

MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie

ELICITORY VYVOLANÁ PCD U BUNĚK TABÁKU

Bakalářská práce

Brno 2006

Jitka Tieffová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

V Brně dne 1.5.2006

Jitka Tieffová

Poděkování

Chci poděkovat svému vedoucímu Mgr. Tomáši Kašparovskému, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při vypracování bakalářské práce.

Obsah

1 Úvod	7
2 Teoretická část	8
2.1 Interakce mezi rostlinou a patogenem	8
2.2 Obranné reakce rostlin	8
2.2.1 Konstitutivní obrana	8
2.2.2 Obrana indukovaná přítomností patogenu	9
2.2.2.1 Tvorba aktivních forem kyslíku	9
2.2.2.2 Oxid dusnatý	10
2.2.2.3 Hypersenzitivní reakce	10
2.2.3 Systémově získaná rezistence	11
2.3 Programovaná buněčná smrt	11
2.3.1 Vnitřní signální cesta	11
2.3.2 Vnější signální cesta	12
2.3.3 Kaspázová kaskáda	12
2.3.4 Rozdíl mezi PCD a nekrotizací	14
2.4 Elicitory	14
2.4.1 Cryptogein	15
2.4.2 L19R	15
2.4.3 Ergosterol	16
2.4.4 Hexa-N-Acetylchitohexosa	16
2.4.5 Kyselina arachidonová	17
2.5 Fluorescenční mikroskopie	17
2.5.1 Fluorofory	17
2.5.2 Fluorescenční mikroskop	18
2.5.3 Fluorescein diacetát	19
2.5.4 Propidium jodid	20
2.6 Spektroskopické metody stanovení buněčné životaschopnosti	20
2.6.1 Barvení pomocí FDA	20

3 Praktická část	22
3.1 Materiál a metody	22
3.1.1 Chemikálie	22
3.1.2 Biologický materiál.....	22
3.1.3 Přístroje	22
3.1.4 Kultivace tabáku	23
3.1.4.1 Příprava média	23
3.1.4.2 Kultivace suspenzní kultury.....	25
3.1.5 Elicitace buněčné smrti	26
3.1.5.1 Příprava měření.....	26
3.1.5.2 Vlastní měření.....	26
3.1.6 Měření produkce AOS	29
3.1.6.1 Příprava měření.....	29
3.1.6.2 Vlastní měření.....	29
3.2 Výsledky měření	30
3.2.1 Srovnání účinku elicitorů na různé suspenzní kultury	30
3.2.2 Test chyby měření a reprodukovatelnosti.....	31
3.2.3 Koncentrační závislost.....	32
3.2.4 Koelicitace	33
3.2.5 Porovnání vlivu elicitorů u zelených tabákových buněk	34
4 Závěr	35
5 Seznam literatury	36

Použité zkratky

AIP	apoptózu indukující protein
AOS	aktivní formy kyslíku
BAP	6-benzyladenosylpurin
Bcl protein	B lymfoma cells protein
2,4 D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
FDA	fluorescein diacetát
FITC	fluorescein isothiokyanát
GFP	zelený fluorescenční protein
HR	hypersenzitivní reakce
IAP	protein inhibující apoptózu
IR oblast	oblast infračerveného záření
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MES	2-N-morfolinoethylsulfonová kyselina
PCD	programovaná buněčná smrt
PI	propidium jodid
PR-protein	pathogenesis-related protein
SAR	systemově získaná rezistence
SOD	superoxiddismutasa
UV oblast	oblast ultrafialového záření

1 Úvod

Cílem této práce bylo vyvolat buněčnou smrt u kalusových buněk tabáku a rajčete přidáním houbových elicitorů. Rostlinné buňky byly vystaveny působení různých elicitorů a byla sledována závislost buněčné smrti na druhu organismu, typu a množství přidaného elicitoru. Pro odlišení živých a odumřelých buněk byly použity barevné indikátory fluorescein diacetát a propidium jodid. Množství odumřelých buněk bylo vyhodnoceno metodou fluorescenční mikroskopie.

2 Teoretická část

2.1 Interakce mezi rostlinou a patogenem

Odezva na infekci a případný rozvoj či potlačení projevů choroby primárně závisí na genetické výbavě hostitele i patogenu. Geny rezistence u hostitelské rostliny kódují proteiny (receptory), důležité pro včasné rozpoznání patogenu. Naproti tomu expresi genů avirulence u patogenu dojde k produkci specifických elicitorů. Tyto produkty rozhodují o tom, bude-li rostlina infikována nebo patogen potlačen.

Při napadení rostliny patogenem mohou nastat dva typy interakcí, kompatibilní nebo inkompatibilní. Ke kompatibilní interakci dochází tehdy, není-li v rostlině přítomen gen rezistence nebo patogenu chybí gen avirulence. V tomto případě dochází k reprodukci patogenu a šíření infekce v rostlině. Druhým typem je inkompatibilní reakce, kdy je rostlina sice napadena, ale následně dochází k potlačení růstu patogenu nebo dokonce k jeho usmrcení. Rostlina je vůči patogenu rezistentní (1, 2).

2.2 Obranné reakce rostlin

Obrana rostlin proti patogenům zahrnuje velké množství mechanismů, které působí na různých úrovních. Hlavním cílem těchto pochodů je posílení mechanických bariér, poškození nebo usmrcení patogenu.

Při obranné reakci jsou v rostlině aktivovány regulační mechanismy, které řídí průběh jednotlivých reakcí. Patří k nim především zvýšení hladiny aktivních forem kyslíku (AOS), změny v transportu iontů přes cytoplazmatickou membránu, aktivace enzymů, fosforylace a defosforylace proteinů a zahájení transkripce obranných genů.

2.2.1 Konstitutivní obrana

Strukturní ochranou bariéru proti patogenům zajišťují primární a sekundární krycí pletiva. Primárním krycím pletivem je epidermis s kutikulou, která je tvořena kutinem a vosky. K zesílení mechanické obrany slouží trichomy a impregnace suberinem nebo ligninem. Sekundární krycí pletivo vytváří korkovou ochranou vrstvu, kde se ukládá suberin a vosky.

Přirozenou ochranu rostlině poskytují fytoncidy a inhibitory, které jsou pro patogeny toxické. Jsou to sekundární metabolity a mohou být v rostlině přítomny trvale nebo ve formě prekurzorů.

K syntéze aktivní formy pak dochází při poškození buňky. Tyto přirozené metabolity bývají nejčastěji uloženy ve vakuolách povrchových vrstev buněk. Chemicky se řadí mezi terpenoidy, fenolické látky, flavonoidy nebo alkaloidy.

2.2.2 Obrana indukovaná přítomností patogenu

K aktivaci rostlinné obrany dochází na více úrovních. Lokální obrana v místě napadení má za následek produkci AOS, NO, akumulaci fenolických látek a zesílení buněčné stěny. Rostlinná pletiva na přítomnost patogenu reagují syntézou PR-proteinů, akumulací fytohormonů, např. kyseliny salicylové, kyseliny jasmonové nebo ethylenu, a rovněž zesílením buněčné stěny.

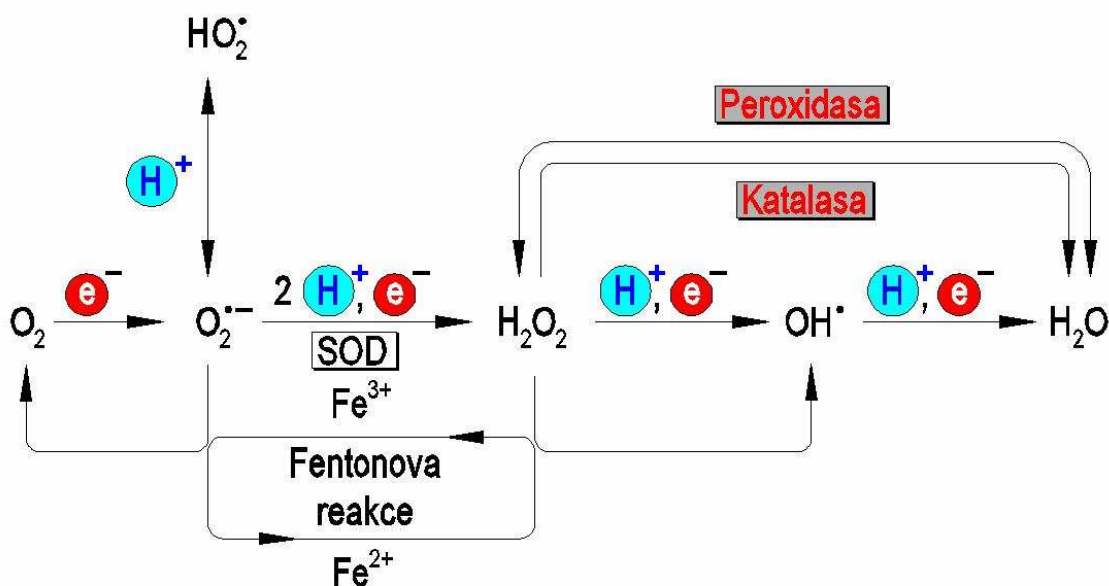
Několik minut až hodin po infekci se zvyšuje koncentrace transkriptů některých genů. Rostlinné buňky vylučují chitinasy a glukanasasy, což jsou enzymy, které degradují buněčnou stěnu hub (3).

2.2.2.1 Tvorba aktivních forem kyslíku

V mnoha případech, kdy dochází k inkompatibilní interakci, je jako první detekována právě produkce AOS. K této reakci dochází již během prvních pěti minut po napadení patogenem.

Po kontaktu elicitoru s receptorem dochází k aktivaci NADPH oxidasy, která je lokalizována na vnější straně plazmatické membrány. Tento enzym katalyzuje vznik superoxidového radikálu ($O_2^{\bullet-}$), který se dále rozkládá superoxiddismutasou za vzniku peroxidu vodíku (H_2O_2). Peroxid vodíku je již sám o sobě pro patogen toxický, jeho úloha spočívá ale také při zpevnování buněčné stěny, stimulaci detoxikačních enzymů nebo signálních a regulačních molekul, např. kyseliny salicylové. Mnohem toxicitější je pro patogen hydroxylový radikál (OH^{\bullet}), vzniklý přeměnou peroxidu vodíku (viz obrázek 1). Jeho tvorba je zrychlována v přítomnosti železnatých iontů, tzv. Fentonovou reakcí (2):





Obrázek 1: Schéma vzájemných přeměn AOS.

2.2.2.2 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je další látkou, která vzniká záhy po kontaktu patogenu s rostlinou a jeho produkce je spojena s rozpoznáním patogenu. Hlavní funkcí NO je inhibice odbourávání H_2O_2 . Oxid dusnatý se váže na hem, funkční skupinu katalasy a askorbátperoxidasy, které zajišťují odbourávání H_2O_2 , a může tím navodit buněčnou smrt. Tvorba NO spolu s AOS hrají důležitou synergickou roli při aktivaci celé řady obranných reakcí po napadení patogenem.

2.2.2.3 Hypersenzitivní reakce

Hypersenzitivní reakce (HR) je častá a účinná reakce vyvolaná působením fytopatogenů. Po napadení patogenem dochází v místě infekce k rychlé smrti buněk, čímž dojde k zamezení šíření infekce do dalších míst rostlinné tkáně. V optimálním případě spolu s buňkou umírá i patogen. HR vzniká tak, že se buď aktivuje PCD nebo dojde k usmrcování buněk působením AOS, kdy dochází k peroxidaci a rozpadu membránových systémů, vedoucích ke smrti buňky. Při HR také dochází k výtoku Cl^- a K^+ iontů z buněk a čerpání Ca^{2+} iontů do buněk. Tím dochází k aktivaci Ca^{2+} dependentní proteinkinasy, která aktivuje syntézu obranných enzymů. Zablokování H^+ ATP-asy způsobí alkalizaci v okolí buněk (3).

2.2.3 Systémově získaná rezistence

Přežije-li rostlina napadení patogenem, dochází k vývinu rezistence proti dalšímu napadení a to nejen v místě dřívějšího napadení, ale i v dosud nezasažených částech rostlinného těla. Systémově získaná rezistence (SAR) vzniká během několika dní po infekci, kdy se zvyšuje hladina obranných látek včetně chitinas a dalších hydrolas.

Mezi endogenní signály zprostředkující SAR patří kyselina salicylová, jejíž hladina se po napadení patogenem výrazně zvyšuje a přenáší signál do dalších částí rostliny. SAR ve vzdálenějších částech rostliny, ale také v rostlinách okolních, vyvolává těkavá látka methylsalicylát, methylester kyseliny salicylové (1).

2.3 Programovaná buněčná smrt

Pro proces řízeného odumírání buněk se používá termín řeckého původu apoptóza, pro rostlinné buňky také slovní spojení programovaná buněčná smrt (PCD). PCD rostlinných buněk je přirozenou součástí jejich normálního vývoje, ale může být i reakcí na působení okolního prostředí. Proces PCD má uplatnění při stárnutí orgánů, pletiv a při pohlavním rozmnožování. Rovnováha mezi buněčným růstem a PCD je nezbytně nutná pro udržení životního cyklu rostlin i živočichů, v buněčném vývoji a diferenciaci je klíčovým procesem. Schopnost organismu odstraňovat nadbytečné, nevhodně lokalizované nebo závažně postižené buňky je potřebná pro zajištění tkáňové homeostázy v období mezi vznikem a zánikem buněk, organismus si tak zajišťuje optimální počet fungujících buněk (6). Průběh PCD je znázorněn na obrázku 2.

Celý proces PCD je geneticky kódován a složitě vícestupňově řízen. Prvním stupněm je reverzibilní signální fáze. Proces PCD může být aktivován stimulací specifických receptorů smrti na povrchu buňky a následným uvolněním či aktivací specifických proteinů nebo cestou, kdy hlavní roli mají protein p53 a mitochondrie.

PCD je regulována lokálními cytokininy, steroidy nebo pomocí NO.

2.3.1 Vnitřní signální cesta

Tato cesta je aktivována poškozením jaderné DNA vlivem metabolitů, superoxidových radikálů, virovou infekcí nebo toxiny.

Protein p53 rozpoznává genetické poškození, iniciuje a katalyzuje jeho opravu a zároveň inhibuje dělení buňky do doby, kdy je oprava dokončena. Odhalí-li protein

p53 změny DNA přesahující možnost opravy, exprese genu se zvýší a dochází k syntéze proteinů poškozujících mitochondrie. Mitochondrie tak ztrácejí membránový potenciál, čímž je zvýšena propustnost pro látky aktivující apoptotické děje. Z mitochondrií se uvolňuje cytochrom c, Diablo protein, AIP a další proteiny zahajující aktivaci kaspáz. Zároveň roste tvorba volných kyslíkových radikálů, které zvýší poškození mitochondrií, a množství výše uvedených proteinů se dále zvyšuje. Nastává ireverzibilní část, fáze aktivace kaspázové kaskády.

Jsou zde samozřejmě i antiapoptotické mechanismy, např. protein Bcl-2, který se nachází v mitochondriích. Je-li Bcl-2 přítomen v dostatečné koncentraci, blokuje efekt proteinu p53 a chrání tak mitochondrie před poškozením.

2.3.2 Vnější signální cesta

Cesta přes „receptor smrti“ je zahájena navázáním ligandu na tento receptor, což aktivuje smrtící doménu v cytoplazmě. Tím dochází k aktivaci kaspázové kaskády.

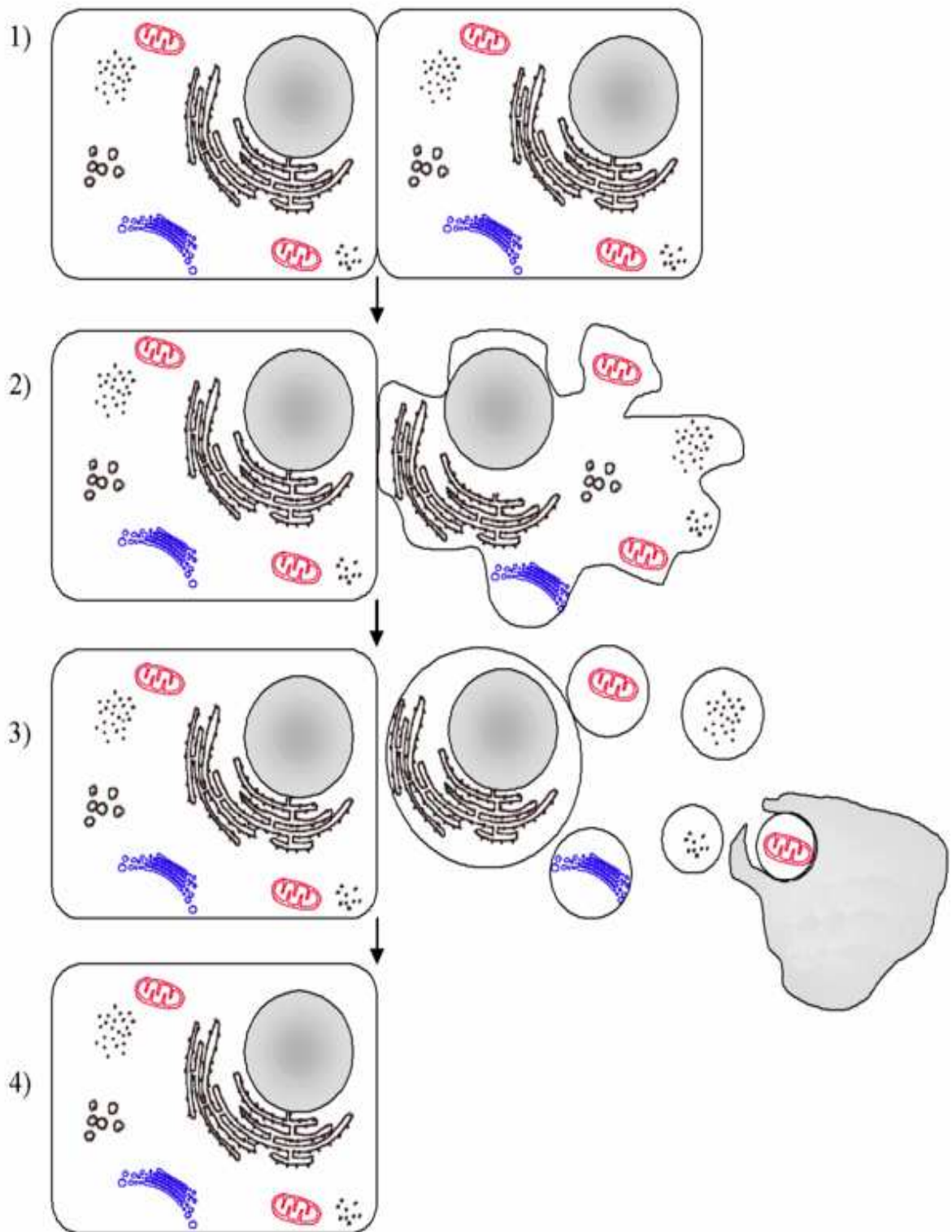
Proces PCD v tomto kroku může opět zablokovat Bcl-2 protein.

2.3.3 Kaspázová kaskáda

V této fázi dochází k aktivaci proteinů kaspáz, způsobující proteolytickou degradaci intracelulárních proteinů. Proto je tato fáze označována jako fáze rozkladná.

Kaspázy se řadí do skupiny cysteinových proteas hydrolyzujících proteiny na specifických místech. Kaspázy jsou syntetizovány jako neaktivní molekuly – prokaspázy, které jsou aktivovány již zmiňovanými signálními procesy. Kaspázy působí na stovky buněčných substrátů. Mohou inaktivovat enzymy opravující poškozenou DNA, dále aktivují endonukleasy, které štěpí jadernou DNA na menší fragmenty, degradují membrány buněčných organel a vnější membránu buňky, hydrolyzují buněčné proteiny a degradují i cytoskeletární struktury. Tyto změny v konečném důsledku končí buněčnou smrtí.

Před i během kaskády aktivačních reakcí může být proces PCD zastaven např. IAP proteinem, zabraňujícím aktivaci prokaspázy 3, nebo proteinem FLIP, který brání aktivaci prokaspázy 8 (4).



Obrázek 2: Průběh PCD (5). Vlevo zdravá buňka, vpravo buňka podléhající apoptóze.

- 1) Výchozí stav. 2) Zmenšování apoptotické buňky. 3) Rozpad buňky na apoptotická tělíška, fagocytóza buňky. 4) Apoptotická buňka je rozložena.

2.3.4 Rozdíl mezi PCD a nekrotózou

Na rozdíl od nekrotózy je PCD aktivní proces vyžadující energii a je zachován její geneticky řízený charakter. Programově umírající buňka se zásadně liší od buněčné nekrotózy i z hlediska morfologického a biochemického.

Dojde-li k PCD, buňka se smršťuje, chromatin jádra se kondenzuje a hrudkuje, přičemž se tvoří povrchové puchýřky a v konečné fázi se buňka fragmentuje na apoptotická tělíška. Odumřelá buňka je pak pohlcena okolními buňkami. Vzhledem k tomu, že zánětlivá reakce neprobíhá, okolní tkáň poškozena není.

Biochemickou metodou gelové elektroforézy lze již v časně fázi PCD vypořadovat pravidelnou fragmentaci jaderné DNA, která je v internukleozomálních oblastech rozštěpena na dvouvláknové molekuly o velikosti asi 185 párů bází. PCD jedné buňky trvá asi půl hodiny, fagocytóza makrofágy trvá několik hodin. Hlavním smyslem apoptózy je zlikvidovat poškozenou buňku, aby se již dále nemohla množit a ohrožovat celý organismus (4,5).

PCD může být způsobena např. negativními vlivy prostředí, jako je ionizující záření, tepelný šok, hypoxie, nadměrná vlhkost nebo toxická chemikálie.

Oproti tomu nekrotóza, neřízená buněčná smrt, je reakcí na akutní, neopravitelné poškození buňky, způsobená např. nedostatkem kyslíku, mechanickým poraněním, zářením či chemickým účinkem a jedná se o reakci náhodnou a neprogramovanou.

V případě nekrotózy je zastaven proces oxidativní fosforylace a dochází k nahromadění Na^+ a Ca^{2+} iontů uvnitř buňky v důsledku otevření iontových kanálů, vedoucí k popraskání buněčných membrán a uvolnění proteolytických enzymů do cytoplazmy. Bílkoviny a DNA se neorganizovaně dělí a nakonec je degradována i vnitřní buněčná membrána. Obsah buňky se vylévá do okolí, čímž je zahájena zánětlivá kaskáda pro okolní tkáň. Síla postižení, rychlost a aktuální stav buňky mají vliv na to, jak bude buňka reagovat (4).

2.4 Elicitory

Elicitory jsou monomerní, oligomerní nebo polymerní látky, pocházející z patogenních organismů, schopné vyvolat obrannou reakci u rostlin. Elicitory mohou mít charakter oligosacharidů, oligogalakturonanů a oligochitosacharidů. Mezi elicitory patří i některé nízkomolekulární látky, jako např. ergosterol a jiné lipidy.

Elicitory se rozdělují do dvou skupin. Mezi exogenní elicitory se řadí metabolity vylučované patogenem (polysacharidy, specifické enzymy, peptidy) a do skupiny endogenních elicitorů se řadí látky uvolňované narušením buněčné stěny rostliny (oligogalakturonany) či patogenu (oligomery chitinu, oligoglukany, glykoproteiny) (7).

Elicitor má funkci ligandu, který se váže na receptorový protein rostlinné buňky. Tyto receptory jsou lokalizovány na vnější straně plazmatické membrány nebo v cytoplasmě. Komplex vytvořený interakcí receptoru s elicitem je signálem pro spuštění obranných reakcí (3).

Velkou roli ve schopnosti vyvolat smrt buněk hraje struktura elicitoru. I relativně drobné rozdíly ve struktuře molekuly mohou ovlivnit toxicitu elicitorů.

2.4.1 Cryptogein

Cryptogein je proteinový elicitor vylučovaný houbou *Phytophthora cryptogea*. Jeho molekulová hmotnost je 10 kDa a je tvořen třemi disulfidovými můstky a hydrofóbním jádrem schopným vázat lipidy. Cryptogein je globulární protein složený z 98 aminokyselin.

Cryptogein vyvolává HR a způsobuje systémovou rezistenci u buněk tabáku. Rozpoznání tohoto elicitoru receptorem cytoplazmatické membrány vede k celé řadě dějů, jako je fosforylace proteinů, vtok Ca^{2+} iontů, výtok Cl^- a K^+ iontů, depolarizace plazmatické membrány, aktivace NADPH oxidasy zodpovědné za produkci AOS a okyselení cytosolu. Dále dochází k aktivaci pentosafosfátové dráhy a aktivaci MAPK (8).

2.4.2 L19R

L19R je mutantní protein cryptogeinu se sníženými schopnostmi vázat lipidické látky. Transformace byla provedena místně cílenou mutagenezí. Pro mutagenezi cryptogeinu byla navržena dvojice komplementárních oligonukleotidů nesoucích danou mutaci.

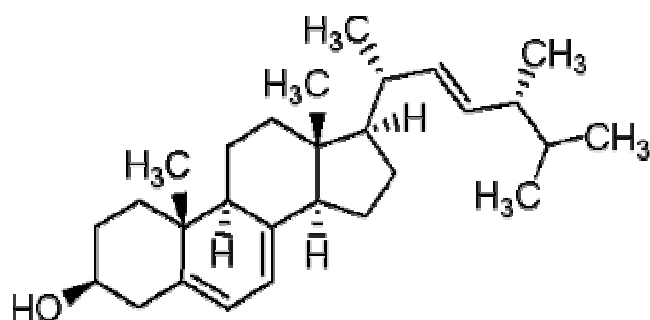
GTG AGC ATC CGA TCG GAC GCG TCG
CGA CGC GTC CGA TCG GAT GCT CAC,

Tento protein vznikl záměnou aminokyseliny leucinu v poloze 19 za hydrofilnější arginin, což způsobilo zvýšení jeho pI na 8,8 (pI cryptogeinu je 8,6). Mutací dále došlo ke změně elektrostatických interakcí na větší vzdálenost, které jsou důležité

pro navázání ligandů. Bylo zjištěno, že L19R neváže steroly, ale je schopen vázat mastné kyseliny. Nebylo prokázáno, že by L19R podněcoval syntézu AOS nebo změnu pH, výsledky však prokázaly, že tento mutant stimuluje buněčnou smrt (9).

2.4.3 Ergosterol

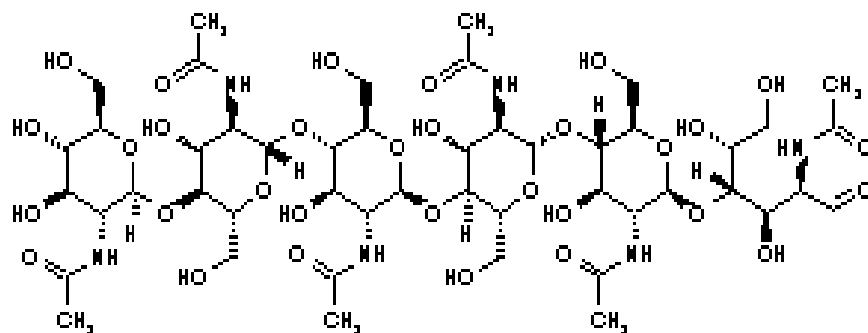
Ergosterol je hlavní sloučeninou houbové cytoplazmatické membrány. Ergosterol je schopen spouštět obrannou reakci u buněk tabáku a rajčete již v nanomolární koncentraci. Působením ergosterolu dochází k produkci AOS, alkalizaci média, změně toku iontů, aktivaci MAPK a produkci fytoalexinů (10).



Obrázek 3: Ergosterol

2.4.4 Hexa-N-Acetylchitohexosa

Hexa-N-Acetylchitohexosa patří do skupiny N-Acetylchitooligosacharidů a je schopna vyvolat HR. Připravuje se hydrolyzou chitinů z krabího krunýře. Tyto chitinové oligomery jsou složeny z N-acetyl-D-glukosaminů spojených vazbou β -1,4 a jsou hlavní složkou buněčné stěny většiny vyšších hub. Pro chitinové fragmenty mají rostlinné buňky vysoce citlivý vjemový systém a rozpoznávají je již při koncentraci 1 pM (11).



Obrázek 4: Hexa-N-Acetylchitohexosa

2.4.5 Kyselina arachidonová

Kyselina arachidonová je nenasycená esenciální mastná kyselina s 20 uhlíkovými atomy a čtyřmi cis dvojnými vazbami a je hlavní složkou membránových lipidů houby *Phytophthora infestans*. Kyselina arachidonová je rozpoznávána rostlinnými buňkami. Aktivní složkou, která je rostlinami rozpoznávána by mohla být oxidovaná forma kyseliny arachidonové metabolizovaná enzymem lipooxygenasou (11).



Obrázek 5: Kyselina arachidonová

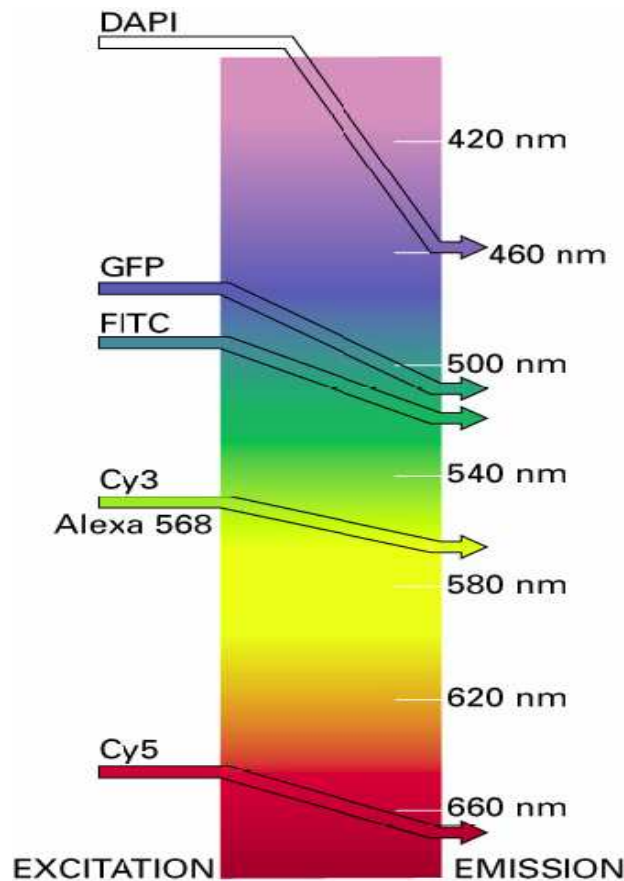
2.5 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je velmi používanou metodou pro detekci molekul proteinů, lipidů, sacharidů nebo i konkrétních sekvencí nukleových kyselin v buňkách bez nutnosti jejich destrukce a biochemické frakcionace. Další možností využití fluorescenční spektroskopie je studium metabolismu pomocí fluorescenčních sond. Hlavní výhodou fluorescenční mikroskopie je rychlost a jednoduchost, kdy výsledky jsou získány řádově v minutách. Nevýhodou metody je fakt, že i při sebelepším zaostření dochází k detekci také části světelného signálu pod i nad rovinou ostrosti. Lze proto použít modifikace fluorescenční mikroskopie, tzv. konfokální mikroskopie, kdy je získán ostrý obraz v různých optických rovinách. Tato metoda ale vyžaduje mimořádně silné zdroje světla typu laserů a speciální technologii detekce fotonů z roviny ostrosti. Další komplikací fluorescenční mikroskopie je to, že fluorofory se intenzivním zářením rozkládají a tím ztrácejí schopnost absorpce a emise. Při absorbcích a emisích také dochází k uvolňování volných radikálů, které poškozují jak samotné fluorofory, tak dochází i k negativnímu ovlivnění životaschopnosti buněk. Je proto důležité omezit expozici zářením využitím clon.

2.5.1 Fluorofory

Fluorofory jsou látky schopné absorbovat světlo určité vlnové délky a následně emitovat světlo o delší vlnové délce. Existuje řada převážně heterocyklických sloučenin, které se od sebe liší absorpčními a emisními vlnovými délkami a které

pokrývají celé spektrum viditelného spektra s přesahy do UV a IR oblasti (viz obrázek 6). Proto je možné detekovat více různých struktur v téže buňce a sledovat tak jejich vzájemnou polohu. Záření z jednotlivých fluoroforů lze oddělit pomocí příslušných filtrů.



Obrázek 6: Příklady některých fluoroforů s příslušnými excitačními a emisními vlnovými délkami. DAPI interkaluje do struktury DNA, fluorofor k detekci jádra. Zelený fluorescenční protein (GFP). Fluorescein isothiokyanát (FITC) pro detekci tubulinového cytoskeletu. Cy3, Cy 5, Alexa 568 fluorofory s vysokou účinností fluorescence.

2.5.2 Fluorescenční mikroskop

Přístrojem pro detekci fluoroforů je fluorescenční mikroskop. Jako zdroj světla se používá rtuťová výbojka. Světlo různých vlnových délek se dá od sebe oddělit pomocí filtrů. Excitační filtr z barevného spektra propouští pouze vlnové délky potřebné pro excitaci fluorescence a zároveň zabraňuje průchodu světla o jiné vlnové délce, které by tvořilo pozadí. Druhý filtr se nazývá bariérový a propouští pouze emisní část spektra.

Tento filtr také brání průchodu světlu excitačnímu, které má mnohem větší intenzitu než světlo emisní a tím pádem by narušilo přesné pozorování (12, 13).



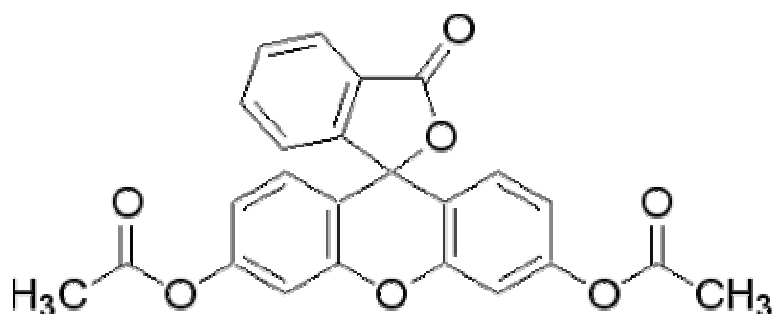
Obrázek 7: Fluorescenční mikroskop

2.5.3 Fluorescein diacetát

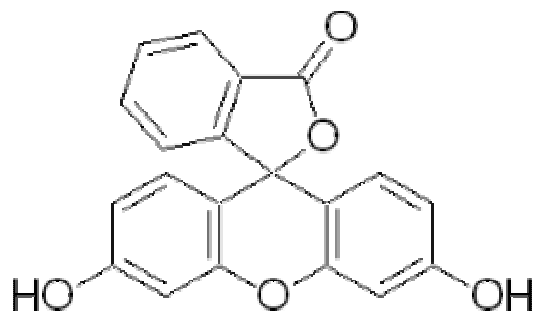
Fluorescein diacetát (FDA) se široce používá v mikroskopii k přibližnému stanovení živých buněk v populaci. Toto barvivo proniká do živých buněk přes neporušenou cytoplazmatickou membránu a v cytosolu je esterázami hydrolyzováno na fluorescein. Fluorescein není schopen přejít zpět přes membránu a uvnitř buňky zeleně fluoreskuje (6, 14).

Použitím fluorescenčního mikroskopu lze takto označené živé buňky spočítat a určit poměr všech buněk a živých buněk.

Hlavní nevýhodou této techniky je kolísání intenzity zeleného emisního světla, které může vést k chybnému odečtení.



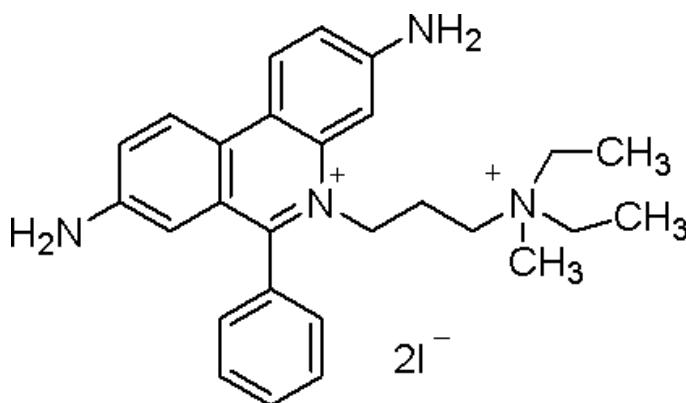
Obrázek 8: Fluorescein diacetát



Obrázek 9: Fluorescein

2.5.4 Propidium jodid

Propidium jodid (PI) je interkalující barvivo, které neprochází neporušenými membránami živých buněk. Jeli však cytoplazmatická membrána porušená, barvivo lehce prochází do buněk. PI má vysokou afinitu k nukleovým kyselinám a po navázání asi 40x větší fluorescenci. PI se proto používá k detekci mrtvých buněk, které svítí intenzivně červeně (14). Vlnová délka excitace je 535 nm a emise 617 nm.



Obrázek 10: Propidium jodid

2.6 Spektroskopické metody stanovení buněčné životaschopnosti

2.6.1 Barvení pomocí FDA

FDA slouží ke stanovení množství životaschopných buněk pomocí rychlosti přeměny FDA. Fluorescein diacetát proniká do buněk přes cytoplazmatickou membránu, kde se u živých buněk přeměňuje na fluoreskující sloučeninu fluorescein. Použitím spektrofluorimetru se měří emise fluorescentního záření. Vlnová délka excitace fluoresceinu je 493 nm, vlnová délka emise 510 nm. Kalibraci lze provést

pomocí standardů o různém zastoupení živých a mrtvých buněk. Mrtvé buňky se získají zmrazením a následným rozmrazením živých buněk a přidají do suspenzí buněk živých. Tím je vytvořena sada suspenzí, jejichž životaschopnost se pohybuje v rozmezí od 0 do 100 % s přírůstkem vždy 20 %. Změna fluorescence se pak měří po dobu dvouminutového časového intervalu a mezi 60 – 90 s se vyhodnocuje spád nárůstu fluorescence u každé buněčné suspenze.

3 Praktická část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Chemikálie

Ergosterol	$M_r = 396,65$
Metergosterol	$M_r = 410,68$
Cryptogein	$M_r = 10\,000$
L19R	$M_r = 10\,000$
Kyselina arachidonová	$M_r = 304,47$
Hexa-N-Acetylchitohexosa	$M_r = 1237,17$
Ethanol	$M_r = 46,07$
Propidium jodid	$M_r = 668,39$
Fluorescein diacetát	$M_r = 416,39$
5-amino-2,3-dihydro-14-phthalazindion (Luminol)	$M_r = 177,16$

3.1.2 Biologický materiál

Kalus *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi odvozený z listu rostlin. (v textu Xanthi)

Kalus *Nicotiana tabacum* L. ze sbírky DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). (v textu DSMZ)

Kalus *Lycopersicon esculentum* darovaný ze sbírky INRA Dijon. (v textu Rajče)

3.1.3 Přístroje

Mikroskop Olympus CX21

Třepačka s vodní lázní GLF 1092

Autokláv Chirana AUT 26/II

Membrána Minisart, velikost pórů 0,22 μm (Sartorius)

Laminární box Ekom EM 90

Třepačka Heidolph Unimax 2010

Luminometr Bio-orbit typ-1253

pH metr WTW inoLab Level 2

3.1.4 Kultivace tabáku

3.1.4.1 Příprava média

Médium pro pěstování suspenzní kultury tabáku (var. Xanthi) a rajčete se skládá ze dvou částí. První část (hlavní médium) obsahovala látky, které je možno sterilizovat v autoklávu. Složení této části je popsáno v tabulce 1. Hlavní médium bylo doplněno na 900 ml redestilovanou vodou a pH upraveno na 5,7- 5,9. Sterilizace byla provedena v autoklávu 30 minut při 140 kPa.

Látka	Množství látky v 1l zásobního roztoku (g)	Přídavek zásobního roztoku na 1l média (ml)	Výsledná koncentrace (g.l ⁻¹)
Makroprvky			
KH ₂ PO ₄	3,4	50	0,17
KNO ₃	38,0		1,90
NH ₄ NO ₃	33,0		1,65
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,4		0,37
CaCl ₂ .2H ₂ O	8,8		0,44
Mikroprvky			
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	1	0,022
ZnSO ₄ .2H ₂ O	8,6		0,0086
H ₃ BO ₃	6,2		0,0062
KI	0,83		0,00083
NaMoO ₄ .H ₂ O	0,25		0,00025
CuSO ₄ .2H ₂ O	0,025		0,000025
CoCl ₂ .2H ₂ O	0,025		0,000025
EDTA-Fe			
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78	10	0,028
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,72		0,037
Sacharosa		20 g	20 g/l

Tabulka 1: Složení hlavního média pro suspenzní kulturu tabáku (var. Xanthi) a rajčete.

Druhá část média (roztok vitamínů a růstových látek) nemohla být sterilizována v autoklávu pro svoji tepelnou labilitu, a proto byla sterilizována ultrafiltrací. Složení roztoku vitamínů a růstových látek je popsáno v tabulce 2. U této části bylo pH upraveno na 5,8.

Vitamíny	Množství látky v 0,1l zásobního roztoku (mg)	Přídavek zásobního roztoku na 1l média (ml)	Výsledná koncentrace (g.l ⁻¹)
Thiamin	5	1	0,0005
Kyselina nikotinová	50		0,005
Pyridoxin	5		0,0005
Glycin	20		0,002
Pantothenát Ca	30		0,003
Kyselina folová	5		0,0005
Biotin	0,5		0,00005
Inositol		100 mg	0,1
Glutamin		200 mg	0,2
BAP	22,5	0,48	0,00011
2,4-D	22,1	0,8	0,00018

Tabulka 2: Vitamíny a růstové látky pro přípravu suspenzní kultury tabáku (var. Xanthi) a rajčete.

Do zchladlého hlavního média (cca 50 °C) byl v laminárním boxu přidán sterilní roztok vitamínů a růstových látek. Takto připravené růstové médium bylo rozléváno po 80 ml do 250ml Erlenmeyerových baněk, které byly předtím vysterilizované 3 hodiny horkým vzduchem při 140 °C.

Při přípravě tuhého média bylo do hlavního média před sterilizací navíc přidáno 3,5 g phytagelu na 1 litr média. Po smíchání obou částí bylo růstového médium rozléváno na sterilní Petriho misky.

Složení média pro kultivaci bílých tabákových buněk (DSMZ) je uvedeno v tabulce 3. Sterilizace byla provedena v autoklávu 20 minut při 140 kPa.

Látka	Množství látky v 1l zásobního roztoku (g)	Přídavek zásobního roztoku na 1l média (ml)	Výsledná koncentrace (g.l ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	3,4	50	0,17
KNO ₃	38,0		1,90
NH ₄ NO ₃	33,0		1,65
MgSO ₄	3,61		0,18
CaCl ₂	6,64		0,332
FeNaEDTA	0,73		0,037
MnSO ₄ .H ₂ O	0,34		0,017
ZnSO ₄ .4H ₂ O	0,17		0,0086
H ₃ BO ₃	0,12		0,0062
KI	0,02		0,00083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,005		0,00025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0005		0,000025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0005		0,000025
Thiamin hydrochlorid			0,0004
Inositol			0,1
2,4-D		0,00022	
Kyselina naftyloctová		0,00019	
Sacharosa		30	
<i>pH = 6,0</i>			

Tabulka 3: Složení kultivačního média pro suspenzní kulturu tabáku (DSMZ).

3.1.4.2 Kultivace suspenzní kultury

Kultura tabáku byla uchovávána na pevném médiu za světla při teplotě 23 °C, přičemž přeočkování této kultury bylo prováděno jednou za měsíc.

Přeočkování do tekutého média se provádělo tak, že byla kvantitativně přenesena kultura z misky do 50ml Erlenmeyerovy baňky s 12 ml média. Potom byla tato suspenzní kultura pěstována za světla a třepání o frekvenci 120 min⁻¹ při 23 °C po dobu 7 dnů. 8 ml této suspenze bylo naočkováno do tekutého média o objemu 80 ml. Pro uchování byla suspenzní kultura pěstována v 250 ml Erlenmeyerových baňkách za výše uvedených podmínek po dobu 7 dní.

Obdobným způsobem se prováděla kultivace suspenzních kultur rajčete a bílých tabákových buněk. Doba pěstování kultur však byla místo jednoho týdne 14 dní.

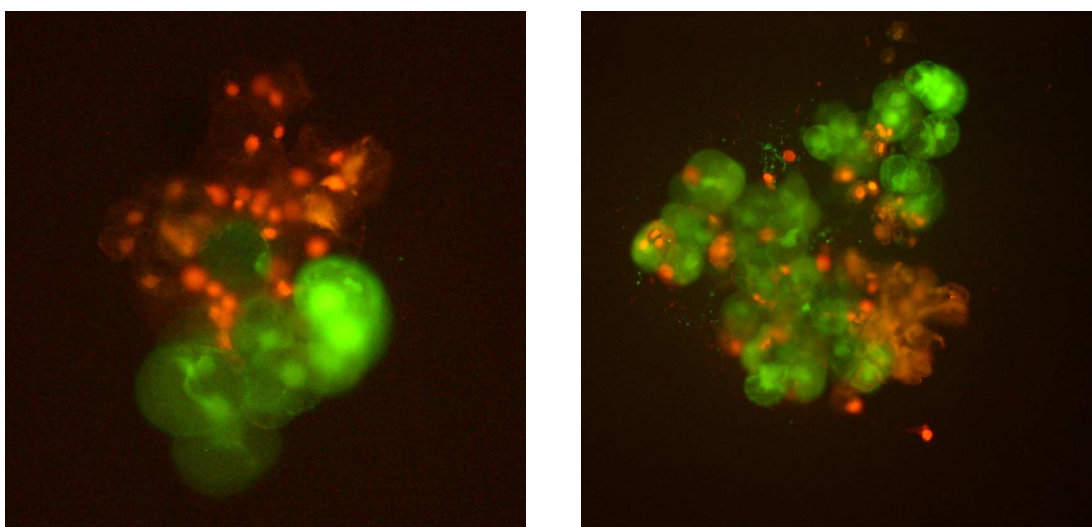
3.1.5 Elicitace buněčné smrti

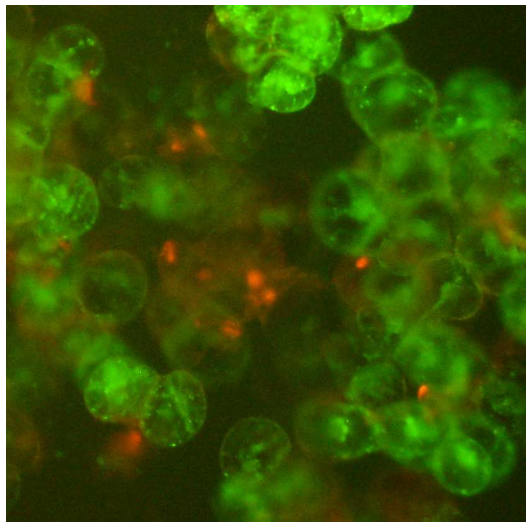
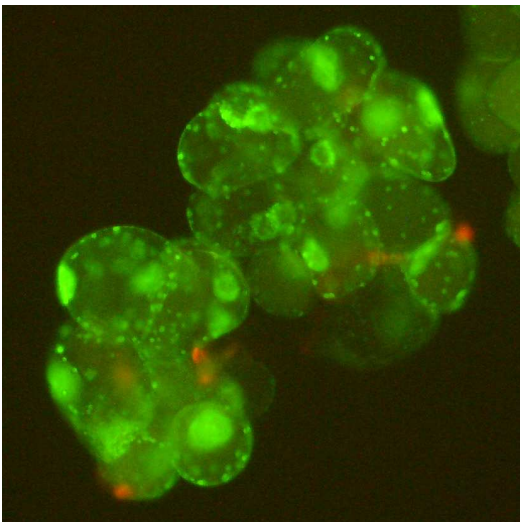
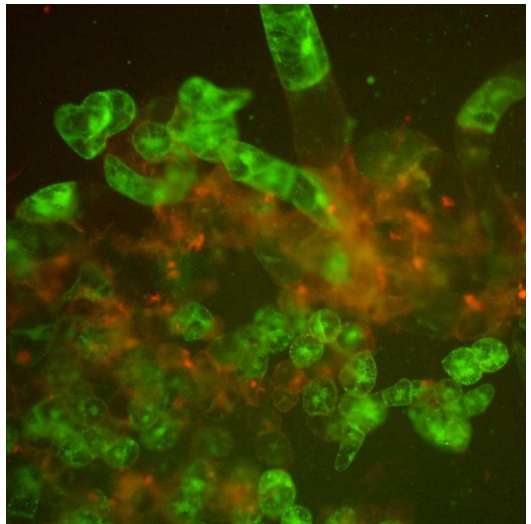
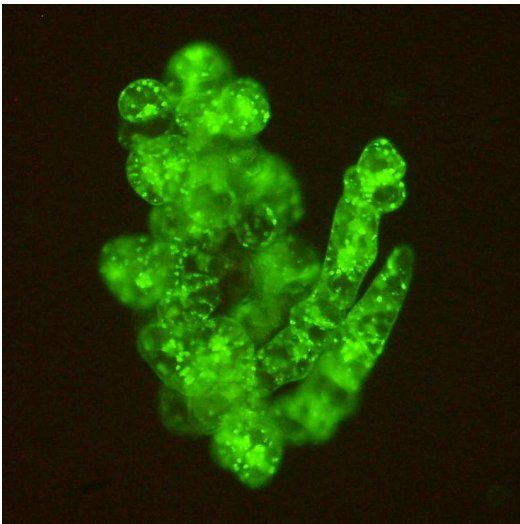
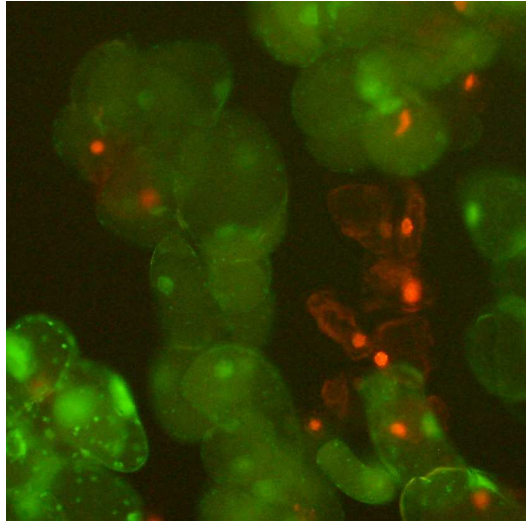
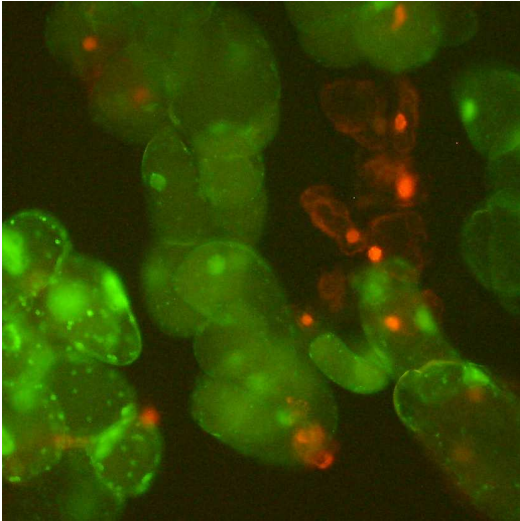
3.1.5.1 Příprava měření

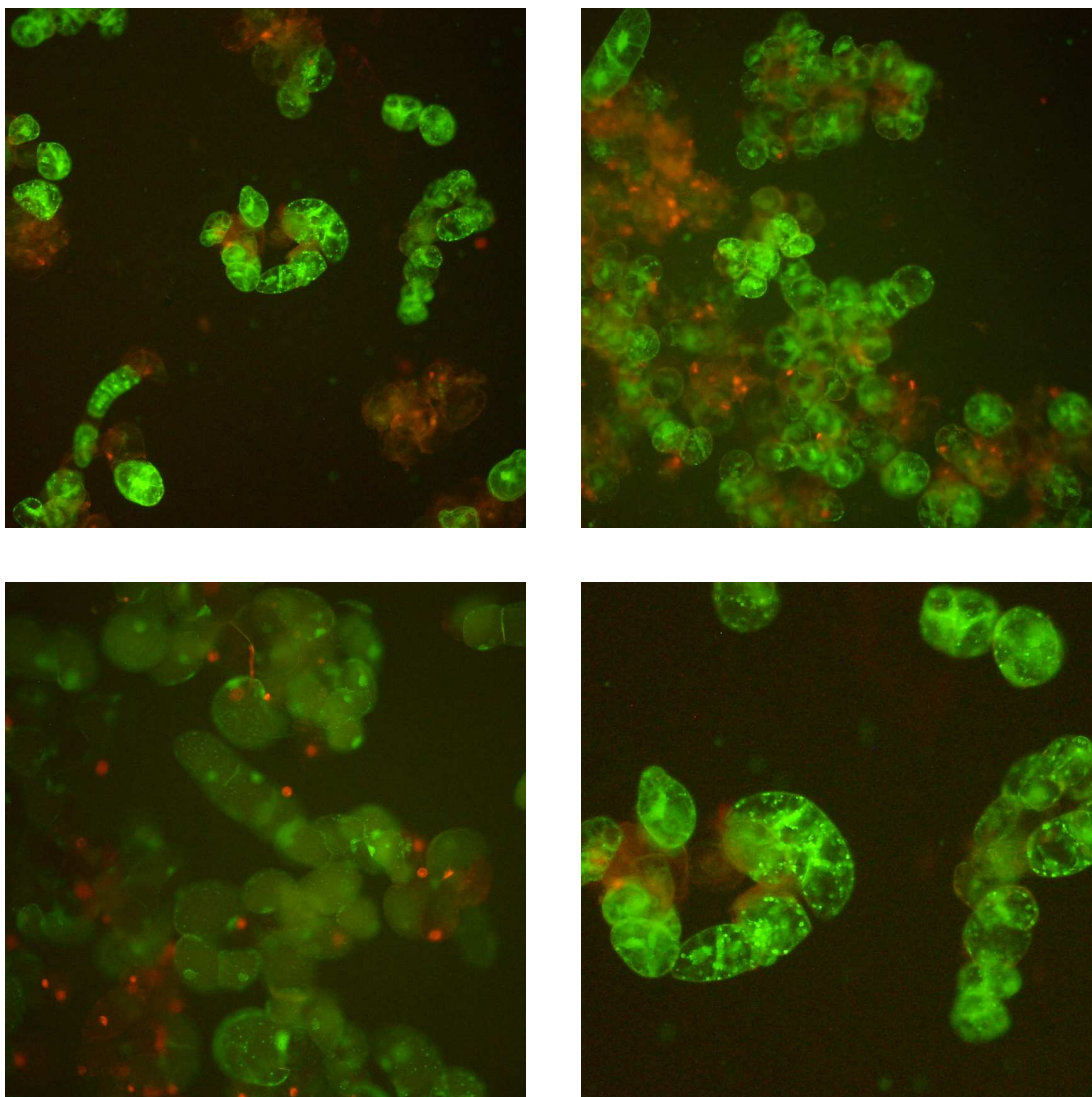
Pro měření byla použita 5 dní stará kultura tabáku. Suspenze buněk byla rozlita po 10 ml do 25ml Erlenmeyerových baněk a byly přidány elicitory. Tyto baňky pak byly umístěny na třepačku s vodní lázní a byly inkubovány 24 h při frekvenci třepání 150 min^{-1} a teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.5.2 Vlastní měření

Z jednotlivých baněk bylo postupně odebráno do mikrozkušavek $5 \mu\text{l}$ suspenze. K této suspenzi bylo přidáno $10 \mu\text{l}$ PI ($0,1 \text{ g.l}^{-1}$) a $30 \mu\text{l}$ FDA ($0,0008 \text{ g.l}^{-1}$) a po pěti minutách byl vzorek přenesen na podložní sklíčko. U takto připraveného preparátu lze použitím fluorescenčního mikroskopu pozorovat buněčnou smrt. Pro pozorování živých buněk byl použit modrý excitační filtr CX-DMB-2 a pro pozorování buněk mrtvých zelený excitační filtr CX-DMG-2. Optimální zvětšení pro mikroskopování bylo $100\times$. U každého preparátu bylo vyhodnoceno asi 400 buněk a bylo spočteno procentuální zastoupení živých buněk. Zobrazení buněk pod mikroskopem je uvedeno na obrázku 11.







Obrázek 11: Snímky z fluorescenčního mikroskopu.

Zeleně fluoreskující buňky jsou živé, buňky mrtvé fluoreskují červeně. Pro detekci živých buněk byl použit fluorescein diacetát, který do nich proniká přes neporušenou cytoplazmatickou membránu. V cytozolu je hydrolyzován esterasami na zeleně fluoreskující fluorescein. Pro stanovení mrtvých buněk byl použit propidium jodid, který prochází poškozenou membránou a jadernou membránou mrtvých buněk. Uvnitř mrtvých buněk se váže na DNA a emituje červenou fluorescenci.

3.1.6 Měření produkce AOS

3.1.6.1 Příprava měření

Pro měření HR byly použity 3 dny stará kultura tabáku, která byla odsáta na fritě. Frita byla zvážena po propláchnutí pufrům I2 (složení je popsáno v tabulce 4). Potom byly buňky lehce propláchnuty na fritě pufrům I2 ohřátým na pokojovou teplotu. Po promytí byly buňky rozsuspendovány v pufru I2 v koncentraci 1g buněk na 10 ml pufru I2. Suspenze byla rozlita po 20 ml do 50ml Erlenmeyerových baněk a umístěna na třepačku a 2 hodiny stabilizována při frekvenci 150 min⁻¹ a teplotě 25 °C. Poté byla změřena koncentrace AOS v čase 0. Po přidání příslušných elicitorů bylo provedeno měření AOS v intervalu 5 min.

	Koncentrace (mmol/l)	Navážka na 1 l (g)
Manitol	175	32
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5	0,10
K ₂ SO ₄	0,5	0,09
MES	2	0,39
<i>pH = 5,8 upraveno pomocí KOH</i>		

Tabulka 4: Složení pufru I2.

3.1.6.2 Vlastní měření

Peroxid vodíku vznikající při oxidativním vzplanutí byl měřen luminolovou reakcí na luminometru. Měření bylo provedeno tak, že z měřené baňky bylo v pětiminutových intervalech odebíráno 250 µl suspenze a přeneseno do měřící kyvety se 100 µl 0,03 mM luminolu, 10 µl peroxidasy a 300 µl pufru I20 (pH = 10,6) (složení je popsáno v tabulce 5) a byla ihned změřena luminiscence.

	Koncentrace (mmol/l)	Navážka na 1 l (g)
Manitol	175	32
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5	0,10
K ₂ SO ₄	0,5	0,09
Borát	20	1,24
<i>pH = 10,6 upraveno pomocí KOH</i>		

Tabulka 5: Složení pufru I20.

3.2 Výsledky měření

K měření buněčné smrti byly použity suspenzní kultury tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi a *Nicotiana tabacum* L. a rajčete *Lycopersicon esculentum*. Buňky byly připraveny podle postupu popsaného v kapitole 3.1.5. Ke každé sadě měření byl připojen kontrolní vzorek suspenzní kultury bez přídavku testovaného elicitoru. V kontrolním vzorku se počet mrtvých buněk pohyboval v rozmezí 15 – 20 %, v kontrolním vzorku s přídavkem ethanolu bylo napočítáno 23 % mrtvých buněk.

3.2.1 Srovnání účinku elicitorů na různé suspenzní kultury

Stejně elicitory byly přidávány k různým suspenzním kulturám a byl porovnán vliv jejich působení. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6. Cryptogein byl schopen vyvolat buněčnou smrt pouze u zelených tabákových buněk (Xanthi) a to ve velké míře, kdy bylo usmrceno 80 % veškerých buněk. U bílých tabákových buněk (DSMZ) působením cryptogeinu k signifikantní buněčné smrti nedošlo, stejně tak i při použití elicitorů chitohexosy, ergosterolu a směsi ergosterolu s chitohexosou. Příčinou je pravděpodobně neschopnost vyvolat obranné reakce u těchto buněk, což bylo ověřeno pokusem elicítovat tvorbu AOS u těchto buněk. Při tomto experimentu nebyly zjištěny podstatné změny v koncentraci AOS. (viz tabulka 7). Ani u rajčatových buněk nedošlo působením chitohexosy, ergosterolu a jejich směsi k výrazné buněčné smrti.

Koncentrace (nM)	Elicitor	Kultura	Živé buňky (%)
50	Cryptogein	Xanthi	20,00
		DSMZ	69,39
400	Chitohexosa	Xanthi	90,78
		DSMZ	72,83
		Rajče	83,07
1 250	Ergosterol	Xanthi	69,28
		DSMZ	70,33
		Rajče	67,89
625/200	Ergo/Chit	DSMZ	69,05
		Rajče	78,89

Tabulka 6: Porovnání schopností elicitorů vyvolat buněčnou smrt u různých kultur.

t (min)	Ergosterol (630 nM)	Metergosterol (630 nM)	Cryptogein (25 nM)	Chitohexosa (2 000 nM)
AOS				
5	0,012	0,012	0,013	0,042
10	0,014	0,012	0,014	0,043
15	0,022	0,012	0,014	0,043
20	0,022	0,020	0,016	0,030
25	0,026	0,017	0,017	0,046
30	0,031	0,020	0,012	0,040
35	0,033	0,017	0,017	0,032
40	0,018	0,027	0,016	0,023

Tabulka 7: Elicitace AOS u suspenzních buněk DSMZ.

3.2.2 Test chyby měření a reprodukovatelnosti

Pro zjištění chyby měření byly vzorky vícekrát proměřeny ve stejný den za stejných podmínek. Naměřené hodnoty se téměř shodovaly, pouze jedna hodnota u mutantního proteinu L19R se odlišovala. Příčinou této chybné hodnoty bylo s největší pravděpodobností špinavé sklo. Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce 8.

V tabulce 9 jsou uvedeny hodnoty ověřování reprodukovatelnosti výsledků získaných z měření v několika dnech. I zde se naměřené hodnoty pro jednotlivé elicitory shodují.

Xanthi			DSMZ		
Koncentrace (nM)	Elicitor	Živé buňky (%)	Koncentrace (nM)	Elicitor	Živé buňky (%)
50	Cryptogein	13,95	50	Cryptogein	60,20
50	Cryptogein	15,96	50	Cryptogein	63,92
50	Cryptogein	18,96	1 250	Ergosterol	63,46
50	L19R	82,61	1 250	Ergosterol	65,35
50	L19R	74,23	400	Chitohexosa	72,83
50	L19R	33,33	400	Chitohexosa	64,60

Rajče		
Koncentrace (nM)	Elicitor	Živé buňky (%)
625/200	Ergo/Chit	78,26
625/200	Ergo/Chit	79,52
1 250	Ergosterol	66,00
1 250	Ergosterol	69,77
400	Chitohexosa	84,21
400	Chitohexosa	81,93

Tabulka 8: Ověření opakovatelnosti měření v jeden den u suspenzních buněk tabáku (Xanthi a DSMZ) a rajčete.

Xanthi				DSMZ			
Koncentrace (nM)	Elicitor	Měření	Živé buňky (%)	Koncentrace (nM)	Elicitor	Měření	Živé buňky (%)
50	Cryptogein	1	25,00	50	Cryptogein	1	63,92
		2	15,96			2	69,39
		3	15,60	1 250	Ergosterol	1	65,35
		4	20,00			2	70,33
		5	13,25	400	Chitohexosa	1	72,83
1	68,18	2	75,00				
1 250	Ergosterol	2	73,33	625/200	Ergo/Chit	1	66,67
		3	65,22			2	71,43
		50	L19R	1	75,68		
2	74,23						

Tabulka 9: Ověření reprodukovatelnosti měření v různé dny u suspenzních buněk tabáku (Xanthi a DSMZ).

3.2.3 Koncentrační závislost

V rámci měření bylo také sledováno, jaký má vliv zvyšování koncentrace elicitorů na úmrtnost zelených tabákových buněk (Xanthi). Cryptogein a jeho mutantní protein L19R byl přidán ve třech vzrůstajících koncentracích. Mutantní protein L19R oproti

cryptogeinu vyvolával signifikantní buněčnou smrt až při vyšší koncentraci. Stejný pokus byl proveden i s elicitory chitohexosou a kyselinou arachidonovou. Změna koncentrace těchto elictorů neměla výrazný vliv na počet mrtvých buněk. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce 10.

Koncentrace (nM)	Elicitor	Živé buňky (%)	Koncentrace (nM)	Elicitor	Živé buňky (%)
50	Cryptogein	28,54	50	L19R	72,10
125		28,51	125		47,80
250		20,34	250		39,83

Koncentrace (μM)	Elicitor	Živé buňky (%)	Koncentrace (μM)	Elicitor	Živé buňky (%)
0,4	Chitohexosa	90,78	3,3	Kyselina arachidonová	90,78
2		87,98	16,5		87,98
4		82,22	33		82,22

Tabulka 10: Závislost buněčné smrti na množství přidaného elictoru u zelených buněk tabáku (*Xanthi*).

3.2.4 Koelicitace

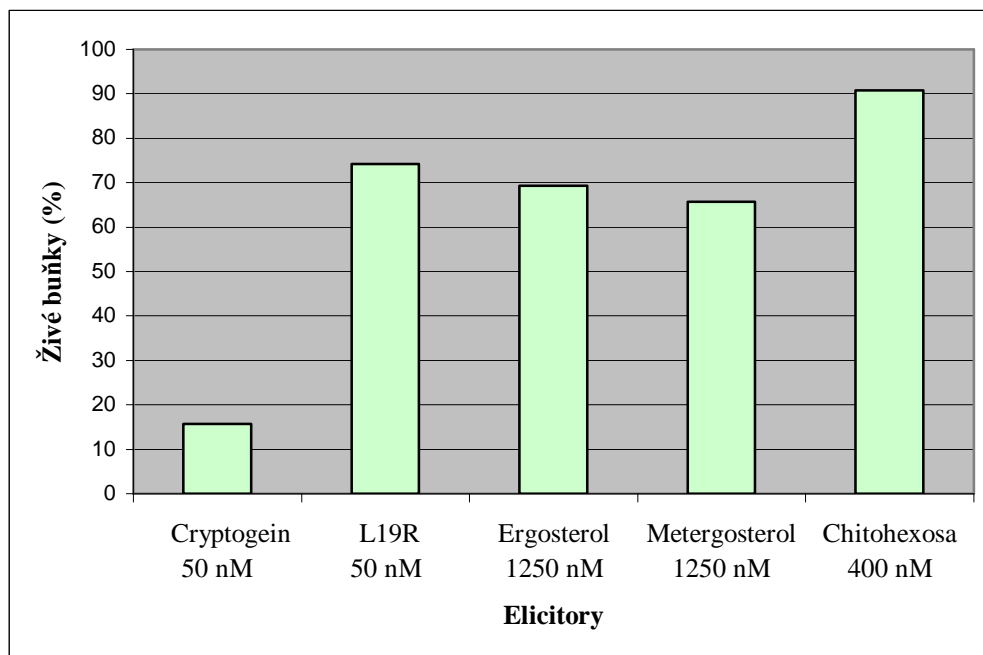
V dalších pokusech byla ověřována možnost zvýšení účinnosti jednotlivých elictorů u zelených buněk tabáku (*Xanthi*) vzájemným spolupůsobením ve směsi. Použité kombinace elictorů jsou uvedeny v tabulce 11. Provedené pokusy neprokázaly změnu v působení elictorů samotných a ve směsi i při vysokých koncentracích.

Ergosterol (μM)	Kyselina arachidonová (μM)	Chitohexosa (μM)	Živé buňky (%)
1,25	-	2	79,07
			70,33
1,25	-	4	85,71
			91,37
-	33	4	71,29
			90,00
1,25	16,5	-	71,60
			90,24
1,25	33	-	73,91
			92,31

Tabulka 11: Účinek koelicitorů u zelených buněk tabáku (Xanthi).

3.2.5 Porovnání vlivu elicitorů u zelených tabákových buněk (Xanthi)

Na zelených tabákových buňkách (Xanthi) byly testovány různé elicitory. Nejvyšší elicitace účinnost se projevila u cryptogeinu. Ostatní testované elicitory výrazně neovlivnily odumírání buněk testovaného vzorku (graf 1).



Graf 1: Schopnost elicitorů vyvolat signifikantní buněčnou smrt u zelených tabákových buněk (Xanthi).

Závěr

1. Byl proveden experiment se sadou elicitorů na suspenzních kulturách tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi a *Nicotiana tabacum* L. a rajčete *Lycopersicon esculentum*. Prokazatelná reakce buněk na přítomnost elicitorů byla pozorována pouze u zelených tabákových buněk (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi). U ostatních buněčných suspenzí nedošlo k vyvolání žádné signifikantní odezvy.

2. U zelených tabákových buněk (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) byl proveden test citlivosti na různé elicitory a jejich kombinace. U použitých kombinací elicitorů nebyla prokázána jejich vzájemná koelicitace. Z testovaného souboru elicitorů byl jako nejúčinnější vyhodnocen cryptogein. Signifikantní nárůst buněčné smrti byl pozorován již při koncentraci 50 nM.

3. Byla testována závislost míry odumírání buněk na vzrůstající koncentraci elicitorů cryptogeinu a jeho mutantního proteinu L19R. Cryptogein vyvolal značnou buněčnou smrt již při nízkých koncentracích (50 nM), naproti tomu L19R vyvolal markantní buněčnou smrt až při vyšší koncentraci (250 nM).

5 Seznam literatury

1. Luštinec J., Žárský V.: Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Karolinum, Praha 2003.
2. Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L.: Biochemistry & molecular biology of plants. American society of plant physiologists, Rockville 2000, 1094 – 1139.
3. Pavlová L.: Fyziologie rostlin. Karolinum, Praha 2005, 159 – 167.
4. Topinková E. (2002): Apoptóza – programovaná buněčná smrt a stárnutí. *Sanquis* 20, 14.
5. <http://cs.wikipedia.org>
6. Amano T., Hirasawa K., O'Donohue M. J., Pernolle J.-C., Shioi Y. (2003): A versatile assay for accurate, time-resolved determination of cellular viability. *Analytical Biochemistry* 314, 1-7.
7. <http://botany.upol.cz>
8. Edreva A., Blancard D., Delon R., Bonnet P., Ricci P. (2002): Biochemical changes in β -cryptogein-elicited tobacco: A possible basis of acquired resistance. *Contributions to tobacco research* 20 (2), 53 – 59.
9. Lochman J., Kašparovský T., Damborský J., Osman H., Marais A., Chaloupková R., Ponchet M., Blein J.-P., Mikeš V. (2005): Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry* 44 (17), 6565 – 6572.
10. <http://wwwdata.muni.cz>
11. Slusarenko A.J., Fraser R.S.S., van Loon L.C.: Mechanisms of resistance to plant diseases. Kluwer academic publishers, London 2000.
12. Černý J.: Fluorescenční mikroskopie. www.otevrena-veda.cz
13. <http://www.natur.cuni.cz>
14. Sekavová B., Melzoch K., Rychtera M., Piterková L.: Stanovení viability termofilních mikroorganismů pomocí fluorescenční mikroskopie. <http://www.vscht.cz>