

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**ÚLOHA REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU A DUSÍKU
PŘI KLÍČENÍ FYTOPATOGENNÍCH HUB**

Bakalářská práce

Anna Bobková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie pro vzdělávání – Geologie a ochrana životního
prostředí pro vzdělávání

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za odborného vedení doc. RNDr. Michaely Sedlářové, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Anna Bobková

Zpracování bakalářské práce bylo podpořeno projektem IGA UP PřF-2022-02

Poděkování

Děkuji doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. z Katedry botaniky PřF UP za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, poskytnutí studijních materiálů a čas věnovaný konzultacím. Především děkuji za odbornou pomoc během práce na experimentální části v laboratoři. Dále děkuji RNDr. Veronice Dumalasové, Ph.D. (VÚRV Praha-Ruzyně) za poskytnutí materiálu snětí. Děkuji také své rodině, manželovi a mně blízkým za podporu během studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Anna Bobková
Název práce	Reaktivní formy kyslíku a dusíku při klíčení fytopatogenních hub
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce pojednává o roli reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) při klíčení fytopatogenních hub, především snětí (<i>Ustilaginomycetes</i>). V teoretické části je též zmíněna problematika RONS v interakci rostlin s jejich houbovými patogeny a uvedeny metody studia RONS.</p> <p>Praktická část bakalářské práce byla věnována studiu procesu klíčení snětí na agaru a lokalizaci RONS. U druhu <i>Sporisorium destruens</i> byl hodnocen vliv teploty na vyklíčení chlamydospor, na délku klíčnicích vláken a pomocí fluorochromů H₂DCF-DA a DAF-FM DA lokalizovány RONS v klíčnicích strukturách snětí.</p>
Klíčová slova	reaktivní formy kyslíku (ROS), reaktivní formy dusíku (RNS), mikromycety, snětí (<i>Ustilaginomycetes</i>), fluorescenční mikroskopie, konfokální mikroskopie, <i>Sporisorium destruens</i>
Počet stran	80
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Anna Bobková
Title of thesis	Role of reactive oxygen and nitrogen species in germination of phytopathogenic fungi
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor	doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>This bachelor thesis deals with the role of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) in the germination of phytopathogenic fungi, especially smuts. Moreover, RONS in plant-fungal pathogens interaction and methods of RONS study are introduced.</p> <p>The experimental part of the bachelor thesis was devoted to study of smut germination on agar and localization of RONS. The effect of temperature on proportion of germinated <i>Sporisorium destruens</i> chlamydospores, and the length of germ tubes was evaluated as well as RONS were localized in smut structures using H₂DCF-DA and DAF-FM DA.</p>
Keywords	reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), micromycetes, smuts (Ustilaginomycetes), fluorescence microscopy, confocal microscopy, <i>Sporisorium destruens</i>
Number of pages	80
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	8
2	CÍLE PRÁCE	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU (RONS)	10
3.1.1	Metabolismus reaktivních forem kyslíku (ROS)	11
3.1.2	Metabolismus reaktivních forem dusíku (RNS)	15
3.1.3	Klíčení fytopatogenních hub a peronospor, patogeneze a RONS.....	17
3.2	CHARAKTERISTIKA MODELOVÝCH ORGANISMŮ	19
3.2.1	Fytopatogenní mikromycety	19
3.2.2	Proces klíčení mikromycet a penetrace hostitele	21
3.3	Metody detekce RONS.....	24
3.3.1	Metody detekce ROS	24
3.3.2	Metody detekce NO	24
3.4	Mikroskopie a další metody stanovení RONS.....	25
3.4.1	Světelná mikroskopie	25
3.4.2	Spektrofotometrie.....	28
3.4.3	EPR (Elektronová paramagnetická rezonance)	29
3.5	Histochemické a imunohistochemické metody značení RONS	29
3.5.1	Fluorochromy pro detekci ROS	30
3.5.2	Fluorochromy pro detekci NO.....	30
4	MATERIÁL A METODY	33
4.1	Sněti (Ustilaginomycetes).....	33
4.1.1	<i>Sporisorium destruens</i> (Schltld.) Vánky	36
4.1.2	<i>Tilletia caries</i> (DC.) Tul. & C. Tul.	37
4.1.3	<i>Ustilago nuda</i> (C.N. Jensen) Kellerm. & Swingle.....	38
4.2	Klíčení chlamydospor sněti na agaru na podložním skle	39

4.3	Histochemická lokalizace a mikroskopie RONS.....	40
5	VÝSLEDKY	41
5.1	Optimalizace podmínek klíčení snětí	41
5.2	Srovnání dynamiky klíčení u <i>S. destruens</i>	42
5.3	Lokalizace ROS a NO u <i>S. destruens</i>	45
5.4	Konfokální mikroskopie.....	48
6	DISKUSE.....	51
7	ZÁVĚR	57
8	DIDAKTICKÁ ČÁST – pracovní list	58
9	SEZNAM LITERATURY	67
10	WEBOVÉ ZDROJE	75
11	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	76
12	SEZNAM TABULEK	80

1 ÚVOD

Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) jsou významné molekuly, které se účastní mnoha fyziologických i patofyziologických procesů u eukaryot i prokaryot, od člověka a dalších živočichů přes rostliny až po houby a bakterie. Jejich role je méně probádána u fytopatogenních hub, především snětí, jimž je věnována tato BP. RONS jsou vysoce reaktivní molekuly, poškozující řadu biomolekul v buňkách, ale hrají i významnou signální roli při klíčení a růstu hub, i při jejich interakci s rostlinami. Na straně rostlin RONS představují molekuly zapojené do signalizace i samotných obranných mechanismů vůči původcům mykóz. Tato bakalářská práce se zaměřuje především na snětí (třídy Ustilaginomycetes a Exobasidiomycetes, pododdělení Ustilaginomycotina, oddělení Basidiomycota, říše Fungi), fakultativně biotrofní parazity napadající reprodukční i asimilační části rostlin, které přetvářejí na snětivá ložiska.

Snětí infikující obilniny způsobují značné ekonomické ztráty, protože napadené klasy nelze využít k potravinářskému zpracování, ani jako krmivo. K ochranným opatřením patří moření osiva a používání zdravého certifikovaného osiva. Mazlavé snětí se vyskytly i u zrn, které byly sklizeny z porostů založených z mořeného osiva, proto je důležité se věnovat hledání dalších alternativ ochrany rostlin.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši o roli reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) u hub i rostlin, nastínit metody jejich detekce (především histochemické barvení a mikroskopii), zpracovat obecnou charakteristiku modelových fytopatogenních mikromycet (snětí).

Cílem praktické části bakalářské práce bylo vyhodnotit klíčení chlamydospor snětí *Sporisorium destruens*, *Tilletia caries* a *Ustilago nuda* na agaru na podložních sklech v různých teplotních režimech a následně fluorescenčně značit RONS pro pozorování fluorescenčním a konfokálním mikroskopem. Ze tří druhů snětí byl pro podrobnější experimenty vybrán druh *Sporisorium destruens*, původce snětivosti prosa, u kterého byl stanoven podíl vyklíčených spor, změřeny délky klíčnicích vláken a lokalizovány RONS. Jednotlivé parametry se lišily u variant inkubace ve fytotronech s teplotními režimy 15/10 °C či 20/17 °C (12/12 h světlo/tma) a v laboratoři s teplotou 22-25 °C.

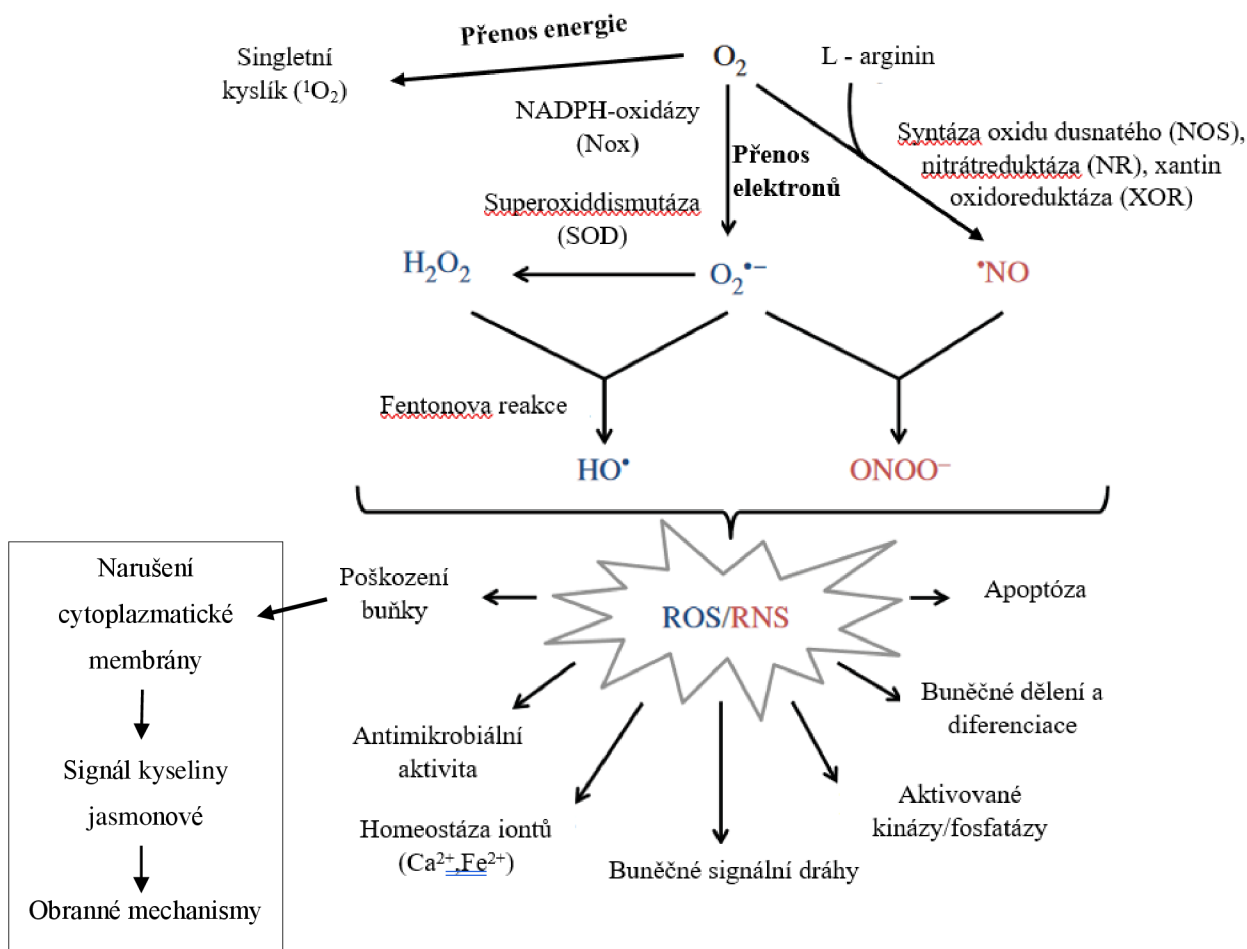
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU (RONS)

Reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS), souhrnně označované reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS), jsou důležité signální molekuly, účastníci se metabolismu v buňkách všech živých organismů. Ovlivňují fyziologické a patofyziologické procesy také ve fytopatogenních houbách a hrají významnou roli v jejich interakci s rostlinami (Heller a Tudzynski 2011, Marschall a Tudzynski 2016, Moné et al. 2014, Zhang et al. 2020). Rovnováha mezi anabolismem a katabolismem RONS, nazývána redoxní homeostáza, je kontrolována enzymovými a neenzymovými systémy. Její narušení, nadprodukcí či blokací odbourávání RONS při působení stresových faktorů, může vést až k oxidačnímu stresu, při kterém jsou poškozovány nukleové kyseliny, proteiny, sacharidy, lipidy, a tím integrita buňky (Moné et al. 2014).

U rostlin různé stresové faktory (např. napadení patogeny, sucho, nízká teplota, působení kyseliny abscisové, xenobiotik) vyvolávají akumulaci ROS, ale i rozpustných cukrů, které byly navrženy jako součást adaptivních obranných mechanismů, i mechanismů řízení fotosyntetické aktivity (Couée et al. 2006).

ROS jsou produkovány především při buněčném dýchání v mitochondriích, u rostlin při fotosyntéze v chloroplastech, i v řadě dalších (především membránových) kompartmentech buňky, přičemž hlavní úlohu hrají NADPH oxidázy (Nox). Oxid dusnatý (NO), ze kterého pak vznikají další RNS, je syntetizován v menší míře v reakcích nezávislých na enzymové katalýze, hlavní část NO však vzniká činností enzymů, hlavně syntázou oxidu dusnatého (NOS) (dobře byla činnost enzymu popsána u živočichů, kde se jedná o téměř výhradní zdroj), v rostlinách z velké části nitrát reduktázou (NR), či xantin oxidoreduktázou (XOR) (Obr. 1) (Moné et al. 2014). Metabolismus a zejména vznik NO u hub není zatím zcela objasněn, podobně jako u rostlin. Genomy studovaných druhů hub neobsahují lokusy NOS savčího typu. V metabolismu dusíku u hub byla popsána denitrifikace a fermentace amoniaku, což jsou procesy, které se spouštějí za hypoxie a vedou i ke vzniku NO. Bylo zjištěno, že do denitrifikace jsou zapojeny enzymy nitrát reduktáza (NR), nitrit reduktáza (NiR) a reduktáza oxidu dusnatého (NOR), které přeměňují dusičnany na dusitany a dále na oxid dusný (N₂O). Proces přeměny dusitanů na NO zůstává však dále neobjasněn (Cánovas et al. 2016).



Obrázek 1: Původ reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) a jejich pleiotropní účinky na buňky. NADPH-oxidázy (Nox) katalyzují vznik superoxidového anionu ($O_2^{\bullet-}$), který je dále přeměněn na peroxid vodíku (H_2O_2) enzymem superoxiddismutázou (SOD). H_2O_2 může dále reagovat s Fe^{2+} za vzniku hydroxylového radikálu (HO^\bullet) tzv. Fentonovou reakcí. Oxid dusnatý ($\bullet NO$) je syntetizován z L-argininu působením NO syntázy (NOS), nitrát reduktázou (NR) či xantin oxidoreduktázou (XOR) a může dále reagovat s $O_2^{\bullet-}$ za vzniku peroxydusitanu ($ONOO^-$) (upraveno podle: Moné et al. 2014).

RONS hrají zásadní roli v signálních a regulačních drahách všech organismů. Klíčení, orientovaný růst a aktivní penetrace vláknitých fytopatogenů, jako jsou oomycety a houby, do pletiv hostitele zahrnují endogenní produkci NO a ROS (Turrión-Gomez a Benito 2011), stejně jako v buňkách rostlin při obranných reakcích (Heller a Tudzyński 2011).

3.1.1 Metabolismus reaktivních forem kyslíku (ROS)

Úloha kyslíku v aerobních organismech je ambivalentní, molekulární kyslík je nezbytný pro dýchání, ale na druhé straně jsou jeho radikály vysoce reaktivní a mohou poškozovat makromolekuly (Marschall a Tudzyński 2016). Ačkoli je kyslík ze své podstaty slabý reaktant, má tendenci snadno vytvářet radikály, a to buď reakcemi přenosu energie, nebo reakcemi přenosu elektronů za vzniku neúplně redukovaných

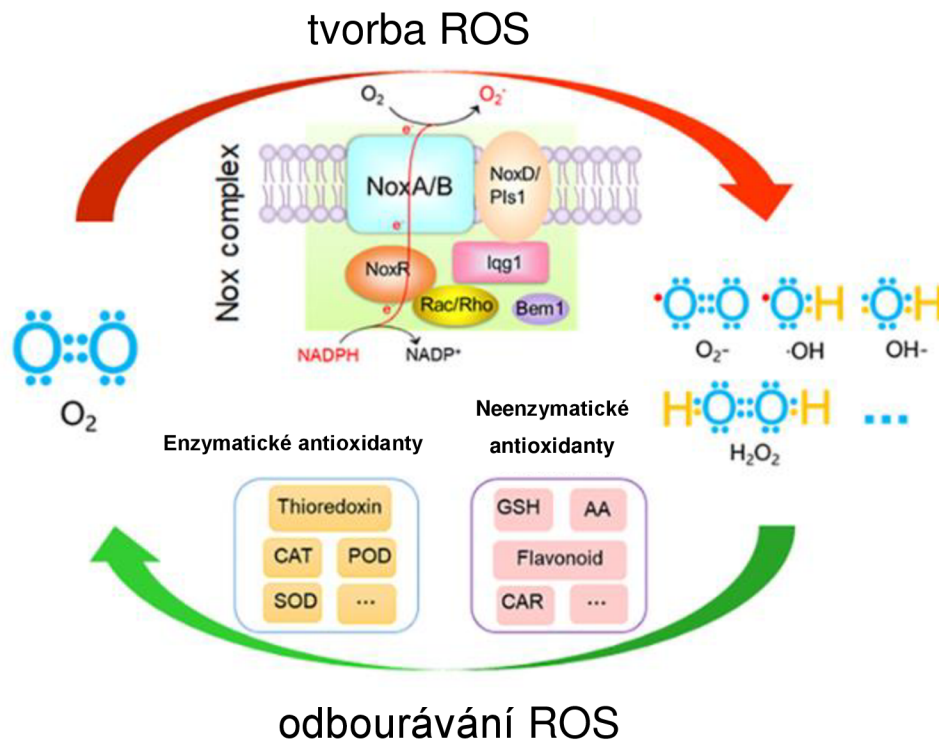
reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou vysoce účinnými oxidanty. Přenos energie vede ke vzniku singletního kyslíku ($^1\text{O}_2$), zatímco přenos elektronů vede k postupné redukci na superoxidový anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) (Obr. 1 a Tab. 1) (Heller a Tudzynski 2011). ROS způsobují poškození molekul, jako je inaktivace enzymů, mutace DNA a RNA, peroxidace lipidů, oxidace proteinů a sacharidů, což může vést ke stárnutí organismu či lokalizované buněčné smrti. Zvýšená koncentrace ROS je také spojena s procesem hypersenzitivní reakce (HR), hlavním obranným mechanismem v obraně rostlin proti biotrofům, kdy po rozpoznání patogenu dochází k aktivnímu narušení plazmatické membrány NAD hydrolázou a spuštění buněčné smrti (Harris et al. 2020; Ma et al. 2020). Pokud k HR dojde záhy po penetraci biotrofním patogenem, je tato obrana velmi účinná (Heller a Tudzynski 2011, Piterková et al. 2005). V buňce rostlin jsou organely s nejvyšší hladinou ROS chloroplasty, peroxizomy, mitochondrie a endoplazmatické retikulum (ER) (Marschall a Tudzynski 2016).

Tabulka 1: Reaktivní formy kyslíku. Jejich označení a chemická struktura (převzato z: Piterková et al. 2005).

Sloučenina	Zkrácené značení	Struktura
Singletní kyslík	$^1\text{O}_2$	$\text{O}-\text{O}:$
Superoxidový anion-radikál	$\text{O}_2^{\cdot-}$	$[\ddot{\text{O}}=\ddot{\text{O}}:]^-$
Hydroxylový radikál	OH^{\cdot}	$\ddot{\text{O}}-\text{H}$
Hydroxylový ion	OH^-	$\ddot{\text{O}}-\text{H}$
Perhydroxylový radikál	$\text{O}_2\text{H}^{\cdot}$	$\ddot{\text{O}}=\ddot{\text{O}}-\text{H}$
Peroxid vodíku	H_2O_2	$\text{H}-\ddot{\text{O}}-\ddot{\text{O}}-\text{H}$

Za účelem udržení rovnováhy redoxního stavu si fytopatogenní houby, stejně jako další prokaryotní i eukaryotní organismy, vyvinuly soubor enzymových i neenzymových mechanismů produkujících a rozkládajících ROS (Obr. 2) (Zhang et al. 2020). Při stresu rostlin je s touto nerovnováhou tvorby/rozkladu ROS v rostlinných buňkách spojena také změna metabolismu oxidu dusnatého a jeho odvozených molekul (RNS). Metabolismus ROS a RNS spolu úzce souvisí, proto bychom měli ROS i RNS (souhrnně RONS) posuzovat společně (Corpas et al. 2021).

Nejdůležitějším enzymatickým systémem tvorby ROS je tzv. NADPH-dependentní oxidázový komplex neboli NADPH-oxidasa (Nox) (Heller a Tudzynski 2011, Zhang et al. 2020), jedná se o flavocytochromy, jejichž struktura a funkce je u eukaryot konzervativní, od řas přes houby po člověka se liší pouze drobně. Jak demonstruje Obr. 2, na metabolismu jednotlivých molekul ROS se dále podílejí aminoxidáza (AOX) a peroxidasy (POD), důležitými enzymy v regulaci hladin ROS jsou i superoxidodismutáza (SOD), kataláza (CAT) a thioredoxiny (TXN) (Piterková et al. 2005). Nox komplexy se skládají z podjednotek a obvykle jsou lokalizovány na cytoplazmatické membráně nebo membráně endoplazmatického retikula. Přenosem elektronů přes membrány redukují molekulu kyslíku na superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$) (Marschall a Tudzynski 2016, Zhang et al. 2020). U vláknitých hub byly známy dvě podrodiny Nox, Nox1 (nebo také NoxA) a Nox2 (NoxB), které jsou homology gp91phox u savců. U některých vřeckovýtusých hub, jako je *Pyricularia oryzae* (syn. *Magnaporthe oryzae*) (Pyriculariaceae, Sordariomycetes, Ascomycota), *Triangularia anserina* (syn. *Podospora anserina*) (Podosporaceae, Sordariomycetes, Ascomycota) a *Aspergillus terreus* (Aspergillaceae, Eurotiomycetes, Ascomycota), byla charakterizována třetí Nox (NoxC), která obsahuje předpokládané EF-hand motivy vázající vápník, což je rys lidské Nox5 a rostlinných homologů Nox (Heller a Tudzynski 2011, Segal 2016, Zhang et al. 2020). Pro funkci komplexu Nox je nutný adaptorový protein a NoxD, který je homologem adaptorového proteinu p22phox u savců; byl identifikován u některých fytopatogenních hub, jako jsou *Botrytis cinerea* (Sclerotiniaceae, Leotiomycetes, Ascomycota) a již zmíněné *T. anserina* a *P. oryzae* (Segal 2016, Zhang et al. 2020). U *B. cinerea* bylo zjištěno, že Nox1 a Nox2 hrají při infekci rostlin rozdílnou roli. Enzym Nox2 je nutný pro penetraci patogenu do hostitele, zatímco enzym Nox1 je potřebný pro postinfekční růst hyf. Enzym Nox1 navíc interaguje s NoxD a ztráta funkce NoxD u *B. cinerea* snižuje míru kolonizace hostitele (Segal a Wilson 2018). U další modelové houby *Neurospora crassa* (Sordariaceae, Sordariomycetes, Ascomycota) byla Nox-1 lokalizována ve vakuolách a plazmatické membráně (Cano-Domínguez et al., 2019). Delece genů Nox u některých hub nesnižuje hladinu ROS, ale naopak zvyšuje akumulaci intracelulárních ROS. To naznačuje, že kromě komplexu Nox existují ve fytopatogenních houbách další alternativní systémy produkce ROS (Zhang et al. 2020).



Obrázek 2: Mechanismy tvorby a rozkladu ROS u fytopatogenních hub (upraveno podle: Zhang et al. 2020).

Komplexy Nox u vláknitých hub produkují ROS důležité pro udržení turgoru při klíčení spor, růstu hyf a diferenciaci infekčních struktur (Segal 2016). Rostliny pro svoji obranu vyvinuly vrozené imunitní mechanismy, které rozpoznávají přítomnost patogenů prostřednictvím receptorů v rámci imunity spouštěné patogeny (PTI) a imunity spouštěné efekty (ETI). Předpokládalo se, že lokální nadprodukce ROS má přímé antimikrobiální účinky proti fytopatogenům. Nejsou však produkovány v takovém množství, aby tyto patogeny usmrtily. Místo toho jsou spíše signálními molekulami v obranné reakci rostlin (Segal a Wilson 2018). Podle Segala a Wilsona (2018) cílená endogenní produkce ROS hraje důležitou roli v klíčových vývojových procesech různých fytopatogenů a nedostatek tvorby ROS u hub může ovlivnit jejich virulenci, či v širším slova smyslu typ symbiózy (na škále od mutualismu po parazitismus) s rostlinami.

Houby, stejně jako ostatní organismy, mají antioxidační systémy pro odstraňování ROS, které neutralizují nadměrné koncentrace ROS pocházející z fyziologických procesů nebo v důsledku stresů (Zhang et al. 2020). Neenzymové antioxidační systémy se obvykle skládají z malých rozpustných molekul, které jsou oxidovány ROS, čímž je odstraňují. Patří mezi ně hlavní buněčný redoxní pufr glutathion (GSH), ale také další

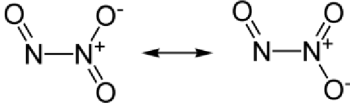
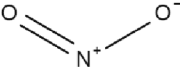
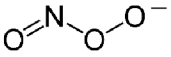
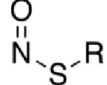
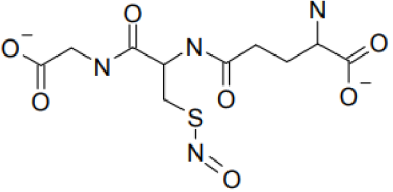
sloučeniny, jako jsou fytochelatiny, kyselina askorbová (AA), polyaminy, flavonoidy a karotenoidy. Enzymatické mechanismy odstraňování ROS zahrnují superoxiddismutázu (SOD) a různé peroxidázy (POD, POX), jako je glutathionperoxidáza (GPX), peroxiredoxiny (PRDXs) a kataláza (CAT) (Heller a Tudzynski 2011).

Ve zkratce lze říci, že se lokální změny hladin ROS u hub podílejí na všech důležitých procesech ontogeneze: od jejich klíčení, přes růst (u fytopatogenů penetraci, signalizaci s hostitelem, tvorbu infekčních struktur pro kolonizaci rostlin) až po tvorbu konidií, tzv. „conidial anastomosis tubes“ či produkci sklerocií (Zhang et al. 2020).

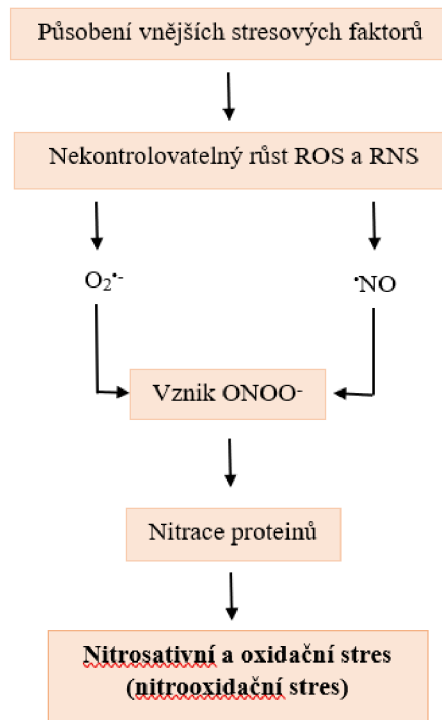
3.1.2 Metabolismus reaktivních forem dusíku (RNS)

Mechanismy tvorby oxidu dusnatého (NO) u hub nebyly ještě plně objasněny, zapojeny jsou pravděpodobně oxidační i redukční způsoby. Lze předpokládat převážně tvorbu enzymatickou, katalyzovanou enzymy analogickými s NOS či NR, v menší míře neenzymatickou cestou (Jedelská et al. 2021). RNS vznikají reakcí volného radikálu oxidu dusnatého (NO) s anorganickými nebo organickými sloučeninami. Významnou roli v metabolismu rostlin i hub hrají oxid dusitý (N_2O_3), radikál oxidu dusičitého (NO_2^*), peroxydusitan ($ONOO^-$), S-nitrosothioly (RSNO), S-nitrosoglutathion (GSNO) (Tab. 2). Peroxydusitan ($ONOO^-$) vzniká reakcí superoxidového anionradikálu (O_2^*) s radikálem oxidu dusnatého (NO^*) (Obr. 1 a 3) (Corpas et al. 2021, Corpas a Barroso 2013), i redukcí nitrosyldioxylového radikálu ($ONOO^*$) superoxidem nebo reakcí nitrosylového aniontu s molekulárním kyslíkem (Hnízdová et al. 2009). Na regulaci redoxního stavu buňky i hladin NO má vliv glutathion. Poměr redukovaného a oxidovaného glutathionu (GSH/GSSG) je považován za účinný ukazatel fyziologického stavu buňky. Obvykle se tento poměr snižuje v podmínkách oxidačního stresu (Corpas a Barroso 2013). Reakcí tripeptidu glutathionu (GSH, γ -Glu-Cys-Gly) s RNS vzniká v aerobním prostředí S-nitrosoglutathion (GSNO), který má klíčovou funkci při udržování fyziologické hladiny celkových nízko- i vysokomolekulárních S-nitrosothiolů v buňkách, je transportní formou NO (Jahnová et al., 2013) a hraje důležitou roli při obranných reakcích rostlin (Kubienová et al. 2013). Za stresových podmínek mohou RNS způsobit nitrosativní stres, vedoucí ke změnám proteinů, viz níže (Corpas a Barroso 2013).

Tabulka 2: Reaktivní formy dusíku. Jejich označení a chemická struktura.

Sloučenina	Zkrácené značení	Struktura
Oxid dusnatý (radikál)	NO [•]	•N=O
Oxid dusitý	N ₂ O ₃	
Oxid dusičitý (radikál)	NO ₂ [•]	
Peroxydusitan	ONOO ⁻	
S-nitrosothioly	RSNO	
S-nitrosogluthation	GSNO	

Oxid dusnatý patří ke klíčovým složkám v procesu rozpoznání patogenů a následné aktivace lokálních a systémových obranných mechanismů rostlin. NO interaguje se signálními drahami ROS a fytohormonů, jeho biologická aktivita je spolu s dalšími RNS spojena s buněčnými redoxními změnami a posttranslačními modifikacemi proteinů, S-nitrosací cysteinových thiolů (Jahnová et al. 2013) a nitrací tyrosinu (Hnízdová et al. 2009). Zvýšené hladiny RNS v rostlinách za stresových podmínek, včetně infekce patogeny, jsou výsledkem časově a prostorově kontrolované tvorby NO a ROS, vyvolané aktivací příslušných enzymových systémů lokalizovaných v plazmatické membráně nebo uvnitř rostlinných buněk (Sedlářová et al. 2016, Corpas et al. 2021). Nadprodukce ROS i RNS může vyvolat nárůst hladiny peroxidusitanu, který zprostředkovává nitraci cílových proteinů (Obr. 3) (Corpas et al. 2021).



Obrázek 3: Sled událostí, který vyvolává nitrooxidační stres jako reakci na stresové podmínky (upraveno podle: Corpas et al. 2021).

NO je u rostlin nezbytný pro spuštění lokálních obranných mechanismů, např. hypersenzitivní reakce (HR) (Lai et al. 2014, Schlicht a Kombrink 2013, Turrion-Gomez a Benito 2011), modulace genové exprese prostřednictvím transkripčních faktorů a syntéza proteinů souvisejících s patogenezí (PR). Způsoby působení NO během HR zahrnují smrt hostitelských buněk vyvolanou H_2O_2 a realizovanou ROS (Sedlářová et al. 2016). NO sehrává také nemalou roli v nástupu systémové získané rezistence (Lai et al. 2014). Lze předpokládat, že NO tvořený rostlinami a difundující do okolí může do jisté míry ovlivňovat vývoj hub. U *Colletotrichum coccodes* (Glomerellaceae, Sordariomycetes, Ascomycota), původce antraknózy rajčat, experimentální nárůst exogenního NO zpozdil klíčení spor, naopak pokles koncentrace NO klíčení spor stimuloval (Turrion-Gomez a Benito 2011).

3.1.3 Klíčení fytopatogenních hub a peronospor, patogeneze a RONS

RONS se podílejí jak na vývojových procesech, tak na virulenci houbových patogenů. Regulují tvorbu disperzních částic, což jsou u většiny hub spory, u vývojově starších sporangia, a tvorbu forem sloužících k přežití nepříznivých podmínek, jako sklerocia u askomycet (Zhang et al. 2020). ROS hrají klíčovou roli i při komunikaci mezi houbovými patogeny s jejich hostiteli. Jakmile se spory mikromycet přichytí na

rostlinné orgány, jsou schopny za příznivých podmínek vyklíčit. Klíčení je stimulováno kutikulárními vosky (Marschall a Tudzynski 2016) a následováno průnikem do pletiv, tzv. penetrací. Houby mohou buněčnou stěnu narušit sekrecí enzymů a ROS (především peroxidu vodíku pro rozvolnění vazeb v celulóze), čímž usnadňují průnik specializovaných infekčních struktur (mohou se lišit u jednotlivých skupin mikromycet) do rostlinných pletiv (Sedlářová et al. 2021). Po penetraci rostlinné buňky se kolem místa infekce nahromadí velké množství ROS původem z poškozené buňky, ale i ze špičky penetrační hyfy (Zhang et al. 2020). Prvním obranným mechanismem rostlin je oxidační vzplanutí, tedy masivní lokální produkce ROS na rozhraní mezi rostlinou a houbou. Tato strategie je účinná pouze proti biotrofním patogenům (např. peronospory, padlí, tafriny, rzi, sněti), nekrotrofové (např. *Botrytis cinerea*) jsou na oxidačním vzplanutí a smrti buněk závislí.

Řada experimentů sledovala vývoj fytopatogenů ve vztahu k ROS. Bylo zjištěno, že mikromolární koncentrace extracelulárního H_2O_2 inhibují klíčení spor řady houbových patogenů *in vitro*. Koncentrace 0,1 mM H_2O_2 indukovala >95% inhibici růstu *Phytophthora infestans* (Peronosporaceae, Oomycota, Chromista). U *Zymoseptoria tritici* (Mycosphaerellaceae, Dothideomycetes, Ascomycota) 5 mM H_2O_2 inhibuje sporulaci 4denních kultur, zatímco u 16denních kultur je zapotřebí koncentrace cca 50 mM. To naznačuje schopnost patogenu tolerovat H_2O_2 během různých fází jeho životního cyklu. Je však obtížné určit, které koncentrace H_2O_2 jsou skutečně účinné *in vivo* v rostlinách, protože nezbytná manipulace s pletivy rostlin při pokusech může sama o sobě vyvolat produkci ROS a/nebo antioxidantů (Shetty et al. 2008).

Oxid dusnatý se také podílí na vývoji mycelia a různých morfologických struktur houbových organismů, včetně nepohlavních a pohlavních plodnic, sporangií, konidií a pro patogenezi nezbytných apresorií a penetračních hyf (Sedlářová, ústní sdělení 2022). Intenzita tvorby NO a její lokalizace je však závislá na vývojovém stadiu patogenu. NO hraje mimo jiné důležitou roli i v procesu klíčení spor. Během klíčení spor *Colletotrichum coccodes* byla pozorována tvorba NO. Exogenní NO klíčení zpomalilo, naopak snížení hladiny NO klíčení urychlilo. Určitý práh NO by tak mohl řídit dobu, kdy spory ukončují stádium dormance a začínají klíčit (Arasimowicz-Jelonek a Floryszak-Wieczorek 2016). Intenzita signálu NO byla studována i u plísně salátové (*Bremia lactucae*), kde byl zjištěn silný signál NO ve špičce klíčícího vlákna a v apresoriu, což je dobrým předpokladem pro průnik do pletiv hostitele. Dále byl

pozorován již slabší signál ve vyvíjejících se primárních a sekundárních vezikulech (Sedlářová et al. 2011). V dalších studiích bylo dokázáno, že NO inhiboval růst mycelia, klíčení spor a sporulaci tří rostlinných patogenních hub (*Aspergillus niger*, *Monilinia fructicola* a *Penicillium italicum*) v podmínkách *in vitro*, což naznačuje přímý účinek exogenního NO na metabolismus hub. Dále byla zjištěna přítomnost NO v hyfách a sporách *Botrytis cinerea* za použití fluorochromu DAF2-DA (Arasimowicz-Jelonek a Floryszak-Wieczorek 2016). Lai et al. (2014) zjistili, že vysoká koncentrace NO může zřetelně zpomalit klíčení spor a významně snížit virulenci *Penicillium expansum* vůči hostitelskému ovoci.

Produkce RONS tedy hraje významnou roli během infekce rostlin patogeny. Mnoho hub a oomycetů vylučuje RONS nebo efektorové proteiny, které jsou schopny zasahovat do obranného mechanismu rostliny a ovlivňovat signální dráhy, včetně těch zapojených do metabolismu RONS (Sedlářová et al. 2021). Náchylnost rostliny a rozvoj choroby často souvisí s narušenou produkcí ROS (Marschall a Tudzynski 2016).

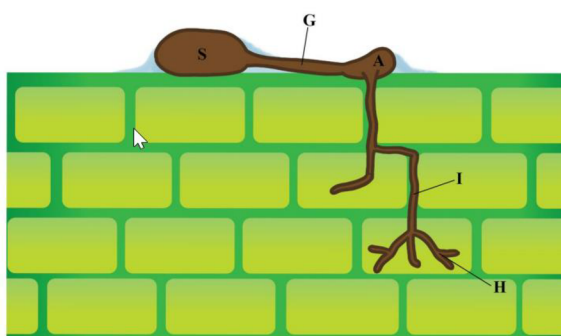
3.2 CHARAKTERISTIKA MODELOVÝCH ORGANISMŮ

3.2.1 Fytopatogenní mikromycety

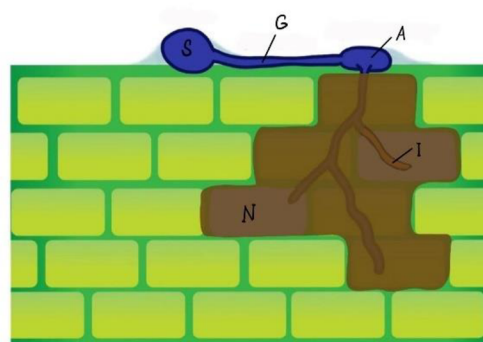
Mikromycety neboli mikroskopické houby mohou být z hlediska morfologie rozlišovány na jednobuněčné (kvasinky) či vícebuněčné vláknité (plísně). Z pohledu taxonomie jsou to zástupci říše Fungi, především podříší Chytridiomyceta, Mucoromyceta a Dikaryomyceta. U řady taxonů především vřekovýtrusých a stopkovýtrusých hub (podříše Dikaryomyceta) pak rozlišujeme morfologicky odlišnou formu sexuální (teleomorfa) a asexuální (anamorfa), souhrnně označované jako holomorfa. Situaci komplikuje i to, že díky morfologické podobnosti (vláknité mycelium) někteří fytopatologové mezi mikromycety tradičně řadí i zástupce oomycetů Peronosporomycota (vývojová větev SAR). Z hlediska výživy se jedná o organismy heterotrofní, saprofytické, mutualistické nebo parazitické. Základ těla vláknitých mikromycet tvoří myceliální stélka (mycelium, thallus), která je složená z houbových vláken (hyf) (Ostrý 1998). Hyfy spolu s nepohlavními a pohlavními reprodukčními orgány představují morfologické znaky využívané spolu s molekulárními,

biochemickými a růstovými charakteristikami při určování a klasifikaci mikroskopických hub (tzv. polyfázický přístup k taxonomii) (Sedlářová, ústní sdělení 2022).

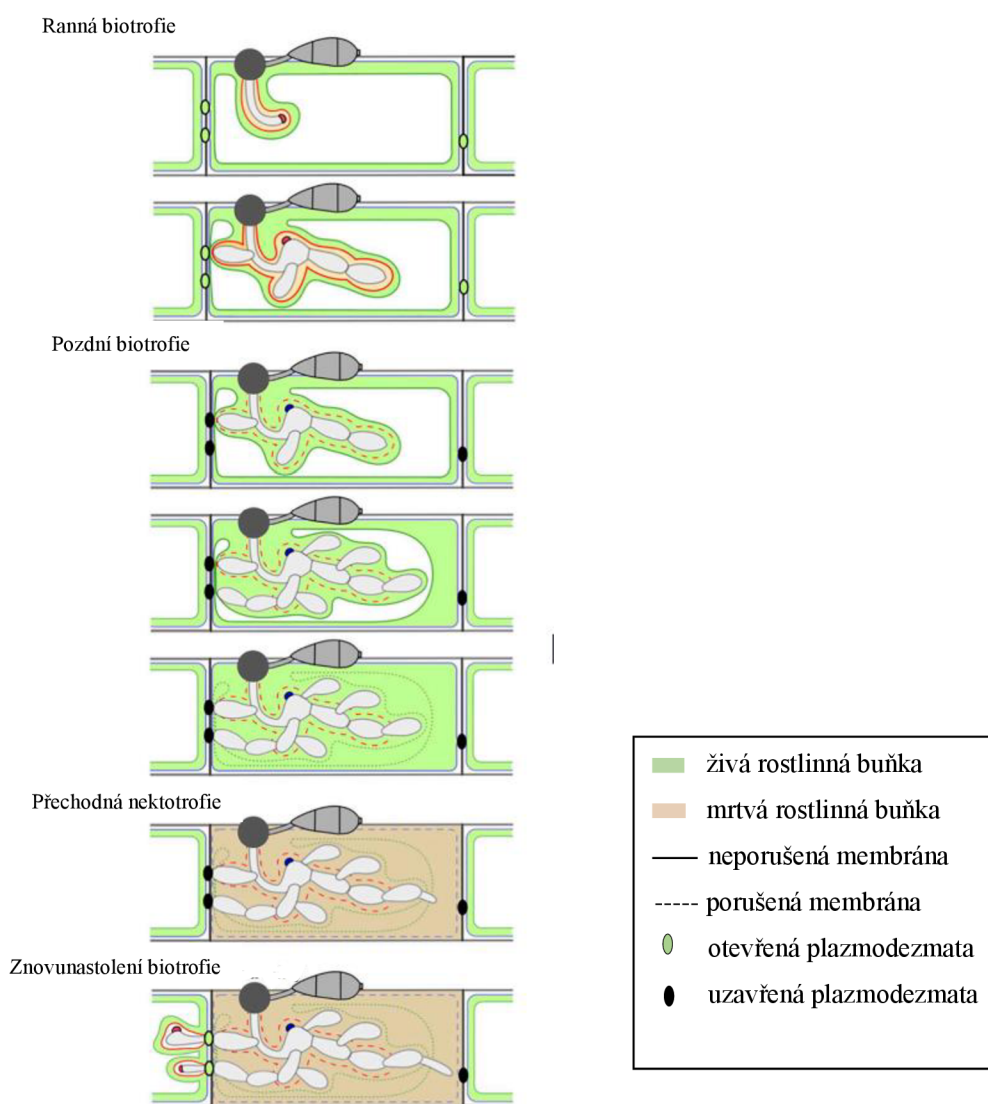
Z hlediska životní strategie dělíme fytopatogenní houby na biotrofy, hemibiotrofy a nekrotrofy. Biotrofové jsou závislí na živých buňkách hostitelských rostlin, oproti tomu nekrotrofové parazitují na odumřelých rostlinných pletivech, které si nejprve účinnými toxiny usmrtí (Obr. 4 a 5). Typickým příkladem nekrotrofního patogenu je např. *Botrytis cinerea* (Heller a Tudzynski 2011). Biotrofy (až na výjimky) proto nelze pěstovat na živných médiích. Ony výjimky tvoří sněti. Biotrofy dělíme na fakultativní a biotrofní. Fakultativní biotrofové (např. sněti) mohou, po skončení biotrofní fáze, která tvoří podstatnou část jejich životního cyklu, růst na mrtvém materiálu, mají schopnost tzv. saprotrofie. Obligátní biotrofové schopnost saprotrofie ztratili a jsou tedy nutričně zcela odkázáni na živé buňky hostitelské rostliny (Sedlářová et al. 2021). Příkladem biotrofního fytopatogenu je *Ustilago maydis* (Heller a Tudzynski 2011). Účinnou obranou k zamezení šíření biotrofního patogenu je hypersenzitivní reakce (HR) hostitele (Zhang et al. 2020). Hemibiotrofové zahajují proces infekce jako biotrofové, následně však mění expresi genů a kontrolovaně přecházejí do fáze nekrotrofní (Obr. 6). Asi nejznámějším příkladem hemibiotrofního patogenu je původce plísně bramboru *Phytophthora infestans* (Sedlářová et al. 2021), dalším příkladem může být *Magnaporthe oryzae* (Obr. 6) (Jones et al. 2021).



Obrázek 4: Infekce rostliny biotrofním patogenem. S – spora, G – klíční vlákno, A – apresorium, I – infekční hyfa, H – haustorium (převzato z: Chethana et al. 2021).



Obrázek 5: Infekce rostliny nekrotrofním patogenem. S – spora, G – klíční vlákno, A – apresorium, I – infekční hyfa, N – nekrotická (odumřelá) tkáň (upraveno podle: Chethana et al. 2021).



Obrázek 6: Průběh infekce buněk rýže hemibiotrofní houbou *Magnaporthe oryzae* (upraveno podle: Jones et al. 2021).

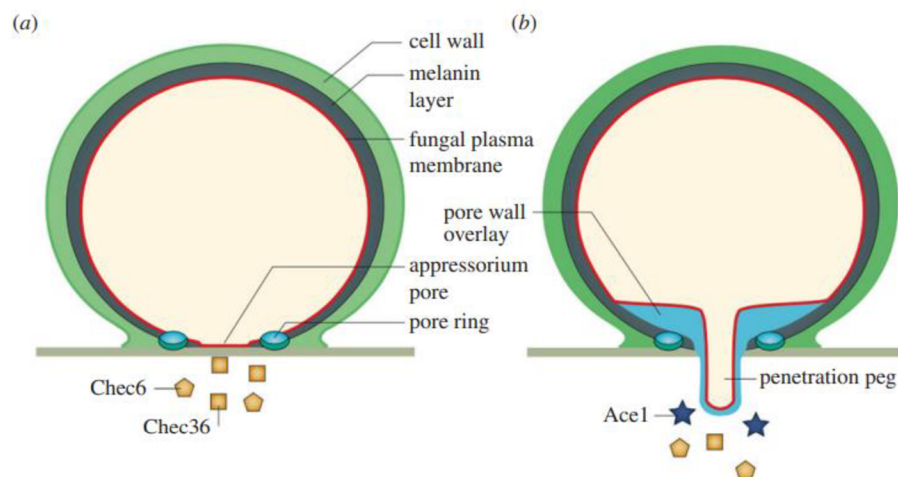
Fytopatogenní mikromycety způsobují choroby kulturních a planě rostoucích rostlin. Napadají nadzemní, ale i podzemní části rostliny (Sedlářová et al. 2021).

3.2.2 Proces klíčení mikromycet a penetrace hostitele

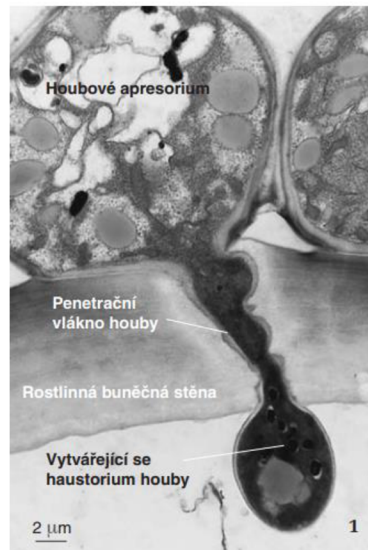
Spory mikromycet buď klíčí hned, nebo podstoupí období klidu (dormance), což záleží na fyziologickém nastavení taxonu a podmínkách prostředí. Dormanci dělíme na konstituční a exogenní. O konstituční dormanci se jedná, pokud jsou všechny vnější podmínky pro klíčení spory příznivé, ale spora i přesto neklíčí. Druhým typem je dormance exogenní, kdy spora přečkává nepříznivé podmínky, než nastanou podmínky specifické pro klíčení (teplota, pH, obsah vody, tlak O₂, atd.) (Klán 1989).

Zralá spora po přenesení na agarovou půdu nejprve nepatrně zvětšuje svůj objem (bobtná) a připravuje se tak na fázi klíčení (zvýší se metabolismus, narůstá počet mitochondrií atd.). Následně nabobtnaná spora praskne a vyroste z ní jedno nebo několik klíčících vláken (jemných hyf) a nastane dělení jádra. Mladá hyfa roste pouze apikálně, později se začíná větvit a lineární růst se mění na všesměrný po celém obvodu kolonie, ta se postupně zvětšuje (Klán 1989).

Tvorba klíčících vláken, růst hyf, pronikání vláknitých hub do kutikuly a buněčné stěny rostlin a další procesy spojené s klíčením spor nebo pylu vyžadují intracelulární turgor a aktivní účast Nox. Ačkoli se zdá, že hlavní hnací silou pro růst hyf je právě turgor, bylo zjištěno, že svou roli v tomto procesu hraje i biogeneze stěn. Tvorbu nové buněčné stěny zajišťuje intracelulární organela zvaná „spitzenkörper“, která je součástí endomembránového systému hub. Tato organela zadržuje a uvolňuje vezikuly, které přijímá z Golgiho aparátu. Tyto vezikuly putují k buněčné membráně a procesem exocytózy uvolňují svůj obsah mimo buňku, odkud pak může být transportován tam, kde je ho zapotřebí. Membrány vezikul tak přispívají k růstu buněčné membrány. „Spitzenkörper“ se pohybuje podél konce hyfového vlákna a vytváří apikální růst a větvení. Aktivní účast Nox je důležitá pro vývoj apresorií. Apresorium je zploštělý, ztluštělý konec hyfy, který se vytváří u některých parazitických hub a usnadňuje průnik penetračního hrotu kutikulou hostitelské rostliny (Obr. 7 a 8) (Segal 2016).



Obrázek 7: Znárodnění procesu pronikání vláknitých hub do rostlinného pletiva. (a) přichycení apresoria k povrchu listu (b) osmotický tak vlačuje penetrační hrot houby do rostlinného pletiva (převzato ze: Segal 2016).



Obrázek 8: Apesorium houby *Magnaporthe oryzae* pronikající přes buněčnou stěnu do rostlinné buňky (převzato ze: Sabol a Pilátová 2020).

Různé druhy mikromycet, včetně snětí, mohou napadat rostliny v různém stádiu vývoje a mohou být specializovány na různé jejich orgány. Např. *Sporisorium reilianum* (dříve pod názvem *Sphacelotheca reiliana*) způsobuje primární infekci klíčících rostlin kukuřice přes kořeny; prašné snětí *U. nuda* a *U. tritici* napadají rostliny v období kvetení - teliospory přenesené větrem z již napadených klasů dopadají na blizny kvetoucích klasů, kde klíčí. „Infekční vlákno prorůstá čnělkou do semeníku. Mycelium zůstává ve štítku embrya v dormantní fázi až do doby klíčení obilky, kdy se houba začíná vyvíjet zároveň s rostlinou, prorůstá jejími pletivy a nakonec vytváří snětivé klasy“ (Dumalasová 2017). Mírně odlišný životní cyklus má sněť krytá ječná (*U. hordei*). Teliospory této snětí se také ze snětivých klasů dostávají do klasů kvetoucích, ale infekční hyfy nepronikají dovnitř do obilky. V dormantní fázi přečkávají pod semennými obaly a čekají, než začne obilka klíčit. Případně může infekce vzniknout z teliospor ulpívajících na povrchu obilek (Dumalasová 2017).

Rozdílné strategie klíčení najdeme i v rámci mazlavých snětí rodu *Tilletia*. *T. controversa* vyžaduje pro vyklíčení teliospor po dobu 3-6 týdnů nižší teploty v rozmezí -2 °C až 15 °C, optimum je 3-8 °C. Infekční proces tohoto druhu je stimulován světlem. Naopak *T. caries* a *T. laevis* klíčí nejrychleji při 18-20 °C a nejstejněměrněji při 14-16 °C. Při 15 °C trvá jejich klíčení 4-5 dnů, při 5 °C pak 10-14 dnů (Dumalasová 2017).

3.3 Metody detekce RONS

Stanovení produkce RONS nám umožňují různé přímé a nepřímé analytické metody, jako např. spektrofotometrie, elektronová paramagnetická rezonance, Griessova (diazotační) reakce, oxyhemoglobinový test, hmotnostní spektrometrie, NO elektrody, histochemické barvení s následnou mikroskopickou detekcí a další. Pokud lze houbové organismy kultivovat *in vitro* na umělých živných půdách, ať už tekutých nebo pevných, je studium RONS jednodušší. V případě biotrofů je nutná kultivace *in vivo* přímo na živých pletivech hostitelských rostlin a odlišení zdrojů RONS je v tomto případě složitější.

3.3.1 Metody detekce ROS

Mezi základní metody detekce ROS patří metody založené na histochemickém barvení (blíže popsáno v kapitole 3.5.1), fluorescenci, luminiscenci, elektronové paramagnetické rezonanci (EPR). EPR umožňuje detekci volných kyslíkových radikálů. Spinové pasti reagují s volnými radikály a vytvářejí adukt, který lze detekovat pomocí EPR (Lehmann et al. 2015).

3.3.2 Metody detekce NO

NO je předmětem intenzivního výzkumu. Analytické testy pro sledování NO jsou však náročné kvůli jeho jedinečným chemickým a fyzikálním vlastnostem (reaktivita, rychlá difúze, krátký poločas rozpadu). I přes tyto obtížnosti bylo do této doby vyvinuto poměrně hodně analytických metod pro detekci NO (Hetrick a Schoenfisch 2009).

Mezi základní metody detekce NO patří přístupy založené na absorbanci, fluorescenci a chemiluminiscenci, elektronové paramagnetické rezonanci (EPR) a elektrochemii. Různé analytické metody měření oxidu dusnatého (NO) vedly k nejednotnému uvádění mezi detekce, které se pohybují od koncentrace (např. mikromolární nebo nanomolární množství) až po absolutní množství (např. pikomoly) (Hetrick a Schoenfisch 2009, Mur et al. 2011).

Jednou z nejběžnějších metod detekce NO je Griessova (diazotační) reakce. (Mur et al. 2011). První používanou metodou pro detekci NO u rostlin byl oxyhemoglobinový test. Jde o spektroskopickou metodu založenou na reakci oxyhemoglobinu (HbO_2) s NO za vzniku methemoglobinu (MetHb) a dusičnanů (NO_3). V současné době se však tato

metoda z mnoha důvodů, hlavně okolností ovlivňujících nepřesnost měření NO, téměř přestala používat (Mur et al. 2011).

Další metodou detekce NO jsou NO elektrody, které jsou hojně využívány především proto, že představují relativně snadný prostředek detekce. Elektrody byly použity např. k odhalení produkce NO během kadmiem indukované buněčné smrti v buňkách tabáku a v kulturách zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* (Mur et al. 2011).

Hmotnostní spektrometrie, jedna z dalších metod měření NO, umožňuje detekovat NO v celých rostlinách. Hmotnostní spektrometrie s použitím membránových vstupů byla použita např. ke zjištění produkce NO z pletivových kultur tabáku nebo sóji inokulovaných kmeny *Pseudomonas syringae*, které vyvolávají HR nebo způsobují závažnější choroby napadených rostlin (Mur et al. 2011). Také Conrath et al. (2004) zkoumali produkci NO u *B. cinerea in vitro* pomocí hmotnostní spektrometrie.

NO lze detekovat i v plynné podobě. K tomu nám slouží chemiluminiscence a laserová infračervená spektrometrie (Mur et al. 2011).

3.4 Mikroskopie a další metody stanovení RONS

3.4.1 Světelná mikroskopie

Světelná mikroskopie k zobrazení pozorovaných struktur využívá světelných paprsků. Dělíme ji na mikroskopii v procházejícím světle a mikroskopii v dopadajícím světle (Hejtmánek 2001).

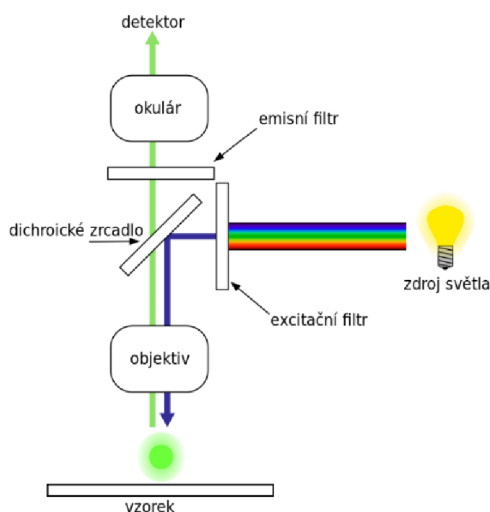
Historie pozorování objektů pouhým okem neviditelných pomocí přístroje složeného z optických čoček sahá k přelomu 16. a 17. století k Z. Janssenovi. Mezi **mikroskopii v procházejícím světle** (světlo prochází pozorovaným objektem) řadíme např. mikroskopii ve světlém poli, m. v temném poli, m. fázově kontrastní, m. interferenční, m. polarizační, m. fluorescenční, m. v neviditelných paprscích (UV, RTG, infračervených) (Hejtmánek 2001). V případě mikroskopie v procházejícím světle vidíme objekty díky tomu, že zeslabují intenzitu procházejícího záření jejich absorpcí. Viditelnost většiny biologických preparátů lze zlepšit barvením (Plášek a Reischig 1995).

Principu luminiscence vzorku pak využívá **fluorescenční mikroskopie**. Primární fluorescence nevyžaduje úpravy vzorku, pokud je v preparátu přítomna luminiscenční

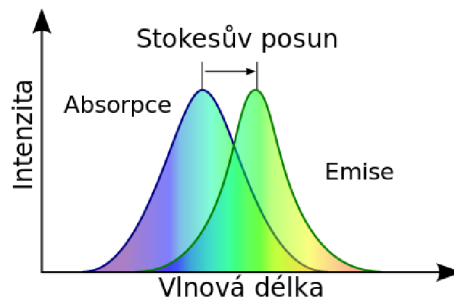
složka (např. přirozená fluorescenční barviva jako chlorofyl nebo karotenoidy, fenolické látky atd.). V případě sekundární fluorescence je ke vzorku přidávána fluorescenční látka, tzv. fluorochrom (syn. fluorofor), která se specificky váže na zkoumané struktury (Vinter a Hašler 2018). Fluorochromy při ozáření vhodnou excitační vlnovou délkou (λ_{ex}) emitují část absorbovaného záření jako fluorescenci (λ_{em}), přičemž $\lambda_{ex} < \lambda_{em}$ (Plášek a Reischig 1995). V současné době se používá především epifluorescenčních mikroskopů, tj. přístrojů, ve kterých je vzorek osvětlován a emitované světlo je zachycováno ze stejného směru. Schéma fluorescenčního mikroskopu je na Obr. 9.

Základní proces fluorescence spočívá v absorpci světelné energie (fotonu) indikátorem a následné emisi části této světelné energie (jako dalšího fotonu) o několik nanosekund později. Protože při tomto procesu dochází ke ztrátě části energie, má emitovaný foton menší energii (delší vlnovou délku) než foton absorbovaný. Rozdíl mezi excitační vlnovou délkou a emisní vlnovou délkou se nazývá Stokesův posun (Obr. 10) (Sanderson et al. 2014).

Existuje také "dvoufotonová" nebo "multifotonová" mikroskopie, kdy je použito červeného světla k vytvoření světla zeleného. Použití červeného světla namísto modrého světla jako excitačního zdroje má značné výhody. Světlo s delší vlnovou délkou může proniknout hlouběji do tkání a pletiv než světlo s kratší vlnovou délkou, protože je méně rozptylováno. Absorpce vysokoenergetického modrého světla má také tu nevýhodu, že je pravděpodobnější poškození buněk (Sanderson et al. 2014).



Obrázek 9: Schéma principu epifluorescenčního mikroskopu (převzato z: wikipedie, autor: Henry Mühlpfordt).

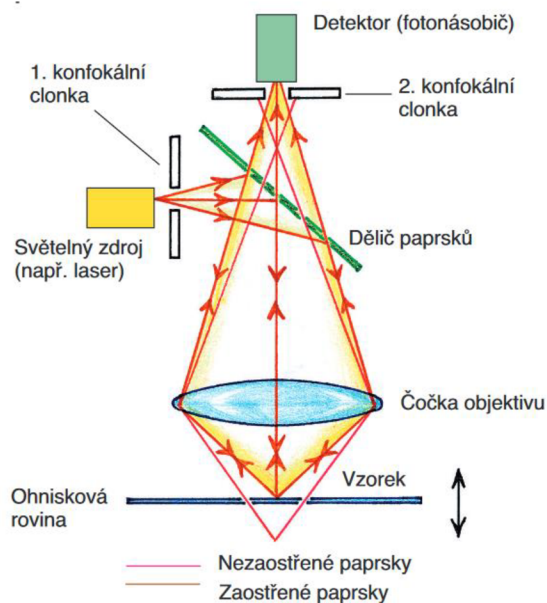


Obrázek 10: Stokesův posun (převzato z: wikipedie, autor: Vojtěch Dostál).

Metody fluorescenční mikroskopie jsou využívány k vizualizaci struktur buňky, či jednotlivých biologických molekul, od proteinů po RONS.

Princip **konfokálního mikroskopu**, tj. snímání obrazu pouze z roviny zaostření zapojením konfokální clonky (štěrbiny) do dráhy světla, procházejícího z objektu na detektor či do okuláru, si nechal patentovat Marvin Minsky již v r. 1957. První prakticky použitelný konfokální mikroskop, mikroskop s dvojitým řádkováním, který sestrojili prof. M. Petrář a doc. M. Hadravský v r. 1966, byl založen na principu rotujícího Nipkowova kotouče se sérií dírek uspořádaných do spirál. Zhruba o deset let později se začaly používat laserové skenovací konfokální mikroskopy (poprvé v r. 1977 publikovali C.J.R. Sheppard a A. Choudhury z Oxfordu, UK), které mají vyšší intenzitu excitačního světla než mikroskopy s dvojitým řádkováním (Plášek 2004).

Konfokální mikroskopie je pokročilý druh fluorescenční mikroskopie. Bodovým zdrojem světla je nejčastěji laserový paprsek, který proniká přes tzv. první konfokální clonu a dopadá na mikroskopovaný vzorek. Světlo je dále odraženo vzorkem (případně, pokud se jedná o fluorescenční konfokální mikroskopii, emitováno fluorescencí) zpět stejným objektivem. Světlo tak vytvoří další obraz bodové clony v zadní ohniskové rovině, kde se nachází druhá konfokální clona. Paprsky postupují dál k tzv. fotonásobiči. Ve fotonásobiči jsou paprsky zesíleny a detekovány a vzniká tak obraz (Kubínová 2006, Plášek 1995). Princip konfokální mikroskopie je vyobrazen a popsán na Obr. 11.



Obrázek 11: Schéma principu konfokálního mikroskopu (převzato z: Kubínová 2006).

Ve srovnání s klasickou optickou mikroskopií má konfokální mikroskop cca 1,6x lepší rozlišovací schopnost ve směru kolmém k rovině pozorování a dokáže potlačit signál z nezaostřených částí studovaného vzorku (díky konfokální cloně). V současné době je nejčastěji používaným typem konfokálního mikroskopu laserový rastrovací konfokální mikroskop (Kubínová 2006).

3.4.2 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je jednou z technik spektroskopie, studuje změnu intenzity světla při jeho interakci s hmotou. Využívá jak viditelné, tak ultrafialové oblasti záření. Jedním z přístupů ve spektrofotometrii je derivační spektrofotometrie, která se používá k získání kvalitativních a kvantitativních informací tím, že rozlišuje velmi malé rozdíly mezi spektry (Ramkumar 2020).

Spektrofotometrie slouží mimo jiné k nepřímému stanovení NO. K stanovení dusitanů i dusičnanů se využívá Griessova (diazotační) metoda. Průkopníkem této techniky byl Johann Peter Griess, německý organický chemik, který přišel na to, že reakcí NO_2^- s kyselinou sulfanilovou a α -naftylaminem vznikají azobarviva. Kyselina sulfanilová byla později nahrazena sulfanilamidem a α -naftylamin N-(1-naftyl)ethylendiaminem (Hetrick a Schoenfisch 2009, Mur et al. 2011).

Griessova metoda je založena na principu tvorby diazoniové soli sulfanilamidu (reakcí dusitanů se sulfanilamidem) a její následné reakci s N-(1-naftyl)ethylendiaminem za

vzniku azobarviv, která jsou detekována při $\lambda \sim 540$ nm pomocí spektrofotometrie. V případě dusičnanů je nejprve nutné převést je na dusitany. To se provádí chemicky pomocí redukčních kovů (např. kadmium) nebo dnes již převážně enzymaticky pomocí bakteriální nitrátreduktasy (Kupková a Beneš 2004, Miranda et al. 2001). Ke stanovení RONS se používají i fluorescenční barviva (Agilent 2021).

3.4.3 EPR (Elektronová paramagnetická rezonance)

Elektronová paramagnetická rezonance (EPR) (známá také jako elektronová spinová rezonance, ESR) je založena na pozorování nepárových elektronů v magnetickém poli, které v mikrovlnné oblasti vykazují "rezonanci" mezi paralelní a antiparalelní orientací elektronového spinu. EPR je zvláště užitečná při detekci NO a singletního kyslíku. Protože je EPR citlivá pouze na volné radikály s krátkým poločasem rozpadu, je nutné RONS „zachytit“ a převést na stabilnější radikálovou formu vhodnou pro monitorování. K tomu nám slouží tzv. spinová past („spin-trap“), molekuly, které zajišťují delší životnost signálu radikálu a tím i jeho lepší detekovatelnost. Detekční limity EPR se pohybují v řádu pmol (Hetricke a Schoenfish 2009, Kupková a Beneš 2004, Mur et al. 2011). Z experimentálního hlediska je EPR skvělá pro jednorázová měření, ale je obtížné ji použít pro kontinuální, dlouhodobé měření téhož vzorku (Mur et al. 2011).

3.5 Histochemické a imunohistochemické metody značení RONS

Pro detekci peroxidu vodíku a aktivity peroxidasy světelnou mikroskopií lze využít DAB (3,3'-diaminobenzidine), pro lokalizaci tvorby superoxidu NBT (nitro-blue tetrazolium chloride). Alternativou jsou fluorescenční sondy, např. H₂DCF-DA (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát) pro RONS obecně, DAF-FM DA (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát) pro NO nebo SOSG (Singlet Oxygen Sensor Green) pro singletní kyslík a další. Tyto fluorochromy detekují drobné změny hladin ROS a RNS v příslušných buněčných složkách v reálném čase a kromě fluorescenční mikroskopie lze signál detekovat fluorimetricky. Pro minimalizaci artefaktů je doporučeno barvit vzorek ve tmě a jeho vizualizaci provádět (multifotonovou) konfokální mikroskopií (Sedlářová a Luhová 2017).

Fluorochromy, které se dostávají (např. v diacetátové formě) přes plazmatickou membránu do buněk pouhým umístěním vzorků do roztoku barviva, výrazně

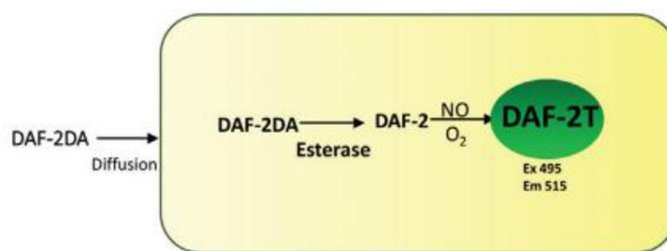
zjednodušily monitorování ROS a RNS *in vivo* a umožnily rozšíření těchto technik. Přesto histochemické barvení a následnou mikroskopickou detekci nelze použít pro přesnou kvantifikaci ROS/RNS; teprve kombinace několika různých analytických metod může poskytnout spolehlivější odhad jejich množství uvnitř buňky (Sedlářová a Luhová 2017).

3.5.1 Fluorochromy pro detekci ROS

Nejpoužívanější indikátor ROS, především peroxidu vodíku (H_2O_2), propustný pro buňky je H_2DCF DA. Tento indikátor zůstává nefluorescenční, dokud nejsou intracelulárními esterázami odstraněny acetátové skupiny (H_2DCF) a v buňce nedojde k oxidaci za vzniku vysoce fluorescenčního DCF (2',7'-dichlorofluorescein) (Egan et al. 2007). Pro detekci H_2O_2 lze dále využít DAB (3,3'-diaminobenzidin). K vizualizaci superoxidového kyslíkového anionu se využívá nitrotetrazoliová modř (nitroblue tetrazolium, NBT). (Lehmann et al. 2015), pro detekci superoxidového anionu DHE (dihydroethidium). Reakcí DHE a superoxidového anionu vzniká 2-hydroxyethidium ($2-OH-E^+$), který vykazuje červenou fluorescenci (Lehmann et al. 2015, Zhao et al. 2003). Pro detekci vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS), mezi které patří peroxydusitan ($ONOO^-$) a hydroxylový radikál (OH^\bullet), jsou využívány fluorescenční sondy HPF (3'-(p-hydroxyfenyl)fluorescein) a APF (3'-(p-aminofenyl)fluorescein) (Setsukinai et al. 2003, Cohn et al. 2009). Pro detekci singletního kyslíku se používá SOSG (Singlet Oxygen Sensor Green) (Lehmann et al. 2015, Sedlářová a Luhová 2017).

3.5.2 Fluorochromy pro detekci NO

DAF-2 DA a DAF-FM DA jsou formy fluorochromu DAF (diaminofluorescein) propustné pro buňky. Jakmile tyto fluorescenční sondy vstoupí do buňky, esterové vazby jsou hydrolyzovány buněčnými esterázami a DAF-2/DAF-FM reaguje uvnitř buněk s NO a přeměňuje se na vysoce fluorescenční triazolofluorescein (DAF-2T/DAF-FM T) (Obr. 12), který lze detekovat pomocí fluorescenční mikroskopie nebo fluorimetrie (Mur et al. 2011, Prats et al. 2008, Vishwakarma et al. 2019).



Obrázek 12: Reakční mechanismus DAF-2DA (převzato z: Vishwakarma et al. 2019)

DAF-2 DA byl později nahrazen 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetátem (DAF-FM DA), který má vyšší fotostabilitu i citlivost vůči NO (detekční limit ~ 3 nM ve srovnání s ~ 5 nM DAF-2 DA). Použití DAF-FM DA je však omezené kvůli jeho citlivosti na pH, signály při pH 9 jsou zhruba poloviční než signály získané při pH 5,5. pH rostlinné buňky se obvykle pohybuje kolem 7,5, přičemž apoplast a vakuola mají pH okolo 5,5. pH buněčných kompartmentů rostlin se však může měnit během různých stresů, jako je hypoxie, napadení patogeny, osmotický stres, růst kořenových špiček a další, což může vést ke zkreslenému měření NO. Proto by se při interpretaci výsledku DAF-FM měly brát v úvahu potenciální změny pH (Mur et al. 2011, Vishwakarma et al. 2019).

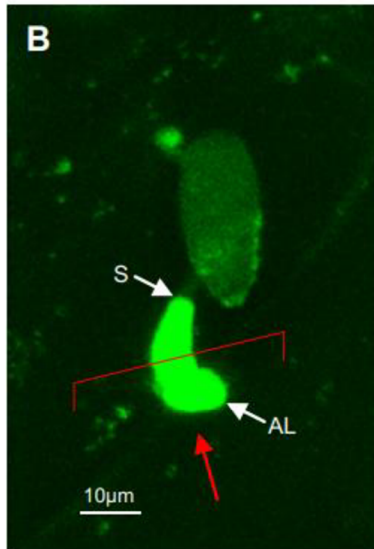
Zvýšenou produkci NO u listů pelargonie (*Pelargonium peltatum*) zaznamenali v průběhu kolonizace *B. cinerea* pomocí 4,5-diaminofluorescein diacetátu (DAF-2 DA) např. Floryszak-Wieczorek et al. (2007).

Barviva DAF-FM, DAF-FM DA a DAF-2 DA mají (jako i ostatní barviva) své výhody i nevýhody. Mezi výhody těchto barviv patří (i) komerční dostupnost na trhu, (ii) vysoká citlivost, měří hladiny NO v nanomolárních koncentracích, (iii) umožňují studium buněčné lokalizace. Mezi jejich nevýhody patří (i) citlivost na pH, (ii) vyžadují kyslík, (iii) DAF-2 nereaguje přímo s NO, (iv) příjem DAF-2 DA se liší v závislosti na typu pletiv a organel, (v) v reakci vytváří meziprodukt N_2O_3 , (vi) kyselina askorbová a dehydroaskorbová mohou reagovat s DAF, (vii) není možné přesné kvantitativní měření (Vishwakarma et al. 2019).

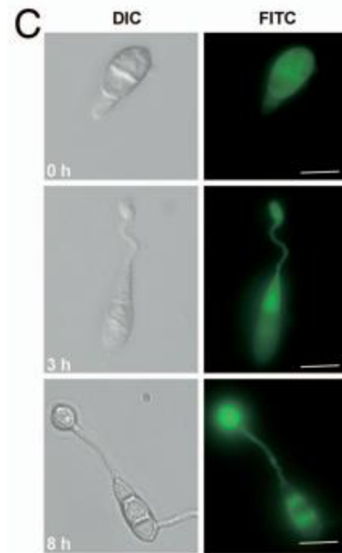
Různé složení buněčných stěn ve fotosyntetických a houbových organismech vyžaduje různou koncentraci sond používaných pro zobrazování ROS/RNS a optimalizaci experimentálních podmínek (inkubační doba, teplota, koncentrace sondy). Např. vhodná koncentrace DAF-FM DA pro konidie oomycetů je $10\mu\text{M}$, pro jejich intercelulární mycelium $10\text{-}20\mu\text{M}$. Pro konidie i intercelulární mycelium hub se vhodná koncentrace

pohybuje mezi 10-40 μ M (koncentraci zvyšujeme, pokud je mycelium pěstované na agaru) (Sedlářová a Luhová 2017).

Příklady lokalizace signálu (zeleně) jednotlivých RONS po obarvení vzorků fytopatogenních hub fluorescenčními sondami jsou uvedeny na Obr. 13 a 14.



Obrázek 13: Detekce NO v aporesriu klíčící konidie padlí *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* pomocí DAF-2 DA (převzato z: Prats et al. 2008).



Obrázek 14: Detekce ROS v klíčících konidiích *Magnaporthe grisea* pomocí H₂DCF-DA (převzato z: Egan et al. 2007).

4 MATERIÁL A METODY

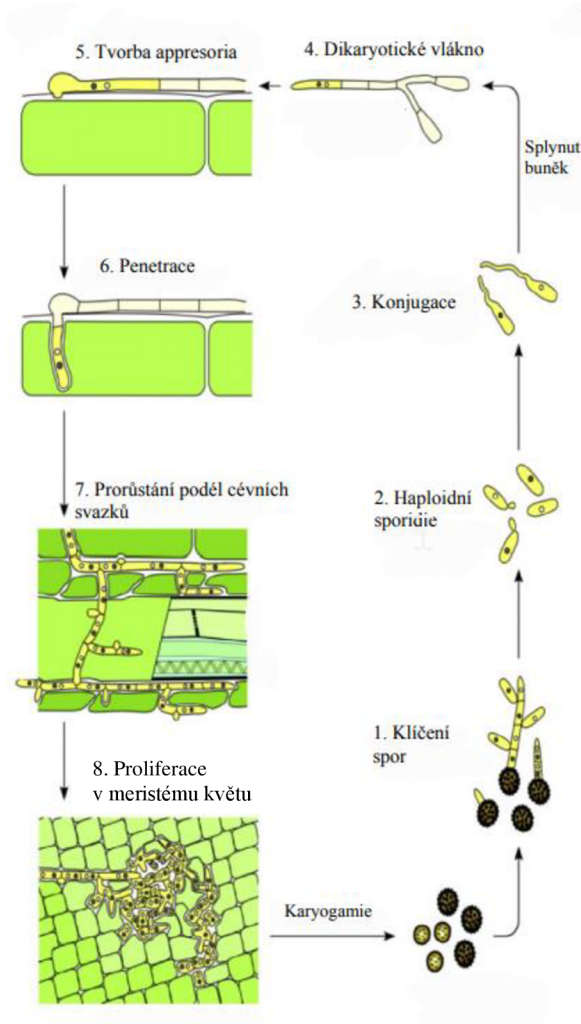
4.1 Sněti (Ustilaginomycetes)

Sněti (oddělení Basidiomycota, pododdělení Ustilaginomycotina, třídy Ustilaginomycetes a Exobasidiomycetes) jsou fakultativní biotrofní parazité krytosemenných rostlin. Napadají určitý orgán rostliny (květ, list, stonek, kořen), na který jsou specializovány, a jeho pletiva přeměňují ve snětivá ložiska vyplněná teliosporami (u snětí označovány i jako chlamydospory). Dle klasifikace ekofyziologických strategií parazitů řadíme sněti mezi tzv. kastrátory nebo debilitátory (neboli oslabovače). Kastrátoři napadají reprodukční orgány rostlin a částečně nebo úplně znemožňují hostitelské rostlině vývoj květů, plodů a semen. Typickými příklady jsou sněti obilovin (Ustilaginaceae, Tilletiaceae). Debilitátoři (oslabovači) napadají zelené (asimilující) orgány rostlin a snižují výtěžek fotosyntézy. Mezi debilitátory patří listové sněti (např. *Ustilago filiformis*, *Urocystis anemones*, *U. colchici*, *Vankya heufleri*, *Exobasidium pachysporum*) (Sedlářová et al. 2021).

Zástupci snětí bývají obvykle dimorfní, střídají saprofytickou kvasinkovitou haploidní fázi a parazitickou vláknitou dikaryotní fázi. Sněti tedy řadíme mezi biotrofy (potřebují ke svému životu živou hostitelskou rostlinu), ale jejich kvasinková stádia můžeme po omezenou dobu pěstovat v umělé kultuře. Pro svůj další vývoj a reprodukci však potřebují hostitelskou rostlinu a bez hostitelských pletiv odumírají (Doehlemann et al. 2014, Dumalasoová 2017, Sedlářová et al. 2021).

U snětí na obilninách je stále užívané dělení na prašné (zástupci řádu Ustilaginales, např. *Ustilago nuda*, *U. maydis*, *U. hordei*) a mazlavé (řád Tilletiales, např. *Tilletia caries*, *T. laevis* a *T. controversa*), podle morfologie bazidií a způsobu klíčení bazidiospor (Dumalasoová 2017). Podle současných poznatků (molekulární metody, studium ultrastruktury a biochemických vlastností) toto dělení nekoresponduje s taxonomií (Sedlářová et al. 2021). Bylo také zjištěno, že řád Microbotryales (tzv. květní sněti), na základě morfologie dříve řazený ke snětím, patří mezi rzi (Marková 2006). Pomocí molekulárně fylogenetických analýz byla zjištěna blízká příbuznost rodů *Ustilago*, *Sporisorium* a *Macalpinomyces* (McTaggart et al. 2012a). Jejich taxonomie však stále není vyřešena.

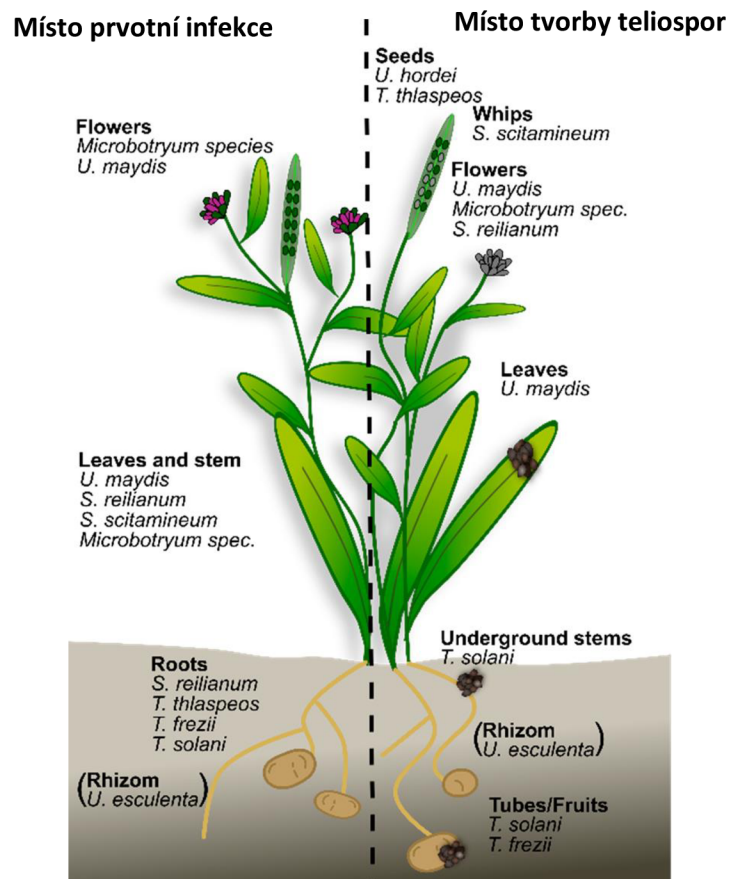
„Sněti tvoří plodnice, ale výtrusné kupky, sori, s tlustostěnnými teliosporami (chlamydosporami), v nichž probíhá karyogamie (fúze jader) a následně meióza. Teliospora klíčí promycelem (útvarem analogickým bazidii), na kterém vznikají jednojaderné haploidní bazidiospory (sporidie) a z nich se oddělují blastospory nebo hyfy s balistosporami. Při kontaktu dvou buněk odlišných pohlavních typů dochází ke konjugaci, čímž vzniká infekční dikaryotické mycelium (Obr. 15). Po penetraci epidermis rostou sněti mezi- a vnitrobuněčně tak, aby nedošlo k narušení plazmatické membrány hostitelské rostliny“ (Sedlářová et al. 2021). Rostliny jsou tedy infikovány dikaryotickou infekční hyfou. K přenosu inokula jako zdroje infekce může dojít půdou, větrem nebo v podobě dormantního mycelia uvnitř obilky nebo pod semennými obaly, teliosporami ulpívajícími na povrchu obilek (Dumalasová 2017).



Obrázek 15: Životní cyklus sněti (upraveno podle: Doehlemann et al. 2014).

Van der Linde a Göhre (2021) studovali několik zástupců snětí (*Ustilago maydis*, *U. hordei*, *U. esculenta*, *Sporisorium scitamineum*, *S. reilianum*, *Thecaphora solani*, *T. frezii*, *T. thlaspeos*, a rod *Microbotryum*, který je nově řazen mezi rzi) a zkoumali jejich časoprostorovou orientaci v rostlině.

Studie van der Linde a Göhre (2021) uvádí, že kromě klasifikace založené na fylogenezi, můžeme snětí rozdělit do tří skupin. Do první skupiny byly zařazeny ty, co infikují rostlinu pouze lokálně a vytváří teliospory v místě primární infekce (např. *U. maydis*), snětí další skupiny infikují několik druhů pletiv rostliny a teliospory vytváří daleko od místa infekce (např. *U. hordei*, *S. reilianum* a *T. thlaspeos*, které sporulují pouze v reprodukčních orgánech), třetí skupina zahrnuje snětí, které mohou rostlinu infikovat jak lokálně, tak systémově (Obr. 16). Zajímavé je také porovnání infekce jednoletých a víceletých rostlin a srovnání infikovaných nadzemních a podzemních pletiv rostliny, protože se liší signály vysílajícími k hostiteli.



Obrázek 16: Přehled různých druhů snětí, u kterých byla studována časoprostorová orientace v rostlině. V levé polovině obrázku je uvedeno místo prvotní infekce rostliny snětí, v pravé místo tvorby teliospor (upraveno podle: van der Linde a Göhre 2021).

Sněti využívají různé části rostlin pro svůj růst, výživu i rozmnožování. Různé druhy snětí se rovněž liší svou časoprostorovou orientací v rostlině. Některé sněti infikují pouze reprodukční orgány rostlin, v kterých se i rozmnožují. Před sporulací vedou v hostitelské rostlině více či méně rozšířený endofytický způsob života, aniž by způsobovaly větší škody. Některé druhy ovlivňují morfologii rostlin, některé zůstávají v prvotním místě infekce blízkém okolním pletivu, jiné se šíří systémově (van der Linde a Göhre 2021).

V experimentech byl použit materiál tří níže uvedených druhů snětí poskytnutý RNDr. Veronikou Dumalášovou, Ph.D. z VÚRV v Praze-Ruzyni. Správnost vědeckých názvů snětí byla ověřena podle databáze Index Fungorum.

4.1.1 *Sporisorium destruens* (Schltdl.) Vánky

S. destruens je prašná sněť napadající rostliny z čeledi lipnicovité (*Poaceae*), nejčastěji proso (Obr. 17). *Sporisorium destruens* (Schltdl.) Vánky (1985) je aktuálně platný název. Synonyma k tomuto názvu nebo ve starších publikacích používaná pojmenování jsou např. *Sphacelotheca destruens* (Schltdl.) J.A. Stev. & Aar.G. Johnson (1944), *Sorosporium panici-miliacei* (Pers.) Takah. (1902), *Caeoma destruens* Schltdl. (1824), *Ustilago destruens* (Schltdl.) Rabenh. (1857), *Uredo carbo* var. *panici-miliacei* (Pers.) DC. (1815) a další. Druh *S. destruens* řadíme do čeledi Ustilaginaceae, řádu Ustilaginales, podtřídy Ustilaginomycetidae, třídy Ustilaginomycetes, pododdělení Ustilaginomycotina, oddělení Basidiomycota, říše Fungi (Index Fungorum).

Květy napadené snětí *S. destruens* se mění v hálky, ze kterých se později uvolňují masy černohnědých spor (Plant Parasites of Europe). Infekce hostitele je systémová a začíná ve stádiu semenáčků. Výtrusy ve zralosti jsou solitární, subglobózní, 8-13 × 7-9 μm velké, světle červenohnědé, stěna výtrusu je hladká až velmi jemně tečkovaná, přibližně stejně široká na všech místech výtrusu, cca 0,5 μm (Obr. 18). Výsledkem klíčení výtrusů jsou čtyř-buněčné bazidie (PaDIL).

Klasifikace *Sporisorium* i dalších snětí rodu *Ustilago* a *Macalpinomyces*, kterým se věnovala práce autorů McTaggart et al. (2012b) je založena na klasifikaci podle typu kolumely, sterilních buněk a vzdušných vaků. Tyto rody jsou si podobné a dlouho byla řešena jejich taxonomie. Byly vytvořeny dva návrhy řešení taxonomie. První navrhol rozdělění současných taxonů na několik menších rodů a podrodů, druhý sjednotit tři rody do jediného rodu *Ustilago*. Studie McTaggart et al. (2012b) se přiklání k prvnímu

řešení, definuje synapomorfnní znaky těchto tří rodů a navrhuje novou klasifikaci pro mnoho druhů v těchto rodech. Pomocí fylogenetické analýzy bylo stanoveno osm kladů v rámci komplexu *Ustilago-Sporisorium-Macalpinomyces*. *Sporisorium* a *Anomalomyces* jsou již dříve uznané rody, dále byl znovu zařazen rod *Anthracozystis* a navrženy 3 nové rody *Langdonia*, *Stollia* a *Triodiomyces*. Ostatní klady zůstaly nepojmenované.



Obrázek 17: Klas prosa napadený snětí *S. destruens* (převzato z: <https://www.padil.gov.au/>).



Obrázek 18: Spory *S. destruens* zobrazeny skenovací elektronovou mikroskopií (SEM) (převzato z: <https://www.padil.gov.au/>).

4.1.2 *Tilletia caries* (DC.) Tul. & C. Tul.

Mazlavá sněť pšeničná napadá pšenici (Obr. 19), žito, tritikále a trávy rodu pýr, ovsík, pýrovník aktuálně platný název je *Tilletia caries* (DC.) Tul. & C. Tul. (1848). Ve starších publikacích se můžeme setkat se synonymy *Tilletia tritici* (Berk.) Wolf (1874), *Uredo caries* DC. (1815) nebo *Lycoperdon tritici* Bjerk. (1775). Druh *T. caries* řadíme do čeledi Tilletiaceae, řádu Tilletiales, podtřídy Exobasidiomycetidae, třídy Exobasidiomycetes, pododdělení Ustilaginomycotina, oddělení Basidiomycota, říše Fungi (Rostlinolékařský portál, Index Fungorum).

Sněť *T. caries* napadá květenství hostitele v časných růstových fázích. Po vymetání je barva napadených klasů olivově zelená. Již ve fázi zelené zralosti se v klasu místo obilek tvoří hálky napadené tmavými spory. V době plné zralosti jsou hálky vyplněné páchnoucí černou hmotou, tvořenou chlamydosporami houby (Rostlinolékařský portál).

Mazlavá sněť pšeničná se přenáší formou spor převážně na povrchu obilek, méně často půdou. Rostlinolékařský portál uvádí, že spory klíčí při teplotě 16-18 °C za 4-5 dní a ke klíčení nepotřebují světlo, Dumalasová (2017) uvádí optimální teplotu 18-20 °C. Spory klíčí v bazidie, z kterých se odškrcují bazidiospory. Mezi bazidiosporami dvou odlišných párovacích typů dochází k anastomózám. Po splynutí bazidiospor se tvoří

infekční hyfy, které infikují hostitele v růstové fázi klíčení. Mycelium prorůstá rostlinou až do základu klasu, kde je možné po vymetání pozorovat snětivá zrna (Rostlinolékařský portál).

Zrna kontaminovaná mazlavou snětí *T. caries* není možné využít pro potravinářské ani krmné účely. Provádí se proto kontrola zdravotního stavu porostu v době dozrávání. Porosty s vyšším napadením mají charakteristický zápach po slanečcích. Ještě důležitější je však kontrola zdravotního stavu osiva, protože aplikace fungicidů po zasetí již nemá dostačující efekt. Účinnou chemickou ochranou rostlin proti napadení snětivostí je moření osiva. Účinnost mořidel by měla dosahovat až 98 % (Rostlinolékařský portál).



Obrázek 19: Klas pšenice napadený snětí *T. caries* (převzato z: <https://www.padil.gov.au/>).

4.1.3 *Ustilago nuda* (C.N. Jensen) Kellerm. & Swingle

U. nuda (prašná snětivost ječmene nebo také prašná sněť ječná) je sněť napadající klasy ječmene obecného a dalších druhů rodu ječmen (Obr. 20). *Ustilago nuda* (C. N. Jensen) Kellerm. & Swingle (1890) je aktuálně platný název. Ve starších publikacích se můžeme setkat se synonymy jako např. *Ustilago segetum* (Bull.) Roussel (1806). Další platná synonyma jsou *Ustilago segetum* var. *hordei* (Pers.) Rabenh. (1857) a *Ustilago segetum* var. *nuda* C.N. Jensen (1888). Druh *U. nuda* řadíme do čeledi Ustilaginaceae, řádu Ustilaginales, podtřídy Ustilaginomycetidae, třídy Ustilaginomycetes, pododdělení Ustilaginomycotina, oddělení Basidiomycota, říše Fungi (Index Fungorum).

U. nuda napadá ječmen během kvetení. Rostliny napadené prašnou snětivostí ječmene dříve metají. Základy zrn v klasu jsou přeměněny na černou masu chlamydospor, která je z počátku překrytá stříbřitou blankou. Blanka časem praská a spory se uvolňují. Uvolněné chlamydospory jsou větrem přenášeny na blizny kvetoucích klasů. Po

dosednutí na bliznu chlamydospora klíčí a prorůstá hyfou přes čnělku dále do semeníku. Nebezpečí infekce je vyšší za vysoké vzdušné vlhkosti. Při klíčení obilky prorůstá mycelium do základu klasů, které přeměňuje na černou masu chlamydospor (Rostlinolékařský portál, Woldemichael 2019).

Napadené klasy prašnou snětivostí ječmene mohou způsobit významné hospodářské ztráty. Proto jsou prováděny prohlídky porostu během kvetení (přímá metoda monitoringu) a stanovován výskyt patogenu v osivu (nepřímá metoda monitoringu). Podle povětrnostních podmínek během kvetení je prováděna prognóza výskytu snětivosti v úrodě. Jako preventivní opatření proti napadení ječmene patogenem se doporučuje časnější výsev jarního ječmene a pozdější výsev ječmene ozimého, výsev pouze uznaného zdravého osiva a upřednostnění odolnější odrůdy (Rostlinolékařský portál).



Obrázek 20: V horní polovině obrázku zdravý klas ječmene, v dolní polovině klas ječmene napadený snětí *U. nuda* (převzato z: <https://www.padil.gov.au/>).

4.2 Klíčení chlamydospor snětí na agaru na podložním skle

Pro experimenty zaměřené na iniciační, tj. saprofytické, fáze vývoje snětí byla použita 4% agaróza, rozehřátá v mikrovlnné troubě a nanesená na podložní skla předeřhřátá na topné desce PRÄZITHERM (Harry Gestigkeit GmbH, Německo). Po ztuhnutí byly spory snětí z napadeného klasu uvolněny pomocí preparační jehly na čerstvý agar a inkubovány ve vlhké komůrce. Srovnávány byly varianty pěstování ve fytozonech s teplotními režimy 15/10 °C a 20/17 °C (12/12 h světlo/tma) a volně v laboratoři (teplota 22-25 °C, 9/15 h světlo tma).

U snětí *S. destruens*, která dobře klíčila a byla ze všech tří nejvhodnější k pozorování, byl v softwaru Cell Sens ve dvou nezávislých pozorováních vyhodnocen poměr

vyklíčených spor z celkového počtu 150 a délka klíčnicích vláken u 30 náhodně vybraných. Výsledky byly zpracovány v sw Statistica. Pro ověření vztahu délky klíčnicích vláken a inkubační teploty byl použit Kruskal-Wallisův test, který je využívám k ověření vztahu ordinální a nominální proměnné.

4.3 Histochemická lokalizace a mikroskopie RONS

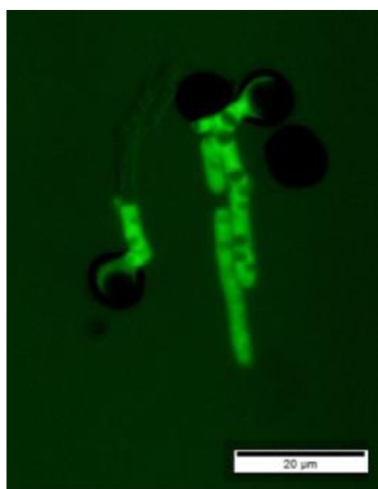
Pro histochemickou lokalizaci RONS byly použity následující fluorochromy a podmínky barvení: 100 μ M H₂DCF-DA pro lokalizaci ROS (10 min, RT, tma) a 200 μ M DAF-FM DA pro lokalizaci NO (60 min, RT, tma).

K vizualizaci signálu byl použit fluorescenční mikroskop Olympus BX60, doplněný CCD kamerou DP73 a softwarem Cell Sens, a konfokální mikroskop Olympus FV1000 se softwarem Fluorview 10.0.

5 VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace podmínek klíčení snětí

Klíčení chlamydospor snětí bylo poprvé hodnoceno po 3 dnech (*Sporisorium destruens* a *Tilletia caries*), resp. po 4 dnech (*Ustilago nuda*) inkubace ve fytotronu (20/17 °C, 12/12 h). Vyklíčily však pouze spory snětí *S. destruens*, proto jsme provedli barvení pomocí H₂DCF-DA. U *T. caries* a *U. nuda* nebyly pozorovány žádné známky klíčení, ani přípravy na klíčení v podobě RONS.

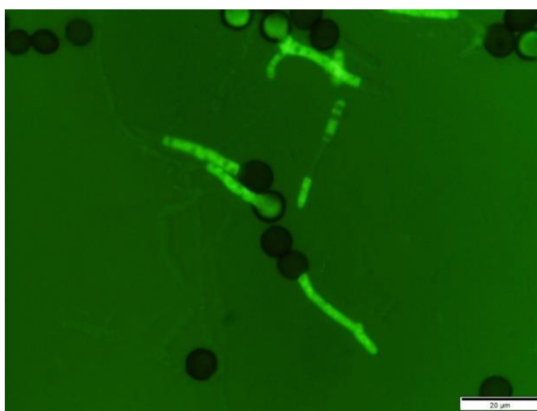


Obrázek 21: Klíčící spory *S. destruens* se zeleným signálem ROS v klíčících vláčkách (3 dny). Autor: A. Bobková.



Obrázek 22: Detail spory *S. destruens* s rozvětveným klíčícím vláčkem (3 dny). Autor: A. Bobková.

Při prodloužení inkubace o tři dny na 6 resp. 7 dní opět nebylo pozorováno klíčení ani u *T. caries* ani u *U. nuda*, pouze došlo k přerůstání vzorků kontaminujícími mikromycetami.



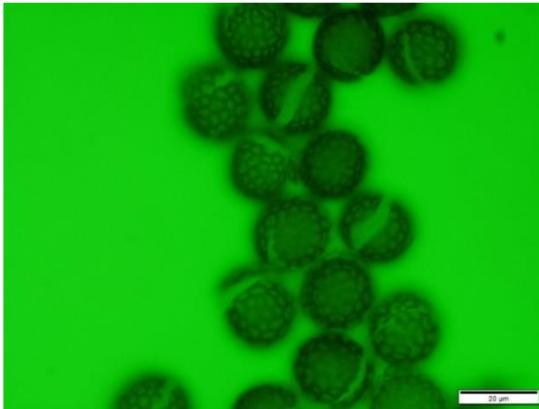
Obrázek 23: Mikrofotografie klíčících spor *S. destruens* v různém stádiu klíčení (7 dní). V některých případech je viditelná fluorescence i ve sporách (začátek klíčení), v jiných pouze v klíčícím vláčkě, v dalších případech fluorescence z klíčících vláken pomalu mizí (pokročilejší fáze klíčení). Autor: A. Bobková.



Obrázek 24: Mikrofotografie spor *T. caries* v procházejícím světle. Autor: A. Bobková.



Obrázek 26: Příklady kontaminací – mnohobuněčné tmavě zbarvené konidie *Alternaria* sp. a neidentifikovaná askomyceta ve světlém poli. Autor: A. Bobková.



Obrázek 25: Mikrofotografie chlamydospor *T. caries* s viditelnou síťovitou strukturou na povrchu. Autor: A. Bobková.



Obrázek 27: Příklad kontaminace skličkové kultury s *T. caries* – pravděpodobně *Cladosporium* sp. Autor: A. Bobková.

5.2 Srovnání dynamiky klíčení u *S. destruens*

Pro další experimenty byl zvolen druh *Sporisorium destruens* a doba klíčení 4 dny. Chlamydospory byly po nanesení na agar na podložním skle uzavřeny ve vlhkých komůrkách a inkubovány ve fytotronech nebo v laboratoři při různých teplotách po dobu čtyř dnů. Jedna vlhká komůrka s agarovými kulturami byla umístěna do fytotronu s denní teplotou 15 °C a noční 10 °C (12/12 h), druhá do vedlejšího s denní teplotou 20 °C a noční 17 °C (12/12 h), třetí do laboratoře s denní teplotou ~22 °C. Po čtyřdenní inkubaci byl pro každou teplotu u 150 spor *S. destruens* vyhodnocen poměr vyklíčených a změřena délka u 30 klíčících vláken. Experiment proběhl ve dvou nezávislých opakováních v odstupu měsíce (Tab. 3).

Tabulka 3: Poměr vyklíčených spor (v %) a délky klíčnicích vláken (v μm) sněti *Sporisorium destruens* inkubované po dobu 4 dnů ve třech různých teplotách.

	1. vyhodnocení (18.1.2022)		2. vyhodnocení (14.2.2022)	
Teplota	Poměr vyklíčených spor (%)	Délka klíčnicích vláken v μm	Poměr vyklíčených spor (%)	Délka klíčnicích vláken v μm
15/10 °C	29,33	(4-8-)18-50(-57)	21,33	(9-)15-48(-57)
20/17 °C	74,67	(19-)33-58(-77)	72,00	36-72(-84)
Pokojová teplota (~22 °C)	71,33	(26-)33-77(-107)	72,67	(30-33)43-78

V 1. vyhodnocení vyklíčilo nejvíce spor při teplotě 20/17 °C (74,67 %), trochu nižší byl poměr v pokojové teplotě (71,33 %). Ve druhém vyhodnocení vyšla procenta v teplotě 20/17 °C a v pokojové teplotě velmi podobná (72,00 %, resp. 72,67 %). Z obou vyhodnocení je patrné, že teplota 15/10 °C je nízká pro klíčení spor; v 1. vyhodnocení vyklíčilo pouze 29,33 % a ve druhém 21,33 %.

Vztah délky klíčnicích vláken a inkubační teploty byl ověřen Kruskal-Wallisovým testem, (neparametrickým ekvivalent ANOVY), protože data nemají normální distribuci hodnot (ověřeno testem normality - Shapiro-wilk test). Hodnota p byla v obou opakováních nižší než 0,05, proto můžeme tento vztah mezi inkubační teplotou a délkou klíčnicích vláken vyhodnotit jako signifikantní, $H_1(2, N = 90) = 26,45832$, $p_1 = 0,000$; $H_2(2, N = 90) = 35,00177$, $p_2 = 0,000$. Existuje tedy vztah mezi inkubační teplotou a délkou klíčnicích vláken. Byla zamítnuta nulová hypotéza a přijata alternativní.

Pokud vyjde hodnota $p < 0,05$ provádí se test mnohonásobného porovnávání (Tab. 4 a 5). Vztah mezi délkou klíčnicích vláken spor inkubovaných v teplotě 15/10 °C a 20/17 °C a mezi délkou klíčnicích vláken v teplotě 15/10 °C a pokojové teplotě je signifikantní, tzn. v teplotě 15/10 °C vyklíčí jinak dlouhá vlákna než v teplotě 20/17 °C nebo v pokojové teplotě. Naopak vztah mezi délkou klíčnicích vláken spor inkubovaných v teplotě 20/17 °C a v pokojové teplotě navzájem není signifikantní ($p > 0,05$) a je tím pádem potvrzena nulová hypotéza.

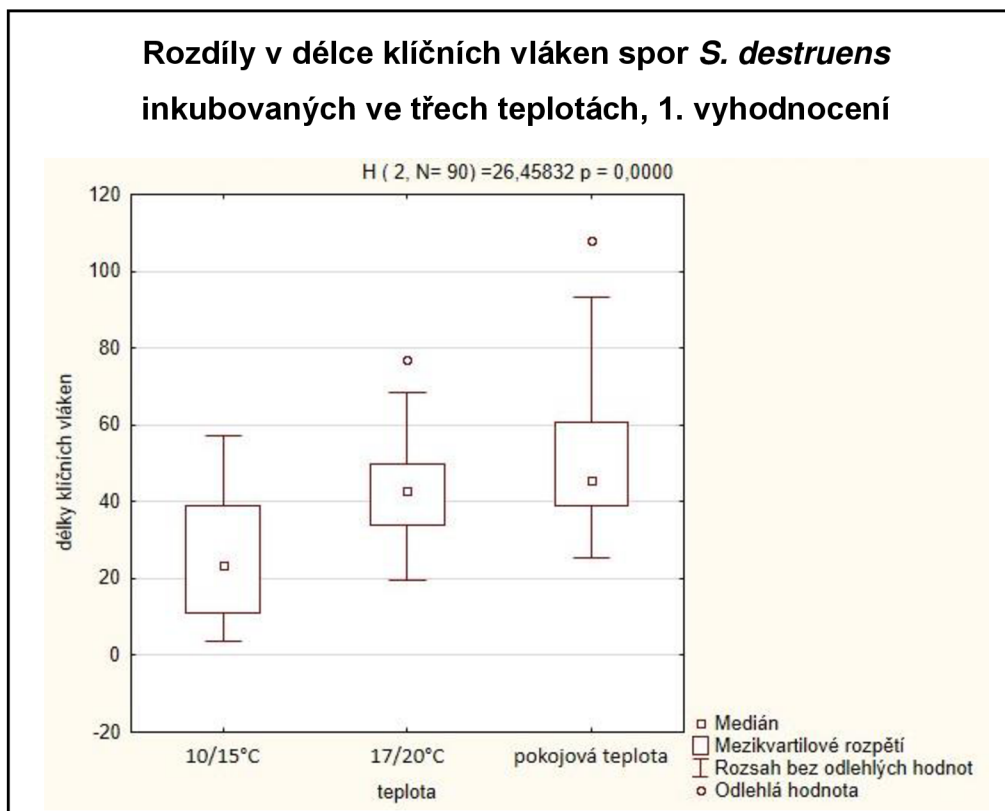
Tabulka 4: Výsledné p hodnoty testu mnohonásobného porovnávání z 1. vyhodnocení. Kurzivou jsou označeny hodnoty $p < 0,05$.

	15/10 °C	20/17 °C	pokojová teplota
15/10 °C		<i>0,001121</i>	<i>0,000002</i>
20/17 °C	<i>0,001121</i>		0,451282
pokojová teplota	<i>0,000002</i>	0,451282	

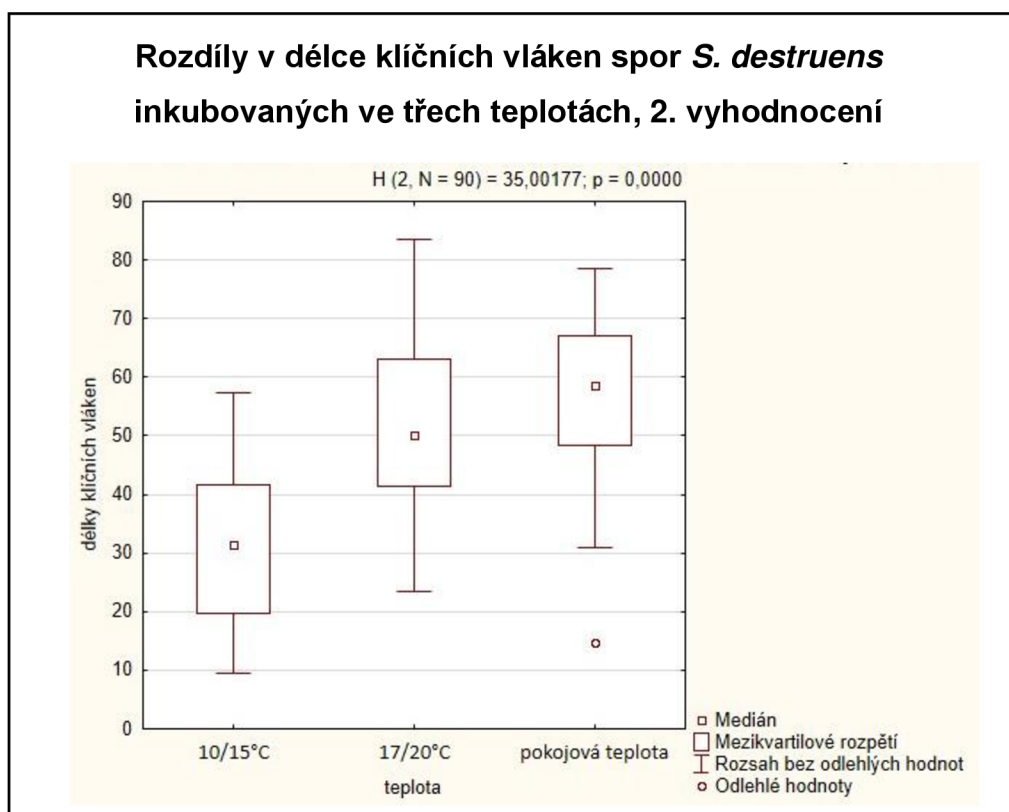
Tabulka 5: Výsledné p hodnoty testu mnohonásobného porovnávání z 2. vyhodnocení. Kurzivou jsou označeny hodnoty $p < 0,05$.

	15/10 °C	20/17 °C	pokojová teplota
15/10 °C		<i>0,000024</i>	<i>0,000000</i>
20/17 °C	<i>0,000024</i>		0,776479
pokojová teplota	<i>0,000000</i>	0,776479	

Rozdíly v délce klíčnicích vláken v závislosti na inkubační teplotě jsou znázorněny i v Obr. 28 a 29.



Obrázek 28: Rozdíly v délce klíčnicích vláken (v μm) spor *S. destruens* inkubovaných ve fytotronu v teplotě 15/10 °C (12/12 h světlo/tma), 20/17 °C (12/12 h světlo/tma) a v laboratoři v pokojové teplotě (9/15 h světlo/tma). Porovnávány hodnoty z 1. vyhodnocení.

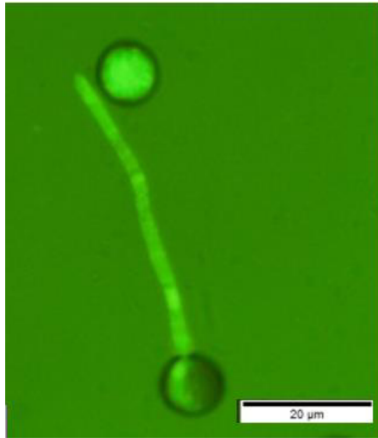


Obrázek 29: Rozdíly v délce klíčních vláken (v μm) spor *S. destruens* inkubovaných ve fytotronu v teplotě 15/10 °C (12/12 h světlo/tma), 20/17 °C (12/12 h světlo/tma) a v laboratoři v pokojové teplotě (9/15 h světlo/tma). Porovnávány hodnoty z 2. vyhodnocení.

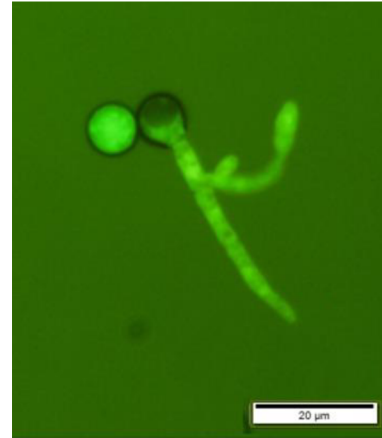
5.3 Lokalizace ROS a NO u *S. destruens*

Čtyřdenní sklíčkové kultury byly obarveny $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (10 min ve tmě) pro detekci ROS nebo DAF-FM DA (60 min ve tmě) pro lokalizaci NO, signál byl vyhodnocen fluorescenčním mikroskopem.

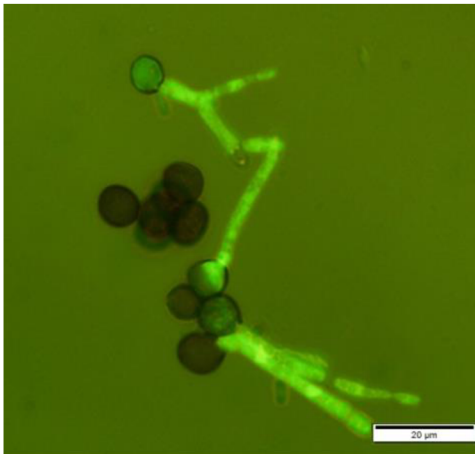
Signál pro ROS (obr. 30-34) a NO (Obr. 35-40) byl detekován jak ve sporách (počátky klíčení), tak v klíčních vlákněch. Signál byl lokalizován nejdříve v cytoplazmě spor, v pozdějších fázích vývoje byl signál patrný v rostoucím klíčním vlákně a ve sporách mizel (např. Obr. 30). V některých případech byly pozorovány spory s rozvětveným klíčním vláknem (Obr. 31). Zřídka byly na některých klíčních vlákněch pozorovány také vytvořené bazidiospory (Obr. 32). Při pořizování některých fotografií bylo přidáno světlo k zviditelnění struktur bez fluorescence (Obr. 33 a 35-37). V případě barvení DAF-FM DA byly pozorovány signály NO v klíčním vlákně více lokálně (oblasti s vyšší fluorescencí v klíčních vlákněch na Obr. 35-40).



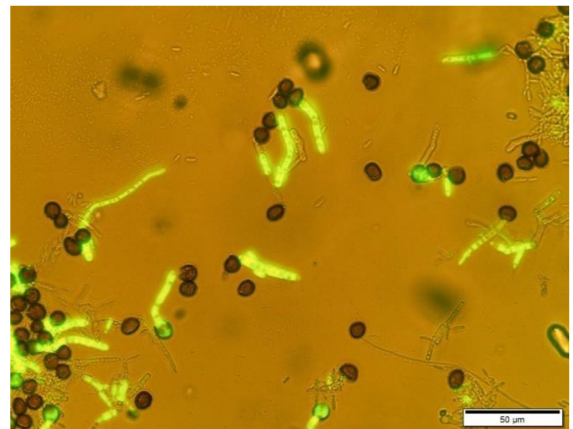
Obrázek 30: Detail spory *S. destruens* s klíčným vláknem vykazujícím fluorescenci (signál ROS) (inkubace 4 dny při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí H₂DCF-DA). Autor: A. Bobková.



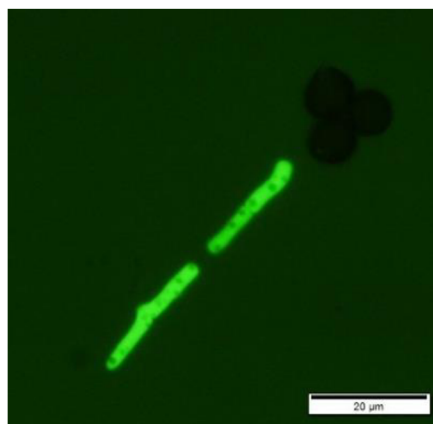
Obrázek 32: Klíčení *S. destruens*, napravo spora s rozvětveným klíčným vláknem a bazidiosporami (inkubace 4 dny při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí H₂DCF-DA). Autor: A. Bobková.



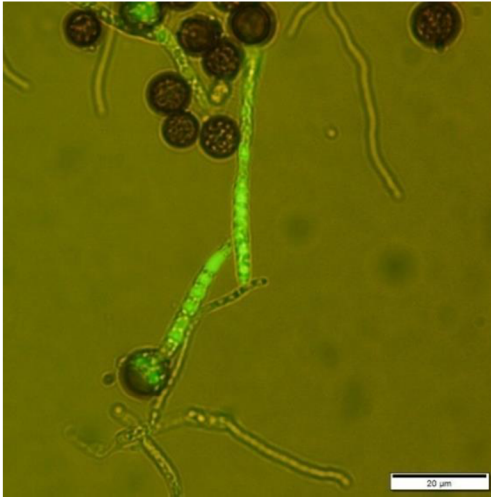
Obrázek 31: Spora *S. destruens* s rozvětveným klíčným vláknem v horní části mikrofotografie (inkubace 4 dny při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí H₂DCF-DA). Autor: A. Bobková.



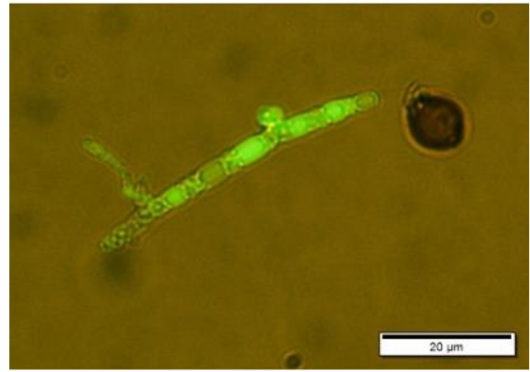
Obrázek 33: Shluky klíčících spor *S. destruens* se signálem ROS v klíčcích vlákních vykazujících fluorescenci (inkubace 4 dny při teplotě 20/17 °C (12/12 h), barvení pomocí H₂DCF-DA). Autor: A. Bobková.



Obrázek 34: Detail tří spor *S. destruens*, z nichž pouze jedna klíčí vláknem vykazujícím signály ROS – zelená fluorescence (inkubace 4 dny v pokojové teplotě (~ 22 °C), barvení pomocí H₂DCF-DA). Autor: A. Bobková.



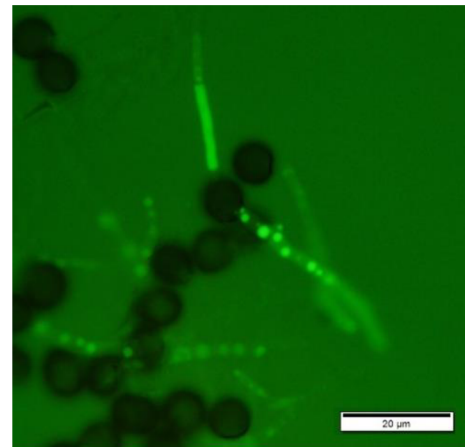
Obrázek 35: Shluk spor *S. destruens* s klíčními vlákny vykazujícími signál NO – zelená fluorescence (inkubace 4 dny při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.



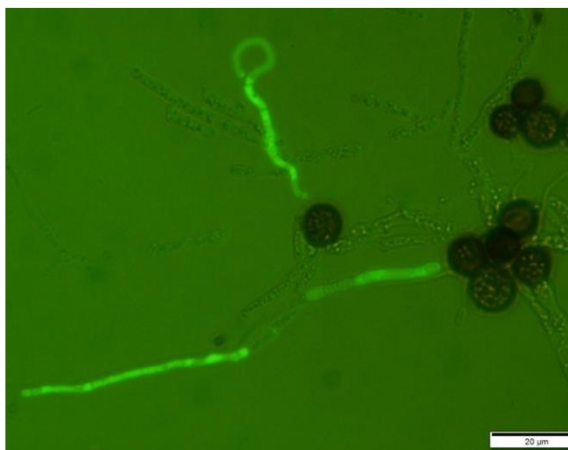
Obrázek 36: Klíčící spora *S. destruens* se signálem NO v klíčním vlákně (inkubace 4 dny při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.



Obrázek 37: Shluk klíčících spor *S. destruens* se zbytkovým signálem NO (zelená fluorescence) v klíčních vlákněch (inkubace 4 dny při teplotě 20/17 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.



Obrázek 38: Shluk klíčících spor *S. destruens* se signálem NO (zelená fluorescence) pouze v určitých místech klíčního vlákna (inkubace 4 dny při teplotě 20/17 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.



Obrázek 39: Spory *S. destruens* s dlouhými klíčovými vlákny vykazujícími signál NO (zelená fluorescence) (inkubace 4 dny při teplotě 20/17 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.

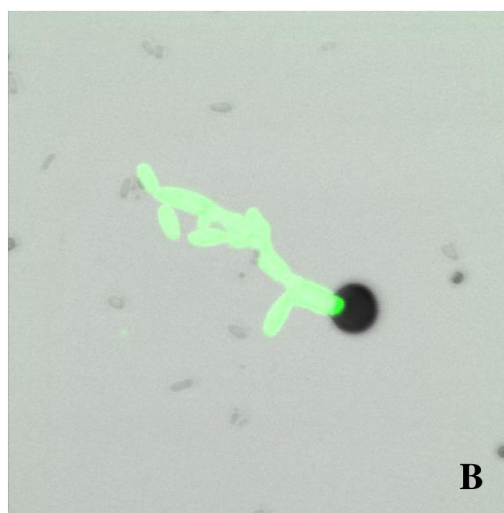
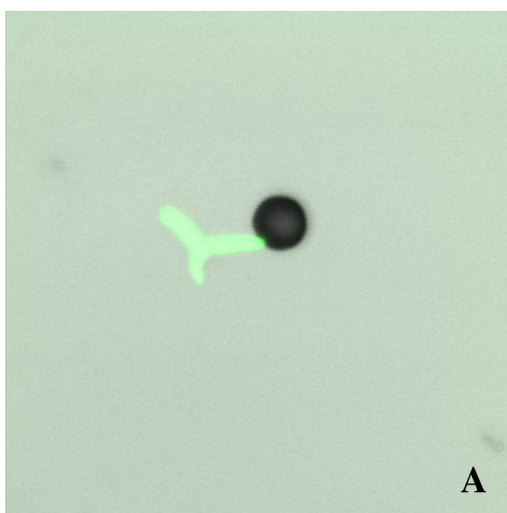


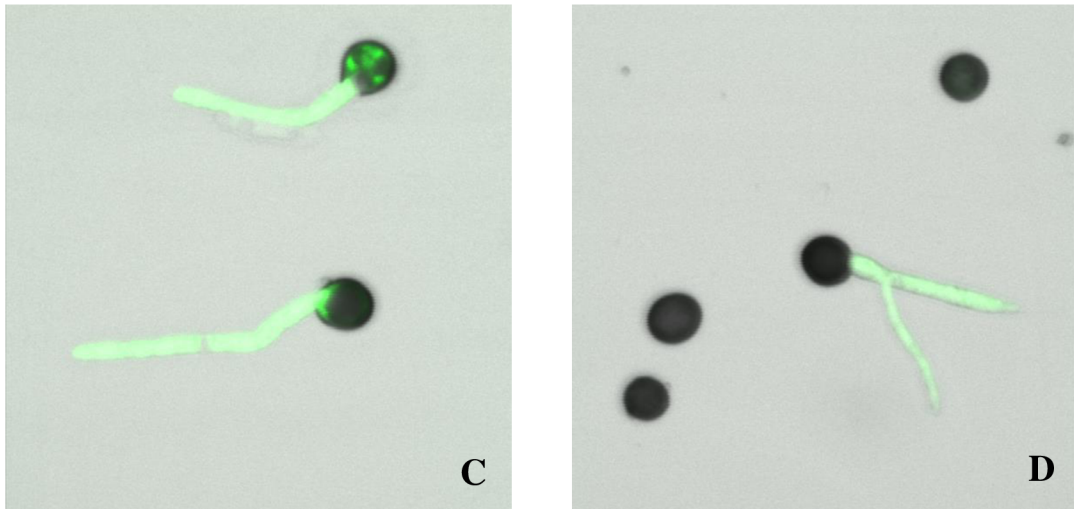
Obrázek 40: Spora *S. destruens* s rozvětveným klíčovím vláknem s fluorescencí (signál NO) (inkubace 4 dny v pokojové teplotě (~22 °C), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.

5.4 Konfokální mikroskopie

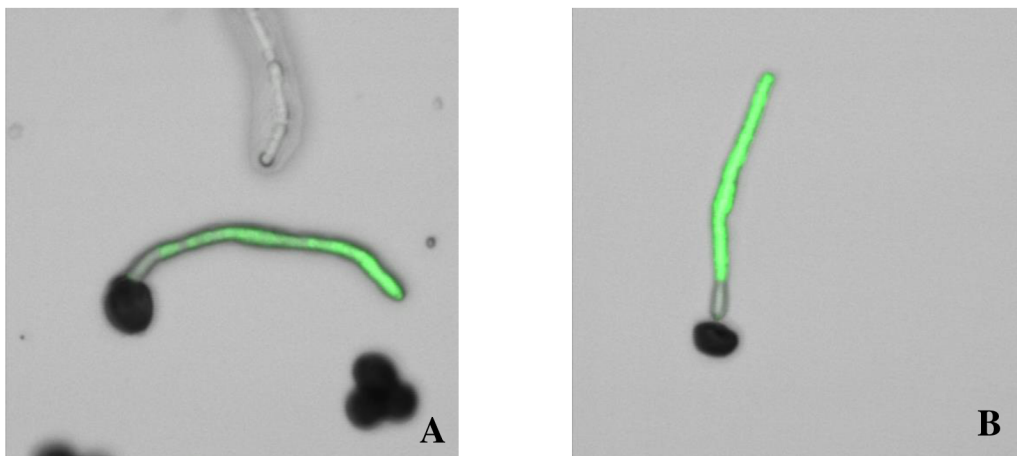
Skla se vzorky obarvená stejně jako pro fluorescenční mikroskop byla vyhodnocena konfokálním mikroskopem (excitace 488 nm, emise 505-550 nm).

Vyklíčené spory snějí se signálem ROS (Obr. 41) i NO (Obr. 42-44) v některých případech tvořily rozvětvená klíční vlákna (Obr. 41 A, B, D; 43 i 44). Na obr. 41 C je dobře vidět, že fluorescence (v tomto případě signál ROS) se prvně objevuje ve spoře a postupuje spolu s rostoucím klíčovím vláknem.

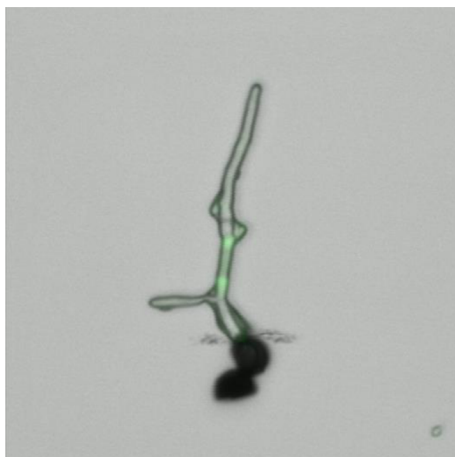




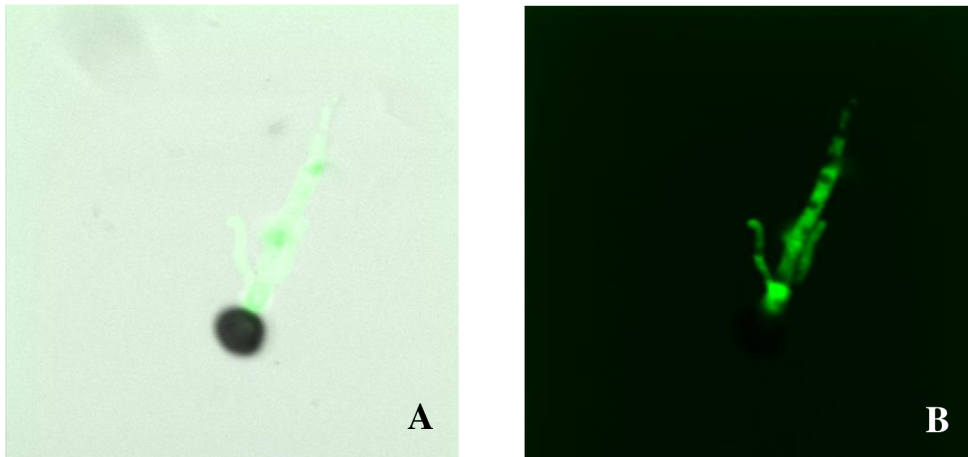
Obrázek 41: Spory *S. destruens* s klíčným vláknem vykazujícím fluorescenci (signál ROS) pod konfokálním mikroskopem (inkubace 5 dní při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí H₂DCF-DA). A, B, D – spory s rozvětvenými a různě dlouhými klíčnými vlákny; C – spory v různě pokročilém stádiu klíčení; spora v horní části obrázku v méně pokročilém, spora ve spodní části v pokročilejším stádiu klíčení. Autor: A. Bobková.



Obrázek 42: Spory *S. destruens* s klíčným vláknem vykazujícím fluorescenci (signál NO) pod konfokálním mikroskopem (inkubace 5 dní při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.



Obrázek 43: Spora *S. destruens* se zbytkovou fluorescencí v klíčném vlákně (inkubace 5 dní při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.



Obrázek 44: Spora *S. destruens* s rozvětveným klíčným vláknem (inkubace 5 dní při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). A – snímek pořízen kombinací kanálů, Nomarského diferenciální kontrast a fluorescence, B – pouze fluorescence DAF-FM DA. Autor: A. Bobková.

6 DISKUSE

Sněti jsou fakultativně biotrofní parazité planě rostoucích rostlin i kulturních plodin. Zvláště ekonomicky významné jsou snětivosti obilnin, sněti prašné (v této práci zastoupeny *Sporisorium destruens* a *Ustilago nuda*) a mazlavé (v této práci zástupce *Tilletia caries*), které do doby vytvoření spor nevykazují na rostlinách výrazné příznaky napadení. Infekce sněti může být systémová (mycelium prorůstá víceméně celou rostlinou) nebo lokální (mycelium omezuje svůj růst na určité orgány).

S. destruens napadá nejčastěji proso, má dvouletý vývojový cyklus a je rozšířena v Evropě, Asii, Austrálii, Africe i Americe. V této BP je jí věnována největší pozornost, její spory v laboratorních podmínkách dobře klíčí, navíc je proso slibnou alternativní plodinou, jejíž pěstování se může rozšířit s globálním oteplováním. *U. nuda*, jejíž klíčení bylo pilotně testováno, napadá klasy ječmene a je rozšířena hlavně v Evropě, Asii, Egyptě, Austrálii a Severní Americe. *T. caries* napadá pšenici, žito, tritikále a trávy rodu pýr, ovsík, pýrovník, testovány byly spory z napadeného klasu pšenice ozimé. *T. caries* je celosvětově rozšířená ve všech zemích, kde se pěstuje pšenice.

U *S. destruens* byla zjištěna závislost délky klíčících vláken na inkubační teplotě. Stejnému rodu byly věnovány předchozí výzkumy; Moharam et al. (2012) a Bag a Agarwal (2003) studovali *S. sorghi*, přičemž Bag a Agarwal (2003) tento druh porovnávali s dalšími třemi druhy snětí (*Cintractia axicola*, *Farysia americana* a *Ustilago cynodontis*). Jaffry a Aslam (1992) zkoumali *Sphacelotheca reiliana*, pro kterou se dnes užívá název *Sporisorium reilianum*. Tento patogen se vyskytuje i v ČR, v nejteplejších oblastech je původcem snětivosti palic a lat kukuřice, spíše cukrové než polní (Rostlinolékařský portál). Moharam et al. (2012) uvádí, že klíčivost spor na maltózovém dextrózovém agaru byla nejvyšší při 30 °C a pH 7,5. V této studii byl dále zkoumán vliv teploty skladování na životnost spor. Pokud byly sory uchovávány při teplotě 5 °C, až 80 % spor vyklíčilo i po 24 měsících skladování. Výsledky závislosti procenta vyklíčených spor na inkubační teplotě se mírně liší od výsledků studie Bag a Agarwal (2003), která uvádí, že neoptimálnější teplota pro klíčení *S. sorghi* je 25 °C. Při teplotě 25 °C vyklíčilo 69,9 % spor *S. sorghi*, oproti tomu při teplotě 30 °C jen 48,4 %. Spory byly nejprve sterilizovány v 0,25 % roztoku chlornanu sodného (NaOCl). Bag a Agarwal (2003) dále studovali, jestli má na klíčení vliv také druh agaru. Pro kultivaci použili maltózový agar (MA), bramborovo mrkvový agar (PCA), bramborovo

dextrózový agar (PDA) a vodní agar (WA) a došli k závěru, že MA nejlépe podporuje klíčivost spor, za ním následuje PDA, WA a nakonec PCA. Nejvyššího procenta klíčivosti dosahovala *S. sorghi* při 25 °C v pH 7, což se shoduje s pH doporučeným Moharam et al. (2012). Vliv teploty na klíčení *S. reilianum* zaznamenali i Jaffry a Aslam (1992). V této studii byl pro inkubaci použit bramborovo-dextrózový agar (PDA) a spory inkubovány v teplotách od 10 °C do 40 °C. Procento vyklíčených spor v teplotě 30 °C představovalo až 90 %, při 25 °C 76 % a při 35 °C jen 33 %. V teplotách 10 °C a 40 °C žádné spory nevyklíčily. Autoři uvádějí, že jejich výsledky se shodují s podobnými studiemi z let 1981 a 1979 a že optimální teplota pro klíčení *S. reilianum* je okolo 30 °C (od 27 °C do 31 °C).

V této BP sněť *S. destruens* klíčila nejlépe v teplotě 20/17 °C (12/12 h), což se liší od teploty klíčení *S. sorghi* i *S. reilianum* a souvisí s biologickými vlastnostmi jednotlivých druhů. Rozdíly najdeme např. i v rámci rodu *Tilletia*; *T. controversa* vyžaduje ke svému klíčení teploty pod 10 °C [optimum 3-8 °C (Dumalasová 2017)], oproti tomu pro *T. indica* jsou optimální teploty v rozpětí 15-25 °C (Smilanick et al. 1985), *T. caries* a *T. laevis* klíčí nejrychleji při 18-20 °C (Dumalasová 2017).

Sněti *T. caries* a *U. nuda* v teplotě 20/17 °C (12/12 h) nevyklíčily. Rostlinolékařský portál uvádí, že spory *T. caries* klíčí při teplotě 16-18 °C za 4-5 dní, Dumalasová (2017) uvádí optimální teplotu 18-20 °C. Pokud bychom brali v potaz pouze informaci z Rostlinolékařského portálu, mohli bychom uvažovat, že teplota 20 °C přes den byla pro spory příliš vysoká na to, aby byly schopné klíčit nebo pokračovat v klíčení. Pod mikroskopem byly pozorovány pouze popraskané spory. Můžeme se tedy pouze domnívat, zda noční teplota ve fytotronu (17 °C) stimulovala klíčení (popraskání spor) a denní teplota (20 °C) následně tento proces zastavila. Dumalasová (2017) však uvádí i teplotu 20 °C jako optimální, dokonce by v ní měly spory klíčit nejrychleji, proto zůstává otázkou, zda kromě teploty sehrály roli jiné i faktory prostředí (světlo/tma, vlhkost, roční období, doba skladování spor...). Spory sněti *U. nuda* v teplotě 20/17 °C také neklíčily, ani nevykazovaly žádné náznaky iniciace klíčení. Stakman (1913) pozoroval klíčení spor *U. nuda* ve vodě. V pokojové teplotě mu za 12 h vyklíčilo 20 % čerstvých spor. Dále pozoroval klíčení *U. nuda* v cukerném roztoku. Výsledky se podobaly výsledkům klíčení ve vodě. V cukerném roztoku pozoroval rozdíl v tloušťce promycelia, které bylo silnější než při klíčení ve vodě, čemuž připisoval častěji a více popraskané spory na začátku klíčení. Woldemichael (2019) uvádí, že na umělých

médiích netvoří *U. nuda* bazidiospory a rychlost růstu je pomalejší než na živé rostlině. Chladné, vlhké počasí a teploty od 15 do 22 °C představují vhodné podmínky pro infekci ječmene v období kvetení. V takovýchto podmínkách jsou květy hostitele déle otevřeny a spory tak mají delší čas na úspěšnou infekci hostitele. Will et al. (1989) pozorovali klíčení *U. nuda* v teplotách 11, 20, 27 a 30 °C. Spory nejlépe klíčily v teplotě 20 °C. Dále studovali vliv osvětlení (různé vlnové délky) a tmy na klíčení chlamydospor a porovnávali divoký kmen *U. nuda* a albínský kmen (mutace bez produkce melaninu ve stěnách spor *U. nuda*). Domnívají se, že díky melaninu jsou spory odolnější k výkyvům teplot (vyšší klíčivost při 27 i 30 °C), množství živin i nižší koncentraci kyslíku. Na základě informací z uvedených studií je těžké posoudit, proč nám spory *U. nuda* nevyklíčily, zda hrála roli teplota nebo jiný faktor. Příčinou toho, proč spory *U. nuda* ani *T. caries* nevyklíčily, mohlo být např. příliš dlouhé skladování spor nebo nedostatečně dlouhá doba inkubace.

U rzi, příbuzných biotrofních bazidiomycetů, byl také studován vliv teploty a dalších podmínek na klíčení spor a dynamiku růstu klíčících vláken. Např. Marchetti et al. (1976) hodnotili vývoj *Phakopsora pachyrhizi* (původce rzivosti sóji) v rozpětí inkubačních teplot od 5,5 do 31 ± 0,2 °C na 1,25 % vodním agaru po 4 h a 22 h. Po 4 hodinách inkubace vyklíčily urediospory *P. pachyrhizi* v rozpětí teplot 12-28,5 °C, po 22 hodinách i při 10 °C. Se zvýšením teploty z 25 na 28,5 °C množství vyklíčených spor prudce pokleslo, při 28,5 °C se postupně zastavilo. Teploty v rozmezí 15-25 °C byly pro klíčení nejprůzračnější. Bonde et al. (2007) inkubovali urediospory *P. pachyrhizi* na desce s teplotním gradientem 3 a 6 hodin. Jako optimální teploty pro klíčení uvádějí 21,00-24,37 °C. Oproti studii Bonde et al. (2007) byl tedy stanoven užší rozptyl teplot optimálních pro klíčení. Při porovnání těchto studií se potvrzuje úvodní tvrzení z článku Bonde et al. (2007), že reakce *P. pachyrhizi* na teplotu se za posledních několik desetiletí změnila jen nepatrně.

Fraser et al. (2017) zkoumali vliv teploty na klíčení teliospor, bazidiospor i urediospor rzi *Uromycladium acaciae* napadající akácii Mearnsovu (*Acacia mearnsii*). Teliospory a urediospory klíčily v teplotách mezi 5 a 30 °C, s optimem při 15-25 °C. Bazidiospory klíčily v teplotách mezi 5 a 25 °C, s optimem při 15-20 °C. Přičemž mezi 15 a 25 °C byly vyklíčené bazidiospory pozorovány již po 6 h, v nižších teplotách byly bazidiospory pozorovány až po 12 h. Všechny typy spor potřebovaly pro vyklíčení inkubační dobu 6-24 h. Spory byly inkubovány ve tmě (zabaleny v hliníkové fólii) i na

světla. Teliospory vykazovaly obecně vyšší klíčivost na světle než ve tmě. Bazidiospory naopak vykazovaly větší klíčivost ve tmě.

Kuhlman a Pepper (1994) studovali *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* na semenáčcích borovice lesní. Zabývali se vlivem teploty na klíčení bazidiospor, které byly inkubovány 24 hodin v různých teplotách. Bazidiospory klíčily v rozmezí teplot 8-32 °C, s optimem mezi 14,6 a 29,6 °C. Tato studie vycházela z podobných studií z dřívějších let.

Pokud srovnáme 3 uvedené studie, které se zabývaly vlivem teploty na klíčení urediospor, vidíme, že neoptimalnější teplota pro klíčení urediospor rží se pohybuje v rozmezí přibližně 15-25 °C. Čtvrtá studie byla zaměřena na studium bazidiospor, kdy se optimální teploty pro klíčení pohybovaly mezi 14,6-29,6 °C. Z výsledků těchto studií, i když je to poměrně malý vzorek, lze usoudit, že pokud budeme inkubovat spory rží při teplotě okolo 20 °C, máme poměrně vysokou pravděpodobnost, že nám spory vyklíčí. Podstatnou roli samozřejmě hrají i další podmínky prostředí, které je potřeba při provádění pokusů zohlednit.

Při porovnání klíčivosti spor snětí a rží vidíme rozdíl v délce inkubační doby potřebné k vyklíčení. V případě rží stačí k vyklíčení několik hodin, v případě snětí se bavíme o několika dnech. Neoptimalnější teploty pro klíčení spor snětí i rží jsou uváděny nejčastěji okolo 20 °C.

V této práci snětí *U. nuda* a *T. caries* v teplotě 20/17 °C (12/12 h) neklíčily. *S. destruens* klíčila ve všech teplotách, které byly zvoleny. Byl pozorován vztah teploty a délky klíčících vláken. Pokud by měla být tato práce v budoucnu rozšířena, bylo by vhodné zopakovat pokus s klíčením všech tří druhů na různých médiích a ve větším rozpětí inkubačních teplot, mohly by tak být zjištěny hraniční teploty pro klíčení spor těchto druhů a stanoveno optimum. Signál pro ROS (barvení pomocí H₂DCF-DA) a pro NO (barvení pomocí DAF-FM DA) byl sledován jak ve sporách, tak v klíčících vlákních *S. destruens*. V případě signálu ROS byla fluorescence více méně souvislá po celém vlákně nebo ve větší části vlákně. V případě signálu NO jsme mohli v klíčících vlákních pozorovat místa s výraznější fluorescencí. Nebyly zjištěny velké rozdíly v míře fluorescence při inkubaci v různých teplotách. Obecně spory s kratšími klíčovými vlákny (počátky klíčení) vykazovaly vyšší fluorescenci (i ve spoře), spory s delšími klíčovými vlákny nižší (signál postupně mizel), což může souviset s nižší koncentrací ve větším

objemu cytoplazmy. Na míru fluorescence tedy neměla vliv teplota a doba inkubace, ale stádium klíčení, ve kterém se klíčící spora aktuálně nacházela. U jiných biotrofních parazitů byly také prováděny studie na lokalizaci RONS. Nejvíce pozornosti bylo věnováno padlí, hlavně zástupci *Blumeria graminis*. Např. Prats et al. (2008) pomocí DAF-2 DA lokalizovali NO v apresoriu klíčící konidie (Obr. 13). Prats et al. (2005) zkoumali ječmen napadený *B. graminis* f. sp. *hordei*. Po obarvení DAF-2DA byla pozorována intenzivní fluorescence v místě kontaktu apresoria s hostitelským pletivem, slabší fluorescenci vykazovaly i další klíčící struktury. Piterková et al. (2009) lokalizovali signál NO v listech rajčat (*Solanum* spp.) infikovaných padlím *Oidium neolycopersici*. NO byl lokalizován pomocí DAF-FM DA v konidii, klíčícím vlákně i v apresoriu. V počátcích infekce listu byla intenzita fluorescence apresoria slabší oproti konidii a klíčícímu vlákně.

Pokud bychom se chtěli v budoucnu věnovat pouze druhu *S. destruens*, bylo by určitě vhodné rozšířit rozpětí inkubačních teplot (např. od 5 do 35-40 °C), abychom zjistili, při jakých teplotách už spory *S. destruens* nejsou schopny vyklíčit a jestli se výsledky shodují s výsledky nebo podobají výsledkům klíčení spor *S. sorghi* a *S. reilianum*, na které byly již studie provedeny. Tyto studie zkoumaly také vliv pH na klíčivost. Tento faktor jsme v naší práci též nezohlednili a může být námětem pro další výzkumy.

Nejvhodnější teplota pro klíčení spor *S. destrues* byla 20/17 °C, procento vyklíčených spor ani délky klíčících vláken v této teplotě se však významně nelišily od pokojové teploty (Tab. 3, Obr. 28 a 29). Při inkubaci v pokojové teplotě ale agar, i když byla podložní sklička s agarem uzavřena ve vlhké komůrce, více vysychal a některá klíčící vlákna byla porušena, což nebylo pro pozorování RONS vhodné. Také fluorescenční signál byl slabší (protože spory v této teplotě klíčily rychleji a byly tím pádem po 4 dnech v pokročilejším stádiu klíčení, než spory inkubované v teplotě 15/10 °C). Sušší agar také komplikoval barvení, kdy se spory při nanesení barviva a následně i destilované vody nutné pro přikrytí krycím sklíčkem snadno odplavovaly a shlukovaly. Klíčící vlákna se vlivem proudu vody odtrhávala od spor, a pokud vykazovalo fluorescenci pouze klíčící vlákno, ale spora už ne, bylo obtížné zjistit, zda spora nevyklíčila, nebo zda od ní bylo klíčící vlákno vlivem naší manipulace (barvení, příprava preparátu pro pozorování pod mikroskopem) odtrženo. Pro účely barvení a pozorování RONS byla naopak vhodnější inkubace v teplotě 15/10 °C, kdy sice nevyklíčilo tolik spor, ani klíčící vlákna nebyla tak dlouhá, ale nepřekrývala se, spory

mezi sebou měly větší rozestupy a bylo tak možné pořídit lepší snímek. V nižší teplotě také klíčily pomaleji a bylo i po 4 dnech inkubace vidět více vyklíčených spor nejen s fluorescencí v klíčním vlákně, ale také v samotné spoře. Spory bylo vhodné barvit hned po vytažení z vlhké komůrky, kdy byl agar ještě vlhký a vyklíčené spory se tím pádem tolik neodplavovaly.

V dalších experimentech by bylo vhodné studovat RONS pozorované u *S. destrunes* více do hloubky. Mohla by být měřena např. intenzita fluorescenčního signálu v klíčních vláknech, provedeny experimenty s inhibitory RONS. Dále by bylo vhodné studovat vliv dalších faktorů prostředí, které by mohly mít vliv na průběh klíčení a infekci hostitele. Nové informace o metabolismu RONS a o jeho úloze během infekce hostitele patogenem by mohly přispět k dokonalejšímu pochopení mechanismů tvorby NO a ROS u fytopatogenních mikromycet (sněží) a také procesů probíhajících během infekce hostitele.

7 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byl zpracován literární přehled k problematice studia RONS u fytopatogenních hub a v experimentální části podrobně studováno klíčení sněti *Sporisorium destruens* v teplotách 15/10 °C, resp. 20/17 °C (12/12 h světlo/tma) a v pokojové teplotě. Ve dvou nezávislých experimentech byl zhodnocen poměr vyklíčených spor a délky klíčnicích vláken v těchto třech teplotách. Nejvyšší poměr vyklíčených spor byl pozorován při teplotě 20/17 °C, v pokojové teplotě byl velmi podobný. V případě porovnávání délky klíčnicích vláken byl na základně Kruskal-Wallisova testu vztah závislosti délky klíčnicích vláken na inkubační teplotě označen jako signifikantní. Dále byl proveden test mnohonásobného porovnávání, kterým bylo potvrzeno, že v teplotě 15/10 °C vyklíčí jinak dlouhá klíčnicí vlákna než v teplotě 20/17 °C nebo v pokojové teplotě. Naopak délka klíčnicích vláken v teplotě 20/17 °C se neliší od délky v pokojové teplotě (~22 °C).

Signál ROS a NO byl pozorován v cytoplazmě u spor *S. destruens* s krátkými klíčnicími vlákní (v počátcích klíčení) ve spoře i v klíčnicím vlákně, později jen v klíčnicím vlákně, do něhož je cytoplazma během růstu vtlačována.

Pro zemědělství je studium interakce mezi rostlinami, patogeny a prostředím důležité, protože získané poznatky pomáhají k eliminaci ztrát úrody zapříčiněných infekcí patogeny. I přes používání pesticidů jsou ztráty úrody poměrně vysoké, proto je potřeba pochopit mechanismy vzniku choroby, patogeneze a imunity rostlin a tyto poznatky využít k obraně rostlin před patogeny.

8 DIDAKTICKÁ ČÁST – pracovní list

Téma sněti i obecněji fytopatogenních hub je odborné, ale vzhledem k hospodářskému dopadu by mohlo být využito k doplnění znalostí ve vyšších ročnících gymnázia, v biologickém semináři nebo na střední zemědělské škole. Doporučená literatura: Sedlářová M., Mieslerová B., Drábková Trojanová Z., Lebeda A. (2021) Biotrofní houby a peronosporý planě rostoucích rostlin. Česká fytopatologická společnost, Praha, 168 str. On-line ke stažení na <https://www.vurv.cz/cspp/publikace.html>.

Pracovní list: Sněti a ostatní houbové patogeny rostlin

Jméno a příjmení:

Datum:

1. Přečti si vybrané pasáže ze dvou článků, které byly publikovány v časopise *Živa a zodpověz otázky.*

„I v době, kdy jsme schopni ošetřovat lány polí pěstované rostliny účinnými syntetickými pesticidy, způsobují choroby rostlin každoročně celosvětové obrovské ztráty na výnosech zemědělských plodin, a výrazně také snižují jejich kvalitu. Přibližné ztráty u pěti významných plodin jsou u pšenice 10,1 - 28,1 %, rýže 24,6 - 40,9 %, kukuřice 19,5 - 41,1 %, brambor 8,1 - 21 % a sóji 11 - 32,4 %.“ (Janda 2020).

„Rozšíření rzi *Hemileia vastatrix* na kávovníkových plantážích v britských koloniích druhé poloviny 19. stol. vedla k jejich devastaci a přechodu na pěstování čajovníku. V Británii se díky tomu rozmohlo ve větší míře pití čaje na rozdíl od předchozí preference kávy. Paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*) přetvářející obilky obilnin ve sklerocia zase působila lokální epidemie otrav v různých částech Evropy a Severní Ameriky od starověku až do konce 19. stol. I v současnosti, kdy máme rozsáhlé možnosti včasné detekce a identifikace parazitických hub a účinné prostředky na jejich hubení, dochází ke kalamitním škodám na zemědělských plodinách. Příkladem mohou být nové virulentní kmeny rzi travní (*Puccinia graminis*), které se šíří z Afriky a snižují výnosy pšenice při silném napadení až o 70 %. Kvůli pěstování obilnin formou velkoplošných jednodruhových polí je těžké zabránit šíření nákazy. Celosvětovým problémem je také druh *Magnaporthe grisea*, parazitující na rýži


– roční ztráty způsobené tímto druhem by podle odhadů vystačily pro nasycení 60 milionů lidí.

O úspěchu rostliny v obraně zásadně rozhoduje její imunita, resp. mechanismy rezistence. Abychom je byli schopni efektivně využít v zemědělství, je potřeba těmto mechanismům co nejlépe porozumět.“ (Koudelková a Koukol 2017).

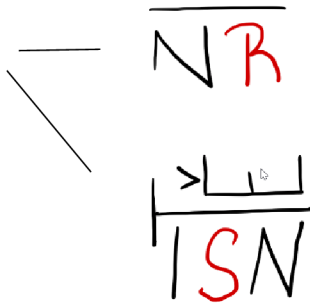
- **Proč je pro zemědělství důležité studovat interakce mezi rostlinami, patogeny a prostředím?**
- **Jak velké procentuální ztráty výnosu pšenice může způsobit rez travní při silném napadení?**
- **Co bylo příčinou přechodu od pěstování kávovníku k pěstování čajovníku v britských koloniích ve 2. polovině 19. století?**
- **Které choroby snižují výnos obilí?**
- **Houba *Magnaporthe grisea* způsobuje plísňovou chorobu rýže, která se vyskytuje v 85 zemích světa a každoročně způsobuje obrovské ztráty. Kolik lidí by odhadem nasýtila tato zničená úroda?**

2. Rozlušti přesmyčky s názvy biotrofních řádů, které patří do oddělení Oomycota, Ascomycota a Basidiomycota. (Nápověda: červeně je označeno počáteční písmeno slova, napravo jsou samohlásky, nalevo souhlásky, střídavě kombinuj).

OOMYCOTA — R P S N R **P** E O^{3x} Y

ASCOMYCOTA 
K V Ř D **K** A E A Y
C V K Č L **P** A I O I E
L D **P** A Í

BASIDIOMYCOTA



3. Jaké orgány pšenice napadá rez a jaké orgány napadá sněť?

4. Přiřaď definice.

SPORY

Hyfy parazita upravená k čerpání živin od hostitele

SPORIDIE

Aktivní průnik parazita do buněk/pletiv hostitele

KONJUGACE

Splynutí buněk

PROLIFERACE

Hojné opakované množení buněk

APRESORIUM

Buňky hub, sloužící

k rozmnožování/přečkání nepříznivého období

PENETRACE

Rozšířená část klíčnicí hyfy

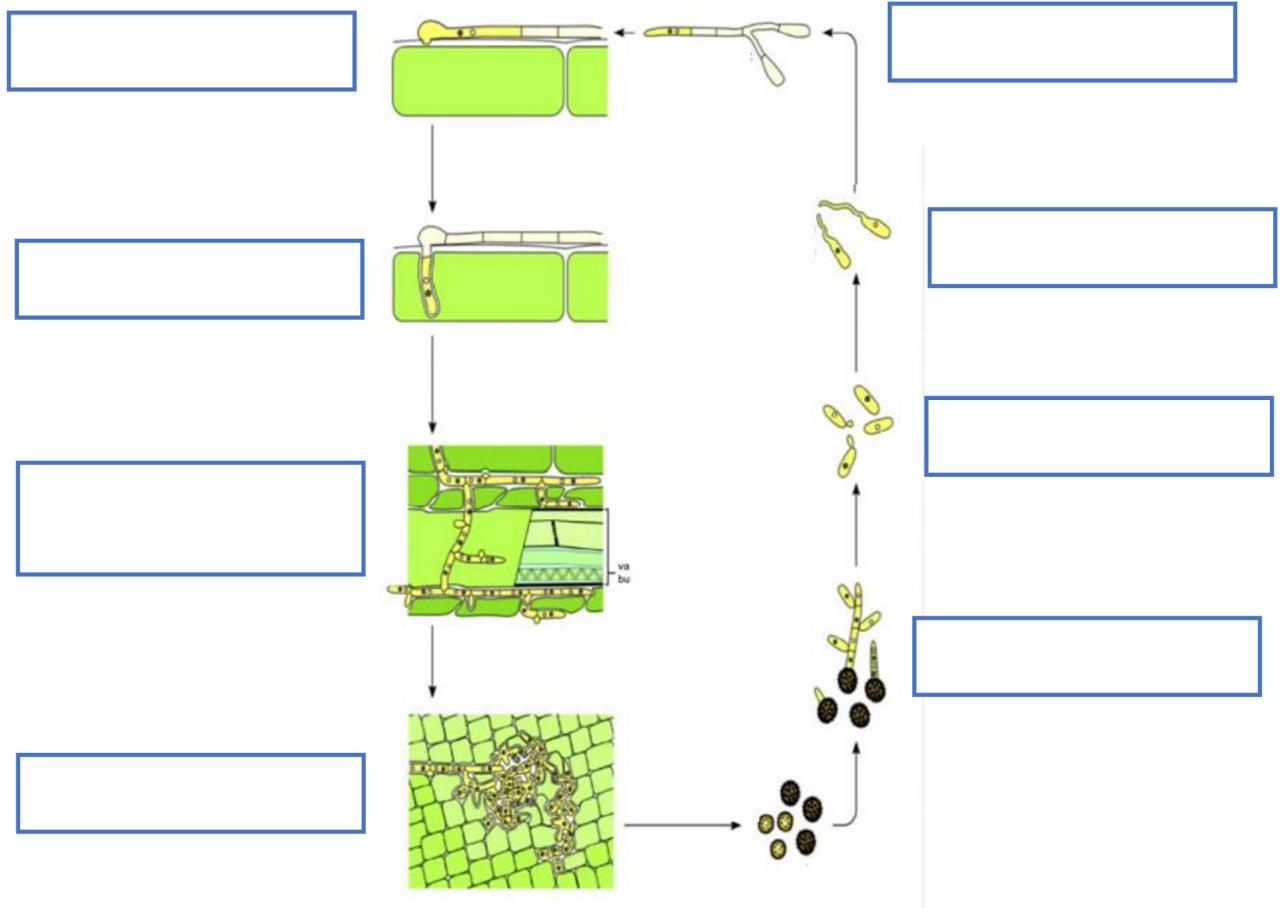
u parazitických hub, kterou pevně přilnou k povrchu hostitele

HAUSTORIUM

Haploidní bazidiospory vznikající u rzi a snětí při klíčení „zimních“ spor

5. Do políček v obrázku doplň pojmy označující jednotlivé fáze životního cyklu sněti.

(doplňuj: dikaryotické vlákno, konjugace, haploidní sporidie, proliferace, klíčení spor, penetrace, tvorba apresoria, prorůstání hyf a haustorií).



6. Rozlušti názvy strategií parazitů a přiřaď k nim správné definice

F R T **B** I O O

Parazit, který napadá a využívá živá pletiva, aniž by je záměrně usmrcoval

F R T R K **N** E O O

Napadá živá pletiva, která rychle po napadení usmrtí a pak z nich čerpá živiny/energii

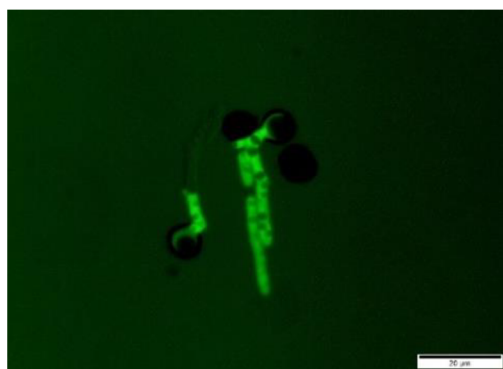


Sněti jsou fakultativně biotrofní parazité

Zástupci snětí bývají obvykle dimorfní, střídají saprofytickou kvasinkovitou haploidní fází a parazitickou vláknitou dikaryotní fází. Sněti tedy řadíme mezi biotrofy (potřebují ke svému životu živou hostitelskou rostlinu), ale jejich kvasinková stádia můžeme po omezenou dobu pěstovat v umělé kultuře. Pro svůj další vývoj a reprodukci však potřebují hostitelskou rostlinu a bez hostitelských pletiv odumírají. Jsou tedy fakultativně biotrofní paraziti.

7. K pozorování morfologie struktur fytopatogenních hub se využívá mikroskopie.

Přiřaď k mikrofotografiím spor snětí, jestli se jedná o mikroskopii ve světlém poli nebo mikroskopii fluorescenční. Na které fotografii spory klíčí?



a.



b.

8. Jak moc obtížný pro tebe byl tento pracovní list na škále od 1 do 5? (1 – velmi lehký, 5 – velmi obtížný)

Řešení pracovního listu – pro vyučující

1. Přečti si vybrané pasáže ze dvou článků, které byly publikovány v časopise *Živa* a zodpověz na otázky.

„I v době, kdy jsme schopni ošetřovat lány polí pěstované rostliny účinnými syntetickými pesticidy, způsobují choroby rostlin každoročně celosvětové obrovské ztráty na výnosech zemědělských plodin, a výrazně také snižují jejich kvalitu. Přibližné ztráty u pěti významných plodin jsou u pšenice 10,1 - 28,1 %, rýže 24,6 - 40,9 %, kukuřice 19,5 - 41,1 %, brambor 8,1 - 21 % a sóji 11 - 32,4 %.“ (Janda 2020).

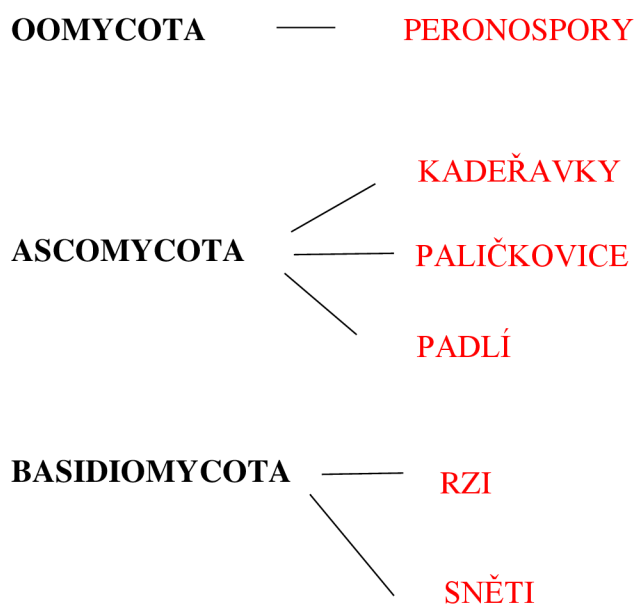
„Rozšíření rzi *Hemileia vastatrix* na kávovníkových plantážích v britských koloniích druhé poloviny 19. stol. vedla k jejich devastaci a přechodu na pěstování čajovníku. V Británii se díky tomu rozmohlo ve větší míře pít čaje na rozdíl od předchozí preference kávy. Paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*) přetvářející obilky obilnin ve sklerocia zase působila lokální epidemie otrav v různých částech Evropy a Severní Ameriky od starověku až do konce 19. stol. I v současnosti, kdy máme rozsáhlé možnosti včasné detekce a identifikace parazitických hub a účinné prostředky na jejich hubení, dochází ke kalamitním škodám na zemědělských plodinách. Příkladem mohou být nové virulentní kmeny rzi travní (*Puccinia graminis*), které se šíří z Afriky a snižují výnosy pšenice při silném napadení až o 70 %. Kvůli pěstování obilnin formou velkoplošných jednodruhových polí je těžké zabránit šíření nákazy. Celosvětovým problémem je také druh *Magnaporthe oryzae*, parazitující na rýži – roční ztráty způsobené tímto druhem by podle odhadů vystačily pro nasycení 60 milionů lidí.

O úspěchu rostliny v obraně zásadně rozhoduje její imunita, resp. mechanismy rezistence. Abychom je byli schopni efektivně využít v zemědělství, je potřeba těmto mechanismům co nejlépe porozumět.“ (Koudelková a Koukol 2017).

- **Proč je pro zemědělství důležité studovat interakce mezi rostlinami, patogeny a prostředím? Aby byla eliminována ztráta úrody zapříčiněná infekcí patogeny. I přes používání pesticidů jsou ztráty úrody poměrně vysoké, proto je potřeba pochopit mechanismy vzniku choroby, patogeneze a imunity rostlin a tyto poznatky využít k obraně rostlin před patogeny.**

- Jak velké procentuální ztráty výnosu pšenice může způsobit rez travní při silném napadení? **Až 70%.**
- Co bylo příčinou přechodu od pěstování kávovníku k pěstování čajovníku v britských koloniích ve 2. polovině 19. století? **Rozšíření rzi *Hemileia vastatrix* na kávovníkových plantážích.**
- Které choroby snižují výnos obilí? **Rez, sněť, paličkovice.**
- Houba *Magnaporthe grisea* způsobuje plísňovou chorobu rýže, která se vyskytuje v 85 zemích světa a každoročně způsobuje obrovské ztráty. Kolik lidí by odhadem nasýtila tato zničená úroda? **Roční ztráty způsobené houbou *Magnaporthe grisea* by podle odhadů vystačily pro nasycení 60 milionů lidí.**

2. Rozlušti přesmyčky s názvy biotrofních řádů, které patří do oddělení **Oomycota, Ascomycota a Basidiomycota**. (Nápověda: červeně je označeno počáteční písmeno slova, napravo jsou samohlásky, nalevo souhlásky, střídavě kombinuj).



3. Jaké orgány pšenice napadá rez a jaké orgány napadá sněť?

Rez napadá fotosyntetizující orgány pšenice (list, stonek, květ/květenství), sněť napadá vždy určitý orgán krytosemenných rostlin, na který se specializuje. U pšenice je to květenství.

4. Přiřad' definice.

SPORY ... buňky hub, sloužící k rozmnožování/přečkání nepříznivého období

SPORIDIE ... haploidní bazidiospory vznikající u rzi a snětí při klíčení „zimních“ spor

KONJUGACE ... splynutí buněk

PROLIFERACE ... hojné opakované množení buněk

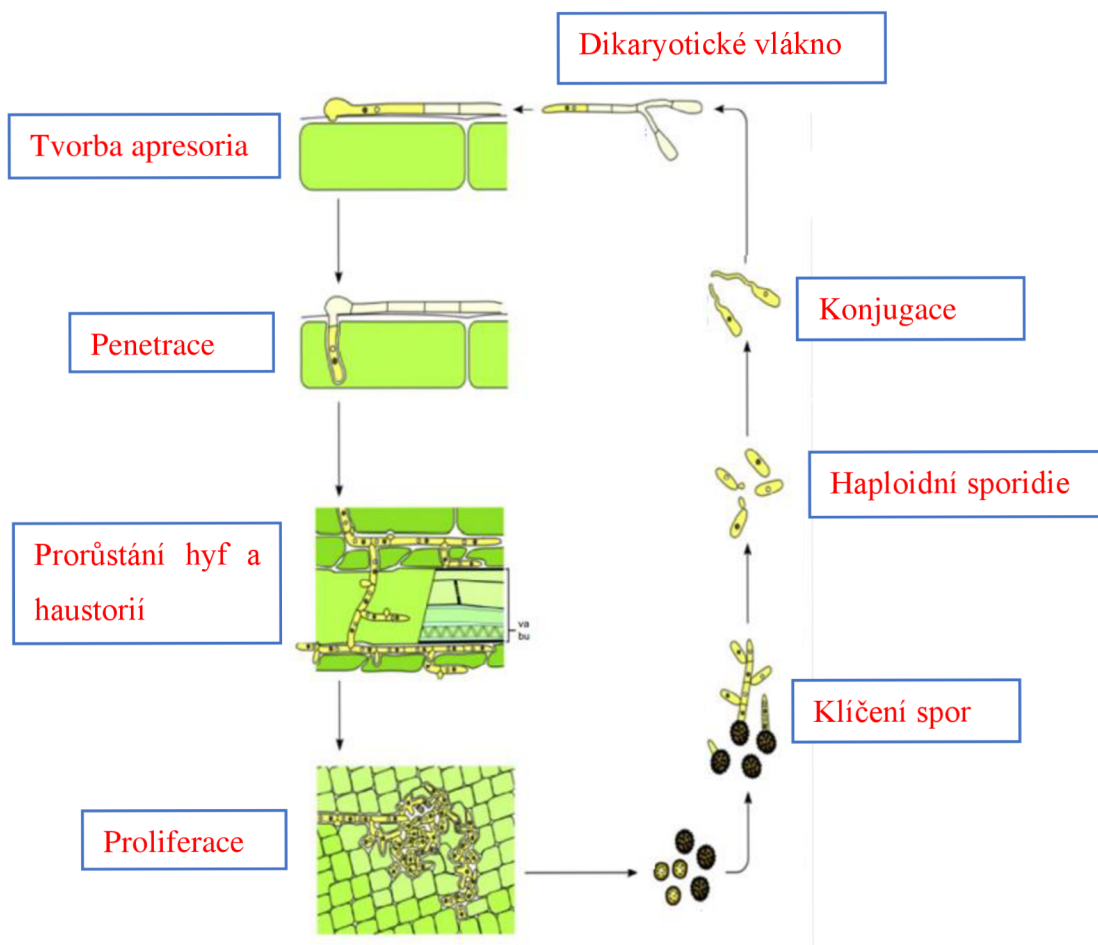
APRESORIUM ... rozšířená část klíční hyfy u parazitických hub, kterou pevně přilnou k povrchu hostitele

PENETRACE ... aktivní průnik parazita do buněk/pletiv hostitele

HAUSTORIUM ... hyfa parazita upravená k čerpání živin od hostitele

5. Do políček v obrázku doplň pojmy označující jednotlivé fáze životního cyklu snětí.

(doplňuj: dikaryotické vlákno, konjugace, haploidní sporidie, proliferace, klíčení spor, penetrace, tvorba apresoria, prorůstání hyf a haustorií).



6. Rozlušti slova a přiřaď definice

BIOTROF ... napadá a využívá živá pletiva, aniž by je záměrně usmrcoval

NEKROTROF ... napadá živá pletiva, která rychle po napadení usmrtí a pak z nich čerpá živiny/energii

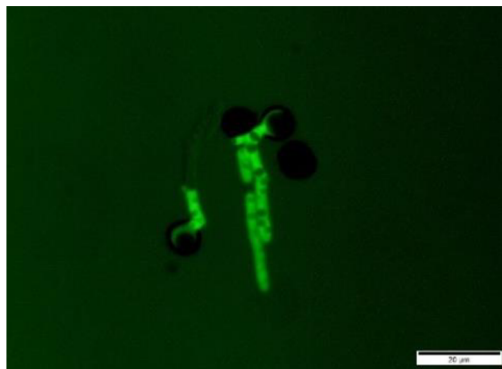


Sněti jsou fakultativně biotrofní parazité

Zástupci sněti bývají obvykle dimorfní, střídají saprofytickou kvasinkovitou haploidní fází a parazitickou vláknitou dikaryotní fází. Sněti tedy řadíme mezi biotrofy (potřebují ke svému životu živou hostitelskou rostlinu), ale jejich kvasinková stádia můžeme po omezenou dobu pěstovat v umělé kultuře. Pro svůj další vývoj a reprodukci však potřebují hostitelskou rostlinu a bez hostitelských pletiv odumírají. Jsou tedy fakultativně biotrofní paraziti.

7. K pozorování morfologie struktur fytopatogenních hub se využívá mikroskopie.

Přiřaď k mikrofotografiím spor sněti, jestli se jedná o mikroskopii ve světlém poli nebo mikroskopii fluorescenční. Na které fotografii spory klíčí?



a.

Fluorescenční mikroskopie

(Na této fotografii vidíme klíčící spory sněti *Sporisorium destruens*)



b.

Mikroskopie ve světlém poli

9 SEZNAM LITERATURY

- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J. (2016): Nitric oxide in the offensive strategy of fungal and oomycete plant pathogens. *Frontiers in Plant Science* 7(252). doi:10.3389/fpls.2016.00252.
- Bag, M. K., Agarwal, D. K. (2003): Studies on germination of teliospore of four smut fungi. *Journal of Mycopathological Research* 41(1), 51-54.
- Bonde, M. R., Berner, D. K., Nester, S. E., Frederick, R. D. (2007): Effects of temperature on urediniospore germination, germ tube growth, and initiation of infection in soybean by *Phakopsora* isolates. *Phytopathology* 97(8), 997-1003.
- Cano-Domínguez, N., Bowman, B., Peraza-Reyes, L., Aguirre, J. (2019): *Neurospora crassa* NADPH Oxidase NOX-1 Is Localized in the Vacuolar System and the Plasma Membrane. *Frontiers in Microbiology* 10, 1825. doi:10.3389/fmicb.2019.01825.
- Cánovas, D., Marcos, J. F., Marcos, A. T., Strauss, J. (2016): Nitric oxide in fungi: is there NO light at the end of the tunnel?. *Current Genetics* 62, 513-518. doi: 10.1007/s00294-016-0574-6.
- Chethana, K. W. T., Jayawardena, R. S., Chen, Y. J., Konta, S., Tibpromma, S., Phukhamsakda, C. et al. (2021): Appressorial interactions with host and their evolution. *Fungal Diversity* 110, 75–107. doi: 10.1007/s13225-021-00487-5.
- Cohn, C. A., Pedigo, C. E., Hylton, S. N., Simon, S. R., Schoonen, M. A. (2009): Evaluating the use of 3'-(p-Aminophenyl) fluorescein for determining the formation of highly reactive oxygen species in particle suspensions. *Geochemical Transactions* 10(1), 1-9. doi: 10.1186/1467-4866-10-8.
- Conrath, U., Amoroso, G., Köhle, H., Sültemeyer, D.F. (2004): Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry. *The Plant Journal* 38(6), 1015-1022. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02096.x.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B. (2013): Nitro-oxidative stress vs. oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytologist* 199(3), 633-635.
- Corpas, F. J., González-Gordo, S., Palma, J.M. (2021): Protein nitration: A connecting bridge between nitric oxide (NO) and plant stress. *Plant Stress* 2, 100026. doi: 10.1016/j.stress.2021.100026.

- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A. (2006): Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany* 57(3), 449-459. doi: 10.1093/jxb/erj027.
- Doehlemann, G., Schirawski, J., Kämper, J. (2014): Functional Genomics of Smut Fungi: From Genome Sequencing to Protein Function. *Advances in Botanical Research* 70, 143–172. doi: 10.1016/B978-0-12-397940-7.00005-7.
- Dumalasová, V. (2017): Sněti, obilí a šlechtění k rezistenci. *Živa* 2017(6), 278-281.
- Egan, J. M., Wang, Z., Jones, A. M., Smirnov, N., Talbot, J. N. (2007): Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(28), 11772-11777. doi: 10.1073/pnas.0700574104.
- Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz, M., Milczarek, G., Jelen, H., Jackowiak, H. (2007): Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen. *New Phytologist* 175(4), 718-730. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02142.x.
- Fraser, S., McTaggart, A. R., Wingfield, M. J., Roux, J. (2017): Effect of temperature, leaf wetness and the developmental stage of host tissue on infection of *Acacia mearnsii* by *Uromykladium acaciae* (Pucciniales). *Australasian Plant Pathology* 46(5), 407-419. doi: 10.1007/s13313-017-0503-2.
- Harris, J. M., Balint-Kurti, P., Bede, J. C., Day, B., Gold, S., Goss, E. M., Grenville-Briggs L. J. et al. (2020): What are the top 10 unanswered questions in molecular plant-microbe interactions?. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 33(12), 1354-1365. doi: 10.1094/MPMI-08-20-0229-CR.
- Hejtmánek, M. (2001): Úvod do světelné mikroskopie. V Olomouci: Univerzita Palackého. ISBN 80-244-0333-1.
- Heller, J., Tudzynski, P. (2011): Reactive Oxygen Species in Phytopathogenic Fungi: Signaling, Development, and Disease. *Annual Review of Phytopathology* 49, 369-390. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095355.

Hetrick, E. M., Schoenfisch, M. H. (2009): Analytical Chemistry of Nitric Oxide. Annual Review of Analytical Chemistry 2, 409-433. doi: 10.1146/annurev-anchem-060908-15514.

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

Jaffry, A. H., Aslam, M. (1992): Effect of different temperatures on the germination of *Sphacelotheca reiliana* (Kuhn) Clint spores. Pakistan Journal of Agricultural Research 13(3), 299-300.

Jahnová J., Tichá T., Kubienová L., Luhová L., Petřivalský M. (2013): Biologické funkce a význam S-nitrosace proteinů. Chemické listy 107, 350-355.

Janda, M. (2020): Co nám přináší výzkum interakce rostlin s patogeny?. Živa 1, 10-11.

Jedelská, T., Luhová, L., Petřivalský, M. (2021): Nitric oxide signalling in plant interactions with pathogenic fungi and oomycetes. Journal of Experimental Botany 72(3), 848-863. doi: 10.1093/jxb/eraa596.

Jones, K., Zhu, J., Jenkinson, C.B., Kim, D.W., Pfeifer, M.A., Khang, C.H. (2021): Disruption of the Interfacial Membrane Leads to *Magnaporthe oryzae* Effector Relocation and Lifestyle Switch During Rice Blast Disease. Frontiers in Cell and Developmental Biology 9, 1449. doi: 10.3389/fcell.2021.681734.

Klán, J. (1989): Co víme o houbách. V Praze: Státní pedagogické nakladatelství. ISBN 80-04-21143-7.

Koudelková, B., Koukol, O. (2017): Fascinující houby – jak o nich učit a kde je najít. Živa 5, CXIX – CXXI.

Kubienová, L., Tichá, T., Jahnová, J., Luhová, L., Petřivalský, M. (2013): S-nitrosoglutathionreduktasa: klíčový enzym regulace S-nitrosylace. Chemické listy 107, 202-208.

Kubínová, L. (2006): Pohledy do trojrozměrného mikrosvěta: konfokální a dvoufotonová mikroskopie. Živa 6, 245-248.

- Kuhlman, E. G., Pepper, W. D. (1994): Temperature effects on basidiospore germination and on infection of slash pine seedlings by *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*. *Phytopathology* 84(7), 735-739.
- Kupková, Z., Beneš, L. (2004): Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chemické Listy* 98, 116-122.
- Lai, T., Chen, Y., Li, B., Qin, G., & Tian, S. (2014): Mechanism of *Penicillium expansum* in response to exogenous nitric oxide based on proteomics analysis. *Journal of Proteomics* 103, 47-56. doi: 10.1016/j.jprot.2014.03.012.
- Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S. E., Metraux, J. P. (2015): Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112, 54-62. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.08.027.
- Ma, S., Lapin, D., Liu, L., Sun, Y., Song, W., Zhang, X., Logemann, E. et al. (2020): Direct pathogen-induced assembly of an NLR immune receptor complex to form a holoenzyme. *Science* 370(6521):eabe3069. doi: 10.1126/science.abe3069.
- Marková, J. (2006): Rzi a sněti, houby podobné a přesto vzdálené. *Vesmír* (85)10, 596-599.
- Marschall, R., Tudzynski, P. (2016): Reactive oxygen species in development and infection processes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 57, 138-146. doi: 10.1016/j.semcd.2016.03.020.
- Marchetti, M. A., Melching, J. S., Bromfield, K. R. (1976): The effects of temperature and dew period on germination and infection by urediospores of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology* 66, 461-463.
- McTaggart, A. R., Shivas, R. G., Geering, A. D. W., Vanky, K., Scharaschkin, T. (2012a): A review of the *Ustilago-Sporisorium-Macalpinomyces* complex. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 29(1), 55-62. doi: 10.3767/003158512X660283.
- McTaggart, A.R., Shivas, R.G., Geering, A.D.W., Vanky, K., & Scharaschkin, T. (2012b): Taxonomic revision of *Ustilago*, *Sporisorium* and *Macalpinomyces*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 29(1), 116-132. doi: 10.3767/003158512X661462.

- Miranda, K. M., Espey, M. G., Wink, D. A. (2001): A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62-71. doi: 10.1006/niox.2000.0319.
- Moharam, M. H. A., Leclerque, A., Koch, E. (2012): Cultural characteristics of *Sporisorium sorghi* and detection of the pathogen in plant tissue by microscopy and polymerase chain reaction. *Phytoparasitica* 40(5), 475-483. doi: 10.1007/s12600-012-0248-y.
- Moné, Y., Monnin, D., Kremer, N. (2014): The oxidative environment: a mediator of interspecies communication that drives symbiosis evolution. *Proceedings of the Royal Society B* 281: 20133112. doi: 10.1098/rspb.2013.3112.
- Mur, L. A., Mandon, J., Cristescu, S. M., Harren, F. J., Prats, E. (2011): Methods of nitric oxide detection in plants: A commentary. *Plant Science* 181(5), 509-519. doi:10.1016/j.plantsci.2011.04.003.
- Ostrý, V. (1998): Vlákňité mikroskopické houby (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka. V Praze: Státní zdravotní ústav. ISBN 80-7071-102-7.
- Piterková, J., Petřivalský, M., Luhová L., Mieslerová, B., Sedlářová, M., Lebeda, A. (2009): Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Molecular Plant Pathology* 10(4), 501-513. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00551.x.
- 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): Konfokální mikroskop. *Vesmír* 74, 508.
- Plášek, J., Reischig, J. (1995): Kontrast v optické mikroskopii. *Vesmír* 74, 638.
- Plášek, J. (2004): Více než pouhý mikroskop. *Vesmír* 83, 586-588.
- Prats, E., Carver, T. L. W., Mur, L. A. J. (2008): Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus. *Blumeria graminis*. *Research in Microbiology* 159, 476-480. doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00266.x.

Prats, E., Mur, L. A. J., Sanderson, R., Carver, T. L. W. (2005): Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular Plant Pathology* 6, 65-78. doi:10.1016/j.resmic.2008.04.001.

Ramkumar, J. (2020): Spectrophotometry: Timeless Workhorse of Analytical Chemistry. *Oriental Journal of Physical Sciences* 5, 1-2. doi:10.13005/OJPS05.01-02.01.

Sabol, P., Pilátová, J., (2020): Jak funguje imunita u rostlin?. *Živa* 1,17.

Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., Bootman, M. D. (2014): Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbour Protocols* 10, 1042-1065. doi:10.1101/pdb.top071795.

Schlicht, M., Kombrink, E. (2013): The role of nitric oxide in the interaction of *Arabidopsis thaliana* with the biotrophic fungi, *Golovinomyces orontii* and *Erysiphe pisi*. *Frontiers in Plant Science* 4(351). doi:10.3389/fpls.2013.00351.

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. doi: 10.1007/s10658-010-9626-9.

Sedlářová, M., Kubienová, L., Drábková Trojanová, Z., Luhová, L., Lebeda, A., Petřivalský, M. (2016): The Role of Nitric Oxide in Development and Pathogenesis of Biotrophic Phytopathogens and Downy and Powdery Mildews. *Advances in Botanical Research*. 77, 263-283. doi: 10.1016/bs.abr.2015.10.002.

Sedlářová, M., Luhová, L. (2017): Re-Evaluation of Imaging Methods of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants and Fungi: Influence of Cell Wall Composition. *Frontiers of Physiology* 8, 826. doi: 10.3389/fphys.2017.00826.

Sedlářová, M., Mieslerová, B., Drábková Trojanová Z., Lebeda, A. (2021): Biotrofní houby a peronosporý planě rostoucích rostlin (Biotrophic fungal and oomycete parasites of wild plants). *Česká fytopatologická společnost, Praha*, 168 str. ISBN 978-80-903545-6-2 (print).

- Segal, L.M., Wilson, R.A. (2018): Reactive oxygen species metabolism and plant-fungal interactions. *Fungal Genetics and Biology* 110, 1-9. doi: 10.1016/j.fgb.2017.12.003.
- Segal, A.W. (2016): NADPH oxidases as electrochemical generators to produce ion fluxes and turgor in fungi, plants and humans. *Open Biology* 6(5), 160028. doi: 10.1098/rsob.160028.
- Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H. J., Nagano, T. (2003): Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *Journal of Biological Chemistry* 278(5), 3170-3175. doi: 10.1074/jbc.M209264200.
- Shetty, N.P., Jørgensen, H.J.L., Jensen, J.D., Collinge, D.B., Shetty, H.S. (2008): Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 121(3), 267-280. doi: 10.1007/s10658-008-9302-5.
- Smilanick, K. L., Hoffmann, J. A., Royer, M. H. (1985): Effect of temperature, pH, light, and desiccation on teliospore germination of *Tilletia indica*. *Phytopathology* 75, 1428–1431.
- Stakman, E. C. (1913): Spore germinations of cereal smuts, Vol. 133. University Farm.
- Turrion-Gomez, J.L., Benito, E.P. (2011): Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant. *Molecular plant pathology* 12(6), 606-616. doi: 10.1111/J.1364-3703.2010.00695.X.
- van der Linde, K., and Göhre, V. (2021): How do smut fungi use plant signals to spatiotemporally orientate on and in planta?. *Journal of Fungi* 7(2), 107. doi: 10.3390/jof7020107.
- Vinter, V., Hašler, P. (2018): Praktikum z anatomie vyšších rostlin. V Olomouci: Univerzita Palackého ISBN 978-80-244-5267-8.
- Vishwakarma, A., Wany, A., Pandey, S., Bulle, M., Kumari, A., Kishorekumar, R. et al. (2019): Current approaches to measure nitric oxide in plants. *Journal of Experimental Botany* 70(17), 4333-4343. doi:10.1093/jxb/erz242.

Will III, O. H., Strom, K., Wollmuth, T. W., Thomas, P. L. (1989): Effects of light, temperature, nutrients, and aeration on the germination of wild type and albino teliospores of *Ustilago nuda*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11, 368-372.

Woldemichael, M. D. (2019): Importance, biology, epidemiology, and management of Loose Smut (*Ustilago nuda*) of barley (*Hordeum vulgare*): A Review. *East African Journal of Sciences* 13(1), 89-108.

Zhang, Z., Chen, Y., Li, B., Chen, T., Tian, S. (2020): Reactive oxygen species: A generalist in regulating development and pathogenicity of phytopathogenic fungi. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18, 3344-3349. doi: 10.1016/j.csbj.2020.10.024.

Zhao, H., Kalivendi, S., Zhang, H., Joseph, J., Nithipatikom, K., Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B. (2003): Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Free Radical Biology and Medicine* 34, 1359-1368. doi: 10.1016/S0891-5849(03)00142-4.

10 WEBOVÉ ZDROJE

Agilent (2021): An Introduction to Reactive Oxygen Species - Measurement of ROS in Cells [online] [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/>

Index Fungorum [online]. [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <http://www.indexfungorum.org/>

PaDIL [online]. [cit. 2022-03-15]. Dostupné z: <https://www.padil.gov.au/>

Plant Parasites of Europe [online]. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: <https://bladminerders.nl/>

Rostlinolékařský portál [online]. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: https://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Původ reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) a jejich pleiotropní účinky na buňky. NADPH-oxidázy (Nox) katalyzují vznik superoxidového anionu ($O_2^{\cdot-}$), který je dále přeměněn na peroxid vodíku (H_2O_2) enzymem superoxiddismutázou (SOD). H_2O_2 může dále reagovat s Fe^{2+} za vzniku hydroxylového radikálu (HO^{\cdot}) tzv. Fentonovou reakcí. Oxid dusnatý ($\cdot NO$) je syntetizován z L-argininu působením NO syntázy (NOS), nitrát reduktázou (NR) či xantin oxidoreduktázou (XOR) a může dále reagovat s $O_2^{\cdot-}$ za vzniku peroxydusitanu ($OONO^{\cdot-}$) (upraveno podle: Moné et al. 2014).	11
Obrázek 2: Mechanismy tvorby a rozkladu ROS u fytopatogenních hub (upraveno podle: Zhang et al. 2020).	14
Obrázek 3: Sled událostí, který vyvolává nitrooxidační stres jako reakci na stresové podmínky (upraveno podle: Corpas et al. 2021).	17
Obrázek 4: Infekce rostliny biotrofním patogenem. S – spora, G – klíčící vlákno, A – apresorium, I – infekční hyfa, H – haustorium (převzato z: Chethana et al. 2021).	20
Obrázek 5: Infekce rostliny nekrotrofním patogenem. S – spora, G – klíčící vlákno, A – apresorium, I – infekční hyfa, N – nekrotická (odumřelá) tkáň (upraveno podle: Chethana et al. 2021).	20
Obrázek 6: Průběh infekce buněk rýže hemibiotrofní houbou <i>Magnaporthe oryzae</i> (upraveno podle: Jones et al. 2021).	21
Obrázek 7: Znárodnění procesu pronikání vláknitých hub do rostlinného pletiva. (a) přichycení apresoria k povrchu listu (b) osmotický tak vtlačuje penetrační hrot houby do rostlinného pletiva (převzato ze: Segal 2016).	22
Obrázek 8: Apresorium houby <i>Magnaporthe oryzae</i> pronikající přes buněčnou stěnu do rostlinné buňky (převzato ze: Sabol a Pilátová 2020).	23
Obrázek 9: Schéma principu epifluorescenčního mikroskopu (převzato z: wikipedie, autor: Henry Mühlpfordt).	26
Obrázek 10: Stokesův posun (převzato z: wikipedie, autor: Vojtěch Dostál).	27
Obrázek 11: Schéma principu konfokálního mikroskopu (převzato z: Kubínová 2006).	28

Obrázek 12: Reakční mechanismus DAF-2DA (převzato z: Vishwakarma et al. 2019)	31
Obrázek 13: Detekce NO v apresoriu klíčící konidie padlí <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> pomocí DAF-2 DA (převzato z: Prats et al. 2008)	32
Obrázek 14: Detekce ROS v klíčících konidiích <i>Magnaporthe grisea</i> pomocí H ₂ DCF-DA (převzato z: Egan et al. 2007)	32
Obrázek 15: Životní cyklus sněti (upraveno podle: Doehlemann et al. 2014)	34
Obrázek 16: Přehled různých druhů snětí, u kterých byla studována časoprostorová orientace v rostlině. V levé polovině obrázku je uvedeno místo prvotní infekce rostliny snětí, v pravé místo tvorby teliospor (upraveno podle: van der Linde a Göhre 2021)	35
Obrázek 17: Klas prosa napadený snětí <i>S. destruens</i> (převzato z: https://www.padil.gov.au/)	37
Obrázek 18: Spory <i>S. destruens</i> zobrazeny skenovací elektronovou mikroskopií (SEM) (převzato z: https://www.padil.gov.au/)	37
Obrázek 19: Klas pšenice napadený snětí <i>T. caries</i> (převzato z: https://www.padil.gov.au/)	38
Obrázek 20: V horní polovině obrázku zdravý klas ječmene, v dolní polovině klas ječmene napadený snětí <i>U. nuda</i> (převzato z: https://www.padil.gov.au/)	39
Obrázek 21: Klíčící spory <i>S. destruens</i> se zeleným signálem ROS v klíčících vláknech (3 dny). Autor: A. Bobková	41
Obrázek 22: Detail spory <i>S. destruens</i> s rozvětveným klíčícím vláknem (3 dny). Autor: A. Bobková	41
Obrázek 23: Mikrofotografie klíčících spor <i>S. destruens</i> v různém stádiu klíčení (7 dní). V některých případech je viditelná fluorescence i ve sporách (začátek klíčení), v jiných pouze v klíčícím vlákně, v dalších případech fluorescence z klíčících vláken pomalu mizí (pokročilejší fáze klíčení). Autor: A. Bobková	41
Obrázek 24: Mikrofotografie spor <i>T. caries</i> v procházejícím světle. Autor: A. Bobková	42
Obrázek 25: Mikrofotografie chlamydospor <i>T. caries</i> s viditelnou síťovitou strukturou na povrchu. Autor: A. Bobková	42

Obrázek 26: Příklady kontaminací – mnohobuněčné tmavě zbarvené konidie <i>Alternaria</i> sp. a neidentifikovaná askomyceta ve světlém poli. Autor: A. Bobková.....	42
Obrázek 27: Příklad kontaminace sklíčkové kultury s <i>T. caries</i> – pravděpodobně <i>Cladosporium</i> sp. Autor: A. Bobková.....	42
Obrázek 28: Rozdíly v délce klíčnicích vláken (v μm) spor <i>S. destruens</i> inkubovaných ve fytotronu v teplotě 15/10 °C (12/12 h světlo/tma), 20/17 °C (12/12 h světlo/tma) a v laboratoři v pokojové teplotě (9/15 h světlo/tma). Porovnávány hodnoty z 1. vyhodnocení.....	44
Obrázek 29: Rozdíly v délce klíčnicích vláken (v μm) spor <i>S. destruens</i> inkubovaných ve fytotronu v teplotě 15/10 °C (12/12 h světlo/tma), 20/17 °C (12/12 h světlo/tma) a v laboratoři v pokojové teplotě (9/15 h světlo/tma). Porovnávány hodnoty z 2. vyhodnocení.....	45
Obrázek 30: Detail spory <i>S. destruens</i> s klíčnicím vláknem vykazujícím fluorescenci (signál ROS) (inkubace 4 dny při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí H ₂ DCF-DA). Autor: A. Bobková.....	46
Obrázek 31: Spora <i>S. destruens</i> s rozvětveným klíčnicím vláknem v horní části mikrofotografie (inkubace 4 dny při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí H ₂ DCF-DA). Autor: A. Bobková.....	46
Obrázek 32: Klíčení <i>S. destruens</i> , napravo spora s rozvětveným klíčnicím vláknem a bazidiosporami (inkubace 4 dny při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí H ₂ DCF-DA). Autor: A. Bobková.....	46
Obrázek 33: Shluky klíčnicích spor <i>S. destruens</i> se signálem ROS v klíčnicích vláknech vykazujících fluorescenci (inkubace 4 dny při teplotě 20/17 °C (12/12 h), barvení pomocí H ₂ DCF-DA). Autor: A. Bobková.....	46
Obrázek 34: Detail tří spor <i>S. destrunes</i> , z nichž pouze jedna klíčí vláknem vykazujícím signály ROS – zelená fluorescence (inkubace 4 dny v pokojové teplotě (~ 22 °C), barvení pomocí H ₂ DCF-DA). Autor: A. Bobková.....	46
Obrázek 35: Shluk spor <i>S. destruens</i> s klíčnicími vlákny vykazujícími signál NO – zelená fluorescence (inkubace 4 dny při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.....	47

Obrázek 36: Klíčící spora <i>S. destruens</i> se signálem NO v klíčícím vlákně (inkubace 4 dny při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.	47
Obrázek 37: Shluk klíčících spor <i>S. destruens</i> se zbytkovým signálem NO (zelená fluorescence) v klíčících vláknech (inkubace 4 dny při teplotě 20/17 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.	47
Obrázek 38: Shluk klíčících spor <i>S. destruens</i> se signálem NO (zelená fluorescence) pouze v určitých místech klíčícího vlákna (inkubace 4 dny při teplotě 20/17 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.	47
Obrázek 39: Spory <i>S. destruens</i> s dlouhými klíčovými vlákny vykazujícími signál NO (zelená fluorescence) (inkubace 4 dny při teplotě 20/17 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.	48
Obrázek 40: Spora <i>S. destruens</i> s rozvětveným klíčícím vláknem s fluorescencí (signál NO) (inkubace 4 dny v pokojové teplotě (~22 °C), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.	48
Obrázek 41: Spory <i>S. destruens</i> s klíčícím vláknem vykazujícím fluorescenci (signál ROS) pod konfokálním mikroskopem (inkubace 5 dní při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí H ₂ DCF-DA). A, B, D – spory s rozvětvenými a různě dlouhými klíčovými vlákny; C – spory v různě pokročilém stádiu klíčení; spora v horní části obrázku v méně pokročilém, spora ve spodní části v pokročilejším stádiu klíčení. Autor: A. Bobková.	49
Obrázek 42: Spory <i>S. destruens</i> s klíčícím vláknem vykazujícím fluorescenci (signál NO) pod konfokálním mikroskopem (inkubace 5 dní při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.	49
Obrázek 43: Spora <i>S. destruens</i> se zbytkovou fluorescencí v klíčícím vlákně (inkubace 5 dní při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). Autor: A. Bobková.	49
Obrázek 44: Spora <i>S. destruens</i> s rozvětveným klíčícím vláknem (inkubace 5 dní při teplotě 15/10 °C (12/12 h), barvení pomocí DAF-FM DA). A – snímek pořízen kombinací kanálů, Nomarského diferenciální kontrast a fluorescence, B – pouze fluorescence DAF-FM DA. Autor: A. Bobková.	50

12 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Reaktivní formy kyslíku. Jejich označení a chemická struktura (převzato z: Piterková et al. 2005).....	12
Tabulka 2: Reaktivní formy dusíku. Jejich označení a chemická struktura.	16
Tabulka 3: Poměr vyklíčených spor (v %) a délky klíčnicích vláken (v μm) sněti <i>Sporisorium destruens</i> inkubované po dobu 4 dnů ve třech různých teplotách.	43
Tabulka 4: Výsledné p hodnoty testu mnohonásobného porovnávání z 1. vyhodnocení. Kurzivou jsou označeny hodnoty $p < 0,05$	44
Tabulka 5: Výsledné p hodnoty testu mnohonásobného porovnávání z 2. vyhodnocení. Kurzivou jsou označeny hodnoty $p < 0,05$	44