

ANALYSIS OF CELL DEATH INDUCED BY NITRIC OXIDE AND HYDROGEN PEROXIDE IN PLANTS

ANALÝZA BUNĚČNÉ SMRTI INDUKOVANÉ OXIDEM DUSNATÝM A PEROXIDEM VODÍKU U ROSTLIN

Víteček J.¹⁾, Babula P.²⁾, Petřek J.¹⁾, Havel L.¹⁾, Potěšil D.³⁾, Adam V.³⁾, Kizek R.³⁾

1) Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

2) Ústav přírodních léčiv, FaF VFU Brno, Palackého 1/3, 612 46 Brno

3) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

E-mail: vitecek@mendelu.cz

ABSTRACT

In plants interplay between synthesis of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) is decisive for the induction of cell death in some cases. This effect was also demonstrated using donors of NO and ROS. The aim of our work was to verify the specific effect of sodium nitroprusside (SNP; NO donor) on the cell viability, morphology and biochemical characteristics, if cells are subjected to SNP and H₂O₂ simultaneously. Cell suspensions of tobacco (BY-2) were treated by SNP, potassium ferricyanide (PFC, analogue of SNP which can not release NO) and glucose with glucose oxidase (GGO, H₂O₂ donor), respectively, and moreover by combination of GGO with SNP or PFC. Entirely combination of SNP and GGO induced cell death. SNP possessed NO specific effect in this case, although the ferricyanide itself influenced the experimental system. Morphology of cells changed and cell nuclei exhibited features of programmed cell death. Controversially DNA was only slightly degraded.

Keywords: potassium ferricyanide, sodium nitroprusside, nitric oxide, hydrogen peroxide, programmed cell death, tobacco BY-2

ABSTRAKT

U rostlin je pro indukci buněčné smrti v některých případech klíčová souhra produkce oxidu dusnatého (NO) a reaktivních forem kyslíku (ROS). Tento fakt byl také prokázán pomocí donorů NO a ROS. Cílem naší práce bylo ověřit specifické působení nitroprusidu sodného (SNP, donor NO) na životaschopnost, morfologii a biochemické charakteristiky rostlinných buněk, jestliže jsou tyto buňky současně ovlivněny SNP a H₂O₂. Buněčné suspenze tabáku

byly vystaveny působení SNP, ferrikyanidu draselného (PFC, analog SNP, který neuvolňuje NO) a glukosy s glukosaoxidasou (GGO, donor H_2O_2) a dále kombinaci GGO s SNP nebo PFC. Pouze kombinace SNP a GGO vyvolávala buněčnou smrt. SNP působil specificky prostřednictvím NO, ačkoli ferrikyanid sám o sobě ovlivňoval experimentální systém. Došlo ke změnám morfologie buněk a buněčná jádra jevila příznaky programované buněčné smrti, zatímco DNA byla jen slabě fragmentována.

Klíčová slova: ferrikyanid draselný, nitroprussid sodný, oxid dusnatý, peroxid vodíku, programovaná buněčná smrt, tabák BY-2

Seznam zkratek

AOS	aktivní formy kyslíku
FDA	fluoresceindiaceát
GGO	glukosa s glukosaoxidasou
IU	mezinárodní jednotka
MTT	metylthiazolydifenyltetrazolium bromid
NR	neutrální červen
PFC	ferrikyanid draselný
PI	propidium jodid
SNP	nitroprussid sodný

ÚVOD

Oxid dusnatý (NO) představuje velmi významnou signální molekulu v organismu obratlovců. Podílí se na funkci nervového, kardiovaskulárního a imunitního systému ¹. V poslední době se ukazuje, že hraje významnou roli i u rostlin. Rostliny mohou reagovat jednak na exogenní NO a dále jej jsou schopny syntetizovat. NO ovlivňuje mnoho fyziologických dějů včetně růstu a vývoje ². Zásadní význam má jeho působení ve stresové fyziologii. Během biotického stresu NO reguluje odezvu hostitelské rostliny na přítomnost patogenního organismu ³. Bylo prokázáno, že NO může při současném působení s aktivními formami kyslíku (AOS) vyvolat buněčnou smrt, jestliže jsou poměry stacionárních koncentrací NO a AOS v určitém rozmezí ³. Tento efekt byl potvrzen i pomocí donorového systému NO a H_2O_2 ^{4,5}. Při těchto experimentech byl jako donor NO používán nitroprussid sodný (SNP). Jedná se o ferrikyanidový komplex a tudíž může kromě NO uvolňovat i kyanid ⁶.

Cílem naší práce bylo ověřit, zda SNP indukuje buněčnou smrt u rostlinných buněk specificky prostřednictvím NO. Dále charakterizovat průběh buněčné smrti indukované působení SNP a glukosy s glukosaoxidasou (donorový systém H_2O_2).

METODIKA

Chemikálie

Pokud není uvedeno jinak, všechny použité chemikálie byly v čistotě p. a. Kultivační media byla připravena z chemikálií dodaných firmou Duchefa Biochemie BV (Haarlem, Nizozemí). Media a roztoky byly připraveny rozpuštěním příslušných látek v deionizované vodě (18,2 M Ω , Demiwa, Watek, ČR).

Přístroje

Veškeré centrifugační procedury byly provedeny na centrifuze MR 22 (Jouan, USA). Pro měření fluorescence byl použit spektrofluorimetr RF 551 (Shimadzu, Japonsko). Absorbance byla měřena na spektrofotometru Anthelie (Secomam, Francie). Preparáty byly pozorovány na mikroskopu AX 70 (Olympus, Japonsko)

Buněčná suspenze BY-2

Suspenzní kultura tabáku linie BY-2 byla udržována v kapalném Murashige-Skoog mediu obohaceném sacharosou (30 g.l⁻¹), KH_2PO_4 (0,2 g.l⁻¹), thiaminem (1 mg.l⁻¹) a kyselinou 2,4-dichlorfenoxycetovou (0,2 mg.l⁻¹)⁷. Suspenze (20 ml) v 50 ml Erlenmeyerových baňkách byla umístěna na třepačce (Kühner Shaker, typ LT-W) za těchto kultivačních podmínek: tma, teplota 27±1°C, 135 ot.min⁻¹. Subkultivace byla prováděna po 3 nebo 4 dnech přenesením 2 resp. 1 ml suspenze do čerstvého media. Pro experimenty byla použita 3 dny stará kultura založená z 1 ml inokula.

Indukce buněčné smrti

Do alikvotů buněčné suspenze tabáku o objemu 20 ml byl přidán donor NO – SNP do výsledné koncentrace 0,5 mM a nebo donor H_2O_2 – glukosa s glukosaoxidasou (GGO) do výsledné koncentrace 0,5 mM a 0,5 IU.ml⁻¹⁸. Paralelně byl namísto SNP použit ferrikyanid draselný (PFC) o stejné koncentraci, který má analogickou strukturu jako SNP, ale neuvolňuje NO. Roztoky SNP a glukosaoxidasou byly připraveny bezprostředně před

použitím. Všechny zde uvedené roztoky byly před pipetováním do buněčné suspenze membránově sterilizovány (Puradisc 25 AS, 0,2 μm , Whatman, USA).

Test viability

Pro stanovení viability bylo použito modifikované dvojité barvení fluoresceindiacetátem (FDA) a propidiumjodidem (PI) ⁹. Vzorek kultury byl doplněn kapalným médiem na objem 50 μl a byl inkubován 5 min při pokojové teplotě s FDA (1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) a PI (20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) ¹⁰. Zastoupení živých (zeleně zbarvených) a mrtvých (červeně zbarvených) buněk bylo vyhodnoceno pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného pro širokopásmovou UV excitaci (kostka U-MWU).

Stanovení aktivity intracelulárních esteras

Intracelulární esterasy byly stanoveny fluoresceindiacetátovým testem ¹¹. Ve stručnosti: Vzorek suspenze byl 3x promyt 50 mM fofátovým pufrem (pH 8,7). Buněčná biomasa byla 10 min homogenizována s extrakčním pufrem (250 mM fosfát, pH 8,7, 1 mM dithiotreitol) na ledové lázni. Zbytky buněk byly odstraněny centrifugací (10000 g, 4 °C, 15 min.). Buněčný extrakt byl doplněn na 1 ml 1 M fosfátem (pH 8,7). Reakce byla zahájena přidávkem FDA do výsledné koncentrace 5 μM . Po 15 min. inkubace při 45 °C byla reakční směs zředěna do kyvety. Koncentrace vzniklého fluoresceinu byla detekována fluorimetricky při $\lambda_{\text{excitace}}$ 490 nm a λ_{emise} 514 nm. Aktivita esteras v IU (mezinárodní jednotka, 1 IU uvolní 1 μmol fluoresceinu za minutu při výše definovaných podmínkách) byla přepočítána na relativní hodnoty. 100% představuje nejvyšší aktivitu v daném experimentu.

MTT test

Do vzorku buněčné suspenze (0,5 ml) byl ihned po jeho odebrání přidán MTT do výsledné koncentrace 0,5 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$. Směs byla inkubována 1 h. na třepačce (120 ot.min⁻¹) při teplotě 25 °C. Po centrifugaci (360 g, 25 °C, 5 min) byl odstraněn veškerý supernatant. Formazan vzniklý redukcí MTT byl z peletu extrahován 1,5 ml isopropanolu po dobu 0,5 h za neustálého promíchávání směsi (třepačka, 120 ot.min⁻¹). Po skončení extrakce byl centrifugací (10000 g, 25 °C, 10 min.) získán čirý roztok formazanu. Jeho absorbance byla změřena při 570 nm ¹². Výsledky MTT testu byly přepočítány na relativní hodnoty. 100% představuje nejvyšší naměřenou absorbanci v daném experimentu.

Izolace DNA a detekce její fragmentace

DNA byla izolována modifikovanou CTAB metodou¹³. Ve stručnosti: K biomase buněk (100 – 500 mg) rozdrcené v kapalném dusíku byl přidán extrakční pufr (2 % cetyltrimethylamonium bromid - CTAB, 2 % polyvinylpyrrolidon, 100 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 8,0). Po roztátí byla směs převedena do mikrozkušavky a inkubována 40 min. při 65 °C. Následně byla 3x provedena extrakce směsí chloroform:fenol (9:1). DNA byla vysrážena přidávkem propan-2-olu v poměru 1:1. Pelet DNA získaný centrifugací (500 g, 25 °C, 5 min) byl promyt 70 % ethanolem a rozpuštěn v TE pufru (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8,0). Roztok byl inkubován 10 min s RNasou (výsledná koncentrace 40 µg.ml⁻¹) při 65 °C. Po skončení inkubace byl zopakován postup od extrakce směsí chloroform-fenol po rozpuštění DNA v TE pufru.

Na 1 % agarosový gel obsahující 0,1 µg.ml⁻¹ etidiumbromidu byl nanášen vždy 1 µg DNA v 5x ředěném dávkovacím pufru (50 % glycerol, 0,04 % bromfenolová modř). Elektroforéza probíhala 1 h při stejnosměrném napětí 70 V. DNA byla vizualizována pomocí systému GDS 8 000 (UVP, USA) řízeného programem Grab-IT 1.3 (UVP, USA). Pro kalibraci byl použit délkový marker 2-Log DNA Ladder (New England BioLabs, USA).

Detekce acidických kompartment

Do vzorku buněčné suspenze byla ihned po jeho odebrání přidána NR do výsledné koncentrace 0,033 %. Po 5 min. inkubaci při pokojové teplotě byly buňky pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu za použití širokopásmové excitace v modrém světle (kostka U-MWB).

Pozorování morfologie buněčných jader

Vzorek buněčné suspenze byl smíchán v poměru 1:1 s PEM puftrem (100 mM PIPES, 10 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, pH 6,9) obsahujícím 4 % formaldehydu¹⁴. Po 30 min. byly fixované buňky 3 krát promyty PEM puftrem a resuspendovány v PEM pufru s 0,1 % Tritonu X100 a 1 µg.ml⁻¹ Hoechst 22385. Buněčná jádra byla pozorována pomocí fluorescenčního mikroskopu při použití širokopásmové UV excitace (kostka U-MWU).

Pozorování morfologie buněk

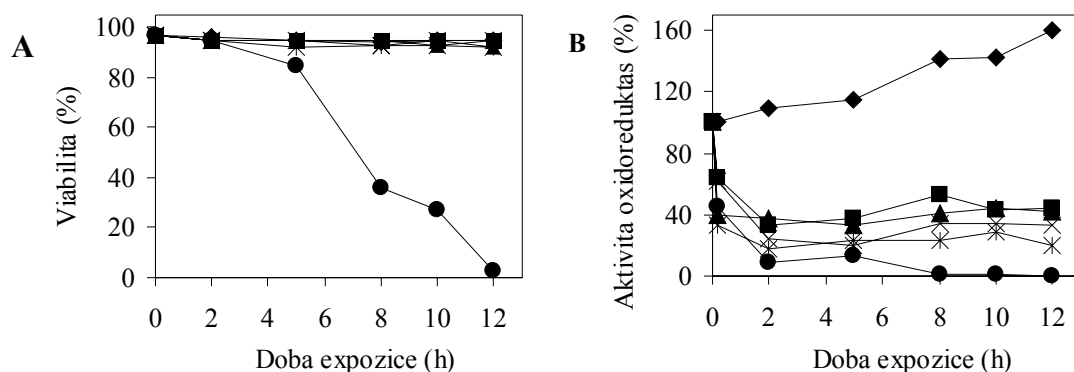
Vzorek suspenze byl 5 minut inkubován s FDA ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a pozorován pomocí fluorescenčního mikroskopu při použití: širokopásmové UV excitace (kostka U-MWU), fázového kontrastu, a světlého pole.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při kontaktu rostlin s nevirulentními patogeny (respektive jejich elicitory) se ukázalo, že rostliny v odezvě na tuto událost syntetizují NO^{4,15,16}. Dále bylo poukázáno na fakt, že souhra syntézy NO a AOS může indukovat buněčnou smrt³. Tento jev byl potvrzen i pomocí donoru NO a AOS^{3,5}, nicméně použitý donor NO - SNP může kromě NO uvolňovat i kyanid⁶ a blokovat tak energetický metabolismus buněk¹⁷.

Indukce buněčné smrti kombinací SNP a GGO

V našich experimentech jsme buněčnou smrt indukovali SNP a GGO (donor H_2O_2) viz. metodika. Paralelně byl použit i PFC, který je stejně jako SNP ferrikyanidová sloučenina, ale neuvolňuje NO. Samostatné působení SNP, PFC a GGO stejně jako spolupůsobení PFC a GGO v rámci 12 hodinového experimentu nevyvolalo buněčnou smrt. Naproti tomu současné působení SNP a GGO indukovalo vymírání buněk (Obr. 1A). Prostřednictvím MTT testu byla sledována aktivita buněčných oxidoreduktas. Veškeré aktivní složky (SNP, PFC a GGO) způsobily rychlý pokles aktivity těchto enzymů (Obr. 1B). Tento jev je pravděpodobně podmíněn poškozením respiračního řetězce, který je zdrojem elektronů k redukci MTT na barevný formazan¹², působením kyanidu a H_2O_2 . Pouze kombinace SNP a GGO vyvolala úplné vymizení aktivity oxidoreduktas (Obr. 1B), což je v souladu s pozorovaným vymíráním buněk (Obr. 1A). SNP tedy indukuje při spolupůsobení s H_2O_2 buněčnou smrt specificky prostřednictvím NO. Ferrikyanidová složka SNP ale významným způsobem poškozuje energetický metabolismus buněk.

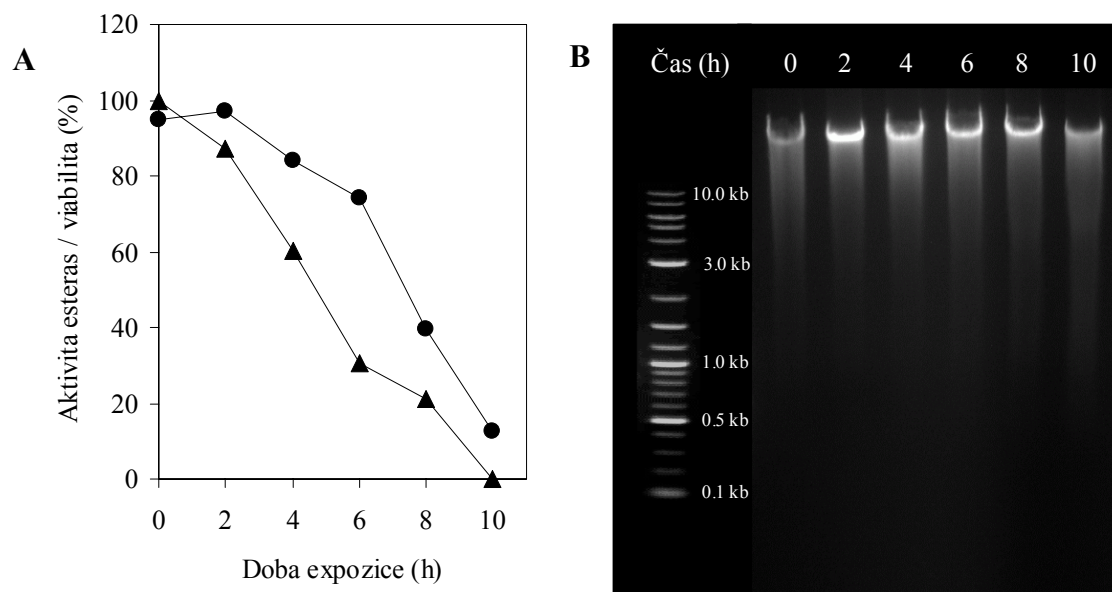


Obr. 1: Časový průběh viability (A) a relativní aktivity oxidoreduktas (B) buněk ovlivněných GGO (■), PFC (▲), SNP (×), PFC a GGO (*), SNP a GGO (●). Jako kontrolní varianta sloužila neovlivněná suspenze (◆).

Dále jsme se zabývali charakterizací buněčné smrti indukované SNP (0,5 mM) a GGO (0,5 mM glukosa s 0,5 IU.ml⁻¹ glukosaoxidasou).

Esterázová aktivita jako marker

V naší předchozí práci jsme zjistili, že intracelulární esterasy mohou sloužit jako marker počtu živých buněk a jejich metabolické aktivity^{11,18,19}. Proto jsme kromě viability sledovali aktivitu intracelulárních esterasy (Obr. 2A). Ta s dobou působení SNP a GGO klesala, avšak jiným způsobem než viability. Rozdíl mezi časovým vývojem viability a aktivity intracelulárních esterasy může být podmíněn charakterem obou metodik. Mikroskopické vyhodnocení životaschopnosti na úrovni jedné buňky představuje kvalitativní charakteristiku – buňka je živá nebo mrtvá. Zatímco stanovení esterasy v buněčném extraktu dokáže podchytit spojitou změnu enzymové aktivity a tak odhalit narušený metabolismus i když se buňky stále jeví jako živé.



Obr. 2: Časový průběh viability (●) a aktivity intracelulárních esteraz (▲). 100 % aktivity esteraz představuje 5.7×10^{-3} IU (A) Analýza fragmentace DNA pomocí gelové elektroforezy (B)

Vliv NO na DNA

Buněčná smrt v rámci biotického stresu, též nazývaná hypersenzitivní buněčná smrt, bývá obvykle označována jako programovaná. 0,5 mM SNP a 0,5 mM glukosa s 0,5 IU.ml⁻¹ glukosaoxidasu v buněčné suspenzi navozují podmínky podobné jako při hypersenzitivní reakci^{4,20}. Během programované buněčné smrti (PCD) obvykle dochází k degradaci DNA na oligonukleosomální fragmenty, deformaci buněčných jader a kondenzaci chromatinu²¹. Degradace DNA se sleduje pomocí gelové elektroforezy, kde se přítomnost oligonukleosomálních fragmentů (180 párů bazí) projeví typickým žebříkovitým vzorem²¹. Ve 2 h intervalech byly odebírány vzorky buněk ze suspenze ovlivněné SNP a GGO pro vyhodnocení fragmentace DNA a morfologie jader. Docházelo k velmi slabému a nespecifickému štěpení DNA (Obr. 1C).

Ovlivnění morfologie buněčných jader po působení NO

Morfologie buněčných jader byla sledována pomocí fluorescenční sondy (Hoechst 22385). V kontrolní variantě měla jádra pravidelný kulovitý tvar. Chromatin byl homogenní a uvnitř bylo dobře viditelné jádérko (Obr. 3A). Působením SNP a GGO došlo k celkové deformaci jádra a intenzivní kondenzaci chromatinu. Po 8 hodinách od zahájení experimentu obsahovala prakticky všechna jádra kondenzovaný chromatin. Přítomnost jader vykazujících znaky PCD je v rozporu s velmi slabou a nespecifickou fragmentací DNA.

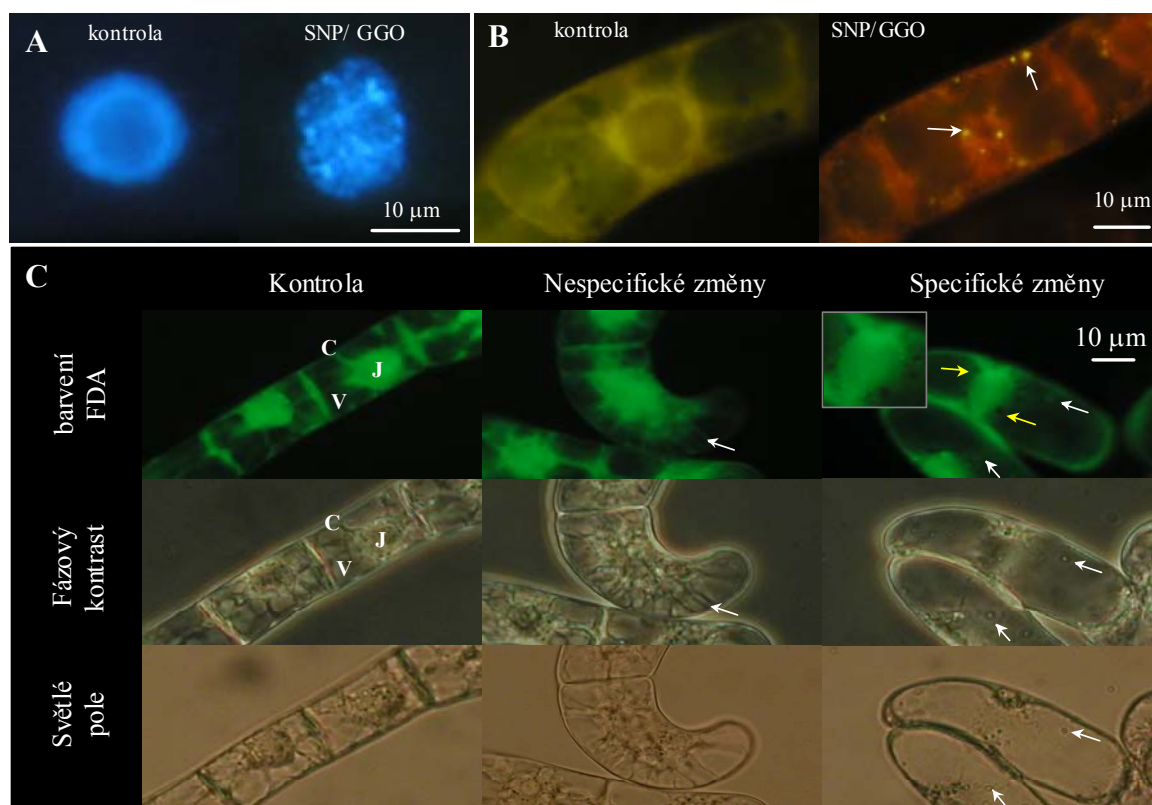
Hypersenzitivní buněčná smrt představuje velmi komplexní jev do kterého je zapojena řada signálních procesů. NO spolu s H_2O_2 sice vyvolává vymírání buněk, ale tato kombinace nemusí nutně spustit všechny události které jsou typické pro PCD.

Oxid dusnatý indukuje vznik kyselých kompartmentů

V buňkách ovlivněných SNP a GGO jsme se pokusili zjistit, zda je buněčná smrt provázána vznikem acidických kompartmentů. Pro tento účel jsme použili barvení neutrální červení (NR). NR představuje slabě bazickou látku. V živých buňkách se proto hromadí v kompartmentech o nízkém vnitřním pH, kde ji lze vizualizovat pomocí fluorescenčního mikroskopu ²². Po 4 – 6 h od zahájení experimentu bylo možné pozorovat vznik acidických kompartmentů v buňkách ovlivněných SNP a GGO (Obr 3B). Tyto kompartmenty mohou souviset s degradací obsahu buňky během buněčné smrti.

Vliv NO na morfologii BY-2 buněk

Pomocí fluorescenční mikroskopie a mikroskopie ve fázovém kontrastu a světlém poli jsme sledovali změny morfologie buněk. Neovlivněné buňky v exponenciální fázi růstu měly typický obdélníkový tvar a obsahovaly několik menších vakuol. V suspenzi ovlivněné SNP a GGO, ale i SNP, GGO, PFC a PFC společně s GGO se po 4 h objevovaly deformované buňky (do 5 %) se silně zvýšeným množstvím vakuol (Obr 3C). K tomuto dochází při působení různých stresových faktorů na buňky BY-2 (Víteček nepublikované výsledky). Pouze v suspenzi, která byla vystavena působení SNP a GGO většina buněk obsahovala snížené množství vakuol a nebo jen jednu vakuolu. Kromě toho se v buňkách vyskytovaly drobné váčky: negativně obarvené FDA v perinukleární oblasti cytoplazmy a pozitivně obarvené FDA pozorovatelné i ve fázovém kontrastu a světlém poli (Obr 3C). Identita těchto útvarů je nejasná, avšak může se jednat o struktury odvozené z endoplazmatického retikula, které jsou indukovatelné stresem ²³.



Obr. 3: Mikroskopické pozorování změn morfologie buněčných jader – barvení Hoechst 22385(A), vzniku acidických kompartment – barvení neutrální červení (B) a morfologie buněk; C – cytoplazma, J – jádro, V – vakuola, žlutá šipka označuje negativně obarvené váčky, bílá pozitivně obarvené (C) v buňkách ovlivněných SNP a GGO. Jendotlivé snímky ukazují typické příklady.

ZÁVĚR

SNP při spolupůsobení s GGO indukuje buněčnou smrt specificky prostřednictvím NO, ale ferrikyanidová složka SNP ovlivňuje experimentální systém. Buněčná smrt je provázena kondenzací chromatinu jádra ale nedochází degradaci DNA na oligonukleosomální fragmenty typické pro PCD. Uvnitř buněk se objevují acidické kompartmenty, které mohou souviset s destrukcí buněčného obsahu. Změna morfologie buněk zahrnuje jak nespecifickou odezvu na stres tak i specifický projev SNP a GGO, kdy se snižuje počet vakuol a v cytoplazmě se objevují drobné váčky.

Poděkování

Príspevek vznikl za podpory FRVŠ 180/2004, IGA MZLU 3/2004, IGA FaF VFU IG342012, GAČR č. 525/04/P132 a Národního výzkumného centra LN00A081

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Mayer, B. & Hemmens, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 477-481 (1997).
- Leshem, Y. Y. *Nitric Oxide in Plants Occurrence, Function and Use* (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000).
- Delledonne, M. et al. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 605-610 (2002).
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. & Lamb, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588 (1998).
- de Pinto, M. C., Tommasi, F. & De Gara, L. Changes in antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol.* **130**, 698-708 (2002).
- Wang, P. G. et al. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem. Rev.* **102**, 1091-1134 (2002).
- Nagata, T., Nemoto, Y. & Hasegawa, S. Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell line in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol* **132**, 1-30 (1992).
- Pinto, M. C., Tommasi, F. & Gara, L. Changes in antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol.* **130**, 698-708 (2002).
- Jones, K. H. & Senft, J. A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 77-79 (1985).
- Mlejnek, P. & Prochazka, S. Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* **215**, 158-166 (2002).
- Víteček, J. et al. Single cell fluorimetric assay: attomole level detection of esterases. *V přípravě*.
- www.sigmaaldrich.com. (2004).
- Murray, M. G. & Thompson, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**, 4321-4325 (1980).

- Callard, D., Aselos, M. & Mazzolini, L. Novel Molecular Markers for Late Phases of the Growth Cycle of *Arabidopsis thaliana* Cell-Suspension Cultures Are Expressed during Organ Senescence. *Plant Physiol.* **112**, 705 (1996).
- Durner, J., Wendehenne, D. & Klessig, D. F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10328-10333 (1998).
- Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C. & Durner, J. *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst i tobacco. *Plant J.* **23**, 817-824 (2000).
- Stryer, L. *Biochemitry* (W. H. Freeman and Company, New York, 1998).
- Víteček, J. et al. Esterases as a marker for growth of BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of the Norway spruce. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **In press** (2004).
- Víteček, J., Kizek, R., Petřek, J., Vacek, J. & Havel, L. in *VIII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů* (eds. Wimmerová, M., Beneš, P., Trnková, L. & Zbořil, P.) (Masarykova univerzita v Brně, Brno, 2004).
- Víteček, J., Kizek, R. & Havel, L. in *Cell biology of nitric oxide and cell death in plants* (ed. Blume, Y. B.) 49 (Institute of Cell Biology and Genetic Engineering (Kyiv), Natl Academy of Sciences, Institute of Semiconductor Physics (Kyiv), Natl Academy of Sciences, Natl Sci. Center Of Medical and Biotechnical Problems (Kyiv), Natl Academy of Sciences, Yalta, Ukraine, 2004).
- Havel, L. & Durzan, D. J. Apoptosis in plants. *Bot. Acta* **109**, 268–277 (1996).
- www.molecularprobes.com. (2004).
- Matsushima, R. et al. An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* **130**, 1807–1814 (2002).