

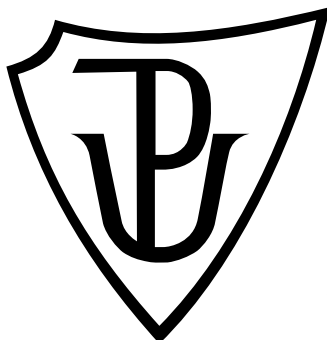
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Lucie Slobodianová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



STUDIUM VLIVU OOMYCET A ELICITORŮ
NA OBRANNOU REAKCI ROSTLIN

Bakalářská práce

Lucie Slobodianová

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

Olomouc 2014

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci zpracovala zcela samostatně s použitím veškeré zmíněné literatury.

V Olomouci, dne

.....

Lucie Slobodianová

Práce byla podpořena interními granty UP PŘF-2012-001, PŘF-2013-003, IGA_PřF_2014001 a projektem P501/12/0590 (GAČR).

Poděkování

Děkuji své školitelce doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. z Katedry botaniky PřF UP za velmi milé, ale zároveň odborné vedení, trpělivost, konzultace, za poskytnutí literatury a za čas strávený během vypracování experimentální i teoretické části této práce. Děkuji paní laborantce D. Vondrákové za spolupráci při autoklávování médií.

Mé poděkování patří také kolektivu Katedry biochemie PřF UP, především Mgr. Lucii Kubienové, Ph.D. a Mgr. Tereze Tiché za ochotu a pomoc při analýze GSNO(R).

Rovněž děkuji své rodině za umožnění bakalářského studia a svému příteli za morální a psychickou podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lucie Slobodianová
Název práce	Studium vlivu oomycet a elicitorů na obrannou reakci rostlin
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	2014

Abstrakt

Bakalářská práce byla věnována problematice reaktivních forem kyslíku a dusíku (RNOS), které se jako významné signální molekuly účastní řady fyziologických a patofyziologických procesů v rostlinách, především odpovědí na stresové faktory. Detailně byla zaměřena na *S*-nitrosoglutathion (GSNO), který je jedním z nejrozšířenějších *S*-nitrosothiolů (RSNOs) a „zásobní molekulou“ transportující NO, a enzym *S*-nitrosoglutathion reduktázu (GSNOR), který je významný pro regulaci intracelulární hladiny RSNOs a tedy i katabolismus GSNO.

V experimentální části této bakalářské práce byla sledována *in vivo* lokalizace GSNO a GSNOR u třech genotypů rajčete (*Solanum esculentum*, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*) po inokulaci patogenem *Phytophthora parasitica*. Pro vyhodnocení signálů jejich imunohistochemické detekce byla použita laserová skenovací konfokální mikroskopie. Dále byla zjišťována specifická aktivita GSNOR a koncentrace proteinů v uvedeném rostlinném materiálu.

Klíčová slova:	<i>Phytophthora parasitica</i> , rajče, reaktivní formy dusíku a kyslíku, GSNO, GSNOR
Počet stran	65
Počet příloh	1
Jazyk	Čeština

Bibliographic identification

Autor's first name and surname	Lucie Slobodianová
Title	The influence of oomycetes and their elicitors on plant defence
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	2014

Abstract

The thesis focused on issues related to signalling by reactive oxygen and nitrogen species (RNOS), important molecules involved in development and stress reactions in many organisms, including plants. *S*-nitrosoglutathione (GSNO), one of the most widely spread *S*-nitrosothiols (RSNOs) and storage molecule for NO, and the enzyme *S*-nitrosoglutathione reductase (GSNOR), whose main function is regulation of intracellular levels RSNOs including catabolism of GSNO, were studied in details.

In the experimental part of this work *in vivo* localization of GSNO and GSNOR is presented, as it was studied in three genotypes of tomato (*Solanum esculentum*, *S. chmielewskii* and *S. habrochaites*) during pathogenesis of *P. parasitica*. Following immunohistochemical detection the signals for both molecules were analysed by confocal laser scanning microscopy. Furthermore, the specific activity of GSNOR and the protein concentration was determined.

Keywords	<i>Phytophthora parasitica</i> , tomato, reactive nitrogen and oxygen species, GSNO, GSNOR
Number of pages	65
Number of appendices	1
Language	Czech

OBSAH:

1. CÍLE PRÁCE.....	8
2. ÚVOD	9
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
3.1. Strategie patogenů	10
3.2. Obecná charakteristika a patogeneze <i>Phytophthora</i> spp.	11
3.3. Biologie a životní cyklus <i>Phytophthora</i> spp	12
3.4. Elicitory <i>Phytophthora</i> spp., mutanty těchto oligopeptidů a jejich účinky	15
3.5. Charakteristika a role reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) v obraně rostlin vůči patogenům	16
3.5.1. Metabolismus a role reaktivních forem kyslíku	16
3.5.2. Metabolismus a role reaktivních forem dusíku	18
3.5.3. Charakteristika, význam a funkce <i>S</i> -nitrosoglutathionu (GSNO)	22
3.5.4. Charakteristika, význam a funkce <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktázy (GSNOR)	24
3.6. Metody studia RONS a jejich metabolismu	27
3.7. Principy a aplikace světelné mikroskopie	28
3.7.1. Historie světelné mikroskopie	28
3.7.2. Fluorescenční mikroskopie	28
3.7.3. Konfokální mikroskopie	29
4. MATERIÁL A METODY.....	31
4.1. Příprava biologického materiálu, patotesty.....	31
4.1.1. Použitý kmen patogena, rostlinný materiál	31
4.1.2. Příprava růstových médií a kultivace <i>Phytophthora</i> spp.	31
4.1.3. Izolace zoospor u <i>Phytophthora</i> spp.....	32
4.1.4. Rostlinný materiál.....	32
4.1.5. Inokulace rostlin, aplikace elicitorů a příprava vzorků.....	33
4.2. Měření aktivity enzymů	34
4.2.1. Stanovení aktivity GSNOR v rostlinném materiálu	34
4.3. Stanovení koncentrace proteinů v rostlinném materiálu.....	36
4.4. Histochemická detekce GSNOR a GSNO	37
4.4.1. Příprava příčných řezů	37
4.4.2. Imunohistochemická detekce GSNO a GSNOR	38

4.4.3.	Inkubace řezů	38
4.4.4.	Imunohistochemická lokalizace enzymů zapojených do metabolismu RONS konfokální laserovou skenovací mikroskopií.....	41
5.	VÝSLEDKY	42
5.1.	Vizuální hodnocení symptomů u inokulovaných pletiv	42
5.2.	Imunohistochemická detekce molekul GSNO a GSNOR laserovou skenovací mikroskopií	43
5.3.	Stanovení aktivity GSNOR v extraktech <i>Solanum</i> spp.	46
6.	DISKUSE	49
7.	ZÁVĚR.....	54
8.	LITERATURA	55
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	63
10.	PŘÍLOHA.....	65

1. CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části mé bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši zaměřenou na 1/ funkci, metabolismus a význam reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) s důrazem na obranu rostlin vůči patogenům; 2/ charakteristiku *Phytophthora* spp., a především patogenezi a elicitory *P. parasitica*.

Hlavními úkoly experimentální části byly 1/ imunohistochemická lokalizace molekuly *S*-nitrosoglutathionu (GSNO) a enzymu *S*-nitrosoglutathion reduktázy (GSNOR) *in vivo* u třech genotypů rajčete (*Solanum esculentum*, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*) s následným zobrazením laserovou skenovací konfokální mikroskopií; 2/ stanovení specifické aktivity GSNOR v rostlinném materiálu v průběhu 120 h patogeneze *P. parasitica*.

2. ÚVOD

Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) jsou významné signální molekuly, které vzájemně interagují a hrají důležitou roli v rostlinné odpovědi na biotický i abiotický stres (Wendehenne et al., 2005). V předchozích experimentech byly úloha a metabolismus RONS studovány v listech tří genotypů rajčat (*Solanum esculentum*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*), které se liší odolností vůči padlí a abiotickým stresorům, v interakci s biotrofní houbou *Oidium neolyopersici* a při abiotickém stresu (Lebeda et al., 2014). V této práci byl tento rostlinný materiál inokulován hemibiotrofním patogenem *Phytophthora parasitica*.

Reaktivní formy kyslíku (ROS) patří mezi signální molekuly, které se účastní změn exprese genů u stresovaných rostlin. V nadměrné koncentraci způsobují poškození buněk, včetně buněk patogenů (inaktivaci enzymů, oxidaci proteinů, poškození DNA a RNA), a podílejí se na hypersenzitivní reakci (HR), kterou rostliny eliminují patogenezí (Piterková et al., 2005).

Reaktivní formy dusíku (RNS), v čele s oxidem dusnatým (NO) jako jedním z nejrozšířenějších mezibuněčných posílů, byly studovány nejdříve u savců. Úloha NO v rostlinných systémech byla popsána už v roce 1979, ale studium signálních drah a obranných reakcí rostlin při infekci patogenem je zkoumáno až v posledních 20 letech. NO je zapojen do celé řady fyziologických procesů, mezi které patří klíčení, růst a kvetení rostlin, pohyb průduchů, senescence listů, programovaná buněčná smrt a HR (Piterková et al., 2008). *S*-nitrosoglutathion (GSNO) je důležitou zásobní molekulou NO, který může být uvolňován činností *S*-nitrosoglutathion reductázy (GSNOR). U některých rostlin byly snižena aktivita GSNOR a v jejím důsledku hromadění *S*-nitrosothiolů korelovány s vyšší rezistencí, avšak u jiných tomu bylo naopak. V rostlinách tykví a hrachu vystavených mechanickému a abiotickému stresu byly nalezeny zvýšené hladiny GSNOR (Kubienová et al., 2014b). Ve vztahu rajčat s padlím byla zvýšená aktivita enzymu nalezena u rostlin s vyšší rezistencí k *O. neolyopersici* (Kubienová et al., 2014a). V této práci se věnují úloze GSNO a GSNOR v interakci rostlin *Solanum* spp.- s hemibiotrofním patogenem *Phytophthora parasitica*.

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Strategie patogenů

Životní cyklus patogena je primárně závislý na okolních podmínkách a na přísunu živin. Jeho růst a reprodukce může probíhat buď uvnitř, nebo na povrchu hostitelské rostliny, čímž ji značně poškozuje (Yamaoka et Takeuchi, 1999). Pazitický organismus může být celým svým životním cyklem vázán na hostitele, pak hovoříme o obligátních parazitech, nebo po různě dlouhou dobu přežívat mimo hostitele, pak se jedná o fakultativní parazity. Podle způsobu výživy rozeznáváme tři strategie rostlinných parazitů. Biotrofní parazité se vyznačují tím, že zdrojem živin je žijící hostitelská buňka; nekrotrofní parazité v první kroku usmrtí buňky hostitele, které následně využít jako zdroje výživy; hemibiotrofní parazité získávají prvotně živiny stejným způsobem jako biotrofní patogeny, avšak po krátké době dochází k přechodu na nekrotrofní způsob výživy (Parlevliet, 1996).

Mezi biotrofní patogeny obecně patří viry a viroidy, některé bakterie, oomycety, houby a vyšší rostliny vytvářející haustoria. Biotrofové vytvářejí oproti nekrotrofům pouze malé množství extracelulárních enzymů či elicitorů, mají úzký okruh hostitelů a řadu z nich nelze subkultivovat na umělých médiích (Věchet, 2012).

Nekrotrofové mohou být zástupci bakterií a hub, jsou druhově méně specializovaní než biotrofní patogeny. Jsou schopni produkovat velké množství extracelulárních enzymů, které narušují buněčnou stěnu napadené rostliny a usnadňují průnik do buněk. Příkladem těchto enzymů mohou být například celulázy, které se aktivně podílejí na rozkladu celulózy, pektinázy degradující pektin, oxidázy, atd. Nekrotrofní patogeny bývají schopny tvořit toxické látky, pomocí kterých narušují metabolismus hostitele a vedou k tvorbě nekrot. Nekrotrofové pak rostou na mrtvém pletivu a vystavují se tak soupeření se saprofytními mikroorganismy.

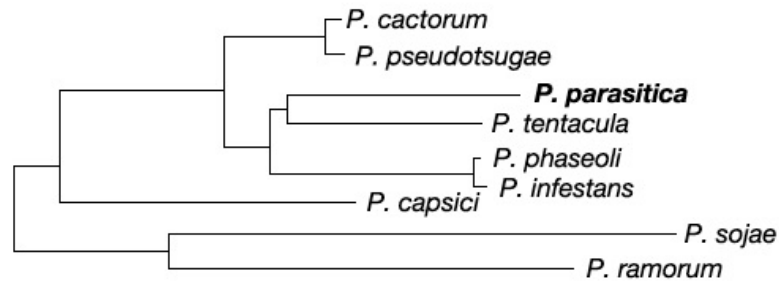
Přechod mezi biotrofními a nekrotrofními patogeny představují hemibiotrofové, kteří se svou počáteční fází vývoje podobají biotrofům, ale později přecházejí do nekrotrofního stádia (Věchet, 2012). Nedávné studie ukázaly, že u některých druhů hub produkujících významné toxiny, dochází během infekce hostitelské rostliny k přeprogramování metabolismu a snížení produkce toxinů tak, že je lze považovat téměř za biotrofy - např. *Cladosporium fulvum* parazitující na listech rajčat (Collemare et al., 2014).

3.2. Obecná charakteristika a patogeneze *Phytophthora* spp.

Jedná se o eukaryotický organismus, který je řazen do říše Chromista, třídy Oomycetes, oddělení Peronosporomycota, čeledi Pythiaceae. Tyto mikroskopické houbové organismy jsou většinou saprofyté nebo fakultativní i obligátní parazité (Kalina et Váňa, 2005). Stélka většiny parazitických druhů je charakteristická vláknitým, větveným a nepřehrádkovaným myceliem (obrázek 2) s mnohojaderným protoplastem, jádra mají velikost asi 3 μm . U oomycet můžeme zřídka také nalézt centrální vakuolu a mitochondrie, které mají trubicovité přepážky. Specifickou strukturu pak představuje tzv. DBV systém („dense body vesicles system“), který zajišťuje polymeraci glukanů, jenž jsou důležitou složkou při tvorbě buněčné stěny nebo zoospor. Zásobní látky vyskytující se v buněčné stěně jsou složeny primárně z rozpustného β -1,3-glukanu, nazývaném také jako mykolaminaran (Kalina et Váňa, 2005).

Phytophthora parasitica je jeden z nejničivějších fytopatogenů, který je schopený infikovat více než 100 druhů rostlin. Jejimi nejčastějšími hostiteli jsou rostliny z čeledi lilkovitých, mezi které patří rajčata, papriky, lilek, brambory a tabák. Významnou hostitelskou skupinou mohou být také ovocné stromy a jejich plody, kam řadíme např. citrusy, ořechy, mandle, pistácie, papáju, broskve, švestky, meruňky, jablka, hrušky, avokádo nebo granátové jablka. Dále napadá zeleninu, zahrnující tykvovité a košťálovité druhy, nebo různé okrasné rostliny. *P. parasitica* je nejvíce problematická v oblastech Středomoří, kde je vysoká teplota vzduchu i půdy společně s nadměrnou vlhkostí ze zavlažování. Tento patogen vyvolává také rozsáhlé škody ve školkách, sklenících i v hydroponických systémech. *Phytophthora* infikuje stejnou mírou jak kořeny, tak stonky, listy a plody hostitelské rostliny (Erwin et Ribiero, 1996). Tento hemibiotrofní parazit způsobuje uvadání rostlin, korovou i listovou nekrózu, nebo také listové spály a chlorózy. Dalšími příznaky jsou hniloba plodů, kořenů, výhonů, hlíz i mladých pupenů (Agrios, 2005).

Příbuzná, v podmínkách ČR původní, *Phytophthora infestans* se řadí mezi ekonomicky významné parazity rostlin, které mají značný hospodářský dopad. Infekce *P. infestans* vyvolává žlutohnědé až tmavohnědé nekrózy listů brambor a dalších lilkovitých rostlin. Plísň způsobené *P. infestans* jsou pozitivně ovlivněny vlhkými a chladnějšími podmínkami (Agrios, 2005; Kalina et Váňa, 2005). Obrázek 1 demonstruje, že *P. parasitica* s velikostí genomu 71 Mb spadá v rámci rodu *Phytophthora* do stejné vývojové větve jako *P. infestans* (Cooke et al., 2000).

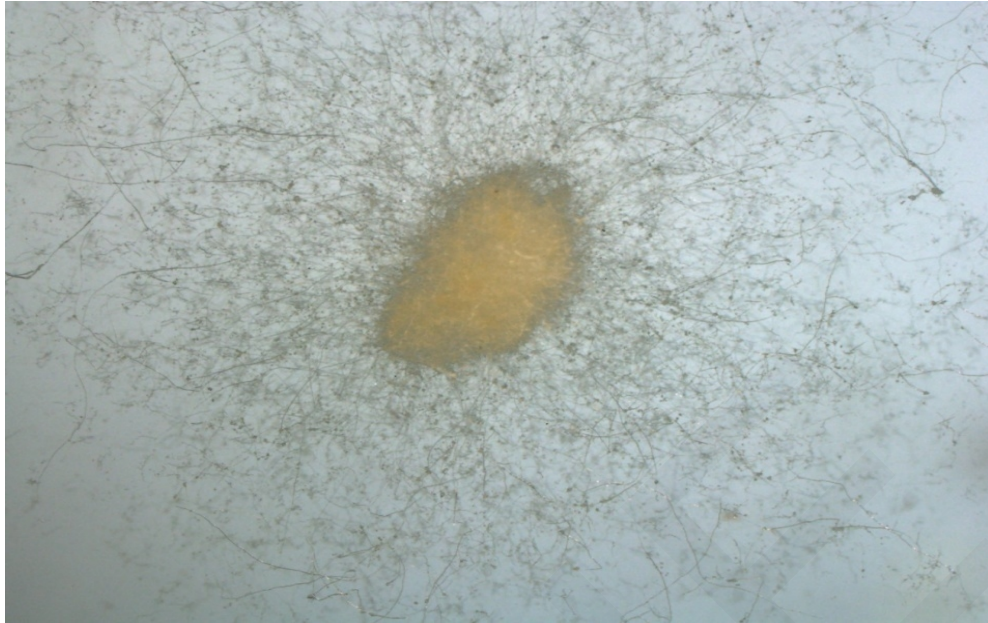


Obr. 1: Fylogenetický kladogram příbuznosti *P. parasitica* s ostatními druhy. (Převzato z: <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Phytophthora_parasitica/GenomeDescriptions.html#Phytophthora_parasitica>, 21. 3. 2014).

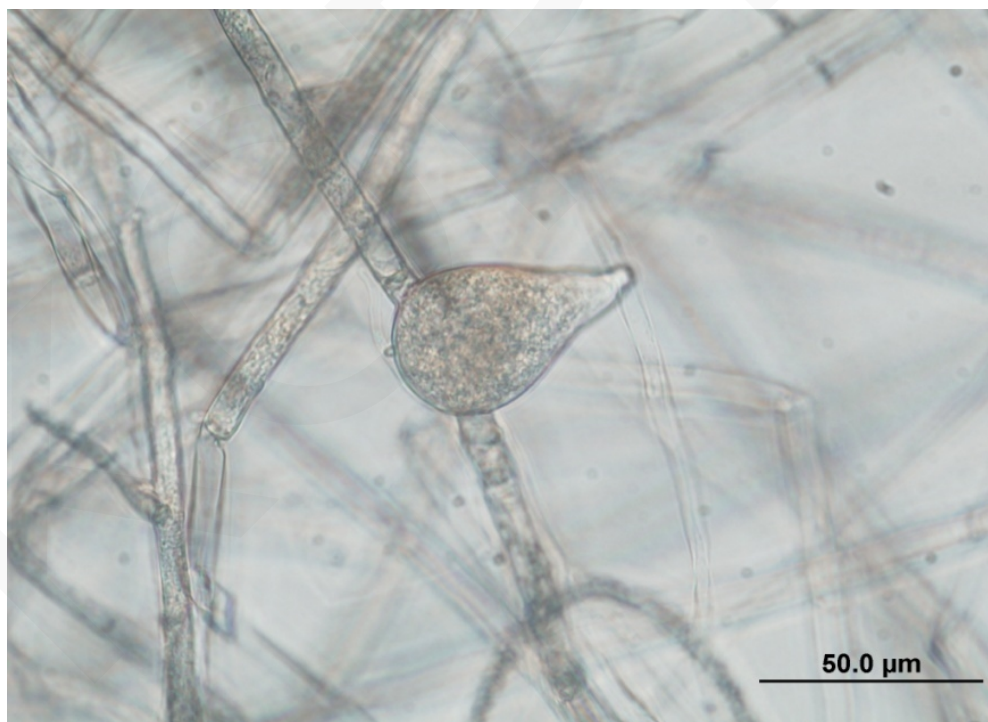
3.3. Biologie a životní cyklus *Phytophthora* spp.

Reprodukce *Phytophthora* probíhá buď sexuálně, nebo asexuálně. Při nepohlavním rozmnožování jsou tvořena sporangia, ze kterých jsou ve vodním prostředí uvolňovány jednojaderné dvoubičíkaté zoospory (obrázek 4). U většiny zástupců se vyskytují pohyblivé zoospory, které jsou typické svými bočně lokalizovanými bičíky, na jejichž povrchu se nachází dvě řady trubicovitých mastigonemat. Jednotlivé bičíky mezi sebou svírají úhel 130° a mají různou délku; přední pětý bičík je většinou kratší než zadní. Sporangia (výtrusnice) hruškovitého tvaru se utváří na specializovaných hyfách zvaných sporangiofory (obrázek 3). Kromě tvorby zoospor se vytvářejí tlustostěnné somatické chlamydospory, které slouží k přežití nepříznivých podmínek.

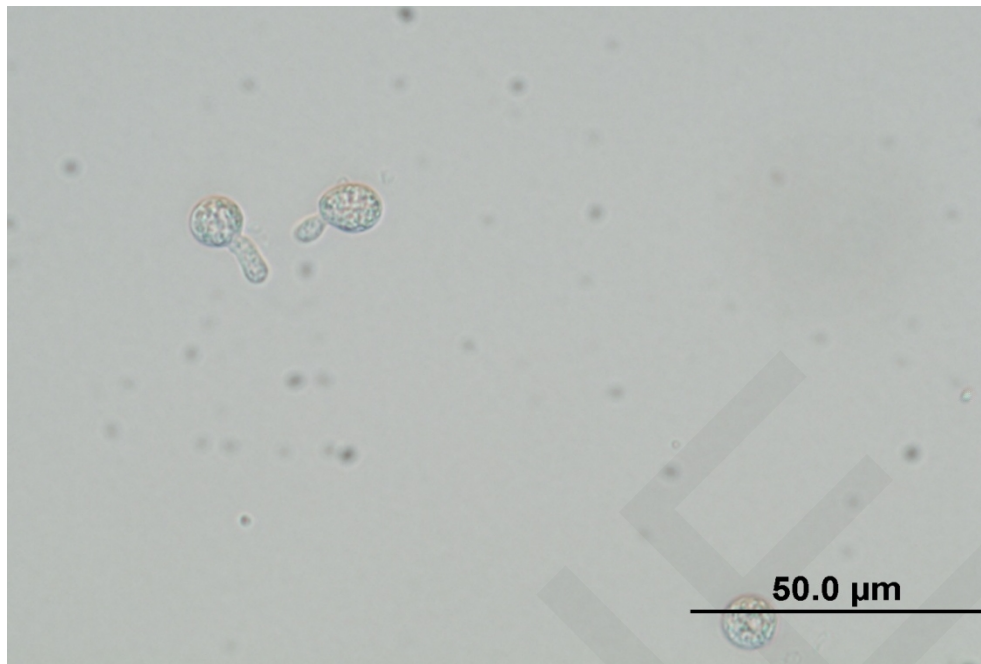
Během pohlavního rozmnožování, které se nazývá oogametangiogamie, se vytvářejí specializovaná gametangia (pohlavní orgány); samčí jednobuněčné antheridium kyjovitého tvaru a samičí oválné oogonium, které obsahuje samičí pohlavní buňky zvané oosféry. Antheridia jsou hormonálně přitahována k oogoniím, kde jakmile dojde k vzájemnému kontaktu, začnou přecházet samčí jádra pomocí kopulačních kanálků do oogonia. Po splynutí se takto oplozené oosféry mění na tlustostěnnou oosporu (zygotu), která má třívrstevnou stěnu (exospor, epispor, endospor) (Erwin et Ribiero, 1996; Kalina et Váňa, 2005). Schéma životního cyklu je znázorněno na obrázku 5. U oddělení Peronosporomycota v životním cyklu převládá diploidní stav, což je odlišné od hub, které jsou v průběhu větší části životního cyklu haploidní (Kalina et Váňa, 2005).



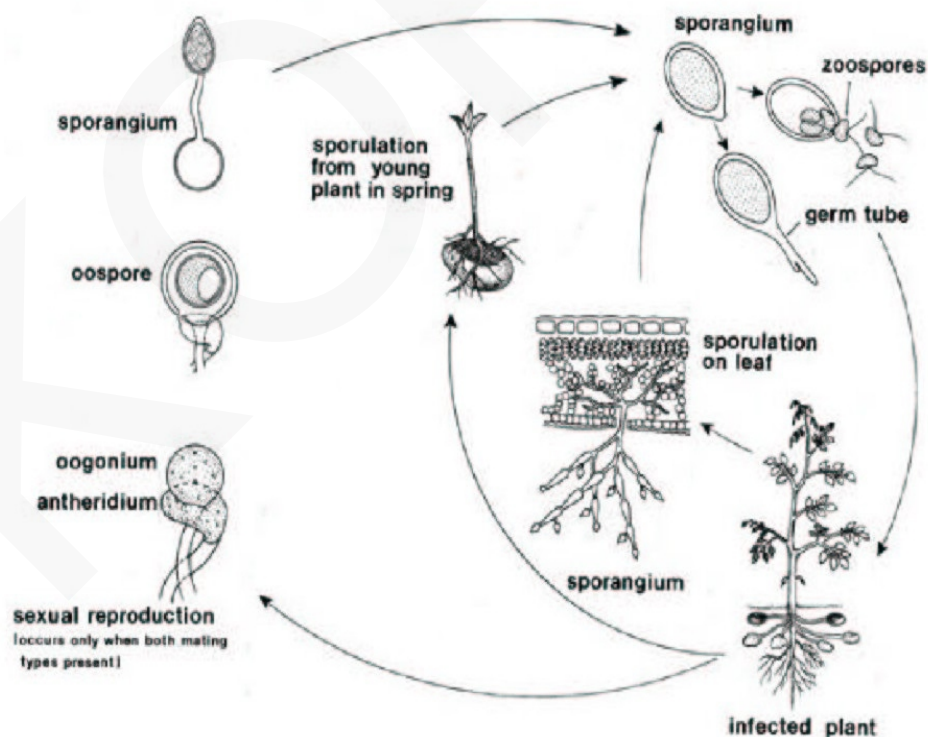
Obr. 2: Detail mycelia *P. parasitica* pod stereomikroskopem, zvětšení cca 40x.



Obr. 3: Sporangium (výtrusnice), ve které se vytvářejí dvoubičíkaté zoospory.



Obr. 4: Klíčící zoospory *P. parasitica*, které již ztratily bičíky.



Obr. 5: Schéma životního cyklu *Phytophthora* spp.

(Převzato z: <http://www.faculty.virginia.edu/evolutionlabs/Speciation_Lab_One.html>, 21. 3. 2014).

3.4. Elicitory *Phytophthora* spp., mutanty těchto oligopeptidů a jejich účinky

Elicitory jsou sloučeniny, které pocházejí z patogenů, podílí se na interakci rostlina-patogen a jsou schopny spustit obrannou reakci (Lochman et al., 2005). Elicitiny jsou proteinové elicitory produkované třídou Oomycetes, konkrétně rodem *Phytophthora*, které mají vysoký stupeň homologie. Elicitiny patří do skupiny malých proteinů, které se rozdělují podle izoelektrického bodu (pI) na kyselé (α -elicitiny, pI = 3-5) a základní (β -elicitiny, pI = 7-9) (Svozilová et al., 2009). Větší léze jsou schopny vyvolat β -elicitiny, které se od α -elicitinů liší svými strukturními vlastnostmi. Elicitiny jsou složeny z 98 aminokyselin, které jsou navzájem propojené třemi disulfidickými můstky, a mají schopnost vázat do své struktury steroly nebo mastné kyseliny (Boissy et al., 1996; Dobeš et al., 2004).

Kryptogein je základní protein o velikosti 10 kDa vylučovaný fytopatogenem *Phytophthora cryptogea*. Jedná se o hydrofilní protein, který má hydrofobní kapsy a jedno vazebné místo se silnou afinitou k dehydroergosterolu. Funkce kryptogeinu je katalytický přenos sterolů mezi fosfolipidovými membránami (Mikeš et al., 1997). *P. cryptogea* produkuje nízkomolekulární proteinový elicitin, kryptogein X-24, který způsobuje hypersenzitivní reakci, tvorbu nekrotů, inhibuje přenos glukózy v tabáku a ochraňuje jeho listy před infekcí patogenem *P. parasitica* var. *P. nicotianae* (Blein et al., 1991). Z původního kryptogeinu X-24 byly vyvinuty mutanti V84F, L41F a L41F/ V84F. Ti se vzájemně liší různou afinitou ke sterolům, mastným kyselinám, odlišnou tvorbou ROS a schopnosti aktivovat obranné geny. Mutant kryptogeinu V84F ztratil schopnost vázat steroly a mastné kyseliny, aktivně se podílí na produkci ROS a spouští expresi obranných genů. U varianty L41F můžeme sledovat pokles afinity k mastným kyselinám a snížení tvorby ROS. U kryptogeinu L41F/ V84F se vyskytuje snížená produkce ROS a exprese genů, nevytváří se ani vazba se steroly a mastnými kyselinami. Po aplikaci fytopagena se u obou mutantů L41F a L41F/ V84F neobjevily žádné viditelné nekrotózy (Dobeš et al., 2004).

3.5. Charakteristika a role reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) v obraně rostlin vůči patogenům

3.5.1. Metabolismus a role reaktivních forem kyslíku

Většina rostlin je během svého života vystavována stresovým faktorům, které mohou být povahy biotické (napadení patogenem, požer, stárnutí) nebo abiotické (extrémní světlo, teplo, dostupnost vody, působení různých chemických látek) (Catalá et al., 2010). Rostliny se obecně proti stresu mohou chránit buď pasivně, tzv. „avoidance mechanisms“ - vytváří mechanickou bariéru, nejčastěji v podobě silné kutikuly na listech, impregnace buněčných stěn; nebo aktivně, tzv. „tolerance mechanisms“ - kdy k omezení negativního dopadu stresorů dojde až po interakci s plazmatickou membránou buněk a symplastem. Dochází ke vzniku stresové reakce, která je ovlivněna intenzitou a dobou působení stresového faktoru, a také samotnou rostlinou (stadium vývoje, vitalita, genotyp i adaptační schopnosti rostliny). V přírodě jsou rostliny často vystaveny současně více stresovým faktorům (Piterková et al., 2005). Hladina reaktivních forem kyslíku („reactive oxygen species“, ROS), která je za normálních podmínek v buňkách nízká, rychle stoupá po narušení homeostázy a dochází k tzv. oxidačnímu stresu díky nerovnováze mezi tvorbou a odbouráváním ROS (Mittler, 2002). Reaktivní formy kyslíku se mohou chovat jako signální molekuly pro expresi genů nebo jako toxické látky, čímž se v obou případech mohou podílet na obranných procesech u rostlin (Neill et al., 2002). ROS spolu s glutathion systémem (bude vysvětleno dále) hrají klíčovou roli při komunikaci a koordinaci genové exprese během interakce rostlin se symbionty či patogeny (Catalá et al., 2010). V nadměrném množství ROS způsobují inaktivaci enzymů, oxidují proteiny nebo mohou poškozovat DNA a RNA. Hypersensitivní reakce (HR) u rostlin nastává v důsledku zvýšené koncentrace RONS, především peroxydusitanu (Delledonne et al., 2002; Gaupels et al., 2011).

Zdrojem ROS jsou produkty běžného buněčného metabolismu, mezi které patří dýchání v mitochondriích nebo fotolýza vody v chloroplastech (Dat et al., 2000). Dále vznikají NADPH oxidázou v plazmatické membráně, ale i v jiných organelách jako v buněčné stěně, endoplazmatickém retikulu a hlavně peroxizomech. Atmosférický molekulární kyslík může být redoxními reakcemi přeměněn na aktivnější formy, kterými jsou např. singletní kyslík, superoxidový aniont nebo O_2^- . Tvorba dalších aktivních forem kyslíku, mezi které patří peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový nebo hydroxylový radikál ($OH\cdot$), je stimulována singletním kyslíkem. Je to právě hydroxylový radikál, který má schopnost ničit lipidy, nukleové kyseliny a proteiny (Piterková et al., 2005).

K ochraně buněk před oxidačním poškozením slouží antioxidanty lokalizované v různých buněčných strukturách. Jedná se konkrétně o neenzymové a enzymové obranné mechanismy. Nejúčinnějšími rostlinnými antioxidanty je vitamín C (askorbát), dále β -karoten, redukovaný glutation a vitamín E (α -tokoferol) (Chen et Gallie, 2004; Shalata et al., 2011). Jako univerzální obrana potom působí specializované enzymy jako superoxiddismutáza (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidáza (EC 1.11.1.7), kataláza (CAT, EC 1.11.1.6) a enzymy askorbát-glutathionového cyklu (Piterková et al., 2005).

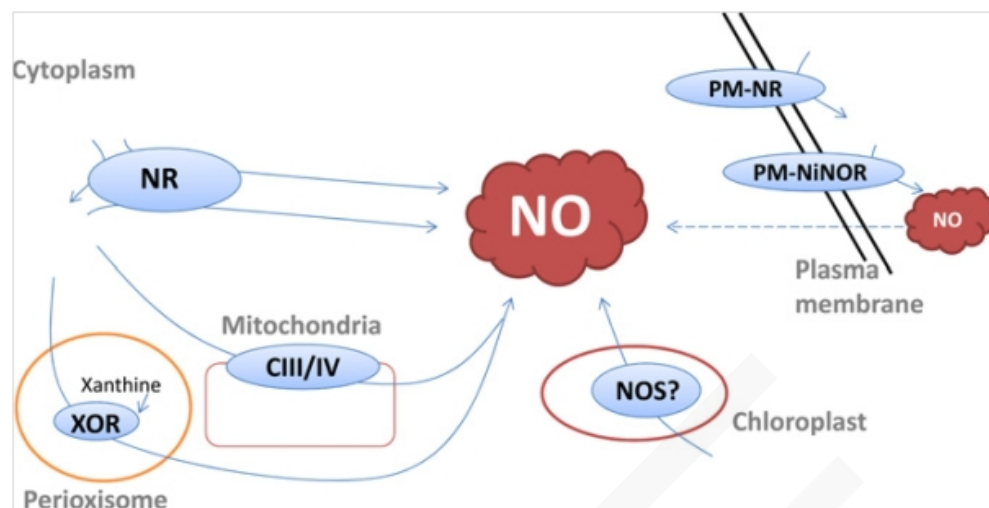
V aerobních organismech můžeme sledovat přítomnost SOD, která se vyskytuje hlavně v cytoplasmě a organelách jako jsou peroxizomy, chloroplasty nebo mitochondrie. Významnou funkcí SOD je katalytická přeměna superoxidového radikálu na peroxid vodíku (H_2O_2). V peroxizomech všech aerobních eukaryot se nachází tři isoformy enzymu katalázy a to CAT1, CAT2 a CAT3, které se vyskytují v různých částech rostliny. V listech se nachází především CAT1, jejíž funkcí je degradovat H_2O_2 , který vznikl jako odpadní produkt během fotorespirace. V cévních svazcích je lokalizována CAT2 a enzym CAT3 se vyskytuje nejčastěji v glyoxyzomech semen a mladých semenáčků, kde způsobuje odstraňování H_2O_2 . Kataláza má schopnost vyvolat katalázovou nebo peroxidázovou reakci. Jestliže je vyvolána katalázová aktivita, dochází katalázou CAT k přímému rozpadu peroxidu vodíku. Peroxidázová aktivita zase vyvolává oxidaci látek, mezi které patří methanol, ethanol, formaldehyd nebo formát. Skupina enzymů obsahující glutathionperoxidázu zastavuje peroxidaci membránových lipidů, kde dochází k redukci H_2O_2 pomocí molekuly glutationu, která slouží jako redukční činidlo. Enzymy askorbát-glutathionového cyklu, mezi které se řadí askorbátperoxidáza (APOX, EC 1.11.1.11) nebo glutathionreduktáza (GSNOR, EC 1.6.4.2), se nachází v takových oblastech, kde je absence CAT, a využívají ke svým procesům glutation nebo kyselinu askorbovou (Piterková et al., 2005).

3.5.2. Metabolismus a role reaktivních forem dusíku

Oxid dusnatý (NO) je významná signální molekula, vznikající při aerobním metabolismu u prokaryot i eukaryot. V živočišné říši má důležitý význam zejména při zánětech a trombózách, účastní se vazodilatace, imunitní odpovědi a neurotransmise. U rostlin hraje NO společně s reaktivními formami kyslíku hlavní roli v běžných fyziologických procesech, mezi které můžeme zařadit klíčení, růst stonku i kořenů, kvetení, opylení a oplození, senescenci listů, pohyb průduchů. NO je důležitý i při reakcích na biotické a abiotické stresové podmínky (Wendehenne et al., 2004; Yu et al., 2014). U rostlin resistantních vůči některým patogenům se jako obranný mechanismus uplatňuje hypersenzitivní reakce (HR), tj. rychlá lokální buněčná smrt vedoucí k eliminaci biotrofního patogena, při jejímž spuštění hraje NO zásadní roli (Delledonne et al., 2001).

Oxid dusnatý u živočichů vzniká činností NO-syntázy (NOS). Tento enzym rozlišujeme ve 3 formách a to neuronální (nNOS), indukovatelná (iNOS) a endoteliální (eNOS). Funkcí všech třech typů NOS je oxidace L-argininu na L-citrulin a NO. U rostlinných buněk můžeme odlišit dva různé zdroje vzniku molekuly NO a to buď enzymově, nebo neenzymově. Enzymová tvorba NO je závislá na nitrát reduktáze (NR) (Wendehenne et al., 2001). Jedná se o homodimerní protein, jehož hlavním úkolem v rostlinných buňkách je katalýza NAD(P)H-dependentní redukce dusičnanu na dusitan (Yamasaki et Sakihama, 2000).

U rostlin je situace složitá, struktura NOS je známa pouze u řasy *Ostreococcus*. Doposud bylo popsáno celkem 6 možných enzymatických zdrojů NO. Na tvorbě NO se podílejí nitrátoreduktáza (NR) a nitrit:NO reduktáza (NiNOR) vázané na plazmatickou membránu. NR může být i v cytoplazmě, v chloroplastech či v cytoplazmě lokalizovaný enzym podobný NOS („NOS-like“ enzym), v peroxizomech xanthinoxidáza (XOD), doplněné o cytochrom c oxidázu a/nebo reduktázu (cytochrom P450) v mitochondriích a pravděpodobně křenovou peroxidázu, která za přítomnosti peroxidu vodíku může katalyzovat vznik NO *in vitro*, (obrázek 6) (Piterková et al., 2008; Yu et al., 2014). V peroxizomech, kde byla zjištěna přítomnost XOD, je tvorba NO nejvyšší (Corpas et Barroso, 2014). Zde také dochází k reakci NO se superoxidem za vzniku peroxydusitanu (obrázek 7).

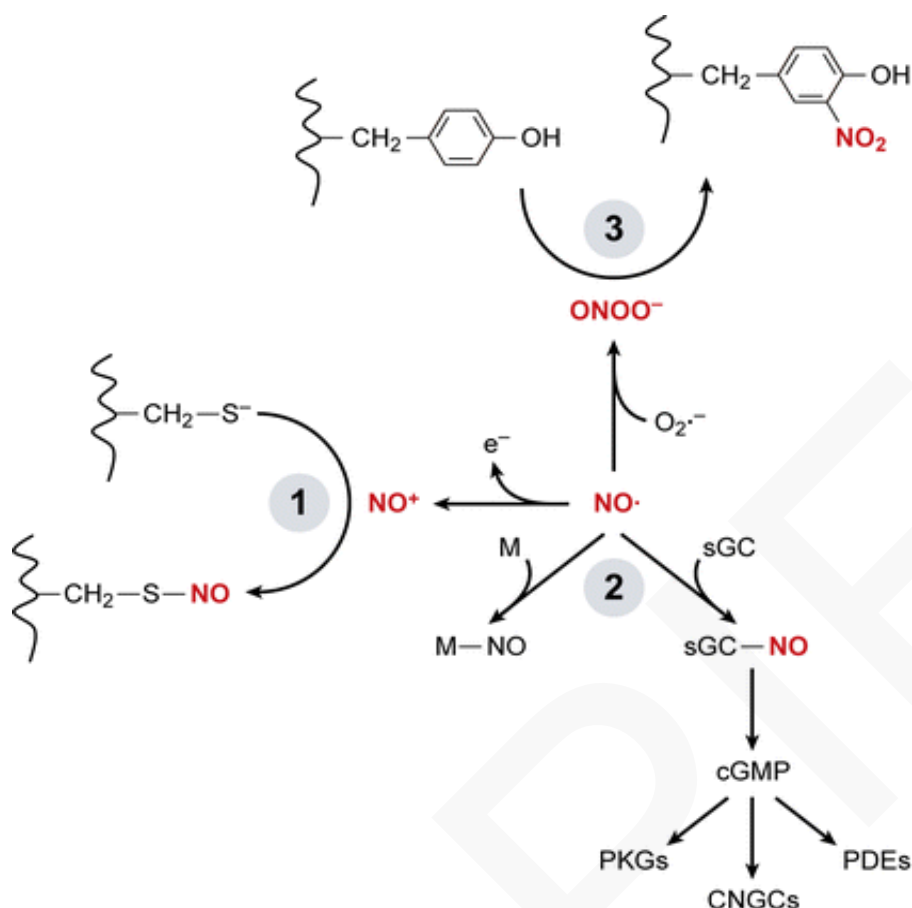


Obr. 6: Zdroje podílející se na tvorbě oxidu dusnatého (NO).

(Převzato z: Yu et al., 2014).

Také neenzymové procesy se podílejí na tvorbě NO, kdy pod vlivem nízkého pH v apoplastu dochází k redukci dusitanu a ten poté dismutuje na NO a dusičnan. Chemická redukce dusitanu na NO a kyselinu dehydroaskorbovou může také nastat v případě reakce s kyselinou askorbovou při dodržení fyziologických podmínek pH. Dalším neenzymovým procesem vyskytujícím se v membránách chloroplastů, je přeměna NO_2 na NO, která probíhá za světla a je katalyzovaná karotenoidy (Piterková et al., 2008).

$\text{NO}\cdot$ je vysoce reaktivní a tudíž i velmi nestabilní plynný radikál, který snadno difunduje přes buněčné membrány. Může být buď donorem, nebo také akceptorem elektronu, přičemž dochází ke vzniku energeticky výhodnějších struktur, mezi které se řadí nitrosoniový kation (NO^+) a nitroxylový anion (NO^-) (Durner et al., 1998). Literatura udává, že poločas života NO dosahuje méně než 6 s (Thomas et al., 2001). V aerobním prostředí dochází k redukci molekulárního kyslíku (O_2) na superoxidový anionradikál (O_2^-), přičemž následuje reakce O_2^- s radikálem oxidu dusnatého ($\text{NO}\cdot$) za vzniku peroxydusitanu (ONOO^-). V případě akumulace NO_2 způsobuje ONOO^- oxidativní poškození buněk (Wendehenne et al., 2001). Peroxydusitan, jakožto silné nitrační činidlo, může také vznikat reakcí kyslíku O_2 s nitroxylovým aniontem (NO^-); další možností je redukce nitrosyldioxylového radikálu ($\text{ONOO}\cdot$) se superoxidem (Hnízdová et al., 2009). Peroxydusitan má také schopnost interagovat s proteiny, lipidy a DNA a podílet se tak na syntéze příslušných nitroso- a nitroderivátů (Szabo et al., 2007).



Obr. 7: Přehled nejvýznamnějších reakcí NO v rostlinách in vivo.

- 1) Oxidace radikálu NO· vede ke vzniku nitrosoniového kationtu NO⁺.
- 2) Interakce NO· s volnými kovy za vzniku nitrosylkomplexů nebo interakce s kovy v hemových kofaktorech enzymů jako je např. guanylátcykláza.
- 3) Nejvýznamnějším reakčním partnerem NO· v rostlinách je superoxidový anionradikál – vzniká peroxydusitan.

(Převzato z: Besson-Bard et al., 2008).

NO· může také přímo interagovat s volnými atomy kovů za vzniku nitrosylkomplexů. Reakce, která si žádá pozornost, je vazba radikálu NO· na hemovou prosthetickou skupinu guanylátcyklázy. Dochází ke změně konformační struktury, která způsobí, že se aktivita enzymu zvýší cca 200x, a tento mechanismus vyvolá tvorbu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP). Životnost komplexu NO-hem je velice krátká, udává se poločas rozpadu méně než 0,2 s (Brown et Borutaite, 2002; Bruckdorfer et al., 2005). Zvýšení hladiny cGMP, který v buňkách vystupuje jako sekundární přenašeč, ovlivňuje aktivitu cGMP-dependentních proteinkináz, cGMP-dependentních iontových kanálů a fosfodiesteráz (obrázek 7). Přesto, že existence guanylátcyklázy nebyla u rostlin

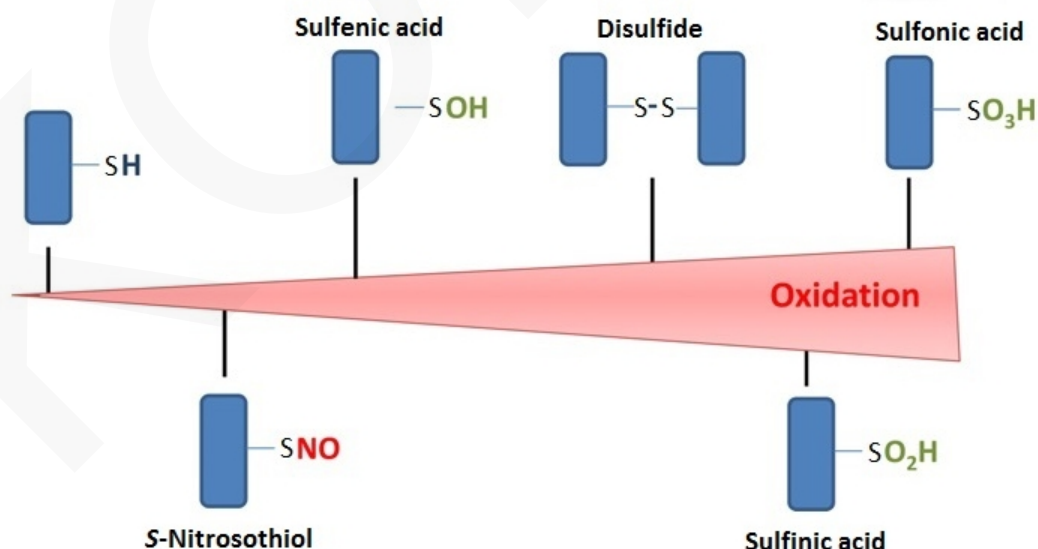
doposud prokázána, je známá alespoň funkce signální molekuly cGMP, která má schopnost regulovat iontové kanály nebo indukovat geny podílející se na produkci obranných látek a úzce souvisí s přestavbou cytoskeletu (Walden, 1998).

Dalšími partnery $\text{NO}\cdot$ mohou být atomy železa vyskytující se v aktivním místě cytochromu c oxidázy nebo komplex nehemového železa Fe-S proteinů ležících v membránách mitochondrií (Brown et Borutaite, 2002). Na obrázku 7 je znázorněn přehled reakcí, kterých se radikál $\text{NO}\cdot$ v rostlinných buňkách účastní.

Kromě nitrosylace je významnou posttranslační kovalentní modifikací proteinů i nitrace, která je založena na vzájemné interakci skupiny $-\text{NO}_2$ s aminokyselinami typu tyrozin (Y), tryptofan (W), cystein (C) a methionin (M) (Corpas et al., 2009).

Nitrace tyrosinu je uskutečněna navázáním skupiny $-\text{NO}_2$ do polohy *ortho* na aromatickém kruhu tyrozinového zbytku, přičemž dochází ke změně struktury, která vede k porušení aktivity a k zamezení fosforylace proteinu (Hnízdová et al., 2009).

Princip *S*-nitrosylace je realizován kovalentní vazbou $-\text{NO}$ skupiny na skupinu $-\text{SH}$ v aminokyselině cysteinu (obrázek 8) (Hoffmann et al., 2003).



Obr. 8: Oxidační posttranslační modifikace.

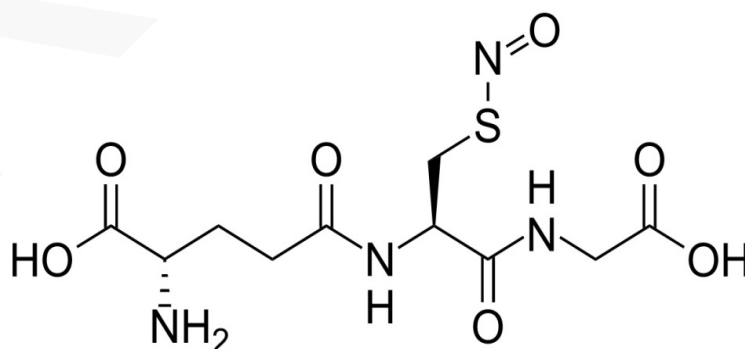
(Převzato z: Yu et al., 2014).

3.5.3. Charakteristika, význam a funkce *S*-nitrosoglutathionu (GSNO)

S-nitrosoglutathion (GSNO) vzniká reakcí glutathionu (GSH, tripeptid složený z aminokyselin kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu) s $\text{NO}\cdot$ a je považován za jeden z nejrozšířenějších nízkomolekulárních *S*-nitrosothiolů (RSNOs). Sumární vzorec GSNO je $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ a systematický název 2*S*-2-amino-5-[[2*R*-1-(karboxymethylamino)-3-nitrososulfanyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-5-oxopentanová kyselina (obrázek 9). GSH může hrát významnou úlohu v regulaci bioaktivity $\text{NO}\cdot$. GSNO může za daných podmínek uvolňovat molekulu $\text{NO}\cdot$ nebo sloužit jako vektor při její distribuci na vzdálených místech organismu (Zhao et al., 2004).

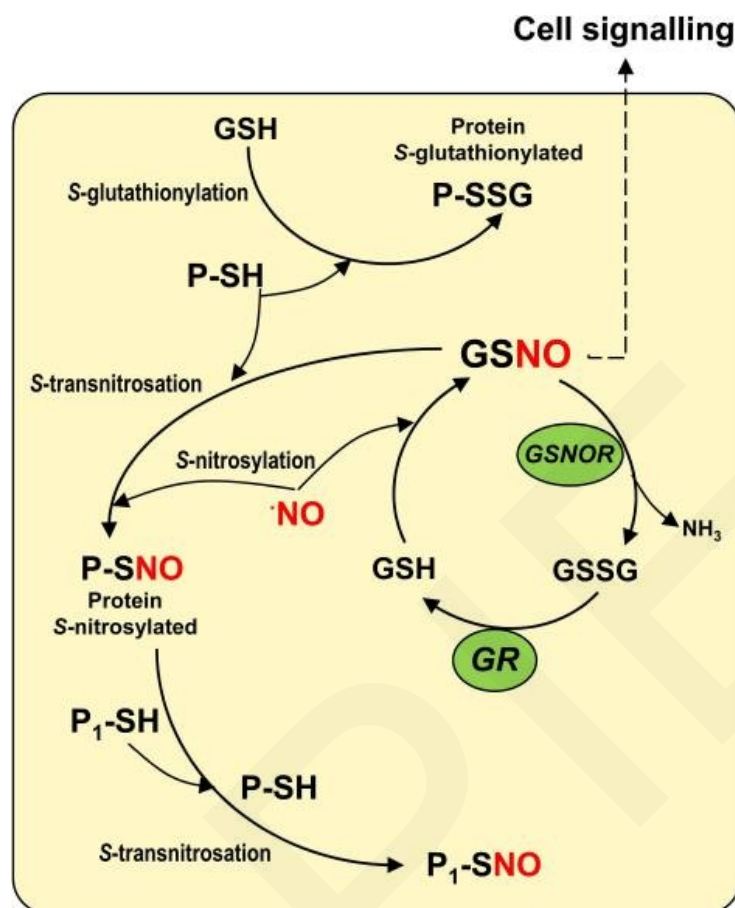
Tvorba GSNO, která probíhá v aerobním prostředí, je závislá na interakci mezi glutathionem a reaktivními formami dusíku. GSNO hraje hlavní roli v regulaci fyziologické hladiny *S*-nitrosothiolů v buňkách (Kubienová et al., 2013b). Bylo zjištěno, že aktivita cytosolárního enzymu GSNO reduktázy (GSNOR) je jednou z významných vlastností, která ovlivňuje celkové množství GSNO. Heterogenní transport GSNO v rostlinných buňkách je závislý na výskytu GSNOR. Tento enzym se podílí na katabolismu GSNO, který není schopný procházet přes plazmatické membrány (Carver et al., 2005).

Analýza GSNO prokázala, že nejhojnější výskyt této molekuly je v kořenech, a následně také v listech a stoncích, což přímo koreluje s obsahem NO v jednotlivých rostlinných orgánech a nepřímo úměrně s aktivitou GSNOR (Corpas et al., 2013). Na obrázku 10 je ukázka interakce GSNO a jeho metabolismus v buňkách.



Obr. 9: Strukturní vzorec GSNO.

(Převzato z: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nitrosoglutathione.svg>>, 14. 3. 2014).

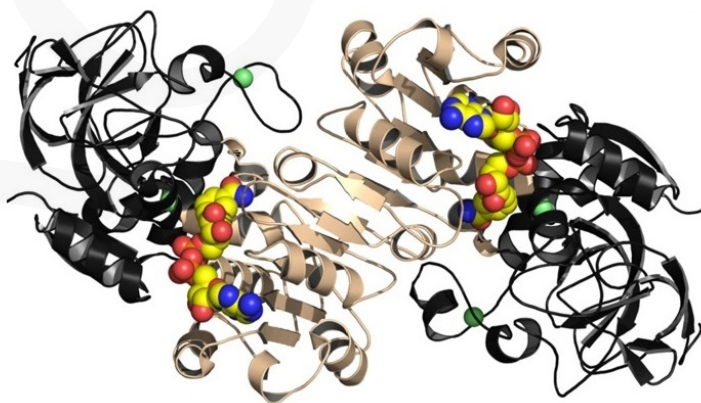


Obr. 10: Schéma interakce *S*-nitrosoglutathionu (GSNO) a jeho metabolismu v buňkách. (Převzato z: Corpas et al., 2013).

3.5.4. Charakteristika, význam a funkce *S*-nitrosoglutathion reductázy (GSNOR)

Synonymem pro *S*-nitrosoglutathion reductázu (GSNOR) je také NAD⁺-dependentní formaldehyd dehydrogenáza, která se řadí do rodiny zinek-dependentních alkohol dehydrogenáz třídy III (ADH3, χ -ADH). Ty jsou typické svou vysokou afinitou k alkoholům obsahující delší řetězec. Enzym *S*-nitrosoglutathion reductáza byl ve starší literatuře spojován s glutathion-dependentní formaldehyd dehydrogenázou. Toto zařazení do klasifikace bylo avšak kvůli nesprávně popsanému principu reakce chybné. Proto od roku 2005 nese tento enzym název *S*-(hydroxymethyl) glutathiondehydrogenáza (EC 1.1.1.284). V současných publikacích se ale nejčastěji manipuluje s pojmem *S*-nitrosoglutathion reductáza (GSNOR), i když se toto označení prozatím nesečkalo se schválením (Kubienová et al., 2013b).

Vzhled enzymů z rodiny alkoholdehydrogenáz, mezi které patří i ADH3, je typický svou homodimerní strukturou obsahující dva navázané atomy zinku. Jednotlivé monomery jsou složeny ze dvou domén - z jedné velké katalytické domény, kde jsou navázány oba dva zinečnaté ionty, a z menší nekatalytické domény, na které se nachází vazebné místo pro koenzym. Katalytickou úlohu však vykazuje pouze jeden iont zinku, druhý má funkci strukturální (Engeland et al., 1993). Přestože konformace lidské GSNOR je již dobře známá, krystalová struktura rostlinného enzymu pocházející ze *Solanum lycopersicum* byla popsána poměrně nedávno (obrázek 11).



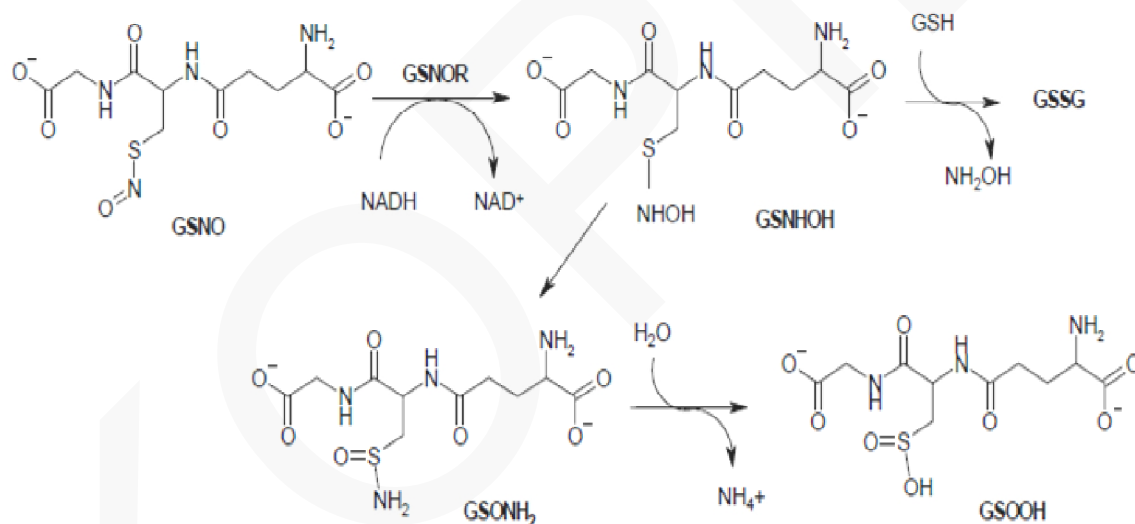
Obr. 11: Krystalová struktura GSNOR *Solanum lycopersicum*.

Katalytická doména, obsahující oba atomy zinku, je zobrazena černou barvou, nekatalytická doména vázající koenzym je naznačena jako světle hnědá. Jednotlivé atomy zinku jsou znázorněny ve formě zelených kuliček, barevně je vyjádřen koenzym NAD⁺.

(Převzato z: Kubienová et al., 2013a).

V posledních letech se potvrdila teorie, že enzym GSNOR hraje klíčovou roli v katabolismu GSNO a současně i v regulaci intracelulární hladiny *S*-nitrosothiolů (RSNOs) a podílí se tak na celkovém metabolismu NO a reaktivních forem dusíku. Funkce GSNOR byla jako první popsána u *Arabidopsis thaliana* (Kubienová et al., 2013b).

Mechanismem katalytické reakce je redukce GSNO prostřednictvím GSNOR, při které dochází ke vzniku meziprojektu *S*-hydroxylaminoglutathionu (GSNHOH). Následně může nastat samovolné přeskupení GSNHOH na glutathion-sulfinamid (GSONH₂) nebo může docházet k interakci s GSH za vzniku molekuly glutathion-disulfidu (GSSG) (Staab et al., 2008). Princip reakce je naznačen na obrázku 12.



Obr. 12: Katalytická reakce GSNOR.

Prostřednictvím enzymu GSNOR (třídy ADH3) dochází ke katalytické NADH-dependentní redukci *S*-nitrosoglutathionu (GSNO). Produktem je nestabilní intermediát *N*-hydroxy-sulfinamid (GSNHOH).

(Převzato z: Kubienová et al., 2013b).

3.5.4.1. GSNOR v reakcích rostlin na abiotický stres

Řada publikací uvádí výsledky, které popisují funkci GSNOR v souvislosti s reakcí rostlin na abiotický stres (Kubienová et al., 2014b). Bylo zjištěno, že jestliže je rostlina nějakým způsobem mechanicky poškozena, dochází u *Arabidopsis thaliana* k potlačení genu AtGSNOR (Kubienová et al., 2013b). Tento gen je naopak aktivován v případě, že na něj působí kyselina salicylová (SA), která zprostředkovává přenos biotického stresu. Podobný experiment byl aplikován na rostlinách tabáku, které byly ošetřeny kyselinou jasmonovou. Ta způsobila snížení hladiny i aktivity GSNOR a reakce na salicylát se zvýšila. Z této studie vyplývá, že rostlinné hormony a mechanické poškození mají zásadní vliv na výslednou aktivitu enzymu GSNOR. Fytohormony jsou produkovány v signálních procesech, které vznikají jako reakce na různé stresové faktory a tím aktivují různé obranné geny. Za stresové může být považováno poranění, sucho, chlad či zasolení půdy a právě tyto podmínky způsobují vylučování hormonů, mezi které patří kyselina abscisová, kyselina jasmonová a kyselina salicylová (Díaz et al., 2003; Yu et al., 2014).

V publikaci Leterrier et al. (2011) byly pozorovány změny u semenáčků *Arabidopsis*, které byly pěstovány v přítomnosti 0,5 mmol/l arsenu. Bylo zjištěno, že tento polokov způsobil významnou redukci kořenů, zatímco se aktivita enzymu GSNOR a také obsah NO výrazně zvýšily. Hladina GSNOR se také aktivně podílí na určení buněčné homeostázy molekuly NO a současně je nepřímo zapojena do buněčné redoxních dějů.

Mezi abiotické stresory patří také vysoká teplota, která negativně ovlivňuje růst a reprodukci rostlin. U mladých rostlin slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) snižuje vysoká teplota obsah NO, aktivita i exprese GSNOR klesá, přičemž dochází k akumulaci RSNOs včetně GSNO. Tato studie vedla k závěru, že i nadměrná teplota způsobuje výkyvy hladiny GSNOR (Chaki et al., 2011).

3.5.4.2. GSNOR v reakcích rostlin na biotický stres

Experimentální studie ukazují, že NO a GSNO jsou pozitivními regulátory rezistence rostlin, podílejí se na hypersenzitivní reakci (HR) a aktivaci obranných genů. Pokud nastane situace, že dojde ke snížení hladiny GSNOR a zároveň ke zvýšení hladiny RSNOs, může být konečným výsledkem zvýšení rostlinné imunity na lokální i systémové úrovni. Jestliže bude patogen odhalen včas, nastane zvýšená tvorba NO, reaktivních forem kyslíku (H_2O_2 , O_2^-) a SA. Byly však uveřejněny také opačné publikace, které hypotézu vyvracejí. Vysvětlují, že snížení aktivity enzymu GSNOR a následné zvýšení RSNOs způsobilo pokles bazální i nehostitelské rezistence. Tento princip byl prokázán u *Arabidopsis thaliana*, která byla inokulována bakterií *Pseudomonas syringae* (Feechan et al., 2005).

3.6. Metody studia RONS a jejich metabolismu

Molekuly RONS lze kvantifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie po reakci s různými činidly, pomocí laserové fotoakustické spektroskopie nebo pomocí EPR spektroskopie (EPR = elektronová paramagnetická rezonance) či lokalizovat *in vivo* různě specifickými fluorochromy (Vandelle et Delledonne, 2008).

Pro detekci molekul GSNO a GSNOR se u vyšších rostlin využívají dvě metody, a to imunohistochemická analýza pomocí komerčně dostupných protilátek proti GSNO/GSNOR nebo kapalinová chromatografie elektrosprejem pomocí hmotnostní spektrometrie (LC-ES/MS). Právě tyto techniky poskytly počáteční informace o obsahu a lokalizaci GSNO/GSNOR v různých rostlinných orgánech pod vlivem nepříznivých podmínek. Histochemická metoda, využívající fluorescenčně značenou sekundární protilátku, poskytuje informaci o lokalizaci a relativním množství GSNO/GSNOR, které je pak možno přesně kvantifikovat pomocí LC-ES/MS. Pro vizualizaci signálu GSNO/GSNOR v rostlinných pletivech se využívá především laserová skenovací konfokální mikroskopie (LSCM) (Corpas et al., 2013).

Při stanovení změny aktivity GSNOR je spektrofotometricky sledován úbytek/tvorba redukovaného nikotinamidadeninukleotidu (NADH). Detekce aktivity GSNOR je také možná v gelech po nativní elektroforéze, následovaná specifickým barvením (Uotila et Koivusalo, 1987).

Expresí genů kodujících GSNOR může být analyzována pomocí qRT-PCR („quantitative real-time PCR“) (Wang et al., 2012).

3.7. Principy a aplikace světelné mikroskopie

3.7.1. Historie světelné mikroskopie

Kolem r. 1590 byl v Holandsku sestroyen první drobnohled, kterým H. a Z. Janssenovi zahájili éru optické mikroskopie (Kubínová, 2006). Důležitou vlastností každého mikroskopu je rozlišovací schopnost, tj. vzdálenost dvou bodů objektu, které se v mikroskopu jeví jako dva samostatné body. Světelný mikroskop není schopen rozlišit takové body, které leží v menší vzdálenosti, než je polovina vlnové délky záření. Tento úsek odpovídá zhruba 250 nm.

Optické mikroskopy využívají zákon odrazu a lomu světelného záření, kdy dochází k šíření světla podle tzv. Huygensova principu. Zdrojem sekundárních sférických vln se může stát každý samostatný bod osvětleného preparátu. Vznikající sekundární vlny spolu interferují a obsahují informaci o podobě objektu, která se šíří směrem do objektivu. Sekundární vlny, které se od roviny předmětu pohybují rovnoběžně, se vzájemně střetávají v zadní ohniskové rovině objektivu a interferují. Podle Huygensova principu tak dochází ke vzniku nových vln, které v obrazové rovině mikroskopu vytváří zvětšený a převrácený obraz předmětu (Hampl, 2010). V současnosti se využívá řady optických modifikací světelné mikroskopie pro zvýšení kontrastu, barvení preparátů, či pro lepší zobrazení vzorků.

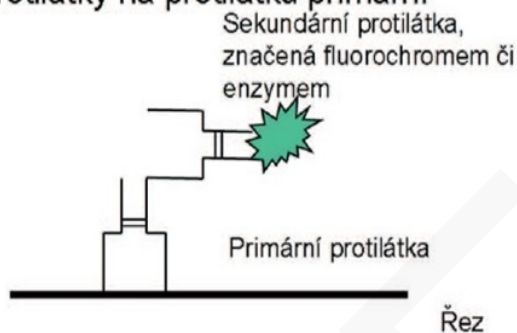
3.7.2. Fluorescenční mikroskopie

Od poloviny 19. století se ve světě mikroskopie začíná využívat fenoménu fluorescence. Fluorescence je děj, kdy molekuly emitují světelné paprsky z excitovaných stavů elektronů, které vznikly buď fyzikálně (např. absorpcí světla), mechanicky (třením), nebo chemickou reakcí. K vybuzení molekul při fluorescenční mikroskopii se využívá fotonů, tzv. excitační záření, které způsobí přeskočení elektronu na vyšší energetickou hladinu. Elektron se poté vrací zpět na nižší úroveň energetické hladiny a krátce emituje světlo, tzv. emisní záření, o nižší energii a vyšší vlnové délce než bylo světlo působící na vzorek. Od fluorescence musíme odlišit druhou kategorii fotoluminiscence, a to fosforescenci, jejíž emise je daleko delší než u fluorescence (Olympus America Inc, 2012).

Fluorescenční značení molekul v biologických vzorcích je v současnosti možné provádět histochemicky, imunohistochemicky nebo prostřednictvím fúzních proteinů u GMO (Sedlářová, ústní sdělení). Na obrázku 13 je znázorněna metoda nepřímého dvojstupňového imunohistochemického značení pomocí fluorochromu.

Nepřímá metoda

= dvojestupňová metoda, založená na imunologické vazbě sekundární značené protilátky na protilátku primární



Obr. 13: Princip nepřímého dvojestupňového imunohistochemického značení.

(Převzato z: Beranová et Tonar, 2002).

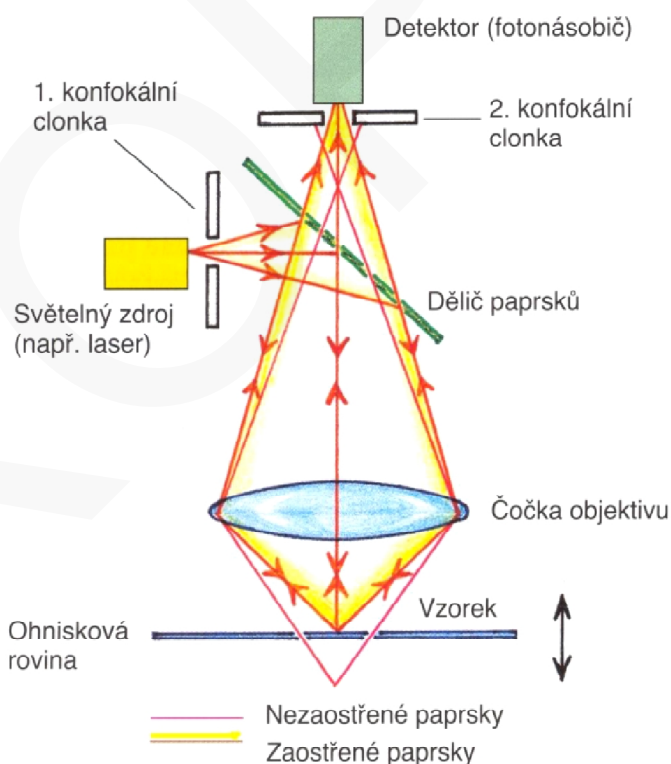
3.7.3. Konfokální mikroskopie

Fluorescenční vzorky lze v současnosti zobrazovat s vyšší přesností konfokální mikroskopií, jejíž výhodou je lepší rozlišovací schopnost, potlačení záření, které vzniká z nezaostřených částí pozorovaného preparátu a možnost provádět velmi tenké optické řezy tlustším vzorkem a následně zobrazit preparát v 3D projekci (Kubínová, 2006).

Základní princip konfokální mikroskopie, tj. omezení signálů z rovin mimo fokus, objevil Marvin Minsky, jakožto postgraduální student Harvardské university, a patentoval jej v r. 1957, i když sám neměl k dispozici dostatečné intenzivní světelný zdroj. Do historie zasáhli i Mojmir Petráň a Milan Hadravský z Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, kteří v r. 1965 zhotovili a v r. 1968 patentovali mikroskop s dvojitým řádkováním, tzv. tandemový skenovací mikroskop (Kubínová, 2006). Za následovatele M. Minskyho může být zároveň považován i M. David Egger, který se podílel na vzniku více paprskového konfokálního mikroskopu na konci 60. let 20. století. V obou případech mikroskop využíval principu Nipkowova kotouče, pomocí kterého zpracovával optické řezy silným preparátem. I v současnosti se používá konfokální mikroskop s rotujícím diskem, který obsahuje velké množství navzájem oddělených clonek. Výhodou je rychlé skenování preparátu vhodné pro studium živých buněk, které je zajištěno zobrazením více bodů najednou (Hibbs, 2004).

S rozvojem laserů a výkonných PC vznikla technika laserové řádkovací konfokální mikroskopie (laser scanning confocal microscopy = LSCM). Během pozorování

v konfokálním mikroskopu je zkoumaný objekt osvětlován bodovým světelným zdrojem, který prochází přes první konfokální clonku, která je pomocí objektivu promítnuta na vzorek a to konkrétně do bodu, jehož průměr odpovídá rozlišovací schopnosti objektivu, tzv. difrakční mez (obrázek 14). Úkolem objektivu je poté sběr světla odraženého či rozptýleného vzorkem, popř. fluorescence preparátu. Během zpětného průchodu tohoto záření přes objektiv dochází k vytvoření dalšího obrazu bodové clonky. Vzniklý obraz je následně díky děliči paprsků usměrněn před fotonásobič, kde je umístěna druhá konfokální bodová clonka. Ta zabraňuje detekci paprsků, které se vytvořily v oblasti vzorku mimo rovinu zaostření. Obraz je registrován skenovacím detektorem. Výsledný snímek nevzniká najednou, ale postupně bod po bodu principem řádkování. Jednotlivé optické řezy (body) jsou zobrazovány díky souřadnicím X-Y daného bodu, pomocí kterých seskládá počítač konečný obraz celého preparátu. Proto tato technika není vhodná pro sledování velmi rychlých dějů v živých buňkách (Plášek, 1995).



Obr. 14: Schéma laserové skenovací konfokální mikroskopie.

(Převzato z: Kubínová, 2006).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Příprava biologického materiálu, patotesty

4.1.1. Použitý kmen patogena, rostlinný materiál

V následujících experimentech byl použit kmen *Phytophthora parasitica* s. 149 poskytnutý v r. 2013 Mgr. Jan Lochmanem, Ph.D. z Katedry Biochemie, PřF Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37, Brno.

4.1.2. Příprava růstových médií a kultivace *Phytophthora* spp.

Zástupci rodu *Phytophthora* jsou hemibiotrofními parazity, proto je možné je kultivovat dlouhodobě na živných médiích. V názorech na složení kultivačních půd se autoři různí, podle Gallegly a Honga (2008) je celkově nejlepším médiem pro růst všech druhů, zejména pomalu rostoucích a psychrofilních izolátů, fazolový agar. Toto médium se připravuje rozvařením 141 g zmražených fazolových lusků a přidáním 20 g agaru na 1 l destilované vody. Pro pěstování *Phytophthora* spp. se dále používají konopná média nebo také média vyrobená z fazolí, která jsou zároveň obohacena žitnými semínky. Krátká et al. (2008) doporučují mrkvový agar, pro jehož výrobu se využívá mrkvový džus, nebo také agary ovesné, glukózo-asparaginové nebo V8. Známý je také agar ze zmraženého hrachu. Pro naše účely byla *Phytophthora parasitica* kultivována na V8 médiu. Hlavní složkou tohoto média je V8 džus, což je přírodní zeleninová šťáva prodávaná volně v supermarketech. Pevná i tekutá V8 média se používají pro statickou kultivaci fytoftor a narostlé mycelium poté můžeme sledovat přes dno Petriho misky, i když pro mikroskopická pozorování není toto médium díky zabarvení nejvhodnější.

Pro přípravu V8 média je potřeba 350 ml V8 džusu pufrovat 5 g CaCO₃ několik minut, nejlépe za stálého míchání. Následuje centrifugace po dobu 20 min při 6000 g. Supernatant ředíme destilovanou vodou v poměru 1:5. Někteří autoři přidávají 0,1-0,2 g β-sitosterolu (rozpuštěný v etheru) na 1 l média. Pro získání pevného V8 média je potřeba dodat 1,5-2% agar (možno rozvařit v mikrovlnné troubě). V8 agary i bujóny poté autoklávueme při 120 °C po dobu 20 min a po částečném vychladnutí rozléváme do Petriho misek. Uchováváme v lednici při 4 °C. Sterilizované médium je také možné dlouhodobě skladovat při 4 °C ve skleněné nádobě se šroubovacím uzávěrem a před dalším použitím vyklávkovat a rozlít do Petriho misek, jak již bylo uvedeno výše (Krátká et al. 2008; Picard et al., 2000; Šašek, 2011).

4.1.3. Izolace zoospor u *Phytophthora* spp.

P. parasitica byla pěstována na pevném V8 médiu v pokojových podmínkách (alternativně se kultivuje při trvalém osvětlení a teplotě 25 °C). Po inkubaci 1,5-2 týdny bylo vzdušné mléčně bílé mycelium sterilně odebráno ve flow-boxu i s agarem. 3-4 čtverečky o velikosti cca 7 × 7 mm s nárůstem mycelia byly přeneseny do tekutého V8 média na Petriho misku a inkubovány za stejných podmínek jako na V8 agaru, po dobu 10-12 dní. Mycelium v podobě bílých chomáčků bylo sterilně odebráno, v malých částech umístěno na 2% vodní agar a pěstováno dalších 5-7 dnů. Průběžně lze monitorovat vývoj sporangií pomocí stereomikroskopu.

Pro uvolnění zoospor ze sporangií je využíván teplotní šok. Kultura na vodním agaru byla přenesena do 4 °C na 30-60 min. Poté bylo mycelium převrstveno sterilní vodou o teplotě 37 °C a inkubováno 30 min při 25 °C. Suspenze zoospor byla odpipetována a použita pro inokulaci rostlinného materiálu. Hustota zoospor byla stanovena počítáním zoospor v Malasseho nebo Bürkerově komůrce po odebrání alikvotní části 200 µl ze získané suspenze. Pro znehybnění bičíkatých zoospor, a tudíž větší efektivitu počítání, lze přidat 2 kapky 50% kyseliny octové nebo krátce centrifugovat. Nejčastěji používaná koncentrace pro inokulaci rostlin je cca 100 zoospor na 20 µl, tj. 5 × 10³ v 1 ml (Lochman et al., ústní sdělení).

4.1.4. Rostlinný materiál

Jako modelové rostliny byly použity 3 genotypy rajčete (rod *Solanum* dříve *Lycopersicon*) s odlišnou náchylností resp. odolností vůči infekci padlí (*Oidium neolyopersici*) a abiotickým stresorům. V experimentech byly použity náchylný genotyp *Solanum esculentum* L. cv. Amateur, středně rezistentní *S. chmielewskii* (Rick, Kesickii, Forbes and Holle) Spooner, Andreson and Jansen (LA 2663) a rezistentní *S. habrochaites* Knapp and Spooner f. *glabratum* (LA 2128) (syn. *S. hirsutum* L.) (Piterková et al., 2009).

Semena byla vysévána do vodou navlhčeného perlitu a cca 2 týdny staré semenáčky s plně vyvinutými děložními listy byly přesazeny do směsi zahradního substrátu. Jednotlivé rostliny v plastových květináčích o průměru 7 cm byly pěstovány ve skleníku při teplotě 20/18 °C a fotoperiodě 12/12 h (den/noc). Rostliny byly pravidelně zalévány a hnojeny. Pro experiment byly použity rostliny zhruba 2 měsíce staré.

4.1.5. Inokulace rostlin, aplikace elicitorů a příprava vzorků

Na každé rostlině byly zoosporami *P. parasitica* inokulovány 3 dobře vyvinuté lístky jednoho lichozpeřeného listu (obrázek 15), jednalo se vždy o cca 5.-6. pravý list rostliny. Pro inokulaci byla použita metoda infiltrace pomocí injekční stříkačky bez jehly. Po lehkém narušení pokožky spodní (abaxiální) strany listu rajčete plastovou špičkou byla suspenze zoospor patogena jemně vtlačena do mezibuněčných prostor listového mezofylu. Byla testována i varianta nanesení kapky sporové suspenze na povrch listu, ale toto provedení inokulace nebylo vhodné. Především u *S. habrochaites* jsou listy pokryty silnou vrstvou trichomů a inokulace tímto také užívaným způsobem nebyla úspěšná.

U každého genotypu rajčat bylo inokulováno 10 rostlin. Odběry materiálu (listů inokulovaných i kontrolních rostlin) byly provedeny 0, 24, 48, 72, 96 a 120 hodin po inokulaci (hpi). Směsný vzorek pletiv ze dvou listů byl rozdělen do tří částí, vzorky byly zváženy, popsány a zamraženy v tekutém dusíku. Do okamžiku měření biochemických parametrů byla pletiva uchovávána v -80 °C.

Pěstování, inokulace a odběr vzorků byly provedeny ve třech nezávislých sériích.



Obr. 15: Ukázka inokulace tří lístků lichozpeřeného listu *S. habrochaites*, metoda infiltrace pletiv suspenzí zoospor *P. parasitica*.

4.2. Měření aktivity enzymů

4.2.1. Stanovení aktivity GSNOR v rostlinném materiálu

Homogenizace rostlinného materiálu byla provedena v tekutém dusíku ve třecí misce společně s extrakčním pufrům (50 mmol/l Tris-HCl o pH 7,5; 0,2% (v/v) Triton X-100; 2 mmol/l DTT; 1 mmol/l PMSF) v poměru 1:2, tj. 0,5 g odebraných listů rajčat:1 ml extrakčního pufru. Látky DTT a PMSF je nutné do pufru přidávat vždy čerstvé. Homogenizovaný extrakt byl přenesen do mikrozkušavky Eppendorf a centrifugován 20 min při 16000 g a 4 °C. Následně byl získaný supernatant přečištěn na koloně NAP-5 (3 ml náplně Sephadex G-25). Ekvilibrace kolony byla provedena pomocí ekvilibračního pufru o složení 10 mmol/l Na⁺-fosfátový pufr, pH 6,8. Po nanesení 3x 2,5 ml Na⁺-fosfátového pufru na kolonu, bylo aplikováno 500 µl supernatantu. Po vsáknutí vzorku byl nanesen 1 ml elučního pufru (50 mmol/l K⁺-fosfátový pufr, pH 7,8). Následně bylo potřeba jimat 1 ml eluátu, který kolonou protekl. Nakonec byla kolona opakovaně promývána 25 ml destilované vody (Corpas et al., 2008).

Principem pro spektrofotometrické měření aktivity GSNOR byla oxidace NADH při $\lambda = 340 \text{ nm}$ a 30 °C. Do jednotlivých jamek na 96 jamkové mikrodestičce bylo pipetováno vždy ve třech opakováních 225 µl reakčního pufru (20 mmol/l Tris-HCl, pH 8), 15 µl proteinového extraktu a 30 µl 2 mmol/l NADH. Do negativní kontroly, blanku, bylo pipetováno 30 µl destilované vody namísto GSNO. Start reakce byl uskutečněn přidáním 30 µl 4 mmol/l GSNO. NADH společně s GSNO bylo potřeba připravit v potřebném množství vždy čerstvé a uchovávat je ve tmě, protože jsou citlivé na světlo (fotolabilita).

A) Výpočet aktivity GSNOR (kat = mol/s):

$$a = \frac{\Delta A \cdot V}{\varepsilon \cdot t \cdot l}$$

Tabulka 1: Legenda pro výpočet aktivity GSNOR (kat = mol/s).

a	Aktivita GSNOR (kat = mol/s)
ΔA	Změna absorbance ($A_{10 \text{ min}} - A_{20 \text{ min}}$)
V	Celkový objem pipetovaný do každé jamky (300 µl = 0,0003 l)
ε	Molární extinkční koeficient pro NADH = 6220
t	Čas v sekundách (600 s pro 10 min)
l	Délka optické dráhy

B) Výpočet aktivity GSNOR (nmol/min):

$$a = a \text{ (mol/s)} \cdot 60000000000$$

*) 60000000000 = převod jednotky mol/s na jednotku nmol/min

C) Výpočet specifické aktivity GSNOR (nmol/min) na mg proteinu:

$$\text{Specifická aktivita} = \frac{1}{\left(\frac{V_2}{V_1} \cdot c_p\right)} \cdot a$$

Tabulka 2: Legenda pro výpočet specifické aktivity GSNOR (nmol/min) na mg proteinu.

a	Aktivita GSNOR (nmol/min)
c _p	Vypočítaná hodnota koncentrace proteinů ve vzorku (mg/ml)
V ₂	Do každé jamky bylo pipetováno 15 μl vzorku (extraktu)
V ₁	Celkem bylo vyizolováno 1000 μl (1 ml) extraktu

D) Výpočet aktivity GSNOR (nmol/min) na 1 ml:

$$a_1 = \left(\frac{V_2}{V_1}\right) \cdot a$$

Tabulka 3: Legenda pro výpočet aktivity GSNOR (nmol/min) na 1 ml.

a	Aktivita GSNOR (nmol/min)
a ₁	Aktivita GSNOR (nmol/min) na 1 ml
V ₂	Do každé jamky bylo pipetováno 15 μl vzorku (extraktu)
V ₁	Celkem bylo vyizolováno 1000 μl (1 ml) extraktu

E) Výpočet aktivity GSNOR (nmol/min) na 1 g FW (čerstvé váhy):

$$a_2 = a_1 \cdot 3 \cdot 2$$

Tabulka 4: Legenda pro výpočet aktivity GSNOR (nmol/min) na 1 g FW.

a ₁	Aktivita GSNOR (nmol/min) na 1 ml
a ₂	Aktivita GSNOR (nmol/min) na 1 g FW
3	Homogenizace rostlinného materiálu v poměru 1:2; tj. (1 + 2 = 3)
2	Ředění na kolonce NAP-5

Následně po doměření kinetiky GSNOR bylo třeba na spektrofotometru (Mikrodestičkový spektrofotometr, Reader Synergy HT, BioTek Instruments, USA) stanovit délku optické dráhy při $\lambda = 900$ nm a 977 nm (tabulka 5). Získané hodnoty absorbancí byly zobrazeny v softwaru KC4, který je součástí readeru. Pro výpočet hodnot byly použity uvedené vzorce (tabulka 1, 2, 3, 4), pro vyhodnocení výsledků a jejich následné zpracování byl zvolen program Microsoft Office Excel 2007.

F) Výpočet délky optické dráhy:

$$\text{Délka optické dráhy} = \frac{A_{977} - A_{900}}{0,18}$$

Tabulka 5: Legenda pro výpočet délky optické dráhy.

A_{977}	Absorbance při 977 nm
A_{900}	Absorbance při 900 nm
0,18	Koeficient pro přepočtení naměřených hodnot na spektrofotometru (konkrétně pro Reader Synergy HT, USA)

4.3. Stanovení koncentrace proteinů v rostlinném materiálu

Pro stanovení obsahu proteinů v rostlinných extraktech byla použita metoda Bradfordové. Do jednotlivých jamek na 96 jamkové mikrodestičce bylo aplikováno postupně vždy 45 μ l deionizované vody, 5 μ l vzorku proteinu (extraktu) nebo standardu BSA, a 200 μ l pracovního činidla Bradfordové, které bylo připraveno vždy čerstvé (zásobní roztok Coomassie Blue ředěný deionizovanou vodou v poměru 1:4). Do negativní kontroly, blanku, bylo pipetováno 50 μ l destilované vody zároveň s 200 μ l činidla Bradfordové. Po inkubaci 5 min byla na výše zmíněném spektrofotometru měřena absorbance při $\lambda = 595$ nm. Hodnoty absorbancí byly zobrazeny v softwaru KC4. Výsledky byly následně přepočteny (tabulka 6) a vyhodnoceny v programu Microsoft Office Excel 2007.

G) Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí rovnice lineární regrese:

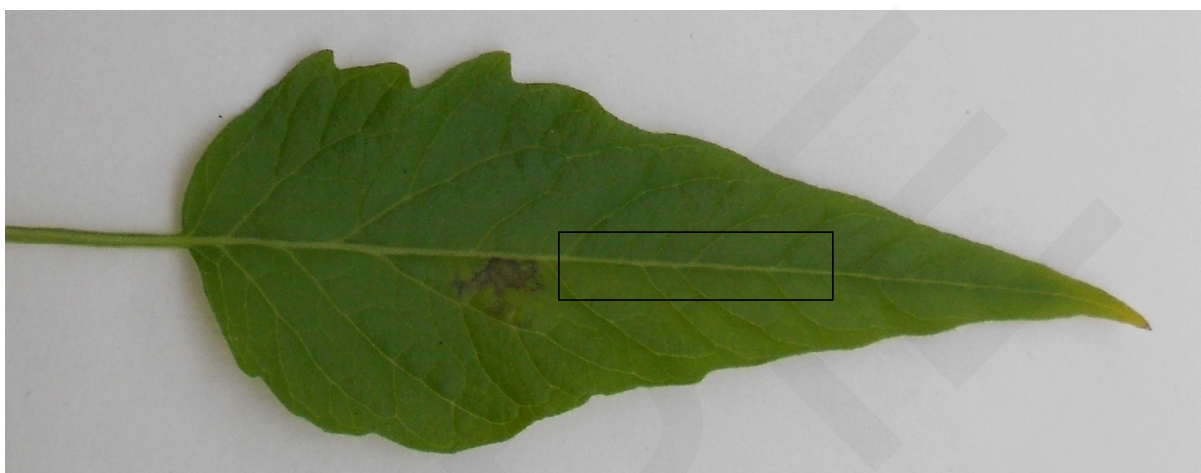
$$y = kx + q \quad \text{a} \quad x = \frac{y-q}{k}$$

Tabulka 6: Legenda pro výpočet koncentrace proteinů.

y	Hodnota absorbance (A) vzorků
x	Hodnota koncentrace (c) proteinů
k	Směrnice přímky
q	Druhá souřadnice průsečíku přímky s osou y.

4.4. Histochemické stanovení lokalizace GSNOR a GSNO

In vivo lokalizace *S*-nitrosoglutathionu (GSNO) a enzymu *S*-nitrosoglutathion reductázy (GSNOR) byla provedena 72 hpi v pletivech, které sousedily s místem infiltrace či vznikající léze (obrázek 16), a ve stejných segmentech kontrolních listů neinokulovaných rostlin.



Obr. 16: Ukázka výřezu inokulovaného listu *S. chmielewskii*.

4.4.1. Příprava příčných řezů

Inokulovaný list rajčete (72 hpi) byl přenesen na filtrační papír, kde byl pomocí ostré žiletky proveden řez rovnoběžně vedle hlavního cévního svazku o šířce cca 3 mm (obrázek 16). Takto izolovaný segment byl kolmo rozkrájen ostrou žiletkou na čtvercové části po 0,5 cm.

Následně byla provedena fixace jednotlivých řezů v 4% (w/v) paraformaldehydu v 0,1 mol/l K^+ -fosfátovém pufru (pH 7,4) při pokojové teplotě po dobu 3 h. Poté byly řezy vkládány do 4% agarosy o teplotě cca 40 °C a do zchladnutí udržovány v kolmé pozici. Po ztuhnutí byly z agarosy vyříznuty krychle o rozměrech cca 1 × 1 × 1 cm se vzorkem uprostřed a upevněny vteřinovým lepidlem na držák vzorků. Na vibratomu (BangCo, 1000 Plus, Brno, Česká republika) byly zhotoveny příčné řezy vzorkem o tloušťce 100 μ m. Žiletka i povrch agarosového kvádrů byly v průběhu řezání neustále zvlhčovány TBSA-BSAT puftrem pomocí malého štětečku, kterým byly řezy zároveň přenášeny do Petriho misky s TBSA-BSAT puftrem (pH 7,6).

4.4.2. Imunohistochemická detekce GSNO a GSNOR

Pro imunodetekci GSNO a GSNOR byla použita nepřímá dvoustupňová metoda upravená Mgr. Lucií Kubienovou, Ph.D. z KBC PšF UP podle práce Corpas et al. (2004). Primární protilátkou pro detekci GSNO byla komerčně prodávaná polyklonální kryší protilátka proti GSNO (Agrisera AB, Švédsko, 1:2000). Jako sekundární protilátka byla využita komerčně dostupná králičí protilátka proti imunoglobulinům krysy, která byla fluorescenčně značená a sledovaná při excitační/emisní vlnové délce 493/518 nm (anti-kryší IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated, Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA, 1:1000).

Primární protilátkou pro imunolokalizaci GSNOR byla polyklonální králičí protilátka proti GSNOR (Jahnová et Kubienová, 2012; Kubienová et al., 2014a; 1:500). Jako fluorescenčně značená sekundární protilátka byla použita kozí protilátka proti králičím globulinům (goat anti-rabbit IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated, Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA, 1:1000). Excitační/emisní vlnová délka fluorescenční značky dosahuje hodnot 493/518 nm.

Pozitivní a negativní kontroly se nejčastěji využívají k tomu, aby se ověřila funkčnost a specifická pracovního protokolu pro detekci sledované látky. K prověření, zda je protokol prováděn správně, slouží takový vzorek, o kterém je prokázáno, že je pozitivní. Pracovní postup je nutné upravit a následně optimalizovat v případě, pokud není rozeznán žádný signál. Pro ověření, zda je daný protokol specifický, slouží negativní kontrola. Za tu mohou být považovány preparáty bez studované látky (antigenu). Jako negativní kontrola se mohou používat i metody, kdy je na preparát navázán antigen, ale primární protilátka je vynechána, nebo je nahrazena sérem ze stejného zvířete, které se stalo donorem primární protilátky. I v tomto případě je detekce jakéhokoli signálu nežádoucí. Komplikace při pozorování fluorescenčních signálů značených protilátek může být vyvolána autofluorescencí vzorku.

4.4.3. Inkubace řezů

Inkubace jednotlivých řezů byla provedena v 12-jamkové mikrotitrační destičce obsahující řady A-C a sloupce 1-4. Schéma mikrotitrační destičky je názorně zobrazeno v následujících tabulkách (tabulky 7, 8).

Tabulka 7: Detekce GSNO. Schéma mikrotitrační destičky.

	1	2	3	4
A	krysí polyklonální protilátka α -GSNO 2 ml, přes noc, 4°C	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min
B	anti-krysí IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated 2 ml, 1 h, 4°C	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min
C	TBSA-BSAT 3,5 ml, přes noc, 4°C	anti-krysí IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated → 2 ml, 1 h, 4°C	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 15 min	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 15 min

Tabulka 8: Detekce GSNOR. Schéma mikrotitrační destičky.

	1	2	3	4
A	králičí polyklonální protilátka α -GSNOR 2 ml, přes noc, 4°C	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min
B	anti-králičí IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated 2 ml, 1 h, 4°C	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min
C	TBSA-BSAT 3,5 ml, přes noc, 4°C	anti-králičí IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated → 2 ml, 1 h, 4°C	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 15 min	→ TBSA-BSAT 3,5 ml, 15 min

(Tabulky 7, 8 byly převzaty z: Jahnová et Kubienová, 2012).

Jednotlivé řezy vzorku byly inkubovány v jamkách řady A a B. Řezy negativní kontroly byly umístěny do jamek řady C.

Do jamky A1 byly přeneseny 2 ml primární protilátky, do jamky C1 bylo napipetováno 3,5 ml TBSA-BSAT pufru (absence primární protilátky). Do obou jamek byly vloženy košíčky se sítky, kde do každého košíčku bylo opatrně přemístěno pomocí štětečku

cca 7-10 řezů vzorku. Destička byla uzavřena víčkem, zabalena do alobalu a inkubována přes noc do druhého dne za mírného třepání na třepače při 4 °C.

Řezy, které byly inkubovány v jamce A1 v primární protilátce, byly během druhého dne přeneseny do jamky A2 a promývány 3x v 3,5 ml TBSA-BSAT po dobu 10 min. Košíček byl z jamky A2 vyjmut pomocí pinzety a přemístěn do další jamky (A3). Následovala inkubace, kdy byla destička opatřena víčkem a zabalena do alobalu. Inkubace probíhala po dobu 10 min za velmi mírného třepání. Tímto způsobem byly košíčky promývány a postupně přenášeny do dalších jamek (Tabulky 7, 8).

V dalším kroku byly do jamek B1 a C2 napipetovány 2 ml sekundární protilátky a následně přemístěny košíčky obsahující vzorky řezů po posledním promývacím kroku (z jamky A4). Destička byla opatřena víčkem, zabalena do alobalu a inkubována 1 h při pokojové teplotě za velmi mírného třepání. Po skončení inkubace byly řezy vzorku přemístěny do další jamky a promývány 3x v 3,5 ml TBSA-BSAT po dobu 10 min. Stejným způsobem byly košíčky postupně přenášeny i do dalších jamek a opakovaně promývány podle uvedeného rozpisu při co nejmenším osvětlení a za mírného třepání destičky. Řezy negativní kontroly byly promývány 2x v 3,5 ml TBSA-BSAT po dobu 15 min.

Jakmile byl dokončen poslední promývací krok, byly jednotlivé řezy přeneseny opatrně pomocí tenkého štětečku z košíčků na podložní skla obsahující 18 μ l roztoku PBS:100% glycerol, v poměru 3:1. Na každé podložní sklíčko bylo umístěno cca 7-8 řezů. Ty byly opatřeny krycím sklíčkem a okraje zafixovány bezbarvým lakem (Jahnová et Kubienová, 2012). Takto hotová sklíčka byla uložena do tmy do 4 °C a následně konfokálním mikroskopem vyhodnocena.

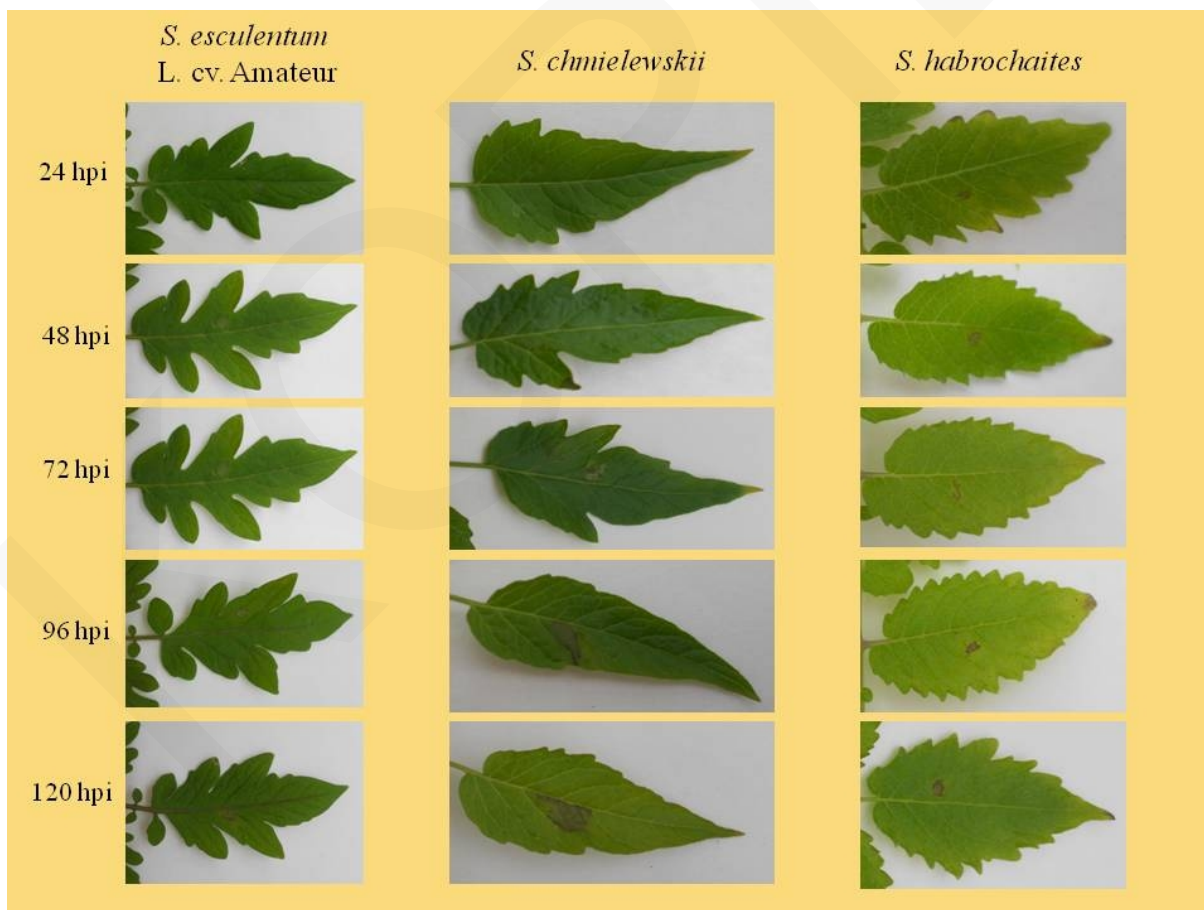
4.4.4. Imunohistochemická lokalizace enzymů zapojených do metabolismu RONS konfokální laserovou skenovací mikroskopií

Řezy vzorků byly zobrazeny konfokální laserovým rastrovacím mikroskopem, konfokální jednotka FluoView 1000 v kombinaci s invertovaným mikroskopem IX 81 (Olympus Czech Group, Praha, Česká republika). Preparáty byly zobrazovány Nomarského DIC a fluorescencí (buzení 100W Hg výbojkou). Pro lokální detekci signálu odpovídajícímu GSNO a GSNOR v jednotlivých optických řezech vzorku byla použita excitace při vlnové délce 488 nm argonového laseru (celkový výkon 30 mW) a emisní filtry 505-525 nm. K zobrazení viditelného kanálu byl použit diodový laser, využívající světlo blízké UV (405 nm, výkon 20 mW). Mikrofotografie byly pořízeny a následně upraveny v počítačovém softwaru FV 10-ASW 4.0 (Olympus, Japonsko) (Kubienová et al., 2014a; Tulpová, 2011).

5. VÝSLEDKY

5.1. Vizuální hodnocení symptomů u inokulovaných pletiv

Listy rostlin byly inokulovány zoosporami hemibiotrofa *Phytophthora parasitica* s. 149. Z vizuálního hodnocení během 120 hpi vyplývá, že symptomy u testovaných genotypů vznikají v místě inokulace listu, případně se dále rozšiřují do okolních pletiv. Vývoj symptomů v jednom modelovém experimentu lze pozorovat na obrázku 17. U pletiv *S. esculentum* byla exprese symptomů poměrně nízká, první známky nekrózy v místě inokulace byly zaznamenány od 48 hpi a do 120 hpi nedocházelo k rozšíření lézí. Největší rozsah nekrózy po 120 hpi byl u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii*, symptomy se však projevily později, až od 72 hpi. U *S. habrochaites* došlo k silné reakci v podobě nekrózy nejrychleji, již 24 hpi. Velikost léze se však během 120 hpi nerozšiřovala.



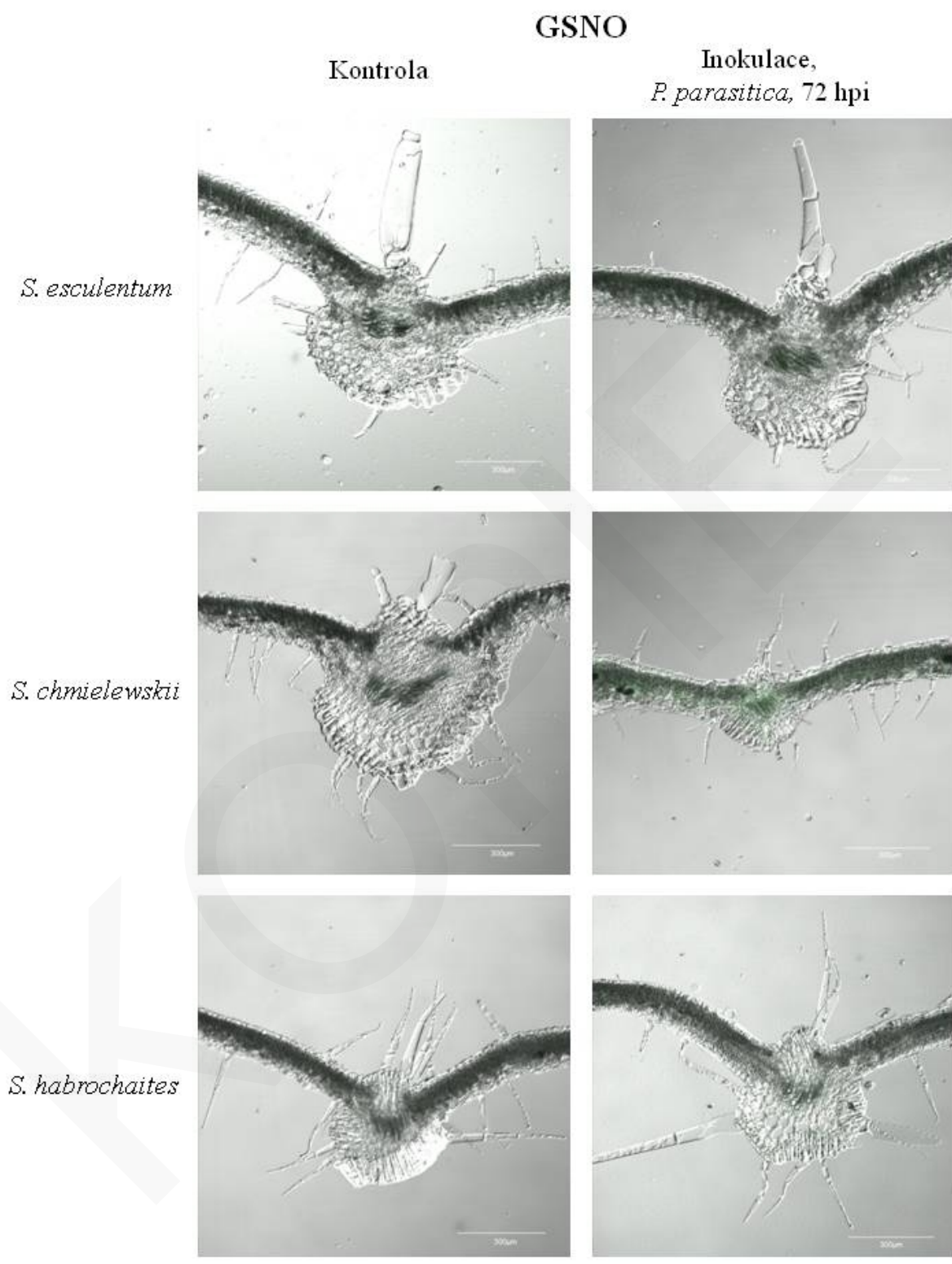
Obr. 17: Časový průběh exprese symptomů u pletiv *S. esculentum*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites* 0-120 h po inokulaci *P. parasitica*.

5.2. Imunohistochemická detekce molekul GSNO a GSNOR laserovou skenovací mikroskopií

Pro *in vivo* histochemickou lokalizaci molekul GSNO a enzymu GSNOR byl použit rostlinný materiál 72 h po počáteční inokulaci. Po působení primární a fluorescenčně značené sekundární protilátky byla detekce signálu pozorována pomocí konfokálního laserového rastrovacího mikroskopu. Vyhodnocení bylo určeno na základě intenzity zeleného fluorescenčního signálu.

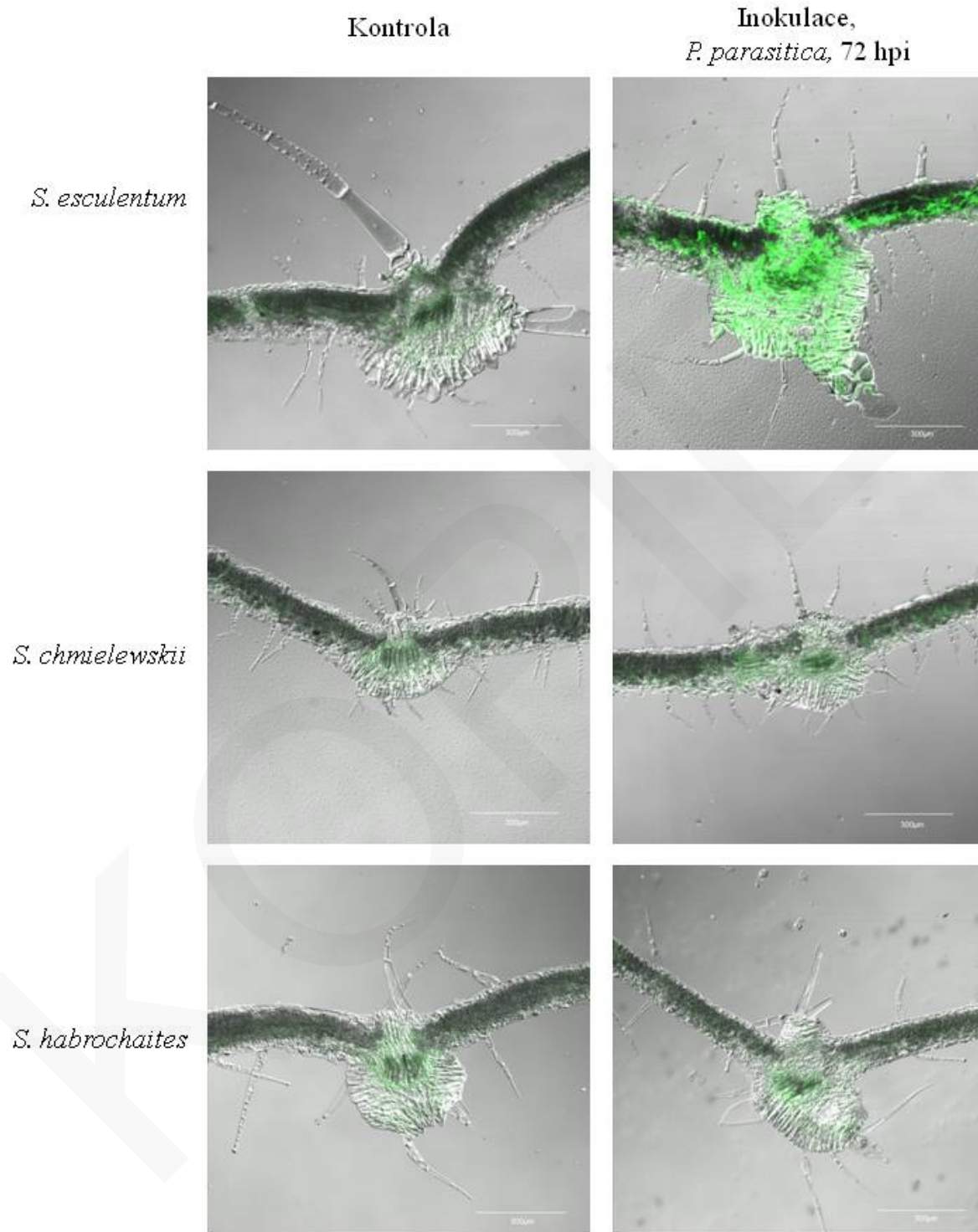
Na obrázku 18 je zobrazena imunohistochemická lokalizace molekuly GSNO v inokulovaném a kontrolním pletivu. U kontrolního genotypu *S. esculentum* L. cv. Amateur nebyl zřetelný žádný signál, odezva nebyla zaznamenána ani v infikovaném pletivu. V případě středně rezistentního *S. chmielewskii* byl detekován zelený fluorescenční signál v oblasti houbového mezofylu a také kolem cévního svazku, skládajícího se z floému a xylému. Kontrolní řez nevykazoval žádný signál. U inokulovaného i kontrolního řezu pletiva *S. habrochaites* nebyla pozorována žádná detekce molekuly GSNO.

Na obrázku 19, obsahující mikroskopické snímky příčných řezů hlavním cévním svazkem, lze sledovat lokalizaci enzymu GSNOR rovněž v inokulovaném a kontrolním pletivu. U genotypu *S. esculentum* L. cv. Amateur byla detekována prokazatelně nejvyšší intenzita zeleného fluorescenčního signálu pro GSNOR, který se nachází ve všech částech listu, zejména v oblastech palisádového a houbového mezofylu, kolenchymu a cévních svazků. U kontrolního řezu se taktéž vyskytoval slabý signál. U pletiva *S. chmielewskii* byl zelený signál zaznamenán jak u kontrolní, tak i u napadené rostliny. Na základě vzájemného porovnávání lze usoudit, že u inokulovaného řezu je v oblasti houbového mezofylu nepatrně větší odezva než u kontroly. U rezistentního genotypu *S. habrochaites* je intenzita detekovatelného signálu srovnatelná jak u kontroly, tak i u inokulovaného pletiva. V obou případech je odpověď lokalizovaná v částech cévního svazku.



Obr. 18: Řezy pletivem *S. esculentum*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites* a detekce GSNO 72 hod po inokulaci *P. parasitica*.

GSNOR



Obr. 19: Řezy pletivem *S. esculentum*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites* a detekce GSNOR 72 hod po inokulaci *P. parasitica*.

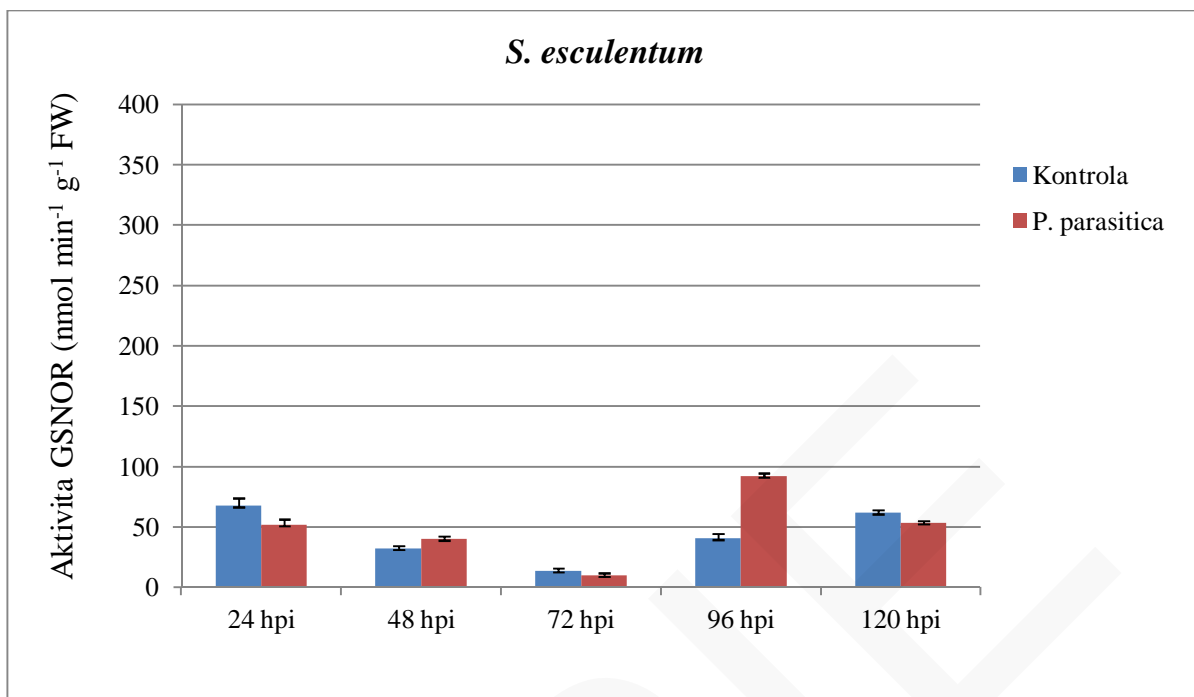
5.3. Stanovení aktivity GSNOR v extraktech *Solanum* spp.

Od počátečního napěstování, přes mechanickou infiltraci, odběr vzorků, samotné měření aktivity a koncentrace proteinů, až po konečné vyhodnocení výsledků, byly zpracovány celkem tři na sobě nezávislé série výsledků. Prezentovány jsou finální vypočítané hodnoty měření z druhé série (pro *S. esculentum* a *S. habrochaites*) a ze třetí série (pro *S. chmielewskii*).

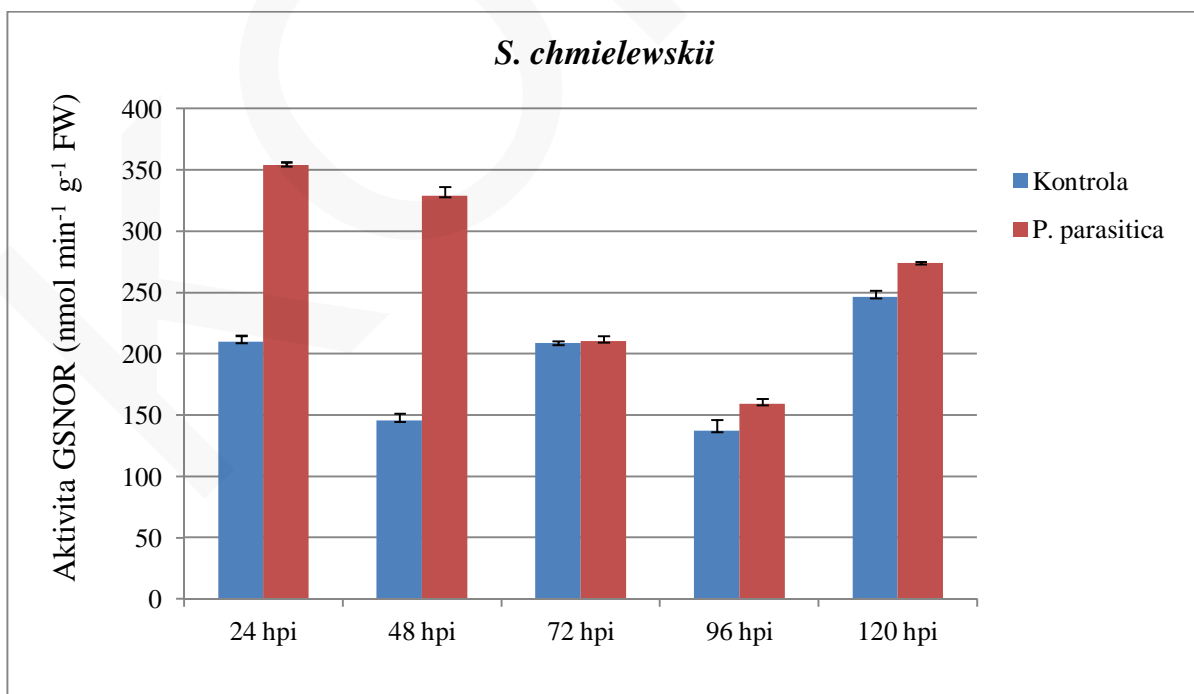
Obrázek 20 znázorňuje změny aktivity GSNOR v listu *S. esculentum* L. cv. Amateur v průběhu 120 h od inokulace. Mechanické poškození listu vedlo k počátečnímu nárůstu aktivity GSNOR, která je vztažena na 1 g FW („fresh weight“ = čerstvé váhy). Po 24 h od inokulace lze pozorovat enormní zvýšení aktivity enzymu na necelých 70 nmol min⁻¹ g⁻¹. Ta poté postupně klesá a největší snížení, 10 nmol min⁻¹ g⁻¹, je viditelné v 72 hpi. K velmi rychlému nárůstu aktivity GSNOR pak došlo u 96 hpi, kdy aktivita dosahuje svého maxima, přes 90 nmol min⁻¹ g⁻¹. U 120 hpi následoval opět mírný pokles aktivity enzymu.

V případě aktivity GSNOR u středně rezistentního *S. chmielewskii* byly získány zajímavé hodnoty. Obrázek 21 naznačuje, že nejvyšší nárůst aktivity GSNOR nastal již u 24 hpi, kdy hladina enzymu dosáhla maximální hodnoty 350 nmol min⁻¹ g⁻¹. Následovalo postupné snižování aktivity, která mírně klesala až do 96 hpi. U 120 hpi byl pozorován opět vzestup aktivity GSNOR, jejíž hladina přesáhla hodnotu 250 nmol min⁻¹ g⁻¹.

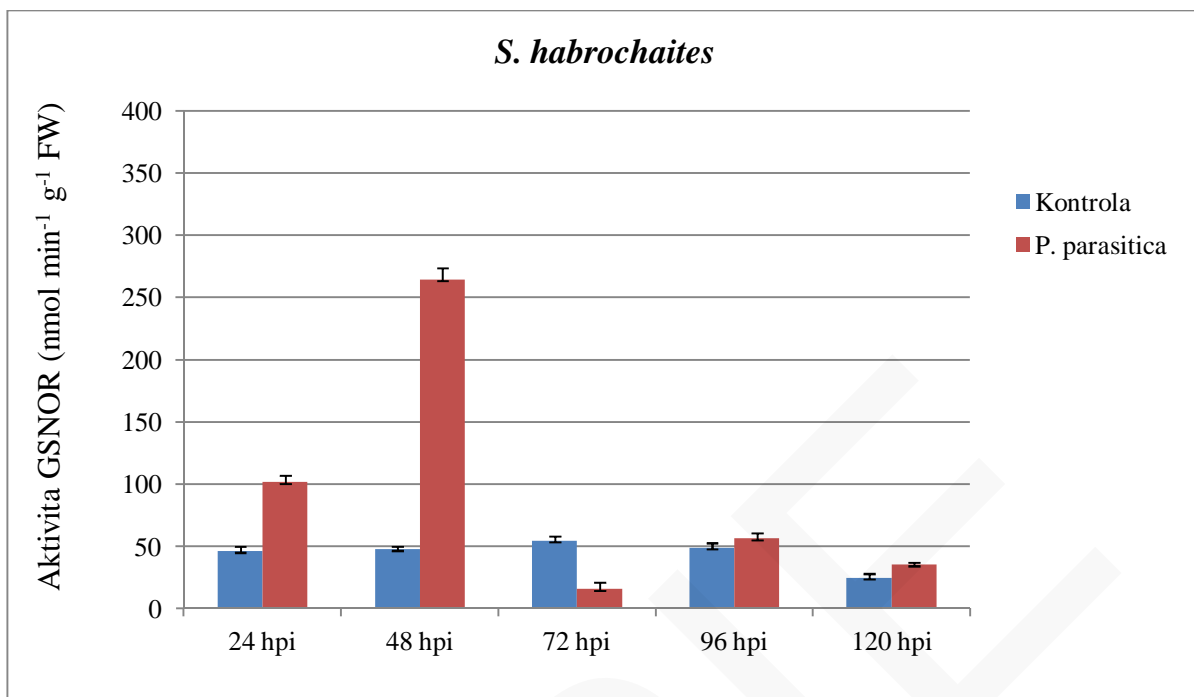
Zajímavých výsledků bylo dosaženo při měření aktivity GSNOR u rezistentního *S. habrochaites* (syn. *S. hirsutum* L.). Z grafu 3 lze vyčíst, že již po 24 hpi byla detekována aktivita zkoumaného enzymu. Tento projev silné reakce odpovídá nástupu nekrózy, která byla u tohoto genotypu pozorována rovněž po 24 hpi. Po 48 hpi se aktivita GSNOR výrazně zvýšila. Zjišťovaná aktivita dosáhla svého maxima, kdy byla zaznamenána naměřená hodnota 250 nmol min⁻¹ g⁻¹. Poté bylo sledováno zásadní snížení aktivity vyskytující se u 72 hpi. Následně se aktivita projevila nevýrazným kolísáním v časovém úseku 96 a 120 hpi.



Obr. 20: Specifická aktivita GSNOR u kontrolního a inokulovaného listu *S. esculentum* L. cv. Amateur během 120 h po inokulaci. Vyznačené chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.



Obr. 21: Specifická aktivita GSNOR u kontrolního a inokulovaného listu *S. chmielewskii* během 120 h po inokulaci. Vyznačené chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.



Obr. 22: Specifická aktivita GSNOR *S. habrochaites* během 120 h po inokulaci. Vyznačené chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

6. DISKUSE

Použitý kmen *Phytophthora parasitica* s. 149 byl v interakci s rostlinami rajčete studován u *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Microtom. V publikaci Le Berre et al. (2007) se autoři věnovali studiu buněčné odpovědi v kořenech po napadení naším patogenem. První den po inokulaci se rostlina jevila zcela zdravá. Avšak mikroskopická analýza prokázala, že se kolem kořínků začaly objevovat nepatrné hyfy. Ani 2. a 3. den po inokulaci nebyly vizuálně zřetelné žádné projevy infekce, i když mikroskopické údaje potvrdily výrazný růst hyf. Čtvrtý den se objevily první příznaky vadnutí rostliny, přičemž kořen a jednotlivé kořenové vlásky byly zcela pokryty myceliem. Následovalo agresivní šíření infekce, které se projevilo poškozením nadzemních částí rostliny. Invaze choroby vedla až k úplné rostlinné smrti, která nastala po desátém dni od inokulace.

P. parasitica s. 149 při inokulaci listů nezpůsobuje tak radikální symptomy a v experimentální části této bakalářské práce bylo možné sledovat *in vivo* lokalizaci GSNO a GSNOR, včetně změn specifické aktivity GSNOR u třech genotypů rajčete (*Solanum esculentum*, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*) 120 h po inokulaci zmíněným patogenem. V jednotlivých seriích pěstování rostlin a jejich inokulace v rámci BP se měřené parametry poněkud lišily, ikdyž u jednotlivých genotypů vykazovaly podobné trendy. Výsledky mohly být ovlivněny vnějšími podmínkami, které působily během celého experimentu na rostliny. Jedním z faktorů mohlo být kolísání teploty ve sklenicích, kde rostliny rostly. Rozsah jednotlivých nekróz mohl být ovlivněn také množstvím zoospor, které byly použity pro vyvolání infekce, ikdyž metoda stanovení hustoty inokula je relativně přesná. Rovněž měření aktivity GSNOR je velmi citlivé na působení vnějších podmínek. Jako možné vysvětlení se nabízí, že během práce mohlo dojít k chybám v pipetování GSNO a NADH, která mohla být způsobena nedostatečnými zkušenostmi. Reakce rostlin mohla být ovlivněna i provedením inokulace, při které může dojít k mírnému ovlivnění měřených parametrů. V listech tabáku při mechanickém poškození se již po 2 h projevilo snížení hladiny GSNOR a proteinů (Leterrier et al., 2011).

Aktivita GSNOR vzrostla u *S. lycopersicum* cv. Amateur lokálně již 72 hpi (viz výsledky mikroskopie) a v celém listu pak 96 hpi (biochemické měření). Z dosažených výsledků lze vyvodit, že zvýšení aktivity GSNOR následuje po radikálním navýšení RONS a RSNOs, které se podléjí na odumírání buněk pletiva.

V publikaci Kubienová et al. (2013b) byla měřena aktivita GSNOR, která byla stanovena ve třech různých orgánech (kořeni, stonku, listu) na 6 týdenních rostlinách *Solanum esculentum* L. cv. Amateur. Výsledky ukazují, že největší aktivita byla detekována ve stonku, která dosáhla více než $130 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ čerstvé váhy. Enzym GSNOR vykazoval nejnižší aktivitu v listech, kde bylo naměřeno cca $10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$. V mé bakalářské práci byla stejná aktivita GSNOR naměřena v listech *S. esculentum* u 72 hpi. Maximální hodnota aktivity byla zjištěna u listu inokulovaného *P. parasitica* 96 hpi, $92,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Kubienová et al. (2013b) zároveň zjistili, že došlo ke zvýšení exprese GSNOR v květenství, zejména v pestíku a tyčinkách. Nárůst aktivity byl očekáván také během zrání plodů a ovoce.

V práci Kubienová et al. (2014b) se autoři zabývali také úlohou NO a reaktivních forem kyslíku (ROS) v interakci rostlina - patogen, kdy použili model tří genotypů *Solanum* spp. s rozdílnou rezistencí proti biotrofnímu houbovému patogenu *O. neolycopersici*, který je významným původcem padlí na rajčatech. Byla potvrzena zvýšená tvorba ROS a NO v důsledku pronikání patogena dovnitř hostitelských buněk, k navýšení exprese GSNOR došlo 24 hpi u *S. habrochaites*.

Významné rozdíly v produkci NO byly taktéž zkoumány v extraktech inokulovaných listů těchto genotypů rajčete (Piterková et al., 2009). U náchylného *S. esculentum* L. cv. Amateur byla zjištěna zvýšená tvorba NO již po 4-8 hpi padlím. U genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* bylo pozorováno, že ke zvýšení produkce NO dochází ve dvou fázích. U středně rezistentního *S. chmielewskii* nastal první nárůst po 4-72 hpi, přičemž maximální hodnoty byly dosaženy během 24-48 hpi. První známky produkce NO v napadených listech byly u genotypu *S. habrochaites* detekovány po 8 hpi. Zároveň byla zaznamenána jak u *S. chmielewskii*, tak i u *S. habrochaites*, druhá fáze produkce NO, která se kontinuálně zvyšovala od 96 hpi až do 216 hpi (Piterková et al., 2009).

Zobecnit úlohu GSNOR ve stresu rostlin je dosud těžké, protože výsledky jednotlivých studií přinášejí rozporuplné závěry. U rostlin *Arabidopsis thaliana* se sníženou hladinou aktivity GSNOR, zároveň s vysokou hladinou RSNOs a konstitutivní aktivací genu pro PR-1 („Pathogenesis-related protein 1“), bylo zjištěno, že vykazují daleko vyšší rezistenci vůči biotrofnímu patogenu *Peronospora parasitica* (*Hyaloperonospora arabidopsis*). V této práci bylo zároveň experimentálně stanoveno, že se enzym GSNOR nachází

v parenchymatických buňkách floému a xylému u rostlin *Arabidopsis*. Autoři došli k závěru, že činnost tohoto enzymu je klíčová pro systémově získanou rezistenci („systemic acquired resistance“, SAR). Tato systémová obranná reakce se aktivuje po napadení rostliny patogenem a je doprovázena zvýšením endogenní hladiny SA a to jak lokálně, tak i systémově, a zároveň koreluje s expresí genů pro PR proteiny (Rustérucci et al., 2007).

Opačný vztah byl sledován u patosystému slunečnice - plíseň slunečnicová (*Plasmopara halstedii*). Pro pozorování průběhu infekce byl použit hypokotyl 9 dní po inokulaci, protože v této části rostliny může dojít k zastavení systémového šíření patogena. U rezistentního kultivaru slunečnice X55 bylo pozorováno, že se aktivita enzymu GSNOR po infekci plísní zvýšila a zároveň došlo k poklesu hladiny RSNOs, což mělo za následek redukcí celkového množství *S*-nitrosothiolů v hypokotylu 1,5x po infekci. U náchylné odrůdy slunečnice HA89 se po inokulaci zvýšil celkový obsah RSNOs 3,5x a aktivita „NOS-like“ enzymu byla po infekci patogenem snížena. Z výsledků lze proto usoudit, že u rezistentní odrůdy došlo k absenci nitrosačního stresu, přičemž u kultivaru HA89 se nitrosační stres projevil. Je zajímavé, že výsledné stanovení celkového endogenního obsahu RSNOs bylo u neinokulovaných hypokotylů odolné odrůdy 1,8x vyšší než u neinfikovaných hypokotylů náchylného kultivaru. Závěrem práce bylo potvrzení inverzní korelace mezi množstvím RSNOs a aktivitou NOS.

S použitím fluorescenční sondy (Alexa Fluor 488 Hg-link) byla také sledována buněčná lokalizace molekul RSNOs v rostlinném pletivu. Výsledky ukázaly, že u náchylných odrůd, které nebyly napadané patogenem, nebyla hladina RSNOs téměř vůbec detekovatelná. Avšak po inokulaci nastal výrazný vzrůst obsahu nízkomolekulárních *S*-nitrosothiolů a to zejména v oblastech cévních svazků, epidermálních buněk a parenchymatických buněk kůry a dřevě. U neinokulovaných rezistentních kultivarů byly molekuly RSNOs přítomny ve všech buňkách, po interakci s patogenem byly pozorovány pouze v buňkách epidermálních a cévních svazcích (Chaki et al., 2009).

V publikaci Chaki et al. (2011) bylo zjištěno, že u semenáčků slunečnice, které byly vystaveny vysokým teplotám (38 °C po dobu 4 h), byla aktivita GSNOR v hypokotylu redukována o 25 %. Lokalizace enzymu byla detekována imunohistochemicky pomocí LSCM v buňkách kůry a rovněž v cévních svazcích. Zároveň se i exprese genů v hypokotylu snížila, zatímco došlo k akumulaci RSNOs. Avšak semenáčky hrachu, které byly podrobeny stejným podmínkám, reagovaly odlišně - hladina aktivity GSNOR se zvýšila, stejně jako obsah

RSNOs. Aktivita enzymu byla studována také při nízkých teplotách, kdy byl jako modelová rostlina použit hrách setý (*Pisum sativum* L.). Sazenice hrachu byly vystaveny teplotě 8 °C po dobu 48 h, což způsobilo zvýšení aktivity GSNOR v listech až o 67 % oproti kontrolním rostlinám a současný pětinašobný nárůst RSNOs (Leterrier et al., 2011). U rostlin hrachu stresovaných 50 µmol/l kadmíem byl obsah GSNO v kolenchymu listu drasticky redukován. Tento děj byl zároveň doprovázen snížením aktivity enzymu GSNOR o 31 % (Barroso et al., 2006). U olivovníku pod vlivem salinitního stresu (200 mmol/l NaCl) byla lokalizace a koncentrace GSNO naprosto odlišná. Zasolení způsobilo výrazné zvýšení aktivity GSNO a to především v cévních svazcích (Valderrama et al., 2007).

U papriky (*Capsicum annuum* L.) bylo prokázáno, že se GSNO vyskytuje hojně v kořenech, ale také v listech a stoncích, kde přímo úměrně souvisí s obsahem NO a nepřímo s hladinou aktivity GSNOR (Airaki et al., 2011). V jiné studii byla u papriky studována aktivita GSNOR při vystavení rostlin nízké teplotě (8 °C po dobu 24 h). Bylo pozorováno zvýšení GSNOR o 32 % a nárůst množství glutationu, přičemž obsah NO klesl cca o 50 %. Během studia mutantů *Arabidopsis thaliana* citlivých na změnu teploty bylo zjištěno, že se u nich pod vlivem tohoto stresoru projevuje kolísání hladiny GSNOR. Zato u přirozeně v přírodě rostoucích rostlin *A. thaliana* byla zjištěna podobná exprese GSNOR jak u kontrolních, tak i teplem stresovaných listů. Autoři předpokládají, že nárůst hladiny GSNO vede zároveň i ke zvýšení citlivosti rostlin k teplotnímu stresu (Leterrier et al., 2011).

Z výsledků získaných v rámci této BP vyplývá, že u *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* došlo po infekci hemibiotrofním patogenem *P. parasitica* s. 149 k nárůstu signálu GSNO. Nejvyšší lokální nárůst signálu enzymu GSNOR byl 72 hpi u *S. esculentum* L. cv. Amateur. Naproti tomu u rezistentního *S. habrochaites* nebyl detekován výrazný rozdíl mezi aktivitou GSNOR u kontrolních a inokulovaných pletiv listů. Avšak v práci Kubienová et al. (2014a) bylo zjištěno, že po napadení biotrofním patogenem *Oidium neolycopersici* byla u tohoto genotypu sledována nadměrná produkce GSNOR ihned 24 hpi, která byla postupně redukována až do 72 hpi. V této BP bylo stanoveno, že k nárůstu signálu GSNOR došlo u *S. habrochaites* 48 hpi, přičemž hladina enzymu následně klesala, podobně zjistili Kubienová et al. (2014a). Zato hladina aktivity zmíněného enzymu byla u *S. esculentum* L. cv. Amateur a *S. chmielewskii* mírně snížena 24 i 72 h po inokulaci padlím. Pomocí

imunohistochemické analýzy bylo dokázáno, že kontrolní rostliny vykazovaly velice slabý signál GSNO, zatímco po infekci patogenem došlo k intenzivnímu zvýšení signálu. Nejnížší signál GSNO i GSNOR byl detekován u kontrolních rostlin *S. chmielewskii* (Kubienová et al., 2014a). Z výše uvedených výsledků vyplývá, že dva různé patogeny mají na stejné genotypy rostlin různý vliv a efekt. Rozdíl spočívá v odlišném nástupu symptomů, taktéž kolísá i hladina GSNO/GSNOR. Lebeda et al. (2014) pozorovali u náchylného genotypu *S. esculentum* L. cv. Amateur po inokulaci *O. neolycopersici* zvýšenou produkci NO, která byla detekována pouze v intervalu od 4-8 hpi. Publikace Kubienová et al. (2014a) naznačuje, že u všech třech zkoumaných genotypů *Solanum* spp. došlo po infekci *O. neolycopersici* ke zvýšené tvorbě ROS a NO. V našem patosystému by bylo také vhodné se dále zaměřit na studium úlohy NO a ROS. Během BP bylo také potvrzeno, že agresivní fytopatogen *P. parasitica* s. 149 nezpůsobuje příliš výrazné symptomy při inokulaci listů.

7. ZÁVĚR

Hlavním cílem mé práce bylo experimentálně proměřit specifickou aktivitu GSNOR v rostlinném materiálu v časovém průběhu 120 h patogeneze *Phytophthora parasitica* s. 149 a následně pomocí *in vivo* imunohistochemické detekce stanovit lokalizaci molekul GSNO a GSNOR u tří genotypů *Solanum* spp.

Získané výsledky potvrzují, že inokulace patogenem způsobila u listů testovaných genotypů rajčete lokální zvýšení hladiny enzymu GSNOR v okolí místa infekce, především u *S. lycopersicum* cv. Amateur. Choroba se pak postupně šířila do vzdálenějších, okolních částí pletiva. Intenzita i rozsah nekrózy se u jednotlivých genotypů lišily.

Histochemická detekce taktéž prokázala, že v případě působení biotického stresu (po inokulaci pletiva) dochází u *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* k nárůstu GSNO, kdežto u *S. lycopersicum* cv. Amateur k poklesu. U mikroskopických snímků příčných řezů hlavním cévním svazkem byla pozorována nejvyšší intenzita zeleného fluorescenčního signálu především v cévních svazcích, ale také v segmentech palisádového a houbového mezofylu.

Experimentálně naměřené hodnoty aktivity GSNOR ukazují, že je její dynamika rozdílná u jednotlivých studovaných modelových genotypů *Solanum* spp. a může být ovlivněna různými vnějšími faktory. Současně bylo prokázáno, že tři různé genotypy *Solanum* spp. vykazují různou náchylnost/odolnost k hemibiotrofnímu patogenu *P. parasitica* a biotrofnímu patogenu *O. neolycopersici*. Bylo také potvrzeno, že enzym GSNOR hraje zásadní roli v katabolizmu GSNO a jeho aktivita vlivem biotického stresu (infekce *P. parasitica*) roste.

Z časových důvodů nebyly provedeny experimenty s elicitory, proto tento úkol zůstává otevřený jako cíl do budoucna.

8. LITERATURA

- Agrios, G. N. (2005): Plant Pathology. Elsevier Academic Press, London, UK, 414-426.
- Airaki, M., Sánchez-Moreno, L., Leterrier, M., Barroso, J. B., Palma, J. M., Corpas, F. J. (2011): Detection and quantification of *S*-nitrosoglutathione (GSNO) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plant organs by LC-ES/MS. *Plant Cell Physiology*, 52: 2006-2015.
- Barroso, J. B., Corpas, F. J., Carreras, A., Rodríguez-Serrano, M., Esteban, F. J., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Romero-Puertas, M. C., Valderrama, R., Sandalio, L. M., del Río, L. A. (2006): Localization of *S*-nitrosoglutathione and expression of *S*-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1785-1793.
- Beranová, M., Tonar, Z. [online] 2002 [cit. 1. 3. 2014]: Principy a příklady imunohistochemie. Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni, str. 6. Dostupné z: <https://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdfCachedSimilar>
- Besson-Bard, A., Pugin, A., Wendehenne, D. (2008): New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 21-39.
- Blein, J. P., Milat, M. L., Ricci, P. (1991): Responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiology*, 95: 486-491.
- Boissy, G., deLaFortelle, E., Kahn, R., Huet, J. C., Bricogne, G., Pernollet, J. C., Brunie, S. (1996): Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure*, 4: 1429-1439.
- Bradford, M. M. (1976): Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brown, G. C., Borutaite, V. (2002): Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 33: 1440.
- Bruckdorfer, R. K., Dooley, A., Truelove, E., Low, S. Y., Gao, B., Abraham, D. (2005): Nitric oxide and antioxidants as regulators of collagen biosynthesis: relevance to systemic sclerosis. *Inflamm Res*, 54: 126-126.
- Carver, J., Doctor, A., Zaman, K., Gaston, B. (2005): *S*-nitrosothiol formation. *Methods in Enzymology*, 396: 95-105.

- Catalá, M., Gasulla, F., Pradas del Real, A. E., García-Breijo, F., Reig-Arminana, J., Barreno, E. (2010): Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. *BMC Microbiology*, 10: 297-300.
- Collemare, J., Griffiths, S., Iida, Y., Jashni, M. K., Battaglia, E., Cox, R. J., de Wit, P. J. G. M. (2014): Secondary metabolism and biotrophic lifestyle in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Plos One*, 9: 1-11.
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., Brasier, C. M. (2000): A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30: 17-32.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B. (2014): Functional implications of peroxisomal nitric oxide (NO) in plants. *Frontiers in plant science, Plant Cell Biology*, 5: 1-3.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Carreras, A., Quirós, M., León, A. M., Romero-Puertas, M. C., Esteban, F. J., Valderrama, R., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Gómez, M., del Río, L. A. (2004): Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology*, 136: 2722-33.
- Corpas, F. J., Carreras, A., Esteban, F. J., Chaki, M., Valderrama, R., del Rio, L. A., Barroso, J. B. (2008): Localization of *S*-nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and *S*-nitrosogluthathione reductase activity in plants. *Methods in Enzymology*, 437: 561-574.
- Corpas, F. J., Chaki, M., Leterrier, M., Barroso, J. B. (2009): Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 4: 920-923.
- Corpas, F. J., Alché, J. D., Barroso, J. B. (2013): Current overview of *S*-nitrosogluthathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in Plant Science, Plant Physiology*, 4: 1-3.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Montanu, M. V., Inze, D., Breusegem, F. V. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 779-795.
- Delledonne, M., Murgia, I., Ederle, D., Sbicego, P. F., Biondani, A., Polverari, A., Lamb, Ch. (2002): Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 605.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, Ch. (2001): Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance

- response. Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A., 98: 13454-13459.
- Díaz, M., Achkor, H., Titarenko, E., Martinez, M. C. (2003): The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. FEBS Letters, 543: 136.
- Dobeš, P., Kmuníček, J., Mikeš, V., Damborský, J. (2004): Binding of fatty acids to β -Cryptogein: Quantitative structure–activity relationships and design of selective protein mutants. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 44: 2126-2132.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D. F. (1998): Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A., 95: 10328-10333.
- Engeland, K., Hoog, J. O., Holmquist, B., Estonius, M., Jornvall, H., Vallee, B. L. (1993): Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: a binding site required for formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation. Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A., 90: 2491-2494.
- Erwin, D. C., Ribiero, O. K. (1996): *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, St. Paul, Minnesota, str. 15.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B. W., Wang, Y., Pallas, J. A., Loake, G. J. (2005): A central role for *S*-nitrosothiols in plant disease resistance. Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A., 102: 8054.
- Gallegly, M. E., Hong, C. X. (2008): *Phytophthora*: Identifying species with morphology and DNA fingerprints. APS Press, St. Paul, MN, U.S.A., 158 pp.
- Gaupels, F., Spiazzi-Vandelle, E., Yang, D., Delledonne, M. (2011): Detection of peroxynitrite accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive defense response. Elsevier, 25: 222-228.
- Hampl, V., Sacherová, V., Němec, P. [online] 2014 [cit. 21. 2. 2014]: Světelná mikroskopie. Dostupné z: <<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/svetelnamikroskopie.htm>>
- Hibbs, A. R. (2004): Confocal microscopy for biologist. BIOCON Melbourne, AUS Springer, 27, 474 stran.

- HnízdoVá, I., Luhová, L., Petřivalský, M. (2009): Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické Listy*, 103: 788-794.
- Hoffmann, J., Dimmeler, S., Haendeler, J. (2003): Shear stress increases the amount of S-nitrosylated molecules in endothelial cells: important role for signal transduction. *FEBS Letters*, 551: 153-158.
- Chaki, M., Fernández-Ocaña, A. M., Valderrama, R., Carreras, A., Esteban, F. J., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M. V., Begara-Morales, J. C., Corpas, F. J., Barroso, J. B. (2009): Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant Cell Physiology*, 50: 265-279.
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A. M., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M. V., López-Jaramillo, J., Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Luque, F., Leterrier, M., Corpas, F. J., Barroso, J. B. (2011): High temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin-NADP reductase by tyrosine nitration. *Plant, Cell and Environment*, 34: 1803-1818.
- Chen, Z., Gallie, D. R. (2004): The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *The Plant Cell*, 16: 1134.
- Jahnová, J., Kubienová, L. (2012): Experimentální metody obranné reakce rostlin. Skripta k předmětu KBC/EMORR, FRVŠ projekt 2473/2012/G4. Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, str. 23-26.
- Kalina, T., Váňa, J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, str. 139-150.
- Krátká, J., Křížková, I., Novotný, D. (2008): Detekce *Phytophthora cactorum* a *P. cambivora* v pletivech jabloní klasickými a imunochemickými metodami. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 16 stran.
- Kubienová, L., Kopečný, D., Tylichová, M., Briozzo, P., Skopalová, J., Šebela, M., Navrátil, M., Tâche, R., Luhová, L., Barroso, J. B., Petřivalský, M. (2013a): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosoglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie*, 95: 889-902.
- Kubienová, L., Sedlářová, M., Wünschová-Vítečková, A., Piterková, J., Mieslerová, B., Navrátil, M., Luhová, L., Petřivalský, M. (2014a): Involvement of reactive nitrogen species in the resistance mechanisms of *Solanum* spp. to biotrophic pathogen *Oidium neolycopersici*. Připraveno do tisku.

- Kubienová, L., Tichá, T., Jahnová, J., Luhová, L., Mieslerová, B., Petřivalský, M. (2014b): Effect of abiotic stress stimuli on *S*-nitrosogluthione reductase in plants. *Planta*, 239: 139-146.
- Kubienová, L., Tichá, T., Jahnová, J., Luhová, L., Petřivalský, M. (2013b): *S*-nitrosogluthionreduktasa: Klíčový enzym regulace *S*-nitrosylace. *Chemické Listy*, 107: 202-208.
- Kubínová, L. (2006): Pohledy do trojrozměrného mikrosvěta: konfokální a dvoufotonová mikroskopie. *Časopis Živa* 6: 245-248.
- Le Berre, J. Y., Engler, G., Panabières, F. (2007): Exploration of the late stages of the tomato-*Phytophthora parasitica* interactions through histological analysis and generation of expressed sequence tags. *New Phytologist*, 177: 480-492.
- Lebeda, A., Mieslerová, B., Petřivalský, M., Luhová, L., Špundová, M., Sedlářová M., Nožková-Hlaváčková, V., Pink, D. A. C. (2014): Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolycopersici*. *European Journal of Plant Pathology*, 138: 569-596.
- Leterrier, M., Chaki, M., Airaki, M., Valderrama, R., Palma, J. M., Barroso, J. B., Corpas, F. J. (2011): Function of *S*-nitrosogluthione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior*, 6: 789-793.
- Lochman, J., Kašparovský, T., Damborský, J., Osman, H., Marais, A., Chaloupková, R., Ponchet, M., Blein, J. P., Mikes, V. (2005): Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry*, 44: 6565-6572.
- Mikeš, V., Milat, M. L., Ponchet, M., Ricci, P., Blein, J. P. (1997): The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Letters*, 416: 190-192.
- Mittler, R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405.
- Moore, K. P., Mani, A. R. (2002): Measurement of protein nitration and *S*-nitrosothiol formation in biology and medicine. *Methods in Enzymology*, 359: 256-268.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., Hancock, J. T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1237.

- Olympus America Inc [online] 2012 [cit. 1. 3. 2014]: Introduction to fluorescence microscopy. Dostupné z:
<<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorointrohome.html>>
- Oregon State University [online] 2014 [cit. 23. 3. 2014]: *Phytophthora* online course: Training for nursery growers, What is *Phytophthora*? Dostupné z:
<<https://courses.ecampus.oregonstate.edu/phytophthora/module1.html>>.
- Parlevliet, J. E. (1996): Reproduction systems of biotrophic nad hemi-biotrophic fungal leaf pathogens and their consequences for breeding for resistance. Proceedings of the 9th European and Mediterranean Cereal Rust and Powdery Mildew Conference, 2-6 September, Lunteren, The Netherlands.
- Picard, K., Tirilly, Y., Benhamou, N. (2000): Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4305-4314.
- Piterková, J., Luhová, L., Petřivalský, M. (2008): Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. Chemické Listy, 102: 410-416.
- Piterková, J., Petřivalský, M., Luhová, L., Mieslerová, B., Sedlářová, M., Lebeda, A. (2009): Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. Molecular Plant Pathology 10: 501-513.
- Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P. (2005): Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. Chemické Listy, 99: 455-466.
- Plášek, J. (1995): Konfokální mikroskop – renesance experimentálních metod. Vesmír, 74: 508-510.
- Rustérucci, C., Espunya, M. C., Díaz, M., Chabannes, M., Martínez, M. C. (2007): S-Nitroso-glutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. Plant Physiology, 143: 1282-1292.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M. (2011): Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative systém. Physiologia Plantarum, 112: 487.
- Staab, C. A., Hellgren, M., Höög, J. O. (2008): Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. Cellular and Molecular Life Sciences, 65: 3950-3960.

- Svozilová, Z., Kašparovský, T., Skládal, P., Lochman, J. (2009): Interaction of cryptogein with its binding sites in tobacco plasma membrane studied using the piezoelectric biosensor. *Analytical Biochemistry*, 390: 115-120.
- Szabo, C., Ischiropoulos, H., Radi, R. (2007): Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6: 662.
- Šašek, V. (2011): Kvantitativní a indukovaná rezistence řepky ozimé k *Leptosphaeria maculans*. Disertační práce, Katedra ochrany rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská Univerzita v Praze.
- Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P., Lancaster, J. R. (2001): The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, 98: 355-360.
- Tulpová, Z. (2011): Lokalizace RNOS konfokální mikroskopii. Bakalářská práce, Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Uotila, L., Koivusalo, M. (1987): Multiple forms of formaldehyde dehydrogenase from human red blood cells. *Hum Hered*, 37: 102-106.
- Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., Gómez-Rodríguez, V. M., Colmenero-Varea, P., del Río, L. A., Barroso, J. B. (2007): Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters*, 581: 453-461.
- Vandelle, E., Delledonne, M. (2008): Methods for Nitric Oxide Detection during Plant-Pathogen Interactions. *Methods in Enzymology*, 437: 575-594.
- Věchet, L. (2012): Mechanizmy interakcí hostitel – patogen a základy šlechtění na odolnost. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., str. 3-7.
- Walden, R. (1998): The alphabet soup of plant intracellular signalling: enter cyclic nucleotides. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 419.
- Wang, H., Wijeratne, A., Wijeratne, S., Lee, S., Taylor, C. G., St Martin, S. K., McHale L., Dorrance, A. E. (2012): Dissection of two soybean QTL conferring partial resistance to *Phytophthora sojae* through sequence and gene expression analysis. *BMC Genomics*, 13: 1-23.
- 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.
- Wendehenne, D., Gould, K., Lamotte, O., Durner, J., Vandelle, E., Lecourieux, D., Courtois, C., Barnavon, L., Bentejac, M., Pugin, A. (2005): NO signaling functions in the biotic and abiotic stress responses. *BMC Plant Biology*, 5: 35.

- 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.
- Yamaoka, N., Takeuchi, Y. (1999): Morphogenesis of the powdery mildew fungus in water (4). The significance of conidium adhesion to the substratum for normal appressorium. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54: 145-154.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. (2000): Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters*, 468: 89.
- Yu, M., Lamattina, L., Spoel, S. H., Loake, G. J. (2014): Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist*, doi: 10.1111/nph.12739 (published on-line 10. 3. 2014).

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3D	Trojrozměrný
A	Adenin
ADH3	Alkoholdehydrogenáza třídy III
APOX	Askorbátperoxidáza
BSA	Hovězí sérový albumin
C	Cystein
CAT	Kataláza
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
DDT	Dithiotreitol
eNOS	Endoteliální NO-syntáza
EPR	Elektronová paramagnetická rezonance
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktáza
GSONH ₂	Glutathion-sulfinamid
GSSG	Glutathion-disulfid
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
Hpi	Hodin po inokulaci
HR	Hypersenzitivní reakce
iNOS	Indukovatelná NO-syntáza
LC-ES/MS	Kapalinová chromatografie elektrosprejem pomocí hmotnostní spektrometrie
LSCM	Laserová skenovací konfokální mikroskopie
M	Methionin
NADH	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NiNOR	Nitrit:NO reduktáza
nNOS	Neuronální NO-syntáza

NO	Oxid dusnatý
NO ⁻	Nitroxylový anion
NO ⁺	Nitrosoniový kation
NO·	Radikál oxidu dusnatého
NOS	NO-syntáza
NR	Nitrát reduktáza
O ₂	Molekulární kyslík
O ₂ ⁻	Superoxidový anionradikál
ONOO ⁻	Peroxydusitan
pI	Izoelektrický bod
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid
qRT-PCR	Kvantitativní real-time PCR
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RSNOs	S-nitrosothioly
SA	Kyselina salicylová
SAR	Systémově získaná rezistence
SOD	Superoxiddismutáza
T	Thymin
TBSA	BSAT TBS + 0,1% azid sodný + 1% BSA + 0,1% Triton X-100
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultrafialové světlo
W	Tryptofan
XOD	Xanthinoxidáza
Y	Tyrosin
α-GSNO	Krysí polyklonální protilátka proti GSNO
α-GSNOR	Králičí polyklonální protilátka proti GSNOR

10. PŘÍLOHA

Příprava roztoků a pufrů:

- 10 mmol/l Na⁺-fosfátový pufr, pH 6,8
15,3 ml 0,2 M NaH₂PO₄ + 14,7 ml 0,2 M Na₂HPO₄, doplnit vodou do 500 ml.
Poté upravit pH na 6,8 a doplnit vodou do 600 ml.
- 50 mmol/l K⁺-fosfátový pufr, pH 7,8
4,9 ml 1 M KH₂PO₄ + 45,4 ml 1 M K₂HPO₄, doplnit vodou do 900 ml.
Poté upravit pH na 7,8 a doplnit vodou do 1000 ml.
- 2 mmol/l NADH (Mr 709,4)
0,0014188 g rozpustit v 1 ml destilované vody.
- 4 mmol/l GSNO (Mr 336,3)
0,0013452 g rozpustit v 1 ml destilované vody.
- Zásobní roztok Coomassie Blue
0,5 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G250; 0,25 mol/l methanol; 0,5 mol/l 85% kyselina fosforečná. Zásobní roztok nakonec naředit destilovanou vodou v poměru 1:4.
- S-nitrosoglutathion (GSNO) (Moore et Mani, 2002)
Nejprve bylo potřeba rozpustit na ledové lázni 614 mg glutathionu ve 3 ml 0,5 mol/l HCl, do kterého bylo přidáno 138 mg dusitanu sodného. Následovala 40 min inkubace takto vzniklé reakční směsi na ledové lázni. Výsledným produktem byla sraženina červené barvy, která byla za pomoci Büchnerovy nálevky odsáta. Následně byla sraženina promyta 2x 10 ml deionizované H₂O, 2x 10 ml acetonu a 2x 10 ml diethyletheru, a poté přenesena do alobalu (fotolabilita). Sraženina byla vysušena v exikátoru a poté zamražena. Pro experiment byl použit 4 mmol/l GSNO.
- Imunohistochemická detekce GSNO a GSNOR
100% glycerol
PBS (2,5 mmol/l Na⁺-fosfátový pufr pH 7,4; 0,73 mmol/l NaCl; 13 mmol/l KCl)
primární protilátka – králíčí polyklonální protilátka α-GSNOR
primární protilátka – krysí polyklonální protilátka α-GSNO
sekundární protilátka – Goat anti-rabbit IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated
sekundární protilátka – Rabbit anti-rat IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated
TBSA-BSAT pH 7,6 (5 mol/l Tris; 0,9% NaCl; 0,05% azid sodný; 0,1% BSA; 0,1% Triton X-100)