci oxidačního stresu a pro neinvazivní detekci RONS. Velkou výhodou této metody je její jednoduchost použití, nevyžaduje větší přípravu vzorků a biofotonová emise může být měřena i na živých vzorcích.

Studium vztahů mezi patogenem a rostlinou je důležité pro ochranu rostlin před infekcemi. Elicitory jsou molekuly, které se účastní interakcí rostlina-patogen. Sekrece elicitorů patogenem do okolí a jejich interakce s rostlinnými buňkami může vyvolat hypersenzitivní reakci. Elicitiny tvoří vysoce konzervativní skupinu proteinů elicitorů, které

jsou vylučovány oomycetami rodu *Pythium* a *Phytophthora*. Biologické funkce elicitinů jsou v současné době známy, avšak při studiu fyziologických účinků na tabáku bylo zjištěno, že elicitiny mají schopnost indukovat tzv. systémově získanou rezistenci proti napadení patogenem. Reakce je vyvolaná interakcí elicitinů s receptorem umístěným na cytoplasmatické membráně tabákových buněk složených z vápníku a glykoproteinu. Přenos signálu přes receptor spouští fosforylační-defosforylační kaskádu v tabákových buňkách a vede k alkalizaci extracelulárního media, dochází k výměně draslíku a chloridových iontů s vápníkem, k tvorbě ROS a změně složení buněčné stěny. Primární struktura elicitinů se skládá z 98 aminokyselin spojených disulfidickými můstky. Elicitiny mohou být rozděleny podle jejich izoelektrického bodu (pI) na λ -elicitiny (pI < 7) a β -elicitiny (pI > 7). β -elicitiny vyvolávají větší nekrózu než λ -elicitiny, což je způsobeno změnou stavby a odlišnostmi ve struktuře (Dobeš a kol., 2004). Velká pozornost je věnována zástupci z řad rostlinných patogenů *Pythium oligandrum* Dreschsler, z něhož je získán nízkomolekulární protein oligandrin. Studie ukázaly, že *P. oligandrum* vyvíjí velkou antagonistickou aktivitu proti širokému spektru houbových patogenů, má schopnost proniknout do kořenového systému rajčat (*Solanum esculentum* Mill. var. *Prisca*) bez poškození buněk a vyvolává řadu obranných reakcí na *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Benhamou a kol., 2001). Fytopatogenní houba *Phytophthora cryptogea* vylučuje nízkomolekulární protein – elicitin kryptogein X-24. Tento protein vyvolává hypersenzitivní reakce a nekrózy, blokuje transport glukózy v tabáku, chrání tabákové listy proti následnému napadení patogenem *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Blein a kol., 1991). Od původního kryptogeinu X-24 byly vytvořeny varianty V84F, L41F a L41F/V84F, které se liší ve schopnosti vázat steroly, mastné kyseliny, produkci ROS a schopnosti aktivovat obranné geny. Varianta kryptogeinu V84F neváže steroly ani mastné kyseliny, aktivuje ROS a expresi obranných genů. Varianta L41F snižuje vazbu mastných kyselin a produkce ROS, po aplikaci není patrná žádná nekróza. Varianta V84F/L41F by neměla vázat steroly ani mastné kyseliny, exprese obranných genů a produkce ROS je snižena, po aplikaci není patrná žádná nekróza (Dobeš a kol., 2004).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Pěstování modelových rostlin lociky kompasové a inokulace padlí čekankového

Lactuca serriola (H58-09-0708 – rezistentní k padlí, H58-09-0724 – náchylný k padlí)

Semena byla vyseta do vlhkého perlitu (Agroperlite, Nový Jičín, Česká republika). Přibližně po 2 týdnech byly semenáčky přesazeny do květináčů o průměru 9 cm se směsí zeminy/rašeliny v poměru 2:1 a umístěny do růstové komory při teplotě 18/15°C (den/noc), 12h fotoperioda, intenzita ozáření 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Při experimentu byly použity rostliny 4-5 týdnů staré (Sedlářová a kol., 2010).

Inokulace byla provedena metodou otisku listu se sporujícím myceliem *Golovinomyces cichoracearum* na listy zdravých rostlin *Lactuca serriola* (4-5 týdnů staré). Rostliny byly následně umístěny do fytotronu při teplotě 18/15°C a fotoperiodě 12/12h (den/noc). Vzorky z napadených rostlin byly odebírány v časových intervalech 24 h a 48 h po inokulaci.

4.2. Pěstování modelových rostlin rajčete a tabáku, aplikace elicitorů

Solanum esculentum cv. Amateur

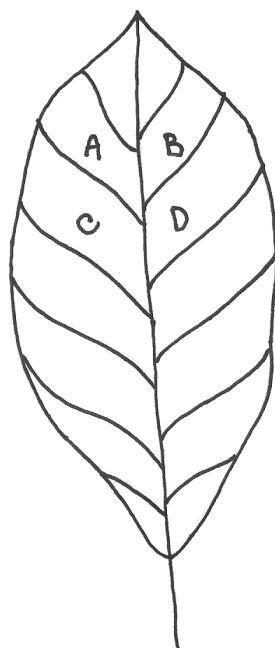
Semena byla vyseta do navlhčeného perlitu (Agroperlite, Nový Jičín, Česká republika). Klíčící rostlinky byly přeneseny do plastových květináčů o průměru 7 cm obsahující směs zahradní zeminy a rašeliny (2:1, v/v). Rostliny byly pěstovány v růstové komoře při teplotě 20/18°C a fotoperiodě 12/12h (den/noc), světelná intenzita 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Experiment byl prováděn na rostlinách přibližně 10 týdnů starých (Piterková a kol., 2009).

Infiltrace listů rajčete elicitory byla provedena pomocí injekční stříkačky bez jehly ze spodní strany listu proti mírnému tlaku z druhé strany. Elicitor oligandrin byl aplikován v koncentracích 10 nM, 100 nM a 1000 nM.

Nicotiana tabacum cv. Samsung

Rostliny tabáku byly vysety do zahradnického substrátu a pěstovány v květináčích o průměru 9 cm ve fytokomoře při teplotě 25/18 °C, fotoperiodě 16/8h (den/noc), intenzitě ozáření 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a vzdušné vlhkosti 65 %. Pro pokusy byly použity 10 týdnů staré rostliny.

Pro aplikaci elicitorů u FDA byly vybrány vždy 3 rostliny (7-10 týdnů staré). U každé rostliny byl elicítován pouze jeden dobře vyvinutý list. Elicitory byly aplikovány tlakovou infiltrací ze spodní strany listu pomocí injekční stříkačky bez jehly. V experimentu byly použity tři koncentrace 10 nM, 100 nM, 1000 nM s tím, že na každém listu byla stejná koncentrace tří různých elicitorů. Segmenty tabákového listu byly infiltrovány podle schématu na obrázku 6. V sektoru A byl infiltrován původní kryptogein X-24, v sektoru B varianta kryptogeinu L41F/V84F, v sektoru C varianta kryptogeinu V 84F a v sektoru D pro negativní kontrolu deionizovaná voda.



Obr. 6: Schéma listu tabáku a rozmístění infiltrovaných segmentů. V sektoru A byl infiltrován kryptogein X-24, v sektoru B varianta kryptogeinu L41F/V84F, v sektoru C varianta kryptogeinu V 84F a v sektoru D pro negativní kontrolu deionizovaná voda.

4.3. Lokalizace RONS v listech hostitelských rostlin konfokální laserovou skenovací mikroskopií

Pro lokalizaci RONS v listech hostitelských rostlin byl použit excitační argonový laser s více spektrálními čarami (457 nm, 488 nm, 515 nm) a celkovým výkonem 30 mW, dále diodový laser (405 nm) s celkovým výkonem 20 mW. Preparáty byly snímány a zobrazovány počítačovým softwarem Olympus Fluorview 1000 s invertovaným mikroskopem IX81. Lokalizace RONS byla pozorována u listů *Lactuca serriola*. Listová pletiva byla nařezaná na malé kousky a barvena roztoky fluorochromů na podložních mikroskopických sklech. Inkubace vzorků probíhala ve tmě po daný časový interval. Následně byly vzorky

propláchnuty puforem, přikryty krycím mikroskopickým sklem a pozorovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií.

Pro detekci RONS byly použity následující fluorochromy

SOSG (<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp36002.pdf>),

H₂DCF DA (http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/reports/els_452e8a317d.pdf),

DAF-FM DA (http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/reports/els_4d166d7773.pdf).

Pro lokalizaci reaktivních forem kyslíku byly vzorky barveny 50 µM roztokem fluorochromu SOSG. Po obarvení fluorochromem probíhala inkubace vzorků 25 min. V případě barvení vzorku 10 µM roztokem fluorochromu H₂DCF DA trvala inkubace 15 min. Pro lokalizaci reaktivních forem dusíku byly vzorky barveny po dobu 20 minut přidáním 20 µM roztoku fluorochromu DAF-FM DA.

4.4. Měření bioluminiscence rostlinného materiálu

Pro měření dvoufotonové ultraslabé fotonové emise u listů *Nicotiana tabacum* cv. Samsung a *Solanum esculentum* cv. Amateur byla použita vysoce citlivá CCD kamera VersArray 1300B (Princeton instruments, Trenton, New Jersey). CCD kamera byla vybavena objektivem s 50 mm ohniskovou vzdáleností a clonovým číslem 1,2 (Nikkor 50 mm, f: 1,2 Nikon, Tokyo, Japonsko). Spektrální citlivost CCD kamery byla v rozmezí 200 až 1000 nm, vzhledem k použitému objektivu byla však omezena na viditelnou část spektra. Pro snížení teploty byla CCD kamera chlazena na -110°C pomocí kapalného dusíku (doplnění dusíku probíhalo vždy po 12h). Kamera byla umístěna v experimentální tmavé místnosti a řízena počítačem z provozní tmavé místnosti. Korekce dat byla provedena před měřením odečtením šumu v pozadí. Pro měření byly nastaveny parametry CCD kamery: frekvence snímání 100 kHz, zesílení 3, akumulací doba 30 min (Rastogi a Pospíšil, 2011). Při experimentu byly před CCD kameru v tmavé místnosti nainstalovány tři rostliny tabáku s infiltrovanými listy. Snímání probíhalo po dobu 36 h, snímky byly zaznamenávány po 30 minutách.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Lokalizace molekul RONS u *Lactuca serriola* během infekce *Golovinomyces cichoracearum*

Pro lokalizaci molekul RONS byly spory *Golovinomyces cichoracearum*, původce padlí čekankovitých, barveny 24 h a 48 h po inokulaci fluorescenčními barvivami SOSG, H₂DCF DA, DAF-FM DA a následně zobrazovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií.

5.1.1. Detekce singletního dusíku

Po obarvení spor fluorescenčním barvivem SOSG byl signál pozorován již po 24 hodinové inkubaci. Singletní kyslík byl detekován u klíčících spor obou genotypů (obr. 7 A, C), přičemž u klíčícího vlákna rezistentní varianty *Lactuca serriola* H58-09-0708 byl signál mírně intenzivnější než u varianty H58-09-0724. Po 48 hodinové inkubaci byl fluorescenční signál pozorován ve stejné míře u obou genotypů. Spory u rezistentního genotypu H58-09-0708 klíčí více a mají delší klíčící vlákna, signál je pozorovatelný v celé spoře i klíčícím vlákně (obr. 7 B). U náchylné varianty H58-09-0724 byla silnější odezva v klíčícím vlákně, slabší pak v samotné spoře (obr. 7 D).

Přítomnost singletního kyslíku nebyla zatím sledována u interakcí rostlina-patogen, experimenty byly prováděny u sinic a řas. Sinha a kol. (2011) prováděl experimenty u sinic *Synechocystis* sp. U malých proteinů ve fotosystému II vyvolává intenzivní osvětlení poškození a generování singletního kyslíku. Singletní kyslík je aktivován jedoelektronovou redukcí, která vede k tvorbě superoxidového anion-radikálu spouštějícího kaskádu reakcí vedoucích k tvorbě peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu. Vytvořený singletní kyslík a hydroxylový radikál může reagovat s polynenasycenými mastnými kyselinami a aminokyselinami, které vedou k peroxidaci lipidů a oxidačnímu poškození proteinů. Zvýšená tvorba singletního kyslíku je detekována zelenou fluorescencí fluorochromu SOSG a hodnocena konfokální skenovací laserovou mikroskopií a elektronovou paramagnetickou rezonancí (Sinha a kol., 2011). Singletní kyslík je produkován ve fotosyntetických organismech vystavených nadměrné intenzitě světla. Až donedávna nebyl singletní kyslík považován za signální molekulu, avšak bylo prokázáno, že souvisí s aktivací genové exprese u *Arabidopsis thaliana* a *Chlamydomonas reinhardtii*. Fischer a kol. (2007) zjistil, že

singletní kyslík u *Chlamydomonas reinhardtii* stimuluje jaderný kódovaný gen GPXH za aktivace signálního mechanismu mimo membránu thylakoidů (Fischer a kol., 2007).

5.1.2. Detekce peroxidu vodíku a dalších ROS

V případě spor barvených fluorescenčním barvivem H₂DCF DA byly zaznamenány důkazy H₂O₂ u obou genotypů *Lactuca serriola* (H58-09-0724 i H58-09-0708). Po 24 hodinové inkubaci byl pozorován pouze slabší signál u klíčících spor (obr. 7 E, G). Spory však klíčily pouze zřídka. Intenzivnější signál byl znatelný po 48 hodinové inkubaci s tím, že u náchylného genotypu H58-09-0724 byl signál výraznější a s více klíčovými spory (obr. 7 H) než u genotypu rezistentního H58-09-0708 (obr. 7 F).

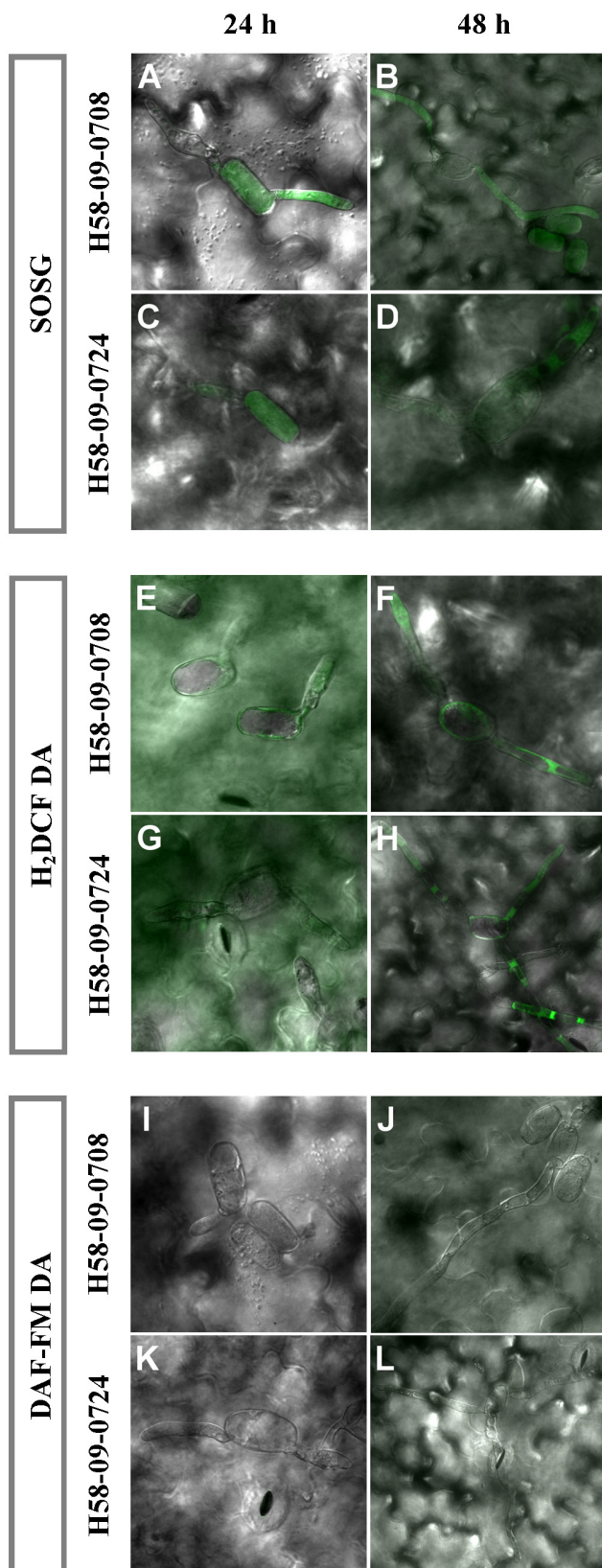
ROS jsou jednou z prvních reakcí rostliny na napadení patogenem. U rýže *Oryza sativa* byly ROS studovány v pletivech listů 0, 3 a 8 h po inokulaci *Magnaporthe grisea*, barvení bylo provedeno 10 μM H₂DCF DA. Nejvyšší signál byl patrný v cytoplazmě konidií a v septální buněčné stěně. ROS byly lokalizovány v klíčících vláknech a v apresoriích mezi 4 a 8 h po inokulaci (Egan a kol., 2007). U *Lactuca* spp. napadených *Bremia lactucae* bylo 96 hodin po inokulaci detekováno pomocí DAB hromadění H₂O₂ v infikovaných buňkách. V inokulovaných listech byla patrná přítomnost H₂O₂ podél xylémových cév, zesílených sekundárních buněčných stěn. U rostlinných pletiv byla přítomnost peroxidu vodíku v epidermálních buňkách v místě penetrace a kolem místa infekce a v mezofylu buněk. V případě genotypu *L. sativa* byla nízká intenzita H₂O₂. U *L. saligna* byla 6 – 12 h po inokulaci detekována odezva H₂O₂, nejintenzivnější odezva byla patrná 30 – 36 h po inokulaci, k mírnému ústupu intenzity signálu došlo 48 h po inokulaci (Sedlářová a kol., 2007). V případě našeho experimentu byly spory *Golovinomyces cichoracearum* barveny 10 μM fluorochromem H₂DCF DA. Slabý signál u klíčících spor byl patrný 24 h po inokulaci u obou genotypů *Lactuca serriola* (H58-09-0724 i H58-09-0708). 48 h po inokulaci byl fluorescenční signál intenzivnější u klíčících vláken náchylného genotypu H58-09-0724 než v případě rezistentního genotypu H58-09-0708.

5.1.3. Detekce oxidu dusnatého

U spor barvených fluorochromem DAF-FM DA nebyla NO zaznamenána ani u genotypu *Lactuca serriola* (H58-09-0724 je náchylný k padlí ani H58-09-0708 rezistentní). Spory *Golovinomyces cichoracearum*, inkubované 24 h a 48 h, klíčily jedním až třemi klíčovými vlákny, přesto u nich nebyl pozorován signál (obr. 7 I-L).

NO byl detekován také v pletivech *Lactuca* spp. inokulovaných plísní salátovou, *Bremia lactucae*. Při pokusu byl použit 20 μ M fluorochrom DAF-FM DA. Signál byl pozorovaný u všech testovaných genotypů, které se lišily pouze v rozvoji patogena. Výraznější fluorescence se objevila 24 hodin po inokulaci ve špičkách klíčnicích vláken a apresoriích (Sedlářová a kol., 2011). V případě barvení spor padlí *Oidium neolycopersici* u *Solanum esculentum* cv. Amateur a *S. chmielewskii* byl fluorescenční signál detekován (Piterková a kol., 2009). Barvení fluorochromem DAF-FM DA bylo prováděno v časovém intervalu 8 – 216 h po inokulaci. Po 8 h od inokulace nebyl v rámci rostlinných pletiv detekovaný fluorescenční signál. U spor barvených 20 μ M DAF-FM DA byla zaznamenána intenzivní zelená fluorescence v konidiích, klíčnicích vláčkách a apresoriích. Po 168 h a 216 h po inokulaci nebyla u spor barvených 10 μ M DAF-FM DA patrná žádná změna v lokalizaci NO. NO byl lokalizován v myceliu (na špičkách hyf a haustoriích) u *S. esculentum* cv. Amateur. V případě *S. chmielewskii* došlo k odezvě i v epidermálních buňkách, které byly v těsném kontaktu s patogenem nebo v blízkosti místa infekce (Piterková a kol., 2009). V práci Prats a kol. (2008) byl NO detekován na listech ječmene barvením konidií *Blumeria graminis* 10 μ M fluorochromem DAF-2 DA. Po 6 – 10 h po inokulaci byl detekován fluorescenční signál v apresoriu a klíčnicích hyfách. Nejvýraznější fluorescenční signál byl patrný při dozrávání apresorií, 11 – 12 h po inokulaci. 20 – 24 h po inokulaci byl signál velmi slabý. Proměnlivá intenzita fluorescenčního signálu, přivedla Prats a kol. (2008) k myšlence, že NO se během životního cyklu *B. graminis* tvoří přechodně.

V mé práci nebyl detekován žádný fluorescenční signál v případě barvení spor *Golovinomyces cichoracearum* 20 μ M DAF-FM DA. Odezva nebyla zaznamenána u žádného z testovaných genotypů *Lactuca serriola*, v žádném časovém intervalu – 24 h a 48 h po inokulaci. Tento výsledek je v rozporu s výše popsány publikovanými výsledky. Je tedy možné, že zvolené časové varianty nebyly vhodné a barvení spor probíhalo v době, kdy NO nebyl přítomen. Rovněž mohla být koncentrace NO v pozorovaných sporách nízká a tedy pod detekčním limitem fluorescenční sondy. Problém mohl nastat i v metodice, proto by bylo vhodné daný experiment zopakovat.



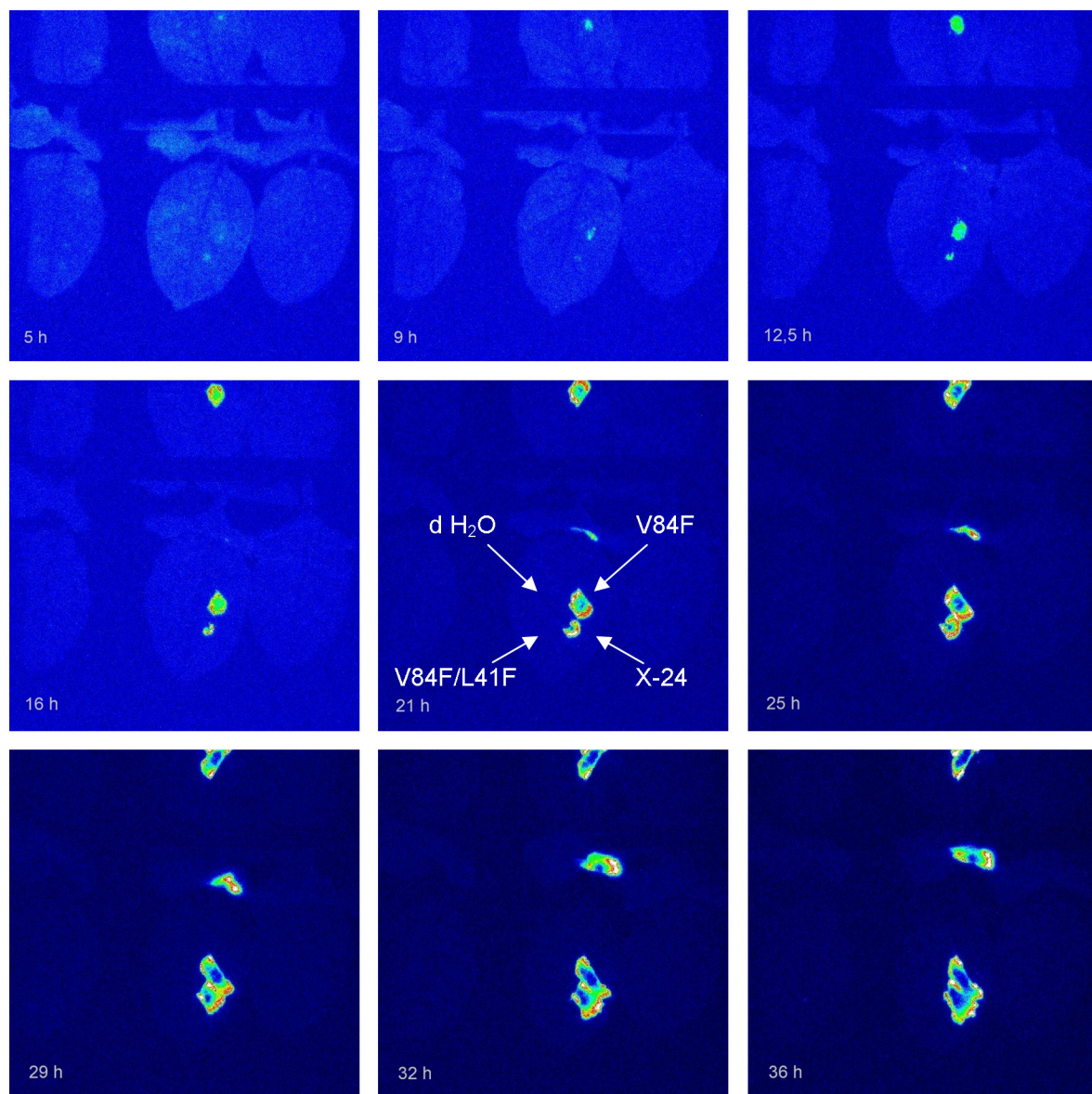
Obr. 7: Porovnání intenzity fluorescenčního signálu spor *Golovinomyces cichoracearum* inokulovaných na listy *Lactuca serriola* (H58-09-0708 – genotyp rezistentní k padlí, H58-09-0724 – genotyp náchylný k padlí) a inkubovaných 24 h a 48 h. Spory jsou barveny v roztocích fluorochromů SOSG, H₂DCF DA, DAF-FM DA.

5.2. Bioluminiscence pletiv rostlin po aplikaci stresor

Nejdříve byl prováděn experiment u *Solanum esculentum* cv. Amateur. Listová pletiva byla infiltrována elicitorem oligandrinem o koncentracích 10 nM, 100 nM a 1000 nM. Při infiltraci došlo k mírnému mechanickému poškození listu, zapříčiněné tuhostí infiltrovaných listových segmentů. Rostlina byla umístěna před CCD kameru chlazenou dusíkem do tmavé experimentální místnosti, kde byla po dobu 36 h měřena ultraslabá dvourozměrná fotonová emise. Z výsledků bylo patrné, že vzniklá emise odpovídá mechanickému poškození listů při infiltraci, nikoli odezvě rostlinného materiálu na infiltraci elicitoru oligandrinu. Kvůli tuhosti infiltrovaných segmentů listu u *Solanum esculentum* cv. Amateur a nejasné odezvě vyvolané elicitorem oligandrinem se přešlo na jiný experimentální model.

Testovány byly listy *Nicotiana tabacum* cv. Samsung a dále byly srovnány aplikace různých variant a koncentrací kryptogeinů, které vyvolávají odezvu. Při pokusu byly nejprve použity čtyři varianty kryptogeinů – kryptogein X-24 (původní elicitor z *Phytophthora cryptogea*) a varianty kryptogeinu se záměnou části sekvence aminokyselin V84F, L41F, L41F/V84F. U kryptogeinu L41F nebyla po aplikaci patrná žádná nekróza. Z tohoto důvodu jsme přistoupili při pokusu k aplikaci tří kryptogeinů (X-24, V84F, L41F/V84F) u kterých byly vidět odlišnosti v bioluminiscenci.

Rostliny infiltrované elicitory podle schématu na obrázku 6 byly nainstalovány před CCD kameru do tmavé experimentální místnosti, kde byla po dobu 36 h měřena ultraslabá dvourozměrná fotonová emise. V případě kryptogeinů s koncentracemi 10 nM a 100 nM, nebyla patrná žádná emise. U listu infiltrovaného kryptogeinu s koncentrací 1000 nM nastala odezva po 5 h od infiltrace, a to pouze v případě segmentů s kryptogeinem X-24 a V84F (obr. 8). Odezva probíhala ze středu infiltrovaného segmentu, avšak u kryptogeinu V84F se šířila rychleji než u kryptogeinu X-24. Po 36 h od infiltrace byla odezva v celém infiltrovaném segmentu listu s nejsilnější emisí v oblasti žilek. Po 36 h od infiltrace je u listových segmentů infiltrovaných kryptogeinu X-24 a V84F patrné rozšíření nekrotických skvrn (obr. 9).



Obr. 8: Časová posloupnost ultraslabé dvourozměrné biofotonové emise u listů *Nicotiana tabacum* cv. Samsung byla měřena CCD kamerou chlazenou dusíkem.



Obr. 9: Listy *Nicotiana tabacum* cv. Samsung po 36 h od infiltrace, u kterých byla měřena ultraslabá dvourozměrná biofotonová emise. Na levé straně je umístěn infiltrovaný list s koncentracemi kryptogeinů 10 nM, uprostřed s koncentracemi kryptogeinů 1000 nM a na pravé straně s koncentracemi kryptogeinů 100 nM.

V poslední době Bennett a kol. (2005) prováděli experimenty u listů *Arabidopsis thaliana*, kde byla patrná biofotonová emise v průběhu hypersenzitivní reakce na *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Biofotonová emise byla přechodná, začala 2 h po inokulaci a trvala pouze 2 – 3 h. Tato přechodná odezva pravděpodobně souvisí s peroxidací lipidů a oxidem dusnatým, který je produkován v obranné reakci rostliny na patogen a má velký potenciál pro aplikaci ve fytopatologických studiích (Bennett a kol., 2005). Ultraslabá biofotonová emise byla měřena u listů *Pelargonium peltatum* cv. Cascade inokulovaných plísní šedou *Botrytis cinerea*. Listy byly inokulovány spory na třech místech. Kolem každého místa byla 3 – 4 dny po inokulaci patrná odezva. Bioluminiscence obklopující místa inokulace korespondovala s rozšířením skvrn plísně šedé. Intenzita signálu byla vzestupná až do 5 dnů po inokulaci, poté byla odezva slabší. Bylo zjištěno, že inokulovaná živá rostlinná pletiva jsou vystavena zvýšené spontánní bioluminiscenci. Nekrotická pletiva hostitelské rostliny projevily pouze slabou emisi (Floryszak-Wieczorek a kol., 2011). Dále Floryszak-Wieczorek a kol. (2011) provádí experimenty u náchylného a rezistentního genotypu *Solanum tuberosum* L. Na listy obou genotypů byly inokulovány spory plísně bramborové *Phytophthora infestans*. V případě náchylného genotypu *S. tuberosum* byla biofotonová emise vyšší než v případě genotypu odolného. Emise trvala 10 – 12 h po inokulaci, potom se signál snížil. V případě rezistentního genotypu *S. tuberosum*

byla bioluminiscence z počátku slabá (0 – 10 h po inokulaci), ale v následujících hodinách se emise zvýšila, vrchol nastal 72 – 96 h po inokulaci. Zobrazování biofotonové emise pomocí CCD kamery ukázalo, že intenzita emise je spojena s patogenezí a rozvojem nekrózy. Biofotonová emise vznikla z metabolických poruch (např. lipidové peroxidace) a je hlavním důsledkem oxidačního stresu u rostlinných pletiv napadených *P. infestans* (Floryszak-Wieczorek a kol., 2011). V mé práci byly na listy *Nicotiana tabacum* cv. Samsung aplikovány čtyři varianty kryptogeinů (X-24, V84F, L41F/V84F, L41F) o třech koncentracích 10 nM, 100 nM a 1000 nM. U kryptogeinu L41F nebyla během 36h po aplikaci patrná žádná nekróza, proto byly dále aplikovány pouze tři varianty kryptogeinů. V případě kryptogeinů s koncentracemi 10 nM a 100 nM, nebyla 36 h po infiltraci patrná žádná odezva. Po 5 h od infiltrace nastala odezva u listu infiltrovaného kryptogeinu s koncentrací 1000 nM, a to pouze v případě segmentů s kryptogeinem X-24 a V84F. Odezva se šířila ze středu infiltrovaného segmentu, u kryptogeinu X-24 probíhala rychleji než u kryptogeinu V84F. Avšak 36 h po infiltraci byla odezva patrná u obou variant kryptogeinu v celém infiltrovaném segmentu listu tabáku.

6. ZÁVĚR

V této práci byly histochemickým barvením a konfokální laserovou skenovací mikroskopií lokalizovány RONS a pomocí citlivé kamery měřena ultraslabá biofotonová emise. RONS byly lokalizovány v listech *Lactuca serriola* (genotyp H58-09-0708 – rezistentní k padlí a genotyp H58-09-0724 – náchylný k padlí) během infekce *Golovinomyces cichoracearum*. Listy hostitelské rostliny byly inokulovány spory padlí, 24 a 48 h po inokulaci barveny fluorochromy pro detekci singletního kyslíku, peroxidu vodíku a oxidu dusnatého. Singletní kyslík byl detekován v samotných sporách a v klíčících vláknách padlí. Peroxid vodíku byl lokalizován u spor barvených fluorescenčním barvivem H₂DCF DA. Po 24 h od inkubace byl fluorescenční signál slabší a spory klíčily pouze zřídka. Avšak 48 h po inkubaci byl signál výraznější a s více klíčícími spory u náchylného genotypu než u genotypu rezistentního. Oxid dusnatý byl detekován barvením spor fluorochromem DAF-FM DA. Spory klíčily jedním až třemi klíčovými vlákny. Oxid dusnatý nebyl pozorován u žádného genotypu 24 h ani 48 h od inokulace. Tento výsledek je v rozporu s dříve publikovanými výsledky, nabízí se proto několik možností, v kterých mohlo dojít k pochybení. Jednak mohla být koncentrace NO nízká a tedy pod detekčním limitem fluorochromu, nebo byly špatně zvolené časové varianty barvení, anebo mohl být problém v metodice. Ultraslabá biofotonová emise byla měřena CCD kamerou chlazenou dusíkem. Bylo zjištěno, že patogenezí vede k signální odezvě po 5 h od infiltrace listu *Nicotiana tabacum* cv. Samsung, a to pouze v případě 1000 nM kryptogeinu X-24 a V84F. Odezva se šířila ze středu infiltrovaného segmentu, přičemž u varianty kryptogeinu V84F se šířila rychleji než u původní varianty kryptogeinu X-24. Po 36 h od infiltrace byla odezva patrná v celých listových segmentech infiltrovaných kryptogeinu X-24 a V84F a korespondovala s rozšířením nekrotických skvrn.

7. LITERATURA

Albers, E. A. (2008): Fluorescent probes for imaging intracellular nitric oxide. [online, cit. 15. 8. 2012]. Dostupné z: <http://www.organicdivision.org/ama/orig/Fellowship/2007_2008_Awardees/Essays/Albers.pdf>.

Benhamou, N., Belanger, R., Rey, P., Tirilly, Y. (2001): Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 681-696.

Bennett, M., Mehta, M., Grant, M. (2005): Biophoton imaging: A nondestructive method for assaying *R* gene response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18: 95-102.

Birtic, S., Ksas, B., Genty, B., Mueller, M. J., Triantaphylide, Ch., Havaux, M. (2011): Using spontaneous photon emission to image lipid oxidation patterns in plant tissues. *The Plant Journal*, 67: 1103-1115.

Blein, J.-P., Milat, M.-L., Ricci, P. (1991): Responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiology*, 95: 486-491.

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.

Claxton, N. S., Fellers, T. J., Davidson, M. W. (2009): Laser scanning confocal microscopy [online, cit. 16. 8. 2012]. Dostupné z: <<http://ns3.ucc.ie/en/anatomy/research/BIOSCIENCESIMAGINGCENTRE/ConfocalImagingSystems/FV1000/Laser-Scanning-Confocal-Microscopy-Introduction.pdf>>.

Česneková, E. (2008): Variabilita interakcí mezi zástupci rodu *Lactuca* spp. a padlím čekankovým (*Golovinomyces cichoracearum*). Diplomová práce, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Montanu, M. V., Inze, D., Breusegem, F. V. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 779-795.

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

Denk, W., Strickler, J. H., Watt, W. W. (1990): Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science, New Series*, 248: 73-76.

Dobeš, P., Kmuníček, J., Mikeš, V., Damborský, J. (2004): Binding of fatty acids to λ -cryptogein: Quantitative structure-activity relationships and design of selective protein mutans. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 44: 2126-2132.

Durner, J., Klessig, D. F. (1999): Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 369-374.

Egan, M. J., Wang, Z.-Y., Jones, M. A., Smirnoff, N., Talbot, N. J. (2007): Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 104: 11772-11777.

- Enzo Life Science (2010): 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate – PRODUCT DATA SHEET. [online, cit. 15.8.2012]. Dostupné z: <http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/reports/els_452e8a317d.pdf>.
- Enzo Life Science (2010): DAF-FM DA – PRODUCT DATA SHEET. [online, cit. 15.8.2012]. Dostupné z: <http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/reports/els_4d166d7773.pdf>.
- Fischer, B. B., Krieger-Liszkay, A., Hideg, E., Šnyrychová, I., Wiesendanger, M., Eggen, R. I. L. (2007): Role of singlet oxygen in chloroplast to nucleus retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*. Federation of European Biochemical Societies Letters, 581: 5555-5560.
- Floryszak-Wieczorek, J., Górski, Z., Arasimowicz-Jelonek, M. (2011): Functional imaging of biophoton response of plants to fungal infection. Plant Pathology, 130: 249-258.
- Fontvieille, D. A., Outaguerouine, A., Thevenot, D. R. (1992): Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges. Environmental Technology, 1992: 531-540.
- Gessler, N. N., Aver'yanov, A. A., Belozerskaya, T. A. (2007): Reactive oxygen species in regulation of fungal development. Biochemistry (Moscow), 72: 1091-1109.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C. (2006): Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: A review. Journal of Fluorescence, 16: 119-139.
- Hámpl, V., Šacherová, V., Němec, P. (2009): Světelná mikroskopie. [online, cit. 15. 8. 2011]. Dostupné z: <<http://web.natur.cuni.cz/parasitology/vyuka/mikroskopickatechnika/>>.
- Hancock, J. T., Desikan, R., Nelil, S. J. (2001): Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. Biochemical Society Transactions, 29: 345-350.
- Hejtmánek, M. (2001): Úvod do světelné mikroskopie. Univerzita Palackého v Olomouci lékařská fakulta, Olomouc 2001: 40-41.
- Invitrogen (2012): Nucleic acid stains – Section 18.1. [online, cit. 16. 8. 2012]. Dostupné z: <<http://www.invitrogen.com>>.
- Invitrogen (2012a): Generating and detecting reactive oxygen species – Section 18.2. [online, cit. 15. 8. 2012]. Dostupné z: <<http://www.invitrogen.com>>.
- Invitrogen (2012b): Singlet Oxygen Sensor Green. [online, cit. 15. 8. 2012]. Dostupné z: <<http://products.invitrogen.com>>.
- Invitrogen (2012c): Probes for Nitric Oxide Research – Section 18.3. [online, cit. 15. 8. 2012]. Dostupné z: <<http://www.invitrogen.com>>.
- Karuppanapandian, T., Moon, J-CH., Kim, CH., Manoharan, K., Kim, W. (2011): Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. Australian Journal of Crop Science, 5(6): 709-725.

- Kobayashi, M., Sasaki, K., Enomoto, M., Ehara, Y. (2007): Highly sensitive determination of transient generation of biophotons during hypersensitive response to cucumber mosaic virus in cowpea. *Journal of Experimental Botany*, 58: 465-472.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T. (1998): Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*, 70: 2446-2447.
- Kubínová, L. (2004): Konfokální a dvoufotonová mikroskopie. *Mikroskopie Dnes*, příloha časopisu *Vesmír*, 83: 4-5.
- Molecular Probes (2004): Singlet Oxygen Sensor Green Reagent – PRODUCT DATA SHEET. [online, cit. 15. 8. 2012]. Dostupné z [www: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp36002.pdf>](http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp36002.pdf).
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., Hancock, J. T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1237-1247.
- Petráň, M., Hadravský, M. (1989): Tandem scanning microscope - a new tool for three-dimensional microanatomy. [online, cit. 15. 8. 2012]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2748672>.
- Piterková, J., Hofman, J., Mieslerová, B., Sedlářová, M., Luhová, L., Lebeda, A., Petřivalský, M. (2011): Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp.-*Oidium neolycopersici* interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 74: 37-44.
- Piterková, J., Luhová, L., Petřivalský, M. (2008): Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické listy*, 102: 410-416.
- Piterková, J., Petřivalský, M., Luhová, L., Mieslerová, B., Sedlářová, M., Lebeda, A. (2009): Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Molecular Plant Pathology*, 10: 501-513.
- 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.
- Plášek, J. (1995): Renezanze experimentálních metod – konfokální mikroskop. *Vesmír*, 74: 508-510.
- Prats, E., Carver, T. L. W., Mur, L. A. J. (2008): Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus *Blumeria graminis*. *Microbiology*, 159: 476-480.
- Procházka, S. (1998): Fyziologie stresu. In: *Fyziologie rostlin*, 412-430. Academia, Praha.
- Rastogi, A., Pospíšil, P. (2011): Spontaneous ultraweak photon emission imaging of oxidative metabolic processes in human skin: effect of molecular oxygen and antioxidant defense system. *Journal of Biomedical Optics*, 16: 1-9.
- Salin, M. L., Bridges, S. M. (1981): Chemiluminescence in wounded root tissue. Evidence for peroxidase involvement. *Plant Physiology*, 67: 43-46.
- Semwogerere, D., Weeks, E. R. (2012): Confocal microscopy. [online, cit. 15. 8. 2012]. Dostupné z: <http://www.physics.emory.edu/~weeks/lab/papers/ebbe05.pdf>.

- Sinha, R. K., Komenda, J., Knappová, J., Sedlářová, M., Pospíšil, P. (2011): Small CAB-like proteins prevent formation of singlet oxygen in the damaged photosystem II complex of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant, Cell and Environment*, 35: 806-818.
- Smékal, P. (1995): Optické zobrazení ve světelném mikroskopu. In: Experimentální metody biofyziky II. Světelná a elektronová mikroskopie, 15-17. Ostravská univerzita, Ostrava.
- Sedlářová, M., Luhová, L., Petřivalský, M., Lebeda, A. (2007): Localisation and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 607-616.
- Sedlářová, M., Petřivalský, M., Piterková, J., Luhová, L., Kočířová, J., Lebeda, A. (2011): Influence of nitric oxide and reactive oxygen species on development of lettuce downy mildew in *Lactuca* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 129: 267-280.
- Tsien, R. Y., Ernst, L., Waggoner, A. (2006): Fluorophores for Confocal Microscopy: Photophysics and Photochemistry. In: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 338-352. Springer Science+Business Media, New York.
- Tulpová, Z. (2011): Lokalizace RNOS konfokální mikroskopii. Bakalářská práce, Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Fernandez-Ocana, A., Chaki, M., Luque, F., Gomez-Rodriguez, M. V., Colmenero-Varea, P., Rio, L. A., Barroso, J. B. (2007): Nitrosative stress in plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 581: 453-461.
- Vandelle, E., Delledonne, M. (2008): Methods for nitric oxide detection during plant-pathogen interactions. *Methods in Enzymology*, 437: 575-594.
- Wendehenne, D., Durner, J., Klessing, D. F. (2004): Nitric oxide: A new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 449-455.
- Winkler, R., Guttenberger, H., Klima, H. (2009): Ultraweak and induced photon emission after wounding of plants. *Photochemistry and Photobiology*, 85: 962-965.
- Zhao, H., Joseph, J., Fales, H. M., Sokoloski, E. A., Levine, R. L., Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B (2005): Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 102: 5727-5732.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

cADPR	cyklická adenosindifosfát ribosa
CAT	katalasa
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein
GSNO	S-nitrosoglutathion
H₂DCF DA	2',7'-dichlorodihydrogenfluorescein diacetát
HR	hypersenzitivní reakce
NOS	synthasa oxidu dusnatého
NR	nitrátreduktasa
RONS	„reactive oxygen and nitrogen species“, aktivní formy kyslíku a dusíku
RNS	aktivní formy dusíku
ROS	aktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutasa
SOSG	Singlet Oxygen Sensor Green