

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**CENTRUM REGIONU HANÁ
PRO BIOTECHNOLOGICKÝ A ZEMĚDĚLSKÝ VÝZKUM**

ODDĚLENÍ BIOFYZIKY

DISERTAČNÍ PRÁCE

**VLIV BIOTROFNÍCH HOUBOVÝCH
PATOGENŮ NA FOTOSYNTÉZU
HOSTITELE**

JITKA PROKOPOVÁ

**OLOMOUC
2012**

Obsah

Seznam publikací.....	1
Prohlášení.....	2
Životopis.....	3
Souhrn.....	8
Abstract.....	10
1. Přehled problematiky.....	12
1.1. Vliv biotrofních patogenů na hostitele	12
1.2. Role cytokininů během interakce hostitel-patogen.....	18
1.3. Vliv exogenní aplikace cytokininů na patogenezi.....	23
1.4. Role teplotního stresu během interakce hostitel-patogen.....	26
2. Seznam použité literatury.....	29
3. Cíle práce.....	38
4. Přehled publikovaných výsledků.....	39
4.1. Rozmanitost obranných mechanismů při interakci rostlin s oomycety: přehled o <i>Lactuca</i> spp. a <i>Bremia lactucae</i>	39
4.2. Změny ve fotosyntéze listových disků salátu způsobené plísní salátovou v kombinaci s exogenní aplikací cytokininů.....	39
4.3. Vliv <i>meta</i> -topolinu na optické vlastnosti listových disků salátu infikovaných <i>Bremia lactucae</i>	43
4.4. Změny ve fotosyntéze rostlin druhu <i>Lycopersicon</i> vyvolané padlím rajčatovým v kombinaci s teplotním šokem	45
5. Přílohy.....	49

Seznam publikací

Tato práce je založena na následujících publikacích:

1. **Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae***
A. Lebeda, M. Sedlářová, M. Petřivalský, **J. Prokopová**
European Journal of Plant Pathology (2008) 122: 71-89.
2. **Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment**
J. Prokopová, M. Špundová, M. Sedlářová, A. Husičková, R. Novotný, K. Doležal, J. Nauš, A. Lebeda
Plant Physiology and Biochemistry (2010) 48: 716-723.
3. **The effect of *meta*-topolin on optical parameters of lettuce leaf discs infected by *Bremia lactucae***
J. Prokopová, J. Nauš, M. Špundová, M. Sedlářová.
In: Lebeda A. and Spencer-Phillips P.T.N. (Eds.): Advances in downy mildew research, Vol. 3. Univerzita Palackého v Olomouci a Jola, v.o.s. Kostelec na Hané (2007) str. 73 – 78.
4. **Changes in photosynthesis of *Lycopersicon* spp. plants induced by tomato powdery mildew infection in combination with heat shock pre-treatment**
J. Prokopová, B. Mieslerová, V. Hlaváčková, J. Hlavinka, A. Lebeda, J. Nauš, M. Špundová
Physiological and Molecular Plant Pathology (2010) 74: 205-213.

Prohlášení

Prohlašuji, že můj podíl na přípravě publikací byl následující:

1. Spoluautor – podíl na shromáždění dat a přípravě manuskriptu (20%).
2. Hlavní autor – podíl na přípravě experimentu (40%), měření (příprava rostlinného materiálu a aplikace cytokininů, měření chlorofylové fluorescence, měření obsahu fotosyntetických pigmentů), diskuzi výsledků (50%), sepsání manuskriptu (60%).
3. Hlavní autor – podíl na měření (příprava rostlinného materiálu a aplikace cytokininů, měření obsahu fotosyntetických pigmentů), sepsání manuskriptu (30%).
4. Hlavní autor – podíl na přípravě experimentu (60%), měření (měření chlorofylové fluorescence, měření obsahu fotosyntetických pigmentů, měření výměny plynů listu – 40%), diskuzi výsledků (70%), příprava manuskriptu (60%).

Souhlas s tímto prohlášením udílí jménem všech spoluautorů publikací

prof. RNDr. Jan Nauš, CSc.

prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.

Poděkování

Děkuji své vedoucí Martině Špundové nejen za cenné rady a pomoc, ale především za neutuchající podporu a povzbuzení během celého mého studia. Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z oddělení biofyziky a botaniky za spolupráci. Poděkování patří též mé rodině a příteli, bez jejichž podpory bych se do doktorátu nikdy nepustila.

V Humpolci, 23.4. 2012

Jitka Prokopová, autor

Životopis

Jitka Prokopová

datum narození: 9. 3. 1982
bydliště: Rozkoš 94, 39601 Humpolec, Česká republika
telefon: +420724862444
e-mail: prokopova.jita@seznam.cz

Zaměstnání

2010 – dosud Datamanažer a hlavní školitel
Nemocnice Pelhřimov, Oddělení hematologie a transfuziologie

2008 – 2009 Vědecký pracovník
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta

Vzdělání

2005 – dosud Postgraduální studium na téma: Vliv biotrofních houbových patogenů na fotosyntézu hostitele. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, obor biofyzika.

2000 – 2005 Magisterské studium oboru Biofyzika a chemická fyzika (zakončené státní závěrečnou zkouškou a diplomovou prací na téma: Vliv vybraných růstových látek na průběh patogenní infekce). Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.

Odborné stáže

04/2009 – 06/2009 Department of Crop Protection (Phytopathology lab) -
Ghent University, Belgie

Účast na projektech

2007 Grant č. 1652/G4/2007: „Příprava praktické úlohy pro měření vývinu kyslíku na listu neporušené rostliny“ (spoluřešitel)

2008 – dosud Grant č. 522/08/H003: "Integrace doktorských studií biochemie, rostlinné fyziologie a biofyziky"

2005 – dosud Výzkumný záměr č. MSM 6198959215: "Variabilita složek a interakcí v rostlinném patosystému a vliv faktorů prostředí na jejich projev"

Publikace

1. Špundová M., **Prokopová J.**, Sedlářová M., Výtisková M., Vlčková A. (2005): Vliv exogenní aplikace cytokininů na patogenezi *Bremia lactucae* a fotosyntetické parametry hostitelské rostliny. Ve sborníku příspěvků konference „Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2005“, Praha, Česká republika, 302-308.
2. **Prokopová J.**, Nauš J., Špundová M., Sedlářová M. (2007): The effect of *meta*-topolin on optical parameters of lettuce leaf discs infected by *Bremia lactucae*. V: Lebeda A. and Spencer-Phillips P.T.N. (Eds.): Advances in downy mildew research, Vol. 3. Univerzita Palackého v Olomouci a Jola, v.o.s. Kostelec na Hané (2007) str. 73 – 78.
3. Lebeda A., Sedlářová M., Petřivalský M., **Prokopová J.** (2008): Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae*. European Journal of Plant Pathology 122: 71-89.
4. **Prokopová J.**, Špundová M., Sedlářová M., Husičková A., Novotný R., Doležal K., Nauš J., Lebeda A. (2010): Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. Plant Physiology and Biochemistry 48: 716-723.
5. **Prokopová J.**, Mieslerová B., Hlaváčková V., Hlavinka J., Lebeda A., Nauš J., Špundová M. (2010): Changes in photosynthesis of *Lycopersicon* spp. plants induced by tomato powdery mildew infection in combination with heat shock pre-treatment. Physiological and Molecular Plant Pathology 74: 205-213.
6. Nauš J., **Prokopová J.**, Řebíček J., Špundová M. (2010): SPAD-502 chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement. Photosynthesis Research 105: 265-271.
7. Kyseláková H., **Prokopová J.**, Nauš J., Novák O., Navrátil M., Šafářová D., Špundová M., Ilík P. 2011: Photosynthetic alterations of pea leaves infected systemically by pea enation mosaic virus: A coordinated decrease in efficiencies of CO₂ assimilation and photosystem II photochemistry. Plant Physiology and Biochemistry 49: 1279-1289.

Příspěvky na konferencích

1. Špundová M., **Prokopová J.**, Sedlářová M., Výtisková M., Vlčková A. (2005): Vliv exogenní aplikace cytokininů na patogenezi *Bremia lactucae* a fotosyntetické parametry hostitelské rostliny. Poster na konferenci „Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2005“, Praha, Česká republika.

2. Sedlářová M., Výtisková M., Doležal K., Špundová M., Vlčková A., **Prokopová J.**, Lebeda A. (2005): Treatment with cytokinins delays chlorophyll degradation induced by *Bremia lactucae* pathogenesis on host *Lactuca* spp.. Poster na konferenci „Auxins and cytokinins in plant development“, Praha, Česká republika.
3. **Prokopová J.**, Nauš J., Sedlářová M., Špundová M. (2007): The effect of *meta*-topolin on optical parameters of lettuce leaf discs infected by *Bremia lactucae*. Poster na konferenci 2nd International Downy Mildews Symposium, Olomouc, Česká republika.
4. **Prokopová J.**, Špundová M., Sedlářová M., Husičková A., Doležal K., Nauš J., Lebeda A. (2007): Vliv cytokininů na změny fotosyntetického aparátu salátu (*Lactuca sativa* L.) vyvolané plísní salátovou (*Bremia lactucae* Regel). Poster a abstrakt ve sborníku konference „Konference experimentální biologie rostlin aneb 11. dny fyziologie rostlin“, Olomouc, Česká republika.
5. Kyseláková H., **Prokopová J.**, Sušila P., Macháčková E., Nauš J. (2007): Změny v optických a fotosyntetických parametrech listu ibišku vyvolané napadením mšicemi. Poster a abstrakt ve sborníku konference „Konference experimentální biologie rostlin aneb 11. dny fyziologie rostlin“, Olomouc, Česká republika.
6. Kyseláková H., **Prokopová J.**, Nauš J., Kubala M., Ilík P., Navrátil M. (2007): Změny ve fyziologii a fotosyntetických parametrech hrachu (*Pisum sativum* L. cv. Merkur) vyvolané působením výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV). Poster a abstrakt ve sborníku konference „Konference experimentální biologie rostlin aneb 11. dny fyziologie rostlin“, Olomouc, Česká republika.
7. **Prokopová J.**, Mieslerová B., Piterková J., Hlaváčková V., Hlavinka J., Špundová M. (2008): Effect of heat shock pre-treatment of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* cv. Amateur) on their resistance to biotrophic pathogen (*Oidium neolycopersici*) infection. Poster a abstrakt ve sborníku konference „International Conference on biotic plant interactions“, Brisbane, Austrálie.
8. Kyseláková H., **Prokopová J.**, Ilík P., Piterková J., Luhová L., Sedlářová M., Novák O., Navrátil M. (2008): Photosynthetic and oxidative responses of pea leaves to progressive infection due to *Pea enation mosaic virus* (PEMV). Poster a abstrakt ve sborníku konference „International Conference on biotic plant interactions“, Brisbane, Austrálie.

9. Hlavinka J., Hlaváčková V., **Prokopová J.**, Mieslerová B., Špundová M., Piterková J., Luhová L., Novák O., Lebeda A., Nauš J. (2010): Effect of heat shock pretreatment of tomato plants (*Lycopersicon chmielewskii*) on their interaction with biotrophic pathogen (*Oidium neolycopersici*). Poster a abstrakt ve sborníku konference "The 15th International Congress of Photosynthesis", Beijing, China.

Citace

1. Beharav A., Ben-David R., Doležalová I., Lebeda A. (2008): Eco-geographical distribution of *Lactuca saligna* natural populations in Israel. Israel Journal of Plant Sciences 56: 195-206. (citován článek č. 3)
2. Lebeda A., Doležalová I., Křístková E., Kitner M., Petrželová I., Mieslerová B., Novotná A. (2008): Wild *Lactuca* germplasm for lettuce breeding: current status, gaps and challenges. Euphytica 170: 15-34. (citován článek č. 3)
3. Lebeda A., Kitner M., Dziechciarková M., Doležalová I., Křístková E., Lindhout P. (2009): An insight into the genetic polymorphism among European populations of *Lactuca serriola* assessed by AFLP. Biochemical Systematics and Ecology 37: 597-608. (citován článek č. 3)
4. Beharav A., Ben-David R., Malarz J., Stojakowska A., Michalska K., Doležalová I., Lebeda A., Kisiel W. (2010): Variation of sesquiterpene lactones in *Lactuca aculeata* natural populations from Israel, Jordan and Turkey. Biochemical Systematics and Ecology 38: 602-611. (citován článek č. 3)
5. Cohen Y., Rubin A., Kilfin G. (2010): Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL-beta-amino-butyric acid (BABA). European Journal of Plant Pathology 126: 553-573. (citován článek č. 3)
6. Rolfe S.A., Scholes J.D. (2010): Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. Protoplasma 247: 163-175. (citován článek č. 4)
7. Cohen Y., Rubin A.E., Vaknin M. (2011): Post infection application of DL-3-amino-butyric acid (BABA) induces multiple forms of resistance against *Bremia lactucae* in lettuce. European Journal of Plant Pathology 130: 13-27. (citován článek č. 3)
8. El-Jendoubi H., Melgar J.C., Alvarez-Fernandez A., Abadia A., Abadia J. (2011): Setting good practices to assess the efficiency of iron fertilizers. Plant Physiology and Biochemistry 49: 483-488. (citován článek č. 6)
9. Lebeda A., Cohen Y. (2011): Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*)-biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. European Journal of Plant Pathology 129: 157-192. (citován článek č. 3)

10. Lebeda A., Mieslerová B. (2011): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum sensu stricto*). Plant Pathology 60: 400-415. (citován článek č. 3)
11. Li H., Ge X., Han S., Sivasithamparam K., Barbetti M.J. (2011): Histological responses of host and non-host plants to *Hyaloperonospora parasitica*. European Journal of Plant Pathology 129: 221-232. (citován článek č. 3)
12. Ling Q., Huang W., Jarvis P. (2011): Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. Photosynthesis Research. 107 (2): 209-214. (citován článek č. 6)
13. Sedlářová M., Petřivalský M., Piterková J., Luhová L., Kočřířová J., Lebeda A. (2011): Influence of nitric oxide and reactive oxygen species on development of lettuce downy mildew in *Lactuca* spp. European Journal of Plant Pathology. 129 (2): 267-280. (citován článek č. 3)
14. Djebali N., Mhadhbi H., Lafitte C., Dumas B., Esquerre-Tugaye M.T., Aouani M.E., Jacquet C. (2011): Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces euteiches*. European Journal of Plant Pathology 131, 559-571. (citován článek č. 3)
15. Pineda M., Olejníčková J., Csefalvay L., Baron M. (2011): Tracking viral movement in plants by means of chlorophyll fluorescence imaging. Journal of Plant Physiology 168, 2035-2040. (citován článek č. 4)
16. As-sadi F., Carrere S., Gascuel Q., Hourlier T., Rengel D., Le Paslier M.C., Bordat A., Boniface M.C., Brunel D., Gouzy J., Godiard L., Vincourt P. (2011) Transcriptomic analysis of the interaction between *Helianthus annuus* and its obligate parasite *Plasmopara halstedii* shows single nucleotide polymorphisms in CRN sequences. BMC Genomics 12, Article Number 498. (citován článek č. 3)
17. Li C.W., Faino L., Dong L., Fan J.M., Kiss L., De Giovanni C., Lebeda A., Scott J., Matsuda Y., Toyoda H., Lindhout P., Visser R.G.F., Bonnema G., Bai Y.L. (2012): Characterization of polygenic resistance to powdery mildew in tomato at cytological, biochemical and gene expression level. Molecular Plant Pathology 13: 148-159. (citován článek č. 5)
18. Murti R.H., Kim H.Y., Yeoung Y.R. (2012): Morphological and anatomical characters of ploidy mutants of strawberry. Internatioanl Journal of Agriculture and Biology 14, 204-210. (citován článek č. 6)

Souhrn

Rostlinné patogeny můžeme dělit do různých kategorií na základě řady kritérií. Jedním z nich je strategie získávání potravy. Biotrofní patogeny získávají živiny z živých buněk hostitelské rostliny. Protože napadají celou řadu rostlin včetně významných plodin, má studium jejich interakcí s hostitelem velký význam nejen pro pochopení jejich životního cyklu, ale především pro možnost nalézt účinné obranné mechanismy proti těmto patogenům. Teprve nedávno se výzkum interakce hostitel-patogen hlouběji zaměřil na změny v primárním metabolismu hostitele a na jejich příčiny. V předkládané práci byly studovány změny ve fotosyntéze napadené rostliny způsobené biotrofními patogeny. Konkrétně byly sledovány dva biotrofní patogeny - *Bremia lactucae* Regel (rasa BL 16) způsobující plíseň salátovou a *Oidium neolycopersici* způsobující padlí rajčatové.

Suspenze *B. lactucae* byla aplikována na listové disky náchylného genotypu salátu *Lactuca sativa* L. cv. Cobham Green. Po třináctidenní inkubaci při dvou světelných intenzitách byly sledovány změny ve fotosyntéze především pomocí měření chlorofylové fluorescence. U náchylného genotypu salátu napadeného plísní salátovou došlo k poklesu obsahu fotosyntetických pigmentů, poklesu maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II, inhibici elektronového transportu a nárůstu nefotochemického zhášení. Pokud byly 24 hodin před inokulací listové disky ošetřeny fytohormony ze skupiny cytokininů - benzylaminopurinem a *meta*-topolinem, bylo zaznamenáno potlačení sporulace patogenu. Avšak dlouhodobější působení cytokininů na listové disky vedlo k podobným změnám fotosyntetických parametrů, jaké způsobila v neošetřených listech sama infekce.

Původce padlí rajčatového *Oidium neolycopersici* byl aplikován na dva genotypy rajčete – náchylný *Lycopersicon esculentum* cv. Amateur a středně rezistentní *Lycopersicon chmielewskii*. V průběhu prvních devíti dní po inokulaci byly pomocí chlorofylové fluorescence a gazometrického měření sledovány změny ve fotosyntéze. Napadení patogenem způsobilo u obou genotypů pouze minimální inhibici fotosyntetických procesů. Ošetření rostlin náchylného genotypu rajčete teplotním šokem (40,5°C, 2 hod) aplikovaným před inokulací vedlo ke zvýšení náchylnosti rostlin k padlí rajčatovému, což se projevilo urychlením zasychání a

opadu listů a inhibicí fotosyntetických procesů. U středně rezistentního genotypu *Lycopersicon chmielewskii* teplotní šok nezpůsobil významné změny v rezistenci rostliny.

Předpokládáme, že ve studovaných modelových systémech jsou změny ve fotosyntéze hostitelů během infekce spojeny s inhibicí Calvinova cyklu způsobenou nárůstem aktivity invertázy a následnou akumulací asimilátů v infikovaném pletivu.

Výsledky prezentované v této práci byly získány při řešení výzkumného záměru č. MSM 6198959215 s názvem "Variabilita složek a interakcí v rostlinném patosystému a vliv faktorů prostředí na jejich projev", grantu č. 522/08/H003 s názvem "Integrace doktorských studií biochemie, rostlinné fyziologie a biofyziky" a projektu OP VaVpI "Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum" (ED0007/01/01).

Abstract

Plants pathogens could be divided into many categories based on different markers. One of them is based on the feeding strategy. Biotrophic pathogens are dependent on the host live cells as a source of the nutrients. This type of pathogens uses wide range of plants including important crops. So studying of these pathogens and their interactions with the plants are essential not only for knowledge about their lifestyle but also for the possibility to find effective protection of the host plants. Recently more attention has been paid to alterations of primary metabolism of host plants induced by pathogenesis and their causes. This work is focused on the investigation of changes in host photosynthesis caused by biotrophic pathogens. Specifically two pathogens were studying - *Bremia lactucae* Regel (race BL 16) and *Oidium neolycopersici*.

B. lactucae suspension was applied on the leaf discs of the susceptible lettuce genotype *Lactuca sativa* L. cv. Cobham Green. Changes in photosynthesis were studied mainly by the chlorophyll fluorescence imaging after thirteen days-long incubation under two intensities of illumination. Reduction in photosynthetic pigment content, decrease of the maximum quantum yield of photosystem II photochemistry, inhibition of electron transport and increase in non-photochemical quenching was noticed in the leaf discs infected by *B. lactucae*. Applications of two cytokinins – benzylaminopurine and *meta*-topolin 24 hours before inoculation retarded the pathogens asexual reproduction. However, long-lasting treatment of healthy tissues by cytokinins caused similar changes in photosynthetic parameters as infection.

Two tomato plants genotype – susceptible *Lycopersicon esculentum* cv. Amateur and moderately resistant *Lycopersicon chmielewskii* were inoculated by *Oidium neolycopersici*. Changes in photosynthesis parameters measured mainly by chlorophyll fluorescence imaging and CO₂ exchange measurement were investigated during first 9 days after inoculation. In both genotypes infection caused only minimal inhibition of the photosynthetic processes. Heat-shock treatment of the susceptible tomato plants right before inoculation (40,5°C, 2 hours) led to increase of the plant susceptibility which was associated with accelerated chloroses/necroses development

and defoliation and also inhibition of the photosynthetic processes. There were no remarkable changes in plant resistance of the moderately resistant genotype caused by heat-shock pre-treatment.

We hypothesise that the changes in hosts photosynthesis in the studied plant-pathogen interactions are associated with Calvin cycle inhibition caused by the increase of the invertase activity following by assimilates accumulation.

The work was supported by the following grants: grant no. MSM 6198959215 from the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic, grant no. 522/08/H003 from the Grant Agency of the Czech Republic and project Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agriculture Research (ED0007/01/01).

1. Přehled problematiky

Pojem patogen označuje buněčný či nebuněčný organismus, který způsobuje chorobu na jednom nebo více hostitelích. Rostlinné patogeny používají různé životní strategie, podle kterých je můžeme dělit do několika kategorií. Podle způsobu výživy se patogeny dělí na biotrofní, hemibiotrofní a nekrotrofní. Zatímco biotrofní způsob výživy vyžaduje živé hostitelské buňky, na něž je patogen nutričně vázán, nekrotrofní patogeny nejdříve hostitelské buňky usmrtí a následně z nich získávají živiny. Mezistupněm jsou hemibiotrofní patogeny, u nichž se během života mohou objevit oba způsoby výživy: nejprve žijí jako biotrofové a s postupující infekcí se mění na nekrotrofy či saprotrofy, které čerpají anorganické látky z rozložené nebo odumřelé organické hmoty rostlin a živočichů (Ashby 2000).

Rostliny jsou vůči většině rostlinných patogenů imunní a pouze vůči úzké škále patogenů jsou náchylné (Dangl a Jones 2001). Specifičnost vztahu hostitel – patogen lze dělit do dvou základních typů – inkompatibilita (nehostitelská rezistence, kdy jde o naprostou neslučitelnost rostliny a mikroorganismu) a kompatibilita (hostitelská rezistence/náchylnost). Kompatibilní interakce je řízena specifickými mechanismy a často je spojená s morfologickými, anatomickými a metabolickými změnami v hostitelské rostlině. Během těchto interakcí bývá zatížen energetický metabolismus rostliny, který musí pokrýt zvýšenou spotřebu energie rostliny v důsledku aktivace obranných reakcí a v případě rozvoje patogenu i jeho energetické nároky.

1.1. Vliv biotrofních patogenů na hostitele

Biotrofní houby patří mezi ekonomicky významné patogeny, protože způsobují velké ztráty u kulturních rostlin. Jejich interakce s hostitelem vyvolávají celou kaskádu biochemických, fyziologických a morfologických procesů, jež se mohou projevit různými způsoby v závislosti na druhu patogenu i hostitele (Wright a kol. 1995a, Scholes a Rolfe 1996, Chou a kol. 2000). Rozdílné jsou již základní mechanismy napadení hostitele. Zatímco většina typů padlí napadá pouze epidermální buňky hostitelské rostliny, ze kterých prostřednictvím haustorií čerpá živiny, rzi nebo plísně oproti tomu napadají kromě epidermálních buněk i buňky

mezofylu a pochev cévních svazků a mají tak přímější přístup ke zdroji živin. Přesto existují určité podobnosti ve vývoji infekce u různých druhů biotrofních patogenů a jejich hostitelů a změny v jednotlivých procesech během vývoje patogenu vykazují u různých systémů řadu shodných znaků.

Veškeré změny způsobené interakcí hostitel-patogen jsou energeticky náročné (Essmann a kol. 2008). Biotrofní patogen představuje pro hostitelskou rostlinu dalšího spotřebitele energie, potažmo asimilátů, které využívá pro svůj vývoj. Další nárůst spotřeby energie je spojen se snahou rostliny spustit obranné reakce. Dochází ke změnám ve tvorbě asimilátů, jejich transportu a distribuci (Walters 1985, Hall a Williams 2000). Z výše uvedených důvodů hraje při napadení rostlin biotrofními patogeny velmi důležitou roli fotosyntéza.

Obecně lze říci, že patogeny způsobují pokles rychlosti fotosyntézy v napadených orgánech a až na výjimky v průběhu infekce rychlost fotosyntézy postupně klesá. Pokles rychlosti fotosyntézy s rozvojem choroby zaznamenali např. Tang a kol. (1996), kteří studovali vliv biotrofní rzi *Albugo candida* na listy *Arabidopsis thaliana*, nebo Moriondo a kol. (2005) v případě vinné révy (*Vitis vinifera*) napadené plísní *Plasmopara viticola*. Také napadení ovsa (*Avena sativa* L.) biotrofním patogenem *Puccinia coronata* vedlo k výraznému poklesu rychlosti fotosyntézy s rozvojem infekce (Scholes a Rolfe 1995). Jedenáct dní po inokulaci došlo k poklesu rychlosti fotosyntézy na 13% hodnoty zdravých listů. Manter (2002) pozoroval pokles maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II v infikovaných jehlicích semenáčku douglasky (*Pseudotsuga menziesii*) patogenem *Phaeocryptopus gaeumannii*. Pokles tohoto parametru byl pozorován i v rostlinách napadených biotrofními houbami *Albugo candida* (Chou a kol. 2000) a *Blumeria graminis* (Swarbrick a kol. 2006). Inhibice fotosyntézy tedy byla zaznamenána celou řadou autorů u různých druhů infikovaných rostlin (Gordon a Duniway 1982, Wright a kol. 1995b, Lebeda a kol. 2008) a příčin může být hned několik.

Během napadení často dochází k redukci funkční listové plochy (Moriondo a kol. 2005): u některých typů biotrofních infekcí je povrch napadených listů pokryt myceliem (Yurina a kol. 1996), což snižuje příjem fotosynteticky aktivního záření. Dále často dochází ke vzniku chloróz a nekrotických oblastí a to jak u náchylných, tak u rezistentních rostlin, což může vést až k opadu listů a tím ztrátě asimilující listové

plochy. U některých patogenů byl naopak zaznamenán vznik tzv. zelených ostrůvků (Allen 1942, Scholes a Farrar 1985, 1986, Roberts a Walters 1988), ve kterých dochází k akumulaci chlorofylů. Ty však nemusejí být fotosynteticky aktivní (Allen 1942). I ve struktuře uvnitř listů může docházet ke změnám. Šíření patogenu uvnitř hostitele bývá spojeno s redukcí počtu chloroplastů a se změnami jejich ultrastruktury, dochází k poklesu obsahu fotosynteticky aktivních pigmentů (Ahmad a kol. 1983, Scholes a kol. 1994, Tang a kol. 1996, Sabri a kol. 1997) a k následnému snížení příjmu světelných excitací (Bechtold a kol. 2005). Nicméně někteří autoři změnu obsahu chlorofylů během napadení nezaznamenali (Scholes a Farrar 1987).

Scholes a Rolfe (1995) uvádějí, že biotrofní patogeny mohou ovlivnit také výměnu plynů v listu. Toto tvrzení koresponduje s pozorovaným uzavíráním stomat vlivem patogenu (Peterson a Aylor 1995), které vede k redukcí vtoku CO₂ do listu (Gordon a Duniway 1982, Manter a kol. 2002) a ke snížení intercelulární koncentrace CO₂ (Ayres 1976). Pokles asimilace CO₂ zaznamenali např. Scholes a Rolfe (1996) u listů ovsa (*Avena sativa* L.) infikovaného *Puccinia coronata*. Naopak Bassanezi a kol. (2002) nenaměřili u listů fazole (*Phaseolus vulgaris* L.) infikovaných rzí *Uromyces appendiculatus* žádné změny ve stomatální vodivosti a transpiraci. S poklesem rychlosti fotosyntézy bývá spojen také nárůst respirace a fotorespirace (Allen a Goddard 1938, Bushnell a Allen 1962, Farrar a Rayns 1987, Berger a kol. 2007). Nutno poznamenat, že částečný podíl na tomto nárůstu může mít i respirace samotného patogenu (Allen a Goddard 1938, Bushnell a Allen 1962).

Další možnou příčinou inhibice fotosyntetických reakcí během rozvoje infekce může být pokles funkčnosti elektronového transportního řetězce. V některých pracích byl zaznamenán pokles rychlosti necyklického elektronového transportu (např. Scott a Smillie 1966, Montalbini a Buchanan 1974, Magyarosy a kol. 1976). Montalbini a Buchanan (1974) nebo Magyarosy a kol. (1976) zaznamenali během napadení rostlin bobu (*Vicia faba* L.) rzí (*Uromyces viciae-fabae*) a cukrové řepy (*Beta vulgaris* L.) padlím (*Erysiphe graminis* DC) inhibici necyklické fosforylace v izolovaných chloroplastech. Dále byl s rozvojem infekce zaznamenán pokles obsahu komponent elektronového transportního řetězce (Montalbini a kol. 1981, Holloway a kol. 1992, Scholes a Rolfe 1996). Magyarosy a

Malkin (1978) naměřili pokles aktivity a obsahu několika cytochromů (f, b₆, b_{559LP}, b_{599HP}) zhruba o třetinu v listech řepy infikovaných padlím (*Erysiphe polygoni*).

Během řady interakcí hostitel-patogen byl s poklesem rychlosti fotosyntetického elektronového transportu současně zaznamenán nárůst fotochemického i nefotochemického zhášení, většinou v infikovaných listech, případně v přímo napadených částech listu (Koch a kol. 1994, Bechtold a kol. 2005). Scholes a Rolfe (1996) pozorovali u listů ovsa (*Avena sativa* L.) napadených patogenem *Puccinia coronata* pokles nefotochemického zhášení v napadených částech, zatímco v neinfikovaných došlo k jeho nárůstu při rozvoji sporulace 8 dní po inokulaci. Jedenáct dní po inokulaci bylo nefotochemické zhášení zvýšeno i v zelených ostrůvcích, tedy v místech, ve kterých se vyskytovalo mycelium. Někteří autoři pozorovali změny ve fotosyntéze také v místech přesahujících infikované regiony s viditelnými symptomy (Luque a kol. 1999, El Omari a kol. 2001). Přesto během napadení biotrofním patogenem může funkčnost fotosyntetického aparátu v neinfikovaných částech rostliny zůstat beze změn, případně může v nenapadených částech docházet i k nárůstu rychlosti fotosyntézy (Berger a kol. 2004).

Z těchto výsledků je patrný další aspekt změn fotosyntézy u infikovaných rostlin. Infikované listy bývají heterogenní, mají infikované a neinfikované oblasti a změny ve fotosyntéze a metabolismu bývají lokální (Berger a kol. 2007), přičemž v průběhu času se jejich lokace mění (Scholes a Rolfe 1996, Chou a kol. 2000). Heterogenita funkčnosti fotosyntézy v ploše infikovaných listů přetrvává i v pokročilých stádiích infekce, ve kterých je fotosyntéza již výrazně inhibována (Scholes a Rolfe 1996). Proto by se i měření fotosyntetických parametrů mělo provádět s ohledem na heterogenitu listů a rozlišovat napadené a nenapadené části. Plošné měřicí metody by měly být doplněny metodami, které jsou schopny zaznamenat i lokální vývoj infekce a změny hostitelských procesů. K tomu je ideální použití metod měřících fluorescenci chlorofylu v celé ploše listu – tzv. metody „fluorescence imaging“ (Rolfe a Scholes 2010).

Jak již bylo řečeno, biotrofní patogeny jsou závislé na hostiteli; využívají jeho sacharidy, aminokyseliny a anorganické živiny (Wright a kol. 1995a). Houby přijímají z rostlin především hexózy a aminokyseliny (Voegelé a kol. 2001), Sutton a kol. (1999) uvádí jako hlavní zdroj energie pro patogen glukózu. Častým jevem u

infekcí biotrofními patogeny jsou proto změny v metabolismu sacharidů (Hwang a Heitefuss 1986). V řadě prací byly zaznamenány změny ve složení a translokaci sacharidů. Abood a Lösel (2003) zjistili, že 3 dny po inokulaci listů okurky (*Cucumis sativus* L.) houbou *Podosphaera xanthii* došlo k velkému poklesu obsahu hexóz a nárůstu obsahu polysacharidů – konkrétně α -glukanů. Ale již 5 dní po inokulaci, kdy začala houba sporulovat, se poměry změnila a zatímco obsah glukózy narůstal, obsah sacharózy a glukanů klesal. Primární nárůst obsahu glukanů a rychlý pokles obsahu monosacharidů vysvětlují zvýšenou potřebou živin před růstem povrchového mycelia a zviditelněním konidiofor. Nárůst obsahu glukózy a fruktózy korelující s rozvojem sporulace zaznamenal i Hwang a Heitefuss (1986) u ječmene (*Hordeum vulgare* L.) napadeného padlím (*Erysiphe graminis* f.sp.*hordei*) 2 až 4 dny po inokulaci. Aked a Hall (1993b) potvrzují změny v obsahu hexóz a sacharózy u hrachu (*Pisum sativum* L.) napadeného *Erysiphe pisi* 7 dní po inokulaci. Změny ve složení živin jsou spojeny i se změnou jejich translokace (Aked a Hall 1993a, Clark a Hall 1998, Biemelt a Sonnewald 2006). Zvýšený přesun glukózy do listů *Arabidopsis thaliana* infikovaných patogenem *Erysiphe cichoraceum* zaznamenal Fotopoulos a kol. (2003). Götz a Boyle (1998) zaznamenali intenzivní změny v metabolickém poolu listů fazolu (*Phaseolus vulgaris*) infikovaných houbou *Uromyces appendiculatus*. Obsah sacharózy v infikovaných listech klesal. Naopak koncentrace glukózy postupně vzrůstala v místě napadení, zatímco v okolním pletivu docházelo k jejímu snižování. Koncentrace fruktózy zůstávala po dobu patogeneze téměř stejná.

Z výše uvedeného je patrné, že v průběhu infekce biotrofními patogeny se mění zastoupení jednotlivých typů sacharidů. Jedním z klíčových enzymů, které regulují toto zastoupení, je invertáza, která rozkládá sacharózu na glukózu a fruktózu. Zvýšení obsahu glukózy a fruktózy bývá často spojeno právě s nárůstem aktivity invertázy (Inman 1962, Aked a Hall 1993b, Wagner a Boyle 1995) a invertáza tak má významnou roli při distribuci sacharidů v hostitelské rostlině během napadení patogenem (Voegelé a kol. 2006).

Existují tři druhy invertázy – invertáza lokalizovaná v buněčné stěně, ve vakuole a v cytoplasmě (Fotopoulos 2005). V případě interakcí hostitel-patogen se mění zejména aktivita invertázy lokalizované v buněčných stěnách (Scholes a kol. 1994, Wright a kol. 1995b, Fotopoulos a kol. 2003, Sutton a kol. 2007). V řadě

případů byla během interakce hostitel – biotrofní patogen zaznamenána zvýšená aktivita invertázy (Chou a kol. 2000, Fotopoulos a kol. 2003, Berger a kol. 2004, Swarbrick a kol. 2006), která zpravidla koreluje s nárůstem obsahu hexóz v infikovaných listech (Mitchell a kol. 1978, Brem a kol. 1986, Hwang a Heitefuss 1986, Zulu a kol. 1991, Heisteruber a kol. 1994, Scholes a kol. 1994, Wright a kol. 1995a).

Změny v rozložení a využití asimilátů způsobené interakcí hostitele s patogenem mohou způsobit změny v aktivitě fotosyntetických procesů (Scholes a kol. 1994, Wright a kol. 1995b, Abood a Lösel 2003). Pokles rychlosti fotosyntézy v důsledku infekce je u celé řady patogenů spojený s nárůstem invertázové aktivity a s akumulací hexóz (v některých případech i sacharózy) v infikovaných listech (Tang a kol. 1996). Změny v distribuci sacharidů mohou vyústit v inhibici Calvinova cyklu (Gordon a Duniway 1982, Scholes a kol. 1994, Wright a kol. 1995b) způsobenou poklesem aktivity a množství enzymů Calvinova cyklu, především enzymu Rubisco (Gordon a Duniway 1982, Walters a Ayres 1984, Higgins a kol. 1985, Scholes a kol. 1994, Wright a kol. 1995b, Tang a kol. 1996), a inhibicí světelných reakcí fotosyntézy v tylakoidní membráně (Magyarosy a kol. 1976, Moll a kol. 1995). Akumulace sacharidů může také potlačit expresi fotosyntetických genů (Heisteruber a kol. 1994, Scholes a kol. 1994, Wright a kol. 1995b, Keutgen a Roeb 1996).

V devadesátých letech dvacátého století tak byl na základě těchto poznatků vytvořen model interakce metabolismu hostitele a patogenu (Scholes a kol. 1994, Tang a kol. 1996). Tento model předpokládá, že nárůst invertázové aktivity vede k akumulaci rozpustných sacharidů a/nebo ke změnám v toku těchto sacharidů. Protože sacharidy mají vliv na expresi mnoha rostlinných genů (Koch 1996), mohou být tyto změny příčinou aktivace signálních cest vedoucí k potlačení exprese fotosyntetických genů a tím k inhibici rychlosti fotosyntézy v infikovaných listech (Chou a kol. 2000). Krapp a kol. (1993) zaznamenali výrazný pokles obsahu transkriptů genů *rbcS* (gen pro malou podjednotku enzymu Rubisco), *cab* (gen pro chlorofyl a/b vázající protein) a *atp-δ* (gen pro podjednotku ATPasy) po přidání glukózy do suspenze buněčné kultury *Chenopodium rubrum*. Jang a Sheen (1994) ukázali, že exprese fotosyntetických genů je potlačena akumulací sacharidů, zejména glukózy a fruktózy. Berger a kol. (2007) i Chou a kol. (2000) zaznamenali nárůst

obsahu hexóz a současně inhibici exprese fotosyntetických genů, stejně tak jako genu *rbcS* (gen pro malou podjednotku enzymu Rubisco) a genu *cab* (gen pro chlorofyl a/b vázající protein).

Berger a kol. (2004) uvádějí, že potlačení exprese fotosyntetických genů je jednou z obecných příčin ovlivnění metabolismu hostitelské rostliny při patogenezí. Nicméně předpokládají, že změny ve funkčnosti fotosyntetického aparátu během interakce hostitele s patogenem nemusejí být nutně zapříčiněné pouze inhibicí fotosyntetických genů, neboť většinou hostitelské rostliny reagují na napadení rychleji, než se mohou udát změny v expresi genů. Scholes a kol. (1994) vyslovili hypotézu, že akumulace sacharidů může mít vedle nepřímé a déle trvající cesty zpětnovazebné inhibice přímý efekt na limitaci anorganického fosfátu nutného pro tvorbu ATP. Zdá se tedy, že změny ve funkčnosti fotosyntézy jsou důsledkem kombinace několika aspektů.

1.2. Role cytokininů během interakce hostitel-patogen

Rostlinné hormony mají obecně velký význam v řadě procesů v rostlině. Jejich působení není úzce specifické a mohou způsobovat mnoho odlišných efektů. Zároveň je jejich působení silně závislé na jejich aktivitě, lokalizaci a také na poměrném zastoupení jednotlivých hormonů. V reakci na biotické a abiotické stresové faktory se může měnit jejich množství a zastoupení (Serezhkina a kol. 2004). Také během napadení rostliny patogenem hraje roli celá řada rostlinných hormonů, jak při obranných reakcích rostliny, tak při vývoji patogenu (Yarullina a kol. 2001). Mezi nejvýznamnější rostlinné růstové regulátory, které hrají roli v průběhu houbových, bakteriálních a virových chorob v rostlinách, patří cytokininy a auxiny (Ashby 2000).

Cytokininy představují skupinu rostlinných hormonů, která byla objevena v 50. letech 20. století (Strnad 1997). Podílejí se na regulaci dělení a diferenciaci buněk. Hrají tak významnou roli při řízení vývoje a růstu rostlin. Mezi další efekty patří např. vliv na vznik sekundárních meristémů, distribuci asimilátů, mohou hrát roli při oddálení senescence (Vlčková a kol. 2006) nebo mohou zvyšovat odolnost rostlin vůči stresům a regulovat regeneraci rostlin. Řada prací proto studuje zapojení

cytokininů během interakce hostitel-patogen, přičemž se nabízí otázka, zda by cytokininy mohly fungovat jako prostředek ke zvýšení rezistence vůči patogenům.

Během napadení a následného vývoje patogenu dochází k řadě změn, ve kterých jsou cytokininy zapojeny. Především jde o vliv na metabolismus rostlin, kdy je potřeba zajistit tok asimilátů směrem k místu napadení, potažmo k patogenu. Protože rostlinné hormony mají významný vliv na syntézu, obsah, složení a translokaci sacharidů (Wingler a Roitsch 2008), předpokládá se, že právě rostlinný metabolismus je ovlivňován změnou složení, koncentrace a toku cytokininů a asimiláty jsou tak transportovány do místa napadení (Cooper a Ashby 1998, Ashby 2000). Cytokininy totiž jednak regulují aktivitu invertázy (Walters a McRoberts 2006), mají ale také vliv na translokaci živin do místa potřeby. Bylo ukázáno, že živiny jsou přednostně transportovány a shromažďovány v pletivu ošetřeném cytokininy (Ehness a Roitsch 1997), neboť tok asimilátů probíhá směrem k místu s vyšší koncentrací cytokininů.

S akumulací cytokininů souvisí i vznik zelených ostrůvků: Thrower (1965) považuje vznik zelených ostrůvků za výsledek přesunu asimilátů hostitele do míst napadení. Je známo, že exogenní aplikace cytokininů nebo inokula biotrofní houby může změnit translokaci živin a tím vyvolat tvorbu zelených ostrůvků (Liu a Bushnell 1986, Murphy a kol. 1997, Ashby 2000). Dlouhodobější udržení chlorofylů v těchto ostrůvcích oproti okolnímu pletivu (Angra a Mandahar 1991, Angra-Sharma a Sharma 1999) svědčí o zvýšeném obsahu cytokininů, protože cytokininy jsou známy svou schopností potlačovat degradaci chlorofylu. Přímý nárůst koncentrace cytokininů v místě zelených ostrůvků zaznamenali např. Angra-Sharma a Sharma (1999). Zvýšená koncentrace cytokininů a akumulace asimilátů v místě napadení zajišťuje dostatečný přísun živin pro patogen a tím jeho další vývoj a šíření (Angra-Sharma a Sharma 1999). Vznik těchto lokalizovaných míst opět poukazuje na heterogenitu infikovaných listů, která je důležitým aspektem při studiu interakcí hostitel-patogen, jak bylo zmíněno v předchozí kapitole.

Důležitým faktorem při interakci hostitel-patogen není jen změna množství cytokininů při patogenezi, ale také změna zastoupení jejich různých forem. V některých pracích docházelo během patogeneze k přeměně neaktivních forem cytokininů na formy aktivní. Během patogeneze také dochází ke změnám v obsahu

dalších komponent, které jsou pro přeměnu forem cytokininů nezbytné. V místě infekce bylo např. zaznamenáno uvolňování enzymu β -glukosidáza, který štěpí zeatin-O-glukosid – prekurzor aktivního zeatinu, který se tak v místě infekce tvoří (Cooper a Ashby 1998). Cooper a Ashby (1998) dále zjistili, že řada nekrotrofních, hemibiotrofních i biotrofních hub produkuje β -glukosidázu *in vitro*. Obecně největší β -glukosidázová aktivita byla pozorována u nekrotrofních hub, což zřejmě souvisí s tím, že tyto houby využívají celou řadu extracelulárních enzymů během svého nekrotrofního růstu. Velké množství β -glukosidáz vyskytující se u hemibiotrofních a biotrofních hub naopak poukazuje na specifickou funkci tohoto enzymu v raných fázích jejich patogeneze, například přerušování obranných rostlinných mechanismů degradací signálních molekul jako jsou oligosacharidy (Faiss a kol. 1996). Další rolí houbové β -glukosidázy by mohlo být potlačení konverze cytokininů patogenu na neaktivní formy (viz dále). Tím je zajištěna dostatečná akumulace cytokininů v místě napadení a následná translokace hostitelských živin potřebných k vývoji patogenu.

Během patogeneze hrají důležitou roli i cytokininy produkované přímo patogenem, neboť tyto patogenní cytokininy mohou představovat značnou část cytokininové zásoby v infikované rostlině (Cooper a Ashby 1998, Ashby 2000, Talieva a kol. 2001) a především v raných fázích infekce (dříve než může dojít ke změnám v zastoupení hormonů hostitele) ovlivnit translokaci živin uvnitř hostitelského pletiva (Ashby 2000). Cooper a Ashby (1998) zjistili, že mycelium hemibiotrofního patogenu *Venturia inaequalis* pěstované na médiu produkuje cytokininy. Větší množství cytokininů bylo produkováno myceliem pěstovaným na médiu s omezeným množstvím živin v porovnání s myceliem pěstovaným na médiu s dostatečným množstvím živin. K podobným výsledkům dospěli i Murphy a kol. (1997), kteří omezením živin stimulovali produkci cytokininů hemibiotrofním patogenem *Pyrenopeziza brassicae*. Během patogenních interakcí tedy významnou úlohu hrají právě mikrobiální cytokininy, především v případě biotrofních patogenů, které jsou závislé na živém hostiteli, a u kterých je sklon k produkci vlastních cytokininů výraznější než u nekrotrofních patogenů (Murphy a kol. 1997, Cooper a Ashby 1998).

Protože změna (nárůst i pokles) obsahu a aktivity cytokininů byla pozorována jak u náchylných, tak u rezistentních druhů rostlin, zdá se, že stimulace nebo naopak inhibice obranných mechanismů je závislá na koncentraci a dočasných změnách v zastoupení různých forem cytokininů a také na poměru obsahu cytokininů a ostatních rostlinných hormonů (Yarullina a kol. 2001). Beckman a Ingram (1994) například předpokládají, že cytokininy mohou přímo ovlivňovat, resp. měnit rezistenci rostliny vůči patogenům. Tuto problematiku proto řeší řada prací, nicméně výsledky jsou nejednotné. U interakcí patogenu s náchylnými hostiteli lze obecně říci, že se koncentrace cytokininů v místě napadení zvyšuje oproti zdravým kontrolám, i když ne vždy je tento nárůst výrazný a může být doprovázen i dočasným poklesem. Nárůst koncentrace cytokininů v místě napadení oproti okolnímu pletivu zaznamenali např. Angra-Sharma a Sharma (1999) u náchylného kultivaru ječmene (*Hordeum vulgare* L. - kultivar DL-70) a kukuřice (*Zea mays* – kultivar CM-600) infikovaného nekrotrofní houbou *Pyrenophora teres* respektive *Dreschlera maydis*. Nárůst v endogenním obsahu cytokininů v průběhu procesu napadení semenáčků náchylného kultivaru pšenice (*Triticum aestivum* L. kultivar Zhnitsa) biotrofní houbou *Tilletia caries* zaznamenal Maksimov a kol. (2002). Nárůst obsahu cytokininů byl patrný od šestého dne po inokulaci a následně během celého experimentu, přičemž výsledný obsah cytokininů byl 1,8x vyšší než u kontroly. Serezhkina a kol. (2004) zkoumali změny v obsahu cytokininů v listech pšenice infikovaných padlím (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici*). V náchylném kultivaru (soft wheat cultivar Rodina) byl u zdravé rostliny zaznamenán vyšší obsah cytokininů v porovnání s rezistentními kultivary. Dva dny po inokulaci pak došlo k poklesu obsahu cytokininů až na 45% původního množství. Následoval opětovný nárůst pět dní po inokulaci, přičemž hlavní zvýšení bylo zaznamenáno v obsahu aktivní transportní formy cytokininu – zeatin ribosidu. Zvýšení obsahu cytokininů navíc odpovídalo období, kdy docházelo k tvorbě velkých sporulujících kolonií patogenu. Yarullina a kol. (2001) zjistili pokles obsahu cytokininů v kořenech a velmi malý nárůst v listech u náchylného kultivaru pšenice (*Triticum aestivum* L. - odrůda Moskovskaya 35) po inokulaci kořenovým patogenem *Helminthosporium sativum*.

Tyto výsledky potvrzují, že patogen v případě kompatibilní interakce s hostitelem využívá cytokininů k přeprogramování metabolismu hostitele a jeho

následné využití pro vlastní vývoj a šíření. Navíc mohou cytokiny i dalšími cestami napomoci patogenezi, což naznačují výsledky z exogenní aplikace cytokininů, při které docházelo k inhibici aktivity některých rostlinných obranných enzymů – např. chitinázy (Shinshi a kol. 1987), k inhibici syntézy fytoalexinů (Beckman a Ingram 1994, Tamogami a kol. 1997) nebo tvorby reaktivních forem kyslíku indukujících obranné reakce v rostlině (Maksimov a kol. 2002).

Výsledky měření obsahu a aktivity cytokininů během napadení rezistentních rostlin nejsou tak jednotné. Během interakce hostitel-patogen může dojít k výraznému nárůstu obsahu cytokininů. Maksimov a kol. (2002) zaznamenali nárůst obsahu cytokininů od šestého dne po inokulaci semenáčků rezistentního druhu pšenice (*Triticum timopheevii* Zhuk) biotrofní houbou *Tilletia caries*. Nárůst obsahu cytokininů byl rychlejší a dosáhl vyšších hodnot než u porovnávaného náchylného druhu. Zvýšenou koncentraci cytokininů jak v kořenech, tak v listech pozorovali u rezistentního kultivaru pšenice (*Triticum aestivum* L. - odrůda Zarya) infikovaného kořenovým patogenem *Helminthosporium sativum* Yarullina a kol. (2001). Opět pak rezistentní rostliny vykazovaly vyšší obsah cytokininů oproti náchylné variantě.

Někteří autoři naopak uvádějí pouze slabý nárůst cytokininů v pozdějších fázích infekce (Sziraki a kol. 1976, Talieva a kol. 2001). Příkladem může být rezistentní kultivar pšenice (Aegilops line 95/99ⁱ) infikovaný padlím (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *Tritici*), který je silně odolný vůči penetraci patogenu. Hodnoty obsahu cytokininů zůstaly stabilní. Slabý nárůst byl pozorován až pět dní po inokulaci.

U některých systémů byl zaznamenán dokonce pokles v obsahu cytokininů v infikované části hostitele. Např. Angra-Sharma a Sharma (1999) zaznamenali u rezistentního kultivaru ječmene (*Hordeum vulgare* L. - kultivar PL-172) a kukuřice (*Zea mays* – kultivar CM-104) infikované nekrotrofní houbou *Pyrenophora teres*, resp. *Dreschlera maydis*, pokles koncentrace cytokininů v místě napadení vzhledem k okolnímu pletivu. V listech kultivaru rezistentní pšenice (Aegilops line 56/99ⁱ), u něhož po napadení padlím (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *Tritici*) probíhá hypersenzitivní reakce, došlo k postupnému poklesu obsahu cytokininů (Serezhkina a kol. 2004). Pokles v obsahu cytokininů s postupem času po inokulaci zaznamenali tito autoři i u dalšího kultivaru. Zde však šlo o tolerantní kultivar pšenice (*Aegilops*

speltoides k-389) napadený padlím (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *Tritici*), který bývá působením patogenu ovlivněn jen velmi málo a metabolismus zůstává prakticky zachovaný. Celkový obsah cytokininů zůstal po inokulaci nezměněný, nicméně došlo ke změně obsahů jednotlivých forem, kdy narůstaly aktivní formy cytokininů. Pátý den po inokulaci pak došlo k poklesu celkového obsahu cytokininů.

Snížení obsahu cytokininů může být součástí signálních mechanismů vedoucích k rozpoznání patogenu a spuštění obranných procesů (Angra-Sharma a Sharma 1999). Serezhkina a kol. (2004) spojují snížený obsah cytokininů se spouštěním hypersenzitivní reakce a následnou degradací infikovaného pletiva. Někteří autoři naopak za hormonální reakci na napadení patogenem považují akumulaci cytokininů v infikovaných rostlinách, protože cytokininy hrají roli při expresi některých obranných genů (Harding a Smigocki 1994) či při syntéze alkaloidů (Maksimov a kol. 2002). Yarullina a kol. (2001) předpokládají, že nárůst obsahu cytokininů v infikovaných rezistentních rostlinách přispívá k intenzivní tvorbě strukturálních a jiných obranných proteinů, které podporují úspěšnou obrannou reakci rostliny. Maksimov a kol. (2002) vzhledem ke zvýšení obsahu cytokininů nejen u rezistentních, ale i náchylných rostlin usuzují, že jejich syntéza je stimulována samotným patogenem.

1.3. Vliv exogenní aplikace cytokininů na patogenezi

Jak vyplynulo z předchozí kapitoly, rezistence rostlin do jisté míry souvisí se změnami v obsahu, resp. v aktivitě cytokininů. Existuje předpoklad, že cytokininy mohou stimulovat obranné rostlinné reakce, které přispívají k potlačení vývoje patogenu (Yarullina a kol. 2001). Ingram (1967) zjistil, že když je patogenní kultura zásobena určitou kombinací cytokininů a auxinů, může pletivo vykazovat rasově specifickou rezistenci. Sarhan a kol. (1991) poukazují na to, že získaná systémová rezistence je spojena se zvýšeným obsahem cytokininů v rostlinném pletivu, kdy je rezistence vyvolána preinokulací rostliny nekrotickou houbou. Bylo zjištěno, že exprese rezistence může být v rostlině potlačena nárůstem poměru cytokininů k auxinům (Haberlach a kol. 1978). Řada znalostí o vlivu cytokininů na rezistenci rostlin vůči patogenům a translokace metabolitů je přitom vyvozována ze studia

vlivu exogenní aplikace cytokininů na rostliny (Clifford a kol. 1986). Nabízí se proto otázka, zda by exogenní aplikace mohla ovlivnit/vyvolat rezistenci a fungovat tak jako obranný prostředek pro rostliny.

V první řadě může exogenní aplikace ovlivnit přímo vývoj samotného patogenu. Mishina a kol. (2002) se zabývali studiem vlivu exogenní aplikace cytokininů na klíčení konidií. Intenzita klíčení konidií *Erysiphe cichoracearum* f. sp. *phlogis* byla v důsledku aplikace cytokininů zvýšena, přičemž efekt byl srovnatelný u obou testovaných cytokininů – zeatin a kinetin, a obou testovaných koncentrací (1 a 10 mg/l) a to jak *in vivo* na listech zahradního floxu (*Phlox paniculata hort.*), tak i na substrátu *in vitro*. Naopak v případě padlí *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* neměla nižší koncentrace na konidie aktivační efekt a v případě vyšší koncentrace došlo k lehkému potlačení klíčení *in vivo* na listech ječmene (odrůda Maia). Potlačení klíčení *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* zaznamenala i Vizárová a kol. (1989). V případě *in vitro* došlo vlivem aplikace zeatinu k nárůstu klíčení konidií, zatímco u kinetinu nebyla pozorována žádná výrazná změna. Přítomnost cytokininů u obou patogenů dále způsobila snížení počtu normálních apresorií a naopak podpořila abnormální růst zárodečných klíčků (Mishina a kol. 2002). Potlačení vývoje haustorií zaznamenali i Liu a Bushnell (1986) v případě *Erysiphe graminis* DC f. sp. *hordei* ošetřené kinetinem.

Dalším efektem exogenní aplikace cytokininů je změna translokace živin. Bylo ukázáno, že živiny jsou přednostně transportovány a shromažďovány v pletivu ošetřeném cytokininy (Mothes a Engelbrecht 1961). Akumulace živin bývá spojena s tvorbou zelených ostrůvků, přičemž právě lokální aplikace kinetinu na listy ječmene (*Hordeum vulgare*) znásobila efekt tvorby zelených ostrůvků (Angra a Mandahar 1991).

Někteří autoři se během exogenní aplikace cytokininů setkali s potlačením projevů infekce. Kiraly a Szirmai (1964) či Balasz a kol. (1976) ve svých pracích ukázali, že exogenní aplikace kinetinu potlačuje vývoj lokálních lézí na tabáku, který byl infikován virem tabákové mozaiky. Stejný efekt byl pozorován i u listů, ve kterých byl zaznamenán zvýšený obsah endogenních cytokininů (toto zvýšení bylo vyvoláno preinokulací spodních listů rostliny patogenem (Balasz a kol. 1976). Také aplikace kinetinu na listy ječmene infikované nekrotrofní houbou *Bipolaris*

sorokiniana vedla k potlačení počtu a velikosti nekrotických lézí (Sarhan a kol. 1991). Barna a kol. (1985) také zaznamenali menší náchylnost listů rajčat a kukuřice ošetřených kinetinem vůči patogenům *Fusarium* a *Helminthosporium*.

Exogenně zvýšené množství cytokininů dokonce může vést ke změnám v hypersenzitivní reakci. Liu a Bushnell (1986) zaznamenali urychlení hypersenzitivní reakce vůči *Erysiphe graminis* v listech ječmene (*Hordeum vulgare* L.) ošetřených kinetinem, když byl zaznamenán dvojnásobek mrtvých buněk v ošetřených listech. Na druhou stranu existují i práce dokládající opačný efekt exogenní aplikace cytokininů na hypersenzitivní reakci hostitele. Beckman a Ingram (1994) studovali efekt cytokininů na hypersenzitivní reakci na modelovém systému hlízy bramboru a patogenu *Phytophthora infestans*. Zjistili, že vliv kinetinu je závislý na koncentraci aplikované dávky. Při koncentraci 15 – 240 μM kinetin inhiboval výtok iontů, při koncentraci 120 – 240 μM došlo vlivem kinetinu k potlačení akumulace fytoalexinů a při koncentraci vyšší než 60 μM byla indukována náchylnost. Při aplikaci kinetinu o koncentraci 60 μM , 120 μM a 240 μM pozorovali potlačení hnědnutí hlíz, které bývá projevem právě hypersenzitivní reakce. Také v tabáku napadeném bakterií *Pseudomonas tabaci* mohou cytokininy způsobit potlačení hypersenzitivní reakce (Novacky 1972). Z těchto výsledků lze vyvozovat, že cytokininy mohou zmírnit projev hypersenzitivní reakce.

Výsledky studia vlivu exogenní aplikace na průběh patogeneze se tak jeví jako velmi nejednotné. Rozdíly mohou být dány hned několika aspekty. Jednak byly výše zmíněné práce prováděny na různých patosystémech, které mají různé životní strategie. Také koncentrace a druh použitých cytokininů byly rozdílné. Přesto je patrné, že exogenní aplikace cytokininů ve správný čas a na správné místo může pomoci rostlině aktivovat obranné mechanismy a potlačit rozvoj patogenu.

1.4. Role teplotního stresu během interakce hostitel-patogen

Teplotní stres je jedním z abiotických faktorů, který může ovlivňovat interakci hostitel-patogen. Stejně jako vodní stres nebo změna pH může teplota ovlivňovat signální cesty během patogeneze a tím ovlivňovat rezistenci/náchylnost hostitele (Judelson a Michelmore 1992). Teplotní stres tedy ovlivňuje základní

procesy v hostiteli, které mají význam jak při obranných reakcích hostitele, tak při snaze patogenu získat živiny a rozvíjet se. Rezistence vyvolaná výše jmenovanými abiotickými faktory sice bývá dlouhotrvající a působí na široké spektrum patogenů, ale nezajistí kompletní odolnost vůči patogenu (Walters a kol. 2005).

Při ošetření hostitele působením zvýšené teploty buď před inokulací nebo během ní byly pozorovány odlišné výsledky ve vlivu na rezistenci/náchylnost. V některých případech docházelo ke zvýšení rezistence hostitele. Např. Schweizer a kol. (1995) a Vallélian-Bindschedler a kol. (1998) zaznamenali nárůst rezistence u ječmene vůči padlí *E. graminis* f.sp. *hordei* a *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* po ošetření teplotou 50°C. Kultivar ječmene Bancroft vykazoval rezistenci získanou zvýšením teploty během inkubace z 4-20°C na 10-35°C vůči rzi *Puccinia striiformis* f.sp. *hordei* (Chen a Line 1995). Naopak Chen a kol. (2003) zaznamenali naprostou ztrátu rezistence zelených bobulí a listů kávovníku vůči *Colletotrichum gloeosporoides* a urychlení patogenezise u *Colletotrichum kahawae* po půlminutovém působení 55°C. Aplikace teploty 44°C na sojové boby hodinu před inokulací zvýšila jejich náchylnost vůči *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, navíc se u bobů projevila náchylnost i vůči houbám, které běžně nebývají vůči sóje patogenní (Chamberlain a Gerdemann 1966). Náchylnost vyvolaná zvýšenou teplotou byla zaznamenána také u ječmene infikovaného *E. graminis* f.sp. *hordei* (Ouchi a kol. 1977, Hazen a Bushnell 1983).

Zdá se tedy, že aplikací zvýšené teploty může být u různých typů hostitele a patogenu rezistence jak zvýšena, tak potlačena. Nelze tedy vyřknout obecně platnou závislost mezi teplotním stresem a reakcí hostitele (Yong-fu a kol. 1998). Někteří autoři poukazují na existenci genů rezistence senzitivních na teplotní změny (Judelson a Michelmore 1992, Bevan 1993): zvýšená teplota může rychleji/silněji exprimovat geny rezistence (Gousseau a kol. 1985, Judelson a Michelmore 1992, Balass a kol. 1993). Nicméně Yong-fu a kol. (1998) zaznamenal rezistenci vůči padlí indukovanou i u kultivarů bez genů rezistence, což naznačuje zapojení dalších faktorů, prostřednictvím kterých může změna teploty ovlivňovat odolnost hostitele. Bylo ukázáno, že teplotní stres může ovlivňovat řadu obranných reakcí jako je zesílení buněčné stěny (Schweizer a kol. 1995, Vallélian-Bindschedler a kol. 1998) nebo změny v rychlosti syntézy a typu syntetizovaných proteinů (Schweizer a kol.

1995, Chen a kol. 2003). Také propojení mezi teplotním a oxidativním stresem může hrát významnou roli (Wahid a kol. 2007), neboť oxidativní stres vyvolaný teplotním stresem může indukovat rezistenci rostlin (Vallélian-Bindschedler a kol. 1998).

Teplotní stres má významný vliv na fotosyntézu. Je známo, že rychlost fotosyntézy výrazně závisí na teplotě a že vysokou teplotou může být fotosyntéza zcela inhibována před tím, než se stačí projevit další symptomy (Berry a Bjorkman 1980). Snížení rychlosti fotosyntézy může být způsobeno inhibicí fotosystému II, který je v rámci fotosyntetického aparátu na teplotu nejvíce citlivý (Havaux a Tardy 1996). Vlivem vysoké teploty dochází také k poškození buněčných membrán (Blum a Ebercon 1981), může se měnit aktivita Calvinova cyklu a může docházet k aktivaci invertázy (Kaur a kol. 2009). Wahid a kol. (2007) uvádí snížení obsahu proteinů a fotosyntetických pigmentů jako důsledek zvýšené teploty. Při nárůstu teploty je jednou z prvních změn v rostlinném metabolismu inaktivace enzymu Rubisco (Kobza a Edwards 1987). Z uvedeného vyplývá, že změny teploty před a během napadení rostliny patogenem mohou prostřednictvím změn ve fotosyntéze významně ovlivnit průběh vývoje patogenu a obrany hostitele. Studium těchto pochodů může být velmi přínosné s ohledem na možnosti zvýšení rezistence.

2. Seznam použité literatury

Abood JK, Lösel DM. Changes in carbohydrate composition of cucumber leaves during the development of powdery mildew infection. *Plant Pathology* 52 (2003) 256-265.

Ahmad I, Farrar JF, Whitbread R. Photosynthesis and chloroplast functioning in leaves of barley infected with brown rust. *Physiological Plant Pathology* 23 (1983) 411-419.

Aked J, Hall JL. The uptake of glucose, fructose and sucrose into pea powdery mildew (*Erysiphe pisi* DC) from the apoplast of pea leaves. *New Phytologist* 123 (1993a) 277-282.

Aked J, Hall JL. Effect of powdery mildew infection on concentrations of apoplastic sugars in pea leaves. *New Phytologist* 123 (1993b) 283-288

Allen PJ. Changes in the metabolism of wheat leaves induced by infection with powdery mildew. *American Journal of Botany* 29 (1942) 425-435.

Allen PJ, Goddard DR. A respiratory study of powdery mildew of wheat. *American Journal of Botany* 25 (1938) 613-621.

Angra R, Mandahar CL. Pathogenesis of barley leaves by *Helminthosporium teres* I: Green islands formation and the possible involvement of cytokinins. *Mycopathologia* 114 (1991) 21-27.

Angra - Sharma R, Sharma DK. Cytokinins in pathogenesis and disease resistance of *Pyrenophora teres* - barley and *Drechslera maydis* - maize interactions during early stages of infection. *Mycopathologia* 148 (1999) 87-95.

Ashby AM. Biotrophy and the cytokinin conundrum. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57 (2000) 147-158.

Ayres PG. Patterns of stomatal behaviour, transpiration, and CO₂ exchange in pea following infection by powdery mildew (*Erysiphe pisi*). *Journal of Experimental Botany* 27 (1976) 1196-1205.

Balass M, Cohen Y, Bar-Joseph M. Temperature-dependent resistance to downy mildew in muskmelon: structural responses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43 (1993) 11-20.

Balasz E, Barna B, Kiraly Z. Effect of kinetin on lesion development and infection sites in Xanthi-nc tobacco infected by TMV: Single-cell local lesions. *Acta Pytopathologia Academiae Scientiarum Hungaricae* 11 (1976) 1-9.

Barna B, Sarhan ART, Kiraly Z. The effect of age of tomato and maize leaves on resistance to a non-specific and a host specific toxin. *Physiological Plant Pathology* 27 (1985) 159-165.

Bassanezi RB, Amorim L, Filho AB, Berger RD. Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spots and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. *Journal of Phytopathology* 150 (2002) 37-47.

Beckman KB, Ingram DS. The inhibition of the hypersensitive response of potato tuber tissues by cytokinins: similarities between senescence and plant defence responses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45 (1994) 229-246.

Bechtold U, Karpinski S and Mullineaux PM. The influence of the light environment and photosynthesis on oxidative signalling responses in plant-biotrophic pathogen interactions. *Plant, cell and environment* 28 (2005) 1046 – 1055.

Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* 122 (2004) 419-428.

Berger S, Sinha AK, Roitsch T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58 (2007) 4019-4026.

Berry J, Björkman O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 31 (1980) 491-543.

Bevan JR, Crute IR, Clarke DD. Diversity and variation in expression of resistance to *Erysiphe fischeri* in *Senecio vulgaris*. *Plant Pathology* 42 (1993) 647-653.

Biemelt S, Sonnewald U. Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology* 163 (2006) 307-318.

Blum A, Ebercon A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science*, 21 (1981) 43-47.

Brem S, Rast DM, Ruffner HP. Partitioning of photosynthate in leaves of *Vitis vinifera* infected with *Uncinula necator* or *Plasmopora viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 29 (1986) 285-291.

Bushnell WR, Allen PJ. Respiratory changes in barley leaves produced by single colonies of powdery mildew. *Plant Physiology* 37 (1962) 751-758.

Clark JIM, Hall JL. Solute transport into healthy and powdery mildew-infected leaves of pea and uptake by powdery mildew mycelium. *New Phytologist* 140 (1998) 261-269.

Clifford PE, Offler CE, Patrick JW. Growth regulators have rapid effects on photosynthate unloading from seed coats of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 80 (1986) 635-637.

Cooper SJ, Ashby AM. Comparison of cytokinin and cytokinin -*O*- glucoside cleaving β -glucosidase production *in vitro* by *Venturia inaequalis* and other phytopathogenic fungi with differing modes of nutrition *in planta*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53 (1998) 61-72.

Dangl JL, Jones JDG. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 441 (2001) 826-833.

Ehness R, Roitsch T. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *The Plant Journal* 11 (1997) 539-548.

El Omari B, Fleck I, Aranda X, Moret A, Nadal M. Effect of fungal infection on leaf gas-exchange and chlorophyll fluorescence in *Quercus ilex*. *Annals of Forest Science* 58 (2001) 165-174.

Essmann J, Schmitz-Thom I, Schön H, Sonnewald S, Weis E, Scharte J. RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defence in source leaves of tobacco. *Plant Physiology* 147 (2008) 1288-1299.

Faiss M, Strnad M, Redig P, Dolezal K, Hanus J, Van Onckelen H, Schmulling T. Chemically induced expression of the *rolC*-encoded β -glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: *rolC* does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides *in planta*. *The Plant Journal* 10 (1996) 33-46.

Farrar JF and Rayns FW. Respiration of leaves of barley infected with powdery mildew: increased engagement of the alternative oxidase. *New Phytologist* 107 (1987) 119-125.

Fotopoulos V, Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family. *Journal of Biological Research* 4 (2005) 127-137.

Fotopoulos V, Gilbert MJ, Pittman JK, Marvier AC, Buchanan AJ, Sauer N, Hall JL, Williams LE. The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *At β fruct1*, are induced in *Arabidopsis* during infection with fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology* 132 (2003) 821-829.

Gordon TR, Duniway JM. Effects of powdery mildew infection on the efficiency of CO₂ fixation and light utilization by sugar beet leaves. *Plant Physiology* 69 (1982) 139-142.

Götz M, Boyle C. Changes in metabolite pools in host and pathogen during the uredinio and teliospore development of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Phytopathology* 146 (1998) 599-607.

Gousseau HDM, Deverall BJ, McIntosh RA. Temperature-sensitivity of the expression of resistance to *Puccinia graminis* conferred by the *Sr15*, *Sr9b* and *Sr14* genes in wheat. *Physiological Plant Pathology* 27 (1985) 335-343.

Haberlach GT, Budde AD, Sequeira L, Helgeson JP. Modification of disease resistance of tobacco callus tissues by cytokinins. *Plant Physiology* 62 (1978) 522-525.

Hall JL, Williams LE. Assimilate transport and partitioning in fungal biotrophic interactions. *Australian Journal of Plant Physiology* 27 (2000) 549-560.

Harding SA, Smigocki AC. Cytokinins modulate stress response genes in isopentenyl transferase-transformed *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *Physiologia Plantarum* 90 (1994) 327-333.

Havaux M, Tardy F. Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem II in vivo: possible involvement of xanthophyll-cycle pigments. *Planta* 198 (1996) 324-333.

Hazen BE, Bushnell WR. Inhibition of the hypersensitive reaction in barley to powdery mildew by heat shock and cytochalasin B. *Physiological Plant Pathology* 23 (1983) 421-438.

Heisteruber D, Schulte P, Moerschbacher BM. Soluble carbohydrates and invertase activity in stem rust-infected, resistant and susceptible near-isogenic wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45 (1994) 111-123.

Higgins CM, Manners JM, Scott KJ. Decrease in three messenger RNA species coding for chloroplast proteins in leaves of barley infected with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Plant Physiology* 78 (1985) 891-894.

Holloway PJ, Maclean DJ, Scott, KJ. Electron transport in thylakoids isolated from barley leaves infected by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* DC. ex Merat f.sp. *hordei* Marchal). *New Phytologist* 120 (1992) 145-151.

Hwang BK, Heitefuss R. Sugar composition and acid invertase activity in spring barley plants in relation to adult-plant resistance to powdery mildew. *Phytopathology* 76 (1986) 365-369.

Chamberlain DW, Gerdemann JW. Heat-induced susceptibility of soybeans to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, *Phytophthora cactorum*, and *Helminthosporium sativum*. *Phytopathology* 56 (1966) 70-73.

- Chen X, Line RF. Gene action in wheat cultivars for durable, high-temperature, adult-plant resistance and interaction with race-specific, seedling resistance to *Puccinia striiformis*. *Phytopathology* 85 (1995) 567-572.
- Chen ZJ, Ribeiro A, Silva MC, Santos P, Guerra-Guimaraes L, Gouveia M, Fernandez D, Rodrigues CJ. Heat shock-induced susceptibility of green coffee leaves and berries to *Colletotrichum gloeosporioides* and its association to *PR* and *hsp70* gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63 (2003) 181-190.
- Chou H-M, Bundock N, Rolfe SA, Scholes JD. Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Molecular Plant Pathology* 1 (2000) 99-113.
- Ingram DS. The expression of R-gene resistance to *Phytophthora infestans* in tissue cultures of *Solanum tuberosum*. *Journal of General Microbiology* 49 (1967) 99-108.
- Inman RE. Disease development, disease intensity and carbohydrate levels in rusted bean plants. *Phytopathology* 52 (1962) 1207-1211.
- Jang JC, Sheen J. Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell* 6 (1994) 1665-1679.
- Judelson HS, Michelmore RW. Temperature and genotype interactions in the expression of host resistance in lettuce downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40 (1992) 233-245.
- Kaur P, Ghai N, Sangha MK. Induction of thermotolerance through heat acclimation and salicylic acid in *Brassica* species. *African Journal of Biotechnology* 8 (2009) 619-625.
- Keutgen N, Roeb GW. Effect of stem rust infection (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici*) on assimilate partitioning in wheat plants and responses to a fungicide treatment. *Journal of Plant Diseases and Protection* 103 (1996) 346-352.
- Kiraly Z, Szirmai J. The influence of kinetin on tobacco mosaic virus production in *Nicotiana glutinosa* leaf disks. *Virology* 23 (1964) 286-288.
- Kobza J, Edwards GE. Influences of leaf temperature on photosynthetic carbon metabolism in wheat. *Plant Physiology* 83 (1987) 69-74.
- Koch KE. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47 (1996) 509-540.
- Koch C, Noga G, Strittmatter G. Photosynthetic electron transport is differentially affected during early stages of cultivar/race-specific interactions between potato and *Phytophthora infestans*. *Planta* 193 (1994) 551-557.

Krapp A, Hofmann B, Schäfer C, Stitt M. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for “sink regulation” of photosynthesis? *The Plant Journal* 3 (1993) 817-828.

Lebeda A, Sedlářová M, Petřivalský M, Prokopová J. Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology* 122 (2008) 71-89.

Liu Z, Bushnell WR. Effects of cytokinins on fungus development and host response in powdery mildew of barley. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 29 (1986) 41-52.

Luque J, Cohen M, Savé R, Biel C, Alvarez IF. Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence and growth of *Quercus suber* L.. *Annals of Forest Science* 56 (1999) 19-26.

Magyarosy AC, Malkin R. Effect of powdery mildew infection of sugar beet on the content of electron carriers in chloroplasts. *Physiological Plant Pathology* 13 (1978) 183-188.

Magyarosy AC, Schürmann P, Buchanan BB. Effect of powdery mildew infection on photosynthesis by leaves and chloroplasts of sugar beets. *Plant Physiology* 57 (1976) 486-489.

Maksimov IV, Ganiev RM, Khairullin RM. Changes in the levels of IAA, ABA, and cytokinins in wheat seedlings infected with *Tilletia caries*. *Russian Journal of Plant Physiology* 49 (2002) 221-224.

Manter DK. Energy dissipation and photoinhibition in Douglas-Fir needles with a fungal-mediated reduction in photosynthetic rates. *Journal of Phytopathology* 150 (2002) 674-679.

Mishina GN, Talieva MN, Babosha AV, Serezhkina GV, Andreev LN. Influence of phytohormones on development of conidial inoculum of causative agents of the phlox and barley powdery mildew. *Biology Bulletin* 29 (2002) 46-52.

Mitchell DT, Fung AK, Lewis DH. Changes in the ethanol-soluble carbohydrate composition and acid invertase in infected first leaf tissues susceptible to crown rust of oat and wheat stem rust. *New Phytologist* 80 (1978) 381-392.

Moll S, Serrano P, Boyle C. *In vivo* chlorophyll fluorescence in rust-infected bean plants. *Journal of Applied Botany - Angewandte Botanik* 69 (1995) 163-168.

Montalbini P, Buchanan BB. Effect of a rust infection on photophosphorylation by isolated chloroplasts. *Physiological Plant Pathology* 4 (1974) 191-196.

Montalbini P, Buchanan BB, Hutcheson SW. Effect of rust infection on rates of photochemical polyphenol oxidation and latent polyphenol oxidase activity of *Vicia faba* chloroplast membranes. *Physiological Plant Pathology* 18 (1981) 51-57.

Moriondo M, Orlandini S, Giuntoli A, Bindi M. The effect of downy and powdery mildew on grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf gas exchange. *Journal of Phytopathology* 153 (2005) 350-357.

Mothes K, Engelbrecht L. Kinetin-induced directed transport of substances in excised leaves in the dark. *Phytochemistry* 1 (1961) 58-62.

Murphy AM, Pryce-Jones E, Johnstone K, Ashby AM. Comparison of cytokinin production *in vitro* by *Pyrenopeziza brassicae* with other plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50 (1997) 53-65.

Novacky A. Suppression of the bacterially induced hypersensitive reaction by cytokinins. *Physiological Plant Pathology* 2 (1972) 101-104.

Ouchi S, Nakabayashi H, Oku H. Effect of predisposition temperature on subsequent hyphal growth and colony development of *Erysiphe graminis hordei* on barley leaves. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 43 (1977) 455-461.

Peterson RB, Aylor DE. Chlorophyll fluorescence induction in leaves of *Phaseolus vulgaris* infected with bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Plant Physiology* 108 (1995) 163-171.

Roberts AM, Walters DR. Photosynthesis in discrete regions of leek leaves infected with the rust, *Puccinia allii* Rud. *New Phytologist* 110 (1988) 371-376.

Rolfe SA, Scholes JD. Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma* 247 (2010) 163-175.

Sabri N, Dominy PJ, Clarke DD. The relative tolerances of wild and cultivated oats to infection by *Erysiphe graminis* f.sp. *avenae*: II. The effects of infection on photosynthesis and respiration. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50 (1997) 321-335.

Sarhan ART, Király Z, Sziráky I, Smedegaard-Petersen V. Increased levels of cytokinins in barley leaves having the systemic acquired resistance to *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker. *Journal of Phytopathology* 131 (1991) 101-108.

Scott KJ, Smillie RM. Metabolic regulation in diseased leaves. I. The respiratory rise in barley leaves infected with powdery mildew. *Plant Physiology* 41 (1966) 289-297.

Serezhkina GV, Mishina GN, Kondrateva VV, Ryabchenko AS, Babosha AV, Talieva MN, Avetisyan TV, Lapochkina IF, Andreev LN. The dynamics of abscisic acid and cytokinins content in the leaves of wheat-aegilops lines and their parental forms affected by powdery mildew. *Biology bulletin* 31 (2004) 437 – 442.

Shinshi H, Mohnen D, Meins F. Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (1987) 89-93.

Scholes JD, Farrar JF. Photosynthesis and chloroplast functioning within individual pustules of *Uromyces muscari* on bluebell leaves. *Physiological Plant Pathology* 27 (1985) 387-400.

Scholes JD, Farrar JF. Increased rates of photosynthesis in localized regions of a barley leaf infected with brown rust. *New Phytologist* 104 (1986) 601-612.

Scholes JD, Farrar JF. Development of symptoms of brown rust of barley in relation to the distribution of fungal mycelium, starch accumulation and localized changes in the concentration of chlorophyll. *New Phytologist* 107 (1987) 103-117.

Scholes JD, Lee PJ, Horton P, Lewis DH. Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist* 126 (1994) 213-222.

Scholes JD, Rolfe SA. How do biotrophic pathogens affect the photosynthetic metabolism of their hosts? *Aspects of Applied Biology* 42 (1995) 91-99.

Scholes JD, Rolfe SA. Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199 (1996) 573-582.

Schweizer P, Vallélian-Bindschedler L, Mössinger E. Heat-induced resistance in barley to the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47 (1995) 51-66.

Strnad M. The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* 101 (1997) 674-688.

Sutton PN, Gilbert MJ, Williams LE, Hall JL. Powdery mildew infection of wheat leaves changes host solute transport and invertase activity. *Physiologia Plantarum* 129 (2007) 787-795.

Sutton PN, Henry MJ, Hall JL. Glucose, and not sucrose, is transported from wheat to wheat powdery mildew. *Biomedical and Life Sciences* 208 (1999) 426-430.

Swarbrick PJ, Schulze-Lefert P, Scholes JD. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant Cell Environ* 29 (2006) 1061-1076.

Sziraki I, Barna B, el-Waziri S, Kiraly Z. Effect of rust infection on the cytokinin level of wheat cultivars susceptible and resistant to *Puccinia graminis* F. sp. *tritici*. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 11 (1976) 155–160.

Talíeva MN, Kondrateva VV, Andreev LN. Level of endogenous cytokinins and abscisic and salicylic acids in the leaves of *Phlox paniculata* and *Ph. setacea* under the influence of invasion by conidia of phytopathogens. *Biology Bulletin* 28 (2001) 361–364.

Tamogami S, Rakwal R, Kodama O. Phytoalexin production elicited by exogenously applied jasmonic acid in rice leaves (*Oryza sativa* L.) is under the control of cytokinins and ascorbic acid. *FEBS Letters* 412 (1997) 61-64.

Tang X, Rolfe SA, Scholes JD. The effect of *Albugo candida* (white blister rust) on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* 19 (1996) 967-975

Thrower LB. Host physiology and obligate fungal parasites. *Journal of Phytopathology* 52 (1965) 319-334.

Vallélian-Bindschedler L, Schweizer P, Mössinger E, Métraux JP. Heat-induced resistance in barley to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) is associated with a burst of active oxygen species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52 (1998) 185-199.

Vizárová G, Mishina GN, Sereshkina GV, Andreev LN. Effects of cytokinins on the development of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* conidia. *Biologia* 44 (1989) 415-423.

Vlčková A, Špundová M, Kotabová E, Novotný R, Doležal K, Nauš J. Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum* 126 (2006) 257-267.

Voegelé RT, Stuck C, Hahn M, Mendgen K. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (2001) 8133–8138.

Voegelé RT, Wirsal S, Möll U, Lechner M, Mengen K. Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19 (2006) 625-634.

- Wagner S, Boyle C. Changes in carbohydrate, protein and chlorophyll content and enzyme activity during the switch from uredinio- to teliospore sporulation in the bean-rust fungus *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Link. *Journal of Phytopathology* 143 (1995) 633-638.
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61 (2007) 199-223.
- Walters DR. Shoot: root interrelationships: The effects of obligately biotrophic fungal pathogens. *Biological Reviews* 60 (1985) 47-79.
- Walters DR, Ayres PG. Ribulose biphosphate carboxylase protein and enzymes of CO₂ assimilation in barley infected by powdery mildew (*Erysiphe graminis hordei*). *Journal of Phytopathology* 109 (1984) 208-218.
- Walters DR, McRoberts N. Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science* 11 (2006) 581-586.
- Walters D, Walsh D, Newton A, Lyon G. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology* 95 (2005) 1368-1373.
- Wingler A, Roitsch T. Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology* 10 (2008) 50-62.
- Wright DP, Baldwin BC, Shephard MC, Scholes JD. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. I. Alterations in carbohydrate metabolism. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47 (1995a) 237-253.
- Wright DP, Baldwin BC, Shephard MC, Scholes JD. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47 (1995b) 255-267.
- Yarullina LG, Ibragimov RI, Akhmetov RR. Hormonal balance in wheat infected with *Helminthosporium sativum*. *Biology Bulletin* 28 (2001) 423-425.
- Yong-fu G, Johnson W, Roberts JJ, Rajaram S. Temperature and resistance gene interactions in the expression of resistance to *Blumeria Graminis* f. sp. *Tritici*. *Euphytica* 99 (1998) 103-109.
- Yurina TP, Yurina EV, Karavaev VA, Solntsev MK, Kukushina MA, Ekobena FAP. Physiological characteristics of wheat leaves in cultivars resistant and susceptible to powdery mildew. *Russian Journal of Plant Physiology* 43 (1996) 64-69.
- Zulu JN, Farrar JF, Whitbread R. Effects of phosphate supply on wheat seedlings infected with powdery mildew: carbohydrate metabolism of first leaves. *New Phytologist* 118 (1991) 553-558.

3. Cíle práce

Tato práce je zaměřena na prohloubení znalostí o interakcích mezi hostitelem a patogenem u následujících modelových systémů:

- náchylného genotypu salátu *Lactuca sativa* L. cv. Cobham Green a biotrofního patogenu *Bremia lactucae*.
- náchylného genotypu rajčete *Lycopersicon esculentum* cv. Amateur a středně rezistentního genotypu rajčete *Lycopersicon chmielewski* a biotrofního patogenu *Oidium neolycopersici*.

Cílem práce bylo především zjistit, zda a jakým způsobem biotrofní patogen ovlivňuje fotosyntézu hostitele, čemuž zatím není v patologických studiích věnována dostatečná pozornost. Dalším cílem bylo zjistit, zda exogenní aplikace cytokininů a teplotní ošetření ovlivní rezistenci/náchylnost hostitelských rostlin a jestli tyto vnější zásahy ovlivní změny fotosyntézy způsobené infekcí.

4. Přehled publikovaných výsledků

4.1. Rozmanitost obranných mechanismů při interakci rostlin s oomycety: přehled o *Lactuca* spp. a *Bremia lactucae*

Významnou skupinu rostlinných patogenů představují oomycety, tzv. houby vaječné, zahrnující širokou škálu druhů s různou životní strategií, od biotrofních přes hemibiotrofní až po nekrotrofní patogeny. Důležitým zástupcem původců chorob kulturních rostlin s vysokým ekonomickým dopadem je *Bremia lactucae* vyvolávající plíseň salátovou. Tento patogen napadá více než dvě stě druhů kulturních i planých rostlin z čeledi Asteraceae. Protože se interakce patogenu *B. lactucae* s jednotlivými druhy z rodu *Lactuca* vyznačují rozsáhlou variabilitou v důsledku dlouhé koevoluce, je patosystém *Lactuca* spp. – *B. lactucae* velice často používán jako model pro studium interakcí hostitel-patogen na všech úrovních (od studia populací, jednotlivců, orgánů, pletiv, buněk až po úroveň molekulární, případně genetickou).

Přehledná práce kompletně shrnuje dostupná data nejen o výše zmíněném patosystému, ale především sumarizuje dosud známé informace o samotné plísni salátové. Ačkoli je *B. lactucae* biotrofním patogenem, jehož strategií je získávání živin ze žijícího hostitele a ovlivňuje tedy rostlinný metabolismus včetně fotosyntézy, v literatuře je nedostatek informací o změnách ve fotosyntetických procesech hostitele během patogeneze.

Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae* – A. Lebeda, M. Sedlářová, M. Petřivalský, J. Prokopová. European Journal of Plant Pathology (2008) 122: 71-89.

4.2. Změny ve fotosyntéze listových disků salátu způsobené plísni salátovou v kombinaci s exogenní aplikací cytokininů

Biotrofní patogeny využívající živého hostitele ke svému vývoji jsou známy svou schopností ovlivňovat metabolismus hostitele. Do skupiny biotrofních patogenů patří i *Bremia lactucae* napadající rostliny z čeledi Asteraceae včetně významných plodin rodu *Lactuca*. Přesto není k dispozici dostatek informací o vlivu tohoto

patogenu na fotosyntetické procesy hostitele. Jedním z náchylných genotypů salátu vůči *B. lactucae* je *Lactuca sativa* L. cv. Cobham Green. Právě tento genotyp byl použit v kombinaci s *B. lactucae* Regel (rasa BL 16) ke studiu změn fotosyntézy během kompatibilní interakce hostitel-patogen.

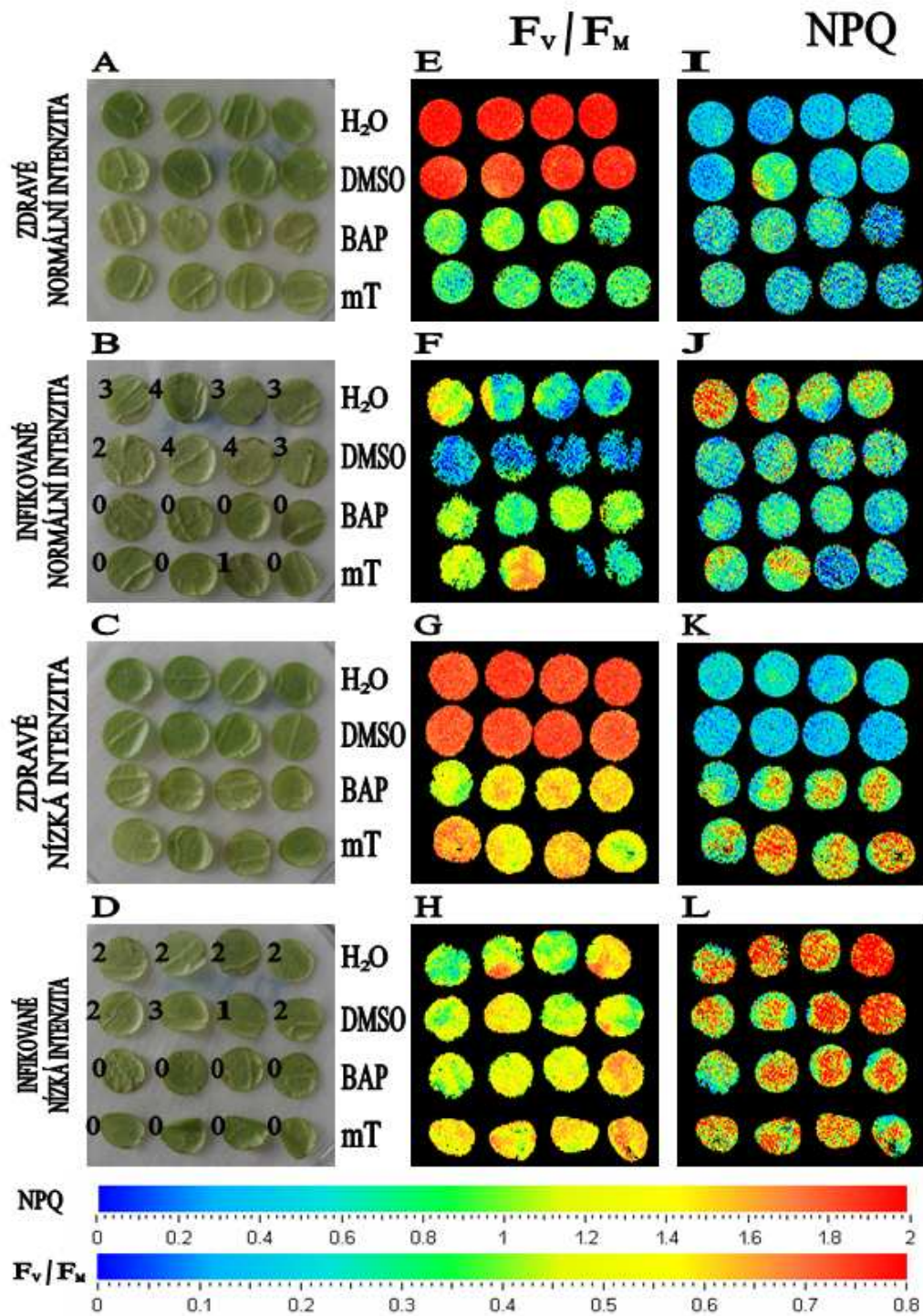
Třináctidenní inkubace patogenu na listových discích salátu vedla k rozvoji *B. lactucae*, především k vývoji hyf a sporulace na abaxiální straně listů a také k vzniku přidružených symptomů, např. tvorbě mírných chloróz pletiva. S rozvojem patogenu bylo zaznamenáno snížení obsahu fotosyntetických pigmentů a došlo k poklesu maximálního výtěžku fotochemie fotosystému II (Obr.1). Dále byla zaznamenána inhibice elektronového transportu a nárůst nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (Obr.1). Zmíněné změny fotosyntetických parametrů byly detekovány v oblastech listových disků kolonizovaných patogenem. Pokles funkčnosti fotosystému II a s tím spojeného elektronového transportu byl zřejmě způsoben tzv. zpětnovazebnou inhibicí Calvinova cyklu a následným poklesem spotřeby NADPH. Předpokládáme, že tato inhibice Calvinova cyklu byla způsobena nárůstem invertázové aktivity a následnou akumulací hexóz. Uvedenou hypotézu potvrzují naše předběžné výsledky ukazující na zvýšenou aktivitu extracelulární invertázy (Obr.2) v napadeném pletivu a také fakt, že u listových disků inkubovaných při vyšší intenzitě fotosynteticky aktivního záření (srovnáváno záření o intenzitě 100 a 25 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mělo působení infekce větší vliv na fotosyntetický aparát, neboť při větší intenzitě záření se dá předpokládat větší příjem excitační energie a tím i silnější zpětnovazebná inhibice fotosyntézy.

Protože existují práce ukazující, že zvýšená koncentrace cytokininů, případně jejich dodatečná aplikace může ovlivnit, respektive potlačit, vliv patogenů na hostitele, byla druhá část projektu zaměřena na studium působení exogenní aplikace vybraných cytokininů na výše zmíněný modelový systém. Listové disky *Lactuca sativa* L. cv. Cobham Green byly 24 hodin před inokulací vloženy na filtrační papír nasáklý 200mM roztokem jednoho ze dvou aromatických cytokininů – benzylaminopurinu nebo *meta*-topolinu. V případě infikovaných listových disků vedlo před-ošetření cytokininy k potlačení rozvoje patogenu: byla pozorována výrazně snížená sporulace na povrchu listových disků po třináctidenní inkubaci. Nicméně u zdravých listových disků ošetření cytokininy a následná inkubace vedla

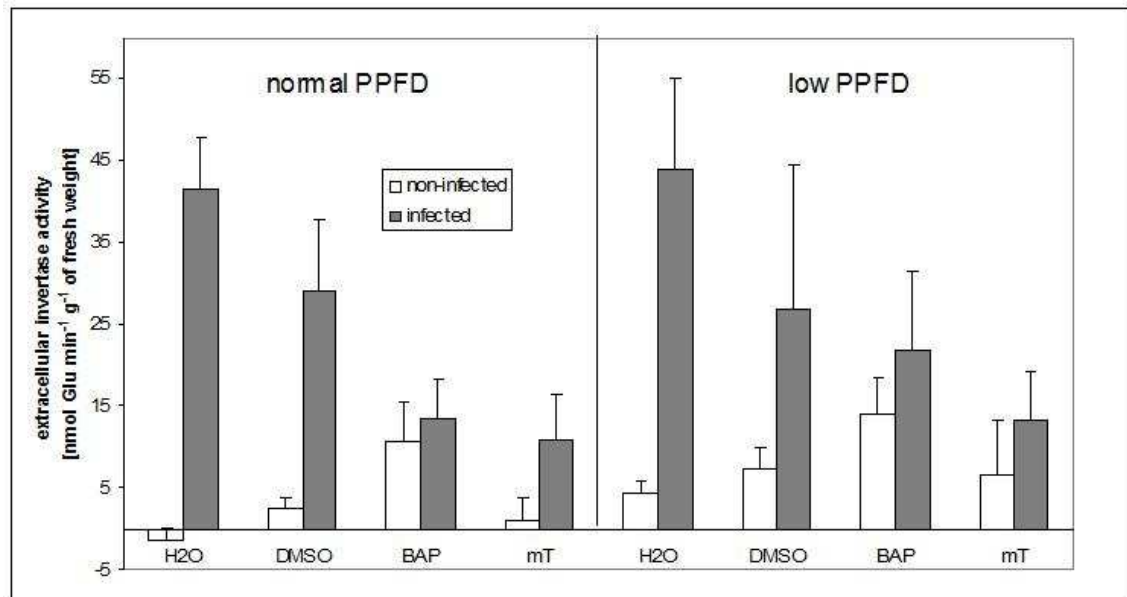
ke zhoršení funkčnosti fotosyntetického aparátu, které bylo méně intenzivní, nicméně srovnatelné se zhoršením způsobeným samotnou infekcí. I v tomto případě bylo zhoršení stavu fotosyntetického aparátu patrně způsobeno zpětnovazebnou inhibicí Calvinova v cyklu v důsledku akumulace hexóz, protože je známo, že zvýšená koncentrace cytokininů zvyšuje invertázovou aktivitu. Naše předběžné výsledky skutečně potvrdily zvýšenou aktivitu extracelulární invertázy v listových discích ošetřených benzylaminopurinem (Obr.2).

Infikování salátu *Lactuca sativa* L. cv. Cobham Green biotrofním patogenem *B. lactucae* vedlo ke zhoršení funkčnosti fotosyntetického aparátu, které zřejmě souviselo se snahou patogenu uzpůsobit metabolické pochody hostitele ve svůj prospěch. I když v této interakci exogenní aplikace cytokininů účinně potlačila rozvoj patogenu, způsob aplikace, zvolená koncentrace či délka působení nebyla optimální z hlediska zachování funkčnosti fotosyntézy hostitele. Pro použití v polních podmínkách je tato metoda nevhodná, neboť je potřeba rostliny ošetřit před napadením patogenem a navíc je otázka, zda lze změnou koncentrace cytokininů eliminovat jejich negativní dopad na fotosyntézu zdravých rostlin a zachovat přitom ochrannou funkci cytokininů.

Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment - J. Prokopová, M. Špundová, M. Sedlářová, A. Husičková, R. Novotný, K. Doležal, J. Nauš, A. Lebeda. *Plant Physiology and Biochemistry* (2010) 48: 716-723.



Obr.1 Fotografie listových disků *L. sativa* (Cobham Green) (A-D) a prostorová distribuce fotosyntetických parametrů v rámci těchto disků naměřených pomocí fluorescence chlorofylu: maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m ; E-H) a nefotochemické zhášení chlorofylové fluorescence (NPQ; I-L). Stupeň sporulace 13 dní po inokulaci je uveden na fotografiích u příslušných infikovaných disků (B a D). Inkubační médium – voda, DMSO nebo cytokininy (BAP-benzylaminopurin a mT- *meta*-topolin), stejně jako intenzita záření během inkubace jsou uvedeny po levé straně obrázku.



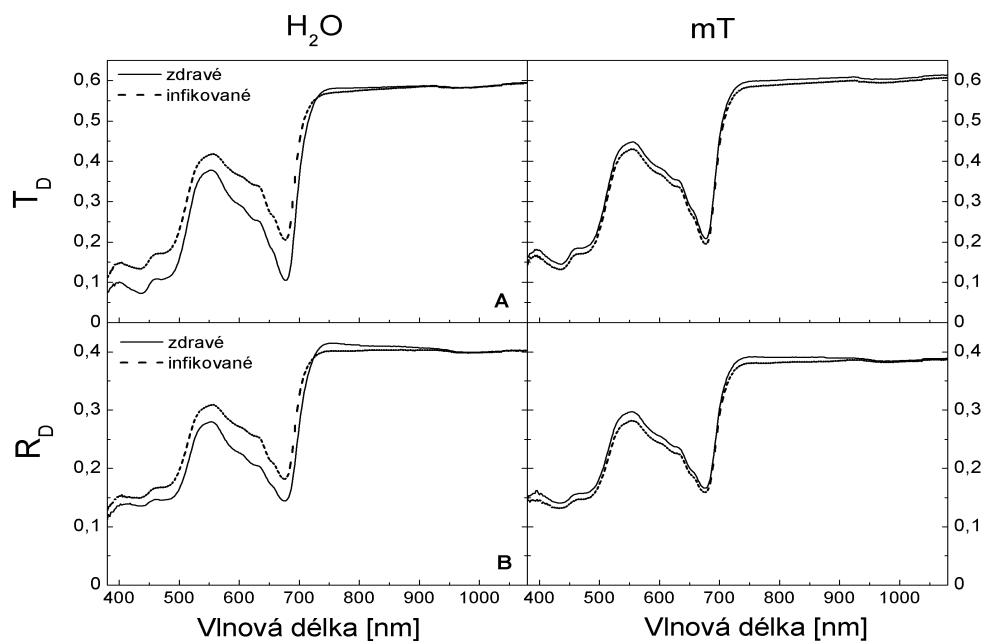
Obr.2 Aktivita extracelulární invertázy v listových discích – neinfikovaných a infikovaných *B. Lactucae*, 13 dní po inokulaci, inkubované při dvou intenzitách záření (normal a low PPFD) na inkubačních médiích – voda, DMSO nebo cytokininy (BAP- benzylaminopurin a mT- *meta*-topolin). Uvedeny jsou průměry a SD, n=3.

4.3. Vliv *meta*-topolinu na optické vlastnosti listových disků salátu infikovaných *Bremia lactucae*

Působení biotrofního patogenu, případně exogenní aplikace cytokininu může ovlivňovat i optické parametry listu, které poskytují informace o struktuře listu. Listové disky salátu *Lactuca sativa* L. cv. Cobham Green infikované *B. lactucae* vykazovaly zvýšenou difúzní transmitanci i reflektanci ve viditelné části spektra, což korelovalo s pozorovaným poklesem obsahu fotosyntetických pigmentů. Naopak shoda spekter infikovaných a zdravých listových disků v infračervené oblasti naznačuje, že infekce nevedla k poklesu obsahu vody, ani k výrazným strukturálním změnám v pletivu listových disků. Aplikace cytokininu *meta*-topolinu měla u zdravých i infikovaných listů stejný efekt – došlo k nárůstu difúzní reflektance i transmitance, což byl zřejmě důsledek urychlení sensecense listových disků působením cytokininu. Tyto změny nebyly v případě infikovaných listových disků ovlivněny působením patogenu (Obr.3). Ze spekter difúzní reflektance lze vyvozovat, že patogen i cytokininy potlačují schopnost listu měnit funkční polaritu. Zatímco zdravé a neošetřené listy se dokázaly přizpůsobit dlouhodobé inkubaci, kdy

světlu byla vystavena abaxiální strana, a změnit vnitřní uspořádání listu, infikované listy a listy ošetřené cytokininy tuto schopnost neměly.

Protože optické parametry listu odrážejí jeho strukturu a ta může být působením patogenu ovlivněna, je tato metoda vhodným doplňkem při studiu interakcí hostitel-patogen, zejména při studiu změn fotosyntetického aparátu napadené rostliny.



Obr.3 Změny spekter difúzní transmittance (T_D ; A,B) a difúzní reflektance (R_D ; C,D) ve zdravých a infikovaných listových discích salátu ošetřených vodou (H_2O) nebo *meta*-topolinem (mT). Spektra byla měřena na abaxiální straně listových disků, zobrazeny jsou průměry, $n=3$.

The effect of *meta*-topolin on optical parameters of lettuce leaf discs infected by *Bremia lactucae* - J. Prokopová, J. Nauš, M. Špundová, M. Sedlářová. In: Lebeda A. and Spencer-Phillips P.T.N. (Eds.): Advances in downy mildew research, Vol. 3. Univerzita Palackého v Olomouci a Jola, v.o.s. Kostelec na Hané (2007) str. 73 – 78.

4.4. Změny ve fotosyntéze rostlin druhu *Lycopersicon* vyvolané padlím rajčatovým v kombinaci s teplotním šokem

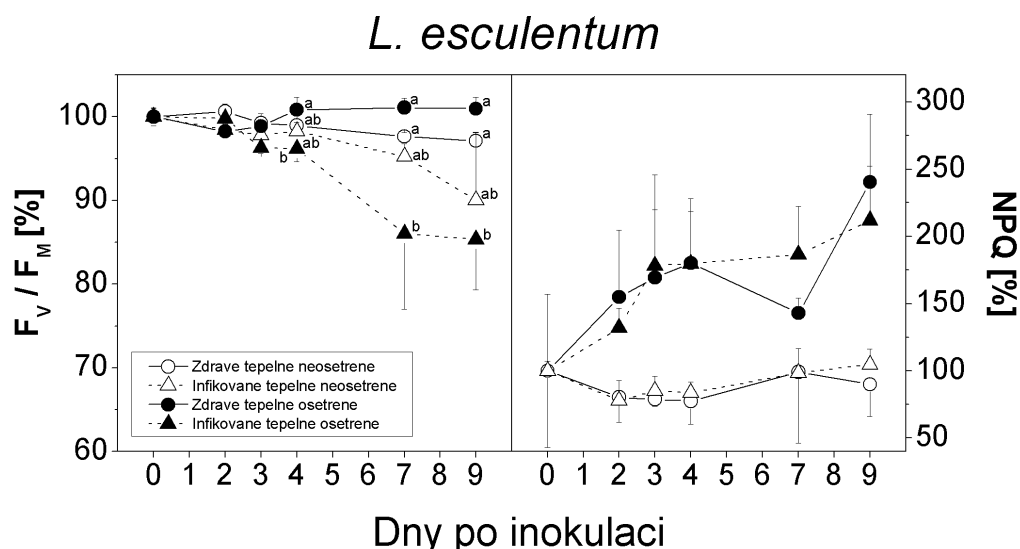
Oidium neolycopersici je biotrofní patogen způsobující padlí rajčatové. Tento patogen se od svého objevení rychle šíří po celém světě, přičemž všechny dosud testované komerční kultivary rajčat jsou vůči tomuto patogenu náchylné. Do této skupiny se řadí i genotyp *Lycopersicon esculentum* cv. Amateur. Naopak genotyp *Lycopersicon chmielewskii* je středně rezistentní a napadení padlím rajčatovým vede v jeho případě k intenzivní hypersenzitivní reakci.

Během prvních devíti dnů po inokulaci došlo u náchylného genotypu k plnému rozvoji patogenu, zatímco u středně rezistentního genotypu se druhý den po inokulaci sice objevilo na povrchu listů vyvíjející se mycelium, nicméně se ve stejnou dobu projevila také hypersenzitivní reakce v podobě černých teček odpovídajících shlukům mrtvých buněk. Následovala postupná nekrotizace pletiva, vadnutí, ohyb a následný opad listů. U fotosyntetických parametrů došlo vlivem infekce pouze k nepatrnému zhoršení a to u obou genotypů.

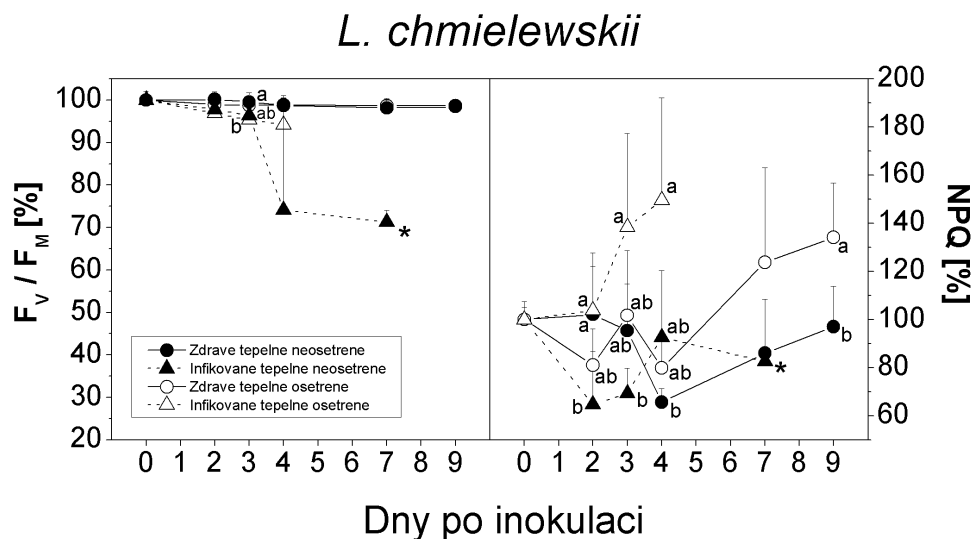
U náchylného genotypu došlo k patrnějším změnám devátý den po inokulaci, kdy byl pozorován mírný pokles maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (Obr.4) a nárůst nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu. Z těchto výsledků lze usuzovat, že ve sledovaném období u hostitele zřejmě nedošlo ke zpětnovazební inhibici Calvinova cyklu v důsledku akumulace hexóz. Otázkou zůstává, zda patogen nezpůsobil aktivaci extracelulární invertázy či k této aktivaci došlo, ale spotřeba asimilátů byla v důsledku patogenní infekce natolik zvýšena, že nedošlo k akumulaci hexóz. Lze předpokládat, že tento stav byl pouze dočasný a k inhibici mohlo dojít v pozdějších, námi nesledovaných fázích patogeneze.

Ani středně rezistentní genotyp nevykazoval výraznější změny ve funkčnosti fotosyntetického aparátu. Pouze čtvrtý den po inokulaci byl zaznamenán mírný pokles maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (Obr.5) a nárůst nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu. Tyto změny však zřejmě byly způsobeny spíše rozvojem hypersenzitivní reakce v napadených listech a následným vadnutím listů a nekrotizací pletiva. Ve prospěch tohoto tvrzení svědčí i heterogenní

rozložení změn nefotochemického zhášení v ploše listu - nárůst nefotochemického zhášení byl zaznamenán především ve více povadlých okrajových částech listu.



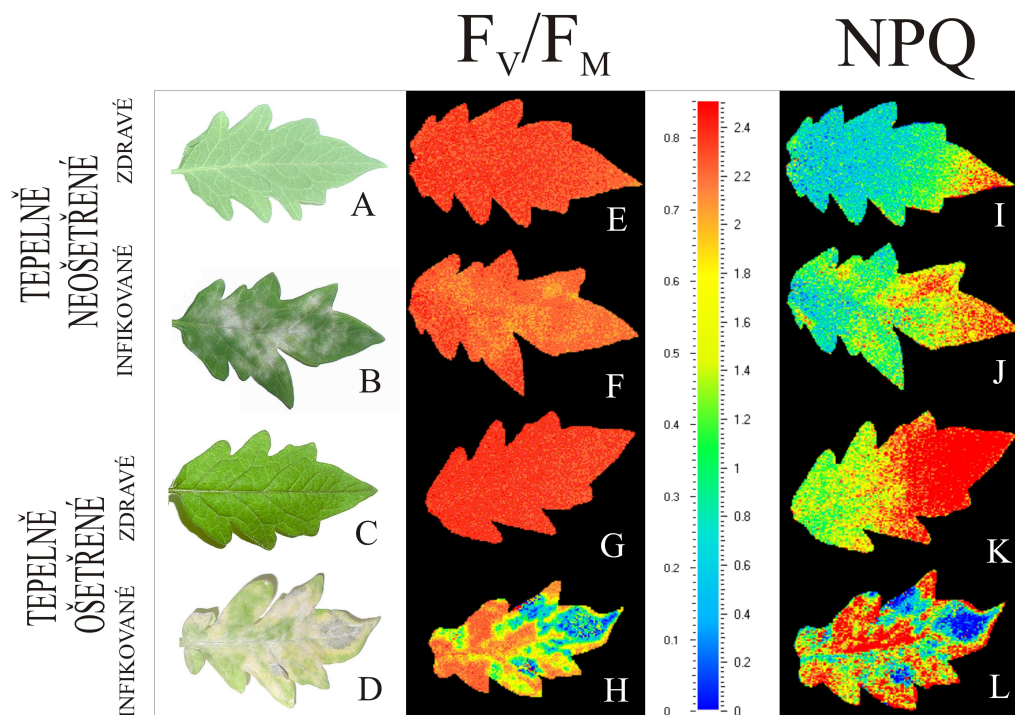
Obr.4 Procentuální změny v maximálním kvantovém výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m ; 100% = 0,803 pro tepelně neošetřené a 0,768 pro tepelně ošetřené listy) a ustálená hodnota nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (NPQ; 100% = 1,3 pro tepelně neošetřené a 0,77 pro tepelně ošetřené listy) ve zdravých a padlím infikovaných (*O. Neolycopersici*) listech náchylného genotypu rostlin rajčete (*L. esculentum* cv. Amateur) během prvních 9. dní po inokulaci. Bod „nula“ představuje listy před inokulací a tepelným ošetřením. Ukázány jsou průměry a SD, n=4.



Obr.5 Procentuální změny v maximálním kvantovém výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m ; 100% = 0,77 pro tepelně neošetřené a 0,77 pro tepelně ošetřené listy) a ustálená hodnota nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (NPQ; 100% = 1,07 pro tepelně neošetřené a 1,59 pro tepelně ošetřené listy) ve zdravých a padlím infikovaných (*O. Neolycopersici*) listech středně rezistentního genotypu rostlin rajčete (*L. chmielewskii*) během prvních 9. dní po inokulaci. Bod „nula“ představuje listy před inokulací a tepelným ošetřením. Ukázány jsou průměry a SD, n=4.

Vzhledem k tomu, že teplota může ovlivnit fotosyntetické procesy, potažmo invertázovou aktivitu, nabízí se otázka, zda vystavení potenciálních hostitelů zvýšené okolní teplotě může ovlivnit rezistenci/náchylnost vůči patogenům. U středně rezistentního genotypu nevedlo vystavení rostliny zvýšené teplotě (40,5°C, 2 h, těsně před inokulací) ke změnám ve funkčnosti fotosyntetického aparátu, ani k viditelným změnám v průběhu rezistentní reakce na napadení *O. neolycopersici*. Naopak u náchylného genotypu došlo k výrazným změnám při kombinaci tepelného ošetření s působením infekce. V průběhu prvních devíti dní po inokulaci došlo na infikovaných listech hostitele k rozvoji chloróz, které se postupně přeměnily na nekrotické léze. Tento makroskopický projev kombinovaného stresu infekce s teplotním ošetřením byl doprovázen výraznými změnami ve fotosyntetických parametrech, kdy byl zaznamenán signifikantní pokles rychlosti asimilace CO₂ a maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (Obr.6). Změny ve fotosyntetických procesech způsobené kombinací infekce a tepelného ošetření mohly být způsobeny nárůstem spotřeby asimilátů vlivem indukce obranných reakcí tepelným ošetřením. Zvýšená spotřeba by pak měla za následek nárůst invertázové aktivity, s tím spojenou akumulaci hexóz a následnou inhibici fotosyntézy. Nicméně tato hypotéza vyžaduje podrobnější studium zapojení invertázy v těchto procesech.

Changes in photosynthesis of *Lycopersicon* spp. plants induced by tomato powdery mildew infection in combination with heat shock pre-treatment - J. Prokopová, B. Mieslerová, V. Hlaváčková, J. Hlavinka, A. Lebeda, J. Nauš, M. Špundová. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2010) 74: 205-213.



br.6 Fotografie (A-D) reprezentativních zdravých a padlím infikovaných (*O. Neolycopersici*) listů náchylného genotypu rostlin rajčete (*L. esculentum* cv. Amateur) tepelně ošetřených a neošetřených. Obrázky maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_M ; E-H) a ustálené hodnoty nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (NPQ; I-L) ve stejných listech. Všechny obrázky byly pořízeny devátý den po inokulaci.

5. Přílohy

K práci jsou přiloženy následující články:

1. **Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae***
A. Lebeda, M. Sedlářová, M. Petřivalský, **J. Prokopová**
European Journal of Plant Pathology (2008) 122: 71-89.
2. **Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment**
J. Prokopová, M. Špundová, M. Sedlářová, A. Husičková, R. Novotný, K. Doležal, J. Nauš, A. Lebeda
Plant Physiology and Biochemistry (2010) 48: 716-723.
3. **The effect of *meta*-topolin on optical parameters of lettuce leaf discs infected by *Bremia lactucae***
J. Prokopová, J. Nauš, M. Špundová, M. Sedlářová.
In: Lebeda A. and Spencer-Phillips P.T.N. (Eds.): Advances in downy mildew research, Vol. 3. Univerzita Palackého v Olomouci a Jola, v.o.s. Kostelec na Hané (2007) str. 73 – 78.
4. **Changes in photosynthesis of *Lycopersicon* spp. plants induced by tomato powdery mildew infection in combination with heat shock pre-treatment**
J. Prokopová, B. Mieslerová, V. Hlaváčková, J. Hlavinka, A. Lebeda, J. Nauš, M. Špundová
Physiological and Molecular Plant Pathology (2010) 74: 205-213.