Univerzita Palackého v Olomouci

KOPIE

Bakalářská práce

Olomouc 2011 Zuzana Tulpová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky

LOKALIZACE RNOS KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIÍ

Bakalářská práce

Zuzana Tulpová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

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

KOPIE

KOPIE

Prohlášení

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

V Olomouci dne ....

KOPIE

Poděkování

Děkuji Doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D z Katedry botaniky PřF UP za hodnotné rady, odborné vedení a trpělivost během mé práce. Děkuji Bc. Tereze Válové za užitečné rady z praxe a možnost konzultace výsledků,Ing. P. Havránkovi, CSc (†2011) za poskytnutí izolátů hub, RNDr. Martinovi Duchoslavovi, PhD. z Katedry botaniky PřF UP za pomoc při statistickém zpracování dat a také své rodině za podporu během celého mého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Zuzana Tulpová

Název práce: Lokalizace RNOS konfokální mikroskopií

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra molekulární a buněčné biologie PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D. (Katedra Botaniky, PřF UP v Olomouci)

Rok obhajoby práce: 2011

Abstrakt: Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RNOS) jsou molekuly, které hrají významnou úlohu v metabolismu živočišných i rostlinných buněk a pravděpodobně i buněk hub. U hub a houbám podobných organismů jsou aktivní formy kyslíku a dusíku zmiňovány nejčastěji v souvislosti s fytopatologií, resp. se studiemi vztahů mezi hostitelskými rostlinami a původci mykóz. RNOS se podílejí na klíčení a procesu penetrace parazita do pletiv hostitele, či naopak na obranné odpovědi rostliny. Neméně zajímavým zjištěním je, že aktivní formy kyslíku i dusíku byly lokalizovány v těle lišejníků, přesněji v pletivu mykobiontů. Je známo, že se reaktivní formy kyslíku a dusíku podílejí na klíčení rostlin i hub. Zda ale nějak výrazně ovlivňují dynamiku klíčení houbových spor a morfologii jejich hyf nebylo podrobně studováno. V této bakalářské práci byl pomocí donorů a lapačů RNOS studován vliv těchto molekul na dynamiku klíčení a morfologii hyf vybraných smržovitých hub, *Morchella conica* a *Ptychoverpa bohemica,* v úvodních fázích jejich vývoje. Bylo zjištěno, že vyšší koncentrace peroxidu vodíku podporuje růst hyf. Stejně tomu bylo i po zvýšení koncentrace oxidu dusnatého. Nicméně u oxidu dusnatého byl zaznamenán pozitivní vliv na růst hyf i v případě jeho nedostatku. Zvýšená koncentrace peroxidu vodíku i oxidu dusnatého také pozitivně ovlivnila tvorbu mikrosklerocií *Morchella conica* v delším časovém horizontu. Aktivní formy kyslíku a dusíku byly pomocí histochemické detekce lokalizovány konfokální mikroskopií v cytoplazmě klíčících spor a hyfách obou druhů.

Klíčová slova: Konfokální mikroskopie, ROS, RNS, *Morchella conica, Ptychoverpa bohemica*

Počet stran: 67

Počet příloh: 1 (CD)

Jazyk: Čeština

KOPIE

Autor´s first name and surname: Zuzana Tulpova

Title: Confocal microscopy in RNOS detection

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc

Supervisor: Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D. (Department of Botany, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc)

The year of the presentation: 2011

Abstract: Reactive nitrogen and oxygen species (RNOS) are molecules that play an important role in metabolism of animal and plant cells, and probably also in fungal cells. In respect to fungi and fungi-like organisms the RNOS are mentioned mainly in relation to phytopathology, esp. interactions between the host plants and the causes of mycoses. RNOS are involved in process of parasite germination and penetration into host tissues as well as in plant's defence mechanisms. No less interesting is the fact that RNOS can be found in lichens, particularly in mycobiont cells. It is known that RNOS contribute to plant and fungal germination. However, it has not been studied in details whether RNOS influence the dynamics of fungal spores' germination and its hyphal morphology. This work studies effects of RNOS donors and scavengers on dynamics of fungal spores' germination and hyphal morphology of selected fungi ranked in the family of *Morchellaceae*, *Morchella conica* and *Ptychoverpa bohemica,* in their early stages of development. It was observed that higher concentration of both hydrogen peroxide but also nitric oxide induces hyphal growth. On the other hand, also the lack of nitric oxide has a positive effect on hyphal growth. Over a longer period, decreased concentration of NO positively influences production of *Morchella conica* microsclerotia. Histochemical staining was used to localize RNOS in our experiments by confocal microscopy. The signal was found in cytoplasm of germinating spores and hyphae of both species of fungi.

Keywords: Confocal microscopy, ROS, RNS, *Morchella conica*, *Ptychoverpa bohemica*

Number of pages: 67

Number of appendices: 1 (CD)

Language: Czech

KOPIE

OBSAH

1 CÍLE PRÁCE 7
2 ÚVOD 8
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 9
3.1 Principy světelné a konfokální mikroskopie 9
3.1.1 Světelná mikroskopie 9
3.1.2 Fluorescenční mikroskopie 10
3.1.3 Konfokální mikroskopie 11
3.1.4 Další techniky konfokální mikroskopie 14
3.2 Charakteristika fluorochromů, využití 17
3.2.1 Obecná charakteristika fluorochromů 17
3.2.2 Fluorochromy pro detekci ROS 19
3.2.3 Fluorochromy pro detekci RNS 20
3.3 Význam a funkce RNOS ve fyziologii rostlin a hub 22
3.3.1 Aktivní formy kyslíku 22
3.3.2 Aktivní formy dusíku 26
3.4 Charakteristika modelových organismů 32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 37
4.1 Materiál a metody 37
4.1.1 Příprava růstového média pro klíčení spor 37
4.1.2 Stanovení vlivu exogenních RNOS na dynamiku klíčení spor 38
4.1.3 Lokalizace molekul RNOS 38
4.1.4 Vývoj mycelia v delším časovém horizontu 39
5 VÝSLEDKY 40
5.1 Stanovení vlivu exogenních RNOS na dynamiku klíčení spor 40
5.1.1 *Morchella conica* 40
5.1.2 *Ptychoverpa bohemica* 47
5.2 Lokalizace molekul RNOS 50
5.3 Vývoj mycelia v delším časovém horizontu 52
6 DISKUSE 56
7 ZÁVĚR 61
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 62
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 67

KOPIE

1 CÍLE PRÁCE

Cílem mojí bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši o reaktivních formách kyslíku a dusíku (RNOS) a v experimentální části studovat tyto molekuly v klíčících sporách hub z čeledi *Morchellaceae*; tj. porovnat vliv exogenních modulátorů hladiny RNOS na dynamiku klíčení spor a morfologické vlastnosti hyf a porovnat intenzitu produkce RNOS v modelových houbách z čeledi *Morchellaceae* s využitím konfokální laserové rastrovací mikroskopie.

KOPIE

2 ÚVOD

Poslední desetiletí jsou ve znamení velkého pokroku jak v technických tak i v přírodovědných disciplínách. Nejinak je tomu i v oblasti zobrazovacích metod, které jsou intenzivně využívány v medicíně, přírodních vědách obecně i v technických disciplínách. Jednou z nejmladších metod optické mikroskopie je mikroskopie konfokální, která vychází z poznatků fluorescenční mikroskopie a jako zdroj světla využívá nejčastěji laserový paprsek.

Aktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), které jsou souhrnně označovány jako RNOS nebo RONS, jsou v říši živočichů a rostlin známé řadu let, ať už jako významné signální molekuly v ontogenezi nebo stresových reakcích. Nejdříve studovaná a nejlépe známá je role ROS a NO ve fyziologii a patofyziologii živočichů, následovaly analogické experimenty u rostlin. Přestože první zmínky o emisi NO v rostlinách pocházejí již z roku 1979, intenzivně je tato problematika zkoumána až posledních 10 - 15 let. aktivní formy kyslíku vznikají např. při fotosyntéze v chloroplastech nebo při dýchání v mitochondriích díky elektron transportním řetězcům. Aktivní formy dusíku, a především oxid dusnatý, jsou také běžnou součástí života. NO je významnou signální molekulou, která se u živočichů podílí na vazodilataci, neurotransmisi nebo imunitní odpovědi, u rostlin ovlivňuje senescenci nebo klíčení. RNOS jsou známé také jako molekuly úzce spojené s reakcí organismů na stresové podněty, kdy mají signální úlohu a podílejí se u rostlin na strukturních i biochemických obranných mechanismech. Ve zvýšené koncentraci se ale stávají toxické, způsobují oxidační poškození buňky (např. peroxidace lipidů) a mohou se podílet i na její programované smrti. U živočichů a rostlin máme tedy již základní představu o metabolismu a lokalizaci RNOS, ale u hub informací příliš není. Studie produkce RNOS se houbami zabývaly především v souvislosti patogeneze mikromycet na rostlinách, nicméně vliv RNOS na vývoj vláknitých hub objasněn nebyl. Možná i to byl jeden z důvodů, proč mě zaujalo pro moji bakalářskou práci téma aplikace mikroskopických metod (především konfokální mikroskopie) při studiu úlohy a lokalizace RNOS v raných fázích růstu smržovitých hub. Snad pomůžu alespoň jednu malou trhlinu ve znalostech týkajících se zapojení RNOS do vývoje hub vyplnit.

KOPIE

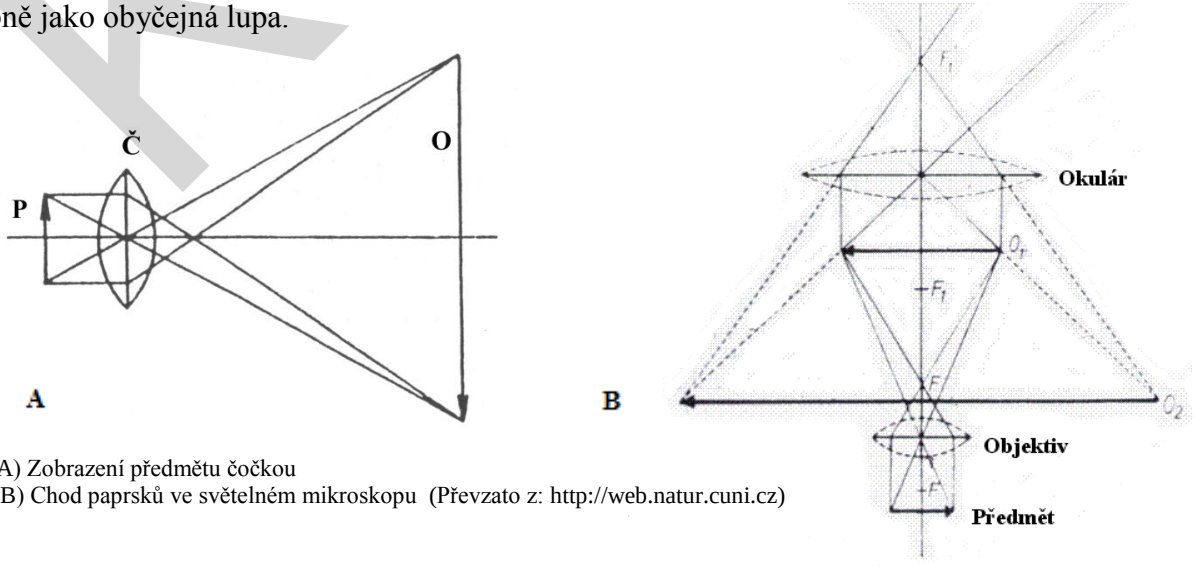
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Principy světelné a konfokální mikroskopie

3.1.1 Světelná mikroskopie

První přístroj označovaný jako mikroskop byl sice sestaven již v letech 1590 - 1609 Hansem a Zachariasem Janssenovými v Holandsku (Kubínová, 2004), ale hlavní průlom v oblasti světelné mikroskopie je přisuzován spíše Anthonymu van Leeuwehoekovi, který žil na přelomu 17. a 18. století. Jím vyrobené mikroskopy obsahovaly čočky broušené do vynikající kvality a byly schopny zvětšovat až 270x. Čočky, jako objektivy a okuláry, zůstaly hlavní součástí mikroskopu dodnes. Kromě těchto optických částí má mikroskop ještě část mechanickou, tvořenou podstavcem, stojanem a stolkem s křížovým posunem, a část osvětlovací, kterou představují zdroj světla, kondenzor a clona (Hampl, 2010).

Objektiv je čočka (Č), resp. soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností. Světelné paprsky vycházející z určitého bodu předmětu (P) se šíří různými směry, dopadají na čočku z různých úhlů, procházejí jí a nakonec se sbíhají v obrazové rovině čočky opět do jednoho bodu. Výsledkem je ostrý obraz (O) předmětu (obrázek 1A). Vzhled obrazu záleží na vzdálenosti předmětu od čočky. V případě, že je pozorovaný předmět umístěn mezi dvojnásobkem ohniskové vzdálenosti a ohniskem (F) objektivu mikroskopu, je vzniklý obraz převrácený, skutečný a zvětšený a v mikroskopu je promítán mezi ohnisko okuláru a okulár. Okulár mikroskopu je tvořen rovněž čočkou, nicméně ta plní "pouze" funkci zvětšovací, podobně jako obyčejná lupa.



Obr. 1: A) Zobrazení předmětu čočkou
B) Chod paprsků ve světelném mikroskopu (Převzato z: http://web.natur.cuni.cz)

KOPIE

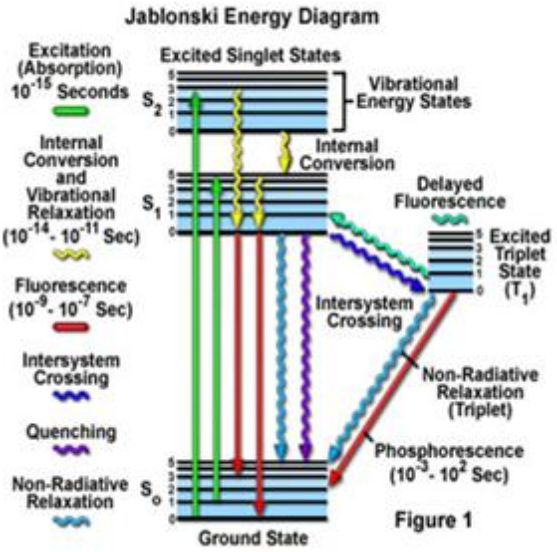
Po fyzikální stránce je vznik obrazu v optickém mikroskopu charakterizován pomocí Huygensenova principu, který říká, že každý bod osvětleného objektu (zaostřená rovina preparátu) se stává zdrojem sekundárních sférických vln. Sekundární vlny následně spolu interferují a výsledné vlnění vstupuje do objektivu. V zadní ohniskové rovině objektivu dochází k interferenci sekundárních vln, které opustily rovinu předmětu rovnoběžně, a dle Huygensenova principu se ony stávají zdrojem nových vln, které v obrazové rovině mikroskopu skládají zvětšený a převrácený obraz (Hampl, 2010).

K významným parametrům každého mikroskopu patří mimo jiné jeho rozlišovací schopnost, která je popisována jako nejmenší vzdálenost dvou bodů ve vzorku, které mikroskop zobrazí jako dva samostatné body. U světelného mikroskopu je tato vzdálenost zhruba 250 nm. Tato vlastnost je dána fyzikálními vlastnostmi světla a ovlivnit ji tedy nemůžeme. Co lze ovlivnit je kontrast zobrazení ve světelném mikroskopu, např. alternativními metodami jako je zástin, fázový kontrast, Nomarského diferenciační interferenční kontrast (DIC) nebo Hoffmanův modulační kontrast (Hampl, 2010). Pro zvýšení kvality zobrazení objektů je možné také použít i jiné zdroje světla, např. laser u některých metod konfokální mikroskopie.

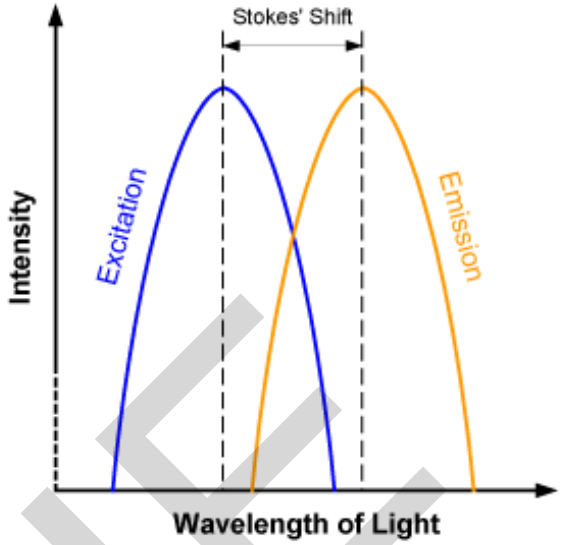
3.1.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie využívá jevu, který se nazývá luminiscence. Je to jev, kdy je látka schopná vysílat do svého okolí světlo. Můžeme rozlišit dvě formy luminiscence a to chemiluminiscenci, kdy látka vydává světlo na základě chemické reakce (např. světluška), a na fotoluminiscenci, kdy látka reaguje na světlo. Fluorescenci zařazujeme do kategorie fotoluminiscence. Princip fluorescence spočívá ve schopnosti atomů nebo molekul absorbovat množství energie (excitační energie) a vzápětí ji opět vydat zpět v podobě světelného emisního záření o větší vlnové délce (obrázek 2). Posun vlnových délek je také označován jako Stokesův posun (obrázek 3). Fluorescence je jev krátkodobý, po osvětlení vydrží preparát „svítit“ přibližně 8 - 10 sekund. Obecně platí, že s přibývajícím časem odeznívá schopnost fluorochromu, fluorescenčního barviva, emitovat světlo a i při intenzivním osvětlení je preparát hůře pozorovatelný. Fluorescenčním barvivům je věnována kapitola 3.2.

KOPIE



Obr. 2: Jablonkého energetický diagram - diagram rozdělení barevného spektra excitovaného a emitovaného světla (Převzato z: www.olympusfluoview.com, 27.11.2010)



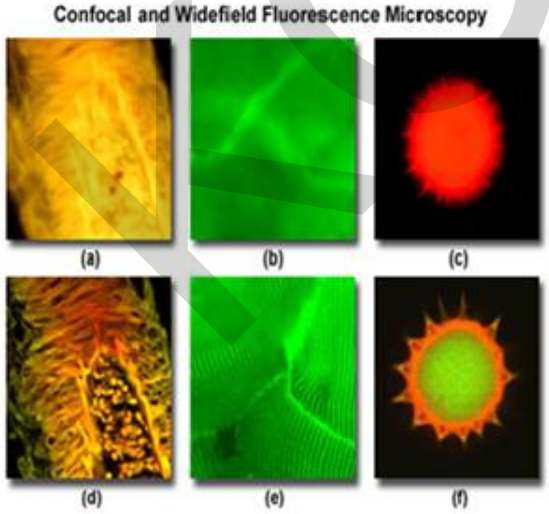
Obr. 3: Stokesův posun (Převzato z: www.art.ca/en/preclinical/optical-molecular- imaging/fluorescence.php, 27.11.2010)

3.1.3 Konfokální mikroskopie

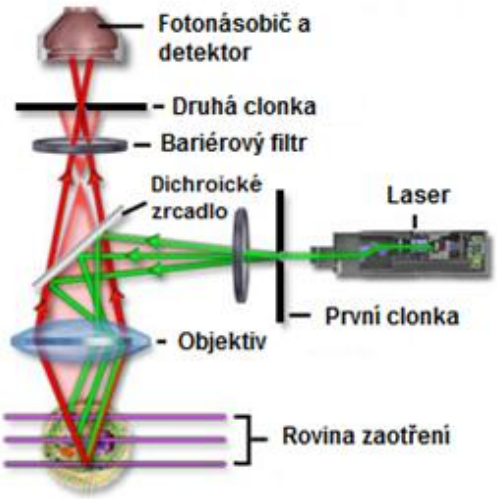
Historie světelného mikroskopu sice sahá do 16. století, ale většina modifikací této metody byla konstruována až ve 20. století. Princip konfokálního mikroskopu byl patentován r. 1957 studentem Harvardské univerzity Marvinem Minskym. Nicméně tato jeho práce zůstala relativně bez povšimnutí a to pravděpodobně díky tomu, že neměl dostatečně intenzivní zdroj světla (Claxton a kol., 2004 - 2009). Pokračovateli Marvina Minskyho byli Mojmír Petráň a Milan Hadravský z Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, kteří r. 1965 zkonstruovali nový typ konfokálního mikroskopu - mikroskop s dvojitým řádkováním (= tandemový skenovací mikroskop) a r. 1968 jej nechali patentovat (Kubínová, 2004). Za pokračovatele Marvina Minskyho je možné považovat i Davida Eggera, který je také spojován se zrodem vícepaprskového konfokálního mikroskopu, jenž pracoval na principu Nipkowova kotouče. S konfokálním mikroskopem s Nipkowovým kotoučem získali David Egger a Mojmír Petráň první kvalitní snímky relativně silných preparátů, vzorků mozkové tkáně. David Egger později nahradil Nipkowovův kotouč za pohybující se zdroj světla a roku 1973 uveřejnil první snímky buněk zpracovaných tímto přístrojem (Claxton a kol., 2004 - 2009).

KOPIE

Pozorování preparátů konfokálním mikroskopem je založeno na stejném principu jako fluorescenční mikroskopie. Nicméně konfokální mikroskop se odlišuje především tím, že má ve své konstrukci konfokální clonky, a že má odlišný zdroj světla osvětlující preparát. V případě fluorescenční mikroskopie je jako zdroj excitační energie používáno UV záření (Hg výbojka), zatímco v konfokální mikroskopii je používán nejčastěji laserový paprsek. Výhoda fluorescenční mikroskopie je citlivost, tzn. schopnost zobrazení i malého množství přítomných molekul a specifičnost jednotlivých fluorochromů a sond. Konfokální mikroskopie použitím laserového paprsku místo UV záření dosahuje vyššího kontrastu a výhodou je také možnost provádět optické řezy, jejichž skládáním lze později v počítači rekonstruovat pozorovaný objekt v 3D. To však klade vysoké nároky na komplexní provoz - tedy technickou vybavenost přístroje a rychlost a kapacitu počítače. Použití laserového paprsku je také výhodou i nevýhodou konfokální mikroskopie. Laserové světlo je natolik intenzivní, že přispívá k rychlejší degradaci použitých fluorochromů a tím i ničení preparátu (Hibbs, 2004). Na obrázku 4 je srovnání preparátů získaných z fluorescenčního mikroskopu a mikroskopu konfokálního. V horní řadě (snímky a, b, c) jsou snímky lidské míchy, vláken neporušeného králičího svalu a pylového zrna slunečnice z klasického fluorescenčního mikroskopu. Spodní řada (snímky d, e, f) je tvořena z týchž preparátů pozorovaných mikroskopem konfokálním. Vyšší rozlišení a kontrast snímků jsou patrné na první pohled. Lepší snímky lze získat už jedině použitím transmisního elektronového mikroskopu.



Obr. 4: Srovnání snímků z konfokálního (d, e, f) fluorescenčního mikroskopu (a, b, c)
(Převzato z: www.olympusfluoview.com, 27.11.2010)

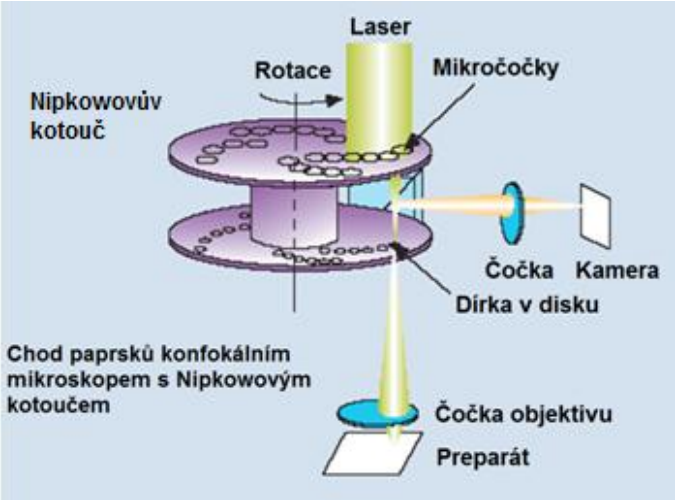


Obr. 5: Chod paprsků konfokálním mikroskopem
(Upraveno dle: Claxton, N.S. a kol., 2004-2009)

KOPIE

Konfokální mikroskop využívá úzký svazek laserového světla, který směřuje skrz první konfokální clonku na dichroické zrcadlo (dělič paprsků). To nasměruje paprsek přes objektiv na preparát (chod paprsků konfokálním mikroskopem, obrázek 5), který je umístěn v ohniskové rovině objektivu. Světlo emitované z preparátu prochází opět objektivem, dichroickým zrcadlem a druhou konfokální clonkou. Druhá konfokální clonka slouží k odfiltrování rušivého světla z okolí, světla pocházejícího mimo rovinu zaostření. Po průchodu druhou clonkou dopadá světlo před fotonásobič a je zároveň snímáno skenovacím zařízením (detektor), které předá výsledné informace o preparátu do počítače. V počítači se ukládají informace o souřadnicích X a Y snímaných bodů preparátu, díky nimž je možné sestavit obraz celého preparátu. Skládáním jednotlivých obrazů na sebe lze rekonstruovat 3D modely pozorovaných objektů (Claxton a kol., 2004 - 2009).

Vzdálenost preparátu, ideální pro snímání, volí skenovací zařízení, které také vybírá i způsob samotného skenování. Existují čtyři možné způsoby, jak skenovat preparát. Prvním způsobem skenování je rozmítání světelného paprsku. Druhou možností je zachování celistvosti paprsku, kdy je skenování zajištěno pohybem zdroje světla, zatímco preparát je statický ("beam scanning". Třetí možností jak skenovat je pohybovat s preparátem a zafixovat zdroj světla ("stage scanning"). Čtvrtý způsob skenování se od ostatních liší. Hlavní rozdíl spočívá v samotné konstrukci mikroskopu, ve které je zabudován Nipkowův kotouč. Nipkowův kotouč je perforovaná destička, která rotuje a tím zajišťuje usměrnění a zaměření laserového světla na body preparátu (chod paprsků, obrázek 6). Mikroskopy s Nipkowovým kotoučem jsou používány pro pozorování živých preparátů. Kromě možnosti rychlého snímání se konfokální mikroskop s Nipkowovým kotoučem vyznačuje nižší intenzitou světla působící na pozorovaný objekt, což je výhodné pro zamezení degradace preparátu (Hibbs, 2004).



Obr. 6: Chod paprsků KM s Nipkowovým kotoučem

KOPIE

(převzato z: www.hi.helsinki.fi, 22.11.2010)

3.1.4 Další techniky konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie zahrnuje i další techniky, než je jenom "prosté" pozorování preparátů. Jednou z těchto metod je metoda FRAP (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleching), která byla vytvořena pro měření kinetiky fluorescenčně značených proteinů nebo lipidů v buněčné membráně. Kromě povrchu buňky je možné sledovat intra- a intercelulární vztahy komponent v živých tkáních a pletivech. Principem FRAP je osvětlení nabarveného preparátu světelným zářením o nízké intenzitě. Poté následuje prudké zvýšení intenzity paprsku na krátkou dobu. Tento laserový pulz způsobí degradaci fluorescence v části preparátu, na kterou byl paprsek zaměřen. Intenzita světelného záření je následně snížena na původní hodnotu. Předmětem měření je fotodegradovaná část preparátu, kde se měří opětovný nárůst fluorescence po "vybělení" (Claxton a kol., 2004 - 2009). Na podobném principu funguje i metoda FLIP (**F**luorescence **L**oss **I**n **P**hotobleaching). Metoda FLIP ale na rozdíl od metody FRAP sleduje úbytek fuorescence z oblastí preparátu, které nebyly vystavené fotodegradaci, tedy z oblastí v okolí vybělené části.

Jinou používanou technikou je metoda FRET (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer). Metoda se využívá na příklad při sledování interakce mezi ligandem (signální molekula) a jeho receptorem. Už podle názvu je patrné, že metoda je založena na principu přenosu energie. Přenos energie probíhá v nabarveném preparátu mezi dvěma fluorescenčními barvivy zvolenými tak, aby se emisní spektrum jednoho barviva překrývalo s excitačním spektrem barviva druhého. To umožní přenos energie excitovaného světla z jednoho fluorochromu na druhý v případě, že vzdálenost mezi oběma barvivy je menší než 4 nm a molekuly, které tyto fluorochromy nesou, spolu reagují (Mikš, 2007).

V dnešní době je fluorescenční mikroskopie na takové úrovni, že s její pomocí je možné detekovat i jedinou molekulu fluorescenčního barviva. Jednou z nejnovějších technologií je FLIM (**F**uorescence **L**ifetime **I**maging **M**icroscopy). Je hojně využívané pro lokalizaci proteinů, lipidů nebo nukleových kyselin. Mimo jiné je možné FLIM, v kombinaci s vícenásobným značením, využít k zobrazování okolních faktorů, které ovlivňují životnost fluorescenčního

KOPIE

barviva. Existují dvě metody, které je možné společně zahrnout do kategorie FLIM - time-domain FLIM a frequency-domain FLIM (Olympus, 2004 - 2009).

Vytvořit tenké optické řezy a s jejich pomocí následně provádět 3D rekonstrukci pozorovaných objektů nebo určit vzájemnou polohu různých buněčných komponent lze i s využitím multifotonového mikroskopu. S myšlenkou multifotonové mikroskopie poprvé přišel Maria Göppert-Mayer v roce 1931 (Masters a kol., 1999), první multifotonový mikroskop byl sestaven Wattem W. Webbem z Cornellovy univerzity v Ithace v roce 1990 (Kubínová, 2004) a v tomtéž roce byl princip multifotonového mikroskopu popsán W.J. Denkem a kol. Ti použili jako zdroj záření laserový paprsek, který se svou vlnovou délkou blížil infračervenému záření (700 nm). Pozorovaný preparát byl osvětlen krátkým pulzem laseru, který trval přibližně 100 fsec a tento pulz byl opakován frekvencí 100 Hz. Krátkým, vysoce intenzivním pulzem laseru s velkou vlnovou délkou bylo dosaženo excitace dvou fotonů. Vlnová délka laserového paprsku může dosahovat hodnot i kolem 1000 nm (Masters a kol.,1999). Multifotonový mikroskop na rozdíl od mikroskopu konfokálního nepotřebuje mít ve své konstrukci druhou, konfokální, clonku pro eliminaci světla emitovaného mimo rovinu zaostření. Clonka není potřebná, protože pravděpodobnost dvoufotonové excitace je úměrná druhé mocnině intenzity excitačního pole, což je nejvyšší právě v rovině zaostření. Výhodou oproti konfokálnímu mikroskopu je větší hloubka proostření, až do 400 μm, a to i v případě vzorků, jejichž povrchové vrstvy silně fluoreskují (Kubínova, 2004).

V případě, že fluorescenční mikroskopie už není schopná poskytnout potřebné informace o prostorovém uspořádání biologických preparátů, lze využít techniku korelační mikroskopie. Prakticky se jedná o pozorování vzorků ve světelném mikroskopu a následně pozorování týchž vzorků v transmisním nebo skenovacím elektronovém mikroskopu (TEM nebo SEM). Počátky této techniky jsou v roce 1973, kdy byly Wetzelem a kol. pozorovány T a B lymfocyty nejprve ve světelném mikroskopu a potom v SEM (Sims a kol, 2006). Techniku korelační mikroskopie můžeme rozdělit dle použití rozdílných typů mikroskopů, TEM nebo SEM. Pro světelný mikroskop a SEM se používají relativně tlusté preparáty. Proto je výhodnější použít SEM (Sims a kol., 2006).

KOPIE

Termínem korelační mikroskopie je možné označit i holografickou mikroskopii. Holografická mikroskopie využívá svazek laserového světla, který je polopropustným zrcadlem rozdělen na svazek, který dopadá na pozorovaný předmět a odráží se od něj a na referenční svazek, který má časově proměnný fázový posun. Oba svazky potom spolu interferují v detekční rovině a vytvářejí tak interferenční obrazec (= hologram), tedy trojrozměrný záznam pozorovaného předmětu. Konečné zobrazení je z výsledného hologramu snímáno počítačem (Chmelík, 2002).

KOPIE

3.2 Charakteristika fluorochromů, využití

3.2.1 Obecná charakteristika fluorochromů

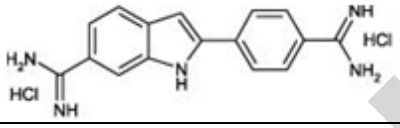
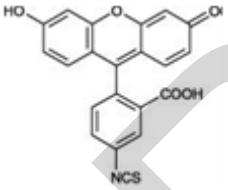
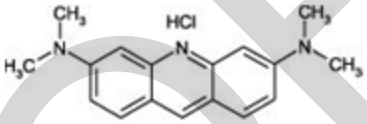
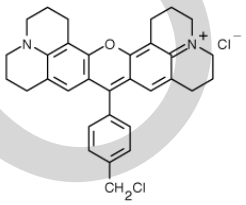
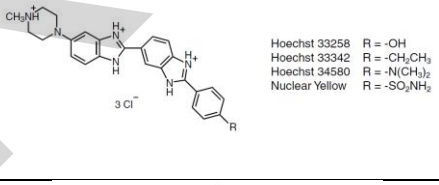
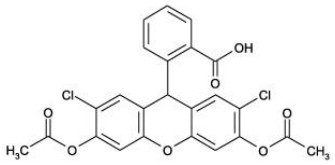
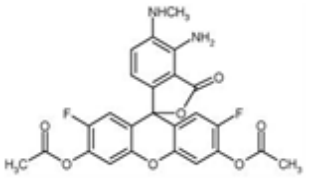
Preparáty se pro lepší viditelnost začaly barvit už na konci devatenáctého století a prudký rozvoj zaznamenalo barvení společně s vývojem moderní histologie. Nejčastěji používanými barvivy byly methylenová modř, malachitová zeleň, azobarviva, safranin O, aj. Barviva byla výhodná pro světelnou mikroskopii, protože barví silně a absorbují velké množství světla. Právě proto jsou však pro mikroskopii fluorescenční prakticky nepoužitelná. Fluorochromy se začaly používat po roce 1920, kdy byl fluorescenční mikroskop poprvé použit pro studium životaschopnosti buněk. Fluorochromy byly ve čtyřicátých letech dvacátého stolení díky Albertovi Coonsovi u zrodu imunofluorescence. Nicméně prudký rozvoj fluorescenčních barviv přišel až s objevem GFP (**G**reen **F**luorescent **P**rotein). Tento protein byl izolován ze světélkující medúzy pohárovky *Aequorea victoria* (Claxton a kol., 2004-2009). Dnes je nejčastěji spojován se známou akvarijní rybkou, zebřičkou, které byla vložena genová sekvence kódující GFP do její vlastní genetické výbavy a výsledkem bylo, že zebřičky zeleně svítily. Kromě nejznámější zelené varianty existuje také žlutá (YFP) a modrozelená forma (CFP) tohoto proteinu a také nepříbuzný protein červený (RFP).

Fluorescenční barviva (sondy) jsou látky, které jsou schopny se specificky navázat na určitou strukturu nebo makromolekulu v buňce. Díky barvivům tedy můžeme pozorovat nejenom buněčné struktury, jako jsou Golgiho aparát, endoplasmatické retikulum, jádro aj., ale můžeme také detekovat aktivní metabolismus buněk a obecně tak jejich životaschopnost. Typickým příkladem fluorochromu, který se používá pro detekci aktivního metabolismu, je fluorescein, resp. fluorescein diacetát (FDA). Do živé a zdravé buňky se totiž fluorescein nedostane přes plazmatickou membránu, naopak FDA je do buňky transportován. FDA je následně hydrolyzován intracelulárními esterázami a vzniklý AM ester je schopný fluoreskovat (Invitrogen, 2011). V současné době se používá několik skupin barviv – tradiční fluorochromy, fluorová barviva Alexa, cyaninová barviva, fluorescenční sondy pro prostředí buněk, organelové sondy, kvantové tečky či fluorescenční proteiny - GFP a jeho deriváty (Claxton a kol., 2004-2009). Mezi tradiční barviva patří již zmiňovaný fluorescein, fluorescein izothiokyanát, používaný v imunofluorescenci, texaská červeň nebo akridinová oranž. Základní parametry barviv jsou vlnové délky excitačního a emisního záření, z čehož vyplývá i barva, kterou má

KOPIE

barvivo při pozorování, a samozřejmě k čemu se barvivo váže a s tím související použití (parametry vybraných barviv viz tabulka I). Nemálo podstatnou informací o fluorescenčním barvivu je i optimální pH, při kterém vydává svou maximální světelnou odpověď. Nutno podotknout, že životnost barviv se snižuje s přibývajícím stářím, množstvím světla, kterému jsou vystaveny, nebo s přibývající teplotou.

Tabulka I: Parametry některých fluorochromů

Fluorochrom		Struktura	Vlnová délka [nm]			Využití
			excit.	emis.	barva	
DAPI			358	461	modrá	barvení DNA
Fluorescein isothiokyanát (FITC)			494	520	zelená	vazba na bílkoviny, použití při metodách FRET
Akridinová oranž			502	525	zelená	barvení DNA
MitoTracker Red FM			581	644	červená	barvení mitochondrií v živých buňkách
Hoechst	33258		352	461	modrá	barvení DNA v živých buňkách
	33342		350	461		
	34580		392	440		
	Nuclear Yellow		355	495		
H_2DCF DA (2', 7'-dihydrodichlorfluorescein diacetát)			498	522	zelená	detekce peroxidu vodíku (H_2O_2)
DAF-FM DA (diaminofluorescein)			495	515	zelená	detekce oxidu dusnatého (NO)

KOPIE

Hoechst 34580, 33258 nebo 33342 jsou fluorochromyze skupiny DNA selektivních Hoechst barviv. Všechny formy jsou rozpustné ve vodě (lze připravit až 2% roztoky) a velice snadno pronikají do buňky skrz cytoplazmatickou membránu. V buňce se pak barviva Hoechst vážou na DNA, přesněji na sekvence bohaté na AT nukleotidy. Po navázání na DNA poskytují modrý signál. Stejně jako u ostatních fluorochromů, i v případě Hoechst může pH ovlivnit intenzitu signálu, který je fluorochrom emituje. Při pH 5 je signál mnohem jasnější a vyšší než v případě pH 8. Přestože je Hoechst skupinou fluorochromů, které jsou relativně netoxické, řadí se do kategorie mutagenů. Proto je nutné s nimi zacházet opatrně a musí být zneškodněny v souladu s platnými předpisy (Invitrogen 2010c).

3.2.2 Fluorochromy pro detekci ROS

H_2DCF DA (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát), také známý jako dichlorofluorescin diacetát, je běžně používán k detekci tvorby reaktivních forem kyslíku. H_2DCF DA nemá schopnost poskytovat fluorescenční signál. Tuto schopnost má jeho vysoce fluorescenční derivát 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF), který vzniká štěpením acetátových skupin H_2DCF DA pomocí intracelulárních esteráz a oxidací volnými radikály, především $^{\cdot}OH$, $CO_3^{\cdot-}$, $NO_2^{\cdot}$ a thiolovými radikály (Catalá a kol., 2010). Oxidace diacetátové formy DCF údajně není přímo citlivá na singletový kyslík, jednu z vysoce reaktivních forem kyslíku, ale ten může ovlivnit tvorbu DCF svými reakcemi s buněčnými substráty, jejichž produktem jsou peroxidové a peroxylové radikály. Bylo prokázáno, že H_2DCF DA může být oxidován na DCF peroxynitritovým aniontem, $ONOO^-$, křenovou peroxidázou nebo v případě nepřítomnosti peroxidu vodíku železnatými kationty (Fe^{2+}). Kromě toho může samotný DCF působit jako stimulátor pro oxidaci jeho diacetátové formy. Z uvedeného vyplývá, že samotný fluorochrom (jeho obě formy) je také schopný produkovat volné radikály, díky čemuž by mělo být jeho použití při měření produkce těchto látek kontrolováno (Invitrogen 2010b).

Vyšší stabilitu i specificitu vykazují dva fluorochromy, které mají velice podobné vlastnosti, 3'-(*p*-aminofenyl)fluorescein (APF) a 3'-(*p*-hydroxyfenyl)fluorescein (HPF). Používají se především pro detekci hydroxylového radikálu a peroxynitritu. Hodnoty excitačního a emisního maxima jsou pro oba fluorochromy shodné, a to 490 a 515 nm, navíc jsou oba relativně odolné vůči oxidaci světlem.

KOPIE

Zajímavým flurochromem je dihydroethidium, známý také pod názvem hydroethidium. Dihydroethidium se používá pro barvení cytoplazmy nebo chromatinu živých buněk. V cytoplazmě poskytuje modrý fluorescenční signál (excitační / emisní maxima ~ 340/420 nm), zatímco DNA, do které interkaluje ethidium vzniklé oxidací dihydroethidia, fluoreskuje červeně (excitační / emisní maxima ~ 535/610 nm, Sigma-Aldrich, 2011). Dihydroethidium je idikátorem superoxidového radikálu, podobně jako další fluorochrom MitoSOX Red (excitační / emisní maxima ~ 400/590 nm). Společně byly použity pro přesnější lokalizaci mitochondrií a pro stanovení tvorby cytosolového a mitochodriálního superoxidu (Invitrogen, 2010b).

3.2.3 Fluorochromy pro detekci RNS

Pro detekci NO a dalších RNS je možné použít diaminofluorescein (DAF). Prakticky všechny analogy DAF téměř specificky reagují s NO a produkují triazolový derivát poskytující fluorescenční signál. Ve starší literatuře najdeme, že nereagují s NO_2^-, NO_3^- nebo dalšími reaktivními formami kyslíku, včetně $ONOO^-$, O_2^- a H_2O_2, což je v dnešní době diskutováno. Nejcitlivějším analogem DAF, je DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein), který vykazuje stabilní fluorescenční signál a to i v širokém rozmezí pH. Intenzita signálu triazolového derivátu je silně snížena v případě, že je hodnota pH nižší než 7 (Itoh a kol., 2000). DAF-FM je nejlepším příkladem látky patřící mezi vicinální diaminové deriváty fluoresceinu, objevené r. 1998, které generují fluorescenční signály. Je vhodný pro detekci oxidu dusnatého *in situ*. DAF-FM je vhodný pro detekci oxidu dusnatého *in situ,* ale pro barvení se používá jeho diacetátový derivát DAF-FM DA, který proniká plazmatickou membránou. Uvnitř buňky je DAF-FM DA následně štěpen esterázami za vzniku intracelulárního DAF-FM, který je dále oxidem dusnatým oxidován na triazolový produkt vykazující fluorescenční signál (Invitrogen 2010a). Pro citlivé analytické metody je možné použít jako fluorescenční barvivo i 2,3-diaminonaftalen (DAN). Po reakci DAN s NO vzniká 1-(H)-naftotriazol (NAT, excitační / emisní maxima ~ 365/415 nm), který poskytuje fluorescenční signál. Pro vysokou senzitivitu se tato technika může využívat při kvantifikaci NO v živých buňkách (Catalá a kol., 2010).

Dalším fluorochromem používaným pro detekci NO je DAA (1,2-diaminoantrachinon), který ale neposkytuje fluorescenční signál. Červeně fluoreskuje až 1H-anthra [1,2d] [1,2,3] triazole-6,11-dion, produkt reakce DAA s NO za přítomnosti O_2. DAA je možné excitovat

KOPIE

264 nm a detekovat při vlnové délce 394 nm (Dacres a Narayanaswamy, 2005). DAA byl používán pro detekci změn hladiny NO u potkanů po poranění sítnice zrakového nervu. Byl také DAA použit při studiu úlohy a tvorby NO v hipokampu lokalizací NO v preparátech mozkové tkáně potkana (Invitrogen, 2010a).

Skupina fluorescenčních barviv pro detekci NO je mnohem rozsáhlejší. Kromě DAF-FM, DAN a DAA do ní patří také NBD Methylhydrazin (*N*-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan, excitační / emisní maxima ~ 468/537 nm), DAR-4M AM (acetoxymethylester diaminorhodaminu, excitační / emisní maxima ~ 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-s-indacene, excitační / emisní maxima ~ 521/237 nm) a další jiná (Gomes a kol., 2006).

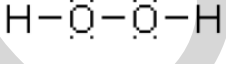
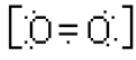
KOPIE

3.3 Význam a funkce RNOS ve fyziologii rostlin a hub

3.3.1 Aktivní formy kyslíku

Přehled aktivních forem kyslíku (= reactive oxygen species ROS) je uveden v tabulce II. ROS je možné v rostlinném těle detekovat i jako součást běžného metabolismu. Jsou produktem fotosyntézy (v chloroplastech), během níž vzniká ve fotosystému I superoxidový radikál nebo ve fotosystému II tripletní kyslík. Zároveň ROS vznikají v procesu dýchání (v mitochondrií), ale byly lokalizovány i v organelách jako peroxizomy, endoplasmatické retikulum, plazmatická membrána či buněčná stěna. Přesto jsou ROS pro buňku toxickými vedlejšími produkty metabolismu a mohou způsobit její poškození. Zejména hydroxylový radikál působí destruktivně na lipidy, nukleové kyseliny a proteiny. Za normálních růstových podmínek je produkce ROS v buňkách nízká, ale vzrůstá vlivem stresových podnětů (Piterková a kol., 2005).

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

Sloučenina	Zkratky	Struktura	Zdroj	Biologický účinek
Peroxid vodíku	H_2O_2		Glykolátoxidasa v glyoxisomech, osvětlené chloroplasty - PSII, mitochondrie v přítomnosti NADH, β-oxidace mastných kyselin, Fe-S proteiny a enzymové reakce (SOD, glykolátoxidasa, aminoxidasa, oxalátoxidasa (EC 1.2.3.4), peroxidasy...)	Inhibice fixace CO_2, inaktivace enzymů Calvinova cyklu, oxidace sulfhydrylů a flavonolů, substrát oxidační reakce
Hydroxylový radikál	OH·		Haberova-Weissova reakce, Fentonova reakce	Velmi silné oxidační činidlo, poškození DNA, peroxidace lipidů, degradace proteinů, produkce C_2H_4
Superoxidový anion-radikál	$O_2^{\cdot -}$		osvětlené chloroplasty, PSII a PSI, mitochondrie v přítomnosti NADH, Fe-S proteiny, cytochrom P450, elektronový transportní řetězec v endoplasmatick ém retikulu, herbicidy (paraquat a nitrofen), enzymové reakce: xanthinoxidasa, NAD(P)H oxidasa, aldehydoxidasa, urikása (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
Singletový kyslík	$^1O_2$		excitované chlorofylové molekuly v tripletovém stavu, zneči.tění vzduchu (NO_2, O_3, atd.)	mutageneze, peroxidace lipidů, fotooxidace aminokyselin

KOPIE

Rostliny jsou během celého života neustále vystavovány různým stresovým faktorům. Stresové faktory můžeme rozdělit na biotické a abiotické. Mezi biotické stresové faktory řadíme stárnutí či útok patogenů a do skupiny abiotických faktorů patří působení extrémních teplot (chlad, mráz, teplo), sucha nebo zamokření, intenzivního světla, herbicidů a mechanické poškození. Vlivem stresových podmínek může docházet k prudké časově omezené tvorbě ROS ("oxidative burst"), čímž dochází k porušení rovnováhy mezi jejich tvorbou a odbouráváním, a to může mít za následek až buněčnou smrt. Nejsou toxické pouze pro buňky rostliny, ale také působí toxicky přímo na patogena. Nicméně kromě funkce toxických vedlejších metabolitů plní ROS také funkci významných signálních molekul kontrolujících obranné procesy rostlin nebo již zmiňovaný proces programované buněčné smrti. Mimo jiné existuje předpoklad, že ve stélkách lišejníků zajišťují komunikaci mezi symbionty (Catalá a kol., 2010).

Přestože je kladný význam ROS v rostlinách nesporný, stále hrozí možnost nechtěného štěpení biomolekul. Proto se u rostlin vyvinuly mechanismy, které udržují koncentraci ROS v únosné míře, zajišťují tedy jejich katabolismus. Jedná se o antioxidační procesy nacházející se v různých buněčných strukturách. Na antioxidačních procesech se podílejí dvě skupiny látek - antioxidanty (neenzymové systémy přímé deaktivace) a antioxidační enzymy. Mezi významné antioxidanty patří kyselina L-askorbová (vitamin C), karotenoidy, redukovaný glutathion nebo α-tokoferol (Piterková a kol., 2005). Účinný biologický antioxidant musí být v buňce přítomen v přiměřeném množství, musí reagovat s různými volnými radikály, musí být vhodný pro regeneraci a jeho koncentrace musí být pro buňku únosná a nesmí ji poškozovat (Rose a Bode, 1993). Nutno také připomenout kladnou roli ROS v metabolismu rostlin, z čehož vyplývá další vlastnost vhodného antioxidantu. Ten by neměl ROS v buňkách zcela zlikvidovat, ale měl by koncentraci ROS pouze regulovat (Arrigoni a De Tullio, 2001).Všechny tyto podmínky splňuje kyselina L-askorbová (vitamin C), která je také používána v této práci.

Antioxidační enzymy jsou látky, které poskytují buňce univerzální ochranu před oxidativním poškozením ve všech jejích částech. Do této skupiny enzymů patří superoxiddismutáza (SOD, EC 1.15.1.1), kataláza (CAT, EC 1.11.1.6), glutathionperoxidázy a enzymy askorbát-glutathionového cyklu (Piterková a kol., 2005; Kranner a Birtić, 2005). SOD se vyskytuje ve striktně a fakultativně aerobních organismech, konkrétně je možné ji detekovat v cytoplazmě, peroxizomech, chloroplastechnebo mitochondriích. SOD katalyzuje přeměnu

KOPIE

superoxidového radikálu na peroxid vodíku ($2\ O_2^{\cdot -} + 2H^+ \leftrightarrow 2H_2O_2 + O_2$). CAT se vyskytuje peroxizomech všech aerobních eukaryot a je možné rozlišit její tři isoformy - CAT1, CAT2 a CAT3, které se liší pouze svým výskytem. CAT1 je lokalizována v listech, kde napomáhá odstraňování H_2O_2 během fotorespirace, CAT2 se vyskytuje především v cévních svazcích a CAT3 se nachází v glyoxysomech semen a mladých semenáčků. CAT se vyznačuje dvojím typem aktivity, katalázovou a peroxidázovou. V případě katalázové aktivity katalyzuje CAT přímý rozklad peroxidu vodíku, zatímco v případě peroxidázové aktivity se jedná o oxidaci methanolu, ethanolu, formaldehydu nebo formátu. Na zamezení peroxidace membránových lipidů se podílí skupina enzymů glutathionperoxidáz, které využívají glutathion jako redukční činidlo pro katalýzu redukce H_2O_2. Glutathion je využíván i enzymy askorbát-glutathionového cyklu, které kromě něj používají i kyselinu askorbovou. Tyto enzymy se vyskytují tam, kde není přítomna CAT. Mezi enzymy askorbát-glutathionového cyklu patří např. askorbátperoxidáza (APOX, EC 1.11.1.11) nebo glutathionreduktáza (GSNOR, EC 1.6.4.2) (Piterková a kol., 2005).

ROS jsou v buňkách hub produkovány, stejně jako v případě rostlinných buněk, běžným metabolismem. Vývoj hub je také bezprostředně ovlivňován fyzikálními a chemickými stresovými faktory a toxicita ROS při extrémních koncentracích byla popsána. V minulosti bylo provedeno velké množství studií zabývajících se produkcí ROS v interakcích hostitel-parazit (vyšší rostlina - houba), ve kterých byl prokázán nárůst hladiny ROS v souvislosti s infekcí. Nicméně role houby (parazita) jako možného zdroje ROS byla opomíjena. Teprve až po pozorování aktivity samotné houby mimo hostitelskou rostlinu byl získán důkaz toho, že se houba podílí na tvorbě ROS společně s rostlinou. Jako příklad je možné uvést spory *Magnaporthe grisea*, která způsobuje mykózu rýže. Na povrchu zdravého listu rýže byla prokázána velmi nízká produkce peroxidu vodíku nebo superoxidového radikálu, ale den po infikování listu byl zaznamenán prudký vzrůst produkce obou molekul. Spory klíčící ve vodě odděleně od rostliny produkovaly ROS se stejnou nebo dokonce vyšší intenzitou než sporami infikované listy. Patogenní houby produkují tyto látky pro usnadnění průniku přes mechanické bariéry hostitelské rostliny (buněčná stěna apod.). Ke zvýšení hladiny ROS dochází i v případě reakce patogena na fungicid. Pokud dojde ke kontaktu fungicidu s houbovým patogenem, zvýší se intracelulární produkce ROS, které pak blokují elektronový transport (Gessler a kol., 2007). Příkladem je fungicid SSF126 známý jako metominostrobin, jehož účinnou látkou je derivát

KOPIE

strobilutinu A, který inhibuje růst mycelia vyšších hub *in vitro* tím, že blokuje dýchací řetězec v mitochondriích. Fungicid SSF126 je účinně používaný proti *M. grisea*, původci mykózy rýže (Iwai a kol., 2006).

Vysychání a rehydratace lišejníků je další proces, ve kterém mají ROS významnou úlohu. Rychlost obnovy fyziologických funkcí, např. fotosyntézy, po vysušení úzce souvisí s mechanismy odstraňujícími ROS. S obnovou také souvisí rehydratace, nicméně ta není přímo úměrná obnově biochemických procesů. Tvorba ROS probíhá během rehydratace lišejníků ve dvou fázích: iniciační fáze má exponenciální charakter a trvá přibližně 20-30 min, zatímco druhá fáze je lineární (Catalá a kol., 2010). V případě izolované řasy *Trebouxia excentrica*, fotobiontu lišejníku *Cladonia vulcani*, došlo ke kompletní rehydrataci mnohem dříve než k obnově systému antioxidační obrany na níž se podílejí α-tokoferol, β-karoten a další látky (Kranner a kol., 2005). Bylo také prokázáno, že antioxidační ochrana neporušeného lišejníku *C. vulcani* je účinnější než ochranné mechanismy obou izolovaných symbiontů. Samostatně rostoucí *T. excentrica* a *Cladonia* sp. (mykobiont lišejníku *C. vulcani*) jsou sice schopné přežít vysušení, ale dochází u nich k poškození fotoprotektivních mechanismů a odbourávání ROS. Naopak v případě kompletního lišejníku k poškození nedochází, což vede k závěru, že lichenizace je proces, který ze dvou méně tolerantních druhů vytváří organismus schopný odolat zvýšenému oxidativnímu stresu vlivem vysychání (Kranner a kol., 2005). Obecně lze říct, že ROS a antioxidační systém, který reguluje jejich hladinu, jsou faktorem, jež lišejníkům, ale i vyšším rostlinám a semenům, uděluje stupeň tolerance k vysušení. Rostlina je schopná přežít vysušení tak dlouho, dokud nedojde ke zhroucení antioxidačního systému a fotoprotektivních procesů, k čemuž může dojít i po úspěšné rehydrataci. Semena jsou schopná přežít ve vysušeném stavu až 1000 let (posvátný lotos ze dna starověkého jezera v Číně), nicméně po vyklíčení se jejich vysoká tolerance k vysušení ztrácí (Kranner a Birtić, 2005).

Hlavním faktorem rozhodujícím o toxicitě ROS je samozřejmě jejich koncentrace v buňkách, ale i rovnováha mezi množstvím pro-oxidantů a antioxidantů. Pokud je množství volných radikálů vysoké a překoná veškeré antioxidační překážky, dochází k oxidativnímu poškození buňky (Catalá a kol., 2010). V případě peroxidu vodíku má tato závislost široké rozmezí. Byl testován vliv H_2O_2 o koncentracích 10^{-2}, 10^{-5}, 10^{-12} a 10^{-15} M. Při poklesu koncentrace H_2O_2 z 10^{-2} na 10^{-5} M byl pozorován i pokles jeho účinku. Zatímco při koncentraci

KOPIE

10^{-2} M téměř úplně potlačoval klíčení *Magnaporthe grisea*, při koncentraci 10^{-5}M byl jeho efekt minimální. Překvapivé bylo, že se toxicita H_2O_2 projevila při koncentraci 10^{-12} M a opět vymizela při koncentraci 10^{-15} M. Protože se toxicita peroxidu vodíku objevila i při velice nízké koncentraci, předpokládá se, že potlačení klíčení vlivem H_2O_2 je až jeho sekundární funkcí. Otázkou zůstává, proč H_2O_2 nebyl toxický při koncentraci 10^{-5} M. Pravděpodobným vysvětlením je, že při této koncentraci není peroxid schopen způsobit v buňkách tak velké škody, aby bylo klíčení potlačeno. Na druhou stranu je jeho hladina ale příliš vysoká na to, aby se mohl účastnit regulačních procesů. Regulační funkce H_2O_2 se neprojevují jenom v jednotlivých buňkách, ale i v případě celých populací. V této situaci je ale podstatným faktorem i hustota samotné populace v suspenzi. V obou extrémech, tedy v příliš husté nebo naopak v příliš zředěné suspenzi, dochází k potlačení klíčení. V případě hustých suspenzí je tento jev snadno vysvětlitelný. Dochází totiž k rychlému vyčerpání zdrojů živin a zároveň k intoxikaci populace vlastními metabolity. Naopak u zředěných suspenzí je vysvětlení složitější. Roli hraje pravděpodobně rovnováha mezi hladinou ROS a hladinou antioxidantů. Pokud jsou oba typy látek v rovnováze, nemůže pozorovat žádné změny v klíčení. Pokud jsou antioxidanty v nedostatku, může dojít k potlačení klíčení, což je pravděpodobně i případ zředěných suspenzí spor (Gessler a kol., 2007).

Kromě klíčení ovlivňuje intenzita tvorby ROS i diferenciaci hub. Nárůst koncentrace ROS je většinou doprovázen zastavením růstu a způsobuje morfologické změny, které vedou k adaptaci buňky na změnu podmínek okolí. Nicméně mnohá experimentální data poukazují na vztah mezi nárůstem koncentrace intracelulárních ROS a spuštěním diferenciačního procesu. Ve studiích s *Dictyostelium discoideum* (dříve řazené mezi houby, nově mezi prvoky) bylo pozorováno, že zvýšená koncentrace intracelulárního i extracelulárního superoxidového radikálu způsobilo shlukování myxaméb a jejich následnou diferenciaci. Shlukování bylo přidáním "lapačů" tohoto radikálu potlačeno (Gessler a kol., 2007).

3.3.2 Aktivní formy dusíku

Oxid dusnatý (NO) je známý především z živočišné říše jako signální molekula, která hraje důležitou roli při zánětech a trombózách, výrazně se podílí na vazodilataci, imunitní odpovědi nebo neurotransmisi. U rostlin je NO zapojen spolu s aktivními formami kyslíku

KOPIE

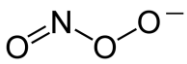
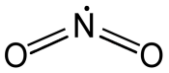
do fyziologických procesů jako je klíčení, senescence či tvorba kořenů a do odpovědi na stres spuštění programované buněčné smrti (Wendehenne a kol., 2004). V živočišných buňkách je NO tvořen enzymem NO-syntázou (NOS), který se vyskytuje ve třech formách, neuronální (nNOS), indukovatelná (iNOS) a endoteliální (eNOS). Všechny tyto tři formy oxidují L-arginin na L-citrulin a NO. Co se týká buněk rostlinných, popisuje se tvorba NO dvěma způsoby, neenzymově a enzymově. Za enzymový zdroj NO v rostlinách byla považována NAD(P)H-dependentní nitrát reduktáza (NR), která např. v obilkách kukuřice za aerobních podmínek redukuje O_2 na $O_2^{\cdot-}$, který následně reaguje s NO za vzniku peroxinitritu ($ONOO^-$). Takto produkovaný $ONOO^-$ se podílí na oxidativním poškození buňky v případě hromadění NO_2^-. Přestože byla NR považována za možný zdroj NO, mnohem častěji se začaly objevovat poznatky o tom, že i u rostlin existuje enzym podobný živočišné NOS. V řadě rostlin byla totiž detekována aktivita enzymu analogického NOS (NOS-like enzyme), který způsoboval tvorbu L-citrulinu z L-argininu a zároveň reagoval na inhibitory živočišné NOS. Použitím protilátek proti živočišným NOS a následnou imunolokalizací pomocí elektronové mikroskopie byla zjištěna přítomnost NOS-like proteinu v matrix peroxizomů a chloroplastů v buňkách listu hrachu. Navíc u kukuřice se podařilo imunofluorescenčně lokalizovat NOS-like protein v cytosolu buněk meristematické zóny a také v jádrech buněk prodlužovací zóny kořene. Typická lokalizace NOS během růstu není u živočichů známá, z čehož vyplývá, že to by mohla být vlastnost NOS-like enzymu specifická pro rostliny (Wendehenne a kol., 2001).

Třetím enzymovým zdrojem NO v rostlinách je enzym nitrit:NO reduktáza (NiNOR), která katalyzuje redukci dusitanu na NO. NiNOR byla popsána v plazmatické membráně kořenových buněk tabáku, z čehož byl vyvozen předpoklad, že se podílí na vývoji kořenového systému rostliny a interakcích s půdními bakteriemi na povrchu kořenů (Piterková a kol., 2008).

Neenzymová dráha tvorby NO rostlinami zahrnuje dva mechanismy. V prvním mechanismu hraje hlavní úlohu hodnota pH. Při fyziologických hodnotách pH může kyselina askorbová neenzymově redukovat dusitan na NO a kyselinu dehydroaskorbovou, zatímco při nízkých hodnotách pH v apoplastu je podporována redukce dusitanu, při které dusitan dismutuje na NO a dusičnan. Druhý mechanismus se týká membrán chloroplastů, v nichž dochází ke světlem zprostředkované přeměně NO_2 na NO katalyzované karotenoidy (Piterková a kol., 2008). Vybrané RNS jsou uvedeny v tabulce III.

KOPIE

Tabulka III: Popis vybraných RNS (zpracováno z více zdrojů)

Sloučenina	Zkratky	Struktura	Zdroj	Biologický účinek
Oxid dusnatý	$NO^{\cdot}$		NOS (EC 1.14.13.39) katalyzuje oxidaci L-argininu na L-citrulin a NO , nitrit:NO reduktáza katalyzuje redukci dusitanu na NO	U živočichů má svoji úlohu při zánětech, trombózách, vasodilataci, neurotransmisi. U rostlin v procesech klíčení, senescenci, reakci na stres a společně s ROS zapojen do programované buněčné smrti.
Peroxynitrit	$ONOO^-$		NR (EC 1.7.1.1.) katalyzuje redukci O_2 na $O_2^{\cdot -}$, který dále reaguje s NO za vzniku peroxynitritu	Cytotoxické účinky, oxidační poškození buňky v případě hromadění nitrace aminokyselin (tyrozin), nejreaktivnější ze všech RNS
Oxid dusičitý	$NO_2^{\cdot}$		Samovolná oxidace oxidu dusnatého, dehydratace kyseliny dusičné oxidem fosforečným	Dráždivé účinky na dýchací cesty, může způsobit plicní poškození, podíl na vzniku smogu
Kyselina dusitá	HNO_2	H-O-N=O	Reakcí oxidu dusitého s vodou	Společně s dusitany (její soli) způsobuje zvracení, bolesti hlavy a břicha, cyanózu, bezvědomí. Patří mezi karcinogeny. Smrtelná dávka jsou 4 g.Oxidace hemoglobinu na methemoglobin

Vliv tvorby NO na lokální a systémové obranné mechanismy rostlin byl studován na vnímavém, středně rezistentním a vysoce rezistentním genotypu *Solanum* spp. po napadení původcem padlí rajčat *Oidium neolycopersici*. Byla zjištěna dvoufázová tvorba NO u obou rezistentních genotypů. Maxima a minima obou fází tvorby NO se ale lišila. V případě vysoce rezistentní rostliny bylo dosaženo maximální hladiny NO po 8 h po inokulaci (hpi) patogenem, zatímco maximální hodnota u středně rezistentní rostliny byla zaznamenána mezi 24 a 48 hpi. Druhá fáze tvorby NO u obou rezistentních genotypů byla totožná a hladina NO byla po 96 h od inokulace konstantní. Tvorba NO v případě vnímavé rostliny byla pozorována v rozmezí od 4 do 8 hpi. Nepodařilo se od sebe oddělit pletivo hostitele a mycelium biotrofního patogena, aniž by došlo k jejich poškození, a tím bylo znemožněno rozlišení NO produkovaného hostitelem a NO produkovaného patogenem. Kromě NO byly v listech *Solanum* spp. detekovány i H_2O_2 a $O_2^{\cdot -}$, k jejichž uvolnění dochází pravděpodobně při zvýšené hladině NO. Společně tyto sloučeniny sice přímo nezpůsobují hypersenzitivní reakci (HR) rostliny, ale hrají důležitou úlohu v indukci apoptózy a významně ovlivňují rezistenci *Solanum* spp. k *O. neolycopersici* (Piterková a kol., 2009). Schematické znázornění drah NO v procesu napadení rostlinné buňky patogenem je na obrázku 7.

KOPIE

Úzkou spolupráci mezi NO a H_2O_2 a jejich vliv na hypersenzitivní reakci hostitelské rostliny, penetraci a klíčení houbových patogenů potvrdila i studie provedená s *Lactuca* spp. napadenými původcem plísně salátové, *Bremia lactucae*. NO společně s H_2O_2 zpomalují průnik patogena do listů rostliny a jeho rozrůstání. Přibližně 6 h před patrnými známkami nekrózy byl zaznamenán vzrůst hladiny NO, který by měl předcházet tvorbě H_2O_2. Úloha NO byla studována použitím 0,1mM SNP (donoru NO), 0,1mM PTIO (lapače NO), 0,1mM rutinu (lapač NO / ROS), 1mM L-NAME (inhibitor NOS) a 5mM Na_2WO_4 (inhibitor NR). Zatímco použití L-NAME a Na_2WO_4 nemělo významný efekt na klíčení *B. lactucae* na náchylném genotypu *L. sativa*, v případě použití SNP a rutinu došlo ke snížení úspěšnosti penetrace patogena. HR byla vlivem SNP (sodium nitroprusside), PTIO a L-NAME snížena u rezistentní *L. virosa*, naopak ve vzorcích téže rostliny ošetřených rutinem byla HR výraznější. NO byl lokalizován histochemicky pomocí DAF-FM DA. Intenzivní fluorescenční signál byl zaznamenán ve špičkách klíčních vláken *B. lactucae* a v penetrovaných buňkách, ve kterých probíhala HR (Sedlářová a kol., 2011).

NO jako takový nebyl zatím v houbách přímo detekován. Nicméně vliv exogenního NO na vývoj i klíčení hub byl potvrzen experimenty, ve kterých klíčení a vývoj konidií *Colletotrichum coccodes* inhiboval přídavek SNP. Účinek SNP na klíčení a vývoj byl ale závislý na koncentraci, 1 mM a 500 μM SNP klíčení zcela zastavily, ale 100 μM SNP, klíčení pouze opozdilo. Naopak konidie *C. coccodes* ošetřené inhibitory NOS (1mM L-NMMA, L-NNA) klíčily intenzivněji při porovnání s kontrolou rostoucí ve vodě (Wang a Higgins, 2005).

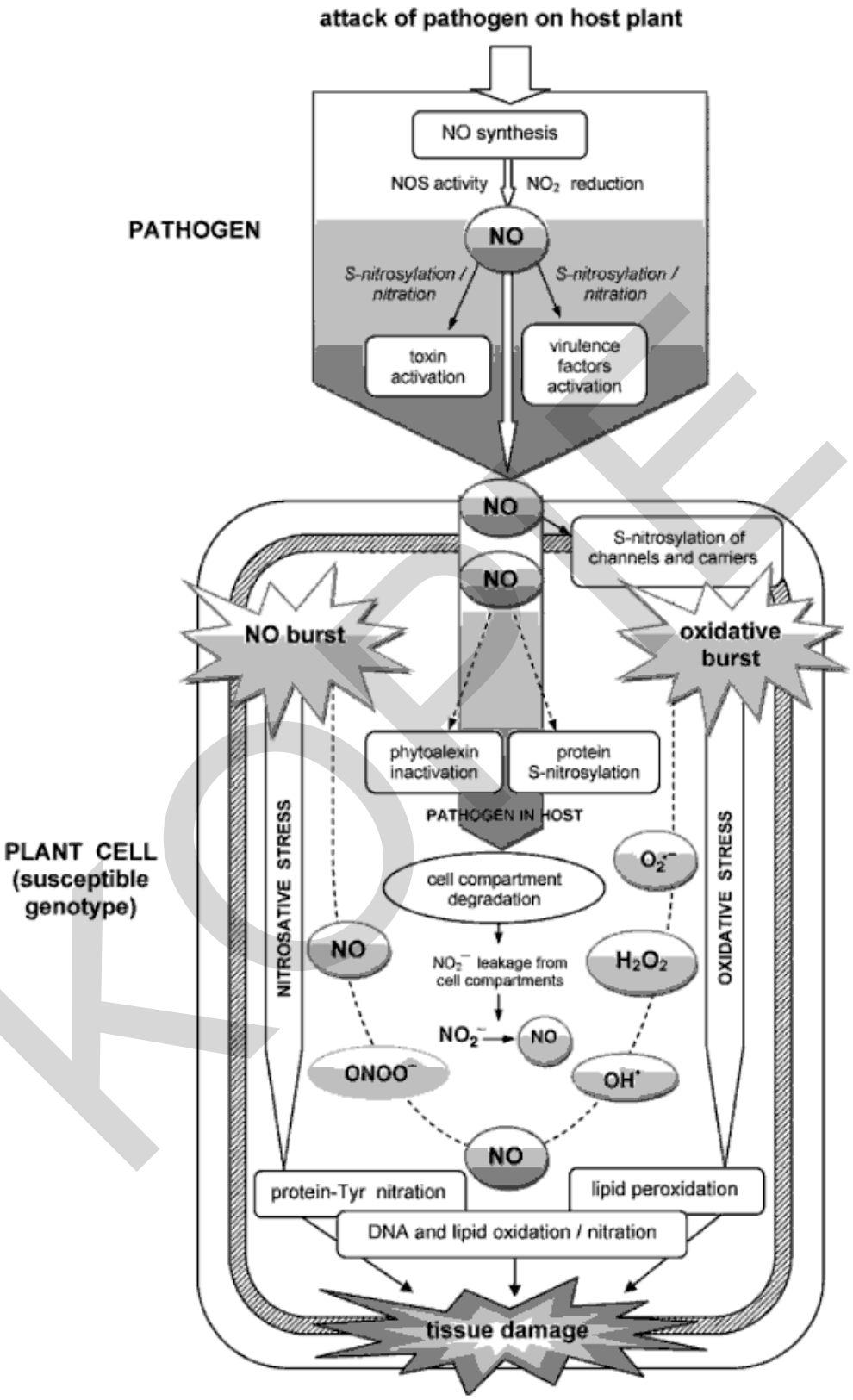
Bylo prokázáno, že v případě samostatně rostoucích jedlých hub *Flammulina velutipes* se NO podílí na důležitých procesech jako je diferenciace, růst a tvorba plodnice (Song a kol., 2000). Je pravděpodobné, že v případě lišejníků je jeho role podobná. Lišejníky jsou složené organismy tvořené fotobionty (jednobuněčnou zelenou řasou = fykobiont nebo sinicí = cyanobiont) a mykobiontem (houbou). Během života lišejníků se často střídají období vysušení s nízkou metabolickou aktivitou a období hydratace, kdy je intenzita jejich metabolismu vysoká. Lišejníky se adaptovaly na tyto dva extrémy, nicméně mechanismy probíhající během cyklů de- a rehydratace jsou jen málo prostudovány. NO se v těle lišejníků podílí na řadě fyziologických procesů. V těle houby reguluje růst a tvorbu plodnic. V těle řasy je zapojen do procesu fototaxe a odpovědi na stres. Experimenty s *Ramalina lacera* potvrdily, že kromě uvedených funkcí

KOPIE

se NO významně podílí i na rehydrataci lišejníku, resp. rehydratace je příčinou prudkého nárůstu produkce NO, který byl ale detekován konfokální mikroskopií pouze v hyfách mykobionta (Weissman a kol., 2005). Maximální hodnoty NO byly naměřeny 2h po rehydrataci, zatímco po 4h hladina NO klesla na minimum, tedy ještě níž než byla koncentrace před rehydratací. Při experimentech, ve kterých byla stélka lišejníku rehydratována roztokem obsahujícím c-PTIO (lapač NO) byl zaznamenán nejen významný pokles fluorescenčního signálu DAN v důsledku eliminace NO, ale i změna v hladině ROS. Byl zaznamenán nárůst tvorby ROS ve dřeni i v kortexu lišejníku, zároveň však byla potlačena počáteční exponenciální fáze produkce ROS. Nejvyšší stupeň peroxidace lipidů byl zaznamenán 2h po rehydrataci. Naopak ke snížení peroxidace na minimum došlo po 4h po rehydrataci (Catalá a kol., 2010). Podle práce Catalá a kol. (2010) NO hraje významnou roli v regulaci peroxidace lipidů a foto-oxidativního stresu fotobionta během rehydratace. Na základě změny fotosyntetické aktivity fotobionta po inhibici NO byl vysloven předpoklad, že NO je zapojen do stabilizace fotosystému II (PS II). Co se týká lokalizace molekul NO, jejich nejvyšší koncentrace byla pozorována ve dřeňové části lišejníku *Ramalina farinacea*, zatímco nejvyšší množství molekul ROS bylo lokalizováno v kortexu (Catalá a kol., 2010).

Vzhledem k vysoké reaktivitě je experimentální detekce a kvantifikace NO *in vivo* obtížná. Metody používané u rostlin pocházejí ze studií prováděných v živočišných systémech a jsou upravovány na podmínky rostlinných pletiv (Piterková a kol., 2008). Metod pro stanovení koncentrace NO existuje celá řada, např. laserová fotoakustická spektroskopie, hmotnostní spektrometrie, chemiluminiscence nebo histochemická detekce pomocí mikroskopie. V ideálním případě by měla metoda pro stanovení NO vykazovat vysoký stupeň citlivosti, specifičnosti a měla by umožnit měření hladiny intra- a extracelulárního NO a to jak v plynné tak v kapalné fázi. Bohužel, žádná ze zmiňovaných metod nesplňuje všechny tyto požadavky (Vandelle a Delledonne, 2008).

KOPIE



Obr. 7: Schematické znázornění dráhy NO v rostlinné buňce napadené patogenem. (Převzato z: Floryszak-Wieczorek, J. a Arasimowicz-Jelonek, M., 2010)

3.4 Charakteristika modelových organismů

Jako modelové organismy pro studium lokalizace RNOS byly vybrány vřeckovýtrusé houby z čeledi *Morchellaceae,* (taxonomie, viz tabulka IV), konkrétně spory smrže kuželovitého, *Morchella conica*, a kačenky české, *Ptychoverpa bohemica*. Třída *Pezizomycetes* zahrnuje pouze jediný řád *Pezizales*. Je to početný řád, jehož zástupci vytvářejí plodnice typu apothecií, vzácně kleistothecií s unitunikátními, operkulátními vřecky (Kalina a Váňa, 2005). Smržovité houby rostou od března do konce května. Nejčastěji je můžeme najít v polo zastíněných hájích, sadech, na zahradách, pod osikami či třešněmi, ale i v parcích či nových výsadbách s dřevní štěpkou. Výjimkou nejsou ani spáleniště. Teorie říká, že smrže začínají růst, pokud nejméně tři dny po sobě noční teploty neklesají pod 5°C a denní teploty se pohybují nad 15°C, ideálně okolo 20°C (Havránek, 2007). Dalšími indikátory, podle kterých je možné odhadnout správnou dobu pro růst smržů, je začátek květu fialek, růstu cibulovin a rozpuku prvních pupenů a stromů.

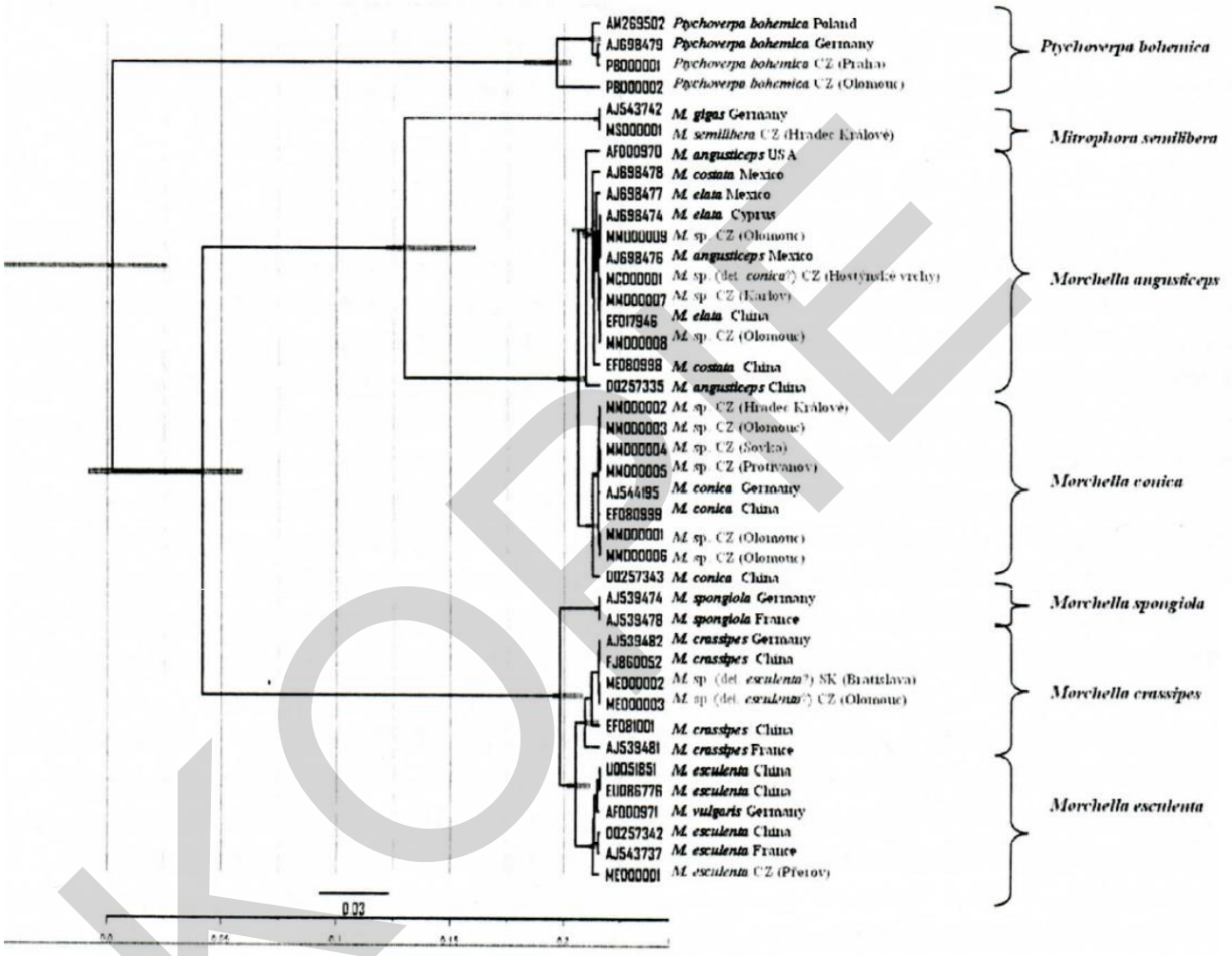
Tabulka IV: Taxonomické zařazení smržovitých hub (upraveno dle: Kalina a Váňa, 2005)

Taxon	Název taxonu
Říše	*Fungi*
Oddělení	*Ascomycota*
Pododdělení	*Pezizomycotina*
Třída	*Pezizomycetes*
Řád	*Pezizales*
čeleď	*Morchellaceae*

Smržovité houby se šíří fermentovanou zahradnickou štěpkou a jejich výskyt je efemérní, což znamená, že zatímco v jedné sezóně jich může na jedné lokalitě vyrůst obrovské množství, další rok nemusí na tom samém místě vyrůst vůbec nic. Skupina smržovitých hub vykazuje velikou morfologickou variabilitu, a to i v případě hub rostoucích v jedné lokalitě (Havránek a kol., 2009), což výrazně ztěžuje jejich taxomické zařazení podle vzhledu. Díky této variabilitě můžeme pouze v rodu *Morchella* rozlišit 3 až 30 různých druhů smržů. Byla ale provedena fylogenetická analýza českých a světových izolátů zahrnující sekvenaci 5.8-ITS2 (internal transcribed spacers) regionů genomů a srovnávací analýzu se světovou databází sekvencí (EMBL, program Beast 1.4.8), jejímž výsledkem je fylogram českých a světových izolátů smržovitých hub (obrázek 8), který rozděluje izoláty rozděluje do sedmi skupin. Nicméně do skupin *M. conica* a *M. agnusticesp* jsou zařazeny i taxonomicky nezařazené izoláty, proto

KOPIE

se hovoří pouze o pěti geneticky vzdálených skupinách v rámci rodu *Morchella* (Ondřej a kol., 2009). Jednoduššího taxonomického rozdělení smržovitých hub je tedy docíleno pomocí fylogenetické analýzy, než na základě morfologie.



Obr. 8: Fylogram českých a světových izolátů smržovitých hub (Převzato z: Ondřej a kol., 2009).

Smrže není jednoduché hledat, ale je relativně jednoduché je poznat. Mají charakteristický vzhled plodnic (askokarpů), které dorůstají do výšky až 300 mm (Kopecký, 2008). Na první pohled zaujme vejčitý, soudkovitý nebo kulovitý "klobouk" okrové, žlutavé až nahnědlé barvy. Na klobouku je nápadné velké množství žeber a prohlubní, jejichž uspořádání a tvar jsou velmi proměnlivé. Třeň, stejně jako klobouk, je dutý a lámavý, nejčastěji bílý či světle hnědý a srostlý s okrajem klobouku. I přes charakteristický vzhled smržů je při jejich sběru nutné dávat si pozor,

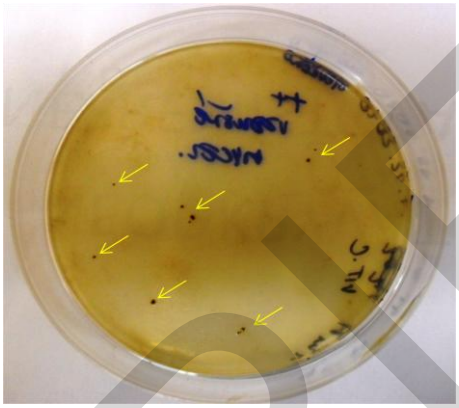
KOPIE

aby nedošlo k záměně s velice podobným, ale jedovatým ucháčem obecným, *Gyromitra esculenta* (Havránek, 2007). Spory smržovitých hub jsou velice odolné. V suchém stavu jsou schopny, stejně jako mikrosklerocia, vydržet teploty až 89°C nebo expozici 3% peroxidem vodíku po dobu jedné hodiny. V otiscích otiscích vyzrálých plodnic je možné výtrusy uchovávat při laboratorní teplotě až po dobu tří let, aniž by došlo k omezení jejich klíčivosti. Při kontaktu s vodou jsou ale schopny vyklíčit během tří hodin (Havránek a kol., 2009).

Smržovité houby se rozmnožují nepohlavním i podstatně složitějším pohlavním způsobem. Nepohlavní rozmnožování se děje nepravidelně produkovanými konidiemi, asexuálními sporami, které se tvoří na konidioforech. Konidie při styku s vodou prakticky okamžitě klíčí. Z genetického pohledu jsou konidie diploidní, tedy mají kompletní genetickou výbavu, a jsou identické s myceliem, ze kterého vznikly. Naproti tomu pohlavní spory (askospory) nesou pouze poloviční genetickou výbavu, jsou haploidní. Příčinou je redukce genetické během procesu meiózy, ke kterému dochází v ascích (vřeckách) umístěných na dnech prohlubní na klobouku. Pohlavní spory jsou morfologicky identické, ale fyziologicky rozlišené na +/-. Z haploidních askospor vyklíčí haploidní hyfy, které se dále rozrůstají v haploidní myceliumtvořící mnohojaderná gametangia. Pomocí trichogynu, vlákna na vrcholu samičího askogonu, přecházejí jádra ze samčího antheridia do askogonu, kde dojde ke spárování jader a vzniku dikaryonu. Dikaryon se následně mitoticky dělí a z askogonu vyrůstají dikaryontní hyfy, v nichž proces mitózy pokračuje. Askogenní hyfy se proplétají s hyfami sterilními a dochází ke karyogamii (splynutí jader), která je následovaná procesem meiózy a mitózy. Výsledkem je osm askospor ve vřecku, které jsou po dozrání z vřecka vystřelovány. Vřecko je operkulátní, otevírá se víčkem. Uspořádání askospor ve vřecku umožňuje studovat proces genetické rekombinace. U mnoha vřecek jsou askospory umístěny v pořadí, v jakém vznikaly z původního jádra zygoty. Jednotlivá mycelia, která vyrostla z askospor ze stejného vřecka, pak vykazují genetické rozdíly, které poskytují informace o tom, jak proběhl crossing-over a jak probíhalo řazení chromozomů v průběhu meiózy (Campbell a Reece, 2006). Z popisu vyplývá, že smrže mají multikaryotické hyfy, tzn. že v jednotlivých buňkách hyf se vyskytuje více jader. Tato jádra však nejsou pouze mnohonásobnou kopií původního jádra, ale jsou pravděpodobně geneticky heterogenní. Protože se jádra liší, nazýváme vzniklá mycelia heterokaryotická (Kopecký, 2008).

KOPIE

V životním cyklu smržovitých hub hrají významnou roli tzv. sklerocia. Sklerocia (obrázek 8) jsou tmavá klubíčka hustě svinutých a zkrácených hyf. V této podobě jsou houby schopné přečkat období nepříznivých podmínek jako je nedostatek vláhy a živin či nízké teploty. V případě, že se sklerocium dostane do příznivých podmínek, vyrůstá z něj opět vegetativní nebo také primární mycelium, což je základem pro tvorbu plodnic.



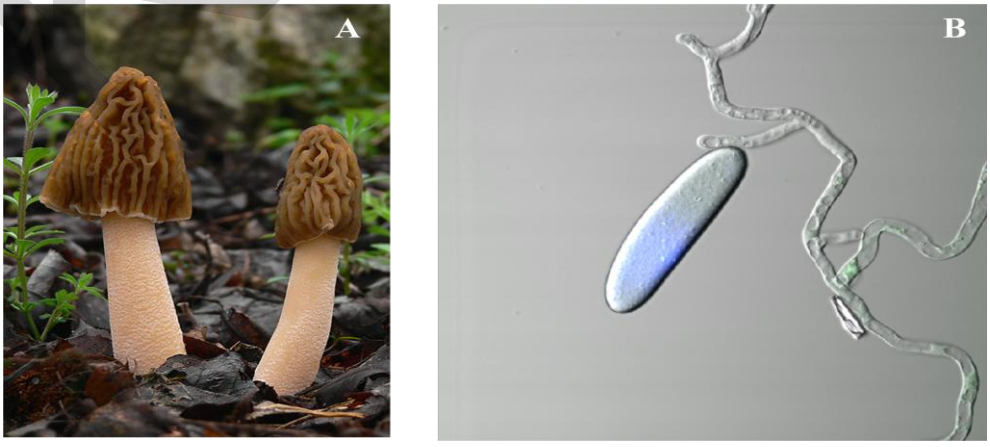
Obr. 9: *Morchella conica*, šipkami jsou označená mikrosklerocia na sladinkovém agaru

Rod *Morchella* má téměř kulovitý nebo naopak kuželovitý klobouk srostlý s třeněm. Klobouk je hluboce jamkatý (lakunózní) s žebrovitými, navzájem propojenými lištami. (Kalina a Váňa, 2005). "Systém" prohlubní a žeber na klobouku bývá velice rozmanitý, což činí taxonomům veliké potíže při zařazování smržů do jednotlivých druhů na základě morfologie. Spory smžů jsou kulovité a lehce oválné. Asi nejjednodušší je rozdělit smrže dle amerického vzoru do dvou skupin (podle tržního, resp. gastronomického využití) na smrže světlé a tmavé. Do skupiny světlých smržů se zařazují třeba smrž obecný (*M. esculenta*) nebo jedlý (*M. vulgaris*). Jako příklad tmavých smržů se uvádějí smrž vysoký (*M. elata*), špičatý nebo kuželovitý (*M. conica*, obrázek 10). Zbarvení mladých klobouků je světlé, může být šedavé, zatímco starší plodnice mají klobouky zbarveny podle druhu a to od světle hnědé, přes okrovou až po téměř černou barvu. Třeň bývá světlý a dutý stejně jako klobouk. Výška plodnice se pohybuje okolo 10-20 cm (Kopecký, 2008).

KOPIE

Obr. 10: *Morchella conica*: A) plodnice (převzato z: http://morelsandmore.com/morelpics.htm), B) klíčící spora

Kačenka česká (*Ptychoverpa bohemica*, obrázek 11) je houba, která se v prosvětlených listnatých hájích mírného pásu objevuje na jaře mezi prvními, tedy přibližně od března do dubna. Klobouk kačenky je výrazně žebernatý a matný. Jeho barva přechází od světlých odstínů hnědé až po pleťovou. Ke třeni je přirostlý pouze ve svém vrcholu jinak je volný. V průměru dosahuje klobouk velikosti od 2 do 4 cm na šířku a přibližně 4 cm na výšku. Třeň je dutý, stejně jako u ostatních smržovitých hub, i když v mládí spíše vatovitý a může dosahovat velikosti až 15 cm. Spory jsou oválné. Kačenka je snadno zaměnitelná s její vzácnější příbuznou kačenkou náprstkovitou (*Verpa conica*), jejíž klobouk je ale na rozdíl od kačenky české pouze mírně zvlněný nebo hladký. Záměna je také možná za hadovku smrdutou (*Phallus impudicus*), která ale páchne a roste v jinou dobu, nebo za smrže polovolného (*Mitrophora semilibera*), jehož klobouk je ale ke třeni přirostlý do poloviny své výšky (Chochel, 2009).



Obr. 11: *Ptychoverpa bohemica* A) plodnice (převzato z: www.nahuby.sk), B) mycelium a nevyklíčená spora

KOPIE

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Příprava růstového média pro klíčení spor

Pro studium vlivu RNOS bylo použito jednoduché kultivační medium osahující 1% agarózu (Agar-Agar SERVA, Feinbiochemica Heidelberg). Agaróza, která byla rozvařena v mikrovlnné troubě, byla nanesena po 350 µl na podložní skla do tvaru obdélníku o velikosti cca 1,7 x 3,5 cm. Takto připravená podložní skla byla krátkodobě skladována ve vlhké komůrce (jakákoli uzavíratelná nádoba s proužky vlhké buničiny po obvodu). Pro experimenty prováděné na konfokálním mikroskopu byl objem média na podložním skle zmenšen na 300 µl.

Do 1,5ml mikrozkumavek byly připraveny suspenze výtrusů modelových hub (viz tabulka V) v 50 µl destilované vody (kontrola), či 0,1 a 1,0mM roztoku modulátorů koncentrace reaktivních forem dusíku - RNS a kyslíku - ROS (viz tabulka VI). Výtrusy hub byly do mikrozkumavek přeneseny ze sporového izolátu na alobalu pomocí bakteriologické kličky. Na každé podložní sklo s 1% agarózou bylo napipetováno 25 µl dané suspenze.

Tabulka V: Použité modelové houby z čeledi *Morchellaceae*

Houba	**Označení izolátu**	**Místo nálezu**	**Sběratel**	**Datum sběru**
Morchella conica	254 KIP	?	M. Kitner	21.4.2010
Ptychoverpa bohemica	251 LIB	Libina	P. Havránek	17.4.2010

Tabulka VI: Postup přípravy roztoků modulátorů hladiny RNS a ROS

Látka	**Typ modulátoru**	**Molekulární hmotnost**	**Rozpouštěné množství**	**Objem rozpouštědla (destilovaná H_2O)**	**Konc. zásobního roztoku [mM]**
H_2O_2	donor ROS	8,34	0,0113 ml*	10 ml	10
Kyselina askorbová (vitamin C)	lapač ROS (antioxidant)	176,12	6,16 mg	350 µl	100
Imidazol	lapač ROS	68,08	2,38 mg	350 µl	100
GSNO	donor RNS	336,32	1,18 mg	350 µl	10
c-PTIO	lapač RNS	315,4	3,15 µl (z 31,7mM alikvotů)	100 µl	1

*) množství se odebírá z 30% komerčně dostupného roztoku peroxidu vodíku (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

KOPIE

4.1.2 Stanovení vlivu exogenních RNOS na dynamiku klíčení spor

Studium vlivu exogenních RNOS na dynamiku klíčení spor a morfologii klíčících vláken hub *Morchella conica* a *Ptychoverpa bohemica* bylo provedeno na podložních mikroskopických sklech s růstovým médiem, na které byly napipetovány roztoky obsahující spory hub a modulátory koncentrace RNS a ROS (koncentrace 0,1 mM a 1,0 mM). Po 24h inkubaci ve tmě ve fytotronu při teplotách 15°C a 10°C střídajících se ve 12h periodách byla pomocí fluorescečního mikroskopu Olympus BX60 při zvětšení 100x až 200x a počítačového programu Olympus cellSens Standard měřena délka vyklíčených vláken obou druhů hub a byla pozorována morfologie těchto vláken - délka hlavního a protilehlého vlákna, počet větvení a délka postranních vláken. V každém experimentu bylo vyhodnoceno 100 vyklíčených výtrusů. V případě *Morchella conica* bylo hodnocení provedeno v průměru na šesti podložních sklíčkách (tři nezávislá opakování), zatímco v případě *Ptychoverpa bohemica* bylo potřeba sklíček v průměru 18. Data byla zpracována pomocí statistického programu NCSS 2007 a programu Microsoft Office Excell 2007.

4.1.3 Lokalizace molekul RNOS

Pro lokalizaci molekul RNOS byl použit konfokální laserový rastrovací mikroskop Olympus FluoView 1000 s invertovaným systémem Olympus IX 81. Pro pozorování preparátů byly využity Nomarského kontrast (DIC) a fluorescence (buzení 100W Hg výbojkou). Pro lokalizaci molekul ROS a RNS byl použit excitační argonový laser (457nm, 488 nm, 515 nm / celkový výkon 30 mW) a diodový laser (blízký UV 405nm / 20mW). Pro zobrazování a snímání preparátů byl použit počítačový software FV 1000 (Olympus, Japonsko). Pro 2,5D rekonstrukci ze sérií několika řezů byl použit počítačový software LCS Imaris 6.4. (Bitplane, Švýcarsko). Lokalizace ROS a RNS byla provedena na podložních mikroskopických sklech, na které byly napipetovány roztoky obsahující spory hub a modulátory koncentrace RNS a ROS (koncentrace 0,1 mM a 1,0 mM). Vzorky byly inkubovány po dobu 24 h ve tmě ve fytotronu při teplotách 15°C a 10°C střídajících se ve 12h periodách. Poté byly barveny fluorochromy DAF FM DA, H_2DCF DA a Hoechst 34580. Vlastnosti používaných fluorochromů jsou uvedeny v tabulce I.

Pro pozorování a lokalizaci jader byl použit 20μM roztok fluorochromu Hoechst 34580. Inkubace vzorku barveným Hoeschst 34580 probíhala ve tmě po dobu 10 min, následně byl

KOPIE

přidán fluorochrom pro lokalizaci molekul RNOS. Pro lokalizaci molekul ROS byly vzorky nabarveny 10μM roztokem fluorochromu H_2DCF DA. Inkubace vzorku po přidání 50 μl fluorochromu probíhala ve tmě po dobu 10-15min. Jako negativní kontrola byl použit vzorek, u kterého bylo provedeno předpůsobení 1,0mM askorbátem (nebo imidazolem) po dobu 15 min a teprve potom barvení fluorescenčním barvivem. Jako pozitivní kontrola sloužil vzorek, na kterém bylo provedeno 15 minutové předpůsobení 1,0mM peroxidem vodíku. Výsledná koncentrace roztoku fluorochromu H_2DCF DA byla i po přidání ke vzorku s předpůsobením stále stejná, 10 μM.

Pro lokalizaci molekul NO (resp. RNS) byly vzorky nabarveny přidáním 50 μl roztoku fluorochromu DAF-FM DA. Inkubace nabarvených vzorků probíhala ve tmě po dobu 25 min. Při pozorování na konfokálním laserovém rastrovacím mikroskopu byly použity koncentrace fluorochromu 20 a 40 μM. Jako negativní kontrola byl použit vzorek, u kterého proběhlo před obarvením předpůsobení 1,0mM roztokem c-PTIO po dobu 15min. Jako pozitivní kontrola sloužil vzorek s předpůsobením pomocí 1,0mM roztoku GSNO po dobu 15 min. Výsledná koncentrace roztoku fluorochromu byla i po přidání ke vzorku s předpůsobením stále stejná.

4.1.4 Vývoj mycelia v delším časovém horizontu

Pro pozorování vývoje mycelia modelových hub v delším časovém horizontu byl připraven sladinkový agar, a to rozpuštěním 7,5 g agaru (bobtnavost 14, Tamda, a.s., OZ Olomouc), 5 g maltózy (Mr 360,3; SERVA, Feinbiochemica Heidelberg) a 2,5 g glukózy (Lachema, Brno) v 500 ml destilované vody. Takto připravený roztok byl rozvařen a sterilizován v Erlenmayerových baňkách v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 20 min. Rozvařené médium bylo rozlito ve flowboxu do sterilních plastových Petriho misek (průměr 9 cm). Na Petriho misky bylo napipetováno 500 μl sterilizované vody obsahující výtrusy modelových hub nebo 500 μl roztoku sterilizované vody s přidaným modulátorem koncentrace ROS a RNS (koncentrace 0,1 mM a 1,0 mM). Voda byla sterilizována 20 min v autoklávu při teplotě 121°C. Po přidání suspenzí na živné médium byly Petriho misky umístěny do fytotronu pro inkubaci ve tmě při teplotě 15°C a 10°C střídajících se v periodách po 12 h. Vývoj mycelia byl pozorován po uplynutí jednoho týdnu a jednoho měsíce.

KOPIE

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení vlivu exogenních RNOS na dynamiku klíčení spor

[redacted]

Obr. 12: [redacted]

5.1.1 *Morchella conica*

[redacted]

[redacted]

Tabulka VII: [redacted]

Tabulka VIII: [redacted]

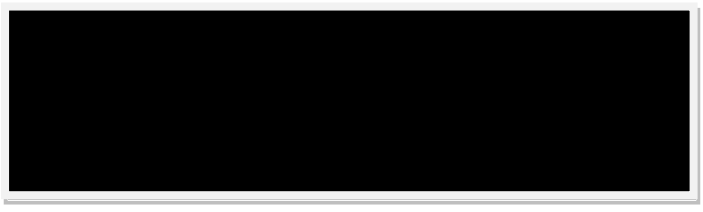
Obr. 13:

Tabulka X:

Tabulka XI: [redacted]

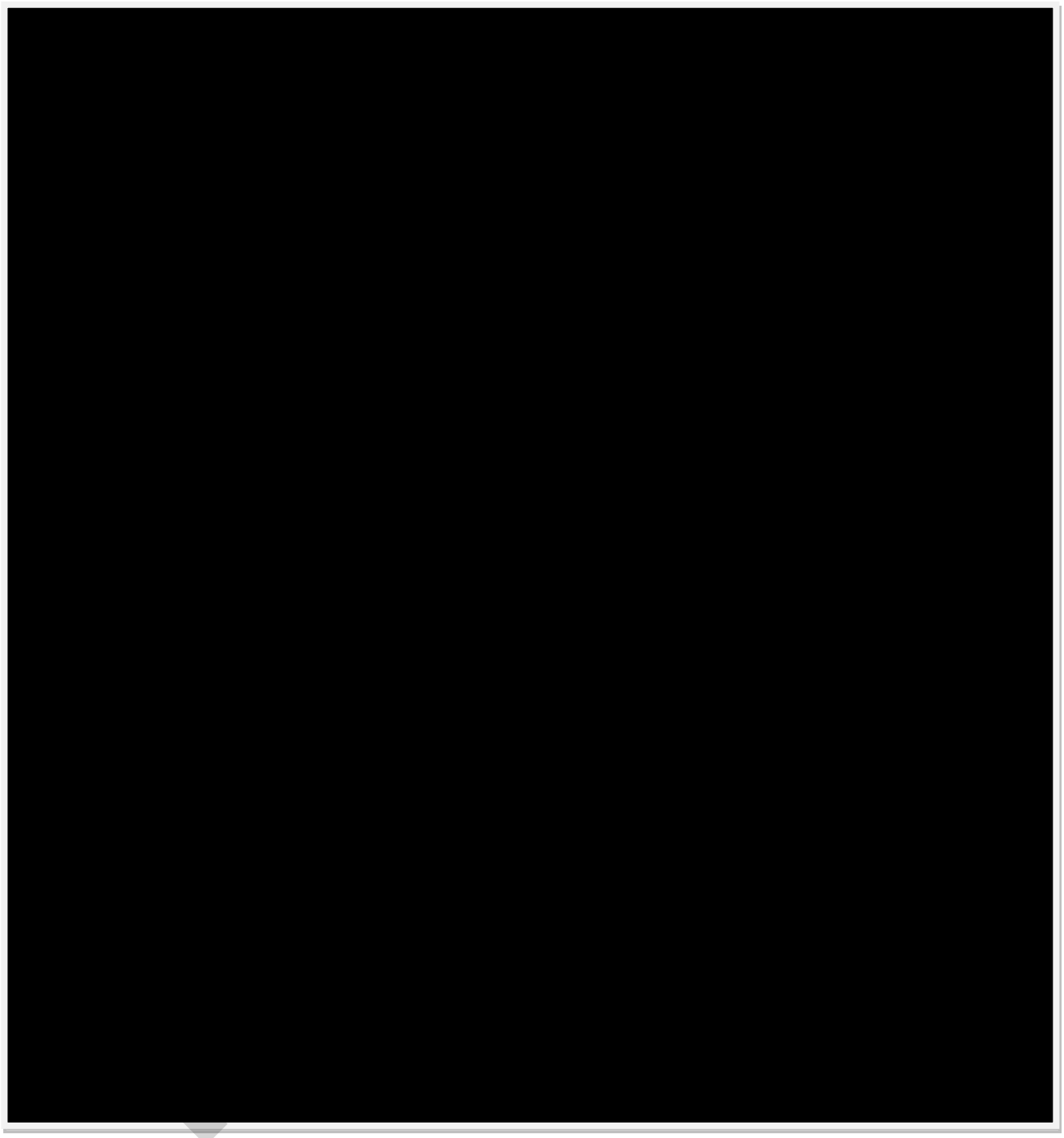
[redacted]

Tabulka XII: [redacted]

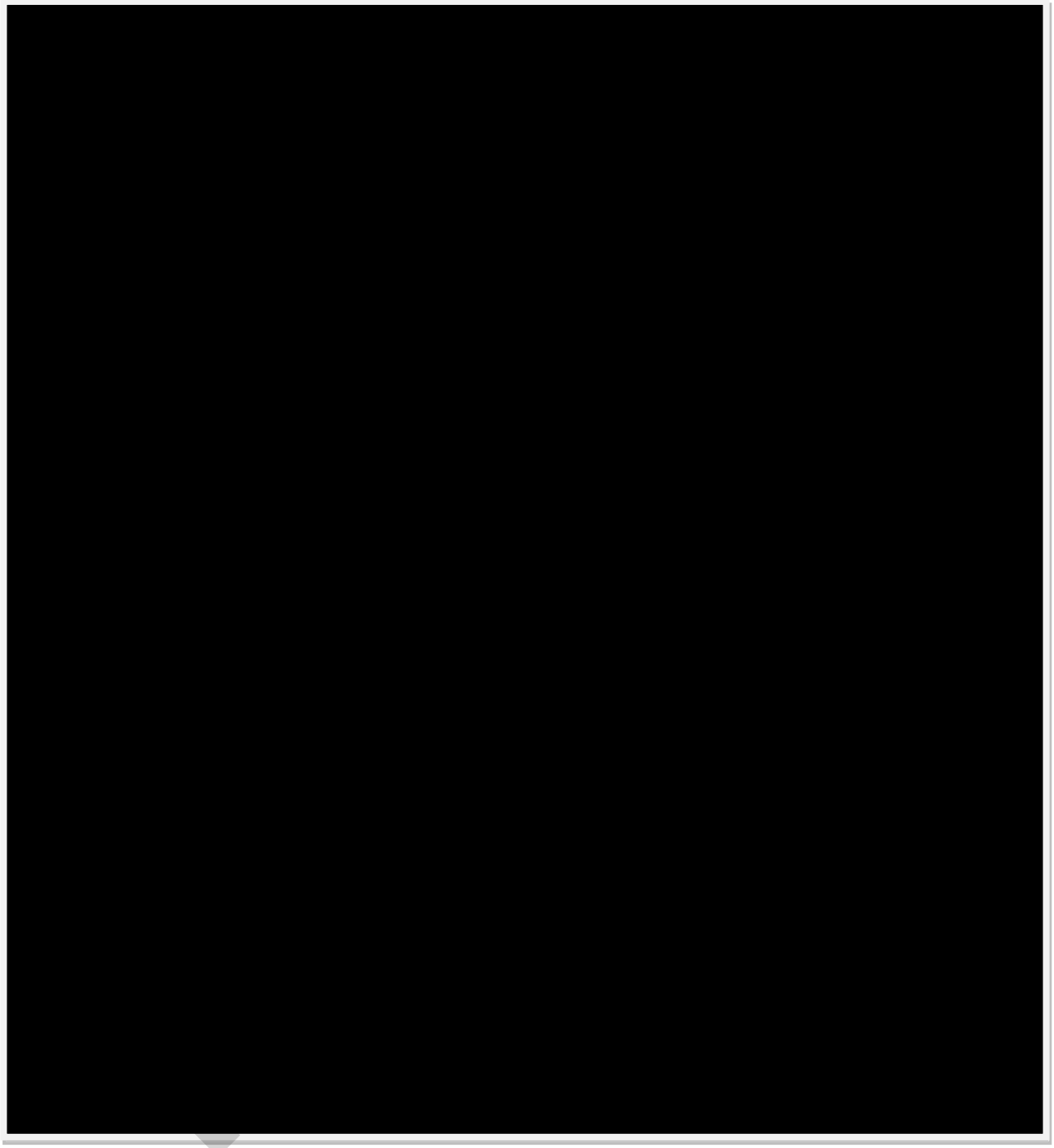


Obr. 14:

Tabulka XIII: Délka protilehlých hyf *M. conica* (popisná analýza).



Obr. 15: [redacted]



Obr. 16:

5.1.2 *Ptychoverpa bohemica*

[redacted]

Tabulka XIV: [redacted]

[redacted]

Obr. 17:

Tabulka XV: [redacted]

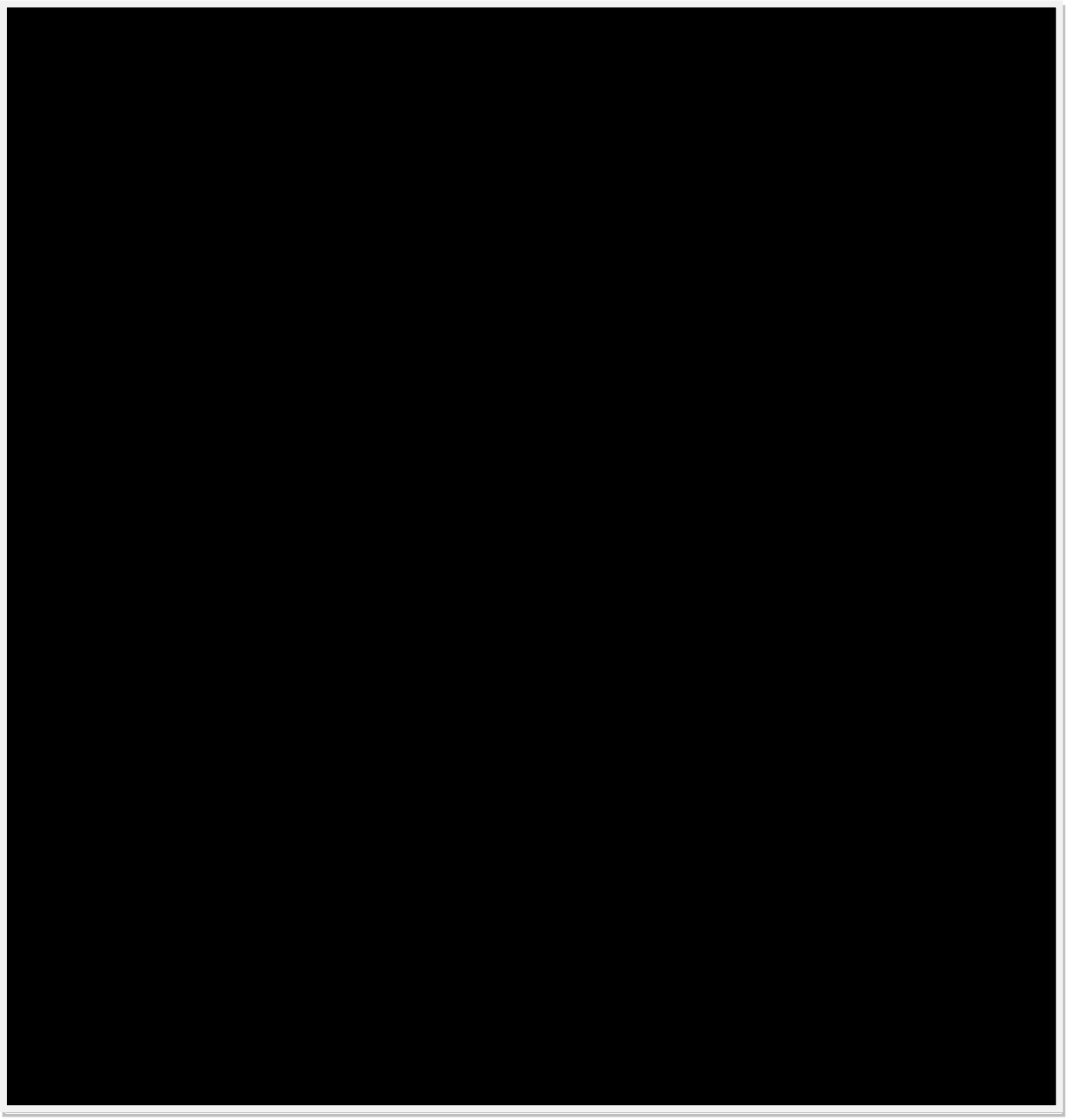
[redacted]

[redacted]

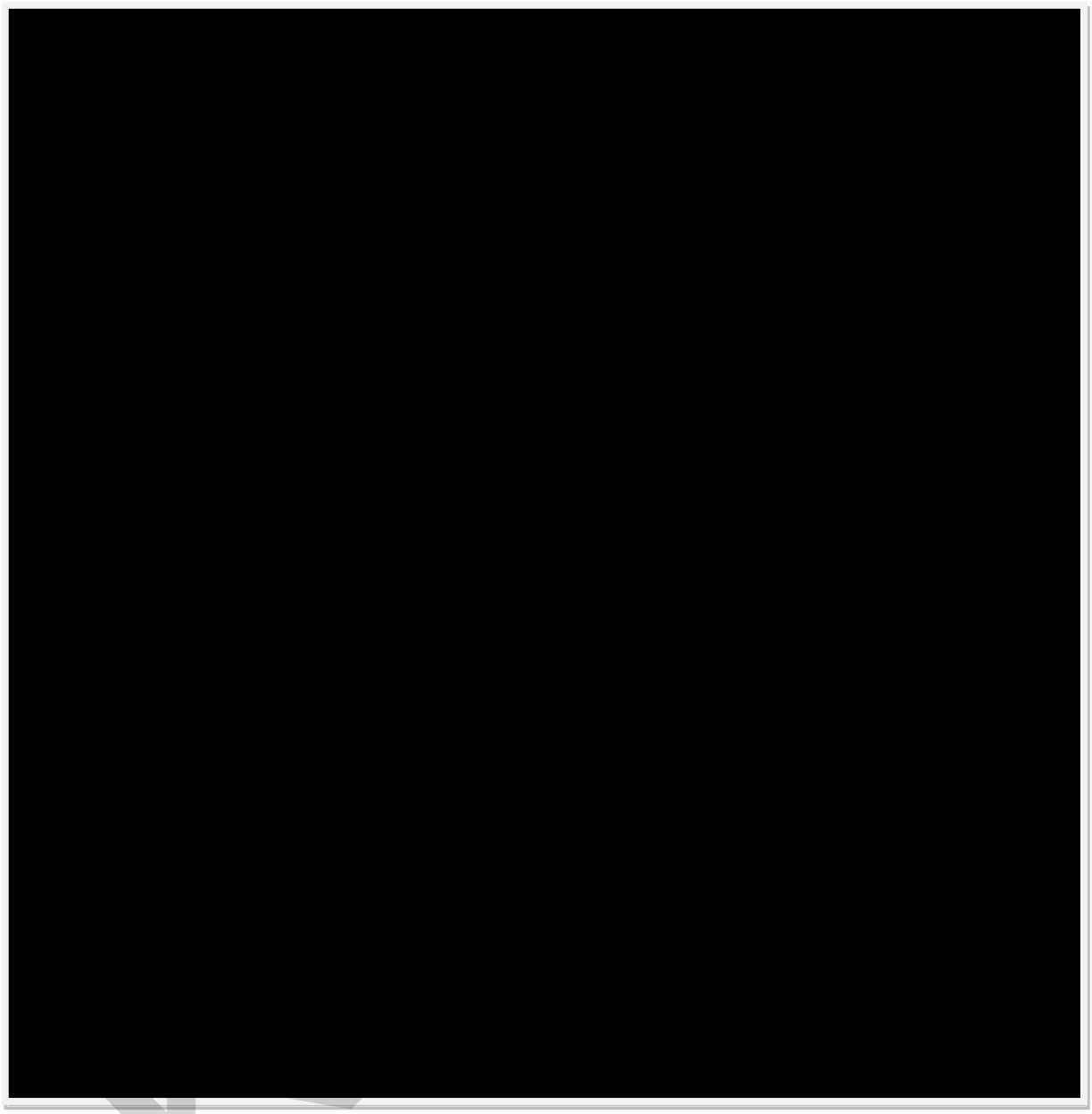
Obr. 18: [redacted]

5.2 Lokalizace molekul RNOS

[redacted]



Obr. 19: [redacted]



Obr. 20:

[redacted]

[redacted]

[redacted]

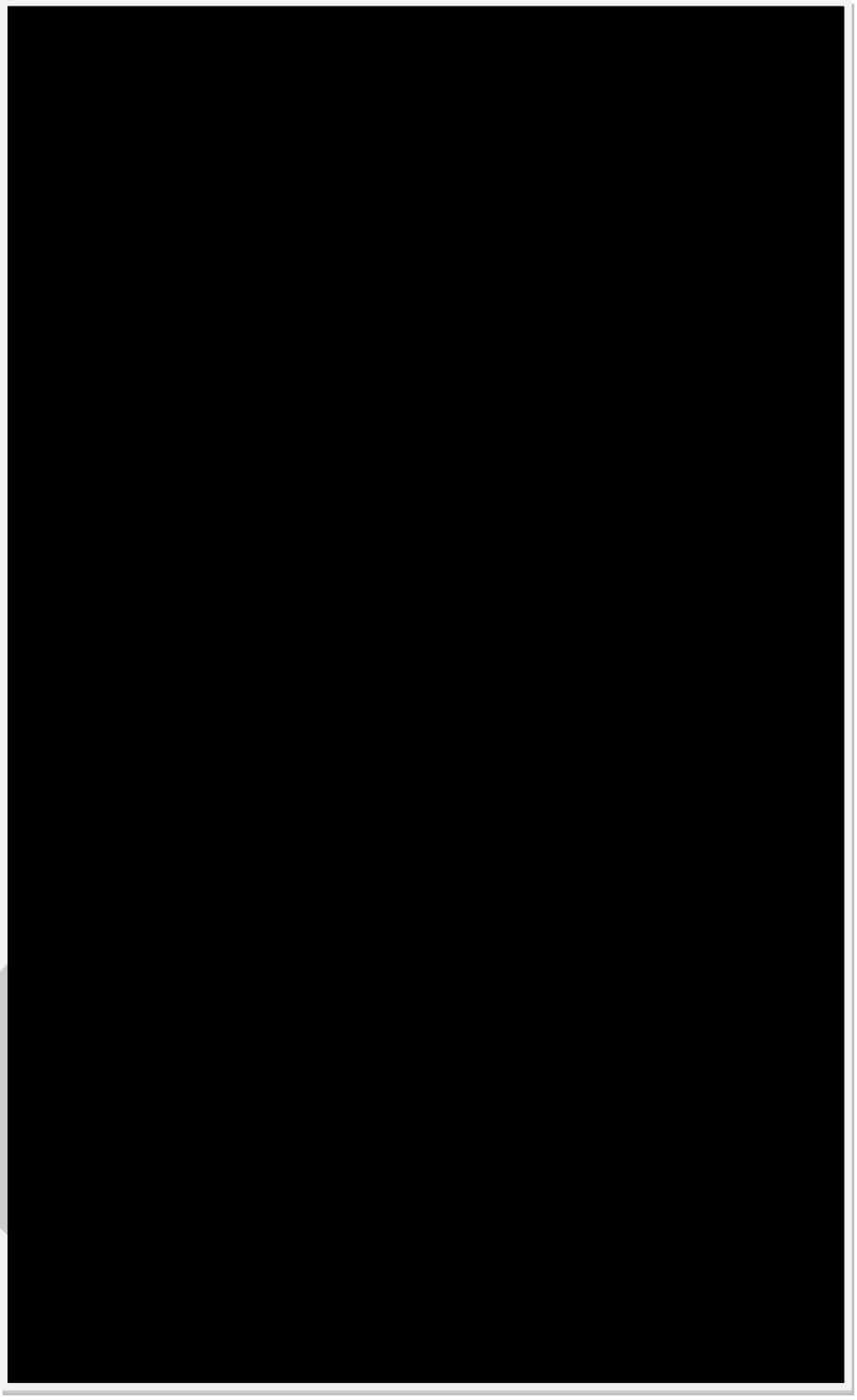
[redacted]

[redacted]

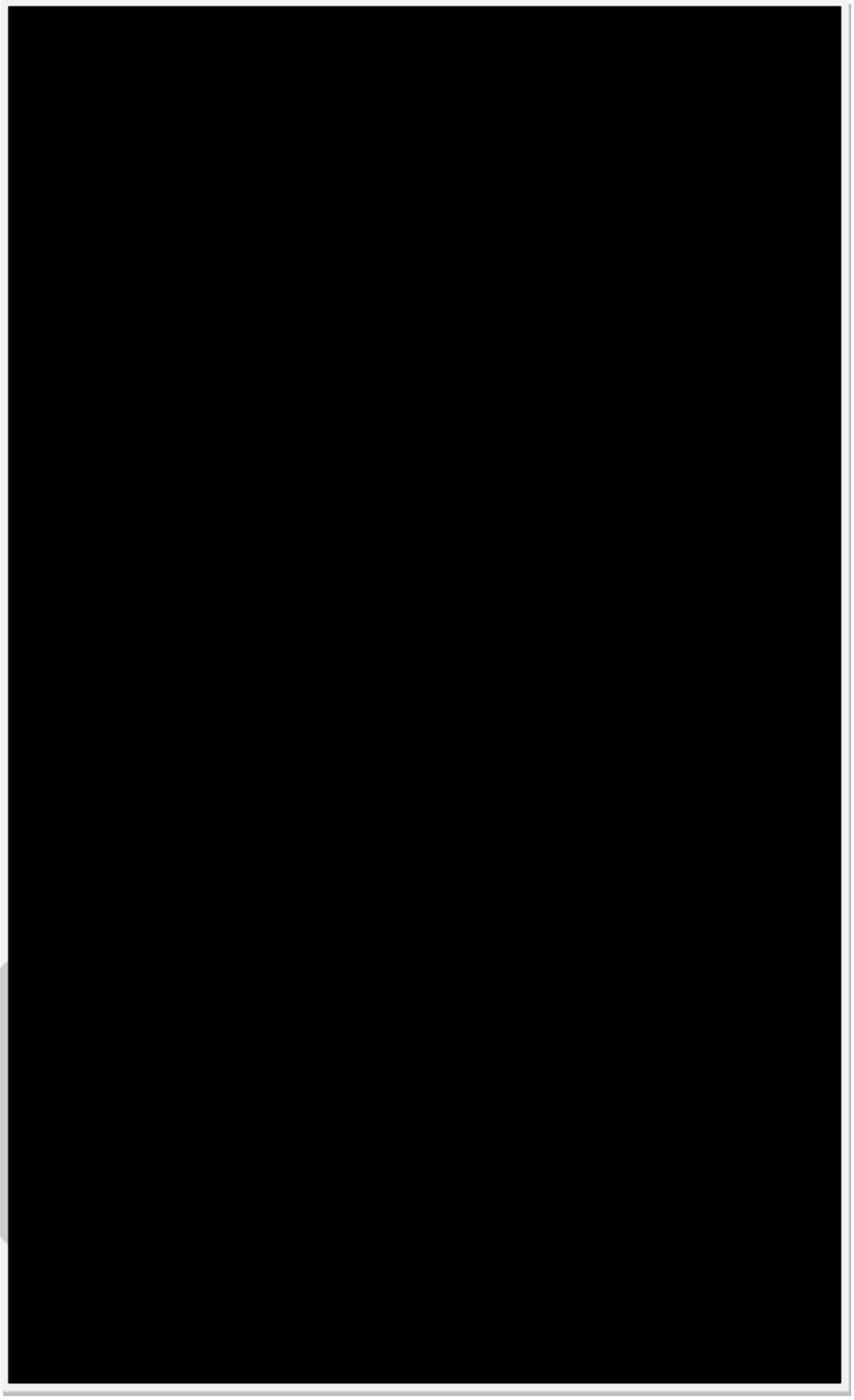
5.3 Vývoj mycelia v delším časovém horizontu

[redacted]

KOPIA



Obr. 21:



Obr. 22: [redacted]

6 DISKUSE

V této práci byl studován vliv aktivních forem kyslíku a dusíku na dynamiku klíčení výtrusů vybraných hub z čeledi *Morchellacea* a zároveň v nich byly tyto molekuly histochemicky lokalizovány pomocí konfokálního mikroskopu.

Vliv peroxidu vodíku na klíčení je silně závislý na jeho koncentraci. Zatímco při koncentraci 10^{-2} M bylo klíčení *Magnaporthe grisea* zcela inhibováno, při koncentraci 10^{-5} M byl jeho efekt minimální. Toxicita peroxidu vodíku se ale objevila i při koncentraci 10^{-12} M a opět vymizela při koncentraci 10^{-15} M (Gessler a kol., 2007). Logicky by tedy absence peroxidu vodíku měla klíčení ovlivňovat pozitivně, nicméně o této variantě Gessler a kol. (2007) nemluví. V této práci byl testován vliv peroxidu vodíku o koncentraci 0,1 mM a 1,0 mM na délku a větvení hyf hub *M. conica* a *P. bohemica*. V případě nižší koncentrace u *M. conica* nebyl zaznamenán velký rozdíl v délkách hyf ani žádné větší větvení oproti hyfám spor inkubovaných ve vodě (kontrola). Naopak u koncentrace 1,0 mM byly naměřeny delší hyfy a byl zaznamenán i větší počet větvících se vláken. Vyšší koncentrace peroxidu vodíku měla tedy překvapivě pozitivní vliv na růst (délku) hyf. Fakt, že výtrusy vyklíčily a zároveň možný pozitivní vliv peroxidu vodíku na samotný růst hyf je v rozporu s tvrzením Gesslera a kol. (2007). Kratší hyfy *M. conica* než u kontroly byly pozorovány u spor klíčících v roztoku 0,1mM kyseliny askorbové (antioxidant), což by teoreticky potvrzovalo kladný vliv peroxidu vodíku na délku hyf, nicméně po zvýšení koncentrace kyseliny askorbové na 1,0 mM, a tím teoreticky zároveň ještě většího snížení koncentrace ROS, byly hyfy svou délkou podobné těm kontrolním. Bylo ale zjištěno, že se kyselina askorbová může také podílet na vzniku ROS, a to buď autooxidací katalyzovanou přítomností kovových iontů (ionty stříbra), nebo chelatací iontů stříbra, která napomáhá k jejich mobilizaci (Liu a kol., 2010). Nicméně žádné ionty stříbra nebyly do roztoků, ve kterých byly spory inkubovány, přidávány. Je tedy nepravděpodobné, že by během klíčení došlo ke zmíněným reakcím, a proto je takový vliv 1,0mM roztoku kyseliny askorbové na délku hyf překvapivý. Možným vysvětlením je, že kyselina askorbová není kvalitní antioxidant a nepodařilo se jí ROS odstranit, její účinek postupně vyprchává, nebo se účastní ještě nějakých dalších reakcí.

Dle již publikovaných studií má vliv RNS, resp. NO, duální charakter, tedy že mají pozitivní i negativní vliv na klíčení a růst hub (Wang a Higgins, 2005; Song a kol., 2000).

KOPIE

Dle Wanga a Higginse (2005) zvýšená koncentrace NO potlačuje klíčení konidií *Colletotrichum coccodes*. Opět ale závisí na koncentraci, zatímco 1mM a 500μM koncentrace donoru NO klíčení a růst zcela inhibovaly, při koncentraci 100 μM bylo klíčení pouze zpožděno. Negativní vliv zvýšené koncentrace NO byl potvrzen i v této práci. Spory, které byly inkubovány v 1,0mM roztoku GSNO měly po 24h inkubaci kratší hyfy než spory inkubované ve vodě. Negativní vliv sice potvrzen byl, ale k úplnému potlačení klíčivosti nedošlo. Zatímco Wang a Higgins (2005) použili ve své práci SNP jako donor NO, v této práci byl používán GSNO. GSNO dodává až 8krát nižší množství NO než SNP (Ederli a kol., 2009), což může být příčinou neúplného potlačení klíčivosti. Z toho logicky vyplývá, že snížením koncentrace NO by měl být růst hyf podporován, což potvrzují výsledky nejenom této práce, ale i Wanga a Higginse (2005).

V této práci byl ale zaznamenán i pozitivní vliv NO, což potvrzuje jeho již zmíněný duální charakter. U spor inkubovaných v roztoku 0,1mM GSNO byly pozorovány naopak delší hyfy než u kontroly. Song a kol. (2000) zjistili, že v době před zahájením tvorby plodnice u penízovky sametonohé (*Flammulina velutipes*) dochází v buňkách mycelia k nárůstu endogenní hladiny NO. Je tedy možné, že inkubací spor *M. conica* v 0,1mM roztoku GSNO bylo sporám dodáno podobné množství NO, jaké je produkováno před tvorbou plodnic *F. velutipes*, a tudíž dochází k intenzivnějšímu růstu hyf. Vyšší koncentrace je pravděpodobně pro buňky do určité míry toxická, a proto byly hyfy kratší. Dle Kunerta (2000) ale ani přidání 10mM roztoku SIN-1 (3-morfolino sydnonimin = molsidomin, donor peroxynitritu používaný k léčbě anginy pectoris) nezahubilo konidie *Aspergilus fumigatus* inkubované v 50mM McIlvainově fosfát-citrátovém pufru (pH 6,5), ale zcela potlačilo klíčení spor rostoucích na glukózo-peptonovém médiu a na glukózovém médiu s dusičnanem sodným. Kunert (2000) ale také zjistil, že SIN-1 v koncentraci do 5 mM neovlivňuje klíčení konidií *A. fumigatus* rostoucích na glukózo-peptonovém mediu, ale naopak klíčení konidií rostoucích na glukózovém médiu s dusičnanem sodným bylo potlačeno. Z toho vyplývá, že kromě samotné koncentrace donoru nebo lapače RNS hraje určitou roli i typ média, na kterém spory klíčí. Nicméně v případě naší práce můžeme vliv média zanedbat, protože pro růst spor bylo používáno ve všech případech médium stejné, jednoduché kultivační médium obsahující 1% agarózu.

Již několikrát avizovaná toxicita peroxidu vodíku nebyla potvrzena ani v případě klíčících spor *P. bohemica*. Naopak, byl zaznamenán opět intenzivnější růst hyf, nicméně v tomto případě

KOPIE

k tomu došlo u spor inkubovaných v roztoku 0,1mM peroxidu vodíku, nikoli v koncentraci 1mM jako u spor *M. conica.* V ostatních variantách nebyly zaznamenány výrazné rozdíly ve srovnání s kontrolou, ani v případě spor inkubovaných v 0,1mM roztoku kyseliny askorbové jako u spor *M. conica.*

Spory *M. conica* klíčily většinou jedním nebo dvěma vlákny na protilehlých stranách a větvení hyf bylo minimální. Naopak spory *P. bohemica* klíčily výrazně do prostoru, což znesnadňovalo jejich focení a zkreslovalo samotné měření. Klíčily i více než dvěma vlákny, větvení bylo častější a tím docházelo k optickému překrývání hyf, což práci výrazně prodloužilo a v některých případech mikroskopické měření dokonce znemožnilo. Proto byl vliv modulátorů RNOS na dynamiku klíčení *P. bohemica* stanoven pouze pro ROS, nikoli však pro RNS.

Po obarvení spor roztokem fluorochromu Hoescht 34580 nebyl zaznamenán výraznější fluorescenční signál. Výsledek je poněkud překvapivý, protože velikost molekuly fluorochromu Hoechst 34580 je srovnatelná s fluorochromy H_2DCF DA a DAF FM DA, takže by jejímu transportu do spor nemělo nic bránit. Rodina fluorescenčních barviv Hoechst patří do skupiny fluorochromů, které se vážou na oblasti DNA bohaté na AT. Je tedy možné, že DNA vybraných hub obsahuje těchto oblastí velmi málo a fluorochrom nemá příliš prostoru se navázat. Nicméně tato domněnka je pouhou teorií, která se nezakládá na přesnějších studiích, a proto by musely být provedeny další experimenty, aby mohla být považována za relevantní.

Špatný (resp. žádný) fluorescenční signál byl zaznamenán u spor *M. conica* obarvených 20µM roztokem DAF FM DA. Signál fluorochromu nebyl zaznamenán ani v samotných sporách ani ve špičkách hyf, jak tomu bylo u hyf mykobionta lišejníku *Ramalina lacera* (Weissman a kol., 2005). Slabý signál poskytovaly spory obarvené DAF FM DA až v koncentraci 80 µM. Ani v experimentech s klíčením smrže (8-12 h v pokojové teplotě) za účasti donorů a lapačů RNOS prováděných paralelně na katedře biochemie Univerzity Palackého v Olomouci nebyl signál zaznamenán (Válová, 2011). Je tedy pravděpodobné, že NO je ve sporách po 24h inkubaci přítomen ve velmi nízké koncentraci a přidaný exogenní NO ovlivňuje tedy nejranější fáze klíčení spor. Tyto výsledky jsou v rozporu s prací Wanga a Higginse (2005), kteří přítomnost NO zaznamenali v konidiích, hyfách i ve zrajících apresoriích *Colletotrichum coccodes.* Intenzita fluorescence se sice lišila v závislosti na stádiu klíčení, nicméně Wang a Higgins (2005)

KOPIE

nepopisují absenci signálu. Fluorescenční signál byl detekován v apresoriálních hyfách *Blumeria graminis* po obarvení 10μM roztokem DAF-2DA a jeho nárůst byl zaznamenán v průběhu dozrávání apresorií (Prats a kol., 2008). V jejich práci je ale zmíněna i myšlenka přechodné tvorby NO během životního cyklu *B. graminis*, která je podložena faktem, že byla v různých intervalech od inokulace konidií *B. graminis* na listy ječmene (hostitel) zaznamenána různá intenzita fluorescenčního signálu. Velmi malý signál byl pozorován také v době 20-24 h od inokulace (Prats a kol, 2008). Je tedy možné, že popsaná absence NO ve sporách smržovitých hub po 24 h inkubace je také důkazem jeho přechodné tvorby. Nicméně tuto myšlenku vyvrací fakt, že signál nebyl zaznamenán ani v jiných časových intervalech. Vzorky spor smrže a kačenky, inkubované v roztocích modulátorů RNS, neposkytovaly po inkubaci s DAF FM DA signál ani v případě pozitivních kontrol, kdy bylo před obarvením preparátů provedeno předpůsobení vzorku 1,0mM roztokem GSNO. Silný fluorescenční signál byl zaznamenán pouze v případě předpůsobení 1,0mM SNP. Tento fakt potvrzuje nejenom to, že DAF FM DA je bez problému transportován dovnitř buněk, ale také že SNP je mnohem lepší donor NO než GSNO (Ederli a kol., 2009) a GSNO není pro tento typ experimentů příliš vhodný, resp. použití GSNO nemusí zajistit prokazatelné výsledky

Po obarvení spor 10μM roztokem H_2DCF DA byl signál zaznamenán i u spor inkubovaných v roztocích modulátorů RNS. Je tedy patrné, že zatímco je hladina samotného NO ve sporách a hyfách minimální, hladina RNOS (tedy i hladina jiných aktivních forem dusíku, než je NO) je podstatně vyšší. Výjimkou byly vzorky inkubované v 1,0mM roztoku kyseliny askorbové. Přítomnost RNOS je vysvětlitelná relativně snadno. Jak již bylo několikrát zmíněno, RNOS jsou běžným produktem metabolismu buňky (Piterková a kol. 2005; Gessler a kol. 2007), proto byl signál zřetelný i v případě spor inkubovaných ve vodě. Nicméně tuto domněnku vyvrací fakt, že žádný fluorescenční signál nebyl zaznamenán po obarvení 50μM roztokem DCHF-DA u spor *Penicillium expansum*, které byly 5h inkubovány ve vodě (Lai a kol., 2011). Intenzita signálu u spor smrže a kačenky inkubovaných v roztocích modulátorů ROS byla nižší nebo srovnatelná s kontrolou, což může být způsobeno tím, že dodané exogenní RNOS rychle vyprchaly, nebo byly odstraněny antioxidačním systémem, a po 24 h již byla jejich hladina snížena na běžnou hodnotu. Pokud by to byla pravda, pak je zde prostor pro spekulace

KOPIE

o efektivnosti antioxidačních systémů hub *M. conica* a *P. bohemica*, protože intenzity signálů u spor inkubovaných v 1,0mM roztoku peroxidu vodíku se mezi těmito dvěma druhy liší.

Dle výsledků mojí práce ovlivňují RNOS vývoj *M. conica* i dlouhodobě. Je zde tedy možnost vyvrátit předchozí tvrzení, že RNOS jsou spíš stimulačním nebo inhibičním faktorem pro klíčení, než že přímo ovlivňují samotné prodlužování hyf. Z dlouhodobého hlediska by to tedy znamenalo, že v rané fázi klíčení spor dojde vlivem RNOS ke změnám procesů vztahujících se k celkovému životnímu cyklu houby, které se pak projeví třeba potlačením tvorby mikrosklerocií nebo naopak podporou jejich tvorby. Experiment, při kterém byl studován vliv RNOS na vývoj mycelia v delším časovém horizontu ukázal, že RNOS mají vliv na tvorbu mikrosklerocií. Po měsíci inkubace byla velká mikrosklerocia vytvořena na Petriho miskách s 0,1mM roztokem GSNO a 1,0mM roztokem kyseliny askorbové a malá mikrosklerocia na miskách s 1,0mM roztokem peroxidu vodíku a 1,0mM roztokem GSNO. V ostatních případech se mikrosklerocia nevytvořila, ani u kontroly. Tento experiment opět potvrzuje, že peroxid vodíku není pro *M. conica* příliš toxický, ba dokonce pozitivně ovlivňuje růst této houby. Nutno podotknout, že v tomto případě je možné říct, že přece jenom absence ROS v důsledku působení kyseliny askorbové, byla pro tvorbu mikrosklerocií výhodnější. Byl potvrzen i kladný vliv NO na růst a vývoj *M. conica*, což je podloženo i výsledky práce Songa a kol. (2000). V jejich práci byl zaznamenán vzrůst aktivity NOS, a tím i hladiny NO, před zahájením tvorby plodnice *Flammulina velutipes*. Nejvyšší aktivita byla detekována během 23. dne inkubace (72krát vyšší než na počátku kultivace), pak následoval její lehký pokles a 30. den byla rozpoznána plodnice. U hub rodu *Morchella* bylo vypozorováno, že se základy nazrzlých mikrosklerocií začaly na sladinkovém agaru tvořit již po sedmi dnech inkubace a po 10 - 12 dnech zastavily svůj růst (Havránek a kol., 2009). Je tedy patrné, že růst hub rodu *Morchella* je rychlejší než v případě *F. velutipes*. Dlouhodobý vývoj mycelia a mikrosklerocií nebyl v mojí práci podrobně studován a dokumentován, tento experiment byl proveden pro doplnění mikroskopických pozorování pouze jednou, výsledky nelze tedy přesněji porovnat s prací Songa a kol. (2000) nebo Havránka a kol. (2009).

KOPIE

7 ZÁVĚR

Cílem práce bylo porovnat vliv exogenních RNOS na dynamiku klíčení vybraných modelových hub z čeledi *Morchellaceae* v počátečních fázích klíčení a lokalizovat tyto molekuly pomocí konfokální mikroskopie. Bylo zjištěno, že zvýšená koncentrace peroxidu vodíku podporuje růst hyf *Morchella conica* a naopak jeho nedostatek způsobuje zpomalení růstu. Růst hyf je podpořen také zvýšením hladiny NO, nebo naopak jejích výrazným snížením. Co je ale nutné podotknout, při výraznějším snížení hladiny NO je růst hyf naopak zpomalen. Po vyklíčení se hladina peroxidu vodíku ve sporách i hyfách snižuje, nicméně jiné formy RNOS se v cytoplazmě klíčících hyf ošetřených modulátory RNS vyskytují. Molekuly NO byly v cytoplazmě detekovány pouze v minimálním množství.

Dáno do souvislosti, o vlivu RNOS na dynamiku klíčení spor smržovitých hub *Morchella conica* a *Ptychoverpa bohemica* rozhoduje především koncentrace těchto látek ve sporách. Vyšší koncentrace peroxidu vodíku pozitivně ovlivňuje růst hyf, resp. neovlivňuje délku hyf jako takovou, ale urychluje klíčení spor. Po 24 h není ve sporách ani hyfách přítomen ve vysokých koncentracích. Jiné RNOS v cytoplazmě ale přítomny jsou. Nedostatek peroxidu vodíku má negativní vliv na růst hyf, ale v delším časovém horizontu napomáhá ke tvorbě mikrosklerocií. Byl potvrzen duální charakter vlivu NO na klíčení a růst hyf. Zvýšená hladina RNS, ale i její snížení, napomáhá k urychlení klíčení spor podobně jako peroxid vodíku, nicméně hladina samotného NO je v buňkách minimální. RNS také napomáhají tvorbě mikrosklerocií. *Ptychoverpa bohemica* není díky svému intenzivnímu větvení a růstu hyf vhodným modelem pro experimenty prováděné metodami použitými v této práci.

Práce by mohla být označena za pionýrskou v oblasti studia biologie smržovitých hub a jejich reakcí na RNOS. Výsledky práce by se mohly stát odrazovým můstkem pro další experimenty související s umělým pěstováním těchto hub, nebo pro experimenty, které by se blíže zaměřily na celkovou rychlost prodlužování hyf a tím by vyvrátily nebo potvrdily předpoklady, že RNOS jsou spíš stimulačním nebo inhibičním faktorem pro samotné klíčení než pro prodlužování hyf.

KOPIE

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Arrigoni, O., De Tullio, M.C. (2001): Ascorbic acis: much more than just an antioxidant. Biochimica et Biophisica Acta, 1569: 1-9.

Campbell, N.A. a Reece, J.B. (2006): Houby (Houbová rozmanitost). In: Biologie, pp. 616 - 632, Computer Press, a.s., Brno.

Catalá, M., Gasulla, F., E Pradas del Real, A., García-Breijo, F., Reig-Armiñana, 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, TJ., Davidson, M.W. [online] 2004-2009 [cit. 18.11 2010]: Laser scanning confocal microscopy. Dostupné z: <www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf >

Dacres, H. a Narayanaswamy, R. (2005): Evaluation of 1,2-diaminoanthraquinone (DAA) as a potential reagent system for detection of NO. Microchimica Acta, 152: 35 - 45.

Ederli, L., Reale, L., Madeo, L., Ferranti, F., Gehring, Ch., Fomaciari, M., Romano, B., Pasqualini, S. (2009): NO release by nitric oxide donors *in vitro* and *in planta*. Plant Physiology and Biochemistery, 47: 42 - 48.

Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz-Jelonek, M. [online] 2010 [cit. 20.4.2011]: Interplay between nitric oxide and other signal ivolved in plant resistance to pathogens. Plant Physiology, 58: 139 - 159. Dostupné z: <http://books.google.cz>

Gessler N.N., Aver'yanov A.A., Belozerskaya T.A. (2007): Reactive oxygen species in regulation of fungal development. Biochemistery (Moscow), 72: 1091-1109.

Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C. (2006): Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review. Jurnal of Fluorescence, 16: 119 - 139

Hampl, V., Sacherová, V., Němec, P. [online] 2010 [cit. 22.11. 2010]: Světelná mikroskopie. Dostupné z : <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/svetelnamikroskopie.htm>

KOPIE

Havránek, P. [online] 2007 [cit. 29.11. 2010]: Skrytá tajemství smržů. Dostupné z: <http://www.smrze.cz>

Havránek, P., Ondřej, V., Kitner, M., Kopecký, P., Wipler, J. et Votruba, P. (2009): "Štěpkový" smrž - co to je? ("Wood chip" morrels - what´s the matter?). - Mykologické Listy, Supplementum, Česko-slovenská vědecká mykologická konference, Brno, 27.-29. srpna 2009, Abstrakty, p. 70-71, Praha.

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

Chochel, M. [online] 2009 [cit. 15.3.2011]: Verpa bohemica (Krombh.) J. Schröt. – kačenka česká / smrčkovec český. Dostupné z: <http://www.botany.cz>

Chmelík, R. (2002): Korelační mikroskopie, alternativní metoda vícekanálového konfokálního zobrazení. Habilitační práce, Fakulta strojního inženýrství, Masarykova Univerzita v Brno.

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

Invitrogen [online]. 2010a [cit. 23.11.2010]. Probes for nitric oxide research - Section 18.3. Dostupné z www: <invitrogen.com>.

Invitrogen [online]. 2010b [cit. 23.11.2010]. Generating and detecting reactive oxygen species - Section 18.2. Dostupné z www: <invitrogen.com>.

Invitrogen [online]. 2010c [cit.23.11.2010]. Nucleic acid stains - Section 8.1. Dostupné z www: <invitrogen.com>.

Invitrogen [online]. 2011 [cit. 7.4.2011]: Fluorescein diacetate (FDA). Dostupné z www: <invitrogen.com>

KOPIE

Iwai, T., Miyasaka, A., Seo, S., Ohasji, Y. (2006): Contribution of ethylene biosynthesis for resistance to blast fungus infection in young rice plants. Plant Physiology, 142: 1202 - 1215.

Kalina, T., Váňa, J. (2005): Houby - Fungi (syn. Mycetalia). In: Sinice, Řasy, Houby, Mechorosty a Podobné Organismy v Současné Biologii, pp.: 229 - 405, Nakladatelství Karolinum, Praha.

Kopecký, P. (2008): Změny životnosti uchovávání izolátů smržovitých hub (*Morchellaceae*). Bakalářská práce, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.

Kranner, I. a Birtić, S. (2005): A modulating role for antioxidants in desication tolerance. Integrative and Comparative Biology, 45: 734 - 740.

Kranner, I., Cram, W.J., Zom, M., Womik, S., Yoshimura, I., Stabentheiner, E., Pfeifhofer, H.W. (2005): Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. PNAS, 102: 3141 - 3146.

Kubínová, L. (2004): Konfokální a dvoufotonová mikroskopie. Mikroskopie Dnes, příloha časopisu Vesmír, 83: 4 - 5.

Kunert, J. (2000): Effect of peroxynitrite on dormant spores and germlongs of *Aspergillus fumigatus.* Folia Microbiologica, 45 (4): 325 - 329.

Lai, T., Li, B., Qin, G., Tian, S. (2011): Oxidative damage involves in the inhibitory effect of nitric oxide on spores germination of *Penicillium expansum*. Current Microbiology, 62: 229 - 234.

Liu, J., Sonshine, D.A., Shervani, S., Hurt, R.H. (2010): Controlled release of biologically active silver from nanosilver surface. American Chemical Society, 4: 6903 - 6913.

Masters, B.R., So, P.T. C, Kim, K. H., Buehler, Ch., Gratton, E. (1999): Multiphoton excitation microscopy, confocal microskopy and spectroscopy of living cells and tissues; functional metabolic imaging of human skin *in vivo*. Methods of Enzymology, 307: 513 - 536.

KOPIE

Mikš, A. (2007): Aplikovaná optika a mikroskopie 2007. Kapitola: Zobrazovací metody v optické mikroskopii. Vydavatelství ČVUT, Praha 2007: 45-60.

Olympus [online] 2004-2009 [cit. 19.2.2011]: Applications in confocal microscopy. Dostupné z www: <olympusfluoview.com/applications/flimintro.html>

Ondřej, V., Havránek, P. et Kitner, M. (2009): Komparativní analýza sekvenačních dat Českých a světových izolátů smržovitých hub (Comparative analysis of sequences data of Czech and world isolates of the morels). - Mykologické Listy, Supplementum, Česko-slovenská vědecká mykologická konference, Brno, 27.-29. srpna 2009, Abstrakty, p. 49-50, Praha.

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.

Prats, E., Carver, T.L.W., Mur, L.A.J. (2008): Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structre in the phytopathogenic fungus *Blumeria graminis*. Research in Microbiology, 159: 476 - 480.

Rose, R.C., Bode, A.M. (1993): Biology of free-radical scavengers - an evaluation of ascorbate. Faseb Journal, 7: 1135 - 1142.

Sedlářová, M., Petřivalský, M., Piterková, J., Luhová, L., Kočířová, J., Lebeda, A. (2011): Influence of nitric oxide and reactive oxygen species on development of lettuce downy mildew in *Lactuca* spp. European Journal of Plant Pathology, 129: 267 - 280.

KOPIE

Sigma-aldrich [online]. 2011 [11.4.2011]. Specification sheet, dihydroethidium. Dostupné z www: <sigmaaldrich.com>

Sims, P., Albrecht, R., Pawley, J.B., Centoze, V., Deenrick, T., Hardin, J. (2006): When light microscope resolution is not enough: correlational light microscopy and electron microscopy. In: Pawley, J.B. (ed): Handbook of Biological Confocal Microscopy, Pawley, J.B., 846 - 860, Springer Science + Business Media, New York 2006.

Song, N.K, Jeong, C.S., Choi, H.S. (2000): Identification of nitric oxide synthase in *Flammulina velutipes*. Mycologia, 92: 1027 - 1032.

Válová, T. (2011): Vliv nanočástic stříbra na proces klíčení. Diplomová práce, Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.

Vandelle E., Delledonne M. (2008): Methods for nitric oxide detection during plant - pathogen interactions. Methods in Enzymology, 437: 575 - 594.

Votruba, P. (2007): Vše o hledání smržů [online, cit. 22.11. 2010]. Dostupné z: <http://www.smrze.cz/cokdekdyjak.htm>

Wang, J. a Higgins, V.J. (2005): Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. Fungal Genetics and Biology, 42: 284-292.

Weissman, L., Garty, J., Hochman, A. (2005): Rehydration of the lichen *Ramalina lacera* results in production of reactive oxygen species and nitric oxide and a decrease in antioxidants. Applied and Enviromental Microbiology, 71: 2121–2129

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.

KOPIE

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CAT	kataláza
c-PTIO	2-(4-carboxyfenyl)-4, 4, 5, 5-tetrametylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
DAF - FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein
DIC	diferenciační interferenční kontrast
GSNO	S-nitrosoglutathion
H_2DCF DA	2', 7'-dihydrodichlorofluorescein diacetát
HR	hypersenzitivní reakce
NiNOR	nitrit:NO reduktáza
NOS	NO syntáza
RNOS	souhrnné označení aktivních forem kyslíku a dusíku
RNS	aktivní formy dusíku
ROS	aktivní formy kyslíku
SNP	nitroprussid sodný
SOD	superoxiddismutáza

KOPIE