

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Patogeneze *Phytophthora* spp. a reakce
hostitelských rostlin**

Bakalářská práce

Jana Poláková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

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

Tato bakalářská práce byla řešena na Katedře botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci s podporou interního grantu UP IGA _PrF_2016_001.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím literárních zdrojů uvedených v seznamu citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Jana Poláková

Poděkování

Děkuji své školitelce doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. z Katedry botaniky PřF UP za její odborné vedení a trpělivost po celou dobu zpracovávání mé bakalářské práce, za poskytnutí literatury a za hodnotné rady během konzultací.

Ráda bych poděkovala také laborantkám Drahomíře Vondrákové a Pavle Šíkové za pomoc při autoklávování kultivačních médií.

Mé poděkování patří rovněž kolektivu Katedry biochemie PřF UP, zejména pak Mgr. Tereze Tiché za ochotnou asistenci během analýzy GSNO(R).

V neposlední řadě patří velké díky mým rodičům za umožnění studia a za jejich morální i psychickou podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Poláková
Název práce	Patogeneze <i>Phytophthora</i> spp. a reakce hostitelských rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D. (Katedra botaniky, PřF UP v Olomouci)
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Bakalářská práce byla zaměřena na studium role reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) během patogeneze plísně bramborové na rajčeti. Rostliny 4 genotypů rajčete (*S. esculentum* L. cv. Amateur a Micro-Tom, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*) byly inokulovány sporangii *Phytophthora infestans*. V průběhu 168 h po inokulaci byl v listech stanoven obsah *S*-nitrosothiolů (SNOs) a aktivita *S*-nitrosoglutathion reduktasy (GSNOR), enzymu regulujícího jejich hladinu v buňkách. Nižší hladiny SNOs byly detekovány v genotypech *S. esculentum*, které jsou náchylnější k infekci.

V klíčících sporangii *P. infestans* byly RONS lokalizovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Tvorba ROS a NO není u tohoto patogenu tak výrazná jako u jiných dosud studovaných původců mykóz.

Klíčová slova	<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Solanum</i> spp., reaktivní formy kyslíku, reaktivní formy dusíku, GSNO, GSNOR
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Čeština

Bibliographic identification

Author's first name and surname	Jana Poláková
Title	Pathogenesis of <i>Phytophthora</i> spp. and reactions of host plants
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor	doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D. (Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc)
The year of presentation	2016

Abstract

This bachelor thesis was focused on the role of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) during development of late blight on tomato. Plants of 4 genotypes of tomato (*S. esculentum* L. cv. Amateur and Micro-Tom, *S. chmielewskii* and *S. habrochaites*) were inoculated by sporangia of *Phytophthora infestans*. In the course of 168 hours post inoculation both concentration of *S*-nitrosothiols (SNOs) and activity of *S*-nitrosogluthation reductase (GSNOR; an enzyme regulating SNOs levels) were analysed in leaves. Lower levels of SNOs were found in *S. esculentum* genotypes which are more susceptible to infection.

In addition, RONS were localized in germinating sporangia of *P. infestans* by confocal laser scanning microscopy. Formation of ROS and NO was lower than in other phytopathogenic fungi and fungi-like organisms studied so far.

Keywords	<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Solanum</i> spp., reactive oxygen species, reactive nitrogen species, GSNO, GSNOR
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1. CÍLE PRÁCE	7
2. ÚVOD	8
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
3.1. Obecná charakteristika <i>Phytophthora</i> spp.....	9
3.2. Biologie a životní cyklus <i>Phytophthora</i> spp.	9
3.3. <i>Phytophthora infestans</i>	10
3.3.1. Životní cyklus <i>P. infestans</i>	11
3.3.2. Patogeneze <i>P. infestans</i>	13
3.3.3. Příznaky napadení <i>P. infestans</i>	14
3.3.4. Média pro kultivaci <i>P. infestans</i>	15
3.4. Interakce mezi hostitelskou buňkou a <i>Phytophthora</i> spp.....	16
3.4.1. Obranné mechanismy rostliny.....	18
3.5. Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) a jejich role v obraně rostlin vůči patogenům.....	19
3.5.1. Charakteristika a metabolismus reaktivních forem kyslíku	19
3.5.2. Charakteristika a metabolismus reaktivních forem dusíku	20
3.5.3. <i>S</i> -nitrosoglutathion (GSNO), jeho charakteristika a funkce	22
3.6. Princip a využití konfokální mikroskopie	23
4. MATERIÁL A METODY	25
4.1. Použité chemikálie, roztoky a jejich složení	25
4.2. Použité přístroje	26
4.3. Biologický materiál	27
4.3.1. <i>Phytophthora infestans</i>	27
4.3.2. Příprava růstových médií a kultivace <i>Phytophthora infestans</i>	27
4.3.3. Izolace zoospor u <i>Phytophthora infestans</i>	28
4.3.4. Rostlinný materiál	28
4.3.5. Inokulace rostlin.....	29
4.4. Měření aktivity GSNOR v inokulovaných listech	30
4.5. Stanovení obsahu <i>S</i> -nitrosothiolů v rostlinném materiálu.....	32
4.6. Stanovení koncentrace proteinů v rostlinném materiálu	32
4.7. Lokalizace RONS v klíčících sporangíích <i>Phytophthora infestans</i>	33
5. VÝSLEDKY	34
5.1. Vizuální hodnocení symptomů u inokulovaných pletiv	34
5.2. Aktivita GSNOR v inokulovaných listech rajčete	35
5.3. Hladina <i>S</i> -nitrosothiolů v inokulovaných listech rajčete.....	36
5.4. Detekce RONS v klíčících sporangíích <i>P. infestans</i>	38
6. DISKUZE.....	41
7. ZÁVĚR.....	45
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	52

1. CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše, zaměřené na:

- Charakteristiku a biologii *Phytophthora* spp. se zaměřením na *Phytophthora infestans*.
- Interakci mezi patogenem a hostitelskou rostlinou se zaměřením na charakteristiku a roli elicitinů v obraně rostliny a na obranné mechanismy rostliny po napadení patogenem.
- Charakteristiku a metabolismus reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) a na jejich uplatnění v obraně rostlin vůči patogenům.

Náplní experimentální části práce bylo:

- Zvládnout techniky kultivace *P. infestans* na pevných médiích.
- Inokulovat listy *Solanum* spp. hemibiotrofním patogenem *Phytophthora infestans* a vyhodnotit výsledné symptomy.
- Stanovit specifickou aktivitu GSNOR v rostlinném materiálu v průběhu 168 hodin po inokulaci *P. infestans*.
- Stanovit obsah S-nitrosothiolů a koncentraci proteinů v rostlinném materiálu.
- Pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie lokalizovat RONS v klíčících sporangíích *Phytophthora infestans*.

2. ÚVOD

Rod *Phytophthora* zahrnuje patogeny, kteří napadají širokou škálu rostlin. Nejvýznamnějším hostitelem *Phytophthora infestans* (plísň bramborové) je *Solanum tuberosum* L. (brambor hlíznatý), na jehož výnosu dokáže *P. infestans* za vhodných podmínek způsobit velké ekonomické ztráty. Patogen dále působí škody i v případě pěstování *Solanum lycopersicum* L. (rajčete jedlého).

Pro růst a kultivaci *P. infestans* je možno využít široké spektrum živných médií, např. mrkvový agar, V8 médium, fazolový či žitný agar.

Reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS) jsou produkovány jak rostlinou, tak patogenem a jejich funkcí je především ochrana vůči biotickému i abiotickému stresu. ROS se u rostlin vystavených stresu ve větší míře podílejí na změnách genové exprese a na hypersenzitivní reakci (HR).

RNS zahrnují sloučeniny odvozené od oxidu dusnatého (NO). NO se v rostlinných buňkách podílí na velké škále fyziologických procesů, kupříkladu na senescenci listů, růstu kořenů či otevírání a uzavírání průduchů. Přírodním rezervoárem NO je *S*-nitrosoglutathion (GSNO), který bývá redukován na velké množství produktů enzymem *S*-nitrosoglutathion reduktasou (GSNOR).

K experimentu byly využity 4 genotypy rajčete (*Solanum esculentum* L. cv. Amateur, *S. esculentum* L. cv. Micro-Tom, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*), navzájem se lišící rezistencí vůči abiotickým stresovým faktorům a vůči infekci padlí (*O. neolycopersici*). Zmíněný rostlinný materiál byl inokulován *P. infestans* a u všech genotypů rajčat byla následně studována úloha a metabolismus RONS, hladina GSNO a aktivita GSNOR.

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Obecná charakteristika *Phytophthora* spp.

Rod *Phytophthora* představuje skupinu eukaryotických hemibiotrofních patogenů rostlin, kteří jsou řazeni do říše Chromista (syn. Stramenopila, Straminipila), oddělení Peronosporomycota, třídy Oomycetes, řádu Peronosporales, čeledi Pythiaceae (Kalina *et* Váňa, 2005). Dříve byly tyto organismy řazeny do říše Fungi (Margulis *et* Schwartz, 1988), podle novějších systémů jsou zařazovány do taxonu Chromalveolata (Adl *et al.*, 2005).

Zástupci rodu *Phytophthora* parazitují na hostitelských rostlinách, především na dvouděložných, u kterých způsobují různé choroby. Pro některé druhy je typická specializace, pro jiné naopak schopnost napadat široké spektrum hostitelů. (Lebeda *et al.*, 2006). Dosud bylo identifikováno přes 100 druhů zmíněného rodu, předpokládá se však existence dalších druhů (Gallegly *et* Hong, 2008).

Stélka bývá obvykle endobiotická, mycelium je vláknité, větvené a nepřehrádkované. Buněčná stěna je složena z celulosy a β -1,3-glukanu, který slouží i jako zásobní látka (Kalina *et* Váňa, 2005).

3.2. Biologie a životní cyklus *Phytophthora* spp.

Rozmnožování zástupců rodu *Phytophthora* probíhá nepohlavním a pohlavním způsobem, infekční cyklus tedy označujeme jako heterogenní. Nepohlavní rozmnožování zahrnuje tvorbu sporangia na specializovaných hyfách, tzv. sporangioforech. Uvnitř se diferencují dvoubičíkaté zoospory, které postupem času za vhodných podmínek encystují a dávají tak vzniku sekundárních zoospor ledvinovitého tvaru. Bičíky bývají umístěny laterálně; přední bičík je delší a péřitý, bičík směřující dozadu je kratší a hladký (Kalina *et* Váňa, 2005). V nepříznivých podmínkách prostředí se na myceliu tvoří chlamydospory, které jsou většinou sférické, bezbíčíkaté a díky zesílené buněčné stěně slouží k přežití.

Pohlavním procesem *Phytophthora* spp. je oogametangiogamie, kdy dochází ke splývání samčích (kyjovitá antheridia) a samičích pohlavních orgánů (kulovitá oogonia). Po kontaktu samčího gametangia se samičím dochází ke vzniku oplozené oosféry, která se vyvíjí v tlustostěnnou oosporu a ta se s rozpadem rostlinných pletiv na podzim dostává do půdy (Kalina *et* Váňa, 2005). V jarním období pak z oospory vyklíčí sporangium a životní cyklus pokračuje během sezóny nepohlavním rozmnožováním.

3.3. *Phytophthora infestans*

První zmínky o patogenu pocházejí z roku 1845, kdy francouzský mykolog Camille Montagne popsal houbu *Botrytis infestans* coby příčinu choroby brambor. V letech 1861 – 1863 pak německý mikrobiolog Heinrich Anton de Bary publikoval dva spisy, ve kterých popsal životní cyklus plísně, nově nazvané *Phytophthora infestans* a zařazené do rodu Peronosporaceae (de Bary, 1876).

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary (plíseň bramborová) napadá převážně rostliny z čeledi *Solanaceae*. Nejvýznamnějším hostitelem tohoto patogenu je *Solanum tuberosum* L. (brambor hlíznatý), na jehož výnosu způsobí *P. infestans* za příznivých podmínek ekonomické ztráty až 70 % (Juroch, 2011). *Phytophthora infestans* působí škody také při pěstování *Solanum lycopersicum* L. (rajčete jedlého), papriky, petúnií či tabáku (Juroch, 2011). Hospodářské škody způsobené plísní bramborovou ročně dosahují až 6,7 miliard USD (Haverkort *et al.*, 2008).

O původu patogenu existují dvě teorie. První z nich je založena na předpokladu, že patogen pochází z oblasti shodné s výskytem jeho hostitele, tj. z horských oblastí And v Jižní Americe (Lebeda *et al.*, 2006). V současné době je ale akceptována spíše domněnka, že *P. infestans* se rozšířila z centrálních oblastí Mexika (Goss *et al.*, 2014) do Spojených států a Kanady. V průběhu 19. století byly infikované hlízy prostřednictvím lodní dopravy zavlčeny do Evropy. Dosud největší zaznamenané škody způsobila *P. infestans* roku 1845 v Irsku, kde došlo téměř ke kompletnímu zničení úrody brambor, což vedlo až k hladomoru, během kterého zemřelo cca milion lidí a řada dalších obyvatel emigrovala do zámoří (Nowicki *et al.*, 2012a). Postupem času se pohlavní typ patogenu, označovaný jako A1, rozšířil do všech zemí světa, pěstujících rajčata či brambory, kdežto pohlavní typ A2 zatím není zcela rozšířen (Juroch, 2011).

Analýza genomu *P. infestans* kmene T30-4, prováděná pod vedením výzkumného týmu z Broad Institutu v USA, ukázala velikost genomu přibližně 240 megabází (Mb), což činí z *P. infestans* T30-4 zástupce s největším a nejkomplexnějším genomem v rámci třídy Oomycetes (Haas *et al.*, 2009).

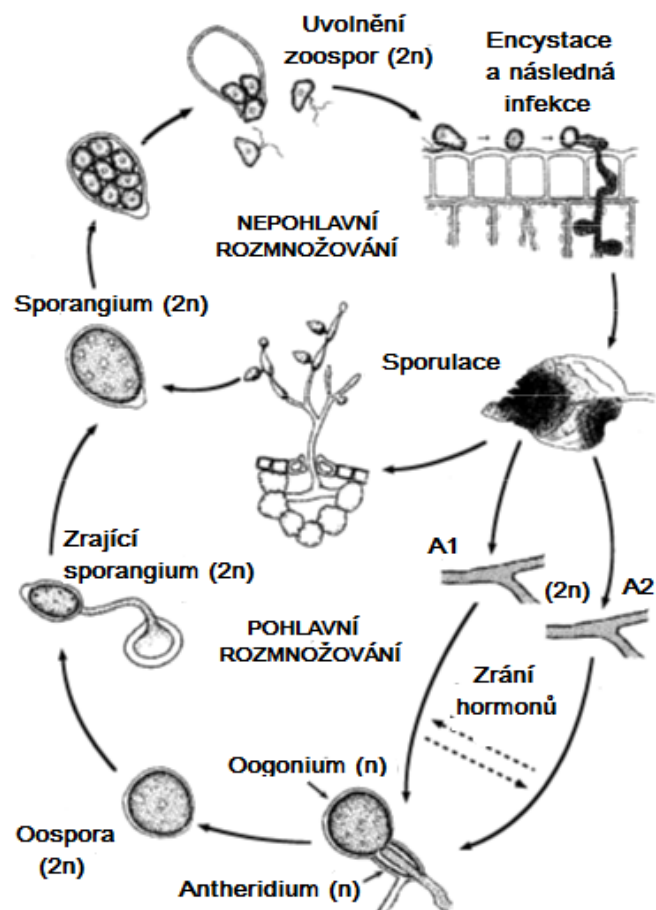
3.3.1. Životní cyklus *P. infestans*

Reprodukce *P. infestans* může probíhat, stejně jako u ostatních zástupců rodu *Phytophthora*, buď asexuálním, nebo sexuálním způsobem. I zde platí, že nepohlavní rozmnožování bývá častější a hraje v životním cyklu patogenu mnohem větší roli. Životní cyklus *P. infestans* ilustruje Obr. 1.

Asexuální způsob reprodukce spočívá v produkci sporangií, která umožňuje snadnější šíření větrem či kapkami deště (Cohen *et al.*, 1997). Sporangia jsou vejčitého, citrónkovitého tvaru (Obr. 2), se stopkou menší než 3 μm (Erwin *et Ribeiro*, 1996). Jejich rozměry bývají variabilní; nejčastěji uváděná šířka sporangií se pohybuje mezi 12 – 20 μm , délka dosahuje obvykle 21 – 30 μm (Juroch, 2011). Pro vytvoření a následné klíčení sporangia je nezbytná vysoká vlhkost a teplota 10 - 24 °C, např. Mayton *et al.* (2000) uvádějí jako teplotní optimum 15 °C.

Phytophthora infestans je heterotalický organismus, zahrnující dva dosud známé pohlavní typy, označované jako A1 a A2 (Brasier, 1992). K pohlavnímu rozmnožování dochází jen za předpokladu, že jsou přítomny oba zmíněné pohlavní typy (Agrios, 2005), které vzájemně interagují a vznikají tak samčí pohlavní buňky antheridia a samičí pohlavní buňky oogonia (Drenth, 1994). Oogonium pak prorůstá antheridiem a v průběhu meiózy dochází v jádrech k redukci počtu chromosomových sad. Zbylé jádro antheridia následně splývá s jádrem oogonia a vyvíjí se silnostěnná oospora s velikostí až 35 μm v průměru (Erwin *et Ribeiro*, 1996), která za vhodných podmínek vyklíčí ve sporangium a životní cyklus dále probíhá stejně jako v případě asexuálního rozmnožování.

Studiem poměrů pohlavních typů A1 a A2 při vzájemné interakci se zabývali Cohen *et al.* (1997), kteří vyvrátili tvrzení, že tvorba oospor je možná pouze při poměru 1 : 1. Zjistili také, že některé typy A1 a A2 se mohou mezi sebou vzájemně lišit fertilitou. Vzhledem k tomu, že ještě donedávna byl znám pouze pohlavní typ A1, se autoři Nowicki *et al.* (2012a) domnívají, že pohlavní reprodukce nehraje tak důležitou roli v onemocnění hostitelských rostlin a že rekombinace přispívá spíše ke zvýšení vnitrodruhové variability, tzn. dává vznik novým a agresivnějším rasám patogenu.



Obr. 1: Životní cyklus *Phytophthora infestans*. (Upraveno podle: Judelson, 1997).



Obr. 2: Uvolněná sporangia *P. infestans* při zvětšení 400x.

3.3.2. Patogeneze *P. infestans*

Pro *P. infestans* je typické, že napadá na hostitelské rostlině z největší části listy (Kalina *et* Váňa, 2005), může však také napadat stonky, plody či hlízy. Patogen spadá mezi tzv. hemibiotrofy, což znamená, že využívá režimu dvoustupňové infekce, přičemž v ranné fázi získává haustorii živiny pro vývoj mycelia z živé hostitelské buňky a následně působí rozsáhlé nekrózy pletiv hostitele a roste saprotrofně (Nowicki *et al.*, 2012a).

Infekce hostitelské rostliny obvykle začíná okamžikem, kdy se sporangium, přenesené na rostlinu pomocí větru či deště, usídí na některém z rostlinných orgánů a uvolní zoospory. Ty bývají opatřené dvěma bičíky a ve sporangiu se jich nachází obvykle 3 – 8, někteří autoři uvádějí až 16 zoospor. Zoospory za vhodných podmínek encystují a vytvářejí klíční hyfu (Obr. 3), penetrující do hostitelského pletiva (Judelson, 1997). Infekční útvary následně vytvářejí v hostitelské buňce mycelium, které prorůstá mezibuněčnými prostory a umožňuje vznik haustoria, struktury specializované na získání živin z buňky hostitele (Nowicki *et al.*, 2012a).

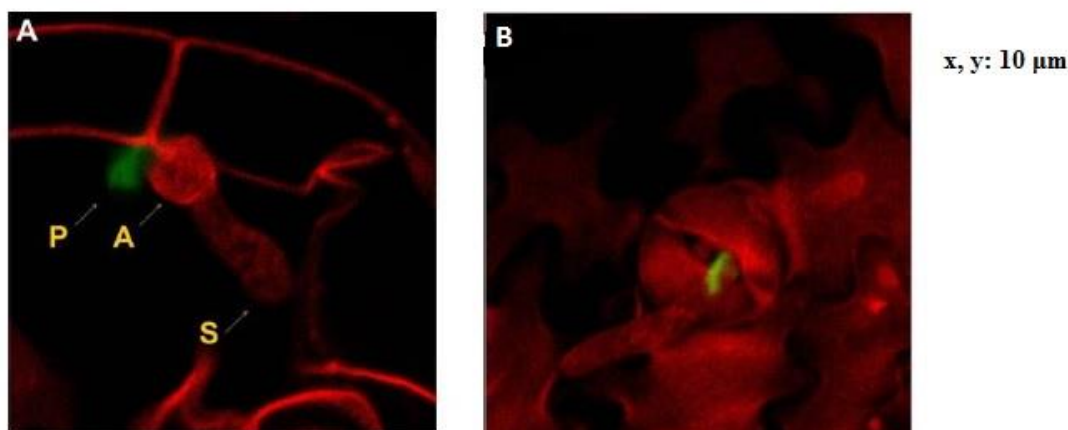


Obr. 3: Sporangium *P. infestans* klíčící v infekční hyfu (zvětšení 400x).

Infekce může také probíhat i přes průduchy, kdy i v tomto případě proniká apresorium do pletiva hostitele a dochází ke vzniku mycelia. Jakmile začnou infikovaná pletiva nekrotizovat, mycelium vyvíjí sporangiofory, které začnou produkovat velké množství

sporangii a tím umožní pokračování infekčního cyklu. Za předpokladu, že napadení proběhne úspěšně a rostlina je na patogen náchylná, může celá rostlina uhynout během 5 až 10 dnů.

Proces patogeneze *P. infestans* na rajčeti (*Solanum lycopersicum* L.) byl studován pomocí metody tzv. „dvojitého barvení“ (dual-stain) prostřednictvím anilinové a trypanové modři. Tato metoda vedla k detekci infekčních struktur a rovněž k mikroskopické vizualizaci napadení rostliny patogenem (viz Obr. 4) (Nowicki *et al.*, 2012b).



Obr. 4: Infekční cyklus *Phytophthora infestans* na náchylném genotypu rajčete 4 dny po inokulaci a následná vizualizace „dvojitým barvením“ a konfokální laserovou skenovací mikroskopií. (A) Klíčící spory: [S] tvorba penetračního hrotu a pokus o penetraci kutikulou prostřednictvím tvorby apresoria, [A] vývoj papily bohaté na kalosu, která slouží jako prvotní linie obrany hostitelské rostliny, [P] pokus o přímou penetraci patogenu do rostlinné tkáně. (B) Konečná fáze infekčního cyklu, kdy začínají hyfy přerůstat přes průduchy listu a dochází k rozvoji sporangia. (Upraveno podle: Nowicki *et al.*, 2012b).

3.3.3. Příznaky napadení *P. infestans*

První symptomy infekce se mohou na napadané rostlině projevit již po 3 - 4 dnech. U bramboru hrají velkou roli v epidemiologii choroby infikované hlízy, neboť právě ony bývají prostředkem k šíření choroby v další sezóně. Počátečními příznaky infekce se rozumí malé léze na vrcholech listů a na stoncích, které mohou v průměru dosahovat jen 1 či 2 mm a začnou se zvětšovat v okamžiku, kdy patogen zcela pronikne do rostlinného pletiva (Nowicki *et al.*, 2012a). Tyto léze bývají zprvu nažloutlé nebo světle zelené a mají charakter vodnatých skvrn. Poté přecházejí do hnědočerné až černé barvy, postupně se zvětšují

a zasahují celý list (Agrios, 2005). Jakmile se nekrózy rozšíří přes řapík a stonek do vyšších listových pater, dojde k rychlému odumření napadené natě (Juroch, 2011). Typickým příznakem je také šedobílý povlak sporangioforů na spodní straně listů.

U rajčete jsou příznaky infekce způsobené *P. infestans* podobné jako u bramboru (Erwin *et* Ribeiro, 1996). Rostliny rajčete však mohou být napadeny až sekundárně prostřednictvím sporangií přenesených větrem či vodními kapkami z infikovaných rostlin bramboru (Juroch, 2011). Nekrotické léze jsou zde kromě listů a stonků přítomny i na květech nebo plodech.

3.3.4. Média pro kultivaci *P. infestans*

Phytophthora infestans spadá mezi hemibiotrofní patogeny, proto ji je možné, stejně jako ostatní zástupce *Phytophthora* spp., kultivovat dlouhodobě na široké škále živných médií. Před kultivací je nutno patogen izolovat z infikované rostlinného pletiva či z půdy. Účinnou a zároveň nejméně časově náročnou metodou je izolace z napadených listů. Izolaci je však možno provést i z nakažených plodů, tato metoda je ale z hlediska provedení mnohem obtížnější a hrozí zde rovněž větší riziko kontaminace (Tumwine *et al.*, 2000). Za účelem izolace *P. infestans* lze využít také média s přidavkem antibiotik, jako například PARP agar, obsahující pimarin, ampicilin, rifampicin a pentachloronitrobenzen (Morita *et* Tojo, 2007).

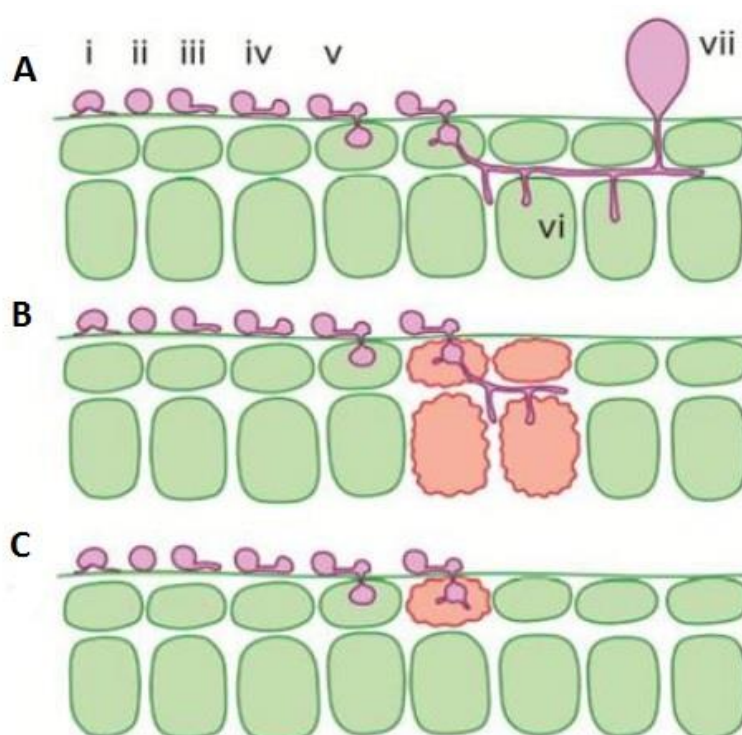
Živná média pro růst a kultivaci zástupců rodu *Phytophthora* se liší složením v závislosti na růstových podmínkách daného druhu. Mezi média vhodná pro pěstování *Phytophthora* spp. patří konopný agar či agary připravované z ovocných a zeleninových šťáv, jako například mrkový agar či V8 médium.

V případě *Phytophthora infestans* je dle Gallegly *et* Honga (2008) nejvhodnější kultivační půdou pro růst patogenu fazolový agar s přidavkem žita, velmi často využívanými médii jsou rovněž žitný či bramborovo-mrkový agar. Jiní autoři zase doporučují pro efektivní produkci zoospor *P. infestans* používat již zmíněný mrkový agar a V8 médium s přidavkem β -sitosterolu.

Žitný agar je možno připravit několika způsoby; jednou z nejméně časově náročných variant přípravy je rozvaření 250 g žitných obilky v dostatečném množství destilované vody po dobu 90 minut. Považené obilky jsou pak bez rozmělnění filtrovány přes 2 vrstvy gázy a vzniklý filtrát je doplněn destilovanou vodou na objem 1 l. Následně je k filtrátu přidáno 20 g sacharosu, 15 g agaru a 0,125 g 40% β -sitosterolu. Médium je nakonec autoklávováno 20 minut při teplotě 121 °C.

3.4. Interakce mezi hostitelskou buňkou a *Phytophthora* spp.

Zástupci rodu *Phytophthora* jsou schopni vylučovat tzv. elicitory, tedy sloučeniny, které jsou po interakci rostlina-patogen schopny spustit obrannou reakci (Lochman *et al.*, 2005). Detekuje-li hostitelská rostlina elicitor, dojde obvykle k tzv. hypersenzitivní reakci (HR), charakterizované jako rychlá a lokalizovaná nekróza několika buněk v místě pokusu o invazi patogenu (Blein *et al.*, 1991), čímž dojde k omezení šíření patogenního mikroorganismu do dalších rostlinných částí. HR je poté možno makroskopicky pozorovat jako nekrotické léze na listech. Proces HR demonstruje Obr. 5.



Obr. 5: Infekční cyklus *P. infestans* na **A** náchylné rostlině ((i) zoospora, (ii) cysta, (iii) klíčící cysta, (iv) klíčící cysta s apresoriem, (v) klíčící cysta s apresoriem a infekčním váčkem, (vi) haustorium, (vii) sporangium) a **B, C** rezistentní rostlině.

Usmrcené (hypersenzitivní) buňky jsou znázorněny červeně. Míra hypersenzitivní reakce závisí na genotypu rostliny a patogenu. (Převzato z: Kamoun *et Smart*, 2005).

Proteinové molekuly, spadající mezi elicitory a vylučovány více než 30 druhů *Phytophthora* spp., se nazývají elicitory (Yu, 1995). Tyto látky dokáží v hostiteli indukovat HR a spouštět tak obrannou reakci rostliny, což může vést k vývoji systémově získané rezistence (SAR, “Systemic Acquired Resistance”) rostlin vůči řadě patogenů (Boissy *et al.*, 1996). Jedním z nejlépe prostudovaných elicitorů je kryptogein. Jedná se o globulární protein produkovaný *Phytophthora cryptogea*, patogenem poprvé popsáno roku 1919 u rajčete a infikujícího cca 150 druhů rostlin. Jeho hlavní funkcí je přenos sterolů a mastných kyselin mezi fosfolipidovými membránami rostlinných buněk. Významnou roli hraje tento protein především u tabáku, kde vyvolává hypersenzitivní reakci a chrání tak rostlinu proti napadení patogenem *P. parasitica* (Blein *et al.*, 1991).

Aby byla *P. infestans* po penetraci do hostitelské rostliny schopna odolat rostlinným hydrolytickým enzymům a zároveň snadněji a efektivněji vyvolat infekci, využívá specializované geny, kódující efekty. Efekty jsou charakterizovány jako molekuly proteinové povahy, které dokáží měnit strukturu a funkci hostitelské buňky (Vleeshouwers *et al.*, 2011). Tyto molekuly jsou vylučovány haustorií a dle místa působení v hostitelské buňce je lze rozdělit na apoplastické, neboli extracelulární, a cytoplazmatické, intercelulární (Nowicki *et al.*, 2012a).

Apoplastické efekty působí v mezibuněčném prostoru, kde reagují s buněčnými stěnami hostitelské rostliny, s jejími proteasami a rovněž se signální sítí obranné odpovědi rostliny. Významnou úlohu zde hrají tzv. receptorové kinasy, podílející se na obranné reakci rostliny proti patogenu. V souvislosti s těmito molekulami bylo zjištěno, že v patosystému *Solanum lycopersicum* – *Phytophthora parasitica* se na obranných mechanismech rostliny podílí gen SISOBIR1, jehož umlčení vede ke zvýšené náchylnosti rajčete na zmíněný patogen (Peng *et al.*, 2015).

Cytoplazmatické efekty naopak hrají roli přímo uvnitř hostitelské buňky, kde spouštějí metabolické změny a napomáhají tak vývoji patogenu v rostlinné buňce (Nowicki *et al.*, 2012a). Skupina cytoplazmatických efektorů se dále dělí do dvou kategorií, a to RXLR proteiny, obsahující signální peptid a N-koncovou doménu se sekvenčním motivem RXLR (Arg-Xaa-Leu-Arg), a CRN proteiny (“crinkling and necrosis”) (Nowicki *et al.*, 2012a), přičemž obě tyto proteinové rodiny hrají při napadení patogenem významnou roli. RXLR geny kódují ještě avirulentní proteiny (AVR) a za jejich správnou funkci v rostlinné buňce je zodpovědný C-konec efektoru (Vleeshouwers *et al.*, 2011). Exprese CRN genů vede k vyvolání typických příznaků na rostlině po napadení *Phytophthora* spp., jako je nekróza či srašnění listů (Torto *et al.*, 2003).

3.4.1. Obranné mechanismy rostliny

K rozpoznání patogenu hostitelskou rostlinou a následnému spuštění obranných mechanismů dochází jen tehdy, má-li rostlina vyvinuty geny rezistence (*R*), které kódují receptory pro dané typy elicitorů. V případě, že nedojde k rozpoznání, dochází k rozšíření infekce a hostitel je na patogen náchylný.

Jakmile hostitelská rostlina rozpozná elicitor patogenu, dochází během několika minut k tzv. ranné fázi obranné reakce. Pro tuto fázi je typická změna v propustnosti plazmatické membrány rostlinných buněk, přičemž ionty K^+ a Cl^- začínají vytékat z cytoplazmy a ionty Ca^{2+} do ní naopak vtékají. Aktivací NADPH oxidasy vzniká peroxid vodíku a následně další reaktivní formy kyslíku (ROS, “Reactive Oxygen Species”), což vede k jevu označovanému jako oxidační vzplanutí. Během ranné fáze obranné reakce dochází také k hypersenzitivní reakci (HR), tedy rychlé a lokalizované smrti buněk v místě pokusu o vznik infekce (Blein *et al.*, 1991).

Za několik hodin po penetraci patogenu do hostitelské rostliny nastává tzv. pozdní fáze obranné reakce, kdy začíná také docházet k produkci PR proteinů (Pathogenesis-related Proteins), jejichž úkolem je aktivní zničení patogenu. Během této fáze dochází rovněž ke změnám v expresi genetické informace, k aktivaci obranných genů a k syntéze signálních molekul, mezi které patří například kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová (JA) či ethylen (Plant Pathology, 2003). Díky těmto hormonům dochází v rostlině k indukci systémové reakce.

Mezi další látky, syntetizované za účelem obrany rostliny, patří fytoalexiny, což jsou nízkomolekulární látky toxické pro řadu mikroorganismů. Typickými zástupci této skupiny jsou například terpenoidy, alkaloidy či flavonoidy (Lewis *et al.*, 2006). Právě fytoalexiny mohou mít vliv na rezistenci některých druhů rostlin proti danému typu patogenu, jako je tomu například u *Nicotiana benthamiana* a jeho rezistencí vůči *Phytophthora infestans*, kdy se na rezistenci podílejí především kyselina salicylová a ethylen (Shibata *et al.*, 2010).

3.5. Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) a jejich role v obraně rostlin vůči patogenům

Reaktivní formy kyslíku (ROS, “Reactive Oxygen Species”) a reaktivní formy dusíku (RNS, “Reactive Nitrogen Species”), souhrně označované jako RONS (“Reactive Oxygen and Nitrogen Species”), zahrnují široké spektrum látek radikálového i neradikálového charakteru. Jedná se o molekuly produkované v živých buňkách během metabolických pochodů, přičemž velmi významnou roli hrají tyto látky u rostlinných organismů.

Jejich hlavní funkcí je v tomto případě ochrana rostlin vůči velkému množství stresových faktorů, které zahrnují jak stres biotický (senescence, napadení patogenem), tak stres abiotický (působení extrémních teplot, nedostatek vody, mechanické poškození) (Catalá *et al.*, 2010). Kromě toho hrají tyto molekuly také významnou roli při koordinaci exprese genetické informace během interakce rostlina-patogen (Catalá *et al.*, 2010). Ačkoli je přítomnost těchto látek v rostlině nezbytná a je známo, že RONS hrají u rostlin především kladnou roli, může také nastat situace, kdy v důsledku nadměrného množství těchto molekul dojde k poškození buněk vyvoláním hypersenzitivní reakce či vznikem nekrózy.

3.5.1. Charakteristika a metabolismus reaktivních forem kyslíku

ROS jsou v rostlinných buňkách tvořeny během dýchacího elektronového řetězce či v průběhu fotosyntézy coby vedlejší produkty atmosférického kyslíku (O_2) (Mittler, 2002). Přehled některých zástupců této skupiny látek, jejich zdrojů a účinků v organismu zobrazuje Tab. 1. Za normálních podmínek bývá hladina ROS v buňkách nízká a tyto látky jsou pro rostlinu netoxické. Po napadení patogenem ale dochází k jejich rychlému nahromadění v důsledku oxidačního vzplanutí a zvýšená hladina ROS může pak za účelem zničení patogenu způsobit peroxidaci lipidů, poškození DNA a proteinů či lokalizovanou buněčnou smrt infikované buňky (Neill *et al.*, 2002).

Typickými produkty excitace atmosférického kyslíku jsou peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$) nebo hydroxylový radikál (OH^{\cdot}). Všechny tyto molekuly jsou schopny oxidovat široké spektrum biologických molekul (Mittler, 2002). Peroxid vodíku navíc plní v buňce signální roli, významným způsobem se podílí na zprostředkování informací o změnách v okolním prostředí (Chen *et Gallie*, 2004).

Tab. 1: Přehled některých ROS, jejich struktura, zdroje a biologické účinky. (Upraveno podle: Piterková *et al.*, 2005).

Sloučenina	Zkratka	Struktura	Některé zdroje	Biologický efekt
Singletní kyslík	$^1\text{O}_2$	O-O:	Excitované molekuly chlorofylu v tripletovém stavu	Mutageneze, peroxidace lipidů, fotooxidace aminokyselin.
Superoxidový radikál	$\text{O}_2^{\cdot-}$	$[\ddot{\text{O}}=\ddot{\text{O}}]^-$	Osvětlené chloroplasty, Fe-S proteiny, cytochrom P450, enzymové reakce: xanthinoxidasa, aldehydoxidasa atd..	Peroxidace lipidů, reakce H_2O_2 za tvorby OH^\cdot . Schopnost oxidovat síru, askorbát a NADPH, redukovat cytochrom c a ionty kovů.
Hydroxylový radikál	OH^\cdot	$\ddot{\text{O}}-\text{H}$	Haberova-Weisserova reakce, Fentonova reakce.	Velmi silné oxidační činidlo – poškození DNA, peroxidace lipidů, degradace proteinů, produkce C_2H_4 .
Peroxid vodíku	H_2O_2	$\text{H}-\ddot{\text{O}}-\ddot{\text{O}}-\text{H}$	Osvětlené chloroplasty, β -oxidace mastných kyselin, Fe-S proteiny a enzymové reakce: SOD, glykolát oxidasa, aminosidasa, peroxidasy).	Inhibice fixace CO_2 , inaktivace enzymů Calvinova cyklu, oxidace sulfhydrilů a flavonolů, substrát oxidační reakce.

Aby nedocházelo k neustálému hromadění ROS, vyvinuly se v rostlinných buňkách neenzymatické i enzymatické antioxidační mechanismy. Nejlépe prostudovanými neenzymatickými antioxidanty u rostlin jsou kyselina askorbová (vitamin C, askorbát), redukovaný glutathion (GSH), α -tokoferol (vitamin E) či β -karoten (Shalata *et al.*, 2011). Mezi antioxidační enzymy patří superoxiddismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), katalasa (CAT; EC 1.11.1.6), peroxidasa (EC 1.11.1.7), a enzymy askorbát-glutathionového cyklu (Piterková *et al.*, 2005).

3.5.2. Charakteristika a metabolismus reaktivních forem dusíku

Reaktivní formy dusíku jsou sloučeniny odvozené od oxidu dusnatého (NO), jako například oxid dusný (N_2O), oxid dusičitý (NO_2), peroxydusitan (ONOO^-), S-nitrosothioly (SNOs) či S-nitrosoglutathion (GSNO) (Chaki *et al.*, 2009). Charakteristika vybraných RNS je uvedena v Tab. 2.

Tab. 2: Přehled některých RNS, jejich struktura, zdroje a biologické účinky. (Zpracováno z více zdrojů).

Sloučenina	Zkratka	Struktura	Zdroj	Biologický efekt
Oxid dusnatý	NO·	$\cdot\text{N}=\text{O}$	NO syntasa – katalyzuje oxidaci L-argininu na L-citrulin a NO. Nitrit:NO reductasa – katalyzuje redukcí dusitanu na NO.	U rostlin zapojen do procesů klíčení, senescence, reakce na stres, programované buněčné smrti.
Oxid dusičitý	NO ₂ ·	$\text{O}=\overset{\cdot}{\text{N}}=\text{O}$	Samovolná reakce NO – dehydratace HNO ₂ oxidem fosforečným.	Cytotoxická molekula.
Kyselina dusitá	HNO ₂	$\text{H}-\text{O}-\text{N}=\text{O}$	Reakce N ₂ O ₃ s vodou.	Karcinogenní látka, u živočichů oxiduje hemoglobin na methemoglobin.
Peroxydusitan	ONOO ⁻	$\text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{O}^-$	Nitrát reductasa – katalyzuje redukcí O ₂ na O ₂ ^{·-} , který pak reaguje s NO za vzniku ONOO ⁻ .	Cytotoxická molekula, při nitraci aminokyselin způsobuje buněčné poškození.

Oxid dusnatý je velmi reaktivní molekula s širokým spektrem biologických funkcí, hrající důležitou roli zejména při signalizaci. U rostlin plní NO významnou funkci v běžných fyziologických procesech, jako je růst kořenů, klíčení, otevírání a uzavírání průduchů či opad listů. Je rovněž důležitý při reakcích na biotický i abiotický stres (Wendehenne *et al.*, 2005).

V rostlinách může být oxid dusnatý tvořen neenzymaticky nebo enzymaticky. Neenzymatická produkce bývá výsledkem reakce mezi oxidy dusíku a rostlinnými metabolity nebo chemické redukce dusitanu v kyselém prostředí. Enzymatická tvorba spočívá v produkci NO z NO₂⁻ prostřednictvím NAD(P)H-dependentní nitrát reductasy (NR; EC 1.7.1.1) (Yamasaki *et Sakihama*, 2000; Wendehenne *et al.*, 2005). Dalším enzymovým zdrojem pro vznik NO mohou být nitrit:NO reductasa (NiNOR; EC 1.7.2.1), vyskytující se v plazmatické membráně (Piterková *et al.*, 2008) nebo NO syntase podobný enzym (“NOS-like”enzym), jehož výskyt byl zaznamenán v chloroplastech a cytoplazmě (Daekyung *et al.*, 2006). Existence NOS-like enzymu byla v rostlinné říši prokázána u zelené řasy *Ostreococcus tauri* (Foresi *et al.*, 2010), u vyšších rostlin se podle nedávných výzkumů předpokládá jeho přítomnost v tabáku (*Nicotiana tabacum*) a huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) (Jeandroz *et al.*, 2016).

Oxid dusnatý se v buňkách nejčastěji vyskytuje ve formě volného plynného radikálu (NO^\bullet), který se kromě vysoké reaktivity vyznačuje také značnou nestabilitou. Poločas rozpadu tohoto radikálu je méně než 6 sekund (Thomas *et al.*, 2001). Největší význam má tato molekula při reakcích s reaktivními formami kyslíku, kdy vzniká řada nitračních činidel způsobujících nitraci aminokyselinových zbytků (Hnízdová *et al.*, 2009). V aerobních podmínkách reaguje NO^\bullet se superoxidovým radikálem ($\text{O}_2^{\bullet-}$) za vzniku peroxydusitanu (ONOO^-), který v případě nahromadění NO_2^- způsobuje oxidační poškození buňky (Yamasaki *et Sakihama*, 2000). NO^\bullet se může rovněž účastnit reakcí s volnými atomy kovů, přičemž vznikají nitrosylkomplexy. Významnou reakcí je v tomto případě vazba NO^\bullet na hemovou skupinu gyanylátcyklasy (EC 4.6.1.2), kdy dochází ke změně v konformační struktuře a vzniká tak cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) (Brown *et Borutaite*, 2002).

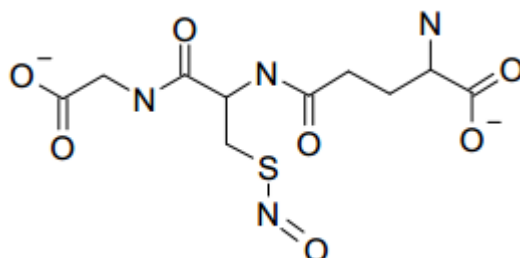
3.5.3. S-nitrosoglutathion (GSNO), jeho charakteristika a funkce

S-nitrosoglutathion (GSNO, Obr. 6) je jedním z nejrozšířenějších S-nitrosothiolů (SNOs) a vzniká reakcí mezi radikálem oxidu dusnatého a redukováným glutathionem (GSH) v procesu S-nitrosylace (Corpas *et al.*, 2013). V rostlinách je tato molekula přirozeným rezervoárem NO, protože z něj dochází k uvolňování NO během stresové reakce. Významným způsobem se podílí na posttranslačních modifikacích proteinů a působí také jako antioxidant (Airaki *et al.*, 2011).

Enzym, katalyzující redukci S-nitrosoglutathionu na široké množství produktů, nese název S-nitrosoglutathion reductasa (GSNOR). Jedná se o cytosolický dimerní enzym s podjednotkami o velikosti 40 kDa, spadající do rodiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas III. třídy (ADH3, EC 1.1.1.1). Přesnější označení tohoto enzymu je proto S-(hydroxymethyl) glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284) (Kubienová *et al.*, 2013a). Hlavní funkcí GSNOR je kromě katabolismu GSNO také kontrola hladiny S-nitrosothiolů v buňkách. Prvním rostlinným organismem, u kterého byla popsána role GSNOR v metabolismu RNS, byl huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), kde bylo zjištěno, že během mechanického poškození rostliny dochází k inhibici AtGSNOR (Kubienová *et al.*, 2013a).

Experimentálně bylo také prokázáno, že GSNO a NO působí jako pozitivní regulátory v obraně rostlin vůči patogenům, kdy hrají roli zejména při hypersenzitivní reakci a aktivaci obranných genů. Dojde-li ke snížení hladiny GSNOR a současně ke zvýšení hladiny SNOs, může dojít k posílení imunity rostlin vůči napadení patogenem (Feechan *et al.*, 2005).

Molekuly GSNO a GSNOR lze u vyšších rostlin detekovat dvěma způsoby, a sice imunohistochemickým značením, konfokální laserovou skenovací mikroskopií (CLSM) (Airaki *et al.*, 2011; Corpas *et al.*, 2013) či prostřednictvím kapalinové chromatografie elektrosprejem pomocí hmotnostní spektrometrie (LC-ES/MS).

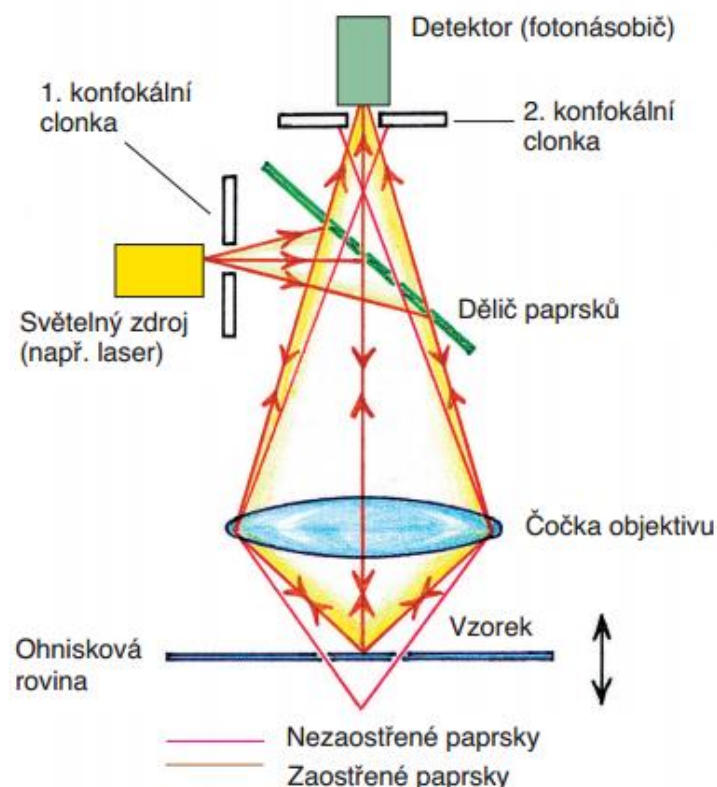


Obr. 6: Strukturní vzorec *S*-nitrosoglutathionu. (Převzato z: Kubienová *et al.*, 2013a).

3.6. Princip a využití konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie je typem světelné mikroskopie, pracující na podobném principu jako mikroskopie fluorescenční. Konfokální mikroskop se nicméně odlišuje od fluorescenčního tím, že ve své konstrukci obsahuje konfokální clonky a má také odlišný zdroj světla, které osvětluje preparát. Zatímco fluorescenční mikroskopie využívá jako zdroj excitační energie UV záření, konkrétně rtuťovou výbojku, v konfokální mikroskopii je k osvětlení preparátů využíván laserový paprsek, díky kterému lze během pozorování dosáhnout vysokého kontrastu. Nevýhodou však je, že světlo emitované laserem je příliš intenzivní a přispívá tak k rychlejší degradaci používaných fluorochromů, čímž dochází k poškození preparátů (Hibbs, 2004).

Během pozorování v konfokálním mikroskopu je zkoumaný vzorek ozářen úzkým svazkem laserového paprsku, zaostřeným na první konfokální clonku (Obr. 7), která je objektivem zobrazena do bodu uvnitř vzorku. Odtud pak světlo, odražené vzorkem, prochází zpětně objektivem a vytvoří další obraz této bodové clonky v zadní ohniskové rovině, kde se nachází druhá konfokální clonka. Vzhledem k tomu, že je druhá konfokální clonka umístěna ještě před detektorem (fotonásobičem), dojde k zabránění průchodu záření z nezaostřených míst vzorku a tím i jeho detekci. Přítomnost konfokální clonky tak představuje oproti klasickým optickým mikroskopům velkou výhodu, jelikož odstraňuje příčinu rozmázení obrazů při pozorováních tlustších řezů (Kubínová, 2006).



Obr. 7: Chod paprsků během pozorování preparátu konfokálním mikroskopem. (Převzato z: Kubínová, 2006).

Po průchodu clonkou je potom obraz zaznamenán skenovacím detektorem, který předá výsledné informace o pozorovaném vzorku do počítače. Výsledný obraz tedy nevzniká v konfokálním mikroskopu najednou, ale řádkováním bod po bodu. V počítači je pak možné na základě snímaných bodů sestavit obraz celého preparátu a postupným skládáním zrekonstruovat 3D objekt (Kubínová, 2006).

Díky vysoké citlivosti, přesnosti a možnosti vytváření trojrozměrných struktur nachází konfokální mikroskopie široké využití v mnoha biologických oblastech. Metoda je velmi vhodná ke studiu prostorových buněčných struktur, jako například cytoskeletu, či při studiu topologie jádra buňky. Uplatňuje se rovněž za účelem studia architektury neuronových sítí v mozkové tkáni. V rostlinné biologii lze konfokální mikroskopii využít např. k detekci reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) po napadení rostliny patogenem, což je založeno na označení příslušných molekul vhodným fluorochromem, čímž dojde k poskytnutí fluorescenčního signálu a následné vizualizaci.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Použité chemikálie, roztoky a jejich složení

0,1% N-(1-naftyletylen)diamin (NED) (Sigma-Aldrich) v destilované vodě

0,5% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Invitrogen™)

4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA) (ThermoFisher Scientific)

6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (carboxy-H₂DCFDA) (ThermoFisher Scientific)

Agar (SIGMA Life Science)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (50 mg Coomassie Blue G-250 ve 25 ml methanolu (koncentrace 0,25 mol/l) a 50 ml 85% kyseliny fosforečné)

Dithiotreitol (DTT) (Duchefa Biochemie)

Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich)

Fosfátový pufr pH 7,5 (koncentrace 20 mmol/l)

Griess A: 3,5% sulfanilamid v 0,5 mol/l HCl

Griess B: 3,5% sulfanilamid v 0,5 mol/l HCl a 1% HgCl₂

Hovězí sérový albumin (BSA) frakce V (AppliChem)

Chlorid rtuťnatý (Sigma-Aldrich)

Kyselina chlorovodíková (Lachema)

Redukovaný nikotinamidadenindinukleotid (NADH) (Sigma-Aldrich)

S-nitrosoglutathion (GSNO) (614 mg glutathionu ve 3 ml 0,5 mol/l HCl a 138 mg dusitanu sodného promytého v 10 ml destilované H₂O, 10 ml acetonu a 10 ml diethyletheru)

Sulfanilamid (Sigma-Aldrich)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MP Biomedicals)

Triton X-100 (Acros Organics)

4.2. Použité přístroje

Analytické váhy APX-323 (P-LAB)

Analytické váhy (Sartorius)

Autokláv Systec VX-55 (Biotech)

Biologický termostat BT 120 M

Centrifuga 5415R (Eppendorf)

Digitální pH metr (InoLab pH level1)

Elektromagnetická míchačka (IKA)

Hlubokomrazicí box U410-85 (New Brunswick Scientific)

Chlazený inkubátor Sanyo (Schoeller Instruments)

Invertovaný mikroskop OLYMPUS IX81 s konfokální laserovou skenovací jednotkou FV1000

Laminární box (Schoeller Instruments)

Mikrodestičkový spektrofotometr, Reader Synergy HT (BioTek Instruments)

Mikroskop OLYMPUS BX60 s digitální CCD kamerou DP73

Mikrovlná trouba (Samsung)

Stereomikroskop SZ 40 OLYMPUS s digitální CCD kamerou DP70

Světelný mikroskop OLYMPUS CHK2-F-GS

Vortex Grant-bio PCV-2400

4.3. Biologický materiál

4.3.1. *Phytophthora infestans*

K provedení následujícího experimentu byly využity dva kmeny *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, a to kmen V1 4/14 a VŽ 14/14, poskytnuty Českou zemědělskou univerzitou, Kamýcká 961/129, 165 21, Praha 6 – Suchdol.

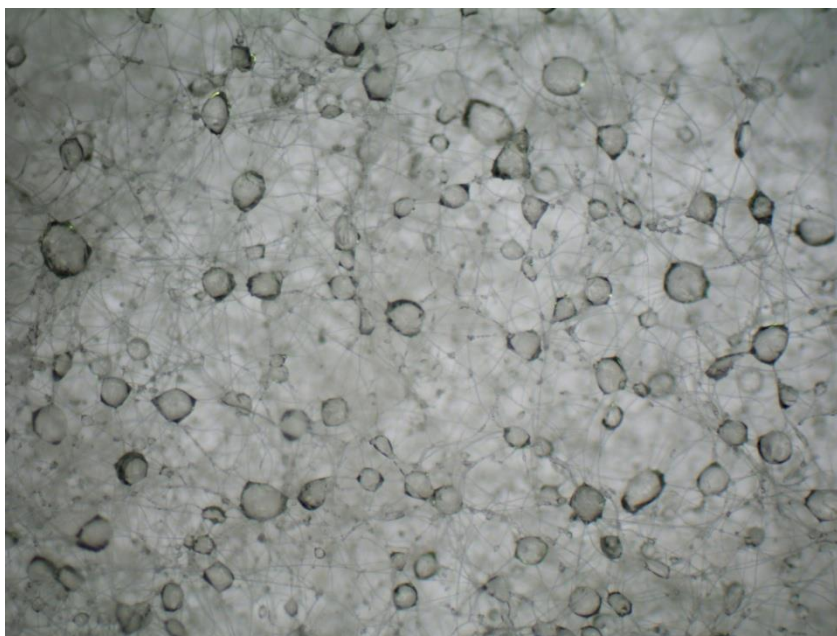
4.3.2. Příprava růstových médií a kultivace *Phytophthora infestans*

K následujícímu experimentu byla pro kultivaci *P. infestans* využita tři média, a sice žitný, rajčatový a bramborovo-mrkvový agar. Pro přípravu žitného agaru bylo naváženo 100 g žitných obilek, které byly rozvařeny v 1 l destilované vody. Extrakt byl následně sceděn a byl k němu přidán 2 – 3% agar, který se za stálého míchání nechal rozpustit. Takto připravený agar pak bylo nutno autoklávovat 20 min při 121 °C a po částečném vychlazení bylo médium možno rozlít do Petriho misek. Hotové médium lze dlouhodobě uchovávat v lednici při 4 °C.

Základní složkou pro přípravu rajčatového agaru je 100% rajčatová šťáva, dostupná volně v supermarketu. Pro získání této živné půdy je potřeba 350 ml rajčatového džusu pufrovat několik minut za stálého míchání 5 g CaCO₃ a džus poté centrifugovat 20 min při 6000 g. Vzniklý supernatant následně zředíme destilovanou vodou v poměru 1 : 4, přidáme asi 3% agar a pak postupujeme stejným způsobem, jako v případě přípravy žitného média.

Příprava bramborovo-mrkvového média spočívá v nastrouhání cca 200 g brambor a mrkve a následném povaření v destilované vodě po dobu asi 60 min. Tekutina je poté přefiltrována a po částečném vychlazení je k extraktu možno přidat zhruba 3% agar, stejně jako v případě přípravy dvou předchozích médií. Po rozpuštění agaru následuje autoklávování 20 min při 121 °C, médium je pak rozlito do Petriho misek a uchováváno při 4 °C.

Phytophthora infestans byla na uvedených živných médiích pěstována po dobu 2 – 3 týdnů v inkubátoru při teplotě 25 °C nebo v pokojových podmínkách. Detail mycelia *P. infestans* po asi 3 týdenní kultivaci na bramborovo-mrkvovém agaru ukazuje Obr. 8.



Obr. 8: Snímek detailu mycelia *Phytophthora infestans* pořízený po cca 3 týdenní kultivaci na bramborovo-mrkvovém médiu pod stereomikroskopem při zvětšení 40x.

4.3.3. Izolace zoospor u *Phytophthora infestans*

Uvolnění zoospor ze sporangií je prováděno teplotním šokem. Petriho misky s narostlým myceliem byly přeneseny z inkubátoru do 4 °C na dobu asi 40 min, mycelium bylo poté převrstveno destilovanou vodou o teplotě 37 °C a inkubováno dalších 20 min při laboratorní teplotě. Hustotu zoospor lze pak stanovit mikroskopicky počítáním v Bürkerově komůrce, kdy je pro znehybnění zoospor za účelem dosažení vyšší efektivity počítání možno k 200 μ l odebrané suspenze přidat 3 kapky 50% kyseliny octové. Doporučovaná koncentrace používaná k inokulaci se pohybuje okolo 100 zoospor na 20 μ l, tedy 5×10^3 v 1 ml. Suspenze uvolněných zoospor byla nakonec odsáta pomocí injekční stříkačky a použita k inokulaci rostlinného materiálu.

4.3.4. Rostlinný materiál

Pro experiment byly jako modelové rostliny využity 4 genotypy rajčete (rod *Solanum*, dříve *Lycopersicon*), navzájem se lišící reakcí k padlí (*Oidium neolycopersici*) a abiotickému stresu. Jednalo se o náchylné genotypy *S. esculentum* L. cv. Amateur a *S. esculentum* L. cv. Micro-Tom, středně rezistentní genotyp *S. chmielewskii* (Rick, Kesickii, Forbes and Holle)

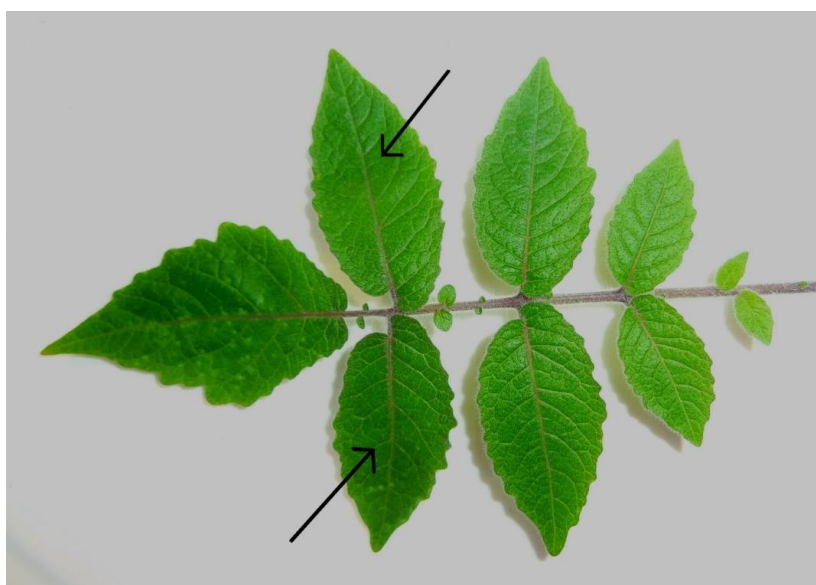
Spooner, Anderson and Jansen (LA 2663) a rezistentní genotyp *Solanum habrochaites* Knapp and Spooner f. *glabratum* (LA 2128) (syn. *S. hirsutum* L.)

Semena zmíněných rostlin byla vyseta do navlhčeného perlitu a po zhruba 14 dnech byly semenáčky s plně vyvinutými děložními listy přesazeny do plastových květináčů, které obsahovaly směs zahradního substrátu. Rostliny byly nadále pěstovány ve skleníku při teplotě 22/19 °C (den/noc) za pravidelného hnojení a zalévání. Po cca 2 měsících pěstování byly rostliny použity na inokulaci.

4.3.5. Inokulace rostlin

Inokulace rostlinného materiálu zoosporami *P. infestans* byla provedena ve třech na sobě nezávislých sériích. U každé rostliny byl vždy vybrán cca 6. – 7. pravý lichozpeřený list, na němž byly inokulovány 2 dobře vyvinuté lístky (viz Obr. 9). Pro inokulaci byla využita metoda infiltrace prostřednictvím injekční stříkačky bez použití jehly. Do spodní (abaxiální) strany listu bylo po lehkém narušení kutikuly plastovou špičkou vtačeno asi 15 μ l suspenze zoospor.

Z každého genotypu rajčete bylo na experiment použito 15 rostlin, přičemž 10 z nich bylo inokulováno patogenem, zbylých 5 pak sloužilo jako kontrola pro jednotlivé odběry. Odběry rostlin, jak infikovaných tak kontrolních, byly provedeny v časech 24, 48, 72, 96 a 168 hodin po inokulaci (hpi). Vzorky odebraných listů byly následně uschovány do alobalu a uchovávány ve tmě při -80 °C až do další analýzy.



Obr. 9: Vyznačená místa inokulace u lichozpeřeného listu genotypu *S. habrochaites*.

4.4. Měření aktivity GSNOR v inokulovaných listech

Pro stanovení enzymové aktivity bylo potřeba 1 g rostlinného materiálu homogenizovat v tekutém dusíku ve třecí misce a k homogenizované rostlinné hmotě následně přidat 2 ml extrakčního pufru (20 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5; 1 mmol/l PMSF; 0,2% (v/v) Triton X-100). Homogenát byl poté ponechán na misce s ledem po dobu 20 min a následně centrifugován 30 min při 16000 g a teplotě 4 °C. Získaný supernatant byl pak použit pro další analýzu.

Aktivita GSNOR byla stanovována spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm a teplotě 30 °C. Do jednotlivých jamek 96 jamkové mikroleštičky bylo napipetováno společně s 40 µl vzorku 200 µl Tris-HCl pufru (20 mmol/l; pH 8) a 30 µl čerstvě připraveného roztoku NADH (koncentrace 2 mmol/l). Reakce byla odstartována přidáním 30 µl čerstvě připraveného roztoku GSNO (koncentrace 4 mmol/l), s výjimkou blanku, kde byla namísto GSNO přidána deionizovaná voda.

Po změření kinetiky GSNOR byla na spektrofotometru stanovena délka optické dráhy při vlnových délkách 900 a 977 nm. Hodnoty absorbancí získané měřením byly vyobrazeny v softwaru KC4, který je součástí readeru. Vyhodnocení a následné zpracování výsledků bylo provedeno pomocí programu Microsoft Office Excel 2007, s použitím následujících vzorců:

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

$$a = \frac{\Delta A * V}{\epsilon * t * l}$$

Tab. 3: Legenda pro výpočet aktivity GSNOR (kat = mol/s).

a	Aktivita GSNOR (kat = mol/s)
ΔA	Změna absorbance
V	Celkový objem pipetovaný do jamky (300 µl = 0,0003 l)
ϵ	Molární extinkční koeficient pro NADH = 6220
t	Čas v sekundách (300 s po 5 minutách)
l	Délka optické dráhy

B) Výpočet aktivity GSNOR (nmol/min):

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

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

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

Tab. 4: Legenda pro výpočet specifické aktivity GSNOR (nmol/min) na mg proteinu.

a	Aktivita GSNOR (nmol/min)
c _p	Vypočítaná hodnota koncentrace proteinů ve vzorku (mg/ml)
V ₂	Objem vzorku pipetovaný do každé jamky (15 μl)
V ₁	Objem vyizolovaného vzorku (extraktu) (1000 μl)

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

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

Tab. 5: Legenda pro výpočet aktivity GSNOR (nmol/min) na 1 ml.

a	Aktivita GSNOR (nmol/min)
a ₁	Aktivita GSNOR (nmol/min) na 1 ml
V ₂	Objem vzorku pipetovaný do každé jamky (15 μl)
V ₁	Objem vyizolovaného vzorku (extraktu) (1000 μl)

E) Výpočet aktivity GSNOR (nmol/min) na 1 g FW (“fresh weight” = čerstvé váhy):

$$a_2 = a_1 * 3$$

Tab. 6: Legenda pro výpočet aktivity GSNOR (nmol/min) na 1 g FW.

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

F) Výpočet délky optické dráhy:

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

Tab. 7: Legenda pro výpočet délky optické dráhy.

A ₉₇₇	Absorbance při 977 nm
A ₉₀₀	Absorbance při 900 nm
0,18	Koeficient pro přepočet hodnot naměřených na spektrofotometru

4.5. Stanovení obsahu *S*-nitrosothiolů v rostlinném materiálu

Obsah *S*-nitrosothiolů (SNOs) byl stanoven Savillovou metodou. Tato kolorimetrická metoda spočívá v diazotační reakci dusitanů vzniklých rozkladem *S*-nitrosothiolů za přítomnosti Hg²⁺ solí a modifikovaného Griessova činidla. Výsledná diazoniová sůl pak reaguje s N-(1-naftyletylen)diaminem (NED) za vzniku azobarviva, které je možno detekovat spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm (Saville, 1958).

Koncentrace *S*-nitrosothiolů v kontrolních a inokulovaných pletivech byla stanovena v 96 jamkových mikrotitračních destičkách, kdy bylo do jednotlivých jamek nanášeno 195 µl činidla Griess B. Pouze v případě slepého vzorku bylo namísto Griess B použito činidlo Griess A. Do jamek bylo následně přidáno 5 µl rostlinného extraktu, v případě slepého vzorku bylo do jamky napipetováno 5 µl deionizované vody. Vzorky v mikrotitrační destičce byly 5 minut inkubovány a poté k nim bylo přidáno 100 µl činidla NED. Po dalších 5 minutách byla na spektrofotometru měřena absorbance jednotlivých vzorků při 540 nm.

Koncentrace SNOs byla odečtena z rovnice lineární regrese, sestavené na základě měření kalibračních standardů GSNO. Pro stanovení koncentrace byla využita rovnice lineární regrese, sestavená z měření kalibračních standardů roztoků GSNO v 0,5 mol/l HCl o koncentracích 0,5; 1; 1,25; 2,5; 5; 10; 50; 100; 200 a 250 µmol/l.

4.6. Stanovení koncentrace proteinů v rostlinném materiálu

Koncentrace proteinů v extraktech inokulovaných listů rostlin byla stanovena metodou Bradfordové, která vychází z předpokladu, že se barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250 váže na molekuly proteinů v alkalickém prostředí, a to buď navázáním trifenylmethanové skupiny na nepolární část proteinu, nebo vazbou anionsulfoskupiny na bazické skupiny ve vedlejších řetězcích aminokyselin. Interakce barviva s proteiny má za následek barevnou změnu, přímo úměrnou množství proteinu. Zmíněné barvivo totiž existuje ve dvou barevných formách, červené a modré, přičemž červená forma je během navázání barviva na protein

převedená na modrou. Intenzita zbarvení je pak stanovena spektrofotometricky při 595 nm (Bradford, 1976).

Měření bylo provedeno na 96 jamkových mikrotitračních destičkách, přičemž bylo do jednotlivých jamek postupně napipetováno 45 μ l destilované vody, 5 μ l vzorku (rostlinného extraktu) a 200 μ l činidla Bradfordové (zásobní roztok Coomassie Blue s destilovanou vodou v poměru 1 : 4). Destička byla následně mírně protřepána a po cca 5 minutách byla u vzorků ve spektrofotometru stanovena absorbance při vlnové délce 595 nm. Pro stanovení koncentrace proteinů byla využita rovnice lineární regrese, sestavená na základě měření kalibračních standardů BSA o koncentracích 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 a 1,4 mg/ml. Získané hodnoty absorbancí byly vyobrazeny v softwaru KC4 a výsledky byly následně přepočteny a vyhodnoceny pomocí programu Microsoft Office Excel 2007.

4.7. Lokalizace RONS v klíčících sporangíích *Phytophthora infestans*

ROS a NO v klíčících sporách patogenu byly detekovány histochemickým barvením a vizualizovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Z Petriho misky s narostlým myceliem *P. infestans* kmenu VŽ 14/14 byla sporangia přenesena na podložní sklo s připravenou tenkou vrstvou vodního agaru a inkubována při pokojové teplotě ve vlhké komůrce.

Alternativně byla na podložní sklo s agarem nanášena vrstva epidermis z čerstvě utrženého listu *Solanum* spp., nebo byl do vodního agaru přidán 10% extrakt listů (0,5 g rostlinného materiálu bylo homogenizováno ve třecí misce s 3 ml fosfátového pufru). Po 60, 90, 120 a 180 minutách byla skla mikroskopována.

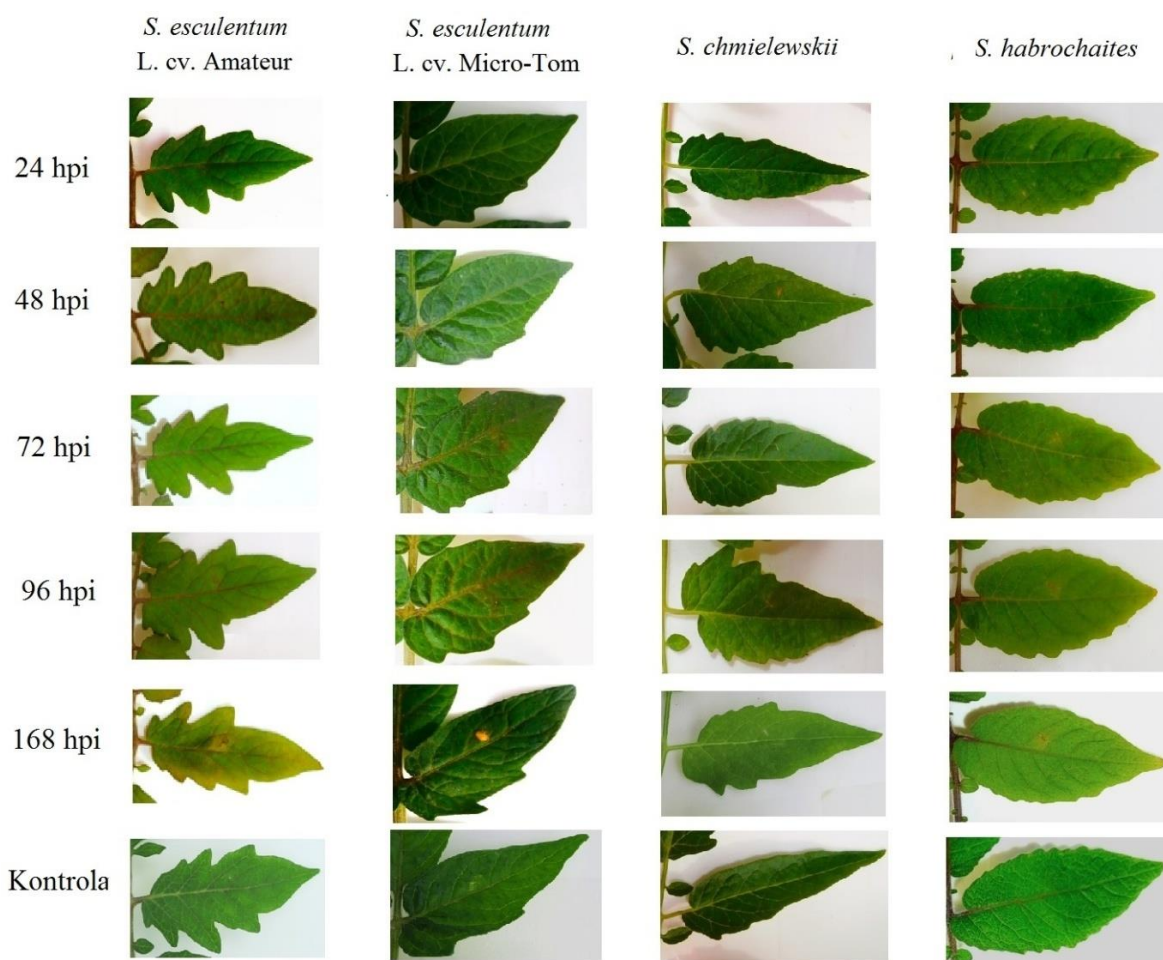
Za účelem vizualizace reaktivních forem kyslíku byl na podložní sklo se sporami aplikován roztok 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (c-H₂DCF DA; koncentrace 100 μ mol/l) v 0,5% DMSO, smíchaný se 100 μ l fosfátového pufru (pH 7,5; koncentrace 20 mmol/l). Sklo pak bylo inkubováno ve tmě po dobu 10 min při pokojové teplotě. Preparát byl následně přikryt krycím sklíčkem a ihned pozorován pod konfokálním mikroskopem při excitační vlnové délce 488 nm a emisní vlnové délce 505 - 550 nm.

Detekce oxidu dusnatého byla provedena za využití fluorescenční sondy 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetátu (DAF-FM DA; koncentrace 40 μ mol/l). Preparát byl inkubován ve tmě při pokojové teplotě 30 min a po uplynutí dané doby opět vizualizován pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu při excitační vlnové délce 488 nm a emisní vlnové délce 505 - 550 nm.

5. VÝSLEDKY

5.1. Vizuální hodnocení symptomů u inokulovaných pletiv

Listy všech genotypů rajčat byly inokulovány zoosporami hemibiotrofního patogenu *Phytophthora infestans*, kmene V1 4/14. Symptomy byly vyhodnocovány během 168 hodin po inokulaci (Obr. 10); v místě inokulace se objevovaly nekrózy, které se ojediněle šířily do okolních pletiv. Inokulované listy *S. chmielewskii* nejevily příznaky napadení v žádném z časových intervalů. U *S. habrochaites* byly nekrotické skvrny pozorovány 96 hpi a velikost lézí dále nevzrůstala. Nejrozsáhlejší nekrózy byly zaznamenány u obou genotypů *S. esculentum*. V případě *S. esculentum* L. cv. Amateur došlo k expresi příznaků 96 hpi; v časovém intervalu 168 hpi pak bylo možno pozorovat další rozšíření lézí. Nejrychlejší byl vznik příznaků u *S. esculentum* L. cv. Micro-Tom (72 hpi), ale nekrózy se dále nezvětšovaly.



Obr. 10: Příznaky infekce *P. infestans* u studovaných genotypů rajčat v průběhu 168 hpi.

5.2. Aktivita GSNOR v inokulovaných listech rajčete

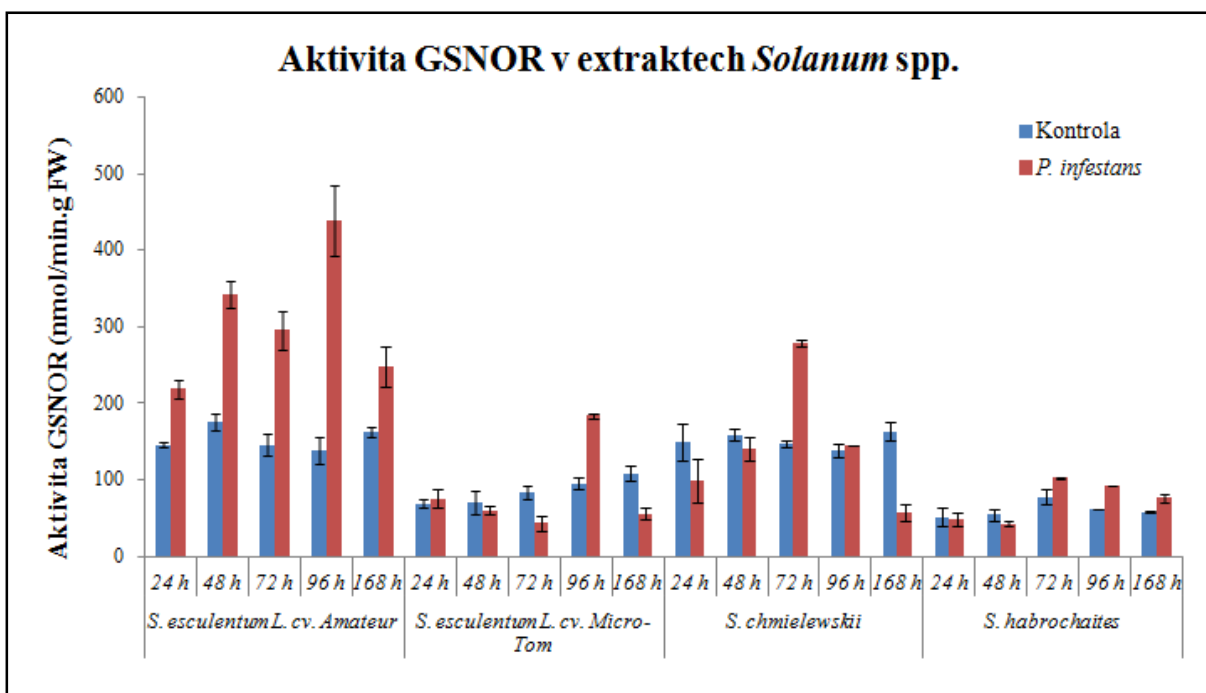
Pro stanovení aktivity GSNOR v inokulovaných listech jednotlivých genotypů rajčat byl použit rostlinný materiál z druhé a třetí provedené série inokulace. Výsledné hodnoty byly po naměření zprůměrovány a zaznamenány do grafu. Změny aktivity GSNOR u čtyř testovaných genotypů rajčat v průběhu 168 hodin po inokulaci znázorňuje Graf 1. Aktivita GSNOR v jednotlivých časových intervalech je vztažena na 1 g FW (“fresh weight” = čerstvé váhy).

U *S. esculentum* L. cv. Amateur došlo vlivem mechanického poškození listu k nárůstu aktivity GSNOR, kdy již po 24 hodinách od inokulace lze pozorovat navýšení aktivity enzymu na cca 230 nmol/min.g FW. Během následujících 24 hodin následoval rapidní vzrůst, hodnoty aktivity GSNOR dosahovaly 48 hpi téměř 350 nmol/min.g FW. Nejvyšší aktivita enzymu byla zaznamenána 96 hpi, tedy v době, kdy se na inokulovaných listech začaly projevovat první výraznější symptomy infekce. Naměřená hodnota činila v tomto případě necelých 450 nmol/min.g FW. V intervalu 168 hpi, kdy bylo na listu vizualizováno rozšíření vzniklé nekrózy, nicméně došlo k poklesu aktivity GSNOR téměř na polovinu předešlé hodnoty.

Z grafu je rovněž patrné, že bazální hladina GSNOR je u studovaného genotypu *S. esculentum* L. cv. Micro-Tom podstatně nižší, než u *S. esculentum* L. cv. Amateur. Hodnoty se zde pohybovaly cca mezi 50 – 70 nmol/min.g FW, přičemž k nejrapidnějšímu zvýšení aktivity GSNOR došlo 96 hpi. Aktivita enzymu dosáhla v tomto časovém intervalu okolo 180 nmol/min.g FW.

Rozporuplné výsledky byly získány v případě měření aktivity enzymu u *S. chmielewskii*, který z vizuálního hlediska nejevil žádné příznaky napadení. Do 72 hpi byl zde zaznamenán lineární nárůst aktivity GSNOR, kdy hodnota vystoupala z počátečních 100 nmol/min.g FW postupně až k cca 270 nmol/min.g FW. Poté došlo opět k jejímu snížení, a to až na nižší než původní hodnotu.

S. habrochaites, u něhož byl vznik nekróz vizualizován 96 hpi, vykazoval nejvyšší aktivitu enzymu v intervalech 72 a 96 hpi, kdy se hodnota pohybovala okolo 100 nmol/min.g FW. Celková hladina GSNOR však byla v tomto případě nízká.



Graf 1: Specifická aktivita GSNOR u studovaných genotypů *Solanum* spp. během 168 hodin od inokulace *P. infestans*. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

5.3. Hladina *S*-nitrosothiolů v inokulovaných listech rajčete

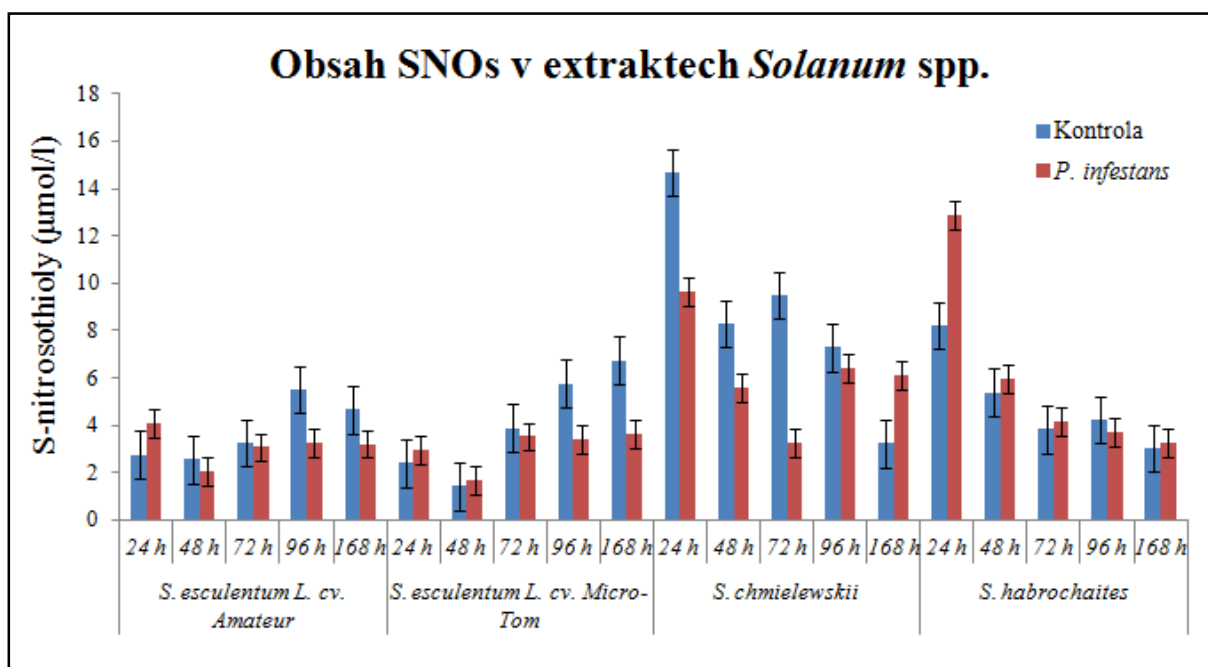
K měření hladiny *S*-nitrosothiolů (SNOs) v inokulovaných listech jednotlivých genotypů rajčat byla použita stejná sada vzorků, jako v případě stanovení aktivity GSNOR. Množství SNOs v $\mu\text{mol/l}$ u testovaných genotypů je zaznamenáno v Grafu 2. Stanovení obsahu SNOs v infikovaných rostlinách vychází z předpokladu, že enzym GSNOR nepřímo inhibuje hladinu SNOs. V případě naměření zvýšení aktivity GSNOR v rostlinách by mělo dojít ke snížení hladiny SNOs a naopak.

U genotypů *S. esculentum* L. cv. *Amateur* a *S. esculentum* L. cv. *Micro-Tom* byla zaznamenána poměrně nízká hladina SNOs, která v průběhu infekce výrazně nekolísala.

Naopak v případě *S. chmielewskii* byl již 24 hodin po inokulaci patogenem detekován poměrně vysoký obsah SNOs, dosahující asi $9 \mu\text{mol/l}$, který se postupně snižoval až do časového úseku 72 hpi, kdy spadl cca na $3 \mu\text{mol/l}$. V čase 96 a 168 hpi pak opět došlo ke zvýšení na hodnotu mírně nad $6 \mu\text{mol/l}$.

Nejvyšší vzrůst hladiny SNOs nastal u rezistentního genotypu *S. habrochaites*, kdy množství *S*-nitrosothiolů činilo 24 hpi okolo $13 \mu\text{mol/l}$. Obsah SNOs v inokulovaných listech

se pak postupně snižoval, až v časovém intervalu 168 hodin po inokulaci klesl na hodnotu kolem 3 $\mu\text{mol/l}$.

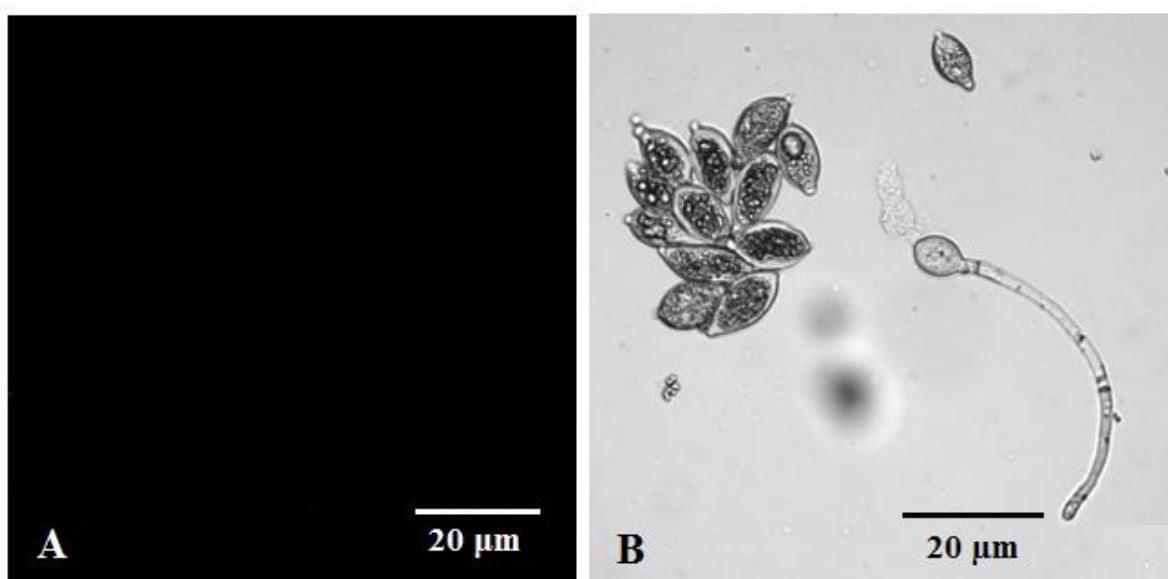


Graf 2: Obsah *S*-nitrosothiolů u studovaných genotypů *Solanum* spp. během 168 hodin od inokulace *P. infestans*. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

5.4. Detekce RONS v klíčících sporangíích *P. infestans*

Detekce reaktivních forem kyslíku a dusíku byla provedena během 3h klíčení sporangií *P. infestans*. U jednotlivých preparátů byla stanovena klíčivost, která činila v průměru zhruba 3 – 4 %, tj. 3 – 4 klíčící sporangia ze 100 sporangií.

Preparáty byly připraveny třemi odlišnými způsoby. V prvním případě, kdy bylo klíčení sporangií provedeno na vodním agarosovém médiu, nebyl detekován žádný fluorescenční signál, a to jak během lokalizace ROS (Obr. 11), tak ani během detekce NO.

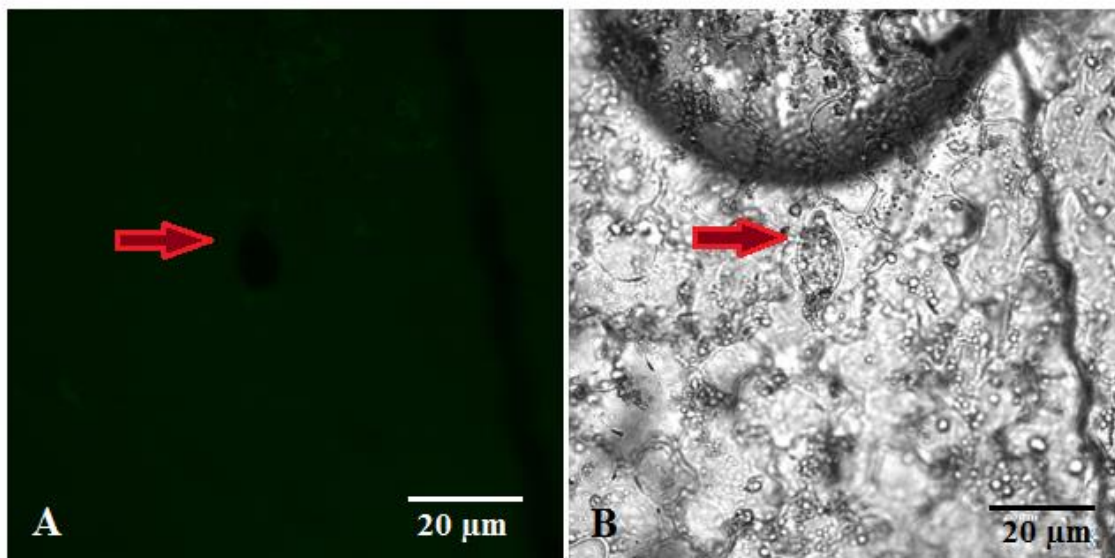


Obr. 11: Detekce reaktivních forem kyslíku ve sporangíích *Phytophthora infestans* po 120 minutách klíčení na vodním agaru (zvětšení 400x).

A: Fluorescenční kanál - signál barviva c-H₂DCF DA nebyl zaznamenán.

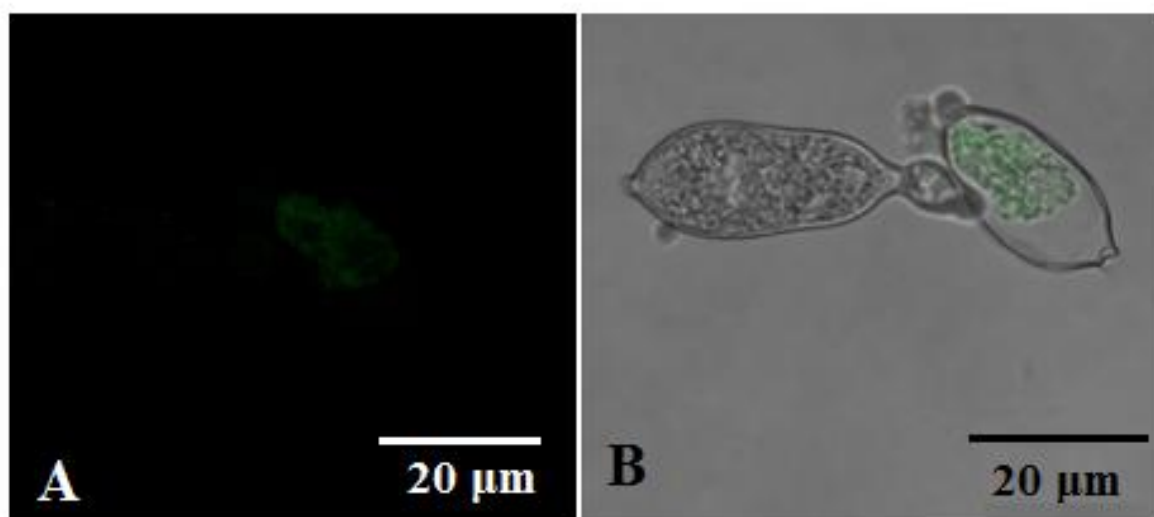
B: Kombinace viditelného a fluorescenčního kanálu. Sporangia, která ještě neuvolnila zoospory (vlevo) a sporangium klíčící v infekční hyfu (vpravo).

Druhou metodou bylo klíčení sporangií na epidermis listu na vodním agaru. I zde se ukázalo, že *P. infestans* nevykazuje žádnou produkci RONS, a to ani po interakci hostitelská rostlina – patogen. U rostlinného materiálu byl nicméně po 120 minutové inkubaci zachycen slabší signál, detekující přítomnost ROS, včetně peroxidu vodíku (viz Obr. 12), a to pravděpodobně v důsledku mechanického poškození při odtržení pokožky od dalších vrstev pletiv.



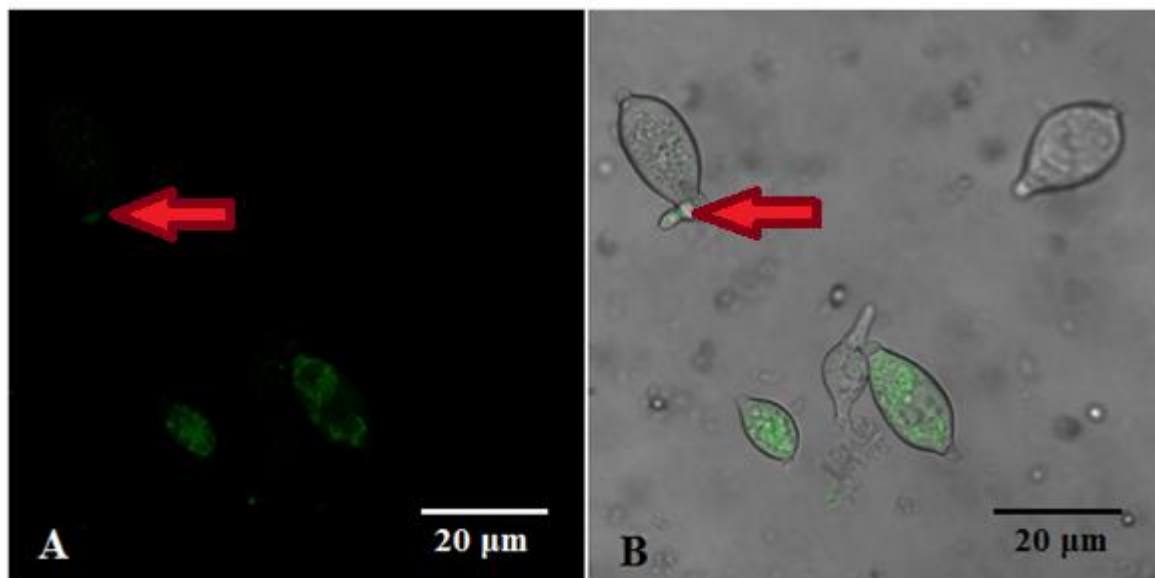
Obr. 12: Detekce ROS u *P. infestans* po 120 min klíčení na epidermis rajčete (zvětšení 400x).
A: Fluorescenční kanál – slabý signál barviva c-H₂DCF DA byl zaznamenán v rostlinném pletivu. Červená šipka ukazuje na sporangium, kde nedošlo k detekci fluorescenčního signálu.
B: Kombinace viditelného a fluorescenčního kanálu.

Použití agaru s extraktem z listů rajčete bylo pro klíčení *P. infestans* nejvhodnější. Bylo také zjištěno, že k produkci RONS dochází u sporangií během jejich odumírání (Obr. 13).



Obr. 13: Detekce ROS ve sporangiích *P. infestans* po 120 minutách klíčení na médiu obsahujícím homogenát z listů *Solanum* spp. (zvětšení 400x).
A: Fluorescenční kanál - signál barviva c-H₂DCF DA v odumírajícím zoosporangiu.
B: Kombinace viditelného a fluorescenčního kanálu.

Metoda klíčení *P. infestans* na agaru obsahující extrakt listů rajčete se ukázala jako vhodná i v případě produkce a následné detekce NO. Fluorescenční signál byl zde zaznamenán jak v odumírajících zoosporách, tak i v klíčním vláknu (Obr. 14).



Obr. 14: Lokalizace NO ve sporangíích patogenu s použitím fluorescenční sondy DAF-FM DA (zvětšení 400x).

A: Fluorescenční kanál - signál barviva DAF-FM DA u dvou odumírajících zoosporangií (dole), ale i v klíčním vláknu (znázorněno červenou šipkou).

B: Kombinace viditelného a fluorescenčního kanálu.

6. DISKUZE

Genotypy rajčat (*S. esculentum* L. cv. Amateur, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*), které byly v této bakalářské práci studovány v interakci s hemibiotrofním patogenem *Phytophthora infestans*, byly již dříve studovány v patosystému *Solanum* spp. – *Phytophthora parasitica*. K prvním příznakům infekce *P. infestans* došlo v časových intervalech 72 či 96 hpi, zatímco exprese příznaků po napadení *P. parasitica* byly u jednotlivých genotypů zaznamenány již 24, případně 48 hpi.

U listů *S. esculentum* L. cv. Amateur inokulovaných *P. infestans* došlo mezi časovými intervaly 96 a 168 hpi k rozšíření vzniklých lézí, kdežto po inokulaci *P. parasitica* nenastalo od počáteční exprese příznaků k další rozšiřování. Genotyp *S. chmielewskii*, který nejevil po inokulaci *P. infestans* žádné výrazné symptomy, prokázal během napadení *P. parasitica* oproti ostatním genotypům rajčat největší rozsahy nekrotizací, které se později rozšiřovaly také do okolních pletiv (Slobodianová, 2014). U *S. habrochaites* byla v souvislosti s patogenezí *P. parasitica* zaznamenána nejrychlejší reakce v podobě nekrotizace, již 24 hpi, která se dále nerozšiřovala. Po inokulaci *P. infestans* došlo k symptomům až 96 hpi a velikost vzniklých lézí již nevzrůstala, stejně jako v prvním případě.

Solanum esculentum L. cv. Micro-Tom nebyl v interakci s *P. parasitica* dosud studován. Takahashi *et al.* (2005) studovali reakce tohoto genotypu rajčete na napadení řadou houbových patogenů. Zjistili, že *S. esculentum* L. cv. Micro-Tom je náchylný k většině testovaných patogenů, včetně *P. infestans* a *Oidium* sp. V případě provedení inokulace *P. infestans* rozprášením suspenze zoospor na celý povrch rostliny došlo po cca 96 hodinách od inokulace ke vzniku vodnatých skvrn na listech, stoncích a řapících s tím, že se skvrny rychle rozšířily, nekrotizovaly a způsobily úplné uhynutí listů. Metoda inokulace prostřednictvím vpravení suspenze zoospor do spodní strany listů způsobila pomalejší nárůst symptomů v podobě menších nekrotických skvrn, které se již dále nerozšiřovaly. Tato skutečnost odpovídá i výsledkům získaným v mé práci.

Všechny čtyři genotypy rajčat studované v této bakalářské práci již byly na Katedře botaniky UP testovány v souvislosti s biotrofním patogenem *Oidium neolycopersici* (padlím rajčatovým), přičemž jednotlivé genotypy vykazovaly různý stupeň náchylnosti k infekci padlím. *S. esculentum* L. cv. Amateur a *S. esculentum* L. cv. Micro-Tom se z hlediska vizuálních symptomů projevíly jako náchylné k infekci, stejně jako tomu bylo v případě inokulace těchto genotypů hemibiotrofem *P. infestans*. U *S. chmielewskii* byla prokázána střední rezistence vůči *O. neolycopersici*, zatímco po inokulaci *P. infestans* nedošlo

u zmíněného genotypu k žádným větším viditelným symptomům. *S. habrochaites* vykazoval jak po infekci padlím, tak po infekci *P. infestans* pouze mírné vizuální příznaky.

Aktivita enzymu *S*-nitrosoglutathion reductasy (GSNOR) v rostlinách a jeho role v reakci na biotický i abiotický stres byla intenzivně studována v mnoha publikacích. Řada studií potvrzuje, že GSNOR hraje důležitou úlohu v regulaci GSNO v buňkách a zároveň nepřímo reguluje hladinu *S*-nitrosothiolů, čímž ovlivňuje celkový metabolismus RNS (Liu *et al.*, 2001). Výsledky získané v experimentální části této bakalářské práce se v jednotlivých sériích inokulace rostlin poněkud lišily, u jednotlivých genotypů ale vykazovaly obdobné trendy. Odchylky v získaných výsledcích mohly být způsobeny jak rozdílnými podmínkami během pěstování rostlin i provádění inokulace, tak například vysokou citlivostí metody měření aktivity GSNOR na působení vnějších podmínek.

Aktivitu GSNOR u *S. esculentum* L. cv. Amateur, genotypu náchylného vůči infekci *O. neolycoopersici*, po vystavení rostliny biotickému stresu studovali Kubienová *et al.* (2013a). V tomto případě byla v listech naměřena nízká aktivita, která dosáhla jen cca 10 nmol/min.g FW. V mé bakalářské práci byly u zmíněného genotypu naměřeny mnohem vyšší hodnoty, které se již 24 hodin po inokulaci *P. infestans* pohybovaly okolo 230 nmol/min.g FW. Vůbec největšího nárůstu dosáhla aktivita GSNOR 96 hpi, tedy v době pozorování prvních výrazných symptomů na inokulovaných listech. Hladina *S*-nitrosothiolů se zde pohybovala v nízkých hodnotách; v žádném z časových intervalů nepřesáhla hodnotu 4 μ mol/l, což odpovídá rapidnímu nárůstu aktivity GSNOR v rostlinném pletivu.

Zajímavým poznatkem je, že u *S. esculentum* L. cv. Micro-Tom byla po infekci *P. infestans* zaznamenána mnohem nižší bazální hladina GSNOR než v případě *S. esculentum* L. cv. Amateur i přesto, že se jedná rovněž o genotyp náchylný k padlí (*O. neolycoopersici*), a že tento genotyp vykazoval po inokulaci *P. infestans* obdobné symptomy. Hladina GSNOR se u *S. esculentum* L. cv. Micro-Tom pohybovala mezi 50 – 70 nmol/min.g FW. K nárůstu aktivity GSNOR ale došlo u obou genotypů shodně, tedy 96 hodin po inokulaci, kdy aktivita enzymu činila u *S. esculentum* L. cv. Micro-Tom cca 180 nmol/min.g FW. Rovněž obsah SNOs byl u tohoto genotypu ve všech časových intervalech nízký, pohyboval se mezi 2 – 4 μ mol/l. Tato skutečnost i v tomto případě koreluje s nárůstem aktivity GSNOR.

U *S. chmielewskii* byl zjištěn kontinuální nárůst aktivity GSNOR od 24 do 72 hpi, ačkoli zmíněný genotyp nevykazoval příznaky napadení. V časových intervalech 96 a 168 hpi pak došlo ke snížení aktivity enzymu. V souvislosti s touto skutečností bylo u *S. chmielewskii* zaznamenáno snížení hladiny SNOs postupně až do 72 hpi, a to z počáteční hodnoty 10 μ mol/l postupně až na hodnotu zhruba 4 μ mol/l. V časových intervalech 96 a 168 hpi pak

došlo k nárůstu obsahu SNOs na hodnotu zhruba 7 $\mu\text{mol/l}$. V bakalářské práci K. Markové (2015) bylo naopak dokázáno, že po napadení *S. chmielewskii* způsobuje *P. infestans* na listech typické příznaky v podobě postupně se rozrůstajících nekrotických lézí. Odchytky ve výsledcích mohly být způsobeny širokou škálou faktorů, jako například kolísáním teplot během pěstování rostlin ve skleníku či množstvím zoospor použitých na inokulaci.

U *S. habrochaites* byla detekována relativně nízká aktivita GSNOR po celou dobu infekce, hodnoty v časových intervalech 24 a 48 hodin po inokulaci nepřesáhly 80 nmol/min.g FW. K nárůstu aktivity zde došlo 72 a 96 hpi, kdy se hodnota pohybovala okolo 100 nmol/min.g FW a kdy byly zároveň zaznamenány viditelné symptomy na listech. Aktivita enzymu koreluje i v tomto případě s obsahem *S*-nitrosothiolů v inokulovaných listech, jelikož obsah SNOs zde činil 24 hpi až 13 $\mu\text{mol/l}$ a kontinuálně se snižoval, až dosáhl 168 hpi cca 3 $\mu\text{mol/l}$. Podobných výsledků bylo dosaženo i během studie aktivity GSNOR po inokulaci *P. parasitica*, kdy u *S. habrochaites* nebyl detekován výrazný rozdíl mezi aktivitou GSNOR u kontrolních a inokulovaných listů (Slobodianová, 2014). Oproti tomu bylo v práci Kubienová *et al.* (2014) prokázáno, že po napadení biotrofním patogenem *O. neolycopersici* dochází u tohoto genotypu ke zvýšení produkce GSNOR již 24 hpi s tím, že od 72 hpi aktivita enzymu postupně klesala.

Vzhledem k tomu, že jednotlivé studie přinášejí různé výsledky, je zobecnění úlohy GSNOR a SNOs v biotickém stresu rostlin dosud obtížné a vyžaduje další výzkumy, a to nejen v případě mnou studovaného patosystému *Solanum* spp. – *Phytophthora infestans*.

Úloha reaktivních forem kyslíku a dusíku ve vývoji a patogenezí fytopatogenů není objasněna tak důkladně, jako je tomu u rostlin. Předpokládá se však, že stejně jako v případě rostlin jsou do mechanismu syntézy ROS a NO u patogenů zapojeny jak oxidační, tak redukční metabolické dráhy (Sedlářová *et al.*, 2016). Produkce ROS a oxidu dusnatého byla dosud prokázána např. během vývoje peronospor (*Bremia lactucae* či *Plasmophara halstedii*) a padlí (*O. neolycopersici* či *Blumeria graminis*), a to zejména v klíčících vláknech, apresoriích a haustoriích (Sedlářová *et al.*, 2011, Prats *et al.*, 2008). Funkci RONS v houbových patogenech studovali také Arasimowicz-Jelonek *et Floryszak-Wieczorek* (2014), kteří došli k závěru, že se tyto molekuly podílejí na přežití patogenu po kontaktu s hostitelskou buňkou a že množství těchto molekul může rovněž ovlivňovat míru patogenity.

Lokalizace ROS a NO byla v této práci studována u sporangií hemibiotrofního patogenu *Phytophthora infestans*, klíčících na vodním agaru s využitím histochemického značení a detekce signálu konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Výsledky ukázaly, že ve sporangiích *P. infestans* nedochází k výrazné tvorbě ROS ani NO. Slabší signál byl

detekován v odumírajících sporách, výskyt NO byl zaznamenán při klíčení na agaru s přídavkem extraktu pletiv rajčete i v klíčném vláknu. Tyto poznatky slabě korelují s výsledky studie Piterkové *et al.* (2009), kdy se autoři zabývali účinky ROS a NO u padlí v patosystému *O. neolycopersici* – *Solanum* spp. Reaktivní formy kyslíku a oxidu dusnatý zde byly detekovány ve špičkách klíčnicích hyf a v haustoriích, tedy ve stejných místech jako u patogenů *P. halstedii* či *B. graminis*. Signál NO však nebyl zaznamenán v případě klíčení spor padlí na agaru bez využití interakce s hostitelskou rostlinou, stejně jako tomu bylo u *P. infestans* v této práci. Přesnější stanovení úlohy ROS a NO v ontogenezi a patogenezi *Phytophthora infestans* ale zůstává výzvou pro budoucí experimentální studium.

7. ZÁVĚR

V bakalářské práci byla provedena inokulace čtyř genotypů *Solanum* spp. Sporangii hemibiotrofa *Phytophthora infestans*, zhodnoceny symptomy a následně měřena specifická aktivita enzymu *S*-nitrosoglutathion reduktasy (GSNOR) a obsah *S*-nitrosothiolů (SNOs) v inokulovaných pletivech během 168 hpi. V klíčících sporangiích *P. infestans* byla lokalizována přítomnost reaktivních forem kyslíku (ROS) a oxidu dusnatého (NO).

Získané výsledky ukazují, že symptomy způsobené infekcí *P. infestans* se u jednotlivých genotypů lišily, ačkoli téměř ve všech případech nastupovaly v pozdějších časových intervalech, nejčastěji 96 hodin po inokulaci.

Infekce *P. infestans* způsobila u inokulovaných listů rovněž zvýšení aktivity GSNOR, přičemž se dynamika změn lišila v závislosti na testovaném genotypu rostliny. K vůbec nejvyššímu nárůstu GSNOR došlo u *S. esculentum* L. cv. Amateur. U *S. esculentum* L. cv. Micro-Tom a *S. habrochaites* se bazální hladina enzymu pohybovala v nižších hodnotách. Poměrně vysoká a zároveň kolísavá aktivita GSNOR byla naměřena u *S. chmielewskii* i přesto, že tento genotyp nevykazoval žádné viditelné příznaky napadení. Naměřené hodnoty GSNOR tak naznačují, že aktivita enzymu může být ovlivněna vnějšími podmínkami. Zároveň bylo potvrzeno, že tento enzym snižuje obsah *S*-nitrosothiolů v inokulovaných pletivech, který se v závislosti na nárůstu GSNOR ve většině případů snižoval.

V této práci bylo také prokázáno, že v klíčících sporangiích *Phytophthora infestans* nedochází během interakce patogen – hostitelská rostlina k tak výrazné tvorbě ROS a NO, jako u některých biotrofních fytopatogenů.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. & Taylor, M. F. J. R. (2005): The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52 (5): 399-451.

Agrios, G. N. (2005): *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, London, UK, 414-426.

Airaki, M., Sánchez-Moreno, L., Leterrier, M., Barroso, J. B., Palma, J. M., Corpas, F. J. (2011): Detection and quantification of S-nitrosoglutathione (GSNO) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plant organs by LC-ES/MS. *Plant Cell Physiology*, 52: 2006-2015.

Anderrson, B. (2007): Sexual reproduction in *Phytophthora infestans* - epidemiological consequences. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden.

Arasimowicz-Jelonek, M., & Floryszak-Wieczorek, J. (2014): Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen? *Molecular Plant Pathology*, 15:406-416.

Besson-Bard, A., Pugin, A., Wendehenne, D. (2008): New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 21-39.

Blein, J. P., Milat, M. L., Ricci, P. (1991): Responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiology*, 95: 486-491.

Boissy, G., deLaFortelle, E., Kahn, R., Huet, J. C., Bricogne, G, Pernollet, J. C., Brunie, S. (1996): Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure*, 4: 1429-1439.

Bradford, M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254

Brasier, C. M. (1992): Evolutionary biology of *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 153-170.

Brown, G. C., Borutaite, V. (2002): Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 33: 1440.

Catalá, M., Gasulla, F., Pradas del Real, A. E., García-Breijo, F., Reig-Arminana, J., Barreno, E. (2010): Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. *BMC Microbiology*, 10: 297-300.

Cohen Y., Farkash S., Reshit Z., Baider A. (1997): Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves. *Phytopathology*, 87: 191-196.

Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., Brasier, C. M. (2000): A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30: 17-32.

Corpas, F. J., Alché, J. D., Barroso, J. B. (2013): Current overview of *S*-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in Plant Science, Plant Physiology*, 4: 1-3.

Daekyung, K., Kenichi, Y., Tatsuva, O. (2006): Nitric oxide synthase-like enzyme mediated nitric oxide generation by harmful red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Journal of Plankton Research*, 28: 613-620.

Drenth, A. (1994): Molecular genetic evidence for a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in Europe: Proefschrift. Thesis Wageningen, Wageningen, The Netherlands.

Erwin, D. C., Ribiero, O. K. (1996): *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, St. Paul, Minnesota, str. 15.

Feechan, A., Kwon, E., Yun, B. W., Wang, Y., Pallas, J. A., Loake, G. J. (2005): A central role for *S*-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, 102: 8054.

Foresi, N., Correa-Aragunde, G., Parisi, G., Caló, G., Salerno, L., Lamattina, L. (2010): Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell*, 22: 3816–3830

Gallegly, M. E., Hong, C. X. (2008): *Phytophthora*: Identifying species with morphology and DNA fingerprints. APS Press, St. Paul, MN, U.S.A., 158 stran.

Goss E.M., Tabima J.F., Cooke D.E., Restrepo S., Fry W.E., Forbes G.A., Fieland V.J., Cardenas M., Grünwald N.J. (2014): The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 111: 8791-8796.

Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H. Y., Handsaker R.E., Cano L.M., Grabherr M., Kodira C.D., Raffaele S., Torto-Alalibo T., Bozkurt T.O., Ah-Fong H.M. V., Alvarado L., Anderson V.L., Armstrong M.R., Avrova A., Baxter L., Beynon J., Boevink P.C., Bollmann S.R., Bos J.I.B., Bulone V., Cai G., Cakir C., Carrington J.C., Chawner M., Conti L., Costanzo S., Ewan R., Fahlgren N., Fischbach M.A., Fugelstad J., Gilroy E.M., Gnerre S., Green P.J., Grenville-Briggs L.J., Griffith J., Grünwald N.J., Horn K., Horner N. R., Hu C.-H., Huitema E., Jeong D.-H., Jones A.M.E., Jones J.D.G., Jones R.W., Karlsson E.K., Kunjeti S.G., Lamour K., Liu Z., Ma L.J., MacLean D., Chibucos M.C., McDonald H., McWalters J., Meijer H.J.G., Morgan W., Morris P.F., Munro C.A., O'Neill K., Ospina-Giraldo M., Pinzón A., Pritchard L., Ramsahoye B., Ren Q., Restrepo S., Roy S., Sadanandom A., Savidor A., Schornack S., Schwartz D.C., Schumann U.D., Schwessinger B., Seyer L., Sharpe T., Silvar C., Song J., Studholme D.J., Sykes S., Thines M., Vondervoort P.J.I., Phuntumart V., Wawra S., Weide R., Win J., Young C., Zhou S., Fry W., Meyers B.C., West P., Ristaino J., Govers F., Birch P.R.J., Whisson S.C., Judelson H.S., Nusbaum C. (2009): Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461: 393-398.

Krátká, J., Křížková, I., Novotný, D. (2008): Detekce *Phytophthora cactorum* a *P. cambivora* v pletivech jabloní klasickými a imunochemickými metodami. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 16 stran.

Hardham, A. R., Cahill D. M. (2010): The role of oomycete effectors in plant-pathogen interactions. *Functional Plant Biology*, 37: 919-925.

- Haverkort, A. J., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. A. P., Kessel, G. J. T., Visser, R. G. F., Vossen, E. A. G. (2008): Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research*, 51: 47–57.
- Hibbs, A. R. (2004): Confocal microscopy for biologist. BIOCON Melbourne, AUS Springer, 27, 474 stran.
- Hnízdová, I., Luhová, L., Petřivalský, M. (2009): Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické Listy*, 103: 788-794.
- Chen, Z., Gallie, D. R. (2004): The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *The Plant Cell*, 16: 1134.
- Judelson, H. S. (1997): The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genetics and Biology*, 22: 65-76.
- Juroch, J. (2011) [pdf] [online] [cit. 27. 2. 2015]: *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary: původce chorob plísně bramboru a rajčete. Ministerstvo zemědělství. Praha, Česká republika. Dostupné z: <<http://eagri.cz/public/web/file/125259/plisen.pdf>>
- Kalina, T., Váňa, J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, str. 139-150.
- Kamoun S., Smart Ch. D. (2005): Late blight of potato and tomato in the genomics era. *Plant Disease*, 89: 692-699.
- Kamoun, S., Young, M., Forster, H., Coffey, M. D., Tyler, B. M. (1994): Potential role of elicitors in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco. *Applied and Environmental Mikrobiology*, 60: 1593 – 1598.
- Kubienová, L., Tichá, T., Jahnová, J., Luhová, L., Petřivalský, M. (2013a): S-nitrosoglutathionreduktasa: Klíčový enzym regulace S-nitrosylace. *Chemické Listy*, 107: 202-208.
- Kubienová, L., Kopečný, D., Tylichová, M., Briozzo, P., Skopalová, J., Šebela, M., Navrátil, M., Tâche, R., Luhová, L., Barroso, J. B., Petřivalský, M. (2013b): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosoglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie*, 95: 889–902.
- Kubienová, L., Sedlářová, M., Wünschová-Vítečková, A., Piterková, J., Mieslerová, B., Navrátil, M., Luhová, L., Petřivalský, M. (2014): Involvement of reactive nitrogen species in the resistance mechanism of *Solanum* spp. to biotrophic pathogen *Oidium neolycopersici*. Připraveno do tisku.
- Kubínová, L. (2006): Pohledy do trojrozměrného mikrosvěta: konfokální a dvoufotonová mikroskopie. *Časopis Živa*, 6: 245-248.
- Le Berre, J. Y., Engler, G., Panabières, F. (2007): Exploration of the late stages of the tomato-*Phytophthora parasitica* interactions through histological analysis and generation of expressed sequence tags. *New Phytologist*, 177: 480-492.
- Lebeda, A., Mazáková, J., Táborský, V. (2006): Protozoa a chromista: taxonomie, biologie a hospodářský význam. Praha: Česká fytopatologická společnost, 92 stran.

- Lebeda, A., Mieslerová, B., Petřivalský, M., Luhová, L., Špundová, M., Sedlářová M., Nožková-Hlaváčková, V., Pink, D. A. C. (2014): Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolycopersici*. *European Journal of Plant Pathology*, 138: 569-596.
- Lewis, K., Ausubel, F. M. (2006): Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature Biotechnology*, 24: 1504–1507.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., Stamler, J. S. (2001): A metabolic enzyme for *S*-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*, 410: 490–494.
- Lochman, J., Kašparovský, T., Damborský, J., Osman, H., Marais, A., Chaloupková, R., Ponchet, M., Blein, J. P., Mikes, V. (2005): Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry*, 44: 6565-6572.
- Margulis, L., Schwartz, K. V. (1988): Life on Earth: The five kingdoms. [Protoctista, Animals]. Ward's Natural Sciences Establishment, Rochester, NY, 448 stran.
- Mayton, H., Smart, C.D., Moravec, B.C., Mizubuti, E.S.G., Muldoon, A.E., Fry W.E. (2000): Oospore survival and pathogenicity of single oospore recombinant progeny from a cross involving US-17 and US-8 genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease*, 84: 1190-1196.
- Mittler, R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405.
- Morita, Y., Tojo, M. (2007): Modifications of PARP Medium Using Fluazinam, Miconazole, and Nystatin for Detection of *Pythium* spp. in Soil. *Plant Disease*, 91: 1591-1599.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., Hancock, J. T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1237.
- Nowicki, M., Foolad, M. R., Nowakowska, M., Kozik, E. U. (2012a): Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. *Plant Disease*, 96: 4-17.
- Nowicki, M., Lichocka, M., Nowakowska, M., Kłosińska, U., Golik, P., Kozik, E. U. (2012b): A simple dual stain for detailed investigations of plant-fungal pathogen interactions. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 77: 61-74.
- Piterková, J., Petřivalský, M., Luhová, L., Mieslerová, B., Sedlářová, M., Lebeda, A. (2009): Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Molecular Plant Pathology*, 10: 501-513.
- Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P. (2005): Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické Listy*, 99: 455-466.
- Peng, K. C., Wang, C. V., Wu, C. H., Huang, C. T., Liou, R. F. (2015): Tomato SOBIR1/EVR Homologs Are Involved in Elicitin Perception and Plant Defense Against the Oomycete Pathogen *Phytophthora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28: 913-926.

Plant Pathology (2003) [online] [cit. 22. 8. 2015]: Active defenses in infection process. Dostupné z: <http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/PlantPathology/infection/plant_defenses/active_def.htm>

Ponchet, M., Panabieres, F., Milat, M. L., Mikeš, V., Montillet, J. L., Suty, L., Triantaphylides, C., Tirilly, Y., Blein J. P. (1999): Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56: 1020 – 1047.

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

Saville, B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst*, 83: 670-672.

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

Sedlářová, M., Kubienová, L., Drábková, Trojanová, Z., Luhová, L., Lebeda, A., Petřivalský, M. (2016): The Role of Nitric Oxide in Development and Pathogenesis of Biotrophic Phytopathogens a Downy and Powdery Mildews. *Nitric Oxide and Signaling in Plants*, 77: 263–283.

Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M. (2011): Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*, 112: 487.

Shattock, R. C. (2002): *Phytophthora infestans*: populations, pathogenicity and phenylamides. *Pest Management Science*, 58: 944-950.

Shibata, Y., Kawakita, K., Takemoto, D. (2010): Age-related resistance of *Nicotiana benthamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene- and salicylic acid-mediated signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23: 1130-1142.

Slobodianová, L. (2014): Studium vlivu oomycet a elicitorů na obrannou reakci rostlin. Bakalářská práce. (Dep. in: Knihovna Biologických oborů PŘF UP v Olomouci).

Stevenson, W. R., Loria, R., Franc, G. D., Weingartner, D. P.: Compendium of potato disease. 2nd edition, APS Press, 2001.

Takahashi, H., Shimizu, A., Arie, T., Rosmalawati, S., Fukushima, S., Kikuchi, M., Hikichi, Y., Kanda, Y., Takahashi, A., Kiba, A., Ohnishi, K., Ichinose, Y., Taguchi, F., Yasuda, CH., Kodama, M., Egusa, M., Masuta, CH., Sawada, H., Shibata, D., Hori, K., Watanabe, Y. (2005): Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. *Journal of General Plant Pathology*, 71: 8-22.

Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P., Lancaster, J. R. (2001): The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, 98: 355-360.

- Torto, T. A., Li, S., Styer, A., Huitema, E., Testa A., Gow, N. A. R., West, P., Kamoun, S. (2003): EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Research*, 13: 1675-1685.
- Tumwine, J., Frinking, H. D., Jeger, M. J. (2000): Isolation techniques and cultural media for *Phytophthora infestans* from tomatoes. *Mycologist*, 14: 137-139.
- Vleeshouwers, V. G. A. A., Raffaele, S., Vossen, J. H., Champouret, N., Oliva, R., Segretin, M. E., Rietman, H., Cano, L. M., Lokossou, A., Kessel, G., Pel, M. A., Kamoun, S. (2011): Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 507-531.
- Wendehenne, D., Gould, K., Lamotte, O., Durner, J., Vandelle, E., Lecourieux, D., Courtois, C., Barnavon, L., Bentejac, M., Pugin, A. (2005): NO signaling functions in the biotic and abiotic stress responses. *BMC Plant Biology*, 5: 35.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. F., Durner, J. (2001): Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science*, 6: 177-183.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. (2000): Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters*, 468: 89.
- Yu, L. M. (1995): Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 92: 4088-4094.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3D	Trojrozměrný
ADH3	Alkoholdehydrogenasa třídy III
AtGSNOR	Rekombinantní S-nitrosoglutathion reduktasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AVR	Avirulentní proteiny
BSA	Hovězí sérový albumin
CaCO ₃	Uhličitan vápenatý
carboxy-H ₂ DCFDA	6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
CAT	Katalasa
cGMP	Cyklický guanosin monofosfát
CLSM	Konfokální laserová skenovací mikroskopie
CRN	Crinkling and necrosis proteins
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GSH	Redukovaný glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathion reduktasa
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
HNO ₂	Kyselina dusitá
Hpi	Hodin po inokulaci
HR	Hypersenzitivní reakce
JA	Kyselina jasmonová
LC-ES/MS	Kapalinová chromatografie elektrospřejem pomocí hmotnostní spektrometrie
N ₂ O	Oxid dusný
N ₂ O ₃	Oxid dusitý
NADH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADPH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát
NED	N-(1-naftyletylen)diamin
NiNOR	Nitrit:NO reduktasa
NO ₂	Oxid dusičitý
NO ₂ ⁻	Dusitanový anion
NO	Oxid dusnatý
NOS	NO syntasa
NR	Nitrát reduktasa
O ₂	Molekulární kyslík
O ₂ ⁻	Superoxidový radikál
OH [·]	Hydroxylový radikál
ONOO ⁻	Peroxydusitan
pI	Izoelektrický bod
PR	Pathogenesis-related proteins
R	Geny rezistence
RNS	Reaktivní formy dusíku
RONS	Reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RXLR	Proteiny s příslušným aminokyselinovým motivem (Arg-Xaa-Leu- Arg)
SA	Kyselina salicylová
SAR	Systémově získaná rezistence
SNOs	S-nitrosothioly
SOD	Superoxiddismutasa
USD	Americký dolar
UV	Ultrafialové záření