

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

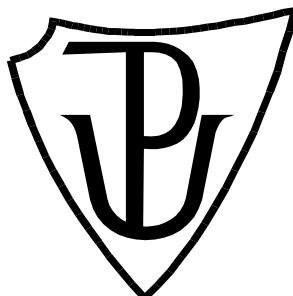
Olomouc 2013

Vendula Večeřová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU A KYSLÍKU PŘI STRESU ROSTLIN

Bakalářská práce

Vendula Večeřová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

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

Katedra botaniky, PřF UP v Olomouci

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Vendula Večeřová
Název práce	Reaktivní formy dusíku a kyslíku při stresu rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů PřF UP a AV ČR
Vedoucí práce	doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D. Katedra botaniky PřF UP
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) se řadí mezi významné signální molekuly účastnící se u rostlin většiny fyziologických a patofyziologických procesů. Při působení stresových faktorů RONS spouští kaskádu obranných reakcí, které mohou vést k navození rezistence nebo například usmrtit patogen. V této práci byly RONS lokalizovány v listech rostlin huseníčku rolního (<i>Arabidopsis thaliana</i>) vystavených fotoinhibičnímu osvětlení, a u rostlin rajčat (<i>Solanum</i> spp.) inokulovaných padlím rajčatovým (<i>Oidium neolycopersici</i>). Pletiva byla barvena fluorochromy detekujícími RONS a zobrazovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií. U rostliny <i>A. thaliana</i> byl zvýšený výskyt singletního kyslíku po osvětlení detekován zejména v mezibuněčných prostorech, peroxid vodíku a oxid dusnatý v chloroplastech. U rostlin <i>Solanum</i> spp. po infekci <i>O. neolycopersici</i> byla detailně studována lokalizace NO a rozšířeny poznatky o roli RNS v tomto patosystému. 24h po inokulaci byl nejintenzivnější signál zaznamenán u nejcitlivějšího genotypu <i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur.</p>
Klíčová slova	ROS, RNS, konfokální mikroskopie, biotický stres, abiotický stres, <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Solanum</i> spp.
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Vendula Večeřová
Title of thesis	Reactive nitrogen and oxygen species in plant stress
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic
Supervisor	assoc. prof., Dr. Micheaela Sedlářová Department of Botany, Faculty of Science Palacký University in Olomouc
The year of presentation	2013
Abstract	Reactive oxygen and nitrogen species (RONS) rank among the most important signaling molecules involved in a range of physiological and pathophysiological processes in plants. Under stress conditions RONS induce a cascade of defense reactions which may lead to a plant resistance or to the death of a pathogen. In this work RONS were localized in leaves of <i>Arabidopsis thaliana</i> plants exposed to a photoinhibitory light and <i>Solanum</i> spp. inoculated by tomato powdery mildew, <i>Oidium neolyopersici</i> . Following staining with fluorochromes the RONS were detected with confocal laser scanning microscopy. In <i>A. thaliana</i> plants an intensive signal for singlet oxygen was localized particularly in the intercellular spaces, while these for hydrogen peroxide and nitric oxide mostly in chloroplasts. In <i>Solanum</i> spp. plants infected by <i>O. neolyopersici</i> localization of NO was studied in details which expanded our knowledge on the role of RNS in this pathosystem. The most intensive signal was recorded for <i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur, a genotype susceptible to <i>O. neolyopersici</i> .
Keywords	ROS, RNS, confocal microscopy, biotic stress, abiotic stress, <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Solanum</i> spp.
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlášení

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

V Olomouci dne

Poděkování

Děkuji doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. z Katedry botaniky PřF UP za cenné rady, poskytnutí studijních materiálů, odborné vedení a hlavně trpělivost během mé práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. CÍLE PRÁCE	9
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
3.1 Reakti vní formy kyslíku a dusíku	10
3.1.1 Význam a funkce RONS ve fyziologii rostlin	10
3.1.2. Reaktivní formy kyslíku.....	11
3.1.3. Reaktivní formy dusíku.....	16
3.1.4. Vliv stresových faktorů	20
3.1.4.1. Abiotický stres	20
3.1.4.2. Biotický stres.....	20
3.2. Metody studia RONS	22
3.2.1. Mikroskopické metody.....	22
3.2.1.1. Konfokální mikroskopie.....	22
3.2.1.2. Obecná charakteristika fluorochromů	24
3.2.1.3. Fluorochromy pro detekci ROS	28
3.2.1.4. Fluorochromy pro detekci RNS	30
3.2.1.5. Imunohistochemická lokalizace enzymů zapojených do metabolismu RONS	31
3.2.2. EPR	32
3.2.3. Biochemické metody.....	32
3.2.3.1. Spektrofotometrie.....	32
3.3 Charakteristika modelových organismů.....	34
3.3.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	34
3.3.2. <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	35
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1. Materiál a metody	37
4.1.1. Rostlinný materiál	37
4.1.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	37
4.1.1.2. <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	37
4.1.2. Aplikace stresu	38
4.1.2.1. Aplikace stresu u <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
4.1.2.2. Aplikace stresu u <i>Solanum lycopersicum</i>	38
4.1.3. Lokalizace RONS.....	38
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	40
5.1. Lokalizace RONS u <i>Arabidopsis thaliana</i> po vystavení intenzivnímu světlu	40
5.1.1. Detekce singletního kyslíku	40
5.1.2. Detekce peroxidu vodíku a jiných ROS	43
5.1.3. Detekce oxidu dusnatého	46
5.2. Lokalizace RNS u <i>Solanum</i> spp. po inokulaci padlím rajčatovým	48
6. ZÁVĚR	53
7. LITERATURA	54
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	59

1. ÚVOD

Rostliny jsou během svého života značně ovlivněny prostředím, ve kterém se nacházejí. Vnější prostředí neustále podléhá změnám, které ovlivňují životní funkce rostlin a při překročení tzv. hranice tolerance mohou způsobit poškození jednotlivých orgánů či v nejhorších případech úhyn organismu. Stresem nazýváme stav, kdy se rostlina nachází pod vlivem stresových faktorů (stresorů). Stresory mohou být dvojí povahy, biotické nebo abiotické. Mezi biotické faktory rostlin řadíme patogenní viry, bakterie, oomycety, houby, herbivorní živočichy, parazitické a alelopatické rostliny. Abiotický stres je způsobován fyzikálními či chemickými faktory, především extrémními klimatickými podmínkami (teplota, záření, dostupnost vody, kyslíku, pH). Abiotický stres může způsobit i nevhodné složení půdy (nedostatek živin, zasolení). Aby rostliny nepodlehly působení stresových faktorů, vyvinuly účinné obranné mechanismy potřebné pro přežití v jejich přirozeném prostředí. Existuje řada signálních molekul, které se podílejí na přenosu informace o působení stresoru a následně spuštění obranných reakcí. Významnou roli mezi nimi hrají reaktivní formy kyslíku (ROS) - zejména peroxid vodíku a reaktivní formy dusíku (RNS) - v poslední době intenzivně studovaný oxid dusnatý.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem mojí bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši o reaktivních formách kyslíku a dusíku (RONS), seznámit se s metodami jejich studia a v experimentální části lokalizovat tyto molekuly v rostlinách vystavených stresovým faktorům.

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

3.1.1 Význam a funkce RONS ve fyziologii rostlin

Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) jsou úzce spojené s reakcí organismů na stresové faktory. Plní funkci signálních molekul a podílejí se u rostlin na strukturních a biochemických obranných mechanismech. Reaktivní formy kyslíku (ROS) vznikají při fotosyntéze v chloroplastech nebo při dýchání v mitochondriích díky elektron transportním řetězcům. Nedílnou součástí metabolismu živých organismů jsou i reaktivní formy dusíku (RNS), především dnes nejprostudovanější oxid dusnatý (NO).

Reaktivní formy kyslíku (ROS) byly dříve považovány pouze za toxické vedlejší produkty aerobního metabolismu, které jsou odstraňovány pomocí antioxidantů a antioxidačních enzymů. V posledních letech bylo zjištěno, že ROS hrají důležitou roli jako signální molekuly kontrolující důležité procesy rostlin jako je růst, vývoj, reakce na biotické a abiotické stresory a programovaná buněčná smrt (Bailey-Serres a kol., 2006). Reaktivní formy kyslíku jsou toxické až ve vyšších koncentracích, způsobují oxidační poškození buňky (např. peroxidace lipidů).

NO figuruje v mnoha fyziologických a biochemických procesech rostlin. NO byl zpočátku označován jako fytohormon, ale jelikož se svým působením vymyká klasickému hormonu, používá se v jeho případě označení „netradiční regulátor růstu“ (Beligni a Lamattina, 2001). NO je regulátorem mnoha fyziologických procesů, jeho účinek závisí na jeho koncentraci. Zjistilo se, že NO hraje roli při otvírání a zavírání průduchů (Garcia-Matta a Lamattina, 2001), regulaci senescence, růstu, kvetení, dormanci semen (Belgini a Lamattina, 2000), má vliv na aktivitu nitrát reduktasy (Planchet a kol., 2006) a programovanou buněčnou smrt (Delledone a kol., 2001).

3.1.2. Reaktivní formy kyslíku

V tabulce je uveden přehled reaktivních forem kyslíku (= reactive oxygen species, ROS).

Tabulka I: Přehled ROS, jejich zdrojů a biologických účinků (převzato z: Piterková a kol., 2005).

Sloučenina	Zkratky	Struktura	Zdroj	Biologický účinek
Hydroxylový radikál	OH	$\cdot\ddot{O}-H$	Haberova-Weissova reakce, Fentonova reakce	velmi silné oxidační činidlo, poškození DNA, peroxidace lipidů, degradace proteinů, produkce C_2H_4
Peroxid vodíku	H_2O_2	$H-\ddot{O}-\ddot{O}-H$	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 (EC 1.2.3.4), peroxidasy.)	inhibice fixace CO_2 , inaktivace enzymů Calvinova cyklu, oxidace sulfhydrylů a flavonolů, substrát oxidační reakce
Singletní kyslík	1O_2	$O-O:$	excitované chlorofylové molekuly v tripletovém stavu, znečištění vzduchu (NO_2 , O_3 , atd.)	mutageneze, peroxidace lipidů, fotooxidace aminokyselin
Superoxidový anionradikál	$O_2^{\cdot-}$	$[\ddot{O}=\ddot{O}]^{\cdot-}$	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, urikáza (EC 1.7.3.3).	peroxidace lipidů, inaktivace enzymů, depolymerizace polysacharidů, reakce s H_2O_2 za tvorby OH., schopnost oxidovat síru, askorbát a NADPH, redukovat cytochrom c a ionty kovů

Na rozdíl od molekulárního kyslíku jsou tyto částečně redukované nebo aktivované radikály kyslíku velmi reaktivní a toxické. Pro úspěšnou existenci rostlin na Zemi bylo nezbytné vytvoření obranných mechanismů, umožňující překonat toxický účinek ROS a využít některé z nich jako signální molekuly. ROS tak u rostlin hrají roli nejen toxických sloučenin, ale jsou i klíčovými regulátory mnoha biologických procesů.

ROS jsou v rostlinných buňkách nejvíce produkovány mitochondriemi, chloroplasty a peroxizomy, což jsou organely s vysoce oxidační metabolickou aktivitou nebo s intenzivní rychlostí elektronového toku. Produkce ROS v těchto organelách může být zodpovědná za spouštění různých signálních kaskád. Za podmínek limitujících fixaci CO₂, jako je sucho, teplotní a salinitní stres, nebo kombinace těchto podmínek a stresu z nadbytku světla, je produkce ROS v chloroplastech zvýšená. Za specifických stresových podmínek je hlavním producentem superoxidového anionu v mitochondriích elektronový transportní řetězec. Zdrojem ROS v rostlinných buňkách jsou detoxikační reakce katalyzované cytochromy v endoplazmatickém retikulu nebo v cytoplazmě. V peroxisomech je produkován superoxid pomocí xanthinoxidasy (Piterková, 2010).

Molekulární kyslík je poměrně málo reaktivní molekulou, jeho aktivace probíhá absorpcí dostatečné energie nezbytné pro obrácení spinu jednoho z nepárových elektronů. Tímto způsobem vzniká reaktivnější singletní kyslík (¹O₂). Singletní kyslík je schopen převést svoji excitační energii na jiné biologické molekuly, nebo s nimi může dále reagovat za vzniku hydroperoxidů. Jiným mechanismem aktivace molekulárního kyslíku je jednoelektronová redukce, tak dochází ke tvorbě superoxidu (O₂⁻), hydroxylového radikálu (OH[•]) a vody (Piterková a kol., 2005). Superoxid je mírně reaktivní forma kyslíku neprocházející přes buněčné membrány, je oxidačním i redukčním činidlem. Díky svému vysokému oxidačnímu potenciálu může způsobit i oxidační poškození buněk. Předpokládá se, že je superoxid zapojen v řadě fyziologických procesů rostlinných buněk, zejména v buněčném dělení, růstu a diferenciaci (Kranner a kol., 2010).

Dvouelektronovou redukcí kyslíku vzniká peroxid vodíku (H₂O₂), který se řadí mezi ROS, ačkoli není volným radikálem (Halliwell, 2006). V nepřítomnosti přechodných kovů je stabilní a nereaktivní, to je také důvodem, proč je považován za jednu z nejstabilnějších forem ROS. V rostlinných buňkách se vytváří v mitochondriích, chloroplastech, cytoplazmě, cytoplazmatické membráně, peroxisomech a buněčné stěně (Kubienová, 2012). H₂O₂ je také produkován reakcemi, jež jsou zahrnuty ve fotosyntéze a respiraci. Z toho vyplývá, že H₂O₂ a další ROS jsou nežádoucími vedlejšími produkty normálního aerobního metabolismu (Mittler, 2002). V řadě studií bylo dokázáno, že se zvyšuje koncentrace H₂O₂ po vystavení rostliny stresu. Na rozdíl od živočišných buněk jsou rostlinné buňky rezistentnější k zvýšené koncentraci H₂O₂. Rostlinná pletiva jsou schopná tolerovat vysoké koncentrace H₂O₂ (a to až v rozmezí 10² - 2x10⁵ μM). Bylo také zjištěno, že rostliny předindukované peroxidem vodíku byly odolnější vůči stresu, který byl způsoben chladem či nadbytkem světla (Piterková, 2010).

Při nízkých koncentracích má H_2O_2 roli signální molekuly, naopak při vysokých koncentracích může způsobit vznik oxidačního stresu, který následně může vést k buněčné smrti. O tom, že je peroxid vodíku opravdu důležitou molekulou, svědčí řada jeho dalších funkcí, například účast na mnoha obranných reakcích (např. zesílení rostlinné buněčné stěny) a regulace celé řady fyziologických procesů (např. senescence, fotorespirace, fotosyntéza, buněčný cyklus).

ROS vznikají v živém organismu i cestou enzymových reakcí. Superoxidový radikál vzniká jako meziproduct reakcí katalyzovaných enzymy, jako je například xanthinoxidasa (EC 1.17.3.2) využívající jako donory elektronů xanthin, hypoxanthin či acetaldehyd. Superoxidový radikál se uvolňuje při katalytické oxidaci xantinu na kyselinu močovou a dále pak podléhá redukci za tvorby peroxidu vodíku (H_2O_2) a hydroxylového radikálu ($\text{OH}\cdot$) cestou Haberovy-Weissovy a Fentonovy reakce. Aldehydoxidasa (EC 1.2.3.1) katalyzuje oxidaci aldehydu za tvorby superoxidového radikálu. Lipoxygenasa (EC 1.13.11.12) katalyzuje peroxideriváty podléhající autokatalytické degradaci, při níž dochází k tvorbě radikálů, které iniciují řetězové reakce peroxidace lipidů. Dále například oxalátoxidasa (EC 1.2.3.4) katalyzuje produkci peroxidu vodíku a oxidu uhličitého z oxalátu za přítomnosti kyslíku a aminoxidasa (EC 1.4.3.6) katalyzuje oxidaci biogenních aminů na příslušný aldehyd za uvolnění amoniaku a peroxidu vodíku (Piterková a kol., 2005).

Rostliny vytvořily účinné obranné mechanismy, které odstraňují reaktivní formy kyslíku, a tím chrání buňku proti oxidačnímu poškození. Mezi takové systémy patří enzymové a neenzymové antioxidanty. Aby byl biologický antioxidant účinný, musí být v buňce přítomen v přiměřeném množství, musí reagovat s různými volnými radikály, musí být vhodný pro regeneraci buňky a nesmí ji poškozovat.

Nejvýznamnějším antioxidantem je kyselina L-askorbová, známější jako vitamín C, který účinkuje v některých fyziologických procesech rostlin, jako je růst, diferenciaci a řada metabolických drah. Dále je schopen redukovat mnoho volných radikálů a tím zabránit vzniku oxidačního stresu. Askorbát může přímo „odstranit“ některé reaktivní formy kyslíku, a to například superoxid, hydroxylové radikály, singletní kyslík, a je schopen redukovat peroxid vodíku na vodu (Piterková a kol., 2005). Mezi antioxidanty patří i karotenoidy, které velice rychle odstraňují singletní kyslík z protein-pigmentových komplexů chloroplastů, glutathion odstraňující cytotoxický peroxid vodíku a reagující s dalšími ROS (např. singletním kyslíkem, superoxidem a hydroxylovým radikálem). Velmi důležitým antioxidantem v lipidových

membránách je α -tokoferol, jinak nazývaný vitamín E, který odstraňuje řetězově vznikající volné peroxylové radikály.

Nejvšestrannější ochranu proti poškození reaktivními formami kyslíku ve všech buněčných částech poskytují zejména enzymy a některé enzymové systémy. Na katabolismu ROS se podílejí enzymy, které jsou shrnuty v tabulce II.

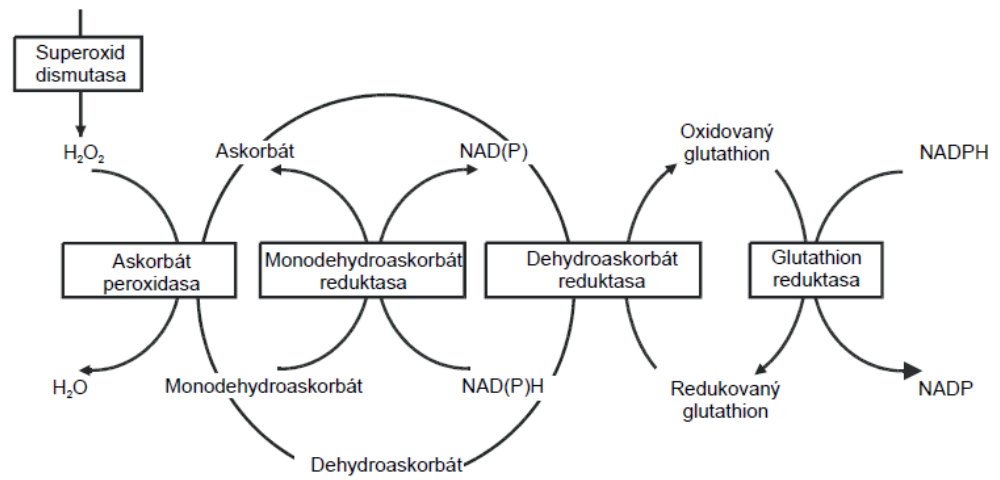
Tabulka II: Přehled enzymů podílejících se na katabolismu ROS (převzato z: Piterková a kol., 2005).

Enzym	Katalyzovaná reakce
Superoxiddismutasa	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \leftrightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Katalasa	$2H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + 2H_2O$
Glutathionperoxidasa	$2GSH + PUFA-OOH \leftrightarrow GSSG + PUFA + 2H_2O$
Askorbátperoxidasa	$AA + H_2O_2 \leftrightarrow DHA + 2H_2O$
Glutathionreduktasa	$NADPH + GSSG \leftrightarrow NADP^+ + 2GSH$

Nejvýznamnější antioxidační enzym se nazývá superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) řadící se do skupiny oxidoreduktas. SOD se vyskytuje u aerobních a fakultativně aerobních organismů a ve všech buněčných odděleních, která jsou citlivá na oxidativní stres (Piterková a kol., 2005, Grace a kol., 2000). U rostlin nacházíme tři typy SOD, které byly klasifikovány podle obsahu kovového kofaktoru jako je Fe, Mn a Cu/Zn (Procházka, 1998). SOD katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku, který je následně odstraněn katalasami a peroxidasami (Březinová Belcredi a kol., 2007).

Ve všech aerobních eukaryotech se nachází tetramerní enzym katalasa (CAT, EC 1.11.1.6). Tento enzym může katalyzovat přímý rozklad peroxidu vodíku, v takovém případě se jedná o katalasovou aktivitu. Navíc může katalyzovat oxidaci substrátů jako je metanol, etanol, formaldehyd a nitrit peroxidem vodíku, pak se jedná o aktivitu peroxidasovou. Existují tři formy CAT, které se liší svojí lokalizací. CAT 1 se vyskytuje v listech, kde napomáhá odstraňování peroxidu vodíku v průběhu fotorespirace. CAT 2 se nachází především v cévních svazcích a CAT 3 je lokalizována v glyoxysomech semen a mladých semenáčků (Dat a kol., 2000). Na odstraňování peroxidu vodíku v místech, kde není přítomna katalasa se podílí antioxidanty askorbát-glutathionového cyklu, např. askorbátperoxidasa (APOX, EC

1.11.1.11) nebo glutathionreduktasa (GSNOR, EC 1.6.4.2). Askorbát-glutathionový cyklus znázorňuje obrázek č. 1.



Obr. 1: Schéma askorbát-glutathionového cyklu (převzato z: Piterková a kol., 2005).

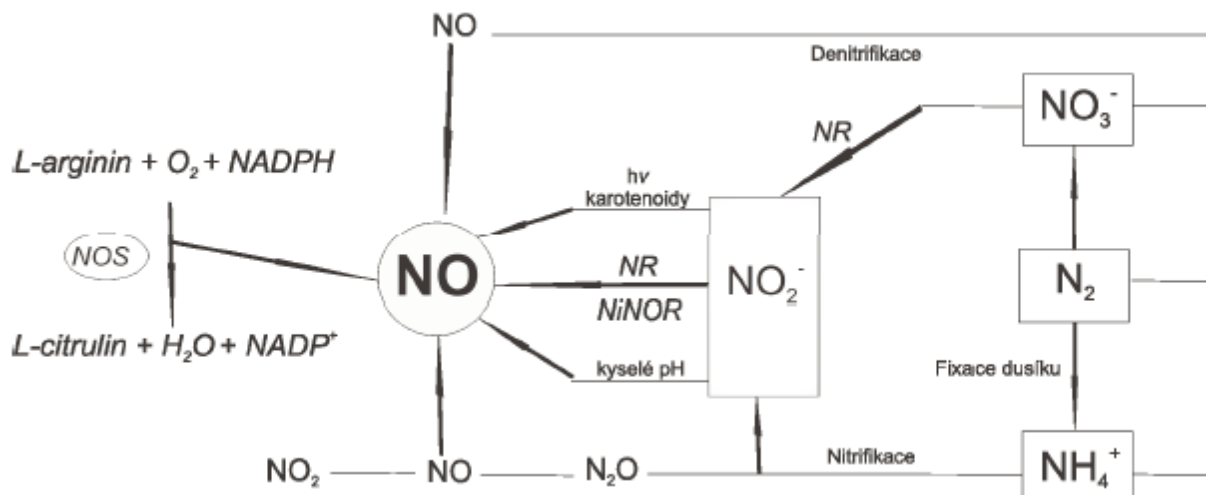
3.1.3. Reaktivní formy dusíku

Další skupinou reaktivních nízkomolekulárních látek, které jsou zároveň signálními molekulami, jsou reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species, RNS). Reaktivní formy dusíku můžeme rozdělit na volné radikály, jako jsou oxid dusnatý ($\cdot\text{NO}$), oxid dusičitý ($\cdot\text{NO}_2$) a na skupinu látek, mezi které patří kyselina dusitá (HNO_2), oxid dusitý (N_2O_3), peroxyinitrit (ONOO^-), alkylperoxyinitrit (ROONO).

Oxid dusnatý (NO) se účastní mnoha fyziologických a patologických procesů u různých organismů. V živočišné říši hraje roli signální molekuly, která se účastní zánětů, imunity, vazodilatace nebo neurotransmise. U rostlin je údajů o funkci NO méně ve srovnání s živočišnými systémy, proto je NO intenzivně studován. Spolu s ROS je oxid dusnatý v rostlinách zapojen do fyziologických procesů (jako je klíčení, senescence, tvorba kořenů, kvetení, pohyby průduchů) a do procesů spojených se stresem (abiotický, napadení patogeny), které má za následek spuštění programované buněčné smrti (Wendehenne a kol., 2004).

NO v buňce může vznikat dvěma způsoby, enzymově nebo neenzymově. U živočichů je NO tvořen enzymem NO-syntasou (NOS, EC 1.14.13.39), který existuje v buňkách ve třech isoformách. Všechny formy, neutrální (nNOS), indukovatelná (iNOS) i endoteliální (eNOS) oxidují L-arginin na L-citrulin a NO. NOS v rostlinách je nyní předmětem mnoha zkoumání, ale přesvědčivě prokázána dosud nebyla (Piterková a kol., 2008). Byl ovšem nalezen analog tohoto enzymu označovaný „NOS-like enzyme“ způsobující tvorbu L-citrulinu z L-argininu a navíc reagující na inhibitory živočišné NOS. Přítomnost „NOS-like“ enzymu byla prokázána v peroxizomech a chloroplastech v listech hrachu, dále v cytosolu buněk meristematické zóny a v jádrech buněk prodlužovací zóny kořene u kukuřice (Wendehenne a kol., 2001).

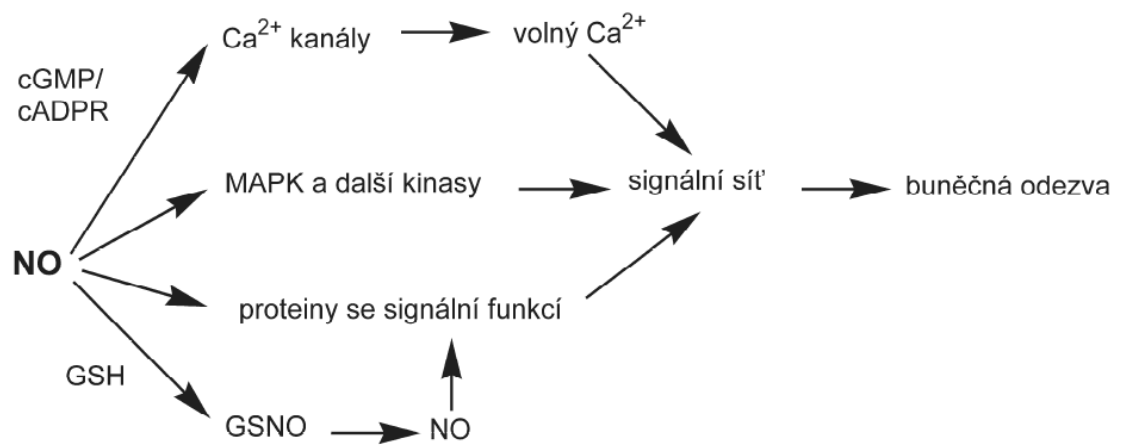
Specifickým rostlinným enzymem je nitrit:NO reduktasa (NiNOR), která katalyzuje redukci dusitanu na NO. NiNOR byla popsána v plazmatické membráně kořenových buněk tabáku, z toho pramení předpoklad, že NO má funkci signální molekuly v průběhu vývoje kořenového systému a účastní se interakcí s půdními bakteriemi na povrchu kořenů. Jiným enzymovým zdrojem NO je nitrátoreduktasa (NR, EC 1.7.1.1.). Hlavní funkcí NR v rostlinách je katalýza NAD(P)H-dependentní dvouelektronové redukce dusičnanu na dusitan. Bylo zjištěno, že za určitých podmínek může docházet k jednoelektronové redukci dusitanu na NO, eventuálně NR může produkovat zároveň s NO i peroxidusitan (Piterková a kol., 2008).



Obr. 2: Schéma zdrojů NO v rostlinách. NO se vytváří činností nitrátreduktasy (NR), nitrit:NO reduktasy (NiNOR) a NO syntasy (NOS) a neenzymovou cestou reakcí NO₂⁻: redukce za kyselého pH a světlem poháněná redukce v přítomnosti karotenoidů. NO může vznikat také jako vedlejší produkt denitrifikace, nitrátové asimilace, nebo respirace (Převzato z: Piterková, 2008).

V rostlinných buňkách jsou dále do syntézy NO zapojeny neenzymové mechanismy, které zahrnují redukci dusitanu v apoplastu při sníženém pH a přítomnosti reductantů jako je kyselina askorbová. Světlem poháněná redukce dusitanů na NO katalyzovaná karotenoidy byla popsána v membránách chloroplastů (Piterková, 2008).

Signální dráhy NO v rostlinách jsou v posledních letech hlavní otázkou mnoha studií. Přestože je pochopení signálních funkcí NO teprve v počátcích, již se podařilo rozpoznat některé prvky přenosových kaskád zprostředkovaných NO (obr. 3), které jsou prozkoumány u živočichů. Signální dráhy NO v rostlinách zahrnují syntézu sekundárních přenašečů, příkladem jsou cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a cyklická adenosindifosfát ribosa (cADPR), které vedou ke změnám hladiny cytosolického vápníku (Piterková a kol., 2008). Aktivace NO je zprostředkována MAP kinasami, které jsou u rostlin aktivovány extracelulárními signály. Mezi tyto signály patří například působení rostlinných hormonů, sucho, chlad, osmotický stres či působení patogenů. Extracelulární signály jsou následkem aktivování signálních drah, které vedou ke genové expresi (Neill a kol., 2002). Signální dráhy NO mohou být také zprostředkovány kovalentními modifikacemi proteinů jako nitrosylace cysteinů a nitrace tyrosinů (Piterková a kol., 2008).



Obr. 3: Schéma znázorňující signální dráhy NO u rostlin, primární cíle NO zahrnují mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK) a Ca^{2+} kanály regulované prostřednictvím změn hladin cGMP a cADPR. NO reguluje aktivitu proteinů nitrosylací thiolových skupin. Stabilní metabolit *S*-nitrosoglutathion (GSNO) může sloužit jako přenašeč signálu NO pro jeho uvolnění a interakce ve vzdálených cílech (Převzato z: Piterková a kol., 2008).

Vzhledem k vysoké reaktivitě NO lze předpokládat jeho nestabilitu. Poločas jeho rozpadu se udává různě v závislosti na podmínkách prostředí, například poločas rozpadu NO v atmosféře obsahující běžně 21% O₂ je ≈ 3,5 hod, v atmosféře obsahující pouze 0,3% O₂ je až ≈ 16 hod (Soegiarto a kol., 2003). V živé buňce je však poločas rozpadu NO mnohem kratší, pohybuje se kolem ≈ 6 s především díky reakci s ROS, které se vyskytují více v buňce než v atmosféře (Thomas a kol., 2001; Misra a kol., 2010). NO je plynný radikál, jenž interaguje se třemi typy sloučenin lišícími se svými fyzikálními vlastnostmi a chemickou reaktivitou. Jedná se o kation dusíku (NO⁺), radikál NO a nitroxylový anion (NO⁻). NO reaguje s kyslíkem za vzniku několika různých oxidů dusíku: NO₂, N₂O₃, NO₂⁻ nebo NO₃⁻. Množství NO u rostlin, které jsou napadené patogenem, závisí na redukčním stavu buňky. Detekce NO se nejčastěji využívá při výzkumu napadených rostlin patogenem (Vandelle a Delledonne, 2008). NO rychle reaguje s jinými radikály, zejména s radikály řadící se mezi reaktivní formy kyslíku. Z biologického pohledu jsou nejpodstatnější reakce se superoxidovým anionradikálem za vzniku peroxodisitanu, který dále reaguje s proteiny, lipidy a DNA za vzniku příslušných nitroso- a nitroderivátů. Další významnou reakcí NO je tvorba nitrosylových komplexů s atomy kovů. NO je malá hydrofobní molekula, proto se snadno pohybuje v prostředí buněčných membrán. Což napomáhá reaktivitě NO s lipofilními látkami, kterými mohou být radikálové meziprodukty peroxidace membránových lipidů. V rostlinných membránách byl při různých stresových podmínkách popsán antioxidační a ochranný vliv NO, který snižuje rozsah lipidové peroxidace (Piterková a kol., 2008).

Kvůli vysoké reaktivitě je experimentální detekce a kvantifikace NO *in vivo* obtížná. Metody, které se používají u rostlin, pocházejí ze studií prováděných u živočichů a jsou upravovány na podmínky rostlinných pletiv (Piterková a kol., 2008). NO se v organismu účastní mnoha procesů a jeho účinky závisí na jeho koncentraci. Jeho přesná detekce je důležitá pro pochopení jeho role v buněčných procesech. Existuje celá řada detekčních technik, například: laserová fotoakustická spektroskopie, EPR spektroskopie, chemiluminiscence nebo hmotnostní spektrometrie (Vandelle a Delledonne, 2008). Pro histochemickou lokalizaci produkce NO se využívá specifických fluorescenčních sond a fluorescenční nebo konfokální mikroskopie (Piterková a kol., 2008).

3.1.4. Vliv stresových faktorů

Během svého života jsou rostliny vystaveny působení různých stresových faktorů, které pak značně ovlivňují jejich fyziologické procesy, dále mohou vést k poškození rostlinných buněk, orgánů a v krajním případě až k jejich smrti. Stresory můžeme rozdělit na abiotické a biotické. Velmi často na rostlinu působí více stresorů najednou. Stresor ovlivňuje část rostliny, ve které dojde k lokální stresové reakci, ta následně může druhotně vyvolat stres i na jiných orgánech. Tímto způsobem dochází k systémové stresové reakci. Zmíněné stresory způsobují zvýšení produkce RONS jako signálních drah nebo obranných mechanismů.

Rostliny jsou schopny zvyšovat svoji odolnost vůči stresu. Jedním možným způsobem je aklimatizace neboli otužování, v tomto případě dochází k morfologickému nebo fyziologickému přizpůsobení konkrétní rostliny. Zvyšuje se syntéza zásobních látek (škrobu, lipidů) nebo dochází ke snížení obsahu vody v buňkách. Adaptace je dalším možným způsobem odolnosti vůči stresu. Adaptací dochází ke genetickým změnám v celé populaci rostlin, které následně vedou k morfologické nebo fyziologické kompenzaci stresu.

3.1.4.1. Abiotický stres

Abiotický stres je způsobován neživými faktory chemického nebo fyzikálního původu. Nejčastěji se jedná o následující faktory:

Chemické faktory: nedostatek/nadbytek vody, nedostatek kyslíku, nedostatek živin v půdě, výskyt toxických plynů ve vzduchu, snížená/zvýšená koncentrace iontů a solí v půdě, přítomnost toxických kovů a organických látek v půdě.

Fyzikální faktory: nadměrné světelné záření, UV záření, vysoká teplota, nízká teplota, mechanické účinky větru, mechanické poranění.

3.1.4.2. Biotický stres

Biotický stres bývá vyvolán živými organismy. Rostliny jsou ohrožovány patogeny, konkurujícími rostlinami a býložravými živočichy. Rostlinným patogenem se označují organismy, které svoji ontogenezi nebo aspoň její část prožije ve vzájemném působení s rostlinou, kterou využívá a poškozuje. Projevy tohoto vzájemného působení se označují jako onemocnění nebo choroba. Patogeny, které jsou nutričně závislé na hostitelské rostlině, jsou zároveň parazity. Biotrofní patogen může existovat pouze v buňkách/pletivu hostitele. Nekrotrofní patogen intoxikuje a usmrtí buňku a následně se živí jejími zbytky. Existují i

patogeny, které se zpočátku chovají jako biotrofní a po čase parazitování buňku zabijí, takový patogen se nazývá hemibiotrofní. Mezi patogeny se řadí viry, viroidy, fytoplazmy, bakterie, houby a nematoda (hlístice). Rostliny jsou poškozovány i mnoha druhy živočichů, jimž slouží jako potrava, v tomto případě se nejedná o patogeny, ale používá se termín škůdci.

3.2. Metody studia RONS

3.2.1. Mikroskopické metody

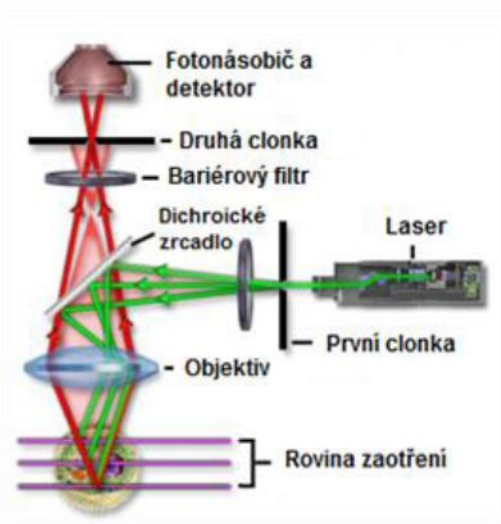
3.2.1.1. Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskop je druhem optického mikroskopu, který má tu výhodu, že má vysokou rozlišovací schopnost danou detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Rozlišení je asi 1,4 x vyšší než u světelného mikroskopu se srovnatelnou optikou. Dochází k potlačení signálu z rovin pod a nad rovinou zaostření, tím se nabízí možnost snímat sérii optických řezů, které umožní rekonstruovat pozorovaný objekt v 3D projekci a provádět následně stereologická měření v preparátu.

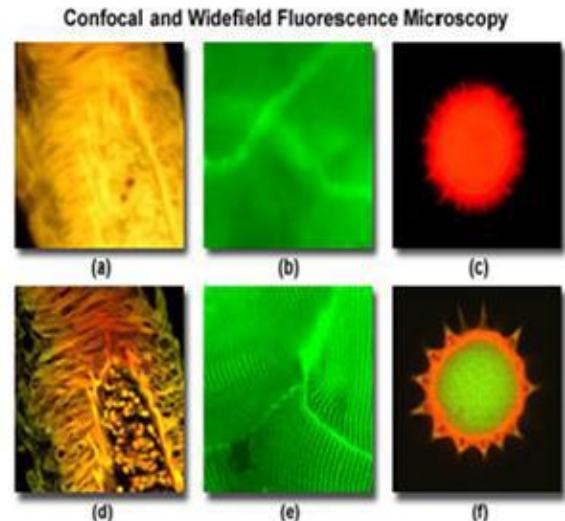
Historie tohoto typu mikroskopu sahá k roku 1957, kdy si vynález konfokálního mikroskopu nechal patentovat americký vědec Marvin Minsky. Minsky však neměl dostatečný zdroj světla pro sestavení funkčního přístroje. Důležitějším milníkem pro konfokální mikroskopii se stal rok 1965, kdy Mojmir Petráň a Milan Hadravský z Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni zkonstruovali nový typ konfokálního mikroskopu na bázi rotujícího Nipkowova kotouče. Tento mikroskop již zajistil kvalitní optické řezy silným preparátem mozkové tkáně, kterou potřebovali pozorovat. Za dalšího pokračovatele lze považovat Davida Eggera, který nahradil Nipkowův kotouč pohybujícím se zdrojem světla a v roce 1973 zveřejnil první snímky buněk vzniklé tímto způsobem. V dnešní době se konfokální mikroskopie stala velmi využívanou metodou v biologii a biomedicině (Claxton a kol., 2004 - 2009).

Existuje více typů konfokálních mikroskopů, nejčastěji používaným je rastrovací konfokální mikroskop „Confocal Laser Scanning Microscope“ (CLSM). Zdrojem světla rastrovací konfokální mikroskopie je laser. Laserový paprsek představující bodový zdroj světla je fokusován na clonku. Dále prochází objektivem a dopadá až na samotný vzorek, kde je obraz clonky fokusován do bodu, jehož průměr odpovídá difrakční neboli rozlišovací mezi. Přes stejný objektiv prochází světlo odražené, rozptýlené, případně fluorescence. Sekundární paprsky prochází přes clonku, jejíž bodový obraz je pomocí děliče paprsků lokalizován před fotonásobič. Tam je umístěna druhá konfokální bodová clonka filtrující světlo, které prochází z oblasti mimo ohniskovou rovinu mikroskopu. Základním principem CLSM je to, že obraz není vytvářen najednou, ale vzniká řádkováním bod po bodu. Řádkováním jsou snímány optické body v rovině XY a díky přesně definovanému posunu v ose Z i jednotlivé optické řezy. Rastrování bod po bodu může probíhat třemi různými způsoby. Prvním způsobem je

rozmitání laserového paprsku, dalším příčný posuv vzorku před objektivem nebo posuv samotného objektivu. Po skenování je počítač schopen sestavit obraz celého preparátu (Kubínová, 2004).



Obr. 4: Chod paprsků konfokálním mikroskopem. (Převzato z: Tulpová Z., 2011)



Obr. 5: Srovnání snímků získaných z fluorescenčního (a,b,c) a konfokálního mikroskopu (d,e,f). Jedná se o snímky lidské míchy, vláken neporušeného králičího svalu a pylového zrna slunečnice. Na první pohled je zřejmé, že u konfokálního mikroskopu mají snímky mnohem vyšší rozlišení a kontrast. (Převzato z: www.olympusfluoview.com, 21.2.2013)

Dalším typem konfokálního mikroskopu je tandemový skenovací mikroskop „Tandem scanning confocal microscope“. Tento mikroskop využívá pro skenování rotující disk, nazývaný Nipkowův kotouč. Nipkowův kotouč je perforovaná destička, která rotuje a tím zajišťuje usměrnění laserového světla na body preparátu. Kotouč obsahuje desítky až stovky tisíc otvorů v Archimedových spirálách. Výhodou tohoto typu mikroskopu je rychlé snímání, což je vhodné pro pozorování živých preparátů. Na pozorovaný objekt působí nižší intenzita světla a tím se snižuje vybělování preparátu tzv. photobleaching (Hibbs, 2004).

Nejnovějším typem konfokálního mikroskopu je takzvaný „Programmable Array Microscope“ (PAM), který by se do češtiny mohl překládat jako Programovatelný maticový mikroskop. Tento mikroskop využívá elektricky ovládaný prostorový modulátor světla „Spatial Light Modulator“ (SLM) vytvářející sadu pohybujících se bodových clonek. Modulátor SLM je zařízení, které obsahuje matici pixelů, z nichž každý má určité vlastnosti (průhlednost, odrazivost, optická rotace). Tyto vlastnosti se mohou elektronicky měnit. SLM

dělí fluorescenční světlo procházející objektivem na fokální konjugovaný obraz, který je reprezentován „zaostřeným“ světlem, a nekonjugovaný obraz tvořený „nezaostřeným“ světlem. Dále mikroskop obsahuje mikroelektromechanická zrcadla nebo komponenty na bázi tekutých krystalů. Ke snímání obrazu se pak obvykle používají CCD kamery. Co se týče konfokálního zobrazování pomocí PAM, přicházejí v úvahu dva postupy. V prvním případě se bodová matrice posouvá a postupným skenováním je dosaženo výsledného kompletního obrazu. Druhý, rychlejší postup, používá krátkou pseudonáhodnou sekvenci překrývajících se snímků, která je tvořena sérií různých dvourozměrných vzorců (Verveer a kol., 1997).

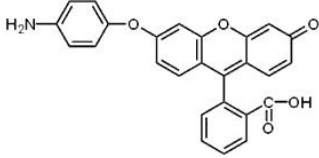
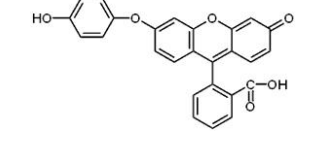
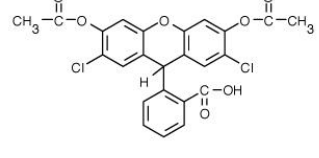
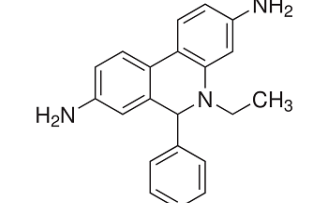

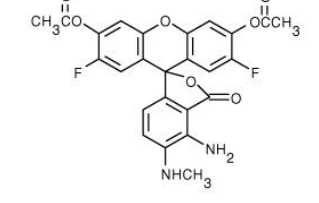
3.2.1.2. Obecná charakteristika fluorochromů

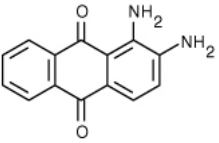
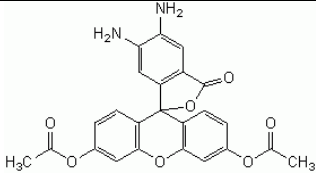
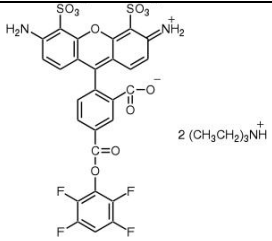
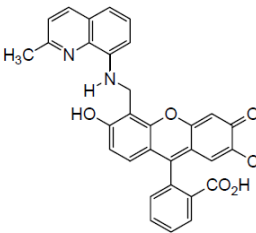
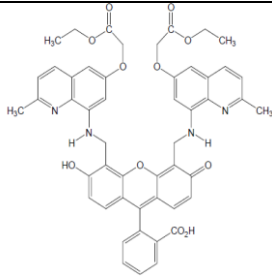
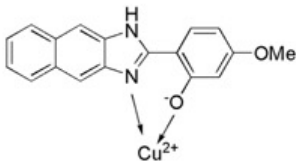
Konfokální mikroskopie umožňuje pozorování optických řezů vzorkem. Vzorek může být pozorován buď v režimu viditelného světla, nebo v režimu tzv. fluorescence. Fluorescence je jev, při kterém některé látky po ozáření (excitaci) světlem určité vlnové délky vyzařují (emitují) světlo jiné vlnové délky. Fluorescenční režim je spjat s velkou citlivostí pro pozorování buněčných komponent a procesů probíhajících v živých buňkách či tkáních. Velké množství fluorescenčních sond tvoří uměle vytvořené organické látky, které se naváží na biologické makromolekuly (např. bílkoviny, nukleové kyseliny) nebo se naváží na strukturní oblasti (např.: na cytoskelet, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, jádro). Jiné sondy slouží k monitorování dynamických procesů v buňkách (např. pH, reaktivní formy kyslíku a dusíku, membránový potenciál).

Již od konce devatenáctého století se pro lepší viditelnost preparátů začalo využívat barviv, mezi nejužívanější barviva patřila methylenová modř, azobarviva, safranin O, malachitová zeleň, aj. Tato barviva však byla výhodnější pro světelnou mikroskopii, a to především díky silnému barvení preparátů a vstřebávání velkého množství světla. Pro fluorescenční a tedy i konfokální mikroskopii však vhodné nebyly, protože většina z nich jen slabě fluoreskuje. Během tohoto období se podařilo vyvinout syntetická barviva na základě xantonových a akridinových heterocyklů, které se staly základem pro dnes využívané fluorescenční sondy. Největšího rozvoje dosáhly fluorescenční barviva po objevení GFP (Green Fluorescent Protein), který byl izolován z medúzy *Aequorea victoria*. Tento druh medúz je specifický svojí schopností světélkovat (Claxton a kol., 2004-2009).

Díky barvivům dnes můžeme detekovat aktivní metabolismus buněk, a tím i jejich životaschopnost. Příkladem fluorochromu se schopností detekce aktivního metabolismu je fluorescein, resp. fluorescein diacetát (FDA). Fluorescein diacetát je do buňky transportován, následně je hydrolyzován intracelulárními esterázami za vzniku AM esteru, který je schopen fluoreskovat. Samotný fluorescein se do živé a zdravé buňky nedostane přes plazmatickou membránu. AM estery jsou hydrofobní sloučeniny, které snadno pronikají do živých buněk, proto jsou velice často využívány pro vkládání různých polárních fluorescenčních sond do buněk (Invitrogen, 2011). Fluorescenční barviva využívaná v současné době rozdělujeme do několika skupin – tradiční fluorochromy, cyaninová barviva, fluorová barviva Alexa, fluorescenční sondy pro prostředí buněk, organelové sondy, kvantové tečky či fluorescenční proteiny - GFP a jeho deriváty (Claxton a kol., 2004-2009). Velmi důležitý je správný výběr fluorescenčních sond s optimálními vlastnostmi (rozpuštěnost, délka barvení, pH, vlnové délky excitačního a emisního záření). Životnost barviv se snižuje stářím, osvětlením, teplotou.

Tabulka III: Přehled vlastností fluorochromů využívaných pro detekci RONS.

Název	Struktura	Použití pro detekci	barva	Vlnová délka (nm)		citace
				Excitace	Emise	
APF 3'-p-(aminofenyl)fluorescein		Hydroxylový radikál (OH), peroxydusitan (ONOO ⁻), chlornanový anion (OCl ⁻)	zelená	490	515	Invitrogen, 2013
HPF 3'-(p-hydroxyfenyl) fluorescein		Hydroxylový radikál (OH) a peroxydusitan (ONOO ⁻)	zelená	490	515	Invitrogen, 2013
H2 DCF DA 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát		Peroxid vodíku (H ₂ O ₂) a další ROS	zelená	498	522	Invitrogen, 2013
SOSG Singlet Oxygen Sensor Green®	Vzorec zatím nebyl zveřejněn	Singletní kyslík (¹ O ₂)	zelená	504	525	Invitrogen, 2013
DHE Dihydroethidium		Superoxid (O ₂ ⁻)	oranžová	510	590	Zhao a kol., 2005
DAF-FM 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein		Oxid dusnatý (NO) a další RNS	zelená	495	515	Invitrogen, 2013
DAF-FM DA 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát		Oxid dusnatý (NO) a další RNS	zelená	495	515	Invitrogen, 2013

Název	Struktura	Použití pro detekci	barva	Vlnová délka (nm)		citace
				Excitace	Emise	
DAA 1,2-diaminoantrachinon		Oxid dusnatý (NO)	zelená	264	494	Invitrogen, 2013
DAF-2 DA 4,5-diaminoflorescein diacetát		Oxid dusnatý (NO)	zelená	495	515	Valderrama a kol., 2007
AF488 Alexa fluor 488		S-nitrosothiol (RONS)	zelená	495	519	Valderrama a kol., 2007
CuFL Kovový fluorofor s mědí v molekule (CuFL ₅)		Oxid dusnatý (NO) a další RONS	zelená	488	516	Albers, 2008
FL2E Kovový fluorofor		Oxid dusnatý (NO) a další RONS	zelená	495	520	http://www.strem.com/uploads/tech_notes/96-0293tech.pdf , McQuade a Lippard, 2010
MNIP-Cu		Oxid dusnatý (NO) a další RONS	zelená	490	492	Ouyang a kol., 2008

3.2.1.3. Fluorochromy pro detekci ROS

Fluorochromem dnes běžně používaným pro detekci tvorby aktivních forem kyslíku je 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H₂DCF-DA) známý také jako dichlorofluoresceindiacetát. Samotný H₂DCF-DA neposkytuje fluorescenční signál, tuto schopnost však má jeho derivát 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) vznikající štěpením H₂DCF-DA pomocí intracelulárních esteráz a oxidací volnými radikály, především $\cdot\text{OH}$, $\text{CO}_3^{\cdot-}$, NO_2^{\cdot} a thiolovými radikály (Catalá a kol., 2010). Zdá se, že oxidace diacetátové formy DCF není přímo citlivá na singletní kyslík. Singletní kyslík, který patří mezi jednu z vysoce aktivních forem kyslíku, může ovlivnit tvorbu DCF svými reakcemi s buněčnými substráty, jejichž následným produktem jsou peroxidové a peroxylové radikály. Bylo dokázáno, že H₂DCF-DA může být oxidován na DCF peroxydusitanovým aniontem (ONOO⁻), křenovou peroxidázou nebo za nepřítomnosti peroxidu vodíku železnatými kationty (Fe²⁺). Navíc může samotný DCF sloužit jako stimulátor pro oxidaci jeho diacetátové formy. Z toho plyne, že samotný fluorochrom (obě jeho formy) je schopen tvořit volné radikály, a díky tomu by mělo být jeho použití při měření tvorby těchto látek kontrolováno (Invitrogen 2010b).

Existují dva fluorochromy s podobnými vlastnostmi, ale vyšší stabilitou a specifitou. Těmito fluorochromy jsou 3'-(*p*-aminofenyl)fluorescein (APF) a 3'-(*p*-hydroxyfenyl)fluorescein (HPF). Nejčastěji se používají pro detekci hydroxylového radikálu a peroxydusitanu. Oba tyto fluorochromy mají shodné hodnoty maxima excitace (490 nm) a emise (515 nm), mimo to jsou oba poměrně odolné vůči oxidaci světlem. Liší se však reakcí s iontem OCl^- - u APF se intenzita fluorescence po reakci s OCl^- výrazně zvyšuje, ne však u HPF. Proto při současném použití obou fluorochromů je umožněna selektivní detekce anionu chlornanu (Setsukinai, 2003).

Tabulka IV : Fluorescenční reakce APF, HPF a H2DCF DA s různými ROS (převzato z: Invitrogen, 2013).

Reaktivní forma kyslíku (ROS)	Metoda indukce tvorby ROS	APF	HPF	H ₂ DCFDA
Peroxid vodíku (H ₂ O ₂)	100 μM H ₂ O ₂	<1	2	190
Hydroxylový radikál (OH [•])	100 μM Cl ₂ FeO ₈ a 1 mM H ₂ O ₂	1200	730	7400
Anion chlornanu (OCl ⁻)	3 μM OCl ⁻	3600	6	86
Oxid dusnatý (NO)	100 μM 1-hydroxy-2-oxo-3-(3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazenu (NOC-7)	<1	6	150
Anion peroxyinitritu (ONOO ⁻)	3 μM ONOO ⁻	560	120	6600
Kyslík (¹ O ₂)	100 μM 3-(1,4-dihydro-1,4-epidioxy-1-naftyl)propionové kyseliny	9	5	26
Anion superoxidu (O ₂ ^{-•})	100 μM KO ₂	6	8	67
Autooxidace	2,5 h vystavení fluorescenčnímu zdroji světla	<1	<1	2000

* V pokusu bylo 10 μM APF, HPF nebo DCF (2', 7'-dichlorofluoresceinu) přidáno k roztoku fosforečnanu sodného (0,1M; pH = 7,4), a tvorba ROS byla vyvolána výše uvedenými způsoby. Fluorescence byla měřena při následujících vlnových délkách excitace/emise pro APF a HPF 490/515 nm, nebo pro DCF (získán hydrolýzou H2DCFDA) 500/520 nm.

Dihydroethidium nebo hydroethidium v cytoplazmě dává modrý fluorescenční signál (excitační / emisní maxima $\lambda \sim 340/420$ nm), kdežto DNA fluoreskuje červeně (excitační / emisní maxima $\lambda \sim 535/610$ nm, Sigma-Aldrich, 2011). Dihydroethidium indikuje také superoxidový radikál, obdobně jako jiný fluorochrom, kterým je MitoSOXRed (excitační / emisní maxima $\lambda \sim 400/590$ nm). Společně byly využity pro přesnější lokalizaci mitochondrií a pro objevení místa, kde se tvoří superoxid (Invitrogen, 2013b).

V současné době má velký význam rozvoj efektivních a selektivních fluorescenčních sond pro reaktivní formy kyslíku, zejména pro singletní molekulární kyslík, který je velmi špatně detekovatelný zejména kvůli vysoké reaktivitě dané velmi krátkým poločasem rozpadu v biologických systémech. Jedním z významných fluorochromů je Singlet Oxygen Sensor Green® (SOSG), jenž byl aplikován u řady biologických systémů známých tvorbou singletního kyslíku (Gollmer, 2011). SOSG nevykazuje citlivou odpověď na hydroxylové radikály a superoxid. V přítomnosti singletního kyslíku SOSG emituje zelenou fluorescenci s excitačními / emisními maximy při $\lambda \sim 504$ nm a 525 nm (Flors, 2006).

3.2.1.4. Fluorochromy pro detekci RNS

Fluorochromem využívaným pro detekci NO a dalších reaktivních forem dusíku je diaminofluorescein (DAF). Téměř všechny obdoby DAF specificky reagují s NO a tvoří triazolový derivát poskytující fluorescenční signál. V dnešní době se diskutuje, zda reagují s NO_2^- , NO_3^- nebo dalšími reaktivními formami kyslíku, včetně ONOO^- , O_2^- a H_2O_2 . Ve starší literatuře se totiž udává, že s těmito formami nereagují. Nejcitlivějším analogem DAF je DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein), který vykazuje stabilní fluorescenční signál v rozsáhlém rozmezí pH. Je-li však hodnota pH nižší než 7, je intenzita signálu triazolového derivátu rapidně snížena (Vandelle a Delledone, 2008). DAF-FM se řadí mezi látky, které patří mezi vicinální diaminové deriváty fluoresceinu a generují fluorescenční signály. Využívá se pro detekci oxidu dusnatého *in situ*, ale pro barvení buněk se používá jeho diacetátový derivát DAF-FM DA, který proniká plazmatickou membránou. V buňce je DAF-FM DA následně štěpený esterázami za vzniku intracelulárního DAF-FM, jenž je oxidován oxidem dusnatým na fluorescenční triazolový produkt (Invitrogen 2013a).

Dalším fluorochromem sloužícím pro detekci NO je 1,2-diaminoantrachinon (DAA), který sám fluorescenční signál neposkytuje. Fluoreskuje až 1H-anthra [1,2d] [1,2,3] triazole-6,11-dion, který je produktem reakce DAA s NO za přítomnosti O_2 . DAA je možné excitovat při vlnové délce 264 nm a detekovat při vlnové délce 394 nm. DAA byl užíván pro detekci změn hladiny NO u potkanů s poraněnou sítnicí zrakového nervu nebo při lokalizaci tvorby NO v hippocampu potkana (Invitrogen, 2013a).

Mezi novější fluorescenční sondy patří FNOCT (Fluorescenční Nitric Oxide Cheletropic Trap), který slouží k detekci NO. FNOCTs jsou pyreny na bázi cyklického o-quinodimethane efektivně reagující s NO. Jako nejcitlivější a nejvhodnější pro biologické systémy se ukázal FNOCT 8a. Dokáže detekovat oxid dusnatý ve velmi malých koncentracích a vykazuje se dlouhodobou stabilitou, dále je vysoce specifický pro NO a nereaguje s jinými reaktivními formami kyslíku a dusíku. Je tedy ideálním fluorochromem pro přímou detekci NO (Vandana a kol., 2012).

Fluorochromů pro detekci NO je však mnohem více. Mimo DAF-FM, DAN a DAA do skupiny fluorochromů pro detekci NO patří i NBD Methylhydrazin (*N*-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan, excitační / emisní maxima $\lambda \sim 468/537$ nm), DAR-4M AM (acetoxymethylester diaminorhodaminu, excitační / emisní maxima $\sim 560/575$ nm), DAMBO-PH (8-(3,4-diaminophenyl)-2,6-bis(2-carboxyethyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetra-methyl-4-bora-

3a,4a-diaza-sindacene, excitační / emisní maxima $\lambda \sim 521/537$ nm) a další jiná (Gomes a kol., 2006).

3.2.1.5. Imunohistochemická lokalizace enzymů zapojených do metabolismu RONS

Imunohistochemie je metoda zkoumající ve vzorku přítomnost určitých antigenů pomocí specifických protilátek. Používané metody se rozdělují na přímé, nepřímé dvoustupňové a nepřímé trojstupňové. Využívají se protilátky monoklonální nebo polyklonální a mohou být značené kovem, enzymem nebo fluorochromem.

Metoda přímá je ze zmíněných metod nejjednodušší, ale není příliš citlivá. Metodu lze použít pro antigeny hojně zastoupené ve vzorku. Značka bývá navázána přímo na primární protilátku. Citlivější metodou je nepřímá dvoustupňová metoda, kdy se v prvním kroku použije neoznačená primární protilátka, která je specifická proti prokazovanému antigenu. Dalším krokem je použití značené sekundární protilátky, která je specifická proti imunoglobulinům zvířete, které bylo původcem primární protilátky. Nepřímé trojstupňové metody se využívá v případech, kdy je množství antigenu ve vzorku příliš nízké. První krok používá specifickou primární protilátku proti studovanému antigenu, v druhém kroku se použije protilátka specifická proti imunoglobulinům zvířete, které bylo dárce primární protilátky a protilátky využívané ve třetí fázi. Ve třetí fázi se nanese značený komplex (například peroxidasa-antiperoxidasový komplex).

Pro detekci GSNO i GSNOR je využívána nepřímá dvoustupňová metoda. V prvním kroku se jako primární protilátka využívá komerční polyklonální krysí protilátka proti GSNO. Fluorescenčně značená sekundární protilátka je komerční králičí protilátka proti imunoglobulinům křesy. Fluorescenční značka se pozoruje při excitační/emisní vlnové délce $\lambda \sim 493/518$ nm.

Pro lokalizaci GSNOR slouží jako primární protilátka v prvním kroku laboratorně připravená polyklonální králičí protilátka proti GSNOR. Fluorescenčně značenou sekundární protilátkou je komerční kozí protilátka proti imunoglobulinům králíka. Fluorescenční značka se pozoruje při excitační/emisní vlnové délce $\lambda \sim 493/518$ nm (Kubienová, 2012).

3.2.2. EPR

Další možnou metodou zkoumání RONS je Elektronová Paramagnetická Resonance (EPR), označována také jako Elektronová Spinová Resonance (ESP), patřící mezi moderní spektroskopické techniky. EPR přímo prokazuje výskyt volných radikálů a jejich identitu. Obecně je tato metoda založena na přechodech mezi energetickými hladinami, které vznikají působením magnetického pole na nepárový elektron (Wertz a kol., 1972). EPR metoda je velice výhodná díky své citlivosti.

Princip metody spočívá v tom, že po vložení radikálu (látky s nepárovým elektronem) do vnějšího magnetického pole dojde k orientaci magnetického momentu elektronu do dvou povolených orientací, které jsou energeticky různé. Po ozáření vhodnou energií lze změřit hodnotu rozdílu mezi oběma spinovými stavy elektronu. Záznamem tohoto měření je pak spektrum EPR. Například NO obsahuje v molekule 11 valenčních elektronů, ale EPR spektrum vzniká u volné molekuly NO pouze za situace, je-li v excitovaném stavu. Pro stanovení NO se využívá metody záchytu spinu, kdy reaguje radikál s diamagnetickou látkou náchylnou k vytvoření komplexu, tak vznikne radikál mající delší biologický poločas a lepší detekovatelnost. NO vytváří tyto komplexy například s přechodnými kovy, thioly nebo s reaktivními formami kyslíku (Kupková a kol., 2004).

3.2.3. Biochemické metody

3.2.3.1. Spektrofotometrie

Spektrofotometrie patří mezi nepřímé metody stanovení NO a jeho metabolitů. Spektrofotometrické stanovení dusitanů pomocí nitrátoreduktasy a Griessova činidla (sulfanilamid) je principem Griessovy metody. Reakcí dusitanů se sulfanilamidem vzniká diazoniová sůl sulfanilamidu, která reakcí s Griessovým činidlem II. (naftylethylendiaminem) dává produkt charakteristického zbarvení, který se stanovuje spektrofotometricky. Stanovení má dvě fáze, v první fázi se ve vzorku stanovuje obsah dusitanů, ve druhé fázi součet dusičnanů a dusitanů. Dusičnany, vzniklé reakcí NO a hemoglobinu, se na dusitany převádějí jednak díky enzymu nitrát reduktase, nebo chemicky na mědi potažených kadmiových kuličkách. Detekce probíhá při $\lambda \sim 540$ nm (Kupková a kol., 2004).

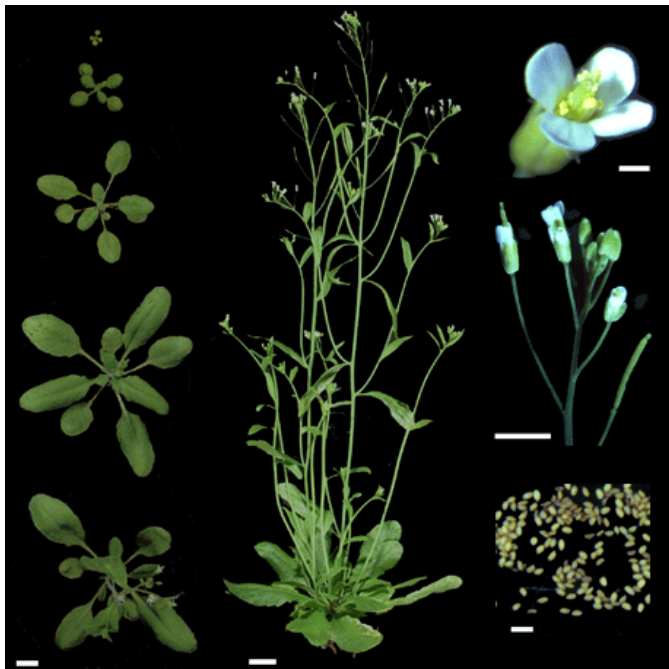
Na rozdíl od EPR metody, je metoda oxidace hemoglobinu založena na rychlé oxidaci redukovaného hemoglobinu (Fe^{2+}) na methemoglobin (Fe^{3+}). Mezi výhody této detekční metody NO patří rychlost, snadné provedení, vysoká citlivost a specifčnost pro NO. Rozdíl mezi oxyhemoglobinem a methemoglobinem se dá zjistit pomocí měření absorbance. Oxyhemoglobin má absorpční maximum při $\lambda \sim 415$ nm a následně dva další užší absorpční pásy při 542 nm a 577 nm, methemoglobin má absorpční maximum při 406 nm. Díky charakteristické změně absorpčního maxima z 415 nm na 406 nm je možné detekovat NO (Vandelle a kol., 2008, Kupková a kol., 2004).

3.3 Charakteristika modelových organismů

Jako modelové organismy pro studium RONS byly vybrány rostliny *Arabidopsis thaliana* L. a tři druhy rodu *Solanum* L.

3.3.1. *Arabidopsis thaliana* L.

Arabidopsis thaliana neboli huseníček rolní (obr. 6) je nízkou bylinou z čeledi *Brassicaceae* (brukvovité). Tato nenápadně vyhlížející rostlina byla poprvé popsána již v 16. století Johannesem Thalem. *A. thaliana* je jednoletá, dvouděložná rostlina s přizemními listy vyrůstajícími v růžici a drobnými bílými květy. Výhodnou vlastností této rostliny je její schopnost samoopylení (autogamie). Její životní cyklus je velmi rychlý (trvá asi 6-8 týdnů), produkuje velké množství semen a snadno ji lze mutovat a transformovat (Gandhi a kol., 2001). K pokusům byla poprvé využita v Německu začátkem 20. století profesorem F. Laibachem, který se snažil prokázat, že huseníček je vhodným genetickým modelovým organismem. V roce 1943 F. Laibach popsal první výsledky studií huseníčku, ve kterých se dokázala jeho krátká generační doba, plodnost, snadnost křížení a možnost mutagenese (Meyerowitz, 2001). Následně byla *A. thaliana* zařazena k modelovým organismům a její význam ve výzkumu je nedocenitelný i nadále. V roce 2000 se *A. thaliana* stala první rostlinou, jejíž genom byl kompletně osekventován (5 chromozomů, 25 500 genů).



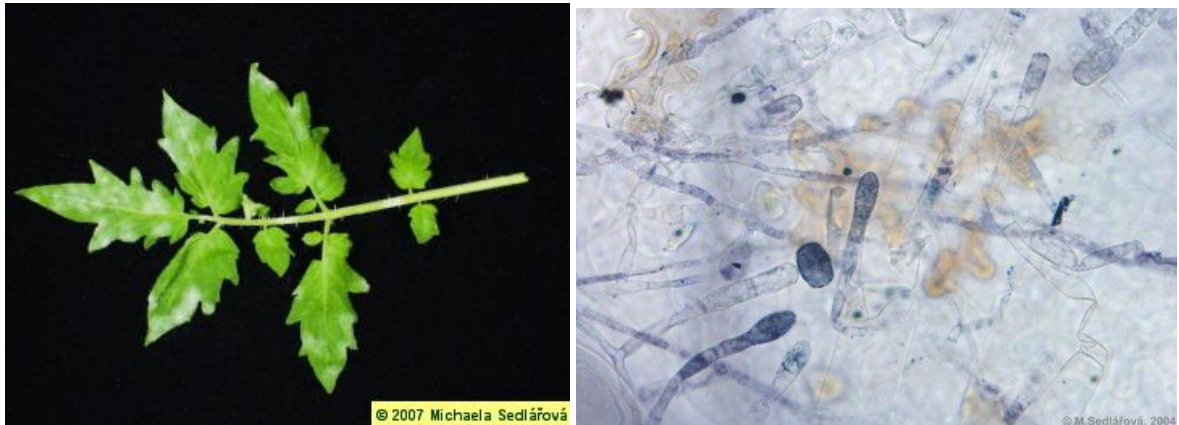
Obr. 6 : Morfologie listů, květů a semen *Arabidopsis thaliana* (převzato z: www.tumblr.com)

3.3.2. *Solanum lycopersicum* L.

Solanum lycopersicum neboli rajče jedlé (obr č. 7) je vytrvalá bylina z čeledi *Solanaceae* (lilkovité). Rostlina má 1-3 metry dlouhý stonek, bývá pěstována jako jednoletka. Stonky jsou posety žláznatými trichomy, listy jsou lichozpeřené s pilovitým okrajem. Květy mají 5 korunních plátků, plodem je bobule. Původ má tato bylina v Peru, do Evropy byla rozšířena začátkem 16. století. V Evropě se pěstování této rostliny velmi rozšířilo a začala probíhat domestikace, zejména z důvodu vyřazení linií, které produkují zvýšené množství solaninu, toxického alkaloidu. Tak bylo postupně vyšlechtěno široké spektrum odrůd rajčat (Allen, 2008). Rod *Solanum* dnes zahrnuje zhruba 1500-2000 druhů. Dosud bylo popsáno velké množství chorob rajčat, velký dopad má například padlí rajčatové, způsobené *Oidium neolycopersici* (obr č. 8). Padlí rajčatové je jedním z nejzhoubnějších chorob rajčat pěstovaných zejména ve sklenících. Zjistilo se, že některé plané druhy rajčete jsou v jisté míře odolné vůči této chorobě (např. *S. habrochaites*, *S. chilense*, *S. parviflorum*, *S. peruvianum* a *S. pennellii*) (Mieslerová a kol., 2004). Jedním z planých druhů s vysokou mírou rezistence vůči padlí je *Solanum habrochaites* Knapp a Spooner syn. *Lycopersicon hirsutum* Dunal. Molekulárně-biologické analýzy dokázaly, že tato rostlina je možným zdrojem genů pro šlechtění rajčete jedlého (Mieslerová a kol., 2004; Mlíčková a kol., 2004).



Obr. 7: Morfologie listů, květů, plodů a semen rostliny *Solanum lycopersicum* L. (převzato z: www.rajcatko.webnode.cz)



Obr. 8 : Makroskopické příznaky padlí na listech rajčat, mycelium a konidiofory *Oidium neolycopersici* (převzato z: <http://old.botany.upol.cz/atlas/system/uvod.php>)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál a metody

4.1.1. Rostlinný materiál

4.1.1.1. *Arabidopsis thaliana* L.

Experiment se prováděl na rostlinách *Arabidopsis thaliana* L. ekotyp Columbia a na mutantech DnaJ, jenž se vyznačují tím, že postrádají molekulární chaperony DnaJ proteiny DnaJ8, DnaJ11 a DnaJ20. U *Arabidopsis thaliana* jsou DnaJ proteiny lokalizované zejména v chloroplastech. DnaJ proteiny se účastní mnoha metabolických procesů, například se podílejí na optimalizaci různých fotosyntetických procesů. Mutantní rostliny nevykazují významně odlišné fenotypy jako kontrola (ekotyp Columbia). Bylo dokázáno, že nedostatek jednoho z těchto proteinů spouští globální stresové reakce a poskytuje rostlinám větší toleranci k oxidačnímu stresu vyvolanému vysokým ozářením (Chen a kol., 2010). Rostliny byly pěstovány v květináčcích naplněných zeminou po 7-8 týdnů, byly vystaveny 16 hod světlu a 8 hod byly ponechány ve tmě, teplota ve dne dosahovala 25 °C, v noci 20 °C. Starší listy byly použity pro experimenty.

4.1.1.2. *Solanum lycopersicum* L.

Experiment se prováděl na rostlinách rodu *Solanum* L., konkrétně na třech genotypech lišících se mírou rezistence vůči padlí. *S. lycopersicum* cv. Amateur je citlivý k padlí, *S. habrochaites* f. *glabratum* prokazuje vysokou rezistenci a *S. chmielewskii* je středně rezistentní (Mieslerová a Lebeda, 2004). Semena byla zprvu vyseta na navlhčený perlit (Agroperlite, Nový Jičín, Česká republika) a později byly semenáčky přesazeny do plastových květináčů (7 cm v průměru) se směsí zahradní půdy a rašeliny v poměru 2:1 (v/v). Rostliny byly pěstovány v růstové komoře 12 hodin světlo/12 hodin tma s intenzitou osvětlení 100 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ při teplotách 20/18°C. Na experiment se využívaly listy rostlin přibližně 10 týdnů starých.

4.1.2. Aplikace stresu

4.1.2.1. Aplikace stresu u *Arabidopsis thaliana*

Rostliny *Arabidopsis thaliana* byly vystaveny intenzivnímu osvětlení. Listy byly ozařovány 1000 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ po dobu 6-7 hodin.

4.1.2.2. Aplikace stresu u *Solanum lycopersicum*

Rostliny *Solanum lycopersicum* byly naočkovány konidii padlí rajčatového *Oidium neolyopersici* rasa CS2 (ze sbírky UPOC udržované na Katedře botaniky PřF UP v Olomouci) formou otisku z listu se sporulujícím myceliem tohoto patogenu.

4.1.3. Lokalizace RONS

Lokalizace RONS byla studována v listech rostlin huseníčku a rajčete. Čepel listu mimo hlavní žilky byla rozřezána na malé kousky (2x2 mm), které byly barveny roztoky fluorochromů na podložním skle při pokojové teplotě ve tmě. Po uběhnutí časového limitu inkubace byly vzorky promyty fosfátovým pufrům (pH 7.2) a překryty krycím sklem. Následně byly preparáty pozorovány konfokálním laserovým rastrovacím mikroskopem. Pro detekci jednotlivých RONS byly používány různé fluorochromy a časy barvení, což znázorňuje tabulka V.

Tabulka V : Použité fluorochromy a časy barvení pro lokalizaci RONS.

Název fluorochromu	Doba barvení	Koncentrace (μM)	Zdroj
DAF-FM DA 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát	25 minut	20	http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/reports/els_4d166d7773.pdf
H2DCF DA 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát	15 minut	10	(http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/reports/els_452e8a317d.pdf)
SOSG Singlet Oxygen Sensor Green®	30 minut	50	(http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp36002.pdf)

Lokalizace molekul RONS byla zobrazena konfokálním laserovým rastrovacím mikroskopem Olympus FluoView 1000 (konfokální jednotka kombinovaná s invertovaným mikroskopem IX 81). Pro pozorování preparátů byl použit Normanského kontrast (DIC) a fluorescence (buzení 100W Hg výbojkou). K detekci signálu výše zmíněných fluorochromů byla použita vlnová délka 488nm excitačního argonového laseru (457nm, 488 nm, 515 nm) s celkovým výkonem 30 mW a také laser diodový (blízký UV 405 nm) s celkovým výkonem 20 mW. Detekce signálu probíhala v rozmezí vlnových délek emise 505-525nm. Pro následné zobrazování a snímání preparátů byl užit počítačový software FV10-ASW Viever (Olympus, Japonsko). K úpravám fotografií, detailnějšímu zobrazení lokalizace signálu a rekonstrukci „2.5D“ modelů ze série optických řezů preparátem byl využit počítačový software LCS Imaris 7.3. (Bitplane, Švýcarsko).

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Lokalizace RONS u *Arabidopsis thaliana* po vystavení intenzivnímu světlu

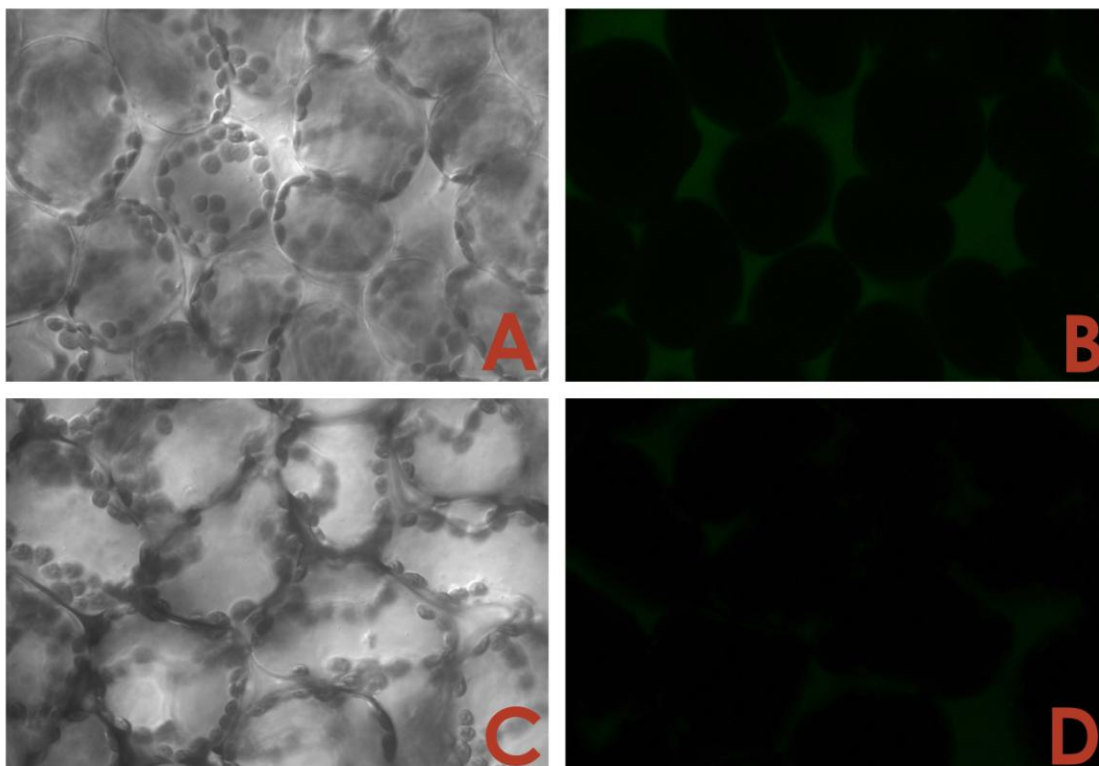
Pro lokalizaci RONS byly listy *Arabidopsis thaliana* barveny po 7 hodinách osvětlení fluorescenčními barvivy SOSG, H2DCF DA, DAF-FM DA a následně zobrazovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Experimenty byly provedeny za stejných podmínek (od pěstování rostlin, přes aplikaci stresu, po barvení RONS a zobrazení pomocí CLSM) ve čtyřech opakováních, uvedená data reprezentují jeden experiment.

5.1.1. Detekce singletního kyslíku

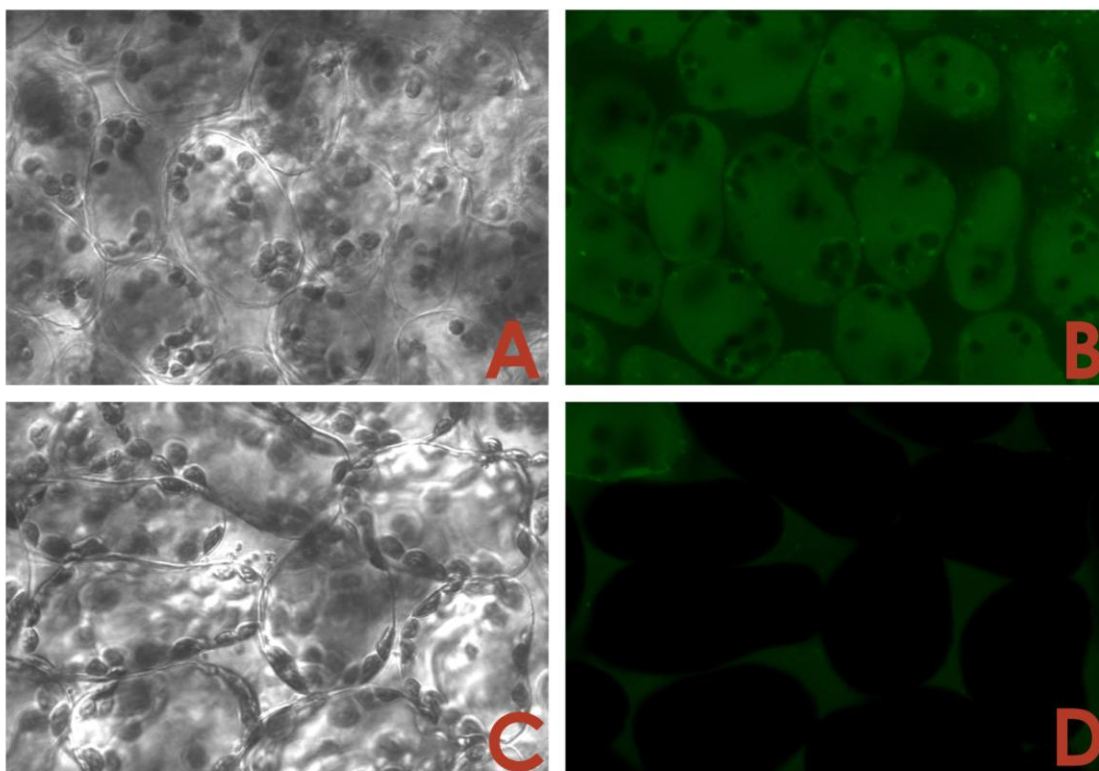
Pro detekci singletního kyslíku byla využita jako kontrola rostlina *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (WT) a dále DnaJ mutantní rostliny *j8*, *j11*, *j20*. Byly barveny fluorochromem SOSG a následně porovnávány listy rostlin vystavených intenzivnímu světlu ($1000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ po dobu 7 hodin) s listy rostlin, které byly ponechány ve tmě. U rostlin, které nebyly osvětleny, byl signál přítomen v mezibuněčných prostorech, u kontroly byl jen velmi slabý signál v chloroplastech. U rostlin, které byly vystaveny stresu, byl signál většinou v mezibuněčných prostorech. V tabulce VI je lokalizovaný signál u jednotlivých rostlin.

Tabulka VI.: Lokalizace signálu singletního kyslíku u kontrolních a mutantních rostlin huseníčku.

Rostlina		Lokalizace signálu
WT	tma	mezibuněčné prostory
	7 h světlo	mezibuněčné prostory
DnaJ <i>j8</i>	tma	mezibuněčné prostory a buňky
	7 h světlo	v některých buňkách, mezibuněčné prostory - převažuje
DnaJ <i>j11</i>	tma	některé buňky, mezibuněčné prostory
	7 h světlo	chloroplasty, mezibuněčné prostory
DnaJ <i>j20</i>	tma	v cytosolu buňky
	7 h světlo	mezibuněčné prostory



Obr. 9: Lokalizace singletního kyslíku u *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (WT) ve tmě (A,B) a po 7h ozáření (C,D) fotoinhibičním světlem ($1000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Obrázky A,C jsou snímky z viditelného kanálu konfokálního mikroskopu, snímky B,D zachycují fluorescenční signál Singlet Oxygen Sensor Green® (SOSG).



Obr. 10: Lokalizace singletního kyslíku u *A. thaliana* DnaJ j20 ve tmě (A,B) a po 7h osvětlení (C,D) Obrázky A,C - viditelný kanál CLSM, snímky B,D fluorescenční signál SOSG.

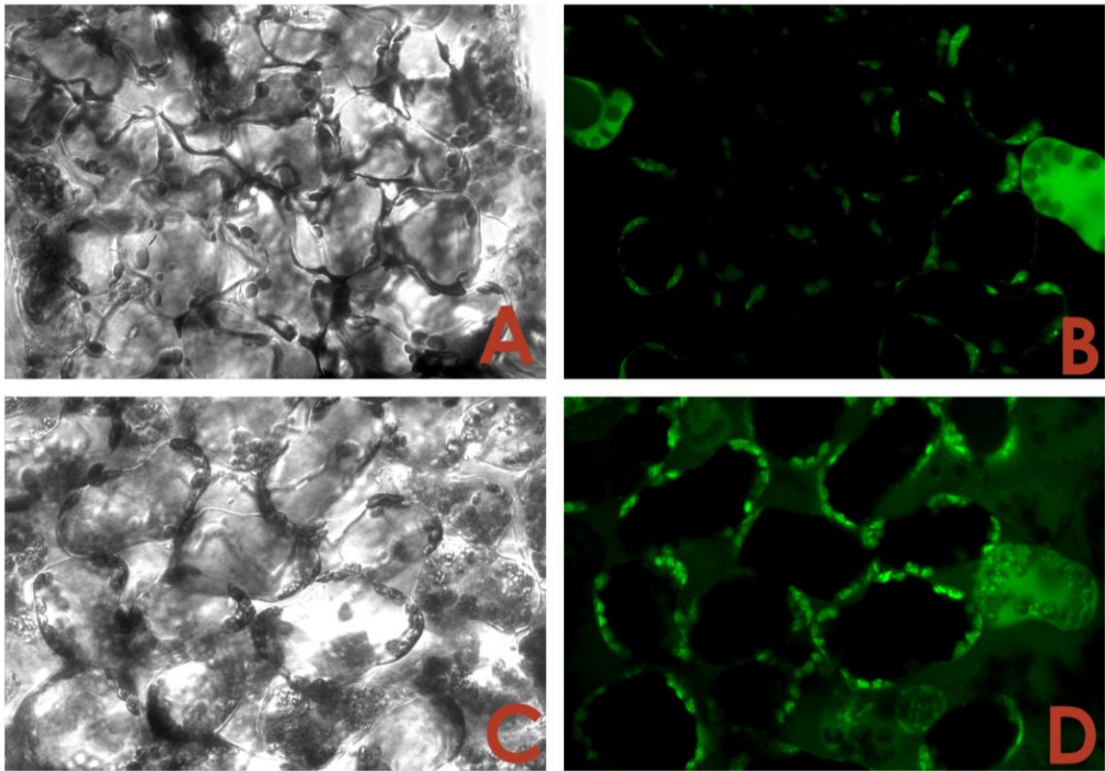
Přítomnost singletního kyslíku byla dosud studována zejména u sinic a řas. Sinha a kol. (2011) prováděl experimenty u sinic *Synechocystis* sp, po intenzivním osvětlení došlo k poškození a generování singletního kyslíku u malých proteinů ve fotosystému II. Singletní kyslík aktivuje jedoelektronová redukce vedoucí k tvorbě superoxidového anion-radikálu, který spouští sled reakcí, jejichž výsledkem je vznik peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu. Vzniklý singletní kyslík a hydroxylový radikál mohou reagovat s aminokyselinami a mastnými kyselinami, což vede k peroxidaci lipidů a oxidačnímu poškození proteinů. Zvýšená produkce singletního kyslíku je detekována fluorescenční sondou SOSG a vyhodnocena konfokální laserovou skenovací mikroskopií a elektronovou paramagnetickou rezonancí (Sinha a kol., 2011). Že je singletní kyslík produkován ve fotosyntetických organismech vystavených intenzivnímu osvětlení zjistil i Fischer a kol. (2007), který ve svých experimentech objasnil roli singletního kyslíku jako stimulatoru jaderného kódovaného genu GPXH za aktivace signálního mechanismu mimo membránu tylakoidů u *Chlamydomonas reinhardtii*. Bylo prokázáno, že singletní kyslík souvisí s aktivací genové exprese i u *Arabidopsis thaliana* (Fischer a kol., 2007). V poslední době byly provedeny experimenty, které ukazují, že zvýšenou fluorescenci SOSG může ovlivňovat i tvorba singletního kyslíku při osvětlení samotné sondy bílým světlem, takže je nezbytně nutné použití kontrolních měření (Hakala-Yatkin a kol., 2011). Funkce DnaJ proteinů u *Arabidopsis thaliana* se zdají být částečně redundantní, ale je zřejmé, že pro každou bílkovinu (AtJ8, AtJ11 i AtJ20) existují i specifické funkce. Vyřazení AtJ8 proteinu mělo nižší vliv na fotosyntetické parametry než vyřazení proteinu AtJ11 nebo AtJ20. Nicméně se tyto proteiny podílejí na optimalizaci fixace CO₂, na stabilizaci komplexů fotosystému II (Chen a kol., 2010).

5.1.2. Detekce peroxidu vodíku a jiných ROS

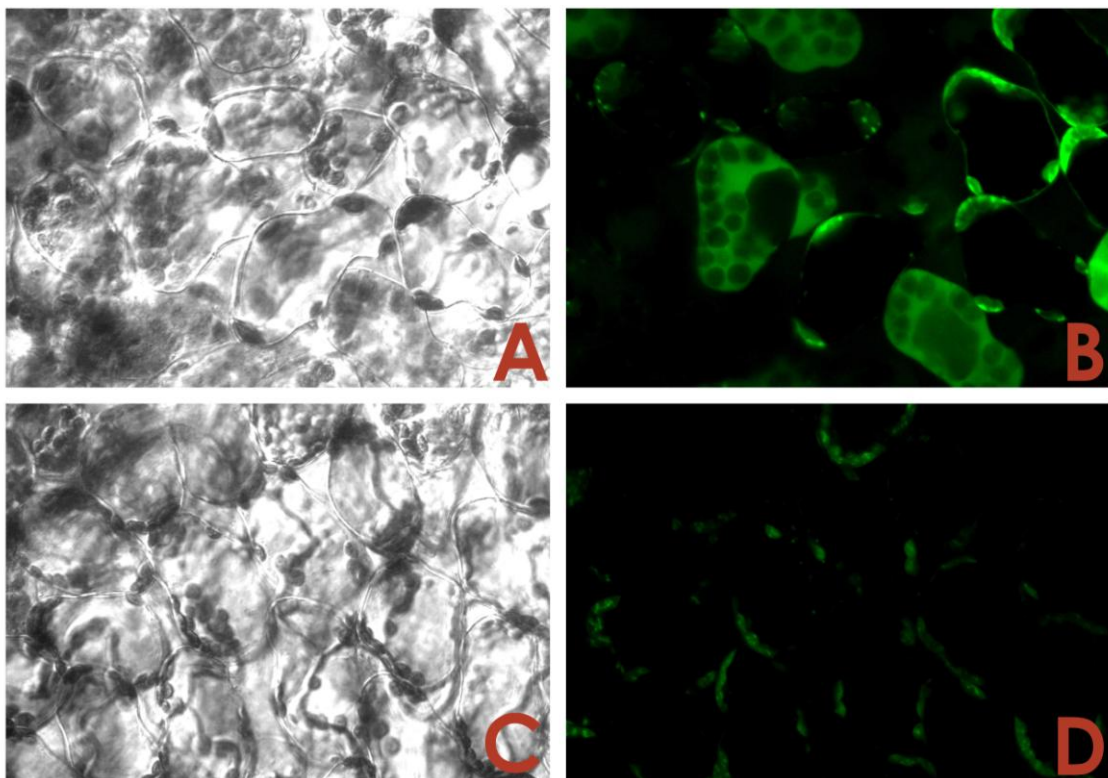
Pro detekci peroxidu vodíku (H₂O₂) a jiných reaktivních forem kyslíku byla využita jako kontrola rostlina *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (WT) a dále DnaJ mutantní rostliny *j8*, *j11*, *j20*. Byly barveny fluorochromem H2DCF DA a následně porovnávány listy rostlin vystavených intenzivnímu světlu (1000 μmol fotonů m⁻²s⁻¹ po dobu 7 hodin) s listy rostlin, které byly ponechány ve tmě. U kontroly (obr. č. 11) byl signál lokalizován v chloroplastech, po ozáření byl signál intenzivnější a objevoval se i v mezibuněčných prostorech. U mutantní rostliny DnaJ *j20* (obr. č. 12) byl signál u neosvětlené rostliny lokalizován v cytosolu, po ozáření se signál objevoval zejména v chloroplastech. Lokalizaci fluorescenčního signálu u všech použitých rostlin zobrazuje tabulka VII.

Tabulka VII: Lokalizace signálu peroxidu vodíku a jiných ROS u kontrolních a mutantních rostlin huseníčku.

Rostlina		Lokalizace signálu
WT	tma	bez signálu
	7 h světlo	chloroplasty
DnaJ <i>j8</i>	tma	chloroplasty – slabý signál
	7 h světlo	chloroplasty
DnaJ <i>j11</i>	tma	chloroplasty – slabý signál
	7 h světlo	chloroplasty
DnaJ <i>j20</i>	tma	v cytosolu buňky
	7 h světlo	chloroplasty



Obr. 11: Lokalizace peroxidu vodíku a ROS u *A. thaliana* ekotyp Columbia (WT) ve tmě (A,B) a po 7h ozáření (C,D) fotoinhibičním světlem ($1000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Obrázky A,C jsou snímky z viditelného kanálu konfokálního mikroskopu, snímky B,D zachycují fluorescenční signál po barvení fluorochromem 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H2DCF DA).



Obr. 12: Lokalizace peroxidu vodíku a ROS na *Arabidopsis thaliana* DnaJ *j20* ve tmě (A,B) a po 7h osvětlení (C,D). Snímky A,C - viditelný kanál CLSM, snímky B,D fluorescenční signál po barvení H2DCF DA.

Role a funkce peroxidu vodíku v rostlinné fyziologii byla popsána již v mnoha odborných člancích v souvislosti s biotickými či abiotickými stresory. Bylo prokázáno, že se při stresu rostlin zvyšuje produkce peroxidu vodíku a dalších ROS, v závislosti na typu, délce působení a intenzitě faktoru. Např. při stresu intenzivním světlem vzniká nadprodukce H_2O_2 hlavně v chloroplastech. Yokawa a kol. (2011) testoval vliv osvětlení na kořenech rostliny *Arabidopsis thaliana*. Kořeny rostliny byly pěstovány ve světle v průhledných Petriho miskách. Následně byla provedena analýza pomocí fluorescenční sondy 2', 7'-dichlorodihydrofluoresceinu diacetátu (H2DCF DA) a konfokální mikroskopie. Bylo prokázáno, že jen krátkodobé osvětlení stačí k okamžité a vysoké produkci reaktivních forem kyslíku (Yokawa a kol., 2011).

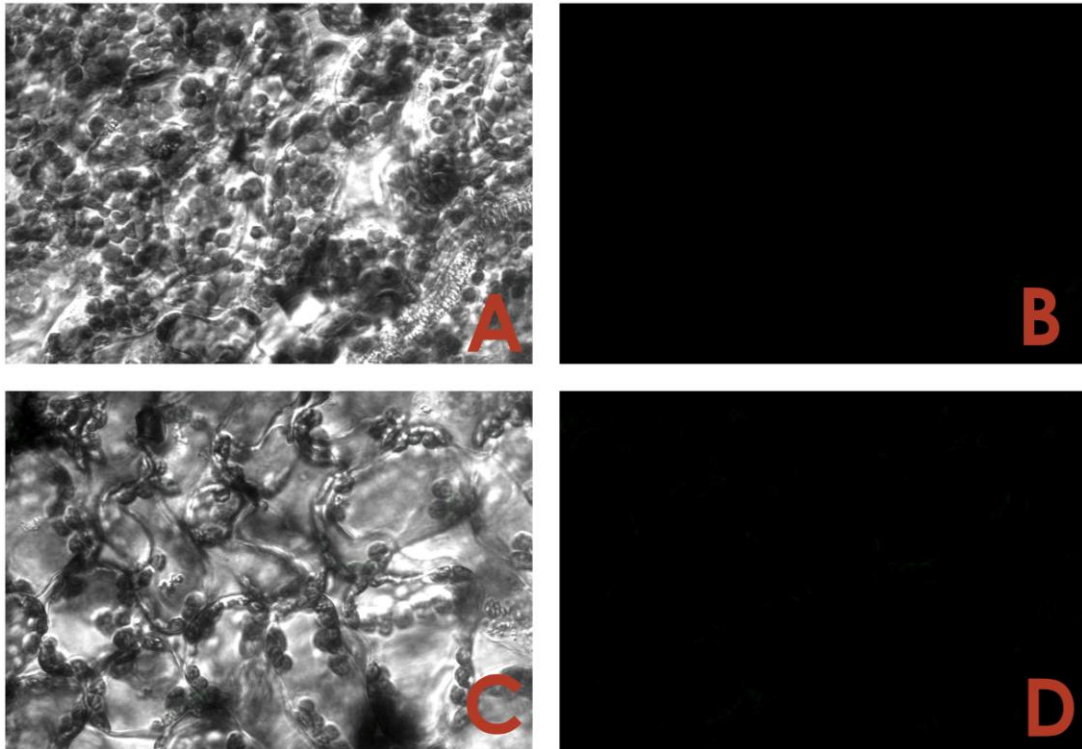
Bi a kol. (2009) se ve své studii zabýval jiným abiotickým stresem. Zkoumal, jaký vliv mají účinky Cd na morfologii a funkci chloroplastů a mitochondrií, a na produkci a lokalizaci ROS u rostlin *Arabidopsis thaliana*. Kadmium (Cd) je vysoce toxický těžký kov, který způsobuje změny v metabolismu rostlin prostřednictvím inhibice fotosyntézy a dýchání. Studie ukázala, že se po ošetření Cd změnila morfologie chloroplastů a tím klesla i fotochemická účinnost, navíc nastala vysoká produkce ROS. ROS byly detekovány pomocí fluorochromu 2', 7'-dichlorodihydrofluoresceinu diacetátu (H2DCF DA) a laserové skenovací konfokální mikroskopie. ROS se objevily nejprve v mitochondriích a následně i v chloroplastech. Po přidání kyseliny askorbové nebo katalasy produkce ROS klesla, což vedlo k zabránění inhibice fotosyntézy, změně organel a následnému odumření protoplastů. Výsledky studie naznačují, že distribuce a mobilita mitochondrií, morfologie chloroplastů a hromadění ROS hrají důležitou roli např. v kadmii indukované buněčné smrti (Bi a kol., 2009). Reaktivní formy kyslíku dále vznikají jako reakce rostliny na působení patogenu. Egan a kol. (2008) studoval ROS v pletivech listů rýže *Oryza sativa* po inokulaci *Magnaporthe grisea*. Listy byly barveny 10 μ M H2DCF DA, nejvyšší signál byl lokalizovaný v cytoplazmě konidií a v buněčné stěně. ROS byly lokalizovány mezi 4 a 8 hodinou po inokulaci v klíčících vláknech (Egan a kol., 2008). Další ze studovaných rostlin byla *Lactuca* spp. infikovaná *Bremia lactucae*. Peroxid vodíku byl v infikovaných buňkách detekován pomocí DAB 96 hodin po inokulaci. V napadených listech byla přítomnost peroxidu vodíku patrná podél xylémových cév. V rostlinných pletivech byl peroxid vodíku přítomen v epidermálních buňkách v místě penetrace, v okolí místa infekce a v mezofylu buněk. U *L. sativa* byla intenzita H_2O_2 nízká, u *L. saligna* byla patrna odezva H_2O_2 6 - 12 hodin po inokulaci, nejintenzivnější odezva však byla pozorována 30 – 36 hodin po inokulaci, 48 hodin po inokulaci došlo k mírné odezvě signálu (Sedlářová a kol., 2007).

5.1.3. Detekce oxidu dusnatého

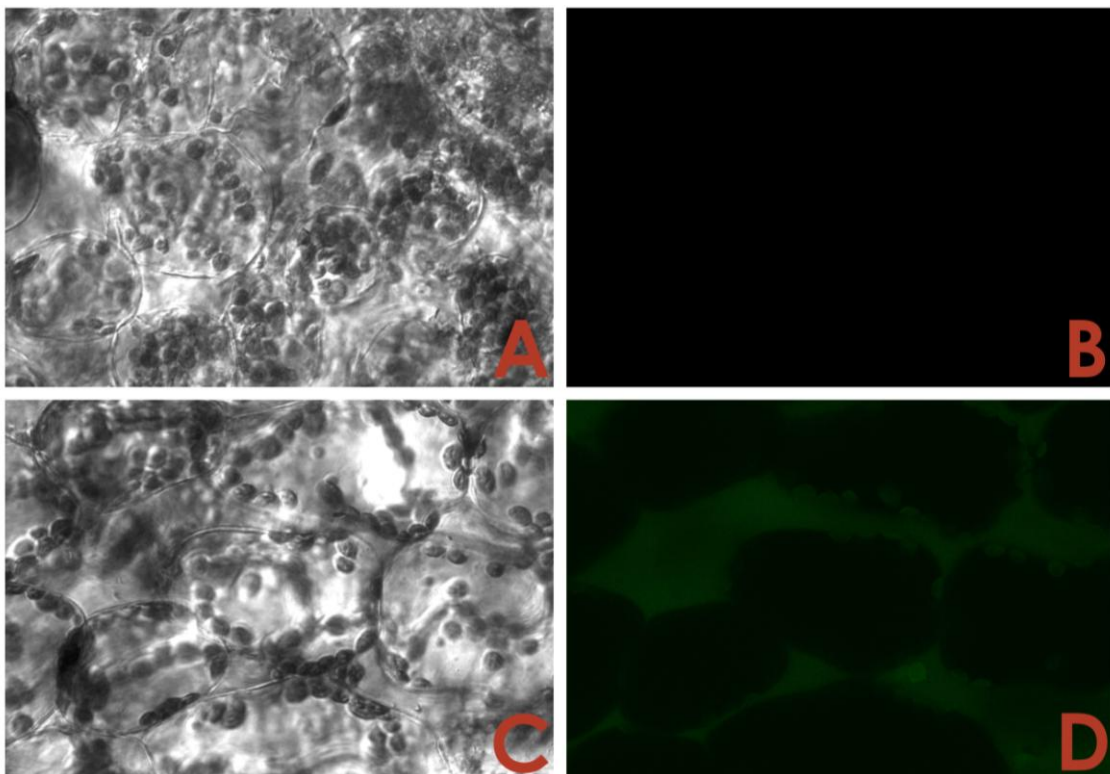
Pro detekci oxidu dusnatého (NO) byla využita jako kontrola rostlina *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (WT) a dále DnaJ mutantní rostliny *j8*, *j11*, *j20*. Pletiva listů byla barvena fluorochromem DAF-FM DA a následně porovnávány listy rostlin vystavených intenzivnímu světlu ($1000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ po dobu 7 hodin) s listy rostlin, které byly ponechány ve tmě. Slabý signál se objevil jak u kontroly (obr. č. 13), tak u DnaJ *j20* (obr. č. 14) u rostlin vystavených osvětlení v chloroplastech, u mutantní rostliny DnaJ *j20* v chloroplastech společně s mezibuněčnými prostory. Lokalizaci fluorescenčního signálu u všech použitých rostlin zobrazuje tabulka VIII.

Tabulka VIII : Lokalizace oxidu dusnatého u kontrolních a mutantních rostlin huseníčku.

Genotyp <i>A. thaliana</i>		Lokalizace signálu
WT	tma	bez signálu
	7 h světlo	chloroplasty – velmi slabý signál
DnaJ <i>j8</i>	tma	chloroplasty
	7 h světlo	bez signálu
DnaJ <i>j11</i>	tma	bez signálu
	7 h světlo	chloroplasty
DnaJ <i>j20</i>	tma	bez signálu
	7 h světlo	chloroplasty, chloroplasty a mezibuněčné prostory



Obr. 13: Lokalizace oxidu dusnatého u *A. thaliana* ekotyp Columbia (WT) ve tmě (A,B) a po 7h ozáření (C,D) fotoinhibičním světlem ($1000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Obrázky A,C jsou snímky z viditelného kanálu konfokálního mikroskopu, snímky B,D zachycují fluorescenční signál po barvení fluorochromem 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetátem (DAF-FM DA).



Obr. 14: Lokalizace NO u *A. thaliana* DnaJ *j20* ve tmě (A,B) a po 7h osvětlení (C,D). Snímky A,C - viditelný kanál CLSM, snímky B,D fluorescenční signál po barvení DAF-FM DA.

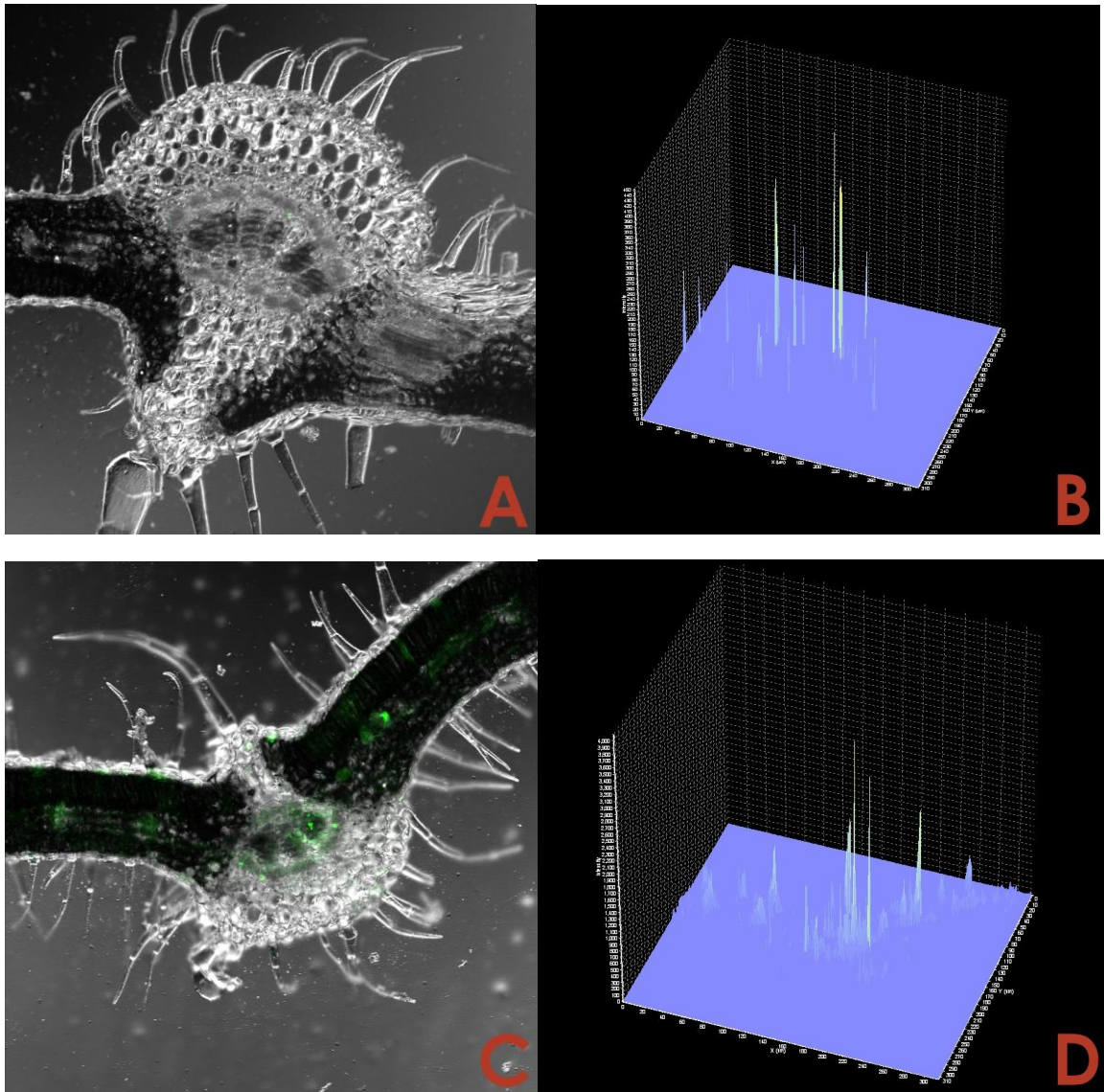
Oxid dusnatý (NO) je klíčovou signální molekulou v různých fyziologických procesech zvířat a rostlin. Metabolismus endogenního NO a dalších reaktivních forem dusíku (RNS) v rostlinách při abiotickém stresu je zatím prozkoumán jen málo. Byly použity rostliny hrachu a vystavily se různým abiotickým stresovým podmínkám (vysoká intenzita světla, nízké a vysoké teploty, nepřetržité působení světla, mechanické zraňování). Lokalizace NO a RNS byla provedena pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie. Listy hrachu byly nabarveny 10 μ M fluorescenční sondou 4-aminomethyl-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA). Fluorescenční signál odpovídající NO byl lokalizován hlavně v cévní tkáni a epidermálních buňkách. NO byl dále pozorovaný u rostlin hrachu, které byly vystaveny různým abiotickým stresorům. Zvýšený signál NO se vyskytoval u rostliny vystavené nízké teplotě, signál byl přítomen téměř ve všech typech buněk (epidermis, hlavní žíly, palisádový mezofyl, houbový mezofyl). Značný nárůst signálu byl i u mechanicky poškozených rostlin (cévní tkáň). Naopak při stresu z vysokých teplot, nepřetržitého osvětlení, ponechání v temnotě byl signál NO snížen. Při stresu z vysoké intenzity světla byl signál srovnatelný s kontrolou (Corpas, 2008).

5.2. Lokalizace RNS u *Solanum* spp. po inokulaci padlím rajčatovým

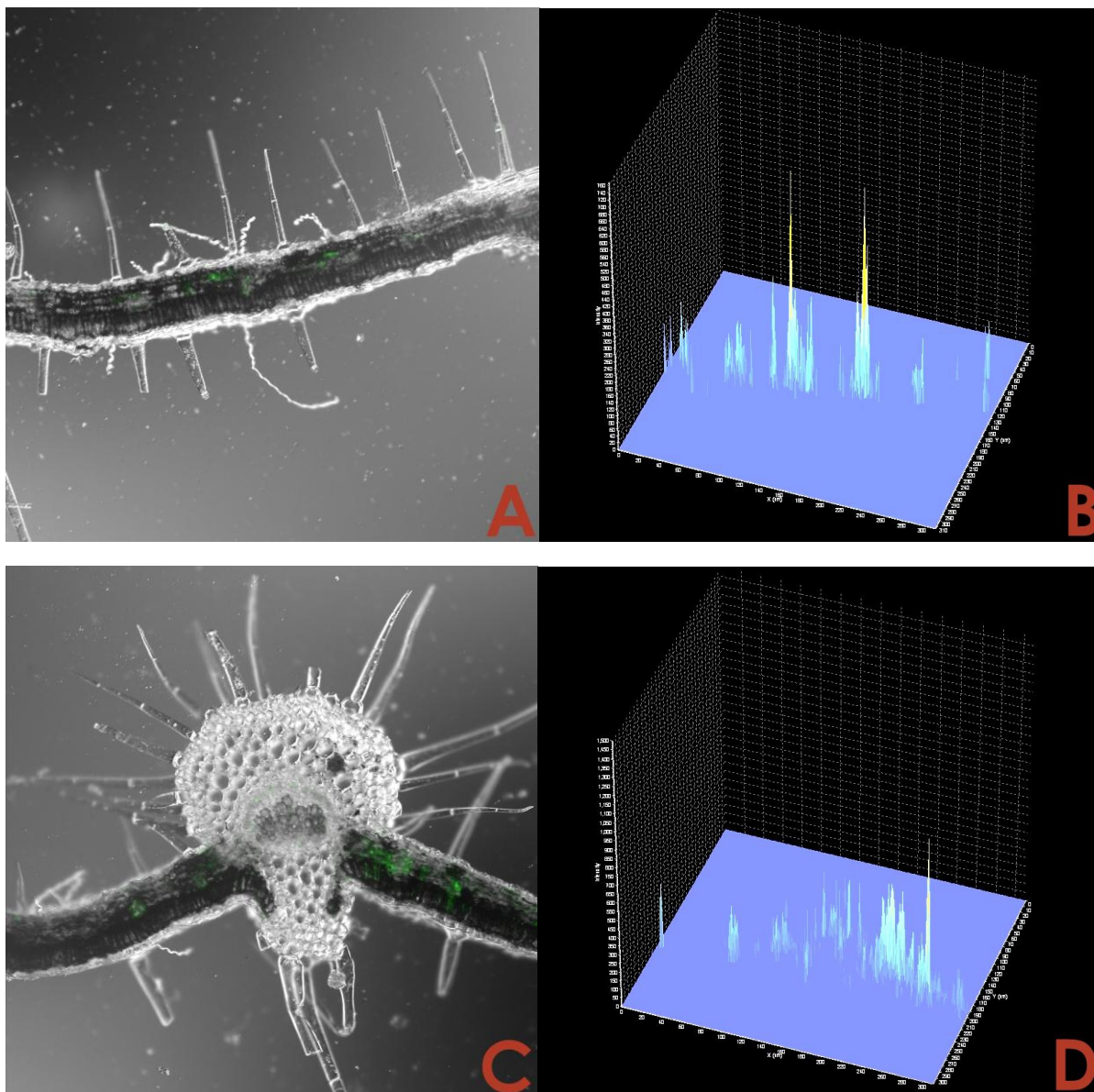
Pro lokalizaci RNS byly listy rajčat barveny fluorescenční sondou DAF-FM DA a následně zobrazovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií.

Pro detekci oxidu dusnatého (NO) a dalších reaktivních forem dusíku byl použit *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* f. *glabratum* (dříve používaný název *S. hirsutum*). Byly barveny po dobu 30 minut fluorochromem DAF-FM DA a následně porovnávány listy rostlin napadených padlím rajčatovým s listy zdravých rostlin.

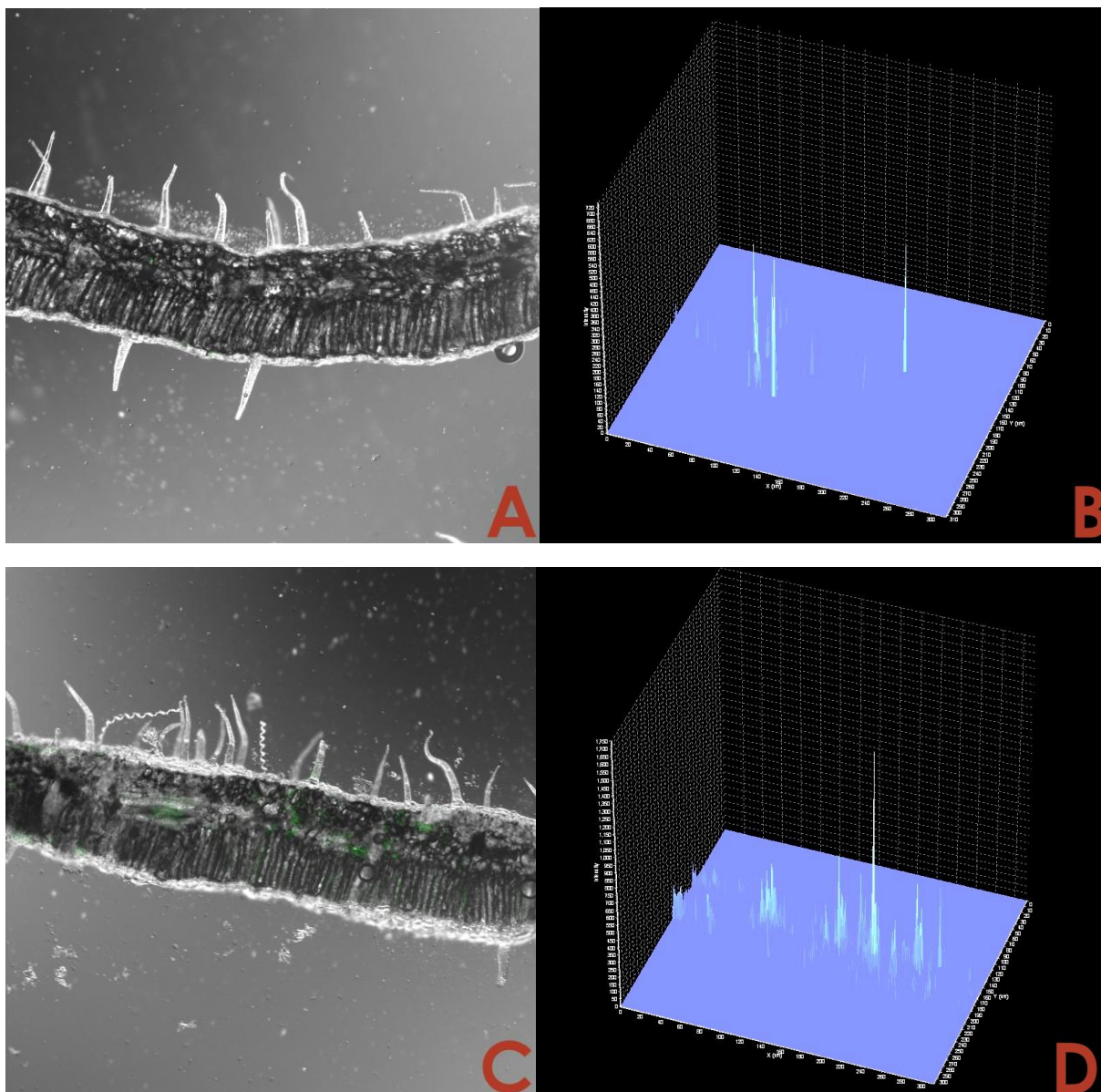
Nejintenzivnější fluorescenční signál, odpovídající tvorbě NO, byl detekován u genotypu rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur, který je citlivý k infekci *Oidium neolycopersici*. Signál se nacházel v oblasti floému, xylému, palisádového a houbového mezofylu. U ostatních druhů *S. habrochaites* f. *glabratum* a *S. chmielewskii* byl signál u infikovaných rajčat intenzivnější ve srovnání s kontrolou, signál NO nacházel v mezofylu.



Obr. 15: Lokalizace fluorescenčního signálu detekujícího oxid dusnatý v cévních svazcích rajčete (snímky A,C). Fotografie A a B znázorňují řez listem kontrolní rostliny *S. lycopersicum* cv. Amateur (bez infekce padlím). Fotografie C a D znázorňují rostlinu *S. lycopersicum* cv. Amateur infikovanou padlím rajčatovým *Oidium neolycopersici*. Snímky B, D ukazují 3D rozložení intenzity fluorescenčního signálu v příslušné fotografii (A,C).



Obr. 16: Lokalizace fluorescenčního signálu detekujícího oxid dusnatý v cévních svazcích rajčete (snímky A,C). Fotografie A a B znázorňují řez listem kontrolní rostliny *S. habrochaites* f. *glabratum* (bez infekce padlím). Fotografie C a D znázorňují rostlinu *S. habrochaites* f. *glabratum* infikovanou padlím rajčatovým *Oidium neolycopersici*. Snímky B,D ukazují 3D rozložení intenzity fluorescenčního signálu v příslušné fotografii (A,C).



Obr. 17: Lokalizace fluorescenčního signálu detekujícího oxid dusnatý v cévních svazcích rajčete (snímky A,C). Fotografie A a B znázorňují řez listem kontrolní rostliny *S. chmielewskii* (bez infekce padlím). Fotografie C a D znázorňují rostlinu *S. chmielewskii* infikovanou padlím rajčatovým *Oidium neolycopersici*. Snímky B, D ukazují 3D rozložení intenzity fluorescenčního signálu v příslušné fotografii (A,C).

Piterková a kol. (2009) barvila spory padlí *Oidium neolycopersici* u *Solanum esculentum* cv. Amateur a *S. chmielewskii*. Pro barvení se používal fluorochrom DAF-FM DA, barvení bylo prováděno v časovém intervalu 8 – 216 hodin po inokulaci. Po 8 hodinové inokulaci nebyl detekován žádný signál. U spor, které byly barveny 20 μ M DAF-FM DA byl zaznamenán fluorescenční signál v konidiích, klíčících vláknech a apresoriích. Po 168 a 216 hodinnách se provádělo barvení 10 μ M DAF-FM DA, lokalizace NO signálu se od předchozího nelišila. U *Solanum esculentum* cv. Amateur byl NO lokalizován ve špičkách hyf a v haustoriích, v případě *S. chmielewskii* byl signál NO lokalizován v epidermálních buňkách, které byly v blízkosti infikovaného místa (Piterková a kol., 2009).

V následující práci (Piterková a kol., 2011) byly použity tři genotypy rajčete s různou rezistencí vůči padlí, *S. lycopersicum* (citlivé), *S. chmielewskii* (středně rezistentní) a *S. habrochaites* f. *glabratum* (vysoce odolný genotyp). Barvení listových disků bylo prováděno 24, 48 a 72 hodin po inokulaci *Oidium neolycopersici* 10 μ M DAF-FM DA (4-amino-5-(N-methylamino)-2',7'-difluorofluorescein diacetát) po dobu 30 minut. Připravené nabarvené preparáty byly pozorovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií. NO signál byl zjištěn v konidiích *Oidium neolycopersici*, klíčících vláknech a apresoriích na listových discích všech genotypů *Solanum* ssp. při 24 a 48 hodinách po inokulaci. Přítomnost NO byla patrná 72 hodin po inokulaci u *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* f. *glabratum* (Piterková a kol., 2011).

NO byl detekován i v dalších rostlinách napadených patogeny, např. v pletivech *Lactuca* spp. inokulovaných plísní salátovou *Bremia lactucae*. Při pokusu byl používán 20 μ M fluorochrom DAF-FM DA a konfokální laserová skenovací mikroskopie. Signál byl patrný u všech pozorovaných genotypů lišících se v rozvoji patogenu. Nejvýraznější fluorescenční signál byl zaznamenán 24 hodin po inokulaci v klíčících vláknech a apresoriích (Sedlářová a kol., 2011).

6. ZÁVĚR

Konfokální laserovou skenovací mikroskopií byly v rostlinách vystavených stresovým faktorům lokalizovány molekuly RONS a porovnána intenzita jejich tvorby, konkrétně u rostlin *Arabidopsis thaliana* L. (ekotyp Columbia a mutantní rostliny DnaJ) vystavených intenzivnímu osvětlení ($1000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ po dobu 6-7 hodin) a u *Solanum* spp. (genotypy lišící se mírou rezistence vůči padlí) po inokulaci *Oidium neolycopersici*. Listy těchto rostlin byly barveny fluorochromy pro detekci singletního kyslíku, reaktivních forem dusíku a reaktivních forem kyslíku.

U mutantů DnaJ *A. thaliana* byly získány výsledky o rozsahu oxidačního stresu v listech po osvětlení fotoinhibičním světlem. Singletní kyslík byl detekován v listech *A. thaliana* pomocí fluorochromu SOSG. U kontrolních rostlin byl fluorescenční signál ukazující výskyt singletního kyslíku detekován v mezibuněčných prostorech jak u rostliny vystavené osvětlení, tak u kontroly ve tmě. U mutantních rostlin DnaJ byl lokalizovaný signál v mezibuněčných prostorech a některých buňkách u rostlin vyskytujících se ve tmě, u osvětlených rostlin byl signál lokalizován hlavně v mezibuněčných prostorech. Peroxid vodíku byl detekován pomocí fluorochromu H₂DCF-DA. U všech rostlin, jež byly ponechány ve tmě, se fluorescenční signál nacházel v chloroplastech, jedinou výjimkou byla mutantní rostlina DnaJ *j20* u níž byl signál v cytosolu buněk. Po osvětlení byl signál lokalizován u všech rostlin v chloroplastech a jevil se intenzivnější než signál v rostlinách ponechaných ve tmě. Oxid dusnatý a další reaktivní formy dusíku byly lokalizovány pomocí fluorochromu DAF-FM-DA. U všech rostlin se za tmy nevyskytoval signál žádný, u rostlin vystavených ozáření se fluorescenční signál objevil v chloroplastech, u mutantní rostliny DnaJ *j20* navíc v mezibuněčných prostorech.

U patosystému *Solanum* spp.-*Oidium neolycopersici* byly ověřeny a rozšířeny poznatky o lokalizaci oxid dusnatého a dalších reaktivních forem dusíku. Nejintenzivnější signál byl zaznamenán u citlivého genotypu rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur po inokulaci *Oidium neolycopersici*. Signál se nacházel v oblasti floému, xylému, palisádového a houbového mezofylu. U ostatních druhů *S. habrochaites* f. *glabratum* a *S. chmielewskii* byl také signál u infikovaných rajčat intenzivnější ve srovnání s kontrolou, signál NO nacházel v mezofylu.

V navazujících experimentech by bylo vhodné podrobněji studovat mechanismy tvorby a metabolismu jednotlivých RONS a jejich interakce s dalšími molekulami při stresu.

7. LITERATURA

- Albers A. E. [online] (2007) [cit 2. 11. 2011]: Fluorescent Probes for Imaging Intracellular Nitric Oxide. Dostupné z [www: http://images.dcheetahimages.com/www.organicdivision.org/ama/orig/Fellowship/2007_2008_Awardees/Essays/Albers.pdf](http://images.dcheetahimages.com/www.organicdivision.org/ama/orig/Fellowship/2007_2008_Awardees/Essays/Albers.pdf)
- Albers A. E., Dickinson B.C., Miller E.W., Chang Ch. J. (2008): A red-emitting naphthofluorescein-based fluorescent probe for selective detection of hydrogen peroxide in living cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18: 5948–5950.
- Allen A. [online] (2008) [cit. 18.3 2013]: A Passion for Tomatoes. *Smithsonian Magazine*. Dostupné z: www.smithsonianmag.com/science-nature/passion-for-tomatoes.html.
- Anonym [online] (2011) [cit 2. 11. 2011]: Probes for Reactive Oxygen Species, Including Nitric Oxide—Chapter 18. In: *Molecular probes: The handbook*. Dostupné z [www: http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Reactive-Oxygen-Species-Including-Nitric-Oxide/Introduction-to-Reactive-Oxygen-Species.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Reactive-Oxygen-Species-Including-Nitric-Oxide/Introduction-to-Reactive-Oxygen-Species.html)
- Bailey-Serres J., Mittler R. (2006): The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiology* 141:311.
- Beligni M.V., Lamattina L.(2000): Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221.
- Bi Y., Chen W., Zhang W., Zhou Q., Yun L., Xing D. (2009): Production of reactive oxygen species, impairment of photosynthetic function and dynamic changes in mitochondria are early events in cadmium-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Biology of the Cell*, 11:629–643.
- Březinová Belcredi N., Ehrenbergerová J., Prýma J., Havlová P. (2007): Stanovení aktivity enzymu superoxiddismutasy pomocí soupravy ransod v rostlinném materiálu. *Chemické listy*, 101: 504-508.
- Chen Kun-Ming, Holmström M, Raksajit W., Suorsa M., Piippo M., Aro E.(2010): Small chloroplast-targeted DnaJ proteins are involved in optimization of photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 10:43.
- Catalá, M., Gasulla, F., E Pradas del Real, A., García-Breijo, F., Reig-Arminana, J., Barreno, E. (2010): Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. *BMC Microbiology*, 10: 297-300
- Claxton, N.S., Fellers, T.J., Davidson, M.W. [online] 2004-2009 [cit. 18.11 2010]: Laser scanning confocal microscopy. Dostupné z: www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf
- Corpas F. J., Chaki M., Fernández-Ocaña A., Valderrama R., Palma J. M., Carreras A., Begara-Morales J. C., Airaki M., A del Río L., Barroso J.B. (2008): Metabolism of Reactive Nitrogen Species in Pea Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Plant Cell Physiology*, 49: 1711–1722.
- Dat J., Vandenameele S., Vránová E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **57**, 779-795.7.

- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (2001): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance; *Nature* 394:585-588.
- Egan M. J., Wang Z.-Y., Jones M. A., Smirnov N., Talbot N. J. (2007): Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 104:11772-11777.
- Fischer B. B., Krieger-Liszkay A., Hideg E., Šnyrychová I., Wiesendanger M., Eggen R. I. L. (2007): Role of singlet oxygen in chloroplast to nucleus retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 581: 5555-5600.
- Flors C., Fryer M. J., Waring J., Reeder B., Bechtold U., Mullineau P. M., Nonell S., Wilson M. T., Baker N. R. (2006): Imaging the production of singlet oxygen *in vivo* using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green. *Journal of Experimental Botany* 57: 1725–1734.
- Gandhi R., Maheshwari S. C., Jitendra P., Khurana J. P., Khurana P. (2001): Genetic and molecular analysis of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Estland) trans-formed with *Agrobacterium*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37:629-637.
- Garcia-Mata, C., Lamattina, L. (2001): Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*. 126: 1196-1204.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C. (2006): Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review. *Journal of Fluorescence*, 16: 119 – 139.
- Grace S. C., Logan B. A. (2000): Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *The Royal Society*, 355:1499-1510.
- Hakala-Yatkin, M., Tyystjärvi, E. (2011): Inhibition of Photosystem II by the singlet oxygen sensor compounds TEMP and TEMPD. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807 :243–250.:
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
- Hibbs, A.R. (2004): Confocal microscopy for biologist. BIOCON Melbourne, AUS Springer, 474 p, 27.
- Invitrogen [online]. 2010a [cit. 7.3.2013]. Probes for nitric oxide research - Section 18.3. Dostupné z www: <invitrogen.com>.
- Invitrogen [online]. 2010b [cit. 7.3.2013]. Generating and detecting reactive oxygen species - Section 18.2. Dostupné z www: <invitrogen.com>.
- Invitrogen [online]. 2011 [cit. 7.3.2013]: Fluorescein diacetate (FDA). Dostupné z www: <invitrogen.com>
- Kranner I., Roach T., Beckett R. P., Whitaker C., Minibayeva F. V. (2010) Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology*: 167, 805-811.
- Kubínová L. (2004): Konfokální a dvoufotonová mikroskopie. *Mikroskopie Dnes*, příloha časopisu *Vesmír*, 83: 4-5.
- Kubienová L. [online] (2012) [cit. 22. 4. 2013]: Dostupné z: http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/emorr/17_RNS_GSNO_GSNOR.pdf
- Kupková Z., Beneš L. (2004): Chemical Properties, Biological Effects and Methods of Detection of Nitric Oxide. *Chemické Listy*, 98: 116-122.

- McQuade L. E. and Lippard S. J. (2010): Fluorescence-Based Nitric Oxide Sensing by Cu(II) Complexes That Can Be Trapped in Living Cells. *Inorganic Chemistry*. 49, 7464–7471.
- Meyerowitz E. M. (2001): Prehistory and History of Arabidopsis Research. *Plant Physiology* 125: 15-19.
- Mieslerová B, Lebeda A, Kennedy R (2004) Variation in *Oidium neolycopersici* development on host and non-host plant species and their tissue defence responses. *Annals of Applied Biology* 144: 237-248.
- Miller E.W., Albers A.E., Pralle A., Isacoff E.Y., Chang C.J. (2005): Boronate-Based Fluorescent Probes for Imaging Cellular Hydrogen Peroxide. *Journal of American Chemical Society* 127: 16652-16659.
- Miller E.W., Chang C.J. (2007): Fluorescent probes for nitric oxide and hydrogen peroxide in cell signaling. *Current Opinion in Chemical Biology* 11: 620–625.
- Misra A. N., Misra M., Singh R. (2010) Nitric oxide biochemistry, mode of action and signaling in plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 25, 2729-2739.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mlíčková, K., Luhová, L., Lebeda, A., Mieslerová, B. et Peč, P. (2004): Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 2004, 753-761.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1237-1247.
- Olympus [online] 2004-2009 [cit. 1. 11. 2011]: Applications in confocal microscopy. Dostupné z www: <olympusfluoview.com/applications/flimintro.html>
- Ouyang J, Hong H, Shen C, Zhao Y, Ouyang C, Dong L, Zhu J, Guo Z, Zeng K, Chen J, Zhang C, Zhang J. (2008): A novel fluorescent probe for the detection of nitric oxide in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine* 10:1426-1436.
- Planchet E., Kaiser W.M. (2006): Nitric oxide production in plants. *Plant Signalling and Behavior* 1: 46-51
- Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005): Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy* 99: 455-466.
- Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008): Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické listy* 102: 410-416.
- Piterková J., Petřivalský M., Luhová L., Mieslerová B., Sedlářová M., Lebeda A. (2009): Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Molecular Plant Pathology*, 10: 501-513.
- Piterková J. (2010): Studium reaktivních forem dusíku a kyslíku u rostlin vystavených působení stresových faktorů. Disertační práce. Depon. In: Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Piterková J., Hofman J., Mieslerová B., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A., Petřivalský M. (2011): Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp.-*Oidium neolycopersici* interactions. *Environmental and Experimental Botany* 74: 37– 44.

- Procházka S. (1998): Fyziologie stresu. In: Fyziologie rostlin, 412-430. Academia Praha.
- Sandalio L.M., Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Río L.A. (2008): Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide *in vivo* in plant tissues. *Methods in Enzymology* 440: 397-409.
- Sedlářová M., Luhová L., Petřivalský M., Lebeda A. (2007): Localization and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 607-616.
- Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima K. H. and Nagano T. (2002): Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 3170–3175.
- Sinha R. K., Komenda J., Knoppová J., Sedlářová M., Pospíšil P. (2011): Small CAB-like proteins prevent formation of singlet oxygen in the damaged photosystem II complex of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant, Cell and Environment*, 35: 806-818.
- 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 Biology and Technology* 28, 327-331.
- Thomas D. D., Liu X., Kantrow S. P., Lancaster J. R. (2001) The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 355-360.
- Tulpová Z. (2011): Lokalizace RNOS konfokální mikroskopii. Bakalářská práce. Depon. In: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Vandana S, Sustmann, Rauen U., Stöhr C. (2012): FNOCT as a fluorescent probe for *in vivo* localization of nitric oxide distribution in tobacco roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 59: 80-89.
- Vandelle E., Delledonne M. (2008): Methods for nitric oxide detection during plant – pathogen interactions. *Methods in Enzymology* 437: 575-594.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F., Durner, J. (2001): Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 177-183.
- Wendehenne, D., Durner, J., Klessig, D. F. (2004): Nitric oxide: A next player in plant signalling and defense responses. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 449-455.
- Yokawa K., Kagenishi T., Kawano T., Mancuso S., Baluška F. (2011): Illumination of *Arabidopsis* roots induces immediate burst of ROS production. *Plant Signaling and Behavior* 6: 1460-1464.

Zdroje obrázků:

Obr. 1.

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

Obr. 2-3.

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

Obr. 4.

Tulpová Z. (2011): Lokalizace RNOS konfokální mikroskopií. Bakalářská práce. Depon. In: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.

Obr. 5.

www.olympusfluoview.com, 21.2.2013

Obr. 6.

www.tumblr.com, 21.2.2013

Obr. 7.

www.rajcatko.webnode.cz, 21.2.2013

Obr. 8.

Sedlářová M. (2007), <http://old.botany.upol.cz/atlasy/system/uvod.php>, 21.2.2013

Obr. 9.-17.

Večeřová V. a Sedlářová M., 2012-2013

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APOX	askorbát peroxidasa
cADPR	cyklická adenosindifosfát ribosa
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CAT	katalasa
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát
GFP	green fluorescent protein
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	glutathion reduktasa
FDA	fluorescein diacetát
H2DCF DA	2', 7'-dihydrodichlorofluorescein diacetát
MAPK	mitogenem aktivované protein kinasy
NiNOR	nitrit:NO reduktasa
NOS	NO-syntasa
RONS	společné označení pro reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RNS	reaktivní formy dusíku
SOD	superoxid dismutasa
SOSG	Singlet oxygen sensor green®