

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv NO na proces klíčení

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Michal Smažák
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 6. května 2011

Touto cestou bych rád poděkoval své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení a všestrannou pomoc při práci na teoretické i experimentální části předložené bakalářské práce. Také děkuji za poskytnutí studijní literatury a cenné rady a připomínky.

Dále děkuji RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za poskytnutí rostlinného materiálu a pomoc při práci na konfokálním mikroskopu.

Můj velký dík také patří mým rodičům za všestrannou a obětavou pomoc a podporu při studiu a vypracování předložené bakalářské práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Michal Smažák
Název práce	Vliv NO na proces klíčení
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011

Abstrakt

Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) jsou vysoce reaktivní molekuly, vznikající v nízké koncentraci běžně v procesech aerobního metabolismu. ROS mohou řadou různých mechanismů ovlivnit metabolické pochody živé buňky. Míra jejich působení je závislá na druhu a koncentraci dané formy, a může ovlivnit jak buněčnou signalizaci, vedoucí k narušení homeostáze a navození různých metabolických pochodů, tak indukovat fyziologický stres, vedoucí často až k buněčné smrti. Oxid dusnatý (NO) jakožto zástupce RNS je nízkomolekulární paramagnetická plynná látka, která je zapojena jako signální molekula v regulaci mnoha metabolických dějů, a podílí se také na nitrosativním stresu živých buněk.

Experimentální část bakalářské práce je zaměřena na studium vlivu NO na proces klíčení pylu vyšších rostlin a spor houbových organismů. Při klíčení pylu byla pozorována po lokální aplikaci donoru NO na růstové medium ke klíčícím pylovým zrnům inhibice klíčení pylu, ztlouštění apikální části pylové láčky, destrukce pylové láčky a její lyze, reorientace růstu pylové láčky. Při klíčení spor byl pozorován mírně inhibiční vliv NO na klíčení a růst houbových hyf, reorientace klíčících vláken nebyla detekována. S využitím fluorescenční a konfokální mikroskopie byla lokalizována tvorba ROS a RNS v klíčícím pylu a houbových sporách s/bez lokálně aplikovaného donoru NO do blízkosti klíčících objektů.

Klíčová slova:	Askorbát, c-PTIO, <i>Cucumis sativus</i> , hyfa, klíčení, <i>Morchella esculenta</i> , nitrosoglutathion, <i>Oidium neolycopersici</i> , oxid dusnatý, pyl, pylová láčka, reaktivní formy kyslíku/dusíku, spora
Počet stran:	76
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Michal Smažák
Title	Effect of NO on the germination process
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2011

Abstract

Reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species are highly reactive molecules produced in low concentrations during aerobic metabolism processes. ROS affect many of metabolic mechanisms in living cells. The extent of their effect depends on the type and concentration of the particular form, and can influence cell signalisation leading to disruption of homeostasis and induction of various metabolic pathways, or induce physiological stress, often leading to the cell death. Nitric oxide (NO) as a representant of the RNS is a low-molecular-weight paramagnetic gas, which is involved as a signalling molecule in the regulation of many metabolic processes, and also contributes to the nitrosative stress of living cells.

The experimental part of this work is focused on the study of the effect of NO on the germination process of higher plants pollen and spores of fungal organisms. During pollen germination process after donation NO on growth medium close to germinating pollen, inhibition of pollen growth, enlargement of apical part, destruction of pollen tube and cel lysis and reorientation of the pollen tube were observed. During germination of spores, slight inhibitory effect of NO on the germination and growth was observed, reorientation of growing fungal hyphae was not shown. Using fluorescent and confocal laser microscopy ROS and RNS in germination of pollen and fungal spores with and without NO donated from external sources were detected.

Key words:	Ascorbate, c-PTIO, <i>Cucumis sativus</i> , germination, hyphae, <i>Morchella esculenta</i> , nitric oxide, nitrosoglutathione, <i>Oidium neolycopersici</i> , pollen, pollen tube, reactive oxygen/nitrogen species, spore.
Number of pages:	76
Number of appendices:	0
Language:	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
1. Úvod	10
2. Reaktivní formy dusíku a kyslíku	11
2.1 Reaktivní formy kyslíku	12
2.2 Reaktivní formy dusíku	18
3. Úloha RNS a ROS	21
3.1 Úloha RNS a ROS při klíčení pylu	22
3.2 Úloha RNS a ROS při klíčení houbových spor	31
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4. Materiál a přístroje	41
4.1 Chemikálie	41
4.2 Rostlinný materiál	41
4.3 Přístroje a experimentální vybavení	41
5. Použité metody	42
5.1 Příprava růstového media pro klíčení pylu	42
5.2 Příprava růstového media pro klíčení spor	42
5.3 Příprava S-nitrosoglutathionu (GSNO)	42
5.4 Lokalizace RNS a ROS	42
6. Zavedení metodiky lokální aplikace donoru NO	44
6.1 Metoda využívající mikromanipulátor	44
6.2 Kapková metoda	45
6.3 Mikroskopování a dokumentace pozorovaných objektů	46
7. Výsledky a diskuse	47
7.1 Porovnání metody využívající mikromanipulátor a kapkové metody	47
7.2 Studium vlivu lokální aplikace donoru NO na vývoj pylové láčky	49
7.2.1 Vývoj pylové láčky	49
7.2.2 Vliv lokální aplikace donoru NO na vývoj pylové láčky	50
7.2.3 Vliv na inhibici růstu pylové láčky	50
7.2.4 Vliv na rozšíření apikální části pylové láčky	51
7.2.5 Vliv na destrukci a buněčnou lyzi pylové láčky	52
7.2.6 Vliv na směr vývoje pylové láčky	52
7.2.7 Detekce ROS a NO v procesu klíčení pylu	53
7.2.8 Detekce ROS a NO v klíčícím pylu pomocí konfokální mikroskopie	54
7.2.8.1 Detekce ROS v klíčícím pylu bez přidání donoru	54

7.2.8.2 Detekce ROS v zesílené apikální části pylové láčky	55
7.2.8.3 Detekce ROS v případě reorientace růstu pylové láčky	56
7.2.8.4 Detekce NO konfokální mikroskopií	57
7.3 Studium vlivu aplikace donoru NO na vývoj spor smrže	57
7.3.1 Vývoj hyf smrže obecného	57
7.3.2 Vliv lokální aplikace donoru NO na vývoj spor smrže	57
7.3.3 Inhibiční vliv NO na růst krátkých klíčnicích vláken spor	57
7.3.4 Vliv NO na růst dlouhých klíčnicích vláken spor	59
7.3.5 Vliv na destrukci a buněčnou lyzi klíčnicího vlákna	59
7.3.6 Vliv NO na orientaci klíčnicího vlákna smrže obecného	59
7.3.7 Produkce NO a ROS při klíčení spor smrže obecného	60
7.3.7.1 Úloha aktivních forem kyslíku při klíčení spor hub	60
7.3.7.2 Detekce ROS a NO fluorescenční mikroskopií	61
7.3.7.3 Detekce ROS a NO pomocí konfokální mikroskopie	62
7.4 Studium vlivu lokální aplikace donoru NO na vývoj spor padlí rajčatového	63
7.4.1 Vývoj hyf padlí rajčatového	63
7.4.2 Vliv lokální aplikace donoru NO na vývoj spor padlí	64
7.4.3 Inhibiční vliv NO na klíčení hyf padlí rajčatového	64
7.4.4 Produkce NO a ROS při klíčení spor padlí rajčatového	66
7.4.4.1 Detekce ROS a NO fluorescenční mikroskopií	66
7.4.4.2 Detekce ROS a NO konfokální mikroskopií	67
8. Závěr	69
LITERATURA	70
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	75

CÍLE PRÁCE

V teoretické části bylo cílem bakalářské práce zpracovat dostupné informace týkající se úlohy reaktivních forem dusíku a kyslíku v procesu klíčení pylu a spor.

- a) charakterizace RNS a ROS (formy, jejich vznik a degradace),
- b) produkce a lokalizace ROS a RNS v procesu klíčení pylu a spor,
- c) fyziologická funkce ROS a RNS v procesu klíčení.

V experimentální části bylo cílem:

- a) zavést v laboratoři techniku mikromanipulace při mikroskopickém pozorování (manipulace s mikromanipulátory, mikrokapilárou, invertovaná mikroskopie),
- b) zavést alternativní metodu vhodnou pro aplikaci donoru NO a studium vlivu NO na proces klíčení,
- c) stanovit vliv lokální aplikace NO na vývoj pylové láčky, klíčného vlákna u spor hub,
- d) lokalizovat produkci ROS a NO pomocí fluorescenčních sond v procesu klíčení u pylu a spor (symbiotický saprofyt *Morchella esculenta*, biotrofní patogen *Oidium neolycopersici*),
- e) lokalizovat produkci a detekovat změnu hladiny ROS a NO pomocí fluorescenčních sond v procesu klíčení u pylu a spor po donaci NO z lokálního vnějšího zdroje.

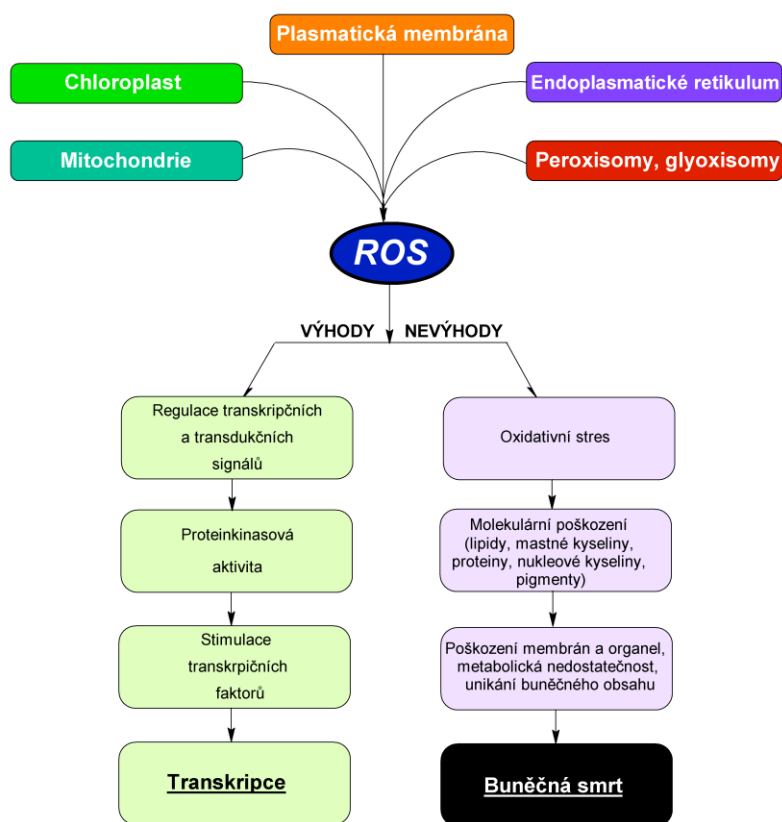
TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod

Významná role reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) v biologii hub, rostlin, živočichů a člověka byla potvrzena v řadě studií realizovaných v posledním období. Jedná se o molekuly schopné spustit na jedné straně kaskádu různých regulačních a signálních procesů (Forman, Maiorino et al., 2010), na straně druhé vznikající jako nežádoucí produkty oxidativního metabolismu po vystavení organismu stresovým podmínkám. Zvýšená produkce ROS a RNS je schopna vyvolat poškození složek buněčných organel, které v krajním případě mohou vést až k buněčné smrti (Circu & Aw, 2010).

ROS a RNS vznikají zejména v buněčných organelách s vysokou metabolickou aktivitou a intenzivním aerobním metabolismem, jako jsou např. mitochondrie, chloroplasty, peroxisomy, endoplasmatické retikulum (ER) nebo za účasti enzymů kotvených v cytoplasmatické membráně buňky (obr. 1).

Vzhledem k neopomenutelné fyziologické a metabolické funkci ROS a RNS je jejich hladina v buňce přísně regulovaná již na genetické úrovni. Tyto geny kódují řadu antioxidantních systémů podílejících se na snížení a regulaci RNS a ROS.



Obr. 1

Místa vzniku ROS a jejich možné fyziologické důsledky na rostlinnou buňku (Převzato z Ahmad et al., 2008).

V posledních letech byly prokázány zajímavé metabolické a fyziologické funkce RNS a ROS v buňkách jak rostlinných, tak buňkách hub. Jedná se například o inhibici a negativní reorientaci klíčení pylových láček (Prado et al., 2004), prolomení dormance a navození klíčení semen vyšších rostlin (Bailly et al., 2008) nebo indukovanou tvorbu apresoria (Shafiei et al., 2007) případně inhibici klíčení určitých druhů houbových spor (Lazar et al., 2008).

Předložená bakalářská práce se zabývá problematikou ROS a RNS, jejich vzniku, degradace a mechanismu působení na molekulární úrovni na základě nejnovějších poznatků z literatury se zaměřením na rostliny a houby. Cílem experimentální části bakalářské práce bylo zdokumentovat vliv oxidu dusnatého (NO) a jeho možné patofyziologické dopady na klíčení houbových spor dvou rozdílných organismů, biotrofního patogenu a symbiotického saprofytu a pylu vyšších rostlin.

2. Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Každá živá buňka je velice dynamický systém podrobený přísné regulaci svých metabolických drah. Buňka je schopna přijímat různé podněty z prostředí chemické nebo fyzikální povahy, ale také na ně odpovídajícím způsobem reagovat. Vlivem působení vnějších podnětů dochází ke zvýšené produkci ROS a RNS v buňce. Pokud jsou rostlinné nebo mykotické organismy vystaveny působení abiotických stresových faktorů, jako je vysoká nebo nízká intenzita světla, teplotní extrém, sucho, vysoká salinita nebo nedostatek minerálních látek, je rovnováha mezi produkcí a schopností degradace ROS a RNS narušena, což často vede často k oxidačnímu poškození buňky (Spsychalla & Desborough, 1990).

Vlivem zvýšené koncentrace ROS a RNS může dojít k poškození lipidů, proteinů a DNA (McCord, 2000). ROS a RNS mají schopnost zahájit řadu autooxidativních řetězových reakcí, především v reakci s nenasycenými mastnými kyselinami. Byla prokázána peroxidace membránových lipidů, často vedoucí k fatálnímu poškození membrány, úniku buněčného obsahu a následné buněčné smrti u organismů vystavených působení stresových faktorů způsobujících zvýšení produkce ROS a RNS (Smirnoff, 2000). Další potenciální hrozbou zvýšené hladiny ROS a RNS je oxidativní poškození proteinů vedoucí k chemické modifikaci vázaných aminokyselin, k poškození peptidového řetězce a zvýšené náchylnosti k proteolýze. ROS a RNS mohou také vyvolat poškození DNA, mohou být příčinou delece, mutace a dalších genetických změn, které jsou skryté nebo se projeví v pozměněném fenotypu organismu, případně se může jednat o poškození fatální (Srivalli et al., 2003).

ROS a RNS nemají na buňku pouze negativní vliv, jak ukázal výzkum v posledních letech. Je už obecně známé, že RNS a ROS mají významnou regulační funkci na transdukcii buněčného signálu, hlavně signálů transkripčních. Pod pojmem transdukce signálu rozumíme přenos signálu – vnějšího podnětu buňky, dovnitř buňky, s následným zesílením signálu, jeho vyhodnocením a zpracováním vedoucím k odpovědi buňky posilující schopnost organismu přežít působení stresových faktorů. Například v odpovědi na napadení rostliny patogenem (bakteriální nebo houbové onemocnění) dochází k produkci rostlinného polysacharidu kalosy, je posílený proces lignifikace vedoucí ke zpevnění buněčné stěny rostlinné buňky v místě poranění nebo napadení patogenem, čímž se zabraňuje napadení dalších buněk, jakožto i pronikání houbových hyf do rostlinného těla (Bowell & Daudi, 2009). Vzhledem k významu a neopomenutelné biologické funkci ROS a RNS v živém organismu je jejich hladina v buňce striktně kontrolována. ROS a RNS vznikají mechanismem oxidačně-redukčních reakcí, především v těch buněčných organelách, kde dochází k rychlé metabolické aktivitě a intenzivnímu toku elektronů, zejména mitochondrie, peroxisomy a chloroplasty. Hustou sítí těchto organel můžeme najít především v části rostlin s intenzivním růstem a látkovou výměnou, např. růstové vrcholy, klíčky semen, vznikající pylové láčky, zakládající se noduly stonků, místa větvení a narůstání bočních kořenů apod.

2.1 Reaktivní formy kyslíku

Jak je patrné z obr. 1, v případě ROS se jedná o molekuly nepodcenitelného významu, v mnoha směrech ovlivňující základní metabolické pochody buňky, a tedy důležité pro fyziologii rostlin obecně. Přehled různých forem ROS tvořících se v živých organismech je uveden v tabulce 1.

Tab. 1

Přehled nejčastěji se vyskytujících reaktivních forem kyslíku v rostlinné buňce (Převzato z Piterková et al., 2005).

<i>Název sloučeniny</i>	<i>Struktura</i>
<i>Singletový kyslík</i>	$^1\text{O}_2$
<i>Superoxidový anion-radikál</i>	$\text{O}_2^{\cdot-}$
<i>Hydroxylový radikál</i>	HO^{\cdot}
<i>Hydroxylový ion</i>	OH^-
<i>Perhydroxylový radikál</i>	$\text{O}_2\text{H}^{\cdot}$
<i>Peroxid vodíku</i>	H_2O_2

Produkce ROS v buňce může být lokalizována v různých organelách, zejména v těch, kde probíhá intenzivní aerobní metabolismus. Mezi specifické dráhy tvorby patří např. Mehlerova reakce probíhající v chloroplastech. Primárním produktem je superoxidový radikál $[O_2^{\cdot-}]$, z něhož mohou vzniknout postupně nebezpečnější hydroxylové radikály a H_2O_2 . Mehlerova reakce probíhá při nízké koncentraci $NADP^+$, např. při nedostatečně rychlé zpětné oxidaci NADPH v Calvinově cyklu. (Ahmad et al., 2008). Dalšími reakcemi, při kterých mohou vznikat ROS, jsou také elektronový transportní řetězec v mitochondriích a glyoxylátový cyklus v peroxisomech (Miller et al., 2008). Přehledně jsou zdroje ROS uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2

Přehled zdrojů reaktivních forem kyslíku (Převzato z Piterková et al., 2005)

<i>Forma kyslíku</i>	<i>Zdroj:</i>
O_2	atmosférický kyslík, PSII, různé enzymy (superoxiddismutasa, katalasa)
$O_2^{\cdot-}$	osvětlené chloroplasty, PSII a PSI, mitochondrie v přítomnosti NADH, Fe-S proteiny, cytochrom P450, elektronový transportní řetězec v endoplasmatickém retikulu, herbicidy (paraquat a nitrofen), enzymové reakce: xanthinoxidasa, NAD(P)H oxidasa, aldehydoxidasa, urikasa (EC 1.7.3.3)
H_2O_2	glykolát oxidasa v glyoxysomech, osvětlené chloroplasty - PSII, mitochondrie v přítomnosti NADH, β -oxidace mastných kyselin, Fe-S proteiny a enzymové reakce (SOD, glykolát oxidasa, aminoxidasa, oxalát oxidasa, peroxidasy)
OH^{\cdot}	Haberova-Weissova reakce, Fentonova reakce
1O_2	singletový kyslík, excitované chlorofylové molekuly v tripletovém stavu, znečištění vzduchu (NO_2 , O_3 , atd.)

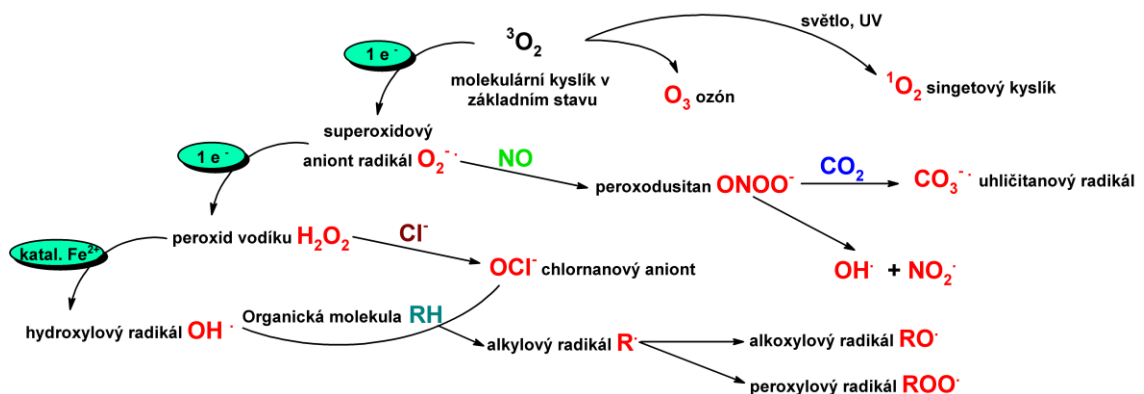
Mechanismus účinku ROS na signální dráhy může být obecně dvojího typu:

- ROS-specifické senzory na povrchu buňky mohou aktivovat signální kaskády a tak buňku přimět k tomu, aby ovlivnila konkrétní buněčný proces,
- přímo jednotlivé signální sloučeniny mohou být oxidovány pomocí ROS, čímž se změní jejich signální funkce bez zásahu buňky na základě receptorového signálu (Ahmad et al., 2008).

Mechanismus působení jednotlivých reaktivních kyslíkových forem je různý, je možná jejich reakce se sloučeninami dusíku za vzniku reaktivních dusíkatých forem (RNS). Zpravidla platí, že:

- Superoxidový radikál, jakožto nejčastěji vznikající forma ROS, reaguje především s kovovými ionty a klastry Fe-S. Ochotně reaguje s oxidem dusnatým za vzniku peroxodusitanu, silného oxidačního činidla, umožňující následnou nitraci a nitrosylaci různých substrátů.
- Peroxid vodíku reaguje s thiolovou skupinou např. cysteinu nebo glutathionu.
- Reakce peroxidu vodíku s chloridovým aniontem samovolně neprobíhá, je však katalyzovaná enzymem myeloperoksidase za vzniku chlornanu ClO^- jakožto silného oxidačního činidla.
- Reakce peroxidu vodíku s ionty přechodných kovů vede k tvorbě hydroxylového radikálu.
- Hydroxylový radikál je velmi reaktivní, reaguje s nukleovými kyselinami, volnými nukleotidy, proteiny, lipidy a sacharidy (Bartosz, 2008).

Možné dráhy přeměn ROS v RNS a další reaktivní molekuly jsou znázorněny na obr. 2:



Obr. 2

Schéma znázorňující jednotlivé vztahy mezi ROS a RNS, cesty jejich vzniku a přeměny (Převzato z Bartosz et al., 2008).

V průběhu evoluce se rostliny dostatečně adaptovali na vliv ROS. Vybudované obranné systémy tvoří sofistikovaný mechanismus na více úrovních, jak enzymatické, tak neenzymatické. Bylo dokázáno, že tyto systémy jsou zakomponovány přímo v genetické výbavě rostliny a dnes je známo více než 150 genů u rostlin (v závislosti od druhu) kódujících enzymy podílející se na produkci a degradaci ROS (Mittler et al., 2004). Jejich stručný přehled a používané zkratky jsou uvedeny v tabulce 3:

Tab. 3

Přehled antioxidačních systémů typicky se vyskytující v rostlinné buňce, jak na enzymové, tak na neenzymové úrovni.

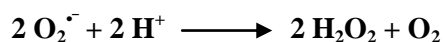
<i>Enzymové antioxidanty</i>	<i>Neenzymové antioxidanty</i>
superoxiddismutasa (SOD) katalasa (CAT) askorbátperoxidasa (APX) glutathionreduktasa (GR) dehydroaskorbátreduktasa (DHAR) monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR) <i>... a mnoho dalších</i>	kyselina askorbová (ASA) α-tokoferol glutathion (GSH) fenolické látky polyaminy (putrescin) zeaxanthin

Mechanismus antioxidantního působení a míra úspěšnosti degradace ROS je závislá na charakteru antioxidantu (enzymový, neenzymový), na aktivitě těchto enzymů a fyziologických podmínkách v buňce. Stručná charakteristika nejvýznamnějších antioxidantních enzymů je uvedena následovně:

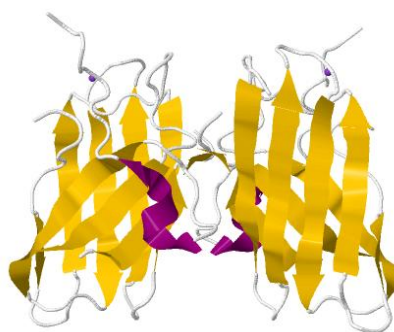
1. Superoxiddismutasa

EC 1.15.1.1 (SOD, systematický název superoxid : superoxidoreduktasa)

Jedná se o nejčastěji o homodimerní metaloenzymy, které katalyzují reakci:



SOD jsou přítomny v aerobních a fakultativně aerobních organismech a ve všech buněčných odděleních citlivých na oxidativní stres, jako je např. cytosol, peroxisomy, plastidy (SOD s Cu/Zn), v mitochondriích (SOD s Mn) a v plastidech (SOD s Fe) Poprvé byla SOD izolována z kukuřice, kde se nacházelo 6 izoenzymů. Tyto izoenzymy se podařilo identifikovat testem citlivosti na peroxid vodíku a KCN: Cu/Zn-SOD je inaktivována KCN i H₂O₂, Fe-SOD pouze H₂O₂ a Mn-SOD je rezistentní na oba inhibitory. Zajímavostí mezi těmito enzymy je SOD izolována ze *Streptomyces* využívající Ni jako kofaktor. (Fridowich, 1989). 3D struktura SOD izolované z rajčete je znázorněna na obr. 3:



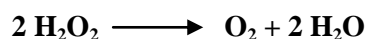
Obr. 3

Homodimerní superoxiddismutasa izolována a popsána v chloroplastu rajčete (*Solanum lycopersicum*). Vyznačené draselné ionty pro každou podjednotku jako stabilizující ligandy (Převzato z PDB.org; DOI: 10.2210/pdb3hog/pdb).

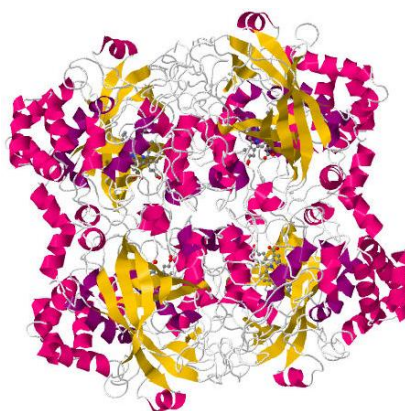
2. Katalasa

EC 1.11.1.6 (CAT, systematický název H₂O₂ : H₂O₂ oxidoreduktasa)

Enzymy s katalasovou aktivitou patří k nejdůležitějším enzymům v rámci detoxikačního procesu ROS. Katalyzují reakci:



Jedná se o enzymy s kvartérní strukturou, kterou tvoří dimery či tetramery. CAT byla lokalizována v eukaryontních organismech s aerobním metabolismem, kde je její hlavní funkcí degradace H₂O₂ vznikajícího činností oxidas, dále v reakci katalyzované SOD, např. při β-oxidaci mastných kyselin, katabolismu purinových bází popřípadě i v průběhu glyoxylátového cyklu. Enzymy s katalasovou aktivitou nejsou specifické pouze pro degradaci H₂O₂, ale mají také oxidasovou aktivitu, to znamená, že jsou schopny katalyzovat oxidační reakci např. methanolu, ethanolu, nebo nitritu za přítomnosti H₂O₂ (tzv. peroxidasová aktivita). V současnosti se rodina CAT skutečně rozrůstá. Pro lepší orientaci byly katalasy rozděleny do tří skupin. CAT1 - vyskytující se zejména v listech, aktivní při fotorespiraci. CAT2 - lokalizovány ve svazcích cévních, a CAT3 - lokalizovány zejména v mikrotěličcích (především glyoxysomy) semen a mladých semenáčcích (Dat et al., 2000). 3D struktura CAT je znázorněna na obr. 4:



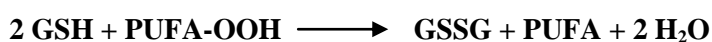
Obr. 4

Znázornění tetramerní struktury katalasy izolované z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Převzato z PDB.org; DOI 10.2210/pdb1a4e/pdb).

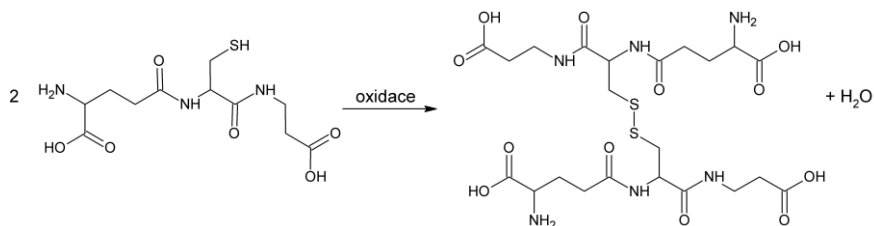
3. Glutathionperoxidasa

EC 1.11.1.12 (GPX, glutathion : H₂O₂ oxidoreduktasa)

Jedná se o velice důležitou skupinu enzymů v rostlinné říši katalyzujících reakci:



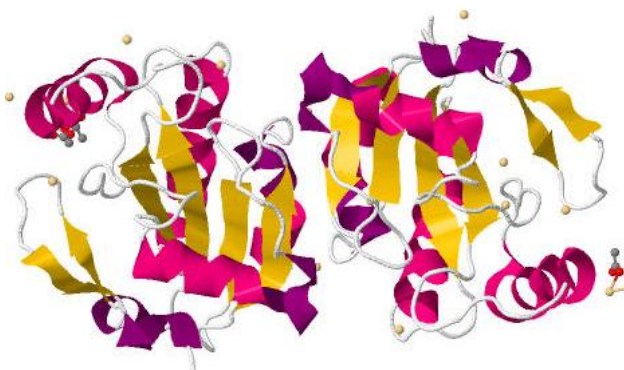
3D strukturu GPX znázorňuje obr. 6. Jedná se o enzymy schopné likvidovat vznikající peroxid vodíku, tak i např. produkty lipoperoxidace (PUFA-z angl. polyunsaturated fatty acids) při toxické oxidaci buněčných membrán způsobené zvýšenou koncentrací ROS. GPX přeměňují H_2O_2 na H_2O a O_2 stejně jako katalasy, a R-OOH přeměňují na R-OH + O_2 , a to za spotřeby redukované formy GSH jakožto redukčního činidla. GSH je přírodní tripeptid (γ -glu-cys-gly), který tvoří následně dimerní oxidovanou strukturu (GS-SG). (Píterková et al., 2005). Oxidaci GSH znázorňuje obr. 5:



Obr. 5

Oxidace glutathionu působením oxidačních činidel, jako např. ROS nebo RNS (Wonisch & Schaur, 2002).

Oxidovaný glutathion se může v buňce recyklovat - zpětně se redukuje za spotřeby 1 molekuly NADPH v přítomnosti enzymu glutathionreduktasy (GR) (Noctor et al, 1998).



Obr. 6

Struktura glutathionperoxidasy izolované z topolu chlupatoplodého (*Populus Trichocarpa*) (Převzato z PDB.org; DOI: 10.2210/pdb2p5q/pdb).

Jak již bylo zmiňováno, existuje také řada neenzymatických antioxidantů, které se podílejí na detoxifikaci ROS a RNS z buněk. Mnoho z nich se řadí do velmi početné skupiny vitaminů. Lokalizace i těchto antioxidantů je velmi úzce spjata s výskytem vysoké aerobní metabolické aktivity, jak znázorňuje tabulka 4:

Tab. 4

Přehled nejvýznamnějších neenzymatických antioxidantů a jejich subcelulární lokalizace (Převzato z Piterková et al., 2005).

<i>Antioxidant</i>	<i>Lokalizace</i>
Asorbát (vitamin C) β - karoten	apoplast, mitochondrie, plastid, peroxisom, cytosol plastid
Glutathion redukovaný (GSH) Polyaminy (putrescin, spermin)	cytosol, apoplast, plastid, mitochondrie, peroxisom cytosol, mitochondrie, plastid, buněčné jádro
α - tokoferol (vitamin E) Zeaxanthin	buněčné membrány chloroplast

2.2 Reaktivní formy dusíku

Další významnou skupinu reaktivních nízkomolekulárních látek zapojených do procesu buněčné signalizace jsou RNS. Vznikají taktéž v procesu oxidativního metabolismu, zejména enzymatickou cestou (obr. 7), kde význačným produktem je především NO. Ten podléhá dalším přeměnám, a to často reakcí s ROS, čímž dochází ke vzniku dalších typů RNS, které se vyznačují zpravidla vyšší reaktivitou a silnějšími oxidačními účinky než NO. Působení RNS v organismu je označováno jako tzv. nitrosativní stres a může také vést k poškození důležitých buněčných součástí, jako je DNA, lipidy a jiné. Přehled nejvýznamnějších zástupců RNS je uveden v tabulce 5:

Tab. 5

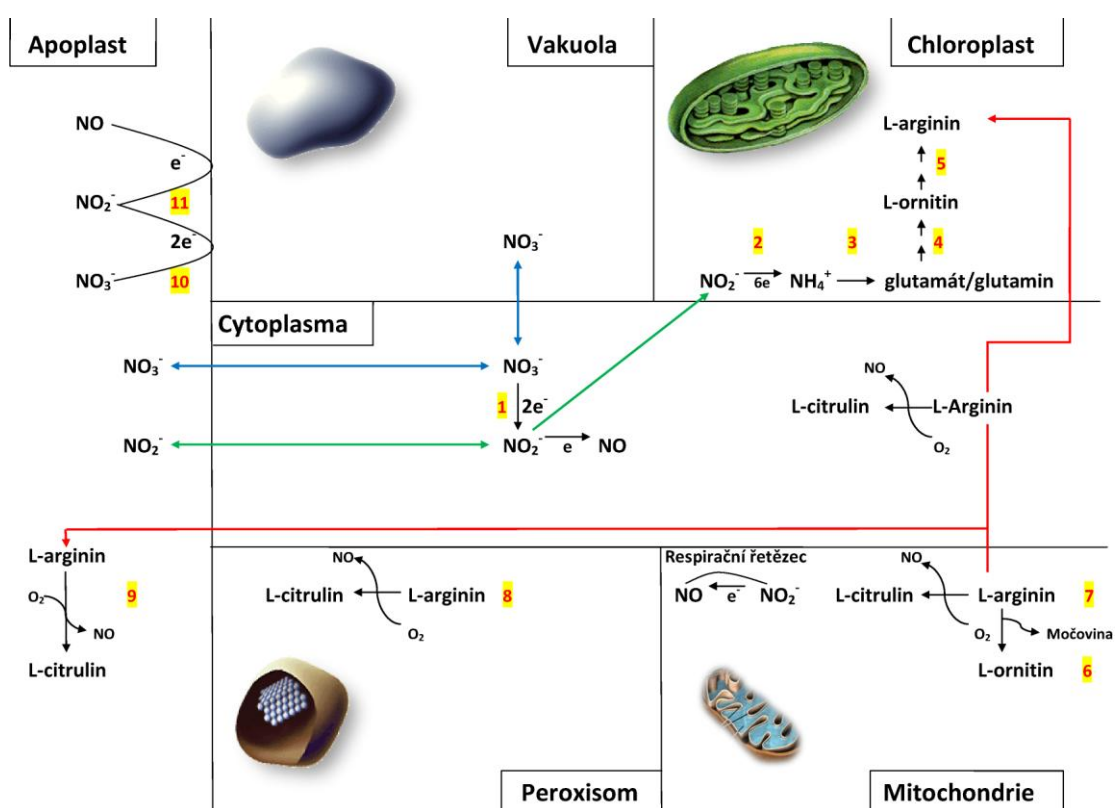
Přehled nejčastěji se vyskytujících reaktivních forem dusíku v buňce s aerobním metabolismem (Upraveno dle Corpas et al., 2008; Dröge, 2002).

<i>Název sloučeniny</i>	<i>Struktura</i>
<i>Oxid dusnatý</i>	•NO
<i>S-nitrosothioly</i>	R-S-NO
<i>S-nitrosoglutathion</i>	GSNO
<i>Peroxodusitan</i>	ONOO ⁻
<i>Nitrosylový kationt</i>	NO ⁺
<i>Nitrosylový aniont</i>	NO ⁻
<i>Kyselina peroxodusitá</i>	ONOOH

Mezi nejvýznamnější zástupce RNS patří nepochybně oxid dusnatý (NO). Jsou známy četné fyziologické funkce NO v buňkách jak živočišných, rostlinných a houbových organismů a stále se objevují další nové poznatky. NO je paramagnetický lipofilní plyn obsahující jeden nepárový elektron (N=O[•]), podílející se na jeho vysoké reaktivitě a schopnosti dimerizace

(O=N-N=O). Ještě v nedávné minulosti byl NO považován za polutant životního prostředí, negativně ovlivňující zdraví. Bylo však dokázáno, že tento zástupce RNS je tvořen v malém množství i ve všech buňkách aerobních organismů. Výzkumy dokazují, že je zapojen do mnoha signálních funkcí v buňce. U živočichů např. způsobuje vazokonstrikci a upravuje krevní tlak a krevní oběh. U rostlin stimuluje klíčivost semen, prolomení stádia dormance, také se zjistilo, že je zapojen do procesu oplodnění, jakožto signální molekula a možný chemotaktický atraktant klíčící pylové láčky. Při studiu vlivu NO na patogenní houby byl prokázán inhibiční vliv na klíčení a vývoj patogenu a tedy na jeho potenciální použití jako přírodního fungicidu pro ochranu plodin.

NO v buňce může vznikat buď enzymovou, nebo neenzymovou cestou. Enzymovou cestu reprezentují zejména enzymy podobné živočišné NO synthase (NOS) katalyzující konverzi argininu na citrulin. U rostlin její přímá existence prokázána nebyla, předpokládá se však výskyt podobných enzymů schopných této konverze. Existují však i jiné dráhy enzymových reakcí podílejících se na tvorbě a produkci NO. Jejich možnosti propojení znázorňuje obr. 7. Neenzymová tvorba je lokalizovaná zejména v buňkách s vysokou aerobní metabolickou aktivitou. Jednotlivé funkce a cesty vzniku u různých druhů organismů budou popsány v následujících kapitolách.



Obr. 7

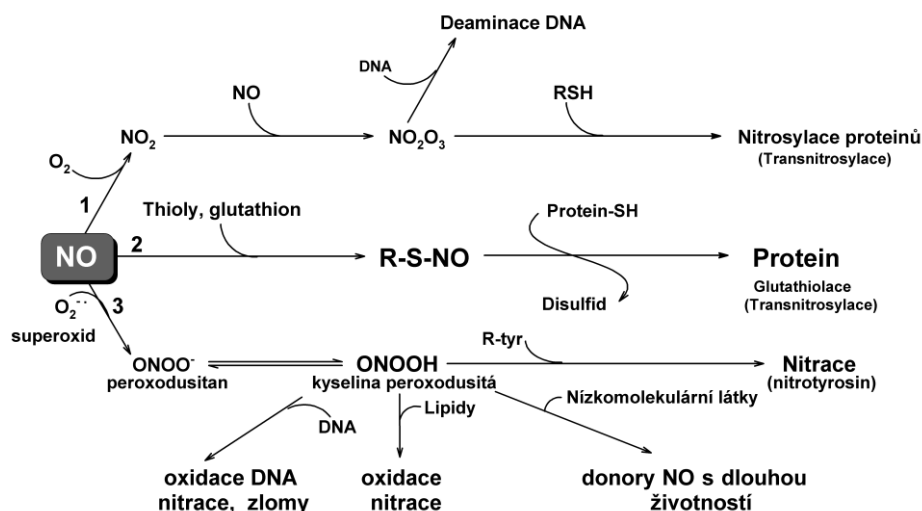
Schéma znázorňující různé cesty produkce NO v rostlinných buňkách enzymatickou cestou. Zúčastněné enzymy: 1. cytosolická nitrátreduktasa; 2. nitritreduktasa; 3. glutaminsynthetasa a

glutamin-2-oxoglutarátaminotransferasa; 4. dráha syntézy L-ornithinu: *N*-acetylglutamátsynthasa, *N*-acetylglutamátkinasa, *N*-acetylglutamát-5-P reduktasa, *N*2-acetylornithinaminotransferasa, *N*2-acetylornithin:glutamátacetyltransferasa; 5. dráha syntézy L-argininu: ornithintranskarbamoylasy, argininosukcinátsynthasa, argininosukcinátlyasa; 6. arginasa; 7. mitochondriální NOS 1; 8. peroxisomální NOS; 9. apoplastická NOS; 10. membránová nitrátreduktasa; 11. nitrit:NO reduktasa (Převzato z Stöhr, 2006).

NO v buňkách živých organismů může v podstatě reagovat čtyřmi způsoby:

- NO reaguje s molekulárním O₂ rozpuštěným ve vodných roztocích za vzniku dusitanů nebo dusičnanů, v závislosti na přítomnosti a síle dalších oxidačních činidel.
- NO reaguje se superoxidovým radikálem za vzniku peroxodusitanového aniontu, hydroperoxynitritu nebo dusičnanu v závislosti na probíhající izomerizační reakci hydroperoxynitritu.
- reakcí se superoxidovým radikálem za vzniku peroxodusitanu, a následnou reakcí s CO₂ za vzniku nitrosoperoxyuhličitanu, který má silné oxidační účinky, způsobuje nitrosylaci mnohem snadněji než peroxodusitan,
- NO reaguje s přechodnými kovy v reakčních centrech různých metaloenzymů (Durzan & Pedroso, 2002; Giba et al., 1998)

Přehledné schéma některých reakcí NO a způsoby jeho degradace, ukládání či transportu jsou znázorněny na obr. 8:



Obr. 8

Molekulární mechanismus propojení a přeměn ROS a RNS: 1, Vznik N₂O₃ z NO vede často k deaminaci bazí v DNA, významný faktor stárnutí rostlinných pletiv. 2, NO se může v buňce skladovat a transportovat ve formě nitrosothiolů, které NO předávají dalším molekulám zejména transnitrosylací přes atomy S nebo N. 3, NO reaguje se superoxidovým aniontem za

vzniku peroxodusitanu, reakcí s CO₂ vzniká nitrosoperoxyuhličitan (ONOOCO₂⁻), nitrosylující mnohem snáz než ONOO⁻ (Převzato z Durzan & Pedroso, 2002).

Vzhledem k vysoké reaktivitě NO lze předpokládat jeho nestabilitu. V literatuře se uvádí poločas jeho rozpadu různě v závislosti na podmínkách prostředí, např. poločas rozpadu NO v atmosféře obsahující běžně 21% O₂ je ≈ 3,5 hod, v atmosféře obsahující pouze 0,3% je až ≈ 16 hod (Soegiarto et al., 2003). Poločas rozpadu NO v živé buňce je však mnohem kratší, pohybující se kolem ≈ 6 s díky nitraci buněčných součástí a reakcí s ROS kterých koncentrace je v buňce mnohem vyšší než v atmosféře (Thomas et al., 2001; Misra et al., 2010).

Při studiu vlivu NO na různé živé organismy se používá NO buď v plynné formě, nebo se používají sloučeniny schopné NO postupně uvolňovat do svého okolí. V dnešní době je běžně dostupná řada donorů NO od komerčních výrobců a jejich výčet je uveden v tabulce 6:

Tab. 6

Příklady sloučenin používaných jako donory NO. V tabulce jsou uvedeny donory běžně používané v biochemické a biologické praxi.

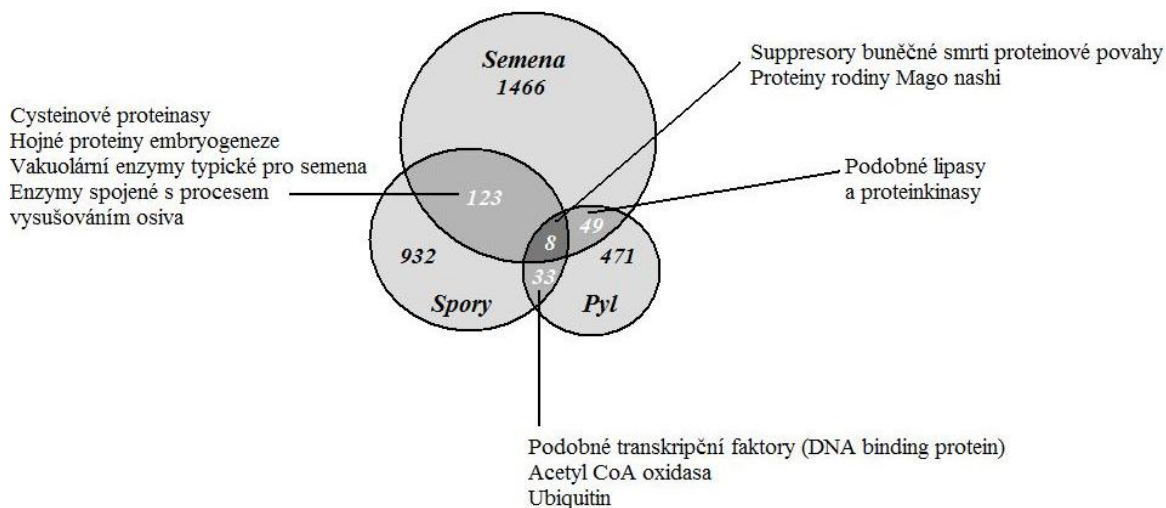
Chemický název	Alternativní označení
[(E)-Hydroxyimino]-6-methoxy-4-methyl-5-nitro-3-hexenamid	NOR-3
S-nitrosoglutathion	GSNO
3,3-Bis(aminoethyl)-1-hydroxy-2-oxo-1-triazen	NOC-18
S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicilamin	SNAP
Nitroprussid sodný	SNP
N-(Methylnitrosokarbamoyl)-α-D-glukosamin	Streptozocin
4-Fenyl-3-furoxankarbonitril	Furoxan
a mnoho dalších...	

Jak je patrné z tab. 6, chemické látky uvolňující NO mají velice rozdílnou chemickou strukturu, a je tedy zřejmé že neuvolňují NO stejně ochotně. GSNO, SNP a SNAP jsou donory, které se v biochemické praxi využívají nejčastěji. Bylo zjištěno, že NO uvolňuje nejochotněji SNAP, poté GSNO a nejobtížněji SNP (Floryszak-Wieczorek et al., 2006).

3. Úloha RNS a ROS

Jak je patrné z předchozí kapitoly, ROS a také RNS mohou mít značný vliv na funkci rostlinné i živočišné buňky a také buněk hub, čím ovlivňují homeostázu a fyziologii celého organismu. Tuto podobnost lze vysvětlit např. společnou nebo podobnou genetickou výbavou buněk různých druhů, jak je ukázáno na obr. 9.

V následujících podkapitolách jsou shrnuty poznatky získané při studiu vlivu ROS a RNS (zejména NO) v procesu klíčení. Zaměřili jsme se zejména na studie týkající se role NO při klíčení pylových zrn vyšších rostlin (*Cormobionta*), a dále na proces klíčení spor hub (*fungi*).



Obr. 9

Schéma naznačující počet genů a společnou genetickou výbavu pro pylová zrna a semena vyšších rostlin a spory mykotických organismů (Převzato z Bushart et al., 2007).

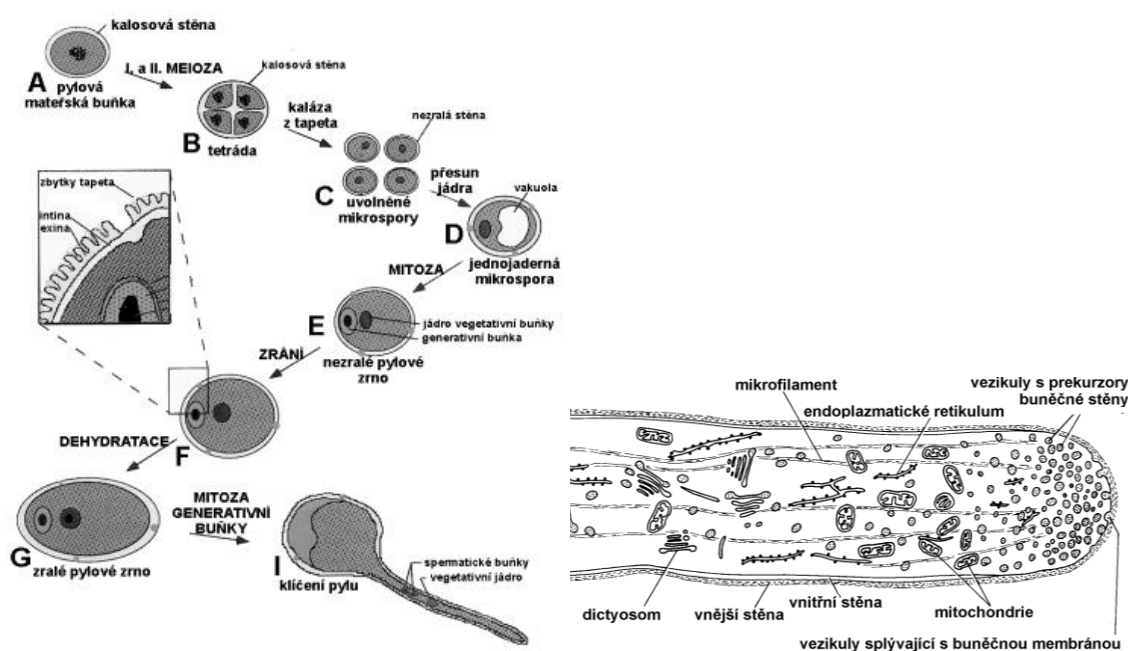
3.1 Úloha RNS a ROS při klíčení pylu

Květ (anthos, flos) je orgán semenných rostlin (krytosemenné a nahosemenné rostliny), který jim slouží k pohlavnímu rozmnožování. Květy obsahují rostlinné reprodukční orgány, jejichž konečnou funkcí je produkce semen představujících následující generaci těchto rostlin. Jsou jimi plodolisty a tyčinky. Soubor plodolistů jednoho květu se nazývá gyneceum a jeho úlohou je nést vajíčka a umožnit jejich vývoj. Semeník (ovarium) obsahuje vajíčka, čnělka (stylus; style) spojuje semeník s bliznou, a blizna (stigma) je aktivní část pestíku, která je přizpůsobena k zachytávání pylu.

Pyl samotný vzniká v procesu nazvaném samčí gametogeneze. Z jedné mateřské buňky pylu meiotickým dělením dochází k vzniku tetrad, které jsou obaleny kalosovou stěnou. Působením enzymu kalasy dojde k uvolnění čtyř mikrospor, které postupně vakuolizují, a heterogenně se rozdělí tak, že menší generativní buňka se nachází uvnitř buňky vegetativní, čímž vzniká útvar nazývaný jako dvoubuněčný samčí gametofyt. Následuje vysoká metabolická aktivita v procesu zrání, kdy se hromadí lipidy a škrob, jakožto zásoba energie. V konečné fázi z generativní buňky

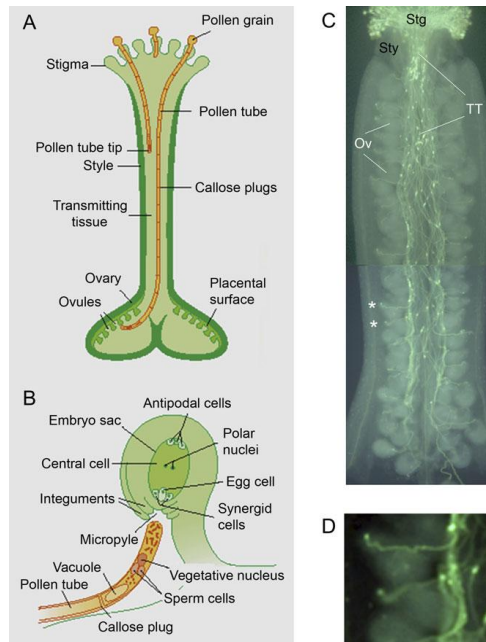
vznikají dělením dvě gamety a to buď již v průběhu zrání pylu (typicky u trav), nebo u jiných rostlinných druhů až při prorůstání pylové láčky čnělkou. Proces zrání je zakončen dehydratací. Zralý pyl je přenesen různými mechanismy na bliznu pestíku, kde začne klíčit a prorůstá vodivým pletivem. Při klíčení pylu dochází ke tvorbě klíčnicích pórů - tzv. apertur, ze kterých následně vyrůstá klíčící pylová láčka. Podle počtu apertur se tyto pylová zrna dělí na trizonoporátní (okurka), pentazonoporátní (javor) apod. (Vinter, 2008). Klíčení pylového zrna je vlastně růst vegetativní buňky. Generativní buňka a buňky spermatické, vzniklé jejím rozdělením, jsou dopravovány do semeníku rostoucí vegetativní buňkou (obr. 10). Pyl lze kultivovat *in vitro* a celý proces zrání a klíčení pylu je možné pozorovat a studovat (Šetlík et al., 2004).

Pylová zrna chrání dva obaly – exina a intina. U krytosemenných je exina více diferencována než u nahosemenných. Exina se v tomto případě může skládat z několika vrstev. V tvrdé exině jsou klíčnicí štěrby – apertury, které jsou velice významným systematickým znakem. Apertur může být od 1 po více než 100. Proces klíčení pylu pestíkem v procesu oplodnění ilustrativně znázorňuje obr. 11:



Obr. 10

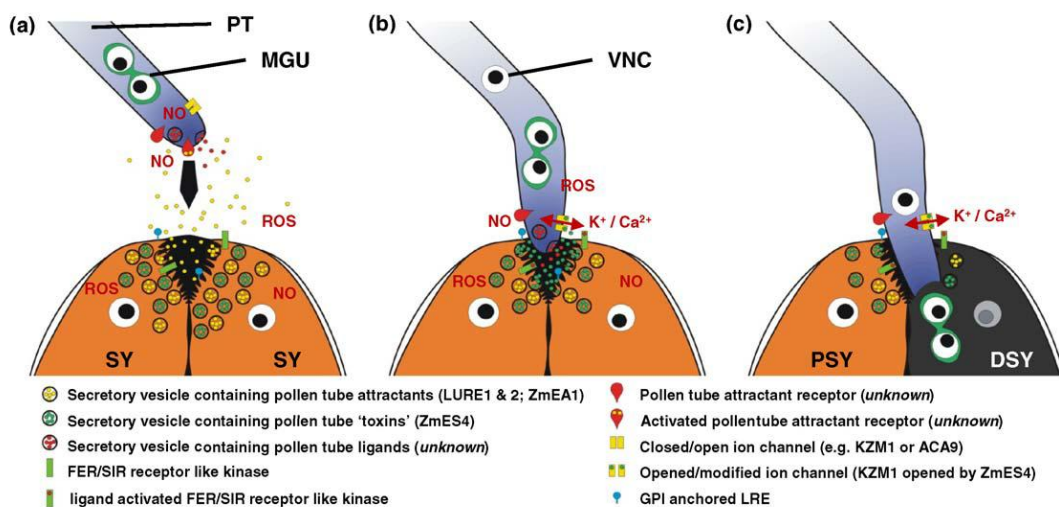
Vlevo: Samčí gametogeneze: A - mateřská buňka pylu, B, C - tetrády, D, E - jednojaderné a dvoujaderné nezralé pylové zrně, E, F, G - zrání pylu, I - klíčení pylu a rozdělení generativního jádra na dvě gamety. Vpravo: Špička klíčící pylové láčky, vyznačení buněčných organel (převzato z Šetlík et al., 2004).



Obr. 11

Růst pylové láčky v pestíku. A), (B) Schematické znázornění zapojení klíčení pylové láčky v procesu oplodnění. (C), (D) (Prorůstání pylové láčky pestíkem dokumentované u Huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) po barvení anilínovou modří (Převzato z Cheung et al., 2010).

Významný fyziologický vliv mají ROS a RNS v procesu opylení a oplodnění. V řadě studií bylo prokázáno, že klíčící pylová láčka na povrchu blizny pestíku je chemotakticky naváděna atraktanty přímo do středu pestíku k vajíčku. Jedná se tedy o pozitivní reorientaci způsobenou chemotaktickými látkami pestíku. Úloha ROS a RNS dosud v tomto směru nebyla přesně ujasněna. Pravděpodobný mechanismus znázorňuje obr. 12 (Dresselhaus et al., 2009).

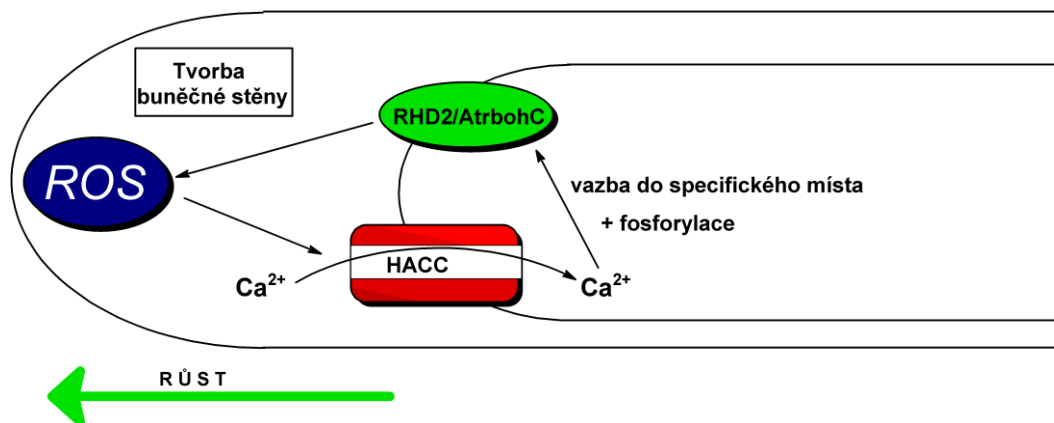


Obr. 12

Hypotetický model zobrazující buněčné a molekulární mechanismy podílející se na přitažlivosti pylové láčky a synergidy (*Pomocná, podpůrná buňka přítomná uvnitř zralého zárodečného*

vaku krytosemenných rostlin. Vznikají obvykle dvě na každý zárodečný vak, ale někdy přechodně a jedna často degeneruje. Funkcí synergid je usnadňovat růst pylové láčky). A, Vezikuly obsahující atraktanty pro pylové láčky, jsou neustále vylučovány ze zralých synergidních buněk. Po navázání na receptor pylové láčky je růst pylové láčky reorientován. V synergidě jsou rovněž vezikuly obsahující „toxiny“ zastavující růst pylové láčky po dosažení povrchu oosféry. B, Růst klíčící pylové láčky je zastaven prostřednictvím aktivace/deaktivace receptorů pylové láčky nebo iontových kanálů. NO a ROS hrají dosud nejasnou roli v tomto procesu. C, Buněčná signalizace v gametofytu vede k buněčné smrti synergidy a pylová láčka následně praská po dramatické změně složení okolního prostředí díky degeneraci synergidy a otevření iontového kanálu. Zkratky: DSY - degenerující synergidní buňka, MGU - spermatické buňky, PT - pylová láčka, PSY - perzistentní synergidní buňka, SY - synergidní buňka, VNC - jádro vegetativní buňky (Převzato z Dresselhaus et al., 2009).

Významná role ROS při růstu a klíčení pylových zrn byla zdokumentována při tvorbě a míře elasticity vznikající buněčné stěny. V tomto případě se jedná o růst polární, tzn., že v prodlužující se apikální části je nejintenzivnější tvorba nově vznikající buněčné stěny, následně na boční bázi buňky dochází pak k jejímu intenzivnímu zpevňování. K intenzivní tvorbě ROS dochází zejména v apikální části rostoucí pylové láčky. Bylo prokázáno, že produkce ROS je pro růst nezbytná. ROS stimuluje aktivitu Ca^{2+} kanálů a indukuje vtok těchto iontů z vnějšku buňky do cytosolu, kde největší koncentrace Ca^{2+} je zejména ve špičce klíčící pylové láčky, jak je ukázáno na obr. 13 (Bell et al., 2009).

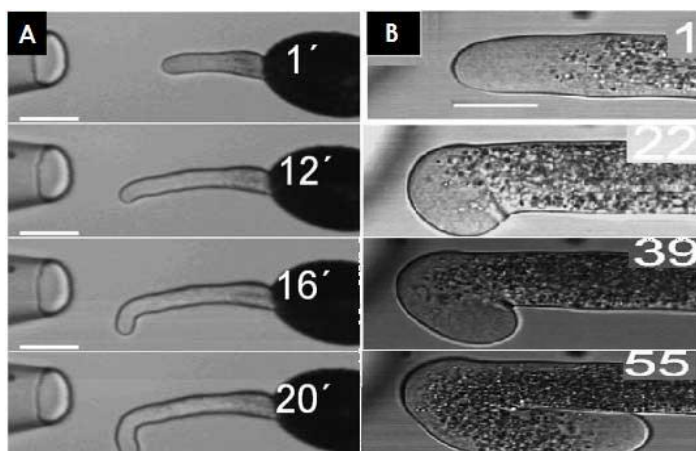


Obr. 13

Schéma znázorňující produkci a vliv ROS na klíčící pylovou láčku. ROS vznikající enzymaticky pomocí specifických NADPH oxidas, také označovaných RBOH (z angl. respiratory burst oxidase homolog) kódujících svými geny RHD2 stimuluje specifické Ca^{2+} kanály (HACC), které pumpují tyto ionty do cytosolu a vytvářejí repolarizaci. Ta stimuluje tvorbu a produkci buněčné stěny (BS). (Převzato z Bell et al., 2009)

Významnou studií zabývající se zapojením NO v procesu klíčení pylu byla studie Prado et al., z roku 2004, kde byl studován vliv zvýšené koncentrace NO aplikované ke klíčící pylové láčce pomocí sondy obsahující donor NO. Použitým rostlinným materiálem byl čerstvý pyl lilie dlouhokvěté (*Lilium longiflorum*). Na agarosovém živném mediu s vyváženým poměrem CaCl_2 , H_3BO_3 , KCl a sacharosy o $\text{pH} \approx 6$ byla k naklíčenému pylu aplikován donor NO (SNAP sonda - S-nitroso-acetylpenicilamin, 10 mmol.l^{-1}). Po uvolnění NO, který byl v přímém kontaktu s klíčící pylovou láčkou, bylo pozorováno zpomalení růstu pylové láčky a v některých případech i jeho úplná inhibice doprovázená vznikem typického rozšíření apikální části. Po 15-20 minutách se růst znovu obnovil, avšak ve směru odlišném od původního a došlo k poměrně ostré reorientaci. Aplikace lapače NO c-PTIO ([2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid] zrušila proces reorientace vyvolaný lokální zvýšenou koncentrací NO. K povšimnutí stojí fakt, že reorientace způsobena donorem NO je negativní - směrem od zdroje NO (obr. 14), zatímco reorientace k oosféře v procesu oplodnění způsobená pravděpodobně pomocí ROS je pozitivní - směrem k oosféře (obr. 11 a 12).

Cílem studie publikované v práci Prado 2004 bylo zjistit, jakým mechanismem se NO podílí na reorientaci. Je známo, že v savčích buňkách zprostředkovává signalizaci spojenou se změnou koncentrace NO především cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Koncentraci cGMP v buňkách ovlivňují dva enzymy NO-aktivovaná guanylátcyklasa (GC) a fosfodiesterasa (PDE), Přírodním inhibítorem GC je IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin) a pro PDE sildenafilcitrát (1-[[3-(4,7-Dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-methylpiperazin citrát, ViagraTM). Po aplikaci NO sondy ke klíčícímu pylu a současné aplikaci sildenafilcitrátu byla detekována mnohem intenzivnější reorientace pylové láčky (úhel byl dokonce až 180°) a to i při menší koncentraci NO než v předchozích experimentech. Na základě získaných výsledků lze předpokládat, že vliv NO na růst a reorientaci pylové láčky je zprostředkován přes cGMP (Prado et al., 2004).



Obr. 14

(A): Časové sekvence rostoucí pylové láčky *L. longiflorum* vystavené exogennímu působení zdroje NO. Pylová láčka v první fázi zpomalila růst, poté se ustanovila nová růstová osa, a růst

pokračoval. Měřítka 30µm. (B): Časová sekvence rostoucí pylové láčky při aplikaci nižší koncentrace NO, ale po aplikaci sildenafilcitrátu (ViagraTM) (Převzato z Prado et al., 2004).

Podobné výsledky byly získány také při studiu vlivu NO na klíčení spor kapradiny *Ceratopteris ricardii*. Byly opět využívány donory NO a také jejich lapače, a bylo prokázáno, že jak donory, tak i lapače NO mohou ovlivnit pozitivní gravitropismus tvořících se rhizoidů. Největší změny byly patrné po aplikaci LY83583, což je 6-(fenylamino)-5,8-chinolindion, inhibitor guanylátacyklasy aktivované NO. Tyto experimenty potvrzují významnou roli NO jako signálního a stresového faktoru u rostlin (Morris & Porterfield, 2004).

V poslední době se intenzivně studuje tvorba endogenního NO v rostlinných buňkách, a jeho zapojení v procesu klíčení a růstu. Doposud bylo identifikováno 6 enzymatických a celá řada dalších neenzymatických cest produkce NO v rostlinné buňce, jak znázorňuje tabulka 7.

Tab. 7

Přehled enzymatických a neenzymatických zdrojů NO v rostlinné buňce (Převzato z Piterková et al., 2008).

	<i>Název enzymu</i>	<i>Substrát</i>	<i>Kofaktory</i>
Enzymatický zdroj	Enzymy podobné NOS	L-arginin	NADPH, FAD, FMN,
	Nitrátoreduktasa	NO ₃ ⁻	NADH
	Nitrit:NO reduktasa	NO ₂ ⁻	NADH
	Křenová peroxidasa	N-hydroxyarginin	NADH
	Xanthinoxidasa	Hydroxymočovina	---
	Cytochrom P-450	NO ₂ ⁻	Cytochrom c
Neenzymatický zdroj	Reakční podmínky	Výchozí látka	Produkt
	nízké pH, apoplast	2 NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻ a NO
	fyzilogické pH světlo, karotenoidy	NO ₂ ⁻ + askorbát NO ₂ ⁻	NO + dehydroaskorbát NO

Mezi enzymatické zdroje NO patří především:

- a) Enzymy podobné NO synthase (NOS; EC 1.13.14.39). Samotný enzym byl popsán u savců, u rostlin jeho existence doposud nebyla potvrzena, předpokládá se však existence strukturálně podobných enzymů katalyzujících stejnou reakci. Jedná se o heterotetramerní Ca-kalmodulin (CaM) dependentní hemoprotein produkující NO oxidací L-argininu pěti elektrony na citrulin a NO. U rostlin jsou tyto enzymy aktivovány mimo jiné UV-B zářením (He, Bai et al., 2007).
- b) Nitrátoreduktasa (NAR; EC 1.7.1.1). Homodimerní enzym aktivován fosforylací, kterého každá podjednotka obsahuje FAD, hem a molybdenový kofaktor. Katalyzuje

dvouelektronovou NAD(P)H-dependentní redukcí dusičnanu na dusitan nebo jednoelektronovou redukcí dusitanu na NO.

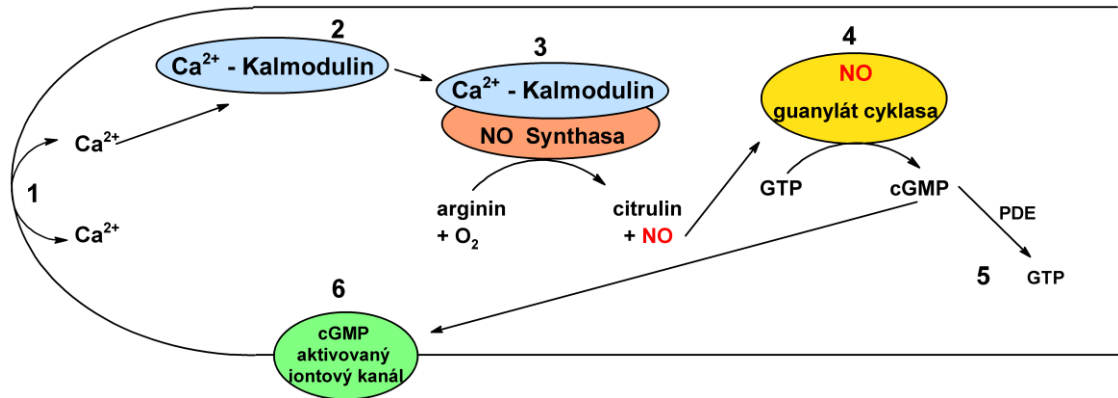
- c) Nitrit:NO reduktasa (EC 1.7.2.1) katalyzuje redukcí dusitanu na NO, donor elektronů není zatím přesně známý.
- d) Křenová peroxidasa (EC 1.11.1.7) produkuje NO z N-hydroxyargininu nebo hydroxymočoviny v přítomnosti H₂O₂.
- e) Cytochromy P-450 (EC 1.14.-.-) je rodina enzymů produkujících NO katalýzou oxidace N-hydroxyargininu za přítomnosti kumylhydroperoxidu.
- f) Xanthinoxidasa (EC 1.1.3.22). Molybdenový enzym existující ve dvou přeměnitelných isoformách, xanthinoxidasa a xanthindehydrogenasa. Produkuje NO za podmínek hypoxie až anoxie, kdy dochází k redukcí dusitanů na NO pomocí elektronů komplexu III dýchacího řetězce. Proto je takto produkovaný NO signálem anoxie a dochází k ovlivnění respiračního řetězce jeho reversibilní vazbou na enzym cytochrom c oxidasu (COX) a tím jeho inhibicí (Benamar et al., 2008; Piterková et al., 2008).

Klíčící pylové láčky pravděpodobně obsahují enzymy příbuzné živočišné NOS, zjistilo se např., že ultrafialové světlo (UV-B) zvyšuje aktivitu NOS, čím dochází k zvýšení intracelulární koncentrace NO v buňce, a tím k inhibici klíčení pylových zrn. Lze tedy předpokládat, že NO může inhibovat klíčení pylu a jeho následný růst (He et al., 2007).

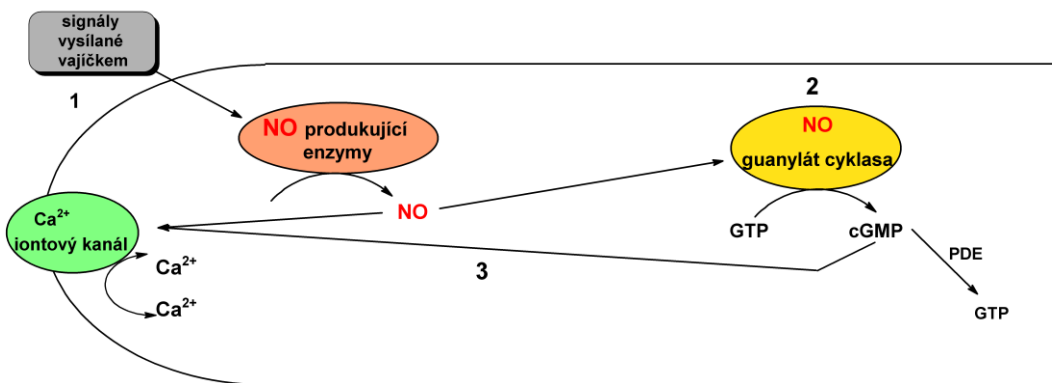
Klíčení a růst pylových láček, a obecně všech na vrcholu rostoucích buněk (pylová zrna, kořenové vlášení, protonemata kapradin a mechů, hyfy houbových organismů) může významně ovlivnit řada dalších látek. Jedná se například o Ca²⁺ ionty, které se dovnitř klíčící pylové láčky dostávají za pomoci pump pro vápenaté ionty, které se nachází sice po celém povrchu pylové láčky, ale aktivní jsou pouze v apikální části pylové láčky, kde se pylová láčka prodlužuje a je zde nejvyšší koncentrace živin, metabolitů a růstových faktorů (např. NADPH) (Cárdenas, 2006). Předpokládá se, že Ca²⁺ ionty mají při klíčení pylu 4 základní funkce: ovlivňují funkci GTPas a stabilizují vzniklé GTP, podmiňují správnou funkci aktinového cytoskeletu, jsou to signální molekuly různých kaskád, a kooperují s funkcí pektinmethylesteras aktivních při vzniku a impregnaci vznikající buněčné stěny pektinem. Také další molekuly, jako např. GABA (kyselina γ -aminomáselná) přímo ovlivňují klíčení pylu a jeho orientaci k oocyту (Eckardt, 2005).

Molekulární mechanismus působení NO a Ca²⁺ iontů v procesech klíčení pylu a ostatních klíčících organismů není dosud dokonale objasněn, existují však jisté modely působení na základě dosavadních poznatků. Některé z nich jsou znázorněny na obr. 15:

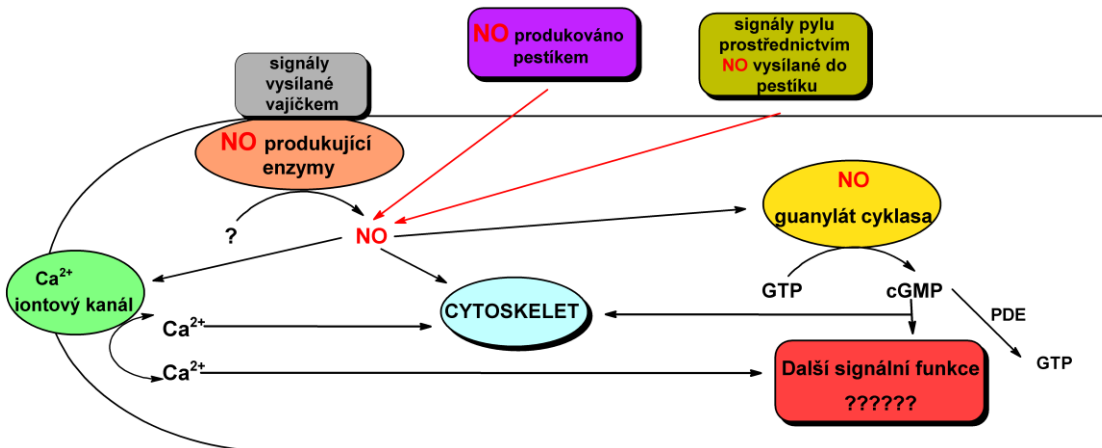
I)



II)



III)

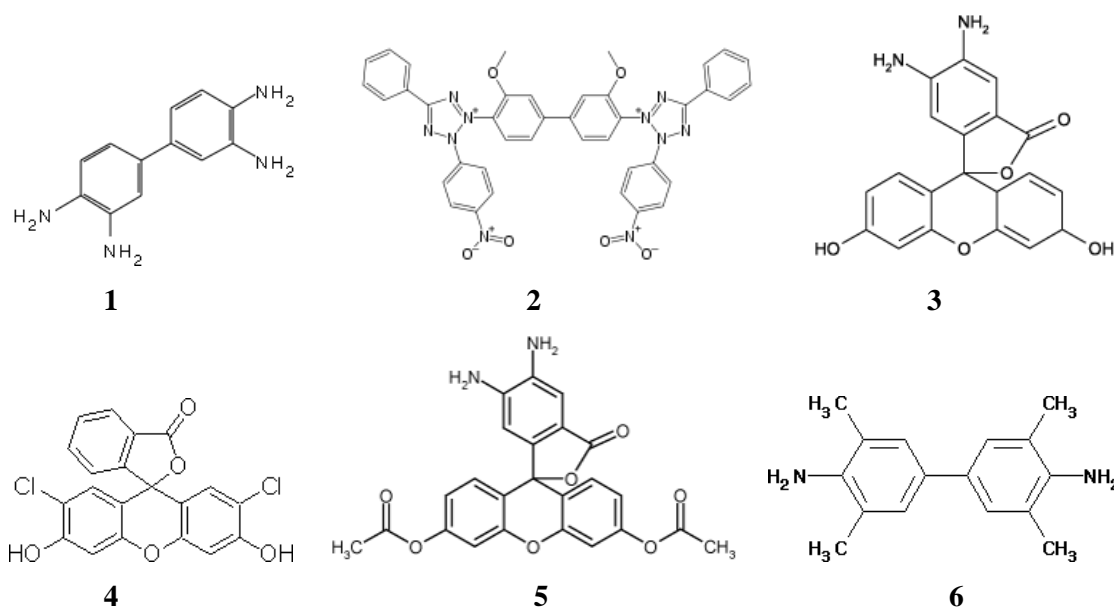


Obr. 15

Schematické modely předpokládaných signálních drah a propojení působení NO a Ca^{2+} iontů v procesech klíčení pylu a oplodnění rostliny. I) 1) Osmoticky poháněné prodlužování pylové láčky vede k otevření Ca^{2+} kanálů a výronu těchto iontů do buňky. Protein kalmodulin (CaM) je schopen tyto ionty navázat 2) a transportovat, přičemž změní svou prostorovou konformaci a může se navázat na NOS 3) NOS, která začne konvertovat L-arginin na citrulin za uvolňování NO, aktivující GC 4). GC konvertuje GTP na signální molekulu cGMP, které množství je regulováno PDE 5). cGMP reguluje aktivitu iontových kanálů a tím i koncentraci iontů v buňce.

II) 1) Vajíčko vysílá chemické signály vedoucí k tvorbě NO v pylové láčce, čímž se také aktivuje GC 2) a oboje, NO a cGMP regulují osmotický tlak v buňce aktivací iontových kanálů. III) Model uvažující chemické signály pestíku a pylu a tím změnu směru klíčení změnou cytoskeletárních vláken možnými jinými signálními drahami (pravděpodobně Cl⁻ dependentní dráhou) (převzato z Prado et al., 2010).

Pro studování vlivu a metabolické aktivity ROS a RNS jsou velmi často používány pro detekci ROS a RNS specifické sondy umožňující lokalizaci jejich produkce s využitím mikroskopických metod. Pro histochemickou lokalizaci H₂O₂ se používá DAB (3,3'-diaminobenzidin, také 3,3',4,4'-tetraamino-difenyl). V místě výskytu H₂O₂ dochází k vzniku hnědého zbarvení. Druhou možností jak lokalizovat H₂O₂ je aplikace TMB (3,5,3',5'-tetramethylbenzidin), který tvoří v jeho přítomnosti modré zbarvení. Další možností je využití H₂DCF-DA (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát), který vykazuje širokou specifitu a tvoří fluorescenční produkt především s ROS (Sedlářová et al., 2007; McInish et al., 2006, Corpas, et al., 2004). Superoxidový aniont (O₂^{•-}) se často indikuje pomocí NBT (nitrotetrazoliová modř) za vzniku temně modrého formazanového precipitátu. Reaktivní formy dusíku, zejména NO lze indikovat např. pomocí fluorescenční próby DAF-2 DA (diaminofluorescein diacetát), který má schopnost poměrně lehce difundovat do buněk, kde se za pomoci cytosolických esteraz odštěpuje acetát a v přítomnosti NO a O₂ dochází k oxidaci na fluoreskující triazolofluoresceinový derivát. Přehled struktur využívaných prób je vyznačen na obr. 16:



Obr. 16

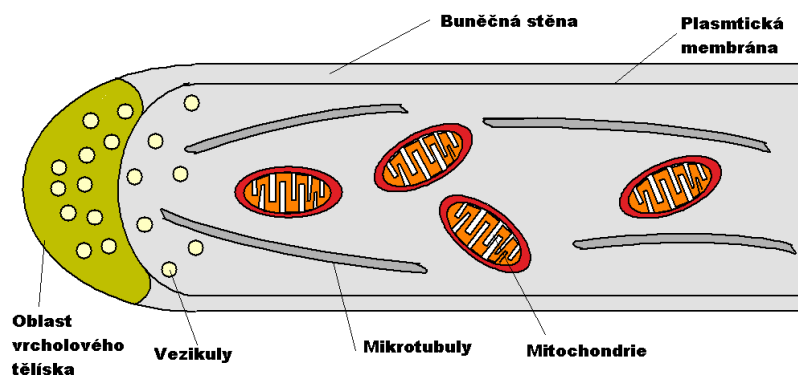
Chemické struktury detekčních sond používaných pro lokalizaci ROS a RNS:

1 - DAB 2 - NBT 3 - DAF 4 - H₂DCF 5 - DAF2 - DA 6 - TMB.

Zdroj: www.sigmaaldrich.com

3.2 Úloha RNS a ROS při klíčení houbových spor

Houby (*Fungi*, dříve *Mycophyta*) představují velkou skupinu živých organismů dříve řazenou k rostlinám, ale nyní vyčleněnou jako samostatnou říši. V užším pojetí jsou houby stélkaté organismy různého tvaru a velikostí, bez asimilačních barviv (tzn. bez plastidů), s heterotrofní výživou, s buněčnou stěnou impregnovanou chitinem. Zásobní látkou jsou oleje a glykogen. Houby se mohou rozmnožovat pohlavním i nepohlavním způsobem. V případě vegetativního rozmnožování dochází např. k fragmentaci vláknité stélky, u jednobuněčných kvasinek pučení nebo produkci nepohlavních výtrusů, a to buď ve specializovaných sporangii, nebo přímo na houbových vlákních v konidioforech. Pohlavní rozmnožování je běžným způsobem rozmnožování u většiny druhů hub, kdy dochází ke splyvání buněčných jader a meiotickému dělení, s následnou tvorbou spor, tzv. výtrusů (Šašek & Prášil, 2003). Klíčení spory je znázorněno na obr. 17.

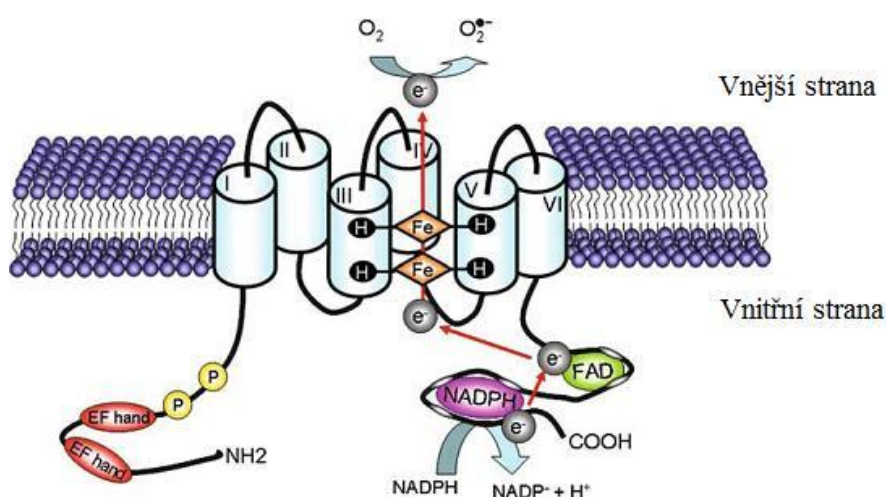


Obr. 17

Růstový vrchol houbové hyfy (Upraveno podle Šašek & Prášil, 2003).

Spory klíčí za příznivých podmínek (vlhkost, vhodné pH a teplota), tvoří se mykotické vlákna - hyfy, které podobně jako pylová láčka u rostlin vykazují apikální polární růst. Hyfa je rozdělena na kompartmenty za pomoci přepážek (septum), které jsou propojené centrálním pórem ($\approx 0,5\mu\text{m}$) podobným např. plasmodesmatům u rostlin, přes které je umožněn tok cytoplasmy a v ní rozpuštěných látek, ale také buněčných organel např. jader nebo mitochondrií. Klíčení spor může nastat buď okamžitě při dosažení vhodných podmínek pro růst a klíčení, nebo musí dojít k určité indukci klíčení působením různých růstových faktorů, např. tepelný šok. Po indukci klíčení dojde k aktivaci a rapidnímu zvýšení aktivity enzymů, zejména trehalasy, glycerol-3-fosfatasy a glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy, která je zajímavá tím, že se aktivuje ADP-ribosylací, jenž probíhá pouze v přítomnosti NO nebo substrátu - glycerinaldehyd-3-fosfátu (Deveze-Alvarez, et al., 2001).

Již dlouhou dobu je známo, že reaktivní kyslíkaté a dusíkaté formy jsou produkovány buňkami mykotických organismů v různé míře při rozmanitých fyziologických procesech, podobně, jak bylo popsáno u rostlin. Jejich hladiny kolísají v závislosti na vlivech venkovního prostředí, jako je např. vodní dispozice, nedostatek živin, mechanické poškození, intenzita různých typů záření (α , β , γ , UV) či interakce s jinými organismy (Belozerskaya & Gessler, 2006; Dröge, 2002). ROS a RNS se nepodílejí pouze na oxidativním stresu vyvolaném působením stresových faktorů a buněčném stárnutí, ale také např. na regulaci proliferace, diferenciaci, extracelulární signální transdukcii, iontovém transportu apod. Dosud známých cest produkce RNS a ROS v mykotických buňkách je hned několik. Asi nejčastějším producentem ROS je reakce O_2 s NADPH za vzniku $O_2^{\cdot-}$ katalyzovaná enzymem NADPH-oxidasou (NOX) kotvenou v cytoplasmatické membráně. Existence NOX byla prokázána ve všech mnohobuněčných organismech, výjimkou jsou pouze kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* a některé huby vykazující dimorfismus (Gessler, Aver'yanov 2007). Její pravděpodobnou strukturu znázorňuje obr. 18.

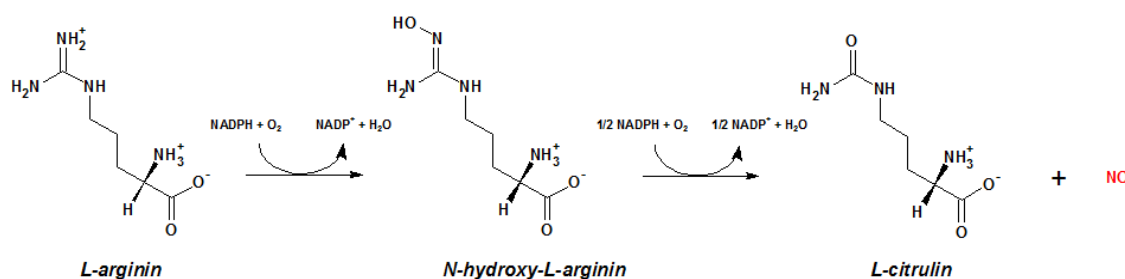


Obr. 18

Schéma znázorňující typickou strukturu NADPH oxidasy (NOX - RBOX - respiratory burst oxidase homolog). NOX je tvořena z cytosolového amino-terminálního regionu obsahujícího dva EF řetězce schopné vázat Ca^{2+} ionty, šest transmembránových domén včetně dvou molekul hemu (Fe), a katalytickou karboxy-terminální doménu obsahující FAD- a NADPH-vazebné domény. NOX vytváří superoxid vně buňky z molekulárního kyslíku převodem elektronů z oxidace NADPH v buňce (Převzato z Bell et al., 2009).

Produkce RNS, např. NO, v houbách se účastní enzymy s NO-synthasovou aktivitou (NOS). Jedná se o enzymy, které využívají řadu kofaktorů (NADPH, FAD, FMN, hem, CaM,

tetrahydrobiopterin), katalyzující přeměnu L-argininu na citrulin za vzniku NO (obr. 19) podílejícího se např. na regulaci tvorby a formace plodnic a sporangiofor (Maier, et al., 2001).



Obr. 19

Schéma reakce NO-synthas (NOS) identické pro buňky savců, rostlin i mykotických organismů (Kanadia et al., 1997).

Mykotické organismy bývají často biotrofními parazity, například u rostlin. Bylo dokázáno, že v místě infekce dochází k mnohonásobnému zvýšení koncentrace ROS a RNS. Předpokládá se, že tyto reaktivní formy jsou produkovány zejména rostlinou, nikoli mykotickým organismem. Signalizační pochody rostliny napadené biotrofními patogeny jsou úzce spjaty se zvýšením endogenní hladiny NO a jeho signalizací vedoucí k produkci již zmíněných ROS (Hong et al., 2008). Na produkci ROS a RNS se mohou podílet u obou organismů enzymy s podobnou katalytickou aktivitou (např. NOX). U hub se produkce ROS dále účastní flavinový enzym glukosaoxidasa, který se nachází typicky pouze u hub a je schopen oxidovat glukosu vzdušným kyslíkem na kyselinu glukonovou za vzniku odpadního produktu - H₂O₂. Dalším producentem H₂O₂ je např. glyoxaloxidasa pozorována u některých fytopatogenních kmenů.

Speciální postavení mají látky zvané elicitory. Elicitor je látka schopná vyvolat obrannou reakci v rostlině a aktivovat tak celý obranný mechanismus rostliny. Jedná se o metabolity patogenu, různého chemického složení nebo fragmenty poškozené buňky (oligosacharidy, peptidy, glykoproteidy, lipidické látky, atd.), které nejsou schopny sami od sebe produkovat ROS ani RNS, ale jsou schopny vyvolat u rostlin obrannou reakci spojenou např. s produkcí ROS. Typickými příklady elicitorů jsou protein elicitin, kyselina arachidonová, nebo uhlíkaté složky buněčné stěny hub (chitosan) (Shibuya & Minami 1998; Keller et al., 1996).

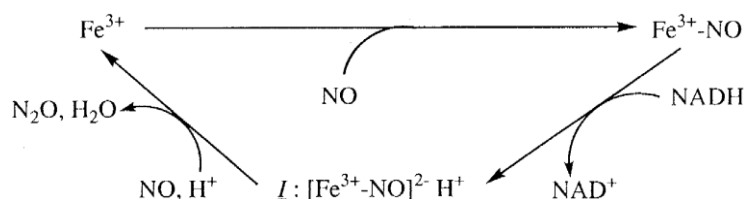
Na produkci ROS a RNS se dále mohou podílet mykotoxiny, jedovaté sekundární metabolity mikroskopických hub. Mykotoxiny mohou buď přímo uvolňovat ROS a RNS nebo se podílet na jejich produkci po redoxní reakci se složkami rostlinné buňky. Do první skupiny jsou řazeny fotosenzitivní mykotoxiny přímo produkující ROS a RNS (cerkosporin → singletový O₂ a O₂^{•-}, dothistromin → O₂^{•-} a H₂O₂). Druhou skupinu tvoří toxiny necitlivé na

světlo, ale vysoce reaktivní (naftazarin → přenášení elektronů z dýchacího řetězce rostlinné buňky na O₂, dihydrofusarubin → detoxikován cytochromem P-450 za produkce ROS). (Gessler et al., 2007).

Houby obsahují rovněž detoxikační a antioxidační systémy velmi podobné systémům známým u rostlin, např. superoxiddismutasy, katalasy, karotenoidy (β-karoten, neurosporaxanthin, astaxanthin), sloučeniny na bázi thiolů (thioredoxin, glutathion, -SH skupiny proteinů) (Belozerskaya et al., 2006, Mayer et al., 2001). Některé druhy hub označované jako denitrifikační obsahují enzymy zapojené v metabolismu N₂ a NO. Jedná se o nitrátreduktasu (NAR), nitritreduktasu (NIR) a reduktasu NO (NOR) které katalyzují sled reakcí:



Reduktasy oxidu dusnatého se podílejí na detoxikaci NO, ale postrádají monooxygenasovou aktivitu, tedy nedokážou oxidovat substráty s využitím O₂. Jedná se o hemoproteiny obsahující v aktivním místě skelet protoporfyrinu IX, avšak s vázaným Fe^V kationtem a thiolátovým residuem cysteinu. Tyto enzymy byly na základě své strukturní podobnosti zařazeny do rodiny cytochromů P-450. Mechanismus působení NOR je znázorněn na obr. 20. (Toritsuka et al., 1997).

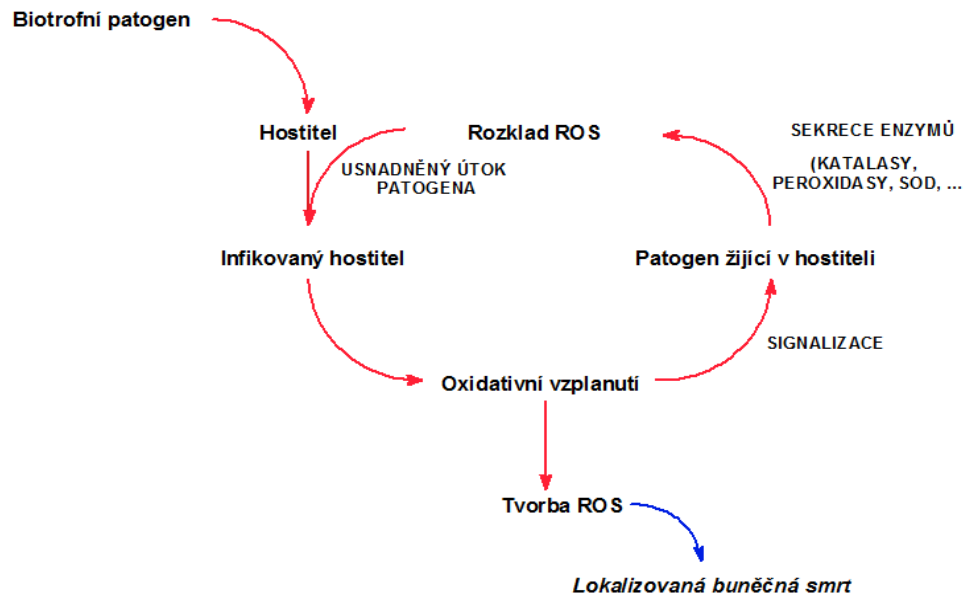


Obr. 20

Molekulární mechanismus působení NOR. (Převzato z Toritsuka et al., 1997).

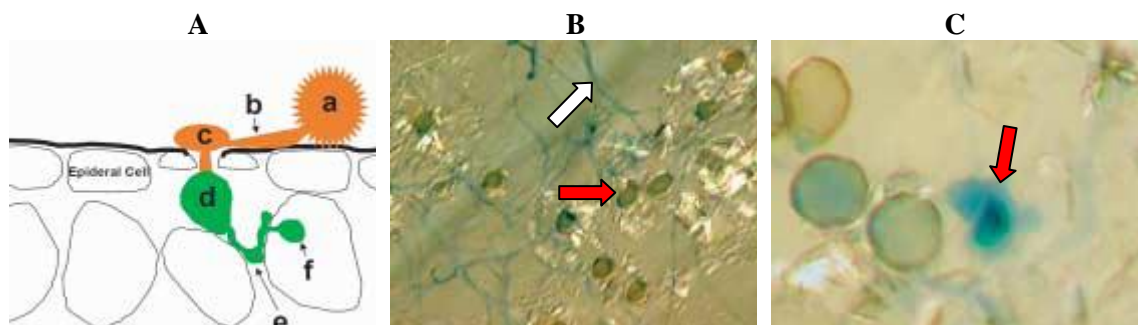
Rostliny odpovídají na napadení patogenem aktivací mnoha indukovaných obranných reakcí. Tyto reakce jsou regulovány sítí vzájemně propojených signálních drah, v nichž klíčovou roli hrají tři hormony: kyselina salicylová, jasmonová a ethylen (Bhattacharjee, 2005). Přestože se signální dráhy těchto hormonů protínají, kyselina jasmonová se podílí především na rezistenci rostlin k nekrotrofním patogenům, zatímco kyselina salicylová je dáována do souvislosti s patogeny biotrofními (De Vos et al., 2005). Indukce ROS a RNS výše uvedenými hormony může vest k programované buněčné smrti a aktivaci některých genů spojených s imunitními procesy, jak je souhrnně znázorněno na obr. 21 (Mayer et al., 2001). Imunitní odpovědi rostlin se liší v závislosti od druhu hostitele a jsou dnes poměrně dobře prozkoumány. Souhrnně se označují jako tzv. NHR efekty (z angl. non-host resistance) a zahrnují jakousi vrozenou odpověď na napadení patogenem. Poslední výzkumy poukazují na dvojí funkci NO v procesu rostlinné patogeneze. Bylo např. zjištěno, že NO jednak zpomaluje klíčivost spor

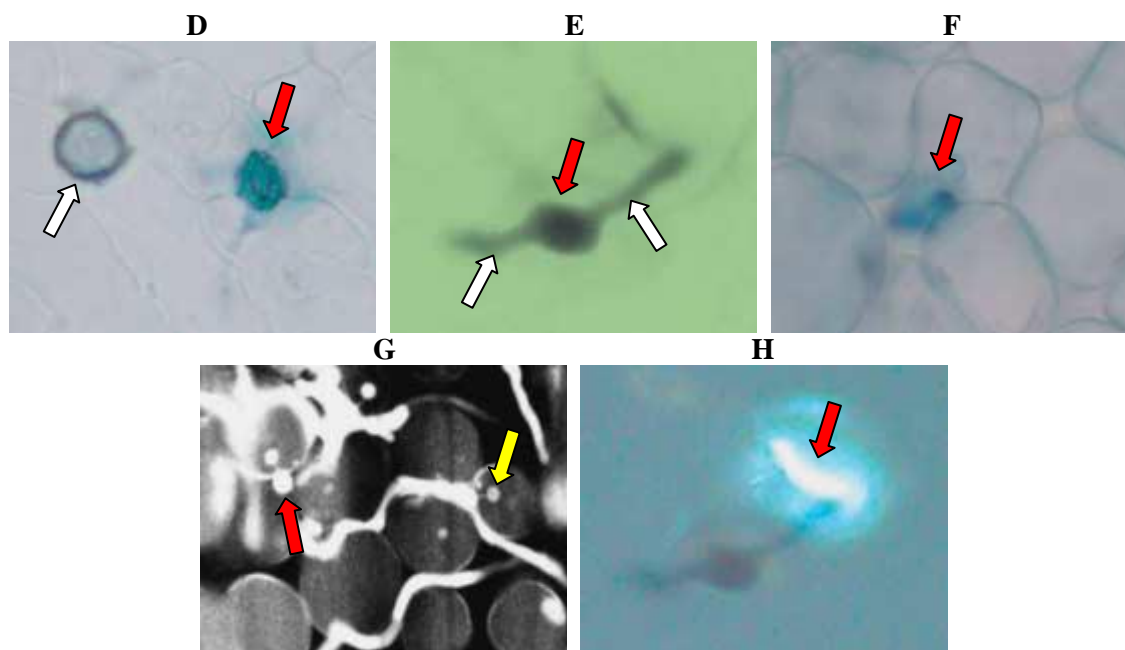
v patosystému *Solanum* spp. - *Oidium neolycopersici*, zatímco lapač NO c-PTIO v konečném důsledku vedl k akceleraci klíčení a rozvoji patogeneze. Inhibice NOS pomocí L-NAME (L-N^G-nitroarginin-methylester-hydrochlorid) neměla na vývoj tohoto patosystému značný dopad. Produkce NO byla detekována významně zejména u genotypů odolných vůči patogenezi *O. neolycopersici*, a to *S. chmielewskii* (středně resistantní) a *S. habrochaites f. glabratum* (vysoce resistantní). Druhým významným poznatkem v úloze NO v tomto patosystému je, že rovněž sporulace byla významně potlačena u genotypů s vysokou resistencí a teda vysokou tvorbou NO (Piterková et al., 2011). Úloha ROS v tomto patosystému je také významná, a zjistilo se např., že vyšší hladiny ROS tvořených při napadení rostliny patogenem indukují klíčení spor, zatímco aplikace antioxidantu zhášejícího ROS toto klíčení oddaluje (Sedlářová et al., 2011). Klasický průběh infekce rostliny biotrofním patogenem je popsán v několika krocích na obr. 22.



Obr. 21

Schematické znázornění některých interakcí mezi hostitelem (rostlinou) a biotrofním houbovým patogenem způsobujícím nekrosu (Upraveno dle Mayer et al., 2001).





Obr. 22

Odezva rostliny na infekci patogenem *Puccinia triticina*. (A) Schéma zobrazující infekci: a, spora na povrchu listu; b, klíčící vlákno; c, apresorium na povrchu průduchu d, substomatární váček; e, infekční hyfa; f, haustorium pronikající do mezofylu hostitele. (B) naklíčené spory. Červená šipka označuje spory, bílá šipka označuje klíčící hyfu patogenu. (C) apresorium tvořené přes průduch označené červenou šipkou. (D) indukovaná buněčná smrt označená červenou šipkou po pokusu o průnik přes průduch. Bílá šipka ukazuje na přilehlé naklíčené spory (E) červená šipka ukazuje substomatární vezikul, bílé šipky ukazují infekční hyfy v substomatární dutině. (F) červená šipka ukazuje haustorium, které se vyvinulo v mezofylových buňkách hostitele. (G) mateřské buňky haustoria jsou znázorněny červenými šipkami. Žlutá šipka ukazuje haustorium, vyvinuté v mezofylových buňkách hostitele. (H) haustorium vytvořené v mezofylu rostlina uzavřela v kalosové dutině a je označena červenou šipkou (Převzato z Shafiei et al., 2007).

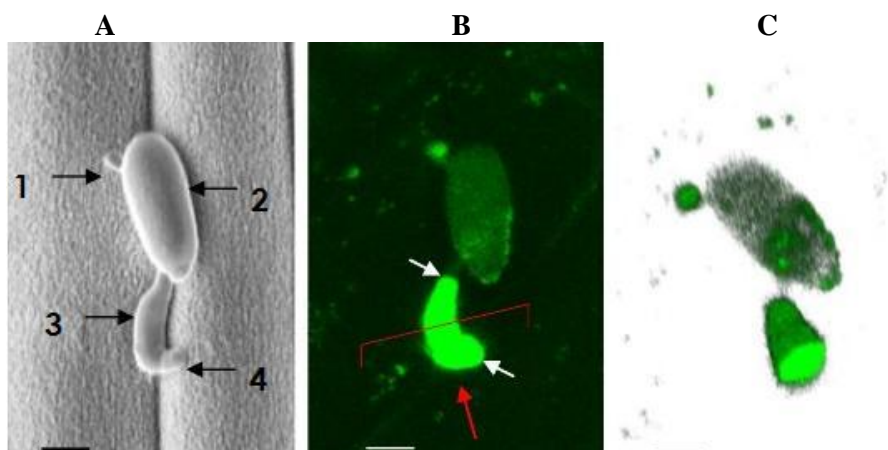
Vliv ROS na vývoj spor závisí na koncentraci těchto látek. Optimální koncentrace ROS vede k pozitivnímu ovlivnění řady signálních drah zodpovídajících za správný vývoj organismu. Výrazně zvýšená koncentrace ROS naopak může být škodlivá a vést v krajních situacích až k buněčné smrti. Důležitá je forma změny a mechanismus působení, kterou v dané koncentraci jsou schopny ROS vyvolat. Bylo např. prokázáno, že při nízké koncentraci H_2O_2 došlo k inhibici klíčení spor, v důsledku nedostatečné koncentrace ROS nutné pro aktivaci odpovídajících signálních drah. Po zvýšení koncentrace ROS na optimální hodnotu pro daný stav a organismus bylo zahájeno klíčení a opět při vysokých koncentracích ROS byla zaznamenána inhibice klíčení, v tomto případě způsobená nevratnými reakcemi ROS

v organismu vedoucími k oxidaci a degradaci složek buněčných organel (Belozerskaya & Gessler, 2006).

Oxid dusnatý (NO) a dusitaný ovlivňují klíčení a životaschopnost mykotických organismů v závislosti na typu organismu a pH prostředí. Při studiu role NO ve fyziologických a obranných reakcích živých organismů je používána řada sloučenin vystupujících jako donory NO. V případě donoru SNP - $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ se vždy ustálí rovnováha mezi NO a NO_2^- . Produkce NO tímto donorem je vždy významně závislá na čase působení a na jeho koncentraci, je však nevýznamně závislá na pH media, ve kterém se vyskytuje. Při použití jiných donorů NO, jako je např. SNAP (*S*-nitroso-*N*-acetylpenicilamin) nebo GSNO (*S*-nitrosoglutathion) dochází k uvolnění pouze NO. Experimenty prokázaly, že např. klíčící hyfy kvasinkového druhu *Candida albicans* jsou odolné vůči zvýšené koncentraci NO a také dusitanů nezávisle na pH prostředí naopak blastokonidie (nepohlavní spora vzniklá pučením, často kulatého nebo oválného tvaru typická pro kvasinky) jsou na zvýšenou koncentraci RNS rezistentní zejména v neutrální oblasti pH, kdežto v kyselé oblasti pH (4-5) jsou citlivější a dochází k inhibici klíčení a elongaci hyf, v krajních případech až k buněčné smrti (Abaitua et al., 1999).

Na základě poznatků získaných ze základního výzkumu byly realizovány experimenty se snahou využít prakticky NO jako fungicid a to ve formě postřiku obsahujícím donor NO nebo balení v ochranné atmosféře NO u různých posklizňových patogenů ovoce a zeleniny, především *Aspergillus niger*, *Monilinia fructicola* a *Penicillium italicum* za účelem snížení kazivosti zemědělských produktů. NO byl aplikován v plynné formě injekčně pod víčko Petriho misek s klíčovými sporami výše uvedených patogenů, následně byla stanovena klíčivost spor, růst mycelia a jeho elongace a také schopnost sporulace. Byl prokázán inhibiční vliv NO na studované parametry, inhibice se však objevila při různých koncentracích atmosférického NO v závislosti na druhu použitého patogenu, z důvodu různé citlivosti jednotlivých druhů na NO. (Lazar et al., 2008).

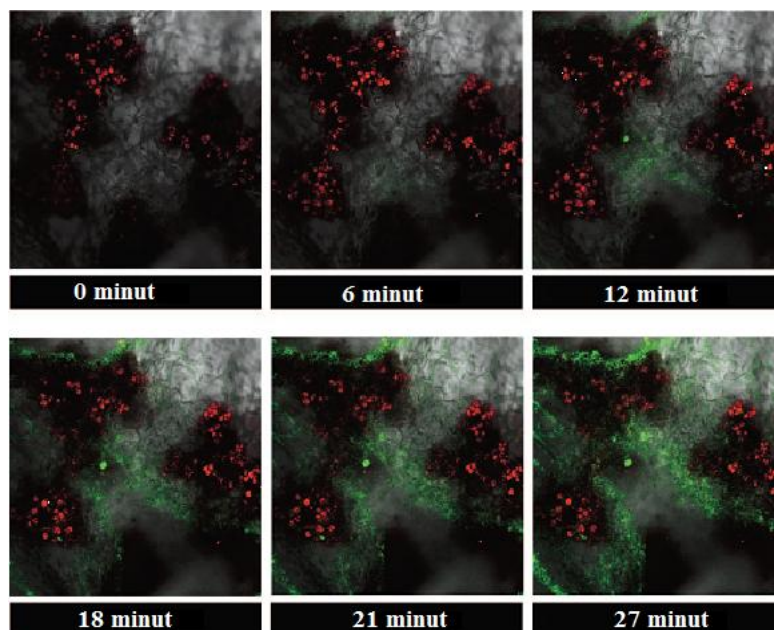
NO v případě klíčících spor některých druhů patogenních hub jako je např. *Blumeria graminis* může vyvolat také morfologické změny. Bylo prokázáno, že vlivem NO, tvořeného v buňce za běžných fyziologických podmínek pomocí mykotické NOS, dochází k tvorbě tzv. apresoria, útvaru zvětšujícího aktivní povrch mykotického vlákna pro usnadnění příjmu živin, který tvoří některé biotrofní patogeny po napadení hostitele. Po aplikaci lapače NO - c-PTIO došlo k razantnímu snížení četnosti tvorby apresoria, a podobného výsledku bylo pozorováno po aplikaci L-NAME jakožto inhibitoru NOS. Tím bylo prokázáno, že právě NO se podílí na tvorbě apresoria některých mykotických organismů, a jeho koncentrace je právě zde nejvyšší (obr. 23). V tomto případě dochází k velice sofistikovanému přizpůsobení patogenu rostlinnému organismu, produkujícímu v rámci obranných mechanismů ROS a RNS, které může daný patogen dokonce využít ve svůj prospěch, např. k tvorbě již zmíněného apresoria (Prats et al., 2008; Sedlářová et al., 2010).



Obr. 23

Fotografie zobrazující klíčící sporu *B. graminis* tvořící apesorium. (A) Naklíčení po 12 hod. 1 - klíčící hyfa, 2 - tělo spory, 3 - klíčící vlákno apesororia, 4 - lalok apesororia. (B) Lokalizace NO v apesoriu a zejména jeho špičce pomocí DAF-2 DA s využitím fluorescenční mikroskopie. (C), 3D obraz znázorňující příčné optické části získané z levého obrázku (Převzato z Prats et al., 2008).

Houby jsou schopny žít nejen individuálně, ale také v symbióze, zejména s jednobuněčnými řasami nebo sinicemi za tvorby symbiotického organismu – lišejníků. Fotobiontem v tomto případě je řasa nebo sinice, mykobiontem je vřeckovýtrusná nebo vzácně i stopkovýtrusná houba. Také u těchto organismů dochází k tvorbě ROS a RNS v rámci fyziologického vývoje organismů nebo v reakci na stresové podmínky. Lišejníky žijí v poměrně nepříznivých podmínkách a často jsou vystaveny působení nízkých teplot nebo nedostatku vláhy. Experimenty prokázaly, že při opětovné rehydrataci dochází k nárůstu koncentrace ROS a RNS jako odpovědi na fyziologický stav organismu ale na druhé straně dochází ke zvýšení intenzity fotosyntézy (obr. 24). Koncentrace ROS a RNS se zvyšuje nezávisle na světelných podmínkách, z čehož vyplývá, že klíčovým spouštěčem produkce ROS a RNS je rehydratace, a ne fotosyntéza (Weissman et al., 2005).



Obr. 24

Kinetika produkce NO v houbových hyfách rehydratované stélky lišejníku *Ramalina lacera* sledovaná pomocí fluorescenční sondy DAF-2 DA laserovou konfokální mikroskopií. Červený kanál - fluorescence chlorofylu v chloroplastech buněk řas, zelený kanál - DAF-2T fluorescence. K částem stélek (1 cm^2) na podložním sklu bylo aplikováno $100 \mu\text{l}$ $10 \mu\text{M}$ DAF-2 DA v deionizované vodě. Měřítka: $1 \text{ cm} = 30 \mu\text{m}$ (převzato z Weissman et al., 2005).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 Materiál a přístroje

4.1 Chemikálie

Agarosa standard EEO (Serva, Německo), askorbová kyselina (Duchefa, Holandsko), sacharosa (Lachema, Česká republika) chlorid vápenatý dihydrát (Sigma, USA), kyselina trihydrogenboritá (Chemapol, Česká republika), dusitan sodný (Lachema, česká republika), glutathion redukovaný, (Duchefa, Holandsko), MS medium (Duchefa, Holandsko), KOH (Lachema, Česká republika), agar (Sigma, USA), H₂DCF DA (Sigma, USA), DAF-FM DA (Alexis, Švýcarsko), peroxid vodíku (Lachema, Česká republika), c-PTIO (Sigma, USA).

4.2 Rostlinný materiál

Pro studium vlivu NO na proces klíčení u vyšších rostlin byl použit pyl okurky seté (*Cucumis sativus* L. cv. Marketer). Semena rostlin byla vyseta do perlitu a po dvou týdnech byly semenáčky rostlin přesazeny do květináčů se zahradnickým substrátem. Rostliny byly pěstovány ve skleníku při fotoperiodě 16/8 h (den/noc) a teplotě 26 °C/18 °C (den/noc) po dobu 7-8 týdnů. Rostliny byly poskytnuty Katedrou botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Česká republika.

Dále byl studován vliv NO na proces klíčení houbových spor, kde jako biologický materiál byly použity spory smrže obecného (*Morchella esculenta* spp.) kmenů „štepkový“ a „žebračka“ a padlí rajčatového (*Oidium neolycopersici*) poskytnuty Katedrou botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Česká republika.

4.3 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy, Sartorius, Německo

Automatické pipety, Eppendorf research, Německo

Digitální chlazená kamera DP70, Olympus, Japonsko

Digitální předvážky, Kern, Německo

Flowbox, Helios 48, Itálie

Invertovaný světelný mikroskop IX51, Olympus, Japonsko

Mikromanipulační a mikrokapilárový systém pro mikroskopii, Narishige, Japonsko

Světelný a fluorescenční mikroskop BX50, Olympus, Japonsko

Konfokální laserový řádkový mikroskop Fluoview 1000, Olympus, Japonsko
Borosilikátové mikroskopické misky, Zell-kontakt, Německo

5 Použité metody

5.1 Příprava růstového media pro klíčení pylu

Medium vhodné pro studium klíčení pylu obsahovalo 0,06% CaCl_2 , 0,01% H_3BO_3 , 8% sacharosu v 1% agarose. Do středu podložního sklíčka bylo aplikováno 0,5 ml zahřátého roztoku media. Po zchlazení na pokojovou teplotu a ztuhnutí agarosy, byl na podložní skla pomocí pinzety aplikován pyl. Podložní skla byla uchovávána ve vlhké komůrce (Petriho miska s proužky navlhčené buničiny po jejím obvodu) při pokojové teplotě.

5.2 Příprava růstového media pro klíčení spor

Medium pro studium klíčení spor mykotických organismů obsahovalo 1% agarosu. Homogenní roztok se připravil zahřátím v mikrovlnné troubě.

5.3 Příprava S-nitrosoglutathionu (GSNO)

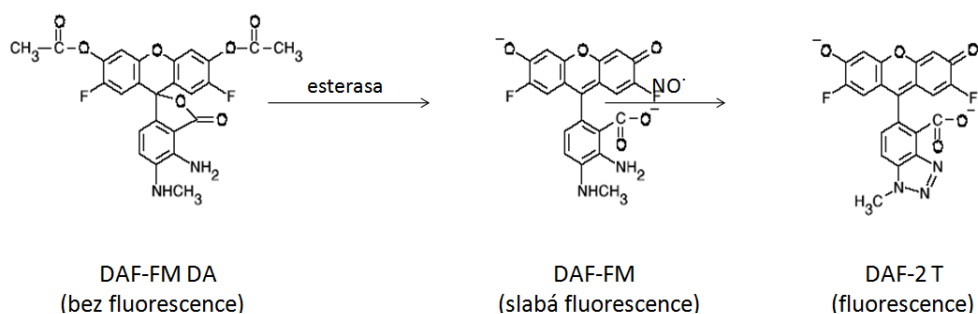
614 mg glutathionu (2 mmol) se rozpustí za stálého míchání ve 3 ml 0,5 M roztoku HCl. Roztok se ochladí na ledové lázni na teplotu 0-2°C a poté se po malých dávkách za chlazení a míchání přidává navážka 138 mg (2 mmol) NaNO_2 . Vzniká červený roztok, postupně dochází k tvorbě růžového produktu. Ten je odsát na Büchnerově nálevce a promýt 2 x 10 ml ledové vychlazené vody, acetonu a diethyletheru a ponechán k vysušení v exsikátoru přes noc. S-nitrosoglutathion se uchovává mimo dosah světla při teplotě do 5°C (Převzato z Moore & Mani, 2002).

5.4 Lokalizace RNS a ROS

Detekce NO v pylových láčkách a klíčících sporách byla provedena pomocí fluorescenční sondy DAF-FM DA. Po aplikaci 20 μl 20 μM sondy ke klíčícímu pylu nebo sporám na podložním sklu byl preparát inkubován 20 min ve tmě při pokojové

teplotě., Jako pozitivní kontrola sloužil preparát inkubovaný 25 minut s 20 μl 0,1 mM GSNO. Negativní kontrolu tvořil preparát inkubovaný cca 30 min s lapačem NO - c-PTIO o koncentraci 0,1 mM.

Podstatou stanovení NO je pronikání sondy DAF-FM DA dovnitř živých buněk, kde dochází k odštěpování acetaťových residuů cytosolickými esterasami, čímž vzniká DAF-FM. Ten ještě nevykazuje dostatečnou fluorescence pro pozorování fluorescenční mikroskopií, ale reakcí s NO vzniká triazolový fluoresceinový derivát DAF 2-T, který vykazuje již značnou fluorescence. Reakční mechanismus jeho vzniku je znázorněn na obr. 25 (Neil et al, 2002).

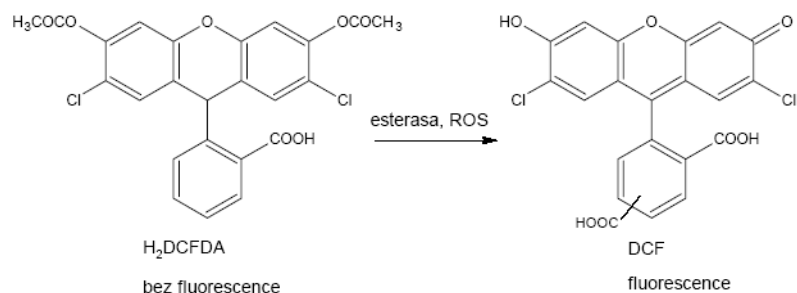


Obr. 25

Mechanismus přeměny DAF-FM DA na triazolový derivát fluoresceinu v živých buňkách, který je používán k detekci NO v buňce (Neil et al., 2002).

Detekce ROS byla provedena pomocí fluorescenční sondy $\text{H}_2\text{DCF DA}$. Po aplikaci 20 μl 15 μM sondy byl preparát inkubován 15 min ve tmě při pokojové teplotě, poté byl pozorován pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie s využitím stejného laserového paprsku a emisního filtru stejného jako v případě lokalizace NO. Jako pozitivní kontrola sloužil preparát inkubovaný 30 minut s 20 μl 0,1 mM H_2O_2 . Negativní kontrolu tvořil preparát inkubovaný cca 30 min s 10 mM kyselinou askorbovou (antioxidant).

Podstatou stanovení ROS je pronikání sondy $\text{H}_2\text{DCF DA}$ dovnitř živých buněk, kde dochází k odštěpování acetaťových residuů cytosolickými esterasami, čímž vzniká H_2DCF . Poté dochází k jeho oxidaci molekulami ROS a vzniká silně fluorescenční molekula DCF. Reakční mechanismus vzniku DCF v buňce je znázorněn na obr. 26 (Gomes et al, 2006).



Obr. 26

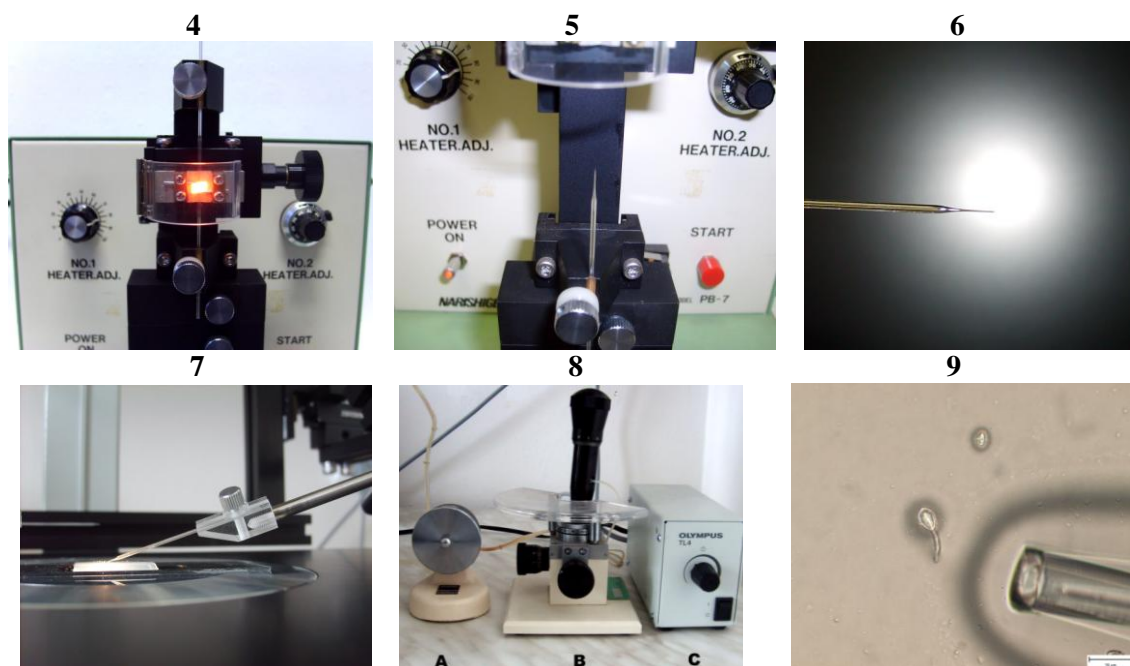
Oxidace fluorescenční sondy 2',7'- dichlorodihydrofluoresceindiacetátu v buňce pomocí reaktivních molekul ROS (Gomes et al., 2006).

6. Zavedení metodiky lokální aplikace donoru NO

6.1 Metoda využívající mikromanipulátor

Mikromanipulační techniky jsou velice precizní a přesné metody založené na přenosu pohybu ruky v řádech několika centimetrů na posuv malých předmětů (mikrokapilára, mikroelektroda apod.) o velmi malou vzdálenost v řádech několika setin milimetru umožňující například přesnou aplikaci požadované látky v daném místě. Práce s mikromanipulátory je v současné době využívána v řadě speciálních laboratoří. Metodika vyžaduje poměrně drahé technické vybavení (invertovaný mikroskop, stůl pro mikroskopii tlumící nárazy přenášené z okolí, tavicí přístroj pro tvorbu mikrokapilár, apod.). Použití metody sestávalo z několika mezikroků, jako je příprava mikrokapiláry, lokální aplikace donoru, pořizování fotografií a jejich elektronická úprava apod. Přístrojové vybavení je zdokumentováno na obr. 27. Jako donor NO byl použit 1 mM GSNO v 0,5 % agarose, kterou byla naplněna mikrokapilára. Po naklíčení pylových zrn (30 min) byl aplikován donor NO přiložením mikrokapiláry s jeho obsahem na medium k naklíčeným pylovým zrnům (kolmý směr k apikální části pylové láčky). V 5 min intervalech byly pořízeny fotografie klíčícího pylu.



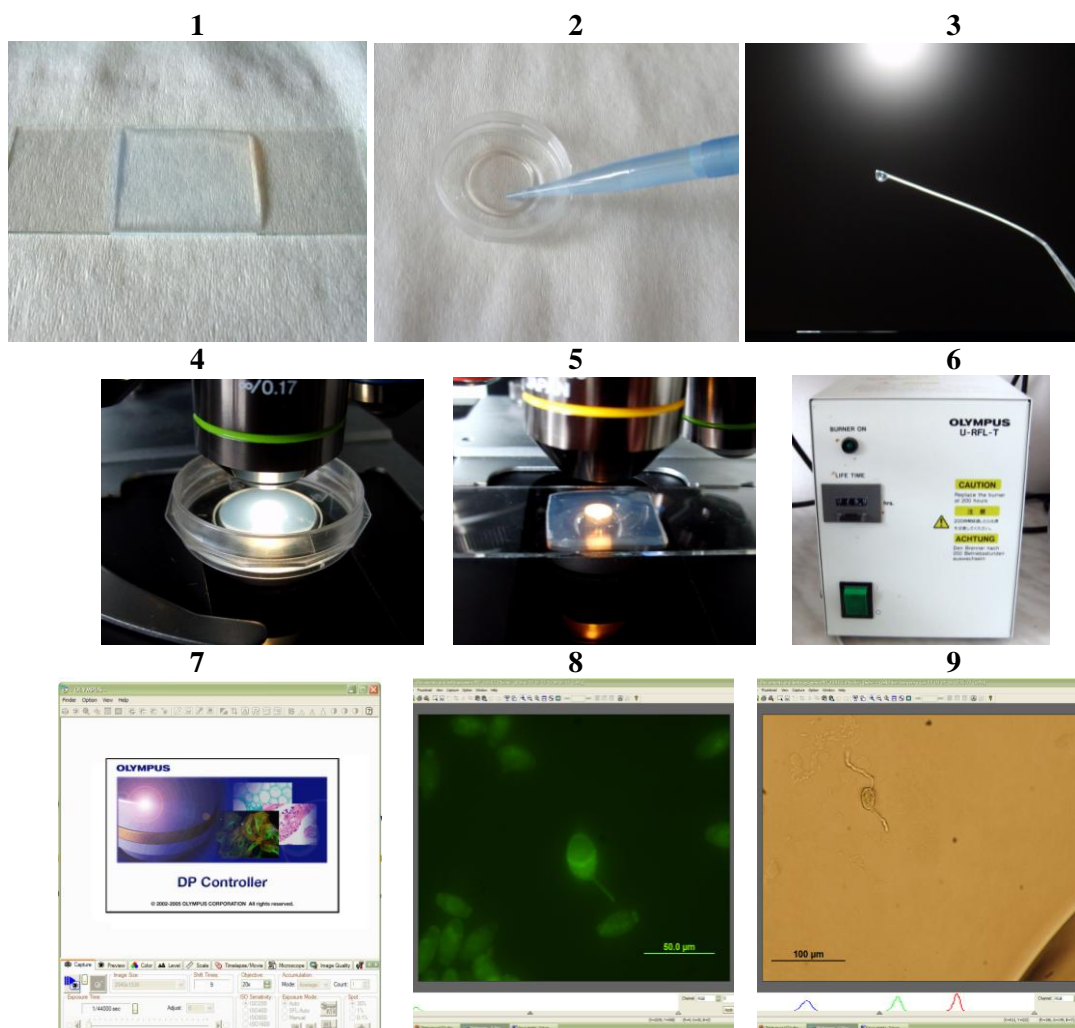


Obr. 27

Aplikace metody mikromanipulace při studiu vlivu NO na proces klíčení. 1) komerčně dodávané kapiláry, 2) zařízení pro přípravu kapilár Narishige PB-7, 3) detail uchycení kapiláry, 4) detail žhaveného vlákna obklopujícího kapiláru, 5) připravená mikrokapilára, 6) detail hrotu mikrokapiláry, 7) aplikace mikrokapiláry do blízkosti klíčícího objektu na živném mediu, 8) ovládání mikromanipulačního ramena: A, vertikální posuv levého ramena, B, kompletní posuv s joystickem pravého ramena, C, ovládání intenzity osvětlení 9) snímek pozorovaného objektu s aplikovanou mikrokapilárou.

6.2 Kapková metoda

Druhou používanou metodou byla metoda využívající aplikace agarosových kapek obsahujících donor NO na růstové medium na podložním skle, případně na speciální Petriho misce, obsahující ve středové části sklo umožňující prohlížení objektu mikroskopem. Na medium byly vždy aplikovány pomocí pipety 1 - 1,5 μ l kapky 0,5 % agarosy obsahující GSNO v konečné koncentraci 1 mmol/l a to do těsné blízkosti klíčícího objektu pozorovaného pomocí invertovaného mikroskopu. Donor NO byl aplikován na medium s klíčovými pylovými zrny *C. sativus* (30 min po přenosu pylových zrn na medium), klíčovými sporami *M. esculenta* (8 h po přenosu spor na medium) a *O. neolycoopersici* (3 h po přenosu spor na medium). Použití metody sestávalo z několika mezikroků, které jsou přehledně znázorněny na obr. 28. Aplikace této metody je náročnější a vyžaduje manuální zručnost, poskytuje však mnoho výhod ve srovnání s využitím mikromanipulační techniky instalované v laboratoři Katedry biochemie.



Obr. 28

Aplikace kapkovací metody při studiu vlivu NO na proces klíčení. 1) Růstové medium na podložním skle, 2) alternativní použití misek pro mikroskopii, aplikace media, 3) vytvoření kapky agarosy s obsahem GSNO pomocí mikropipety před aplikací do blízkosti klíčícího objektu, 4-5) mikroskopie objektů v modu světelné mikroskopie, 6, fluorescenční lampa vhodná pro detekci RNS a ROS, 7, softwarový program pro tvorbu a úpravu fotografií, 8, 9, pozorování objektů v modu fluorescenční a světelné mikroskopie.

6.3 Mikroskopování a dokumentace pozorovaných objektů

Pro pozorování objektů byl použit:

1. fluorescenční mikroskop Olympus BX50 s hranolem U-MWB2 s digitální kamerou Olympus DP-70 s využitím softwaru DP Controller v. 2.3.1.
2. inverzní mikroskop Olympus IX51 s digitálním zrcadlovým fotoaparátém Olympus E450 s využitím softwaru QuickPHOTO MICRO 2.3.

- konfokální laserový skenovací mikroskop (Olympus FluoView 1000 ve spojení s invertovaným mikroskopem IX81) s využitím paprsku argonového laseru o vlnové délce 488 nm a s použitím emisního filtru 505-525 nm.

7. Výsledky a diskuse

7.1 Porovnání metody využívající mikromanipulátor a kapkové metody

Metoda využívající mikromanipulátor při studiu vlivu NO na proces klíčení spočívala v přesné lokální aplikaci donoru NO v těsné blízkosti klíčících objektů za použití mikrokapiláry obsahující sloučeninu, která je donorem NO. NO se postupně uvolňoval a difundoval do růstového media, kde byl v kontaktu s klíčícím objektem. Invertovaný mikroskop propojený s počítačem umožňoval tvorbu sekvencí fotografií dokumentujících klíčení v čase bez aplikace a po lokální aplikaci donoru NO. Výhody a nevýhody metody využívající mikromanipulátor při studiu vlivu NO na proces klíčení jsou uvedeny přehledně v tabulce 8.

Realizaci metody práce s mikromanipulátory za stávajících podmínek znemožňovalo umístění mikroskopu v laboratoři s intenzivním provozem a zejména nedostatečně zpevněným pracovním stolem, kdy v důsledku drobných otřesů, průvanu apod., docházelo k nežádoucímu pohybu mikrokapiláry a znehodnocení experimentu. V případě připravených kapilár nebyl hrot kapiláry vždy rovný. Z důvodů nutnosti několikahodinové inkubace, zejména v případě klíčení spor, nebyla k dispozici vlhká komůrka zajišťující vhodné prostředí pro proces klíčení.

Tab. 8

Výhody a nevýhody zjištěné při zavedení mikromanipulační techniky při studiu vlivu NO na proces klíčení.

<i>Výhody metody</i>	<i>Nevýhody metody</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Vysoká přesnost, preciznost • Přesné dávkování i většího množství donoru • Pohodlná manipulace 	<ul style="list-style-type: none"> • Vysoké nároky na technické vybavení • Vysušování preparátu • Prašnost prostředí • Nerovnoměrné zvlhčení při použití zvlhčovacího proužku buničiny • Pohyb mikrokapiláry vlivem otřesů přenášených z okolí • Mikrokapiláry s neostrými hranami

Z důvodů zejména technických problémů spojených s využitím mikromanipulační techniky za stávajícího přístrojového vybavení byla vypracována alternativní metoda umožňující lokální aplikaci donoru NO pomocí agarosové kapky a následně studia vlivu NO na proces klíčení. Rozměr 1 μl kapky agarosy s donorem NO byl akceptovatelný pro realizaci studie. Klíčící objekty i s lokálně aplikovaným donorem NO byly inkubovány v rámci daných experimentů v kultivačních boxech za standardních podmínek, odkud byly vždy odebrány pouze pro mikroskopické pozorování ve vhodných časových intervalech. Nevýhodou metody je výrazně náročnější aplikace kapky na místo určení, z tohoto důvodu je nutné realizovat experiment v několika opakováních. Výhody a nevýhody kapkovací metody jsou přehledně shrnuty v tabulce 9.

S využitím kapkové metody byl studován vliv NO v procesu klíčení pylu vyšších rostlin a také spor biotrofního patogenu a spor symbiotického saprofytu. Byl studován vliv na dynamiku růstu, změnu směru klíčení, buněčnou perforaci a lyzi, a změnu hladiny ROS a NO v klíčících objektech po donaci NO z externího zdroje pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie.

Tab. 9

Výhody a nevýhody zjištěné při zavedení techniky kapkování při studiu vlivu NO na proces klíčení.

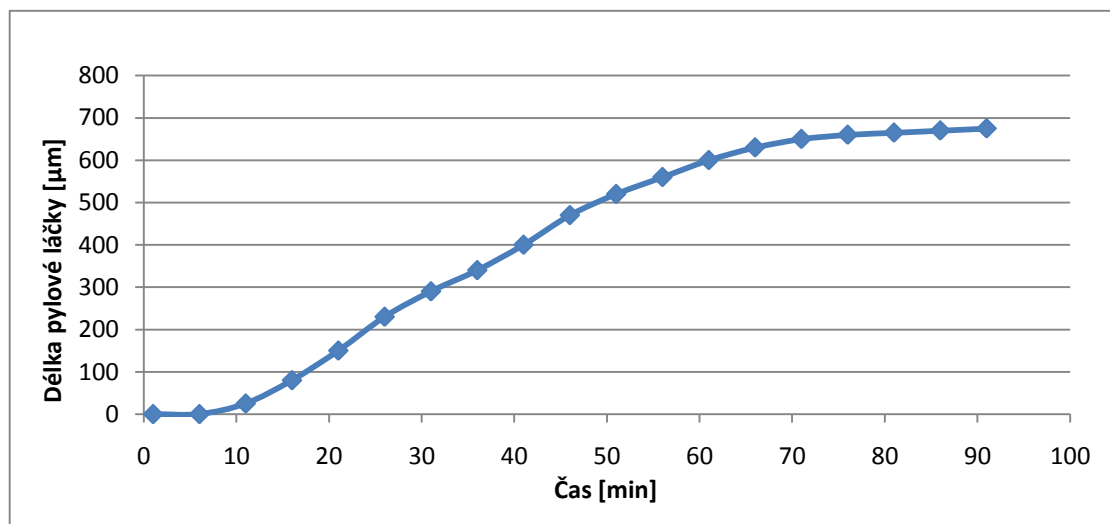
<i>Výhody metody</i>	<i>Nevýhody metody</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Preparát není poškozen ořesy z prostředí • Nedochozí k vysušování preparátu • Omezena prašnost z prostředí • Homogenní vlhkost v celé misce • Jednoduché technické řešení, nízké požadavky na přístrojové vybavení 	<ul style="list-style-type: none"> • Náročnost, pracnost • Rychlé ztuhnutí agarosy ve špičce • Menší přesnost lokální aplikace • Velikost vytvořené kapky

Hlavním cílem předložené bakalářské práce bylo zavést metodiku umožňující studium lokální aplikace donoru NO, např. na proces klíčení pylu, spor apod. V práci Prado et al, 2004 byl aplikován lokálně donor NO pomocí mikrokapiláry při studiu vlivu NO na proces klíčení pylu lilie dlouhokvěté (*L. longiflorum*). V podmínkách naší laboratoře jsme srovnatelných výsledků dosáhli rovněž kapkovou metodou, kterou jsme následně použili i při studiu vlivu NO na klíčení spor. Pylová zrna lilie dlouhokvěté jsou mnohem větší (cca 150 μm v průměru) než v případě okurky seté (cca 70 μm) (Katifori et al., 2010). Z tohoto důvodu byla v našem případě ztížena manipulace a celkové provedení experimentu.

7.2 Studium vlivu lokální aplikace donoru NO na vývoj pylové láčky

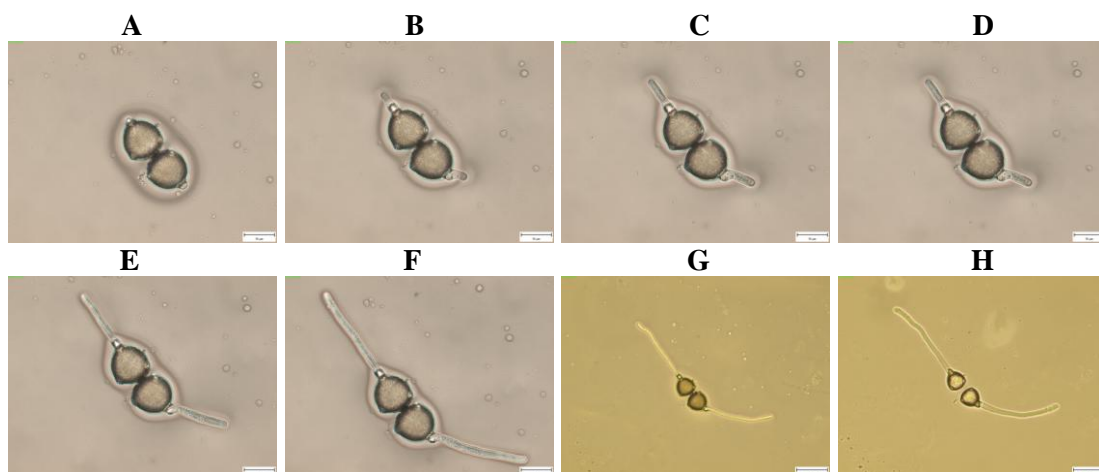
7.2.1 Vývoj pylové láčky

Při studiu vlivu NO na proces klíčení pylu byl jako biologický materiál zvolen trizonoporátní pyl okurky seté (*C. sativus* L. cv. Marketer). Po aplikaci pylových zrn na růstové medium došlo k tvorbě tří klíčících pórů, ze kterých po čase vyrůstala jedna pylová láčka. Pro zvolení vhodné doby pro lokální aplikaci donoru NO bylo nutné nejdříve stanovit růstovou křivku charakterizující klíčení pylového zrna (tj. změnu délky pylové láčky v čase) na růstovém medium (viz. kapitola materiál a metody), které bylo použito ve všech následujících experimentech při studiu vlivu NO na klíčení pylu. Dynamika růstu pylové láčky v čase je uvedena v grafu 1 a je pro názornost doplněna mikrofotografiemi klíčícího pylového zrna (obr. 29). Klíčení pylové láčky bylo detekováno cca po 10 min po aplikaci pylových zrn na růstové medium. V průběhu následujících 45 min se pylová láčka rovnoměrně prodlužovala a cca 60 min po aplikaci pylových zrn na medium se růst pylové láčky zpomaluje a následně zastavuje.



Graf 1

Dynamika růstu pylové láčky při klíčení pylových zrn okurky seté (*C. sativus*).



Obr. 29

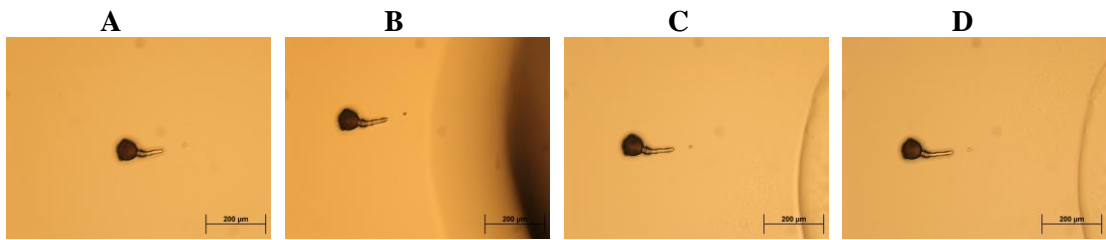
Klíčící pylové zrno okurky seté (*C. sativus*) po aplikaci na růstové medium v čase: A) 1 min B) 11 min C) 21 min D) 31 min E) 41 min F) 51 min G) 61 min H) 71 min. Měřítka 50 µm (A-F), 100 µm (G-H).

7.2.2 Vliv lokální aplikace donoru NO na vývoj pylové láčky

Při studiu vlivu NO na klíčení pylu *C. sativus* byl aplikován donor GSNO vždy o koncentraci 1 mmol/l ke klíčící pylové láčce ve formě agarosové kapky 5 minut po iniciaci klíčení. Byly pozorovány čtyři rozdílné reakce klíčící pylové láčky na přítomnost NO: 1) inhibice růstu, 2) rozšíření apikální části klíčící pylové láčky, 3) praskání a následná buněčná lyze, 4) změna směru růstu pylové láčky. Podobné efekty byly pozorované i při studiu vlivu NO na klíčení pylových zrn různých rostlinných druhů (Prado et al., 2004; He et al., 2007; Feijó et al., 2004; Smirnov, 2000; Dresselhaus et al., 2010).

7.2.3 Vliv na inhibici růstu pylové láčky

V četných případech byla dokumentována inhibice růstu pylové láčky téměř okamžitě po aplikaci agarosové kapky s donorem NO ke klíčícímu pylovému zrnu (obr. 30). Růst pylové láčky po aplikaci donoru NO nebyl pozorován ani po několika hodinách inkubace naklíčeného pylového zrna za standardních kultivačních podmínek. Podobných výsledků bylo dosaženo také v předchozích experimentech publikovaných v literatuře. Pozorovaný poznatek byl popsán např. v článku He et al, 2007, kde byla pozorována inhibice růstu pylu paulovnie plstnaté (*P. tomentosa*) způsobená přítomností vyšší intracelulární koncentrace NO.



Obr. 30

Vliv zvýšené externí koncentrace NO na vývoj pylové láčky. Inhibice růstu klíčící pylové láčky po lokální aplikaci donoru NO (GSNO). Doba po přenesení pylových zrn na růstové medium: A) 9 min - bez GSNO, B) 10 min - aplikace GSNO, C) 20 min - s GSNO, D) 70 min - s GSNO. Měřítka 200 µm.

7.2.4 Vliv na rozšíření apikální části pylové láčky

Při studiu vlivu NO na vývoj pylové láčky bylo pozorováno zbytnění apikální části pylové láčky po lokální aplikaci donoru NO. Tento proces byl vždy doprovázen inhibicí růstu pylové láčky, jak znázorňuje obr. 31. Podobného výsledku bylo dosaženo také v předešlých experimentech publikovaných v literatuře (Prado et al., 2004) a předpokládá se, že tento důsledek je způsoben S-nitrosylací β -aktinových vláken pomocí reaktivních molekul NO na C - konci. Tato modifikace vyústí často v obtížný průběh polymerace aktinových vláken, ztíženou tvorbu aktinových sítí, zpomalení prodlužování těchto vláken a jejich obtížný transport v buňce, tedy i zpomalení až inhibice klíčení pylové láčky (Prado et al, 2010; Thom et al, 2008; Feijó et al, 2004).

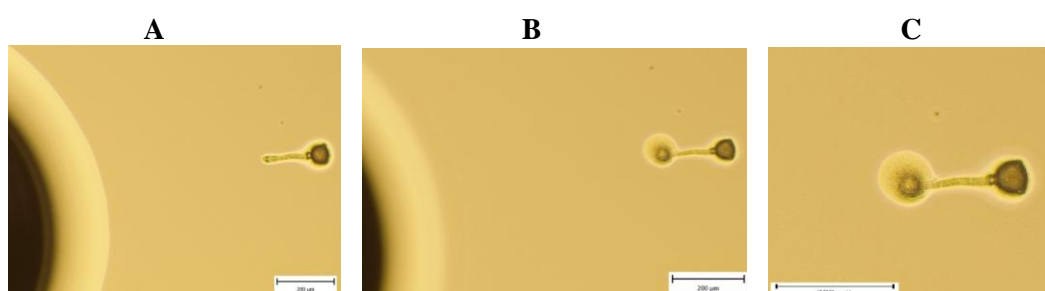


Obr. 31

Vliv zvýšené externí koncentrace NO na vývoj pylové láčky. Pyl byl aplikován na živné medium, po 15 min byl aplikován donor NO ve formě agarosové kapky. Po čase bylo patrné zbytnění apikální části pylové láčky. Doba po aplikaci donoru NO 20 minut. Fotografie A, B znázorňují celkový pohled na klíčící objekty s rozšířenou apikální částí po donaci NO, fotografie C) znázorňuje detail rozšířené apikální části.

7.2.5 Vliv na destrukci a buněčnou lyzi pylové láčky

Po aplikaci donoru NO ke klíčicímu pylovému vláknu došlo často k prasknutí buněčné stěny klíčící pylové láčky a vylití buněčného obsahu - buněčné lyzi. Lze předpokládat, že zmiňovaná destrukce je způsobena vlivem NO z externího zdroje, zejména při jeho vysoké koncentraci (2 mM a vyšší). Pozorované případy prasknutí pylové láčky jsou znázorněny na obrázku 32. Předpokládané důvody destrukce buněčných membrán a vylití obsahu pylové láčky mohou být zejména osmotické jevy a následná plazmolýza, která může být ještě urychlena zapojením NO v procesu lipoperoxidace buněčných membrán a tím jejich oslabení a náchylnosti k protržení (Smirnov, 2000).



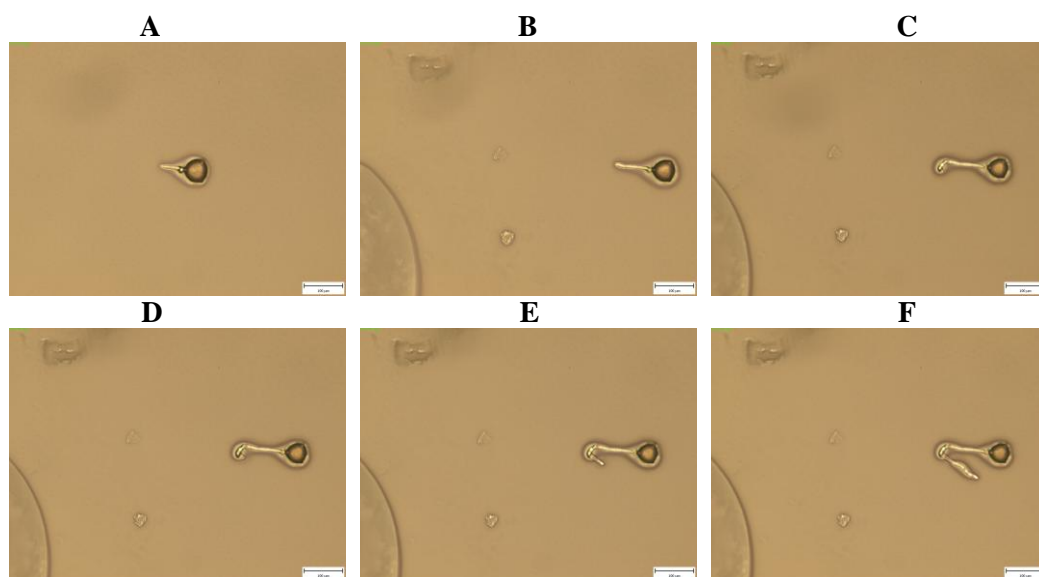
Obr. 32

Vliv zvýšené externí koncentrace NO na vývoj pylové láčky. Lyze buněčné stěny po lokální aplikaci donoru NO ke klíčící pylové láčce. A) Aplikován donor NO ve formě agarosové kapky ke klíčicímu objektu po 10 min od přenesení pylového zrna na růstové medium, B) prasknutí buněčné stěny a vylití buněčného obsahu po 3 min od aplikace donoru, C) detail prasknuté buněčné stěny klíčící láčky. Měřítko 200 µm.

7.2.6. Vliv na směr vývoje pylové láčky

Po lokální aplikaci donoru NO v blízkosti klíčícího pylového vlákna byla pozorována u některých klíčících pylových zrn změna směru klíčení pylové láčky. Tato změna byla vždy doprovázena inhibicí růstu, rozšíření apikální části klíčícího pylového vlákna a následnou změnou směru růstu pod určitým úhlem, jak je zobrazeno na obr. 33. Pozorovaný jev je v souladu s daty publikovanými v práci Prado et al., 2004, kde byl stejný efekt prokázán u pylu lilie dlouhokvěté (*L. longiflorum*). Tento jev je pravděpodobně způsoben reversibilní S-nitrosylací cytoskeletárních vláken β -aktinu, který tímto způsobem inhibuje polymeraci a vzájemné propojení vláken. Tím se naruší cytoskeletární stavba a dochází k vzniku zbytnění apikální části. Tato vazba je však reverzibilní, po čase dochází k denitrosylaci a obnoví se klíčení pylové láčky, často však v jiném směru, který je orientován směrem od místa s vysokou hladinou NO (Prado et al., 2010; Thom et al., 2008; Feijó et al., 2004). NO vystupuje jako

negativní chemotaktický atraktant, což může mít významný vliv na proces opylení a oplodnění rostlin. Bylo např. prokázáno, že látky obsažené v pestíku vystupují jako pozitivní atraktanty, navádějící klíčící pylovou láčku do nitra pestíku k vajíčkům, v případě NO ve spojení s ROS (často se vyskytující v pestíku) pravděpodobně dochází k navigaci pylové láčky k vejcové buňce (oosféře) na základě negativní orientace (od zdroje) jak je poukázáno níže. Molekulární mechanismus tohoto působení není dosud plně objasněn a je intenzivně studován (Dresselhaus et al., 2010).



Obr. 33

Vliv zvýšené externí koncentrace NO na vývoj pylové láčky. Reorientace klíčící pylové láčky po lokální aplikaci donoru NO ke klíčící pylové láčce. Doba po přenesení pylových zrn na růstové medium: A) 10 min - s GSNO, B, 15 min - aplikace GSNO C) 25 min – s GSNO, inhibice klíčení a rozšíření apikální části pylové láčky, D) 40 min - s GSNO, zahnutí apikální části pylové láčky, E) 55 min - s GSNO, iniciace klíčení pylové láčky z rozšířené apikální části pylové láčky, v jiném směru než byl původní, F) 75 min - s GSNO, pokračování růstu pylové láčky v jiném směru. Měřítka 100 µm.

7.2.7 Detekce ROS a NO v procesu klíčení pylu

Dalším úkolem bakalářské práce byla detekce produkce ROS a RNS u klíčících pylových zrn *C. sativus*. Produkce ROS i RNS byla prokázána pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie. Pro detekci ROS byla použita fluorescenční próba H₂DCF DA o koncentraci 15 µM, pro detekci NO próba DAF-FM DA o koncentraci 20 µM. Detekce NO v klíčícím pylu bez donace NO je znázorněna na obr. 32, detekce NO po donaci NO z externího zdroje způsobujícího reorientaci klíčící pylové láčky je znázorněn na obr. 34. Pomocí

fluorescenční próby DAF-FM DA byla detekována přítomnost NO po lokální aplikaci GSNO zejména v rozšířené apikální části a pylovém zrnu.



Obr. 34

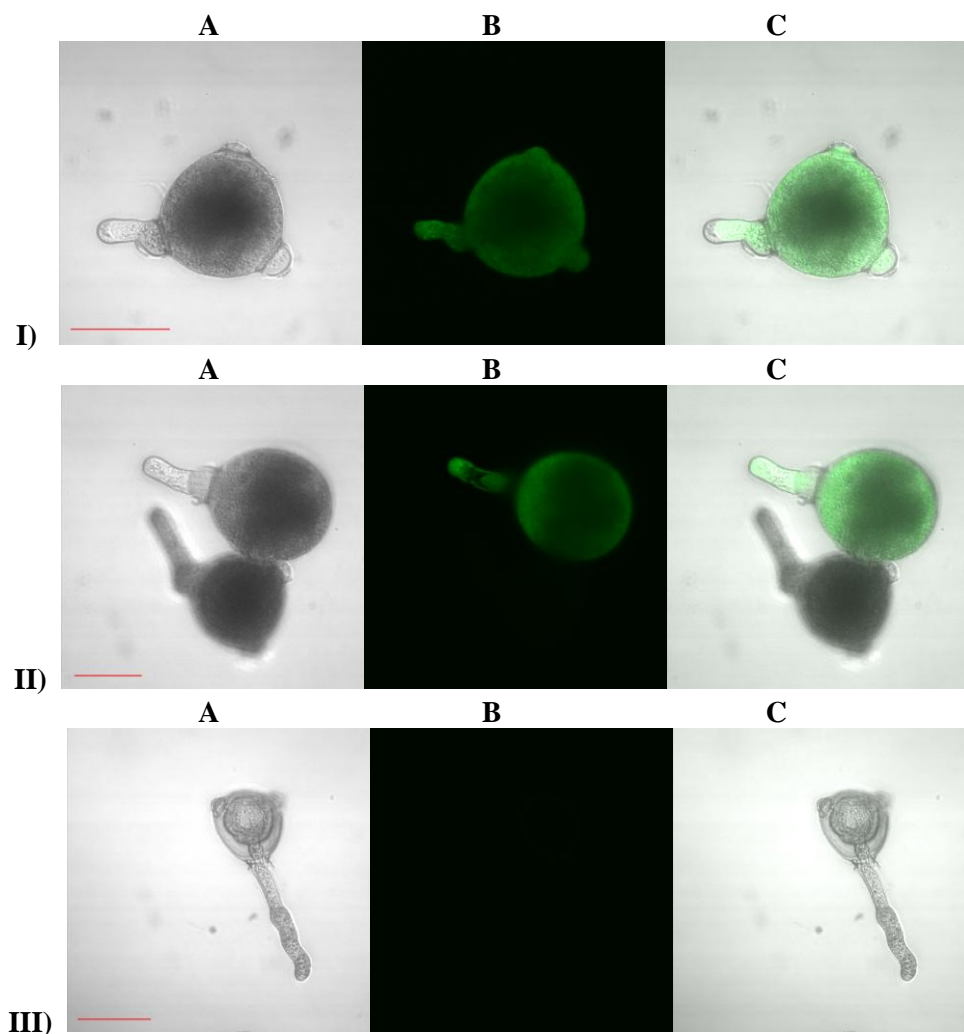
Detekce NO v pylu po lokální aplikaci donoru NO ke klíčící pylové láčce způsobující reorientaci pylové láčky. A) 15 min po přenesení pylových zrn na růstové medium, poté byl ke klíčící pylové láčce aplikován donor NO ve formě agarosové kapky. Došlo k rozšíření apikální části, po 25 minutách od aplikace donoru došlo ke zpětnému navození klíčení a reorientaci klíčící láčky. B) detail rozšířené apikální části a reorientace klíčení, signál světelné mikroskopie. C) lokalizace NO pomocí sondy DAF-FM DA, D) detail rozšířené apikální části, signál fluorescenční mikroskopie. Měřítka: 200 µm (A, C) 50 µm (B, D).

7.2.8 Detekce ROS a NO v klíčícím pylu pomocí konfokální mikroskopie

Pro detekci ROS a NO v klíčících objektech byla dále použita metoda konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM). Byla monitorována hladina ROS a NO bez a s donací NO z externího zdroje. Vliv lokálně aplikovaného donoru NO na hladinu ROS monitorující různý dopad NO na klíčení pylu je znázorněn na obr. 35 - 37.

7.2.8.1 Detekce ROS v klíčícím pylu bez přidání donoru

Po aplikaci donoru NO nebyl detekován významný rozdíl v signálu odpovídajícímu produkci ROS u klíčících pylových zrn. Negativní kontrola byla realizována pomocí preinkubace pylových zrn s lapačem NO cPTIO.

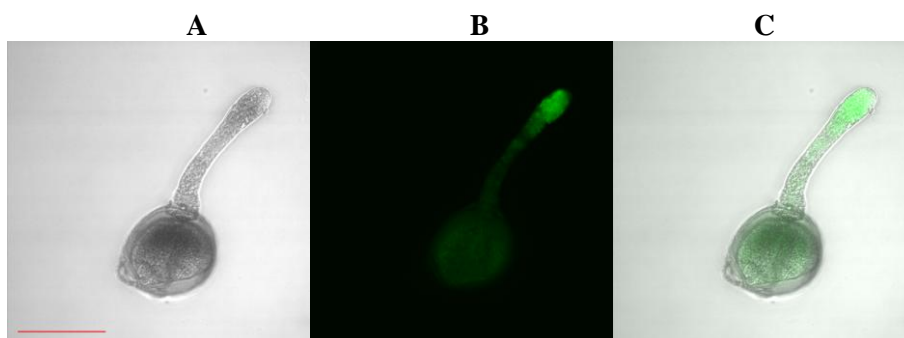


Obr. 35

Detekce ROS pomocí H_2DCF DA v klíčících pylových zrnech *C. sativus*. V čase 30 minut po aplikaci pylu na růstové medium byly detekovány ROS pomocí $10 \mu M$ fluorescenční sondy H_2DCF DA (A-C). I) bez aplikace GSNO, II) po aplikaci GSNO způsobující inhibici růstu, III) Negativní kontrola - 30 min preinkubace s $10 mM$ askorbátem před aplikací fluorescenční sondy A) Signál světelné mikroskopie, B signál konfokální mikroskopie (fluorescenční signál), C, propojení obou kanálů (A a B). Měřítka $50 \mu m$.

7.2.8.2 Detekce ROS v zesílené apikální části pylové láčky

U pylových zrn, která reagovala na lokálně zvýšenou koncentraci NO ztloustitím apikální části pylové láčky, byla detekována zvýšená produkce ROS v místě probíhajících změn, tj. v apikální části pylové láčky.

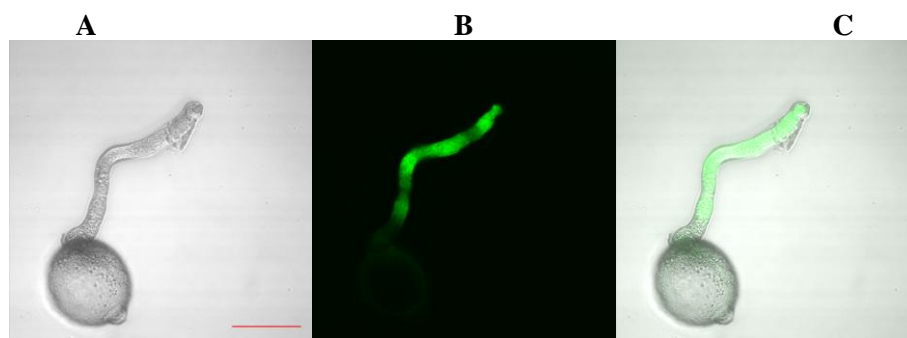


Obr. 36

Lokalizace ROS v klíčícím pylu *C. sativus* po lokální aplikaci donoru NO. Po 50 minutách od aplikace pylových zrn na růstové medium byl ke klíčícím pylovým zrnům aplikován donor NO. Došlo k rozšíření apikální části a inhibici růstu pylové láčky. Produkce ROS byla dokumentována 3 h po aplikaci pylových zrn na růstové medium. A) Signál světelné mikroskopie, B signál konfokální mikroskopie (fluorescenční signál), C, propojení obou kanálů (A a B). Měřítka 50 μm .

7.2.8.3 Detekce ROS v případě reorientace růstu pylové láčky

V případě detekované reorientaci pylové láčky po aplikaci donoru NO ke klíčícímu pylovému zrnu byla zaznamenána intenzivní produkce ROS v pylové láčce a to zejména ve ztlustlé části pylové láčky (místo ohybu) a v její apikální části.



Obr. 37

Lokalizace ROS v klíčícím pylu *C. sativus* po lokální aplikaci donoru NO. Po 50 minutách od aplikace pylových zrn na růstové medium byl ke klíčícím pylovým zrnům aplikován donor NO. Byla pozorována inhibice klíčení, po asi 60 minutách od aplikace donoru došlo k reorientaci klíčící láčky. Produkce ROS byla dokumentována 3 h po aplikaci pylových zrn na růstové medium. A) Signál světelné mikroskopie, B signál konfokální mikroskopie (fluorescenční signál), C, propojení obou kanálů (A a B). Měřítka 50 μm .

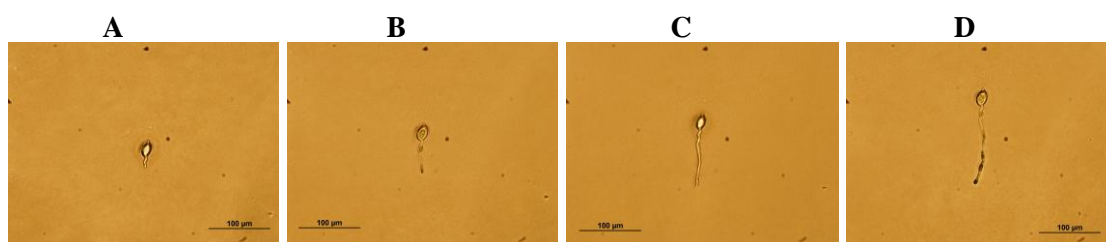
7.2.8.4 Detekce NO konfokální mikroskopií

Pomocí konfokální mikroskopie se s využitím fluorescenční sondy DAF-FM DA sledovala také hladina NO v klíčících objektech. Hladina byla však ve všech případech velice nízká a nebylo ji možné detekovat. Signály byly srovnatelné s negativní kontrolou.

7.3 Studium vlivu aplikace donoru NO na vývoj spor smrže

7.3.1. Vývoj hyf smrže obecného

Pro studium vlivu NO na proces klíčení spor symbiotické saprofytické houby byl jako biologický materiál zvolen izolát smrže *M. esculenta* spp. „štěpkový“ nasbíraný 23. 4. 2009. V prvních experimentech zaměřených na studii daného biologického modelu byla stanovena dynamika růstu klíčících vláken po aplikaci spor na 1% agarosu na podložním skle v průběhu 10 h (obr. 38, tab. 10).



Obr. 38

Klíčící spory *M. esculenta* po aplikaci na růstové medium v čase: A) 3 h, B) 4,5 h, C) 6 h, D) 7,5 h. Měřítko: 100 µm.

7.3.2 Vliv lokální aplikace donoru NO na vývoj spor smrže

Při studiu vlivu NO na proces klíčení spor smrže byly použity jednak naklíčené spory hyfy po 2-3 hodinách po aplikaci spor na medium (krátké klíčící vlákna) a spory po 7-8 hodinách po aplikaci spor na medium (tvořící dlouhé hyfy). Byl studován vliv dvou koncentrací donoru NO (1 a 2 mM GSNO) aplikovaného kapkovou metodou na agarosu na podložním skle.

7.3.3 Inhibiční vliv NO na růst krátkých klíčících vláken spor

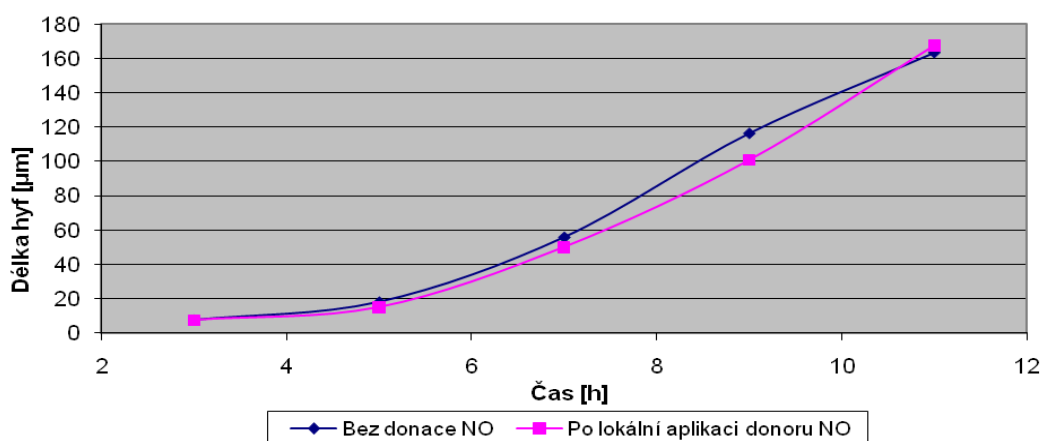
Spory smrže obecného byly přeneseny na agarosu. Po 3 h byl k části vzorků aplikován donor NO formou agarosové kapky a v průběhu 8 h po aplikaci donoru byla proměřena délka

klíčících vláken ve vzorcích s a bez GSNO. Vždy bylo vyhodnoceno 30 spor. Ve výsledcích je uvedena průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou. Byla stanovena dynamika růstu hyf bez donace a s donací NO z externího bodového zdroje. Jak vyplývá z tab. 10, inhibice růstu je největší cca 2 h po aplikaci donoru, poté je inhibiční vliv NO snížen a po 8 h působení NO je plně potlačen (graf 2, tab. 10). Některé objekty se zpomaleným růstem jsou zobrazeny obr. 39: Tato skutečnost je v souladu s výsledky publikovanými v literatuře, kde bylo prokázáno, že organismus *M. esculenta*, stejně jako ostatní zástupci z čeledi *Morchelaceae* mají významnou schopnost odolávat působení a degradovat jak ROS, tak RNS včetně NO. Tyto organismy disponují důmyslným antioxidačním systémem umožňujícím ochranu při působení stresových faktorů životního prostředí (Nitha et al., 2010). Případy razantnější inhibice růstu a klíčení hyf oxidem dusnatým byly pozorovány také u jiných druhů, zejména *A. niger*, *M. fructicola* a *P. italicum* (Lazar et al., 2008). Byl také pozorován negativní vliv NO na blastokonidie kvasinek *C. albicans*, kde byla zejména v kyselé oblasti pH pozorována inhibice klíčení a elongace hyf (Abaitua et al., 1999).

Tab. 10

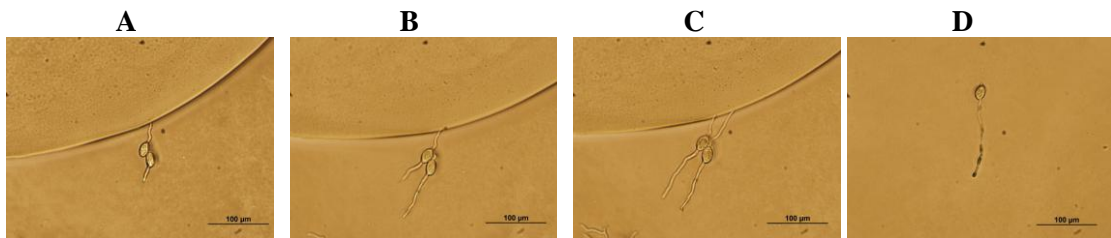
Inhibiční vliv donoru NO na růst klíčících vláken smrže obecného.

Doba po aplikaci spor na agarosu	3 h	5 h	7 h	9 h	11 h
% inhibice	aplikován donor	16,7 %	10,2 %	13,3 %	-2,6 %



Graf 2

Dynamika růstu klíčícího vlákna při klíčení spor smrže obecného v a bez přítomnosti donoru NO.



Obr. 39

Dynamika růstu hyf spor smrže obecného v přítomnosti donoru NO, aplikovaného k naklíčeným sporám. A) klíčící spora, 3 h po přenesení spory na agarosu byl aplikován donor NO (GSNO 1 mM). B) 4 h po aplikaci donoru (7 h po přenesení spory na agarosu), C), 7,5 h po aplikaci donoru (10,5 h po přenesení spory na agarosu), D) Kontrola - 7,5 h po přenesení spory na agarosu (bez přítomnosti GSNO). Měřítka 100 µm.

7.3.4 Vliv NO na růst dlouhých klíčících vláken spor

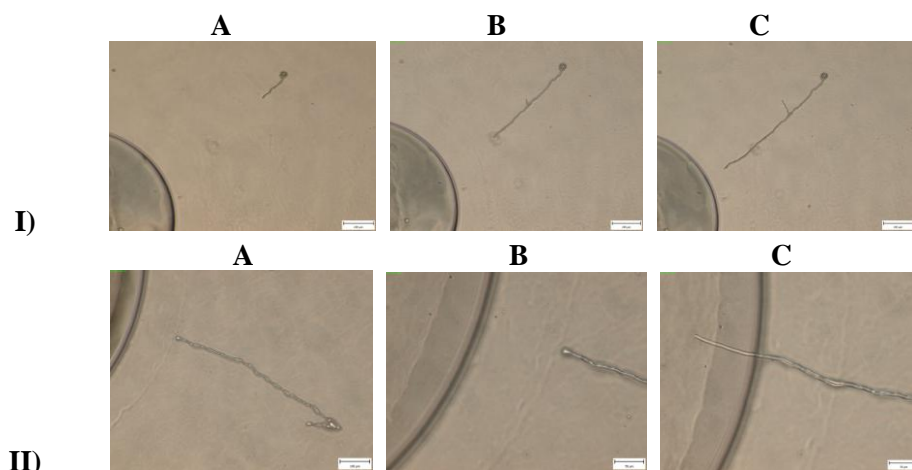
Studie vlivu lokálně zvýšené koncentrace NO byla realizována i v případě spor smrže obecného s dlouhými hyfami, kdy byl donor NO aplikován po 7-8 h od přenesení spor na agarosu. V případě dlouhých hyf bylo již patrné četné větvení, významné rozdíly v působení zvýšené koncentrace NO na vývoj klíčících vláken v porovnání s krátkými klíčovými vláknami nebyl pozorován (v souladu s Nitha et al., 2010).

7.3.5 Vliv na destrukci a buněčnou lyzi klíčícího vlákna

Destrukce apikální části klíčících vláken spor smrže obecného po lokální aplikaci donoru NO (1 mM GSNO) ke klíčícím sporám nebyla pozorována na rozdíl od reakce pylové láčky na zvýšenou koncentraci NO v prostředí. Ke zmíněnému jevu nedošlo ani při použití dvojnásobné koncentraci donoru (2 mM GSNO).

7.3.6 Vliv NO na orientaci klíčícího vlákna smrže obecného

Vliv NO na změnu směru růstu klíčících vláken, který byl pozorován v případě studie klíčení pylových láček, nebyl detekován u spor *M. esculenta*. Klíčící hyfa orientovaná ke kapce s NO donorem byla schopna touto kapkou prorůst bez ohledu na koncentraci donoru, jak je znázorněno na obr. 40. Výsledek je ve shodě s Nitha et al., 2010, kde bylo prokázáno zapojení četných antioxidantních drah podílejících se na degradaci ROS, RNS a také NO v buňce, čím dochází k ochraně organismů před působením stresových vlivů prostředí.



Obr. 40

Studium vlivu lokálně aplikovaného donoru NO (GSNO) na reorientaci klíčného vlákna spor *M. esculenta* I) 1 mM GSNO, II), 2 mM GSNO. Doba po aplikaci donoru NO k vyklíčeným sporám A) 1 h, B) 2 h, C) 3 h. Měřítka 200 μm (I - A-C), 100 μm (II – A), 50 μm (II - B-C).

7.3.7 Produkce NO a ROS při klíčení spor smrže obecného

7.3.7.1 Úloha aktivních forem kyslíku při klíčení spor hub

ROS a RNS jsou neustále produkovány za fyziologických podmínek jako výsledek aerobního metabolismu ale také v odpovědi na biotický a abiotický stres. Zvýšená produkce se objevuje např. v procesech buněčné signalizace patogeneze, rozpoznávání napadení patogenem a spuštění obranných mechanismů u rostlin (Shafiei et al., 2007; Maier et al., 2001; Bhattacharjee, 2005). Vzniká tzv. hypersensitivní reakce vedoucí k buněčné smrti rostlinných pletiv v okolí místa infekce. Předpokládá se, že tyto reaktivní formy jsou produkovány zejména rostlinou, nikoli mykotickým organismem (Nanda et al, 2010; Hong et al., 2008). Produkci těchto reaktivních molekul mohou indukovat mnohé mykotoxiny (Gessler et al., 2007).

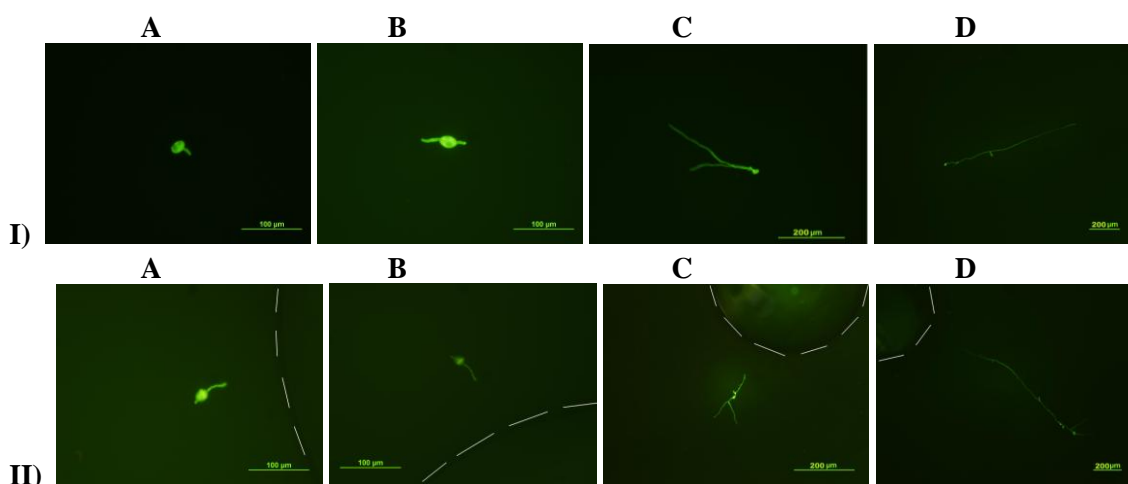
Mykotické organismy si ale v průběhu evoluce vyvinuli řadu obranných mechanismů napomáhajících čelit negativnímu vlivu ROS a RNS z prostředí. Tak např. reductasy NO se podílejí na jeho detoxikaci, postrádají však monooxygenasovou aktivitu a nedokážou oxidovat substráty s využitím O_2 (Toritsuka et al., 1997). Vliv těchto reaktivních látek na vývoj spor závisí na jejich koncentraci. Optimální koncentrace ROS vede k pozitivnímu ovlivnění řady signálních drah zodpovídajících za správný vývoj, zvýšená může být naopak škodlivá a vést někdy až k buněčné smrti (Belozerskaya & Gessler, 2006).

Imunitní odpovědi rostlin se liší v závislosti od druhu hostitele a jsou předmětem intenzivního studia. Poslední experimenty poukazují na dvojí funkci NO v procesu rostlinné patogeneze, a to usnadnění infekce a penetrace napadených listů patogenem, a také započítí

hypersenzitivní reakce rostliny, jak bylo např. zjištěno v patosystému *Solanum* spp. - *Oidium neolyopersici* (Piterková et al., 2011). Podobných výsledku bylo dosaženo i v předložené bakalářské práci v souvislosti s působením NO na vývoj spor a byla prokázána neopomenutelná funkce ROS a NO v procesu klíčení spor hub.

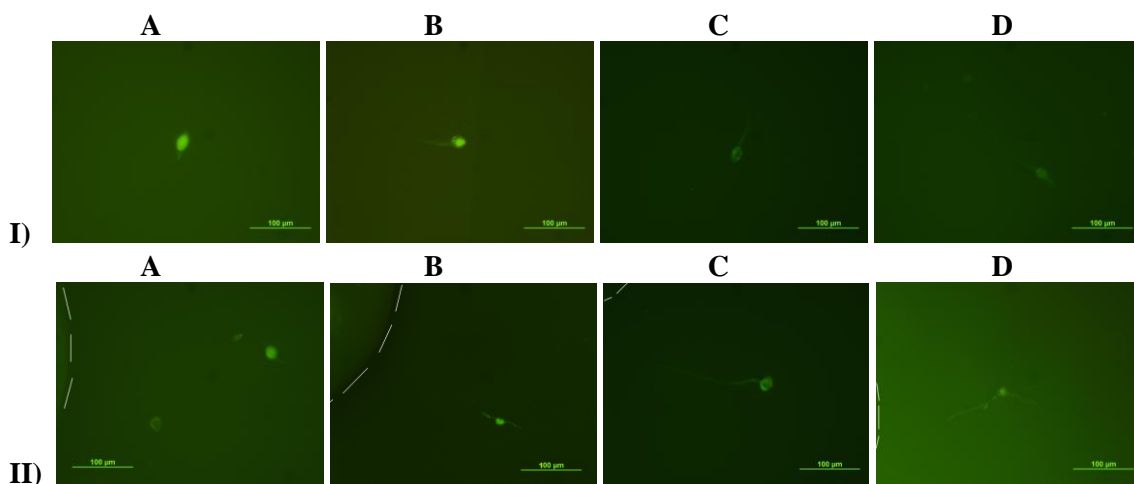
7.3.7.2 Detekce ROS a NO fluorescenční mikroskopií

S využitím fluorescenčních sond H_2DCF DA a DAF-FM DA byla detekována hladina ROS a NO v průběhu klíčení spor a růstu hyf, před a po aplikaci donoru NO ke klíčícím hyfám fluorescenční mikroskopií (obr. 41 a 42). Po aplikaci GSNO nebyla patrná změna v produkci ROS. Po zahájení klíčení je hladina intracelulárního NO poměrně vysoká, v čase postupně klesá. Produkce NO byla detekována zejména ve spoře, v klíčící hyfě byl signál nižší. Klasickou fluorescenční mikroskopií nebyly detekovatelné významné rozdíly produkce ROS a RNS po aplikaci donoru NO.



Obr. 41

Detekce ROS pomocí H_2DCF DA v klíčících sporách smrže v čase 3-9 h po aplikaci spor na medium. I) bez aplikace GSNO, II) po aplikaci GSNO. Doba po aplikaci spor na agarosu A) 3 h, B) 5 h, C) 7 h, D) 8 h. Okraj agarosové kapky s donorem je vyznačen přerušovanou bílou čarou. Měřítko: 100 μ m (A, B), 200 μ m (C, D).

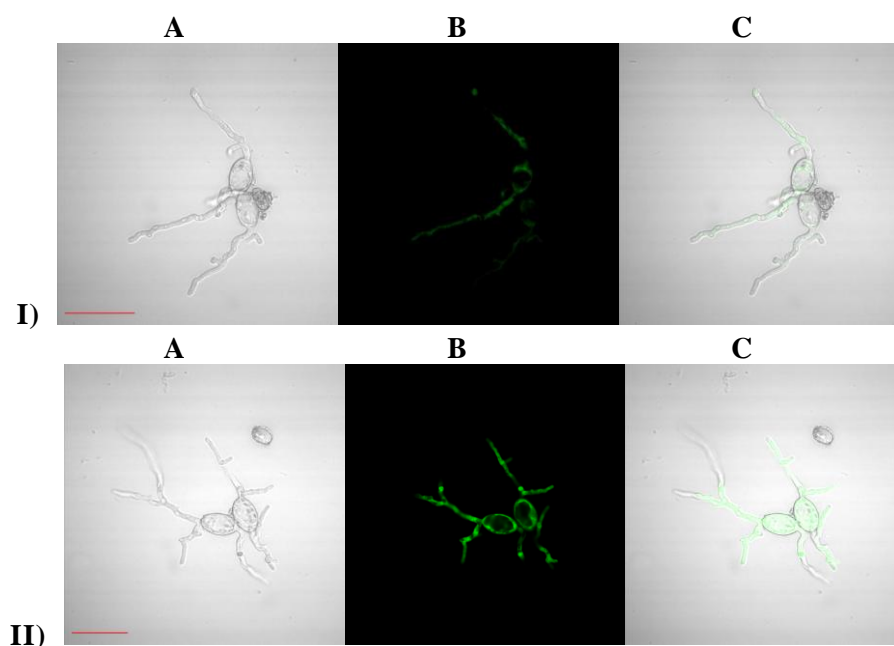


Obr. 42

Detekce NO pomocí DAF-FM DA v klíčících sporách smrže v čase 2-8 h po aplikaci na medium. I) bez aplikace GSNO, II) po aplikaci GSNO. Doba po aplikaci spor na agarosu A) 2 h, B) 4 h, C) 6 h, D) 8 h. Okraj agarosové kapky s donorem je vyznačen přerušovanou bílou čarou. Měřítko: 100 μm .

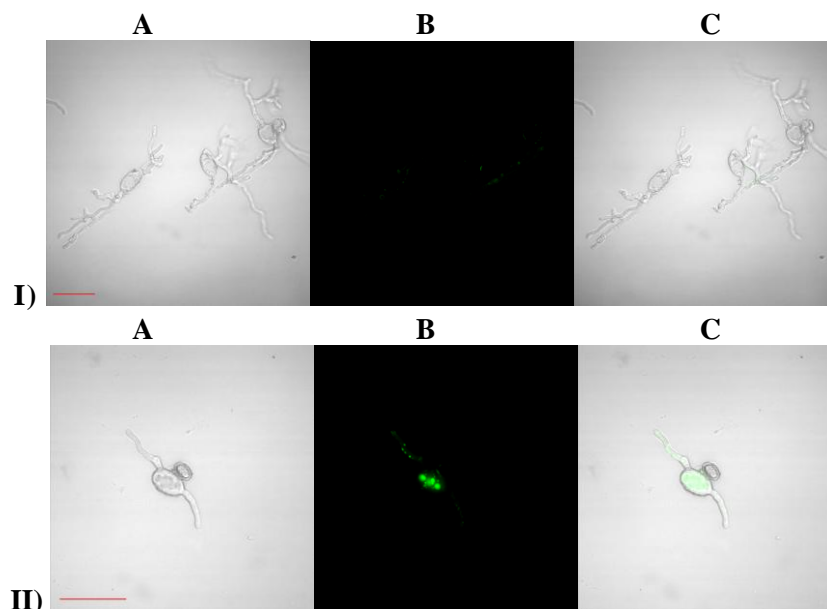
7.3.7.3 Detekce ROS a NO pomocí konfokální mikroskopie

Pro detekci ROS a NO v klíčících hyfách před a po lokální aplikaci donoru NO byla využita i metoda konfokální mikroskopie (obr. 43 a 44). Po lokální aplikaci donoru NO ke klíčícím hyfám byla detekována zejména v klíčících vláknech zvýšená produkce ROS. Signál NO nebyl u spor s dlouhými klíčovými vlákny detekovatelný. Po aplikaci donoru NO byl signál NO pozorovatelný a lokalizován zejména ve vakuolách. Shodné výsledky byly získány nezávisle při řešení diplomové práce Bc. Terezy Válové.



Obr. 43

Detekce ROS pomocí H₂DCF DA v klíčících sporách smrže v čase 12 h po aplikaci spor na medium. I) bez aplikace GSNO, II) po aplikaci GSNO. A) Signál světelné mikroskopie, B signál konfokální mikroskopie (fluorescenční signál), C, propojení obou kanálů (A a B). Měřítka 50 μm.



Obr. 44

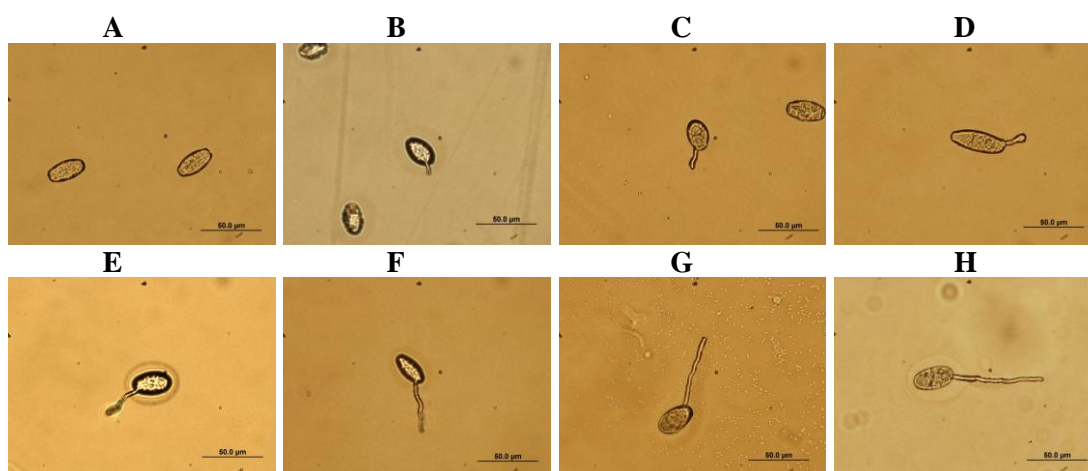
Detekce NO pomocí DAF-FM DA v klíčících sporách smrže v čase 2-8 h po aplikaci na medium. I) bez aplikace GSNO, II) po aplikaci GSNO. A) Signál světelné mikroskopie, B signál konfokální mikroskopie (fluorescenční signál), C, propojení obou kanálů (A a B). Měřítka 50 μm.

7.4 Studium vlivu lokální aplikace donoru NO na vývoj spor padlí rajčatového

7.4.1 Vývoj hyf padlí rajčatového

Pro studium vlivu NO na proces klíčení spor biotrofního patogenu byl jako biologický materiál zvolen izolát *O. neolycopersici* aplikovaný na agarosové medium metodou otisku čerstvě utrženého infikovaného listu *S. lycopersicum*, cv. Amateur. V prvních experimentech zaměřených na studii daného biologického modelu byla stanovena dynamika růstu klíčících vláken po aplikaci spor na 1% agarosu na podložním skle v průběhu 8 h (obr. 45). Spory padlí jsou schopny za příznivých podmínek klíčit na vlhkém agarosovém gelu, bylo však prokázáno, že na agarose tvoří pouze krátká klíčící vlákna, které se málokdy větví a pro svůj další vývoj

potřebují svého rostlinného hostitele (Sedlářová et al., 2011). Proto byly experimenty prováděny pouze u krátkých klíčících vláken.



Obr. 45

Klíčící spory *O. neolyopersici* po aplikaci na růstové medium v čase: A) 1 h, B) 2 h, C) 3 h, D) 4 h, E) 5 h, F) 6 h, G) 7 h, H) 8 h. Měřítko: 50 µm.

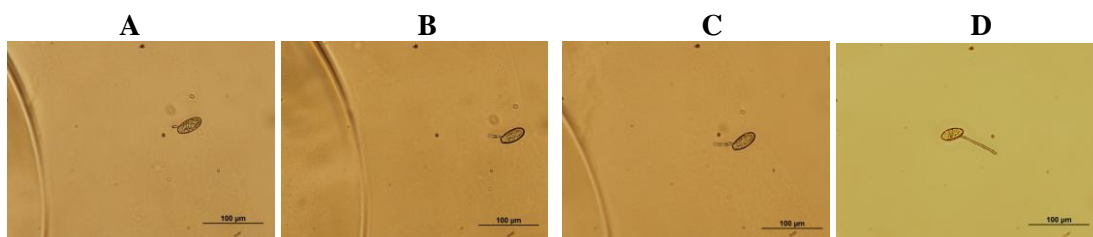
7.4.2. Vliv lokální aplikace donoru NO na vývoj spor padlí

Při studiu vlivu NO na proces klíčení spor padlí byly použity spory tvořící krátké hyfy (narostlé po 2-3 hodinách od aplikace na medium). Byl studován vliv NO s použitím donoru GSNO o koncentraci 1 mM, tedy koncentrace NO způsobující významné změny v procesu klíčení pylu. Nebyl pozorován vliv NO na buněčnou lyzi a následnou destrukci hyf, na změnu orientace růstu klíčících vláken nebo tloušťnutí apikální části klíčícího vlákna (Piterková et al., 2009; Tománková et al., 2006;

7.4.3 Inhibiční vliv NO na klíčení hyf padlí rajčatového

Ke klíčícím hyfám padlí byl po 2 hodinách od aplikace spor na růstové medium aplikován donor NO - GSNO o koncentraci 1 mM ve formě agarosové kapky. Poté byla v čase 8 h od aplikace donoru proměřena délka klíčících hyf a tyto hodnoty byly statisticky vyhodnoceny. Bylo sledováno vždy 30 klíčících objektů, ze získaných hodnot bylo vypočteno procento inhibice růstu hyf (graf 3). Z fotografií na obr. 46 je zřejmý inhibiční vliv NO na růst hyf padlí. Tato skutečnost má neopomenutelný význam např. ve vývoji patosystému *O. neolyopersici* - *S. lycopersicon*, kde napadená rostlina produkuje prostřednictvím hypersenzitivní reakce zvýšenou hladinu ROS a NO, která zpomaluje vývoj patogenu a tím i

vývoj onemocnění rostliny. Míra této odezvy se liší v závislosti na odolnosti rostliny vůči biotrofnímu patogenu (Piterková J. et al., 2011).



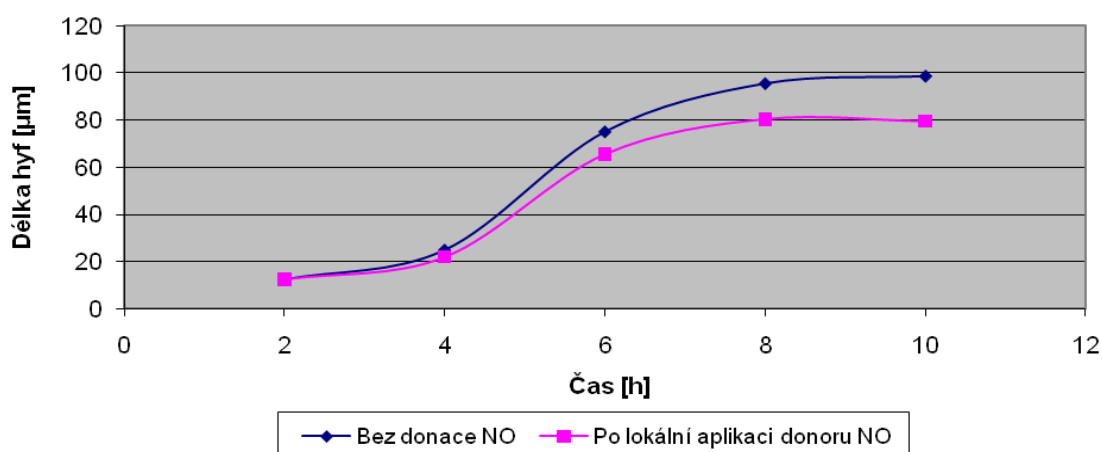
Obr. 46

Dynamika růstu hyf padlí rajčatového v přítomnosti donoru NO, aplikovaného k naklíčeným sporám. A) klíčící spora, 2 h po přenesení spory na agarosu byl aplikován donor NO (GSNO 1 mM). B) 5 hod po aplikaci donoru (7 h po přenesení spory na agarosu) C) 8 h po aplikaci donoru (10 h po přenesení spory na agarosu), D) Kontrola - 8 h po přenesení spory na agarosu (bez přítomnosti GSNO). Měřítko 100 µm.

Tab. 11

Inhibiční vliv donoru NO na růst klíčících vláken spor *O. neolycopersici*

Doba po aplikaci spor na agarosu	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
% inhibice	aplikován donor	12,00 %	12,63 %	15,72 %	19,29 %



Graf 3

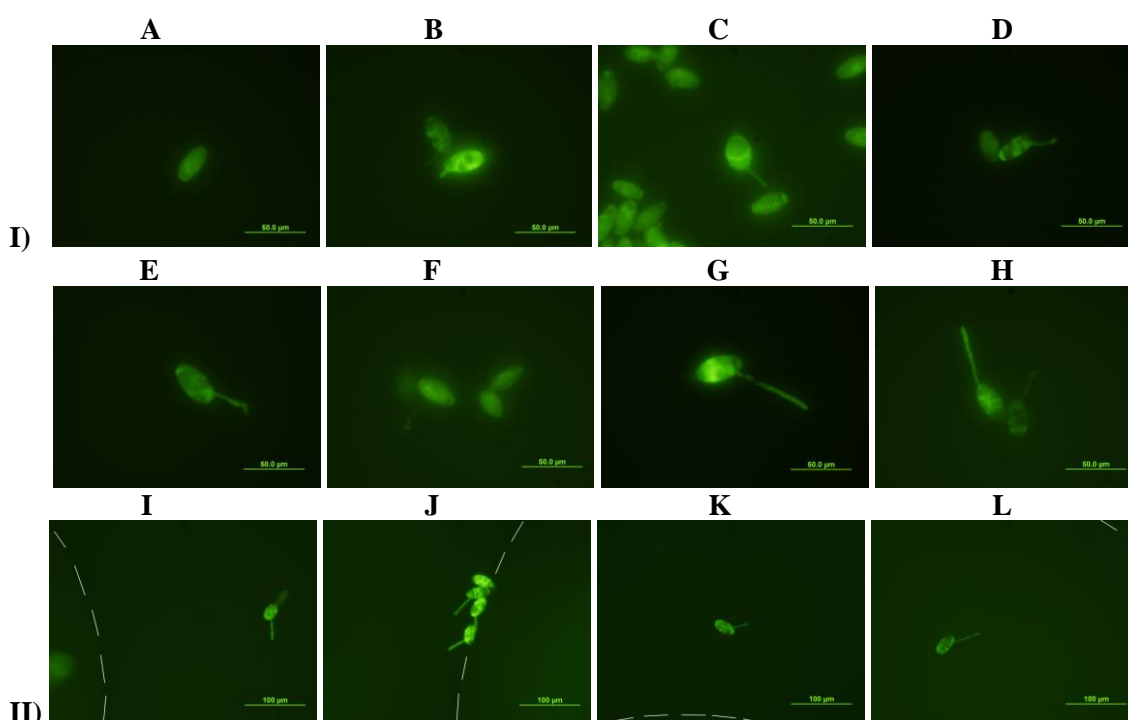
Dynamika růstu klíčícího vlákna při klíčení spor *O. neolycopersici* v a bez přítomnosti donoru NO.

7.4.4 Produkce NO a ROS při klíčení spor padlí rajčatového

7.4.4.1 Detekce ROS a NO fluorescenční mikroskopií

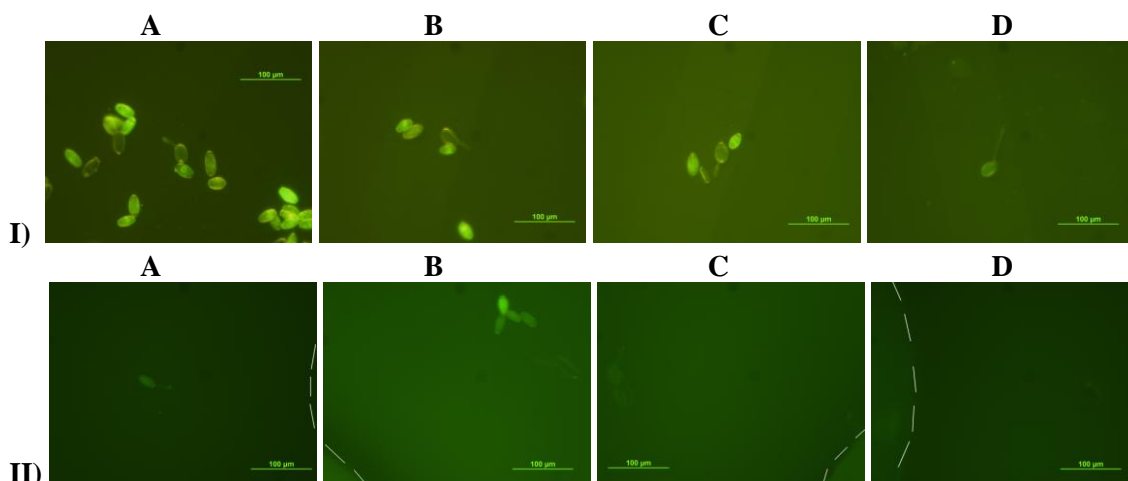
Byla detekována hladina ROS a NO pomocí fluorescenčních práb H_2DCF DA a DAF FM DA v průběhu klíčení před a po aplikaci donoru NO k hyfám klíčících spor pomocí fluorescenční mikroskopie. Hladinu ROS před a po aplikaci ROS v blízkosti klíčících hyf zobrazuje obr. 47, hladinu NO obr. 48.

Byla detekována vysoká hladina ROS u spor, které začaly klíčit, tato hladina se běžně držela vysoko i v průběhu klíčení, pokud ale došlo k tvorbě apresoria nebo větvení (patrné na obr. 48 F, H) došlo ke snížení intenzity signálu. Po donaci NO došlo k inhibici růstu a bylo patrné mírné zvýšení intenzity signálu fluorescence při detekci ROS.



Obr. 47

Detekce ROS pomocí H_2DCF DA v klíčících sporách padlí. I) v čase A) 2 h, B) 3 h, C) 4 h, D) 5 h, E) 6 h, F) 7 h, G) 8 h, H) 9 po aplikaci na medium bez donace donoru NO. II) v čase I) 1 h, J) 2 h, K) 3 h, L) 4 h od aplikace GSNO ke klíčícím objektům (3 - 6 od aplikace na agarosu). Okraj agarosové kapky s donorem je vyznačen přerušovanou bílou čarou. Měřítka: 50 μ m (A - H), 100 μ m (I - L).



Obr. 48

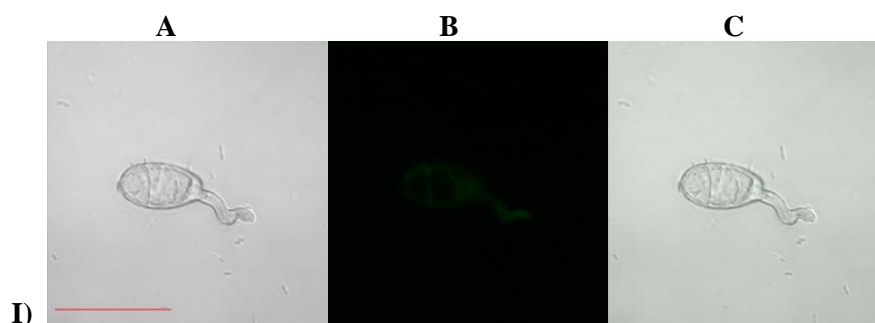
Detekce NO pomocí DAF-FM DA v klíčících sporách padlí v čase 2 - 8 hod po aplikaci na medium. I) bez aplikace GSNO, II) po aplikaci GSNO. Doba po aplikaci spor na agarosu A) 2 h, B) 4 h, C) 6 h, D) 8 h. Okraj agarosové kapky s donorem je vyznačen přerušovanou bílou čarou. Měřítko: 100 µm.

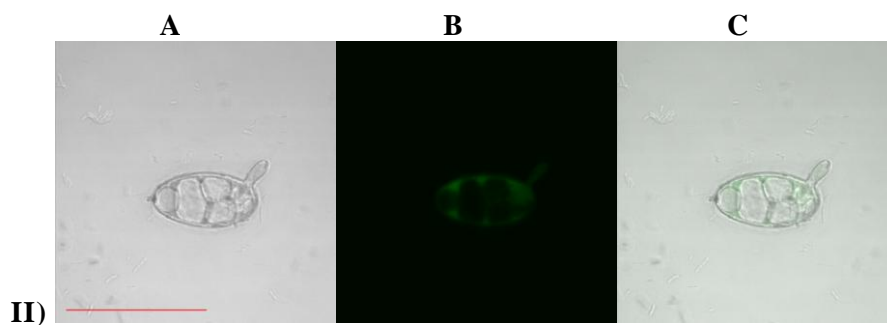
7.4.4.2 Detekce ROS a NO konfokální mikroskopií

Pro detekci ROS a NO v klíčících hyfách *O. neolycopersici* před a po lokální aplikaci donoru NO byla využita i metoda konfokální mikroskopie (obr. 49, 50). Detekce ROS a NO v naklíčených hyfách byla minimální. Po lokální aplikaci donoru NO ke klíčícím hyfám byla detekována mírně zvýšená produkce ROS a NO. Nízká produkce ROS a NO může souviset se zastavením růstu cca do 24 h po přenosu spor na agarosové medium. Jedná se o biotrofní patogen vyžadující pro svůj vývoj přítomnost hostitelského organismu. Tyto výsledky jsou ve shodě s literaturou (Sedlářová et al., 2011; Piterková et al., 2009).

Signál NO nebyl u spor s dlouhými klíčovými vlákny detekovatelný. Shodné výsledky byly získány nezávisle při řešení diplomové práce Bc. Terezy Válové. Po aplikaci donoru NO, byl signál detekován v těle spory. Detekce signálu byla zřejmá zejména ve vakuolách.

Detekce ROS v nativním preparátu:

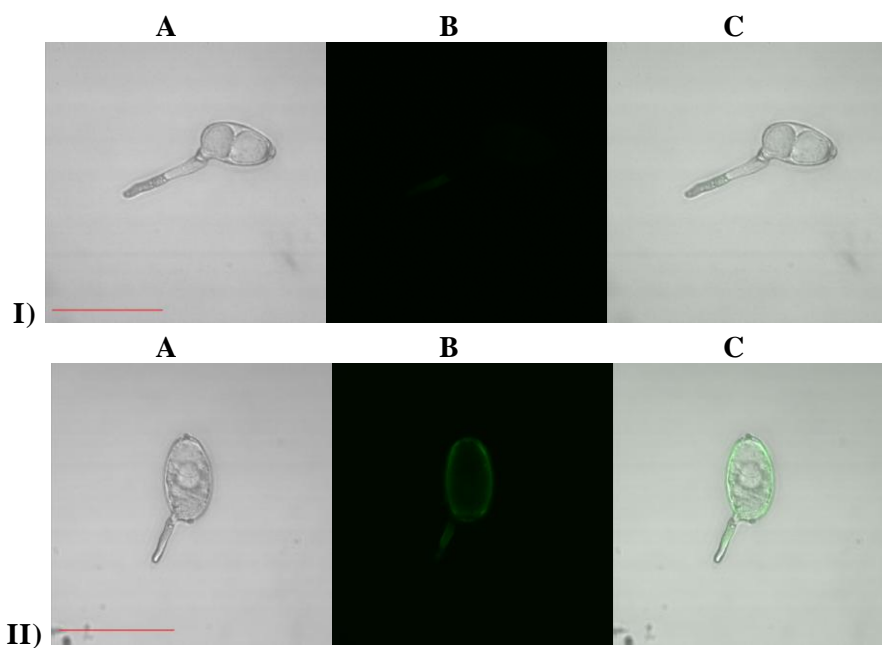




Obr. 49

Detekce ROS pomocí H_2DCF DA v klíčících sporách padlí rajčatového v čase 5 h po aplikaci spor na medium. I) bez aplikace GSNO, II) 3 h po aplikaci GSNO. A) signál světelné mikroskopie, B, signál konfokální mikroskopie, C, propojení obou kanálů. Měřítko 50 μm .

Detekce NO v nativním preparátu:



Obr. 50

Detekce NO v klíčících sporách Padlí rajčatového 5 h po aplikaci na medium I) bez aplikace GSNO, II) 3 h po aplikaci GSNO. A, signál světelné mikroskopie, B, signál konfokální mikroskopie, C, propojení obou kanálů. Patrná lokalizace NO v klíčícím vláknu za nativních podmínek, a v těle spory po aplikaci GSNO. Měřítko 50 μm .

8. Závěr

Výsledky získané při řešení předložené bakalářské práce zaměřené na studium vlivu lokálně zvýšené koncentrace oxidu dusnatého v procesu klíčení pylových zrn a spor hub lze shrnout do následujících bodů:

1. Byla zavedena metoda mikromanipulace a kapkovací metoda při studiu vlivu NO v procesu klíčení. Metody byly optimalizovány pro podmínky na Katedře biochemie a byly porovnány jejich výhody a nevýhody.
2. Z technických důvodů byla pro vlastní experimentální práci použita kapkovací metoda.
3. Byl potvrzen významný vliv NO v procesu klíčení pylových láček *C. sativus* projevující se:
 - inhibicí klíčení
 - zbytněním apikální části klíčící pylové láčky
 - destrukcí buněčné stěny a následnou buněčnou lyzí
 - změnou směru růstu pylové láčky
4. Byla stanovena dynamika růstu pylové láčky *C. sativus* a mykotického vlákna *M. esculenta* a *O. neolycopersici* na růstovém mediu.
5. Byl pozorován minimální vliv lokálně zvýšené koncentrace NO na růst a vývoj houbových vláken *M. esculenta* projevující se mírným zpomalením růstu krátce po aplikaci donoru NO.
6. Byl pozorován inhibiční vliv NO na růst a vývoj hyf *O. neolycopersici*.
7. Byla detekována produkce ROS a NO fluorescenčním a konfokálním mikroskopem. Lokální aplikace donoru NO ovlivnila produkci ROS a NO následně:
 - Pyl: produkce ROS – není detekovatelná změna (silný signál)
produkce NO – není detekovatelná změna (slabý signál)
 - Spory smrže: produkce ROS – zvýšená
produkce NO - zvýšená
 - Spory padlí: produkce ROS – velmi slabě zvýšená (slabý signál)
produkce NO – velmi slabě zvýšená (slabý signál)

LITERATURA

- Abaitua F., Rementeria A., San Millan R., Eguzkiza A., Rodriguez J. A., Ponton J., Sevilla M. J. (1999) *In vitro* survival and germination of *Candida albicans* in the presence of nitrogen compounds. *Microbiology+* **145**, 1641-1647.
- Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *J plant biol.* **51**, 167-173.
- Bartosz G. (2009) Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1303-1315.
- Bell E., Takeda S., Dolan L. (2009) Reactive oxygen species in growth and development. V *Signaling and communication in plants*, Vol. 1 *Reactive oxygen species in plant signaling* (del Río L. A., Puppo A., ed.), pp. 43-53, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Německo.
- Belozerskaya T. A., Gessler N. N. (2006) Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. *Microbiology +* **75**, 427-431.
- Besson-Bard A., Courtois C., Gauthier A., Dahan J., Dobrowolska G., Jeandroz S., Pugin A., Wendehenne D. (2008) Nitric oxide in plants: Production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Mol Plant.* **1**, 218-228.
- Bhattacharjee S. (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr Sci India.* **89**, 1113-1121.
- Bowell G. P., Daudi A. (2009) Reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. V *Signaling and Communication in Plants*, Vol. 1 *Reactive oxygen species in plant signaling* (del Río L. A., Puppo A., ed.), pp. 113-133, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Německo.
- Bushart T. J., Soux S. J. (2007) Conserved features of germination and polarized cell growth: A few insights from a pollen–fern Spore comparison. *ANN-Bot London* **99**, 9-17.
- Cárdenas L., McKenna S. T., Kunkel J. G., Hepler P. K. (2006) Oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth. *Plant Physiol.* **142**, 1460-1468.
- Circu M. L., Aw T. Y. (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Bio Med.* **48**, 749-762.
- Corpas F. J., Barroso J. B., Carreras A., Quiros M., Leon A. M., Romero-Puertas M. C., Esteban F. J., Valderrama R., Palma J. M., Sandalio L. M., Gomez M., del Río L. A. (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent Pea plants. *Plant physiol.* **136**, 2722-2733.
- Corpas F. J., Chaki M., Fernández-Ocana A., Valderrama R., Palma J. M., Carreras A., Begara-Morales J. C., Airaki M., del Río L. A., Barroso J. B. (2008) Metabolism of reactive nitrogen species in Pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1711-1722.

- Dat J., Vandenamee S., Vránová E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci.* **57**, 779-795.
- De Vos M., Van Oosten V. R., Van Poecke R. M. P., Van Pelt J. A., Pozo M. J., Mueller M. J., Buchala A. J., Metraux J. P., Van Loon L. C., Dicke M., Pieterse C. M. J. (2005) Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol Plant Microbe In.* **18**, 923-937.
- Deveze-Alvarez M., Garcia-Soto J., Martinez-Cadena G. (2001) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is negatively regulated by ADP-ribosylation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Microbiol-SGM* **147**, 2579-2584.
- Dresselhaus T., Márton M. L. (2009) Micropylar pollen tube guidance and burst: adapted from defense mechanisms? *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 773-780.
- Dröge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* **82**, 47-95.
- Durzan D. J., Pedrosa M. C. (2002) Nitric oxide and reactive nitrogen oxide species in plants. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **19**, 293-337.
- Eckardt N. A. (2005) At the forefront of pollen tube growth. *Plant Cell* **17**, 327-329.
- Feijó J. A., Costa S. S., Prado A. M., Becker J. D., Certal A. C. (2004) Signalling by tips. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 589-598.
- Floryszak-Wieczorek J., Milczarek G., Arasimowicz M., Ciszewski A. (2006) Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* **224**, 1363-1372.
- Forman H. J., Maiorino M., Ursini F. (2010) Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry-US* **49**, 835-842.
- Fridowich I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* **264**, 7761-7764.
- Gessler N. N., Aver'yanov A. A., Belozerskaya T. A. (2007) Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry-Moscow+* **72**, 1091-1109.
- Giba Z., Grubišić D., Todorovič S., Sajc L., Stojakovič D., Konjevič R. (1998) Effect of nitric oxide – releasing compounds on phytochrome – controlled germination of Empress tree seeds. *Plant Growth Regul.* **26**, 175-181.
- Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C. (2006) Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: A review. *J Fluoresc.* **16**, 119-139.
- He J. M., Bai X. L., Wang R.B., Cao B., She X. P. (2007) The involvement of nitric oxide in ultraviolet-B-inhibited pollen germination and tube growth of *Paulownia tomentosa* in vitro. *Physiol. Plantarum.* **131**, 273-282.
- Hong J. K., Yun B. W., Kang J. G., Raja M. U., Kwon E., Sorhagen K., Chu C., Wang Y., Loake G. J. (2008) Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J. Exp. Bot.* **59**, 147-154.

- Cheung A. Y., Boavida L. C., Aggarwal M., Wu H.-M., Feijó J. A. (2010) The pollen tube journey in the pistil and imaging the in vivo process by two-photon microscopy. *J. Exp. Bot.* **61**, 1907-1915.
- Kanadia R. N., Kuo W. N., Menabb M., Botchway A. (1997) Constitutive nitric oxide synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Mol. Bio. Int.* **45**, 1081-1087.
- Katifori E., Alben S., Cerda E., Nelson D. R., Dumais J. (2010) Foldable structures and the natural design of pollen grains. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 7635–7639
- Keller H., Blein J.-P., Bonnet P., Ricci P. (1996) Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in Tobacco. *Plant Physiol.* **110**, 365-376.
- Lazar E. E., Wills R. B. H., Ho B. T., Harris A. M., Spohr L. J. (2008) Antifungal effect of gaseous nitric oxide on mycelium growth, sporulation and spore germination of the postharvest horticulture pathogens, *Aspergillus niger*, *Monilinia fructicola* and *Penicillium italicum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**, 688-692.
- Maier J., Hecker R., Rockel P., Ninnemann H. (2001) Role of nitric oxide synthase in the light-induced development of sporangiophores in *Phycomyces blakesleeanus*. *Plant Physiol.* **126**, 1323-1330.
- Mathur J., Koncz C. (1998) Protoplast isolation, culture and regeneration. V *Methods in molecular biology*, Vol. 82 *Arabidopsis protocols* (Martínez-Zapater J. M., Salinas J. ed.) pp. 35-42, Humana press, Totowa, New Jersey, USA.
- Mayer A. M., Staples R. C., Gil-ad N. L. (2001) Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* **58**, 33-41.
- McCord J. M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **8**, 652-659.
- McInnis S. M., Desikan R., Hancock J. T., Hiscock S. J. (2006) Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: Potential signalling crosstalk? *New Phytol.* **172**, 221-228.
- Miller G., Shulaev V., Mittler R. (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plantarum* **133**, 481-489.
- Misra A. N., Misra M., Singh R. (2010) Nitric oxide biochemistry, mode of action and signaling in plants. *J. Med. Plants Res.* **25**, 2729-2739.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* **9**, 490-498.
- Moore K. P., Mani A. R. (2002) Measurement of protein nitration S-nitrosothiol formation in biology and medicine. V *Methods in enzymology*, Vol. 359 *Nitric oxide. Oxide detection, mitochondria and cell functions, and peroxynitrite reactions* (Cadenas E., Packer L., ed.), pp. 256-268, Elsevier Academia Press, Missouri, USA.
- Morris K. E., Porterfield D. M. (2004) Nitric oxide and cGMP signaling and gravity dependent cell polarity in *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol.* **18**, 94-104.

- Nanda A. K., Andrio E., Marino D., Pauly N., Dunand C. (2010) Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J Integr. Plant Biol.* **52**, 195-204.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hancock J. T. (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* **128**, 6-13.
- Nitha B., De S., Adhikari S. K., Devasagayam T. P. A., Janardhanan K. K. (2010) Evaluation of free radical scavenging activity of morel mushroom, *Morchella esculenta* mycelia: A potential source of therapeutically useful antioxidants. *Pharm. Biol.* **48**, 453-460.
- Noctor G., Foyer C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Plant Mol. Biol.* **49**, 249-279.
- Piterková J., Hoffman J., Mieslerová B., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A., Petřivalský M. (2011) Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp. - *Oidium neolycopersici* interactions. *Environ. Exp. Bot.* V TISKU.
- Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008) Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chem. Listy* **102**, 410-416.
- Piterková J., Petřivalský M., Luhová L., Mieslerová B., Sedlářová M., Lebeda A. (2009) Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 501-513.
- Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005) Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem. Listy* **99**, 455-466.
- Prado A. M., Porterfield D. M., Feijó J. A. (2010) Calcium, NO, and cGMP signaling in plant cell polarity. V *Nitric oxide in plant physiology*, Vol. 1 (Hayat S., Mori M., Pitchel J., Ahmad A. ed.) pp. 31-50, Willey - Blackwell Verlag GmbH, Německo.
- Prado A. M., Porterfield D. M., Feijó J. A. (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* **131**, 2707-2714.
- 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*. *Res. Microbiol.* **159**, 476-480.
- Sedlářová M., Luhová L., Petřivalský M., Lebeda A. (2007) Localisation and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. *Plant Physiol. Bioch.* **45**, 607-616.
- Sedlářová M., Petřivalský M., Piterková J., Luhová L., Kočířová J., Lebeda A. (2011) Influence of nitric oxide and reactive oxygen species on development of lettuce downy mildew in *Lactuca* spp. *Eur. J. Plant Pathol.* **129**, 267-280.
- Shafiei R., Hang C., Kang J. G., Loake G. J. (2007) Identification of loci controlling non-host disease resistance in *Arabidopsis* against the leaf rust pathogen *Puccinia triticina*. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 773-784.
- Shibuya N., Minami E. (1998) Oligosaccharides as the elicitor signal for the activation of defense system in plants. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **43**, 2531-2539.

- Smirnoff N. (2000) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* **125**, 27-58.
- Soegiarto L., Wills R. B. H., Seberry J. A., Leshem Y. Y. (2003) Nitric oxide degradation in oxygen atmospheres and rate of uptake by horticultural produce. *Postharvest Biol. Tec.* **28**, 327-331.
- Spychalla J. P., Desborough S. L. (1990) Superoxide dismutase, catalase, and alpha-tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiol.* **3**, 1214-1218.
- Srivalli B., Chinnusamy V., Khanna-Chopra R. (2003) Antioxidant defense in response to abiotic stresses in plants. *J Plant Biol.* **30**, 121-139.
- Stöhr C. (2006) Nitric oxide – A product of plant nitrogen metabolism. V *Plant cell monographs* Vol. 6 *Nitric oxide in plant growth, development and stress physiology* (Lamattina L., Polacco C., Robinson G. D., ed.), pp. 15-34, Springer Berlin Heidelberg New York, USA.
- Šašek V., Prášil K. (2003) Fyziologie hub, Růst a rozmnožování hub. V *Nový přehled biologie*, Vol. 1 (Rosypal S., Doskočil M., Fulka J. ed.) pp. 305-330. Scientia, Praha, ČR.
- Šetlík I., Seidlová F., Šantrůček J. (2004) Fyziologie rostlin, pp. 1-14, Biologická fakulta Jihočeské Univerzity, České Budějovice, ČR.
- Thom S. R., Bophale V. M., Mancini D. J., Milovanova T. N. (2008) Actin S-nitrosylation inhibits neutrophil β_2 integrin function. *J Biol. Chem.* **283**, 10822–10834.
- Thomas D. D., Liu X., Kantrow S. P., Lancaster J. R. (2001) The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 355-360.
- Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P., Lebeda A. (2006) Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **68**, 22-32.
- Toritsuka N., Shoun H., Singh U. P., Park S. Y., Iizuka T., Shiro Y. (1997) Functional and structural comparison of nitric oxide reductases from denitrifying fungi *Cylindrocarpon tonkinense* and *Fusarium oxysporum*. *BBA-Protein Struct Mol Enzymol.* **1338**, 93-97.
- Vinter V. (2008) Rostliny pod mikroskopem (Základy anatomie cévnatých rostlin), pp. 63-74, Olomouc, ČR.
- Weissman L., Garty J., Hochman A. (2005) Rehydration of the lichen *Ramalina lacera* results in production of reactive oxygen species and nitric oxide and a decrease in antioxidants. *Appl. Environ. Microb.* **71**, 2121-2129.
- Wonisch W., Schaur R. J. (2002) Chemistry of glutathione. V *Plant ecophysiology*, Vol. 2 Significance of glutathione to plant adaptation to the environment (Grill D., Tausz M. M., Kok L. J., ed.), pp. 13-17, Kluwer academic publishers, New York, USA.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APX	askorbátperoxidasa
ASA	kyselina askorbová (z ang. ascorbic acid)
BS	buněčná stěna
cADPR	cyklická adenosindifosfátribosa
CAT	katalasa
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CM	cytoplasmatická membrána
COX	cytochrom c oxidasa
c-PTIO	([2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid]
DAB	diaminobenzidin
DAF-2 DA	4,5-diaminofluorescein diacetát
DAF-FM DA	4-Amino-5-methylamino- 2',7'-difluorofluorescein diacetát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina, molekulární základ dědičnosti
DSY	degenerující synergidní buňka (z angl. degenerated synergid cell)
ER	endoplasmatické retikulum
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GC	guanylátcyklasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion redukovaný
GSNO	S-nitrosoglutathion
GS-SG	glutathion oxidovaný
GTP	guanosintrifosfát
H ₂ DCF	dichlorodihydrofluorescein diacetát
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthin
CaM	kalmodulin
L-NAME	L-N ^G -nitroarginin-methylester-hydrochlorid
LY83583	6-(fenylamino)-5,8-chinolindion
MDHAR	monodehydroaskorbátreduktasa
MGU	spermatická buňka (z angl. male germ unit)
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaná forma

NADPH	nikotinamidadeninindukleotidfosfát redukována forma
NAR	nitrátreduktasa
NBT	nitrotetrazoliová modř (z angl. nitro blue tetrazoliumchlorid)
NHR	imunitní odpovědi rostlin (z angl. non-host resistance)
NIR	nitritreduktasa
NO	oxid dusnatý
NOR	NO reduktasa
NOS	NO synthasa
NOX	NADPH oxidasa
PDE	fosfodiesterasa
PS I; II	fotosystém I, II
PSY	persistentní synergidní buňka (z angl. persistent synergid cell)
PT	pylová láčka (z angl. pollen tube)
PUFA	vícenenasycené mastné kyseliny (z angl. polyunsaturated fatty acids)
RBOH	homolog NADP ⁺ oxidasy (z angl. respiratory burst oxidase homolog)
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SNAP	S-nitroso-acethylpenilcilamin
SNP	nitroprussid sodný; Na ₂ [Fe(CN) ₅ NO
SOD	superoxiddismutasa
SY	synergidní buňka (z angl. Synergid cell)
TMB	3,5,3',5'-tetramethylbenzidin
UV	ultrafialové záření
VNC	jádro vegetativní buňky (z angl. nucleus of the vegetative tube cell)