

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

CENTRUM REGIONU HANÁ
PRO BIOTECHNOLOGICKÝ A ZEMĚDĚLSKÝ VÝZKUM

ODDĚLENÍ BIOFYZIKY



OBRANNÉ MECHANISMY ROSTLIN
PROTI OXIDAČNÍMU STRESU

DOKTORSKÁ DISERTAČNÍ PRÁCE

HELENA KYSELÁKOVÁ

ŠKOLITEL: PROF. RNDR. PETR ILÍK PH.D.

OLOMOUC

2012

PODĚKOVÁNÍ

*Chtěla bych poděkovat svému školiteli **prof. RNDr. Petru Ilíkovi, Ph.D.**, za cenné rady a odborné vedení, které mi poskytl během celého studia.*

*Rovněž bych ráda poděkovala **doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D.** a **RNDr. Martině Špundové Ph.D.**, za vstřícnost, podnětné rady během experimentů a také za pomoc při psaní odborných publikací a disertační práce.*

Děkuji kolegům z katedry biofyziky, katedry biochemie, katedry botaniky a Laboratoře růstových regulátorů za vytvoření instrumentálního zázemí a laboratorní pohody.

*Velmi bych chtěla poděkovat **Mgr. Jitce Prokopové** za přátelství a povzbuzení.*

*V neposlední řadě patří můj dík **Marinovi** a **mým rodičům** za všestrannou podporu a lásku.*

Tato práce vznikla za finanční podpory projektů, MSM 6198959215 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy s názvem "Variabilita složek a interakcí v rostlinném patosystému a vliv faktorů prostředí na jejich projev", a GAČR 522/08/H003 Grantové agentury České republiky s názvem "Integrace doktorských studií biochemie, rostlinné fyziologie a biofyziky" a projektu OP VaVpI "Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum" (ED0007/01/01).

PŘEHLED PUBLIKACÍ

- [I] Eva Kotabová E., Radek Kaňa, **Helena Kyseláková**, Lenka Lípová, Ondřej Novák, Petr Ilík (2008): A pronounced light-induced zeaxanthin formation accompanied by unusually slight increase in non-photochemical quenching. A study with barley leaves treated with methyl viologen at moderate light. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1563-1571
- [II] **Helena Kyseláková**, Jitka Prokopová, Jan Nauš, Ondřej Novák, Milan Navrátil, Dana Šafářová, Martina Špundová, Petr Ilík (2011): Photosynthetic alterations of pea leaves infected systemically by Pea enation mosaic virus: A coordinated decrease in efficiencies of CO₂ assimilation and photosystem II photochemistry. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 1279-1289
- [III] **Helena Kyseláková**, Michaela Sedlářová, Martin Kubala, Vladimíra Nožková, Jana Piterková, Lenka Luhová, Ondřej Novák, Petr Ilík (2012): Reactive oxygen and nitrogen species and hormone signalling in systemic infection of pea by pea enation mosaic virus. *Plant Protection Science – v recenzním řízení*

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že disertační práce je mým původním dílem, zpracovala jsem ji samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci, 28. 6. 2012

.....
Helena Kyseláková

Prohlašuji, že má role při přípravě publikací byla následující:

- [I] spoluautor, měření a zpracovávání části dat, účast při diskuzi výsledků

- [II] hlavní autor, návrh provedení experimentů, měření a zpracování většiny dat, interpretace výsledků, příprava publikace

- [III] hlavní autor, návrh provedení experimentů, měření a zpracování většiny dat, interpretace výsledků, příprava publikace

Za spoluautory pravdivost prohlášení potvrzují:

Prof. RNDr. Petr Ilík, Ph.D.

.....

doc. RNDr. Michaela Sedlářová Ph.D.

.....

V Olomouci, 28. června 2012

.....
Helena Kyseláková

ABSTRAKTA A PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ Z KONFERENCÍ

- (1) **Kyseláková, H.**, Prokopová, J., Sušila, P., Macháčková, E., Nauš, J. (2007): Změny v optických a fotosyntetických parametrech listu ibišku vyvolané napadením mšicemi. Konference experimentální biologie rostlin; Olomouc, červenec 9.-12. In: Blahoušek, O. (Ed.): *Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin*. FGP Studio, Olomouc, p. 117
- (2) **Kyseláková, H.**, Prokopová, J., Nauš, J., Kubala M., Ilík, P., Navrátil, M. (2007): Změny ve fyziologii a fotosyntetických parametrech hrachu (*Pisum sativum* L. cv. *Merkur*) vyvolané působením výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV). Konference experimentální biologie rostlin; Olomouc, červenec 9. -12. In: Blahoušek, O. (Ed.): *Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin*. FGP Studio, Olomouc, p. 118
- (3) Ilík, P., **Kyseláková, H.**, Kotabová, E., Nauš, J. (2007): Violaxanthin deepoxidation in barley leaves treated with methyl viologen is stimulated by moderate light from a fluorescent tube but not by light of the same intensity coming from a tungsten lamp. *Photosynthesis Research* 91: 245-255
- (4) **Kyseláková, H.**, Prokopová, J., Ilík, P., Piterková, J., Luhová, L., Sedlářová, M., Novák, O., Navrátil, M. (2008): Photosynthetic and oxidative responses of pea leaves to progressive infection due to *Pea Enation Mosaic Virus* (PEMV). In: *International Conference on Biotic Plant Interaction (Book of Abstracts)*. Queensland Biosciences Precinct, The University of Queensland, Brisbane, Australia, March 27. -29., p. 84.
- (5) Sedlářová, M., Kitner, M., Lebeda, A., Piterková, J., Luhová, L., Petřivalský, M., **Kyseláková, H.**, Navrátil, M., Švábová, L. (2008): Reactive nitrogen and oxygen species in pea responses to biotic stress stimuli. In: *2nd International Plant NO Club Workshop, July 21. - 22., (Book of Abstracts)*. UMR INRA, Université de Bourgogne, Dijon, France, p. 25.

CITACE

- (1) Kotabová Eva; Kaňa Radek; Jarešová Jana; et al. (2011) Non-photochemical fluorescence quenching in *Chromera velia* is enabled by fast violaxanthin de-epoxidation. *FEBS LETTERS* **585** (12): 1941-1945 (citován článek 1)
- (2) Krieger-Liszkay Anja; Kos Peter B.; Hideg Eva (2011) Superoxide anion radicals generated by methylviologen in photosystem I damage photosystem II. *Physiologia Plantarum* **142** (1): 17-25 (citován článek 1)
- (3) Sun J.; Jia Y. X.; Guo S. R.; et al. (2010) Resistance of spinach plants to seawater stress is correlated with higher activity of xanthophyll cycle and better maintenance of chlorophyll metabolism. *Photosynthetica* **48** (4): 567-569 (citován článek 1)
- (4) Ilík Petr; Kotabová Eva; Špundová Martina; et al. (2010) Low-light-induced violaxanthin de-epoxidation in shortly preheated leaves: uncoupling from delta pH-dependent nonphotochemical quenching. *Photochemistry and Photobiology*. **86** (3): 722-726 (citován článek 1)
- (5) Mai Jing; Herbette Stephane; Vandame Marc; et al. (2009) Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *Trees-Structure and Function* **23**(4): 863-874 (citován článek 1)

ŽIVOTOPIS

Helena Kyseláková

OSOBNÍ ÚDAJE

datum narození: 24. 6. 1981
bydliště: Lomená 591, Němčice nad Hanou 798 27, Česká republika
telefon: +420775132433
e-mail: helenakyselakova@seznam.cz

VZDĚLÁNÍ

- 2000 - 2003: bakalářské studium, titul **Bc.** udělen v roce 2003
Ostravská Univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, obor Biofyzika
téma bakalářské práce: Příprava thylakoidních membrán z jehlic smrku ztepilého [*Picea abies* (L.) Karst.]
- 2003 - 2005: magisterské studium, titul **Mgr.** udělen v roce 2005
Ostravská Univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, obor Biofyzika
téma diplomové práce: Kinetika relaxace parametrů zhášení fluorescence chlorofylu *a* při aklimaci fotosyntetického aparátu na zvýšenou úroveň ozáření v souvislosti s aktivitou xantofylového cyklu
- 2005 - 2009: postgraduální doktorské prezenční studium
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, obor Biofyzika,
Státní doktorská zkouška úspěšně složena v září 2009
- 2009 - 2012: postgraduální doktorské kombinované studium
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, obor Biofyzika,
téma disertační práce: Obranné mechanismy rostlin proti oxidačnímu stresu
obhajoba disertační práce: srpen 2012

PRACOVNÍ A JINÉ ZKUŠENOSTI

- leden - duben 2008 spolupráce s Ústavem fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR,
optimalizace metodiky pro enzymatickou izolaci protoplastů
- 2008 - 2009 vědecký pracovník oborů fyzikálních na PřF UP v Olomouci
- 2005 - 2009 vedení výuky studentů v praktiku na Katedře biofyziky:
Světelná mikroskopie, Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii, Příprava suspenze chloroplastů
- 2011- současnost grantová poradkyně, specialistka na marketing a propagaci
firmy BENEČYKL s.r.o.

VÝZKUMNÉ PROJEKTY

- 2007 Fond rozvoje vysokých škol MŠMT 2260/2007 – Izolace chloroplastů s vysokým stupněm intaktnosti - hlavní řešitelka
- 2007-2009 zapojena do Výzkumného záměru MSM 6198959215 – Variabilita složek a interakcí v rostlinném patosystému a vliv faktorů prostředí na jejich projev, řešitel prof. RNDr. Aleš Lebeda, DrSc., Katedra botaniky PřF UP
- 2008 - 2009 zapojena do řešení grantu 522/08/H003 – Integrace doktorských studií v oborech biochemie, rostlinné fyziologie a biofyziky, řešitel Prof. RNDr. Ivo Frébort, CSc., Ph.D.

ÚČAST NA ODBORNÝCH SEMINÁŘÍCH A KONFERENCÍCH

- březen 2008 International Conference on Biotic Plant Interactions
Brisbane, Austrálie - poster
- červenec 2007 Konference experimentální biologie rostlin, Olomouc 2x poster
- červenec 2006 Summer School for Ph.D. students - Methods for studying the role of antioxidants in plants, food, man and animals Christian-Albrechts University Kiel, Německo
- květen 2006 Konference Ph.D. studentů, Nové Hradky - přednáška

VĚDECKO-VÝZKUMNÁ STÁŽ V ZAHRANIČÍ

- květen - červenec 2009 Jagiellonian University, Faculty of Science, Department of Plant Biotechnology, Kraków, Polsko
vedoucí prof. H. Gabryś Ph.D. DsC,
studium pohybu chloroplastů *Arabidopsis thaliana* po exogenní aplikaci kyseliny abscisové, získání znalostí z oblasti molekulární biologie

ODBORNÉ PUBLIKACE

Eva Kotabová, Radek Kaňa, **Helena Kyseláková**, Lenka Lípová, Ondřej Novák, Petr Ilík (2008): A pronounced light-induced zeaxanthin formation accompanied by unusually slight increase in non-photochemical quenching. A study with barley leaves treated with methyl viologen at moderate light. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1563-1571

Helena Kyseláková, Jitka Prokopová, Jan Nauš, Ondřej Novák, Milan Navrátil, Dana Šafářová, Martina Špundová, Petr Ilík (2011): Photosynthetic alterations of pea leaves infected systemically by Pea enation mosaic virus: A coordinated decrease in efficiencies of CO₂ assimilation and photosystem II photochemistry. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 1279-1289

Helena Kyseláková, Michaela Sedlářová, Martin Kubala, Vladimíra Nožková, Jana Piterková, Lenka Luhová, Ondřej Novák, Petr Ilík (2012): Reactive oxygen and nitrogen species and hormone signalling in systemic infection of pea by pea enation mosaic virus. *Plant Protection Science – v recenzním řízení*

SOUHRN

Po vystavení rostlin stresovým faktorům, ať už biotickým či abiotickým, dojde k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují poškození různých komponent fotosyntetického aparátu. Proto, aby se rostliny vyrovnaly se s výkyvy životního prostředí a byly schopné bránit se invazi patogenů, musí být jejich metabolismus flexibilní a dynamický. U rostlin se vyvinulo několik protektivních mechanismů, které mají za úkol potlačit produkci reaktivních forem kyslíku a pomoci rostlině vyrovnat se s následky oxidačního poškození. Práce je postavena jak na výsledcích modelových experimentů simulujících oxidační stres v listech rostlin tak na výsledcích získaných na celých rostlinách, kde byl oxidační stres navozen virovou infekcí.

V prvním řešeném projektu jsme se zaměřili na modelový oxidační stres vyvolaný aplikací methyl viologenu. Cílem bylo zjistit, jak jsou obranné mechanismy rostliny schopny se s tímto mírným stresem vypořádat. Zaměřili jsme se na změny v aktivitě antioxidantních enzymů, rozdíly v elektronovém transportu, změny v xantofylovém cyklu a nefotochemickém zhášení fluorescence. Zjistili jsme, že v podmínkách mírného oxidačního stresu při slabé ozáření nebyl urychlen elektronový transport a došlo k poklesu aktivity askorbát peroxidasy. Zjistili jsme nerovnováhu mezi vysokým obsahem zeaxanthinu v thylakoidní membráně a nízkou úrovní NPQ při limitních světelných podmínkách. Ukázalo se, že violaxanthin de-epoxidasa je aktivní také při limitních světelných podmínkách a činnost tohoto enzymu je omezena spíše dostupností violaxanthinu, než aciditou lumenu. Předpokládáme, že mírný oxidační stres může mít vliv na uvolňování violaxanthinu ze světlosběrných komplexů. Dále jsme ukázali, že při mírném oxidačním stresu zeaxanthin účinně ochraňuje thylakoidní membránu před lipidovou peroxidací.

Během kompatibilních virových interakcí dochází k mnohým změnám na úrovni buněk, pletiv i celých rostlin. Jak rostlina při kompatibilní interakci reaguje, není zatím zcela objasněno ikdyž jsou to právě kompatibilní patogeny, které způsobují onemocnění rostlin a tím i velké ztráty v zemědělství. Modelovým systémem, na kterém byly realizovány experimenty zaměřené na změny v primárním metabolismu rostliny v průběhu systémové virové infekce, byl hrách setý (*Pisum sativum* cv. Merkur) infikovaný virem enační výrůstkové mozaiky (PEMV). Zjistili jsme pokles v obsahu fotosyntetických pigmentů, pokles maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II, pokles v rychlosti asimilace CO₂. Zaznamenali jsme aktivaci fotoprotektivních mechanismů, tj. nárůst hodnot

NPQ který byl spojený s akumulací de-epoxidovaných xantofylů. Předpokládáme, že ve studovaném modelovém systému jsou změny ve fotosyntéze hostitele spojeny s inhibicí Calvinova cyklu způsobenou nárůstem aktivity invertasy a následnou akumulací asimilátů v infikovaném pletivu a také že virová infekce urychlila proces senescence, jež byl spojen s poklesem rychlosti asimilace CO₂ a efektivního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II.

Třetí tematická část práce se zabývá úlohou reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) při systémové PEMV infekci hrachu. Lokalizovali jsme RONS především v blízkosti listových žilek, kde byly formovány enace a chlorotické skvrny. Předpokládáme, že RONS se podílejí na regulaci hyperplazie a tkáňové diferenciaci u buněk nově vzniklých v meristému. PEMV infekce vyvolala změny v koncentraci hormonů v rostlinném pletivu. Už 5. den po inokulaci byl zaznamenán nárůst v koncentraci kyseliny abscisové, zatímco koncentrace kyseliny salicylové klesla, tento jev se vyskytuje při potlačení hypersenzitivní reakce. Zjistili jsme antagonistický vztah mezi změnami v hladinách SA/JA u studovaného patosystému, kdy zřejmě došlo k inhibici JA signálem SA. Během systémové infekce byly zjištěny změny v produkci proteinu tepelného šoku (HSP70) a aktivitě peroxidázy.

ABSTRACT

Exposure of plants to stress factors, whether biotic or abiotic, results in production of reactive oxygen species (ROS) which causing damage to different components of photosynthetic apparatus. To cope with environmental fluctuations and were able to defend themselves against the invasion of pathogens, plant's metabolism must be flexible and dynamic. Plants have developed several protective mechanisms to suppress ROS production and to help them cope with the oxidative damage. This work is based on the results of model experiments simulating oxidative stress in plant leaves and on the results obtained for the whole plants, where the oxidative stress was induced by viral infection.

In the first project we studied the oxidative stress, which was purposely induced by methyl viologen treatment on barley leaves. The aim of this study was to find how are defense mechanisms of plant capable to cope with this mild stress. We focused on changes in the activity of antioxidant enzymes, xanthophyll cycle and non-photochemical quenching (NPQ). We found that electron transport in thylakoid was not accelerated in such condition of slight oxidative stress at moderate light and activity of ascorbate peroxidase was reduced. Further, we found out the misbalance between a high amount of zeaxanthin in thylakoid membranes and low NPQ under light limiting conditions. It has indicated that VDE is active also at moderate light and its activity is limited by violaxanthin availability and not by the luminal acidity. We hypothesize that the mild oxidative stress could initiate the release of violaxanthin from LHCS. Further, we have shown that under mild oxidative stress zeaxanthin could effectively protect the thylakoid membrane against lipid peroxidation.

During compatible interactions, viral invasion triggers numerous changes in host cells, tissues and even whole plants. However, how plants respond to infection by compatible viruses is less well understood despite the fact that it is compatible pathogens that cause disease and hence economic losses in agriculture. The model systems, on which experiments focused on alterations of primary metabolism of plant during systemic viral pathogenesis were realized, was pea (*Pisum sativum* cv. Merkur) infected by Pea enation mosaic virus (PEMV). We found out decrease of photosynthetic pigments, the maximum quantum yield of photochemistry of photosystem II, CO₂ assimilation. Concomitant photoprotective responses, *i.e.* an increase in NPQ and accumulation of de-epoxidized xanthophylls, were also detected. Interestingly, alternative electron sinks in chloroplasts were not stimulated by PEMV infection. We assume that changes in photosynthesis in the studied model system during host infection

are associated with inhibition of Calvin cycle following the rise in invertase activity and subsequent accumulation of assimilates in the infected tissue and also that viral infection accelerated senescence during which a decrease in effective quantum yield of photosystem II photochemistry took place in coordinated manner with an inhibition of CO₂ assimilation.

The third thematic part of the thesis addresses the issue of the role of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) during systemic PEMV infection of pea plant. We found out that RONS were accumulated mostly in the vicinity of leaf veins, where enations and chlorotic flecks were formed. We assume that RONS have a crucial role in the control of hyperplasia and tissue differentiation throughout wall synthesis in the cells newly derived by the meristem. PEMV induces systemic changes in concentration of hormones. At 5 days post inoculation (dpi) abscisic acid level increased while this of salicylic acid decreased, which is known to act in suppression of hypersensitive reaction. We observed antagonistic relationship in temporal changes of SA and JA concentrations in studied pathosystem, *i.e.* the induction of SA attenuates JA signal. With the systemic development of infection were detected changes in production of heat shock protein (HSP70) and peroxidase activity.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
APX	askorbátperoxidasa
ATP	adenosintrifosfát
Asc	askorbát
avr-geny	geny avirulence
C3 rostliny	fixace CO ₂ probíhá pomocí Calvinova cyklu
CAT	katalasa
CET	cyklický elektronový transport
CP	plášťový protein viru; „ <i>coat protein</i> “
CWP	peroxidasy buněčné stěny
DAB	3,3'-diaminobenzidin-4HCl
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
dpi	dny po inokulaci
Δ pH	gradient protonů
ELIP	proteiny indukované nadměrnou ozářeností; „ <i>early light-inducible protein</i> “
ET	etylen
ETC	elektronový transportní řetězec
ETR	rychlost transportu elektronů
ER	endoplazmatické retikulum
Fd	ferredoxin
FNR	ferredoxin-NADP ⁺ oxidoreduktasa
F _v /F _M	maximální kvantový výtěžek fotochemie PS II
GR	glutathionreduktasa
GTP	guanosintrifosfát
FAR	fotosynteticky aktivní záření
GSH	glutathion (redukováná forma)
GSSH	glutathion (oxidovaná forma)
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
H ₂ DCF DA	2',7'-dichlorofluorescein diacetát
HPLC	vysocúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysocúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HSP70	proteiny teplotního šoku, 70kDa (<i>heat shock proteins</i>)
HR	hypersenzitivní reakce
Chla/Chlb	chlorofyl <i>a</i> /chlorofyl <i>b</i>
¹ Chla	singletní excitovaná molekula Chla
³ Chla	tripletní excitovaná molekula Chla
Chlps	chloroplasty
ISR	indukovaná systémová reakce
JA	kyselina jasmonová
LHC (I, II)	světlosběrné komplexy PSI a PSII (<i>light harvesting complexes</i>)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukováná forma)
NADP ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (oxidovaná forma)
MAMPs	mikrobům přidružené molekulární vzory (<i>microbe-associated molecular patterns</i>)
MAPKs	mitogeny-aktivované proteinkinasy
MDHAR	monodehydroaskorbát reduktasa
Mit	mitochondrie
MP	protein sloužící k pohybu viru; „ <i>movement protein</i> “
MV	methyl biologem
NO	oxid dusnatý
NOX	NADPH-dependentní oxidasa

NPQ	nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu Chla
$^1\text{O}_2$	signletní kyslík
O_2^-	superoxidový radikál
OJIP křivka	rychlá fáze fluorescenční indukce
OH^\cdot	hydroxylový radikál
PAMPs	patogenům přidružené molekulární vzory (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PCD	programovaná buněčná smrt
PEMV	enační výrůstková mozaika hrachu (<i>Pea Enation Mosaic Virus</i>)
P_N	rychlost čisté asimilace CO_2
POX	guiakolová peroxidasa
PR-proteiny	proteiny příbuzné patogenu (<i>pathogenesis-related proteins</i>)
PRRs	rozeznávající vzorové receptory (<i>pattern recognition receptors</i>)
PSI, PSII	fotosystém I, fotosystém II
qP	koeficient fotochemického zhášení fluorescence Chla
R-geny	geny rezistence
RC	reakční centra
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>)
NPQ	nefotochemické zhášení fluorescence (<i>non-photochemical quenching</i>)
RNS	reaktivní formy dusíku (<i>reactive nitrogen species</i>)
RONS	reaktivní kyslíkové a dusíkové formy (<i>reactive oxygen and nitrogen species</i>)
RUBISCO	ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylasa-oxygenasa
SA	kyselina salicylová
SAR	systémově získaná odolnost (<i>systemic acquired resistance</i>)
SOD	superoxiddismutasa
TMb	thylakoidní membrána
V	violaxanthin
VDE	violaxanthin de-epoxidasa
WK	relativní výška vlny K vztažená k výšce vlny J v OJIP křivce
Z	zeaxanthin
ZE	zeaxanthin epoxidasa

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ.....	II
PŘEHLED PUBLIKACÍ	III
PROHLÁŠENÍ	IV
ABSTRAKTA A PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ Z KONFERENCÍ	V
CITACE.....	VI
ŽIVOTOPIS.....	VII
SOUHRN	IX
ABSTRACT	XI
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	XIII
OBSAH	XV
CÍLE PRÁCE.....	1
1. PŘEHLED PROBLEMATIKY.....	2
1. SPOLEČNÉ MECHANISMY STRESOVÝCH REAKCÍ	2
2. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	4
2.1 Neenzymatická a enzymatická produkce reaktivních forem kyslíku.....	4
2.2 Úloha reaktivních forem kyslíku, oxidační stres.....	7
2.3 Lokalizace tvorby reaktivních forem kyslíku.....	9
2.3.1 Chloroplasty	9
2.3.2 Mitochondrie	13
2.3.3 Peroxisomy.....	14
2.3.4 Plazmatická membrána	16
2.3.5 Buněčná stěna.....	17
3. OBRANNÉ MECHANISMY ROSTLIN PROTI OXIDAČNÍMU STRESU.....	18
3.1 Antioxidanty	20
3.2 Antioxidační enzymy	22
3.3 Xantofylový cyklus	25
3.3.1 Spojení xantofylového cyklu s NPQ	27
3.4 Cyklus voda-voda.....	28
3.4.1 Funkce cyklu voda-voda	31

4. CHARAKTERISTIKA INTERAKCÍ HOSTITEL-PATOGEN	32
4.1 Mechanismy rezistence rostlin	34
4.1.1 Konstitutivní obrana.....	34
4.1.2 Obrana indukovaná patogenem.....	36
4.1.3 Biochemická rezistence.....	40
4.2 Přenos signálu při vzniku obranné reakce	42
4.3 Hormony a jiné signální molekuly	44
4.4 Oxid dusnatý	46
4.5 Proteiny teplotního šoku	49
5. VIROVÉ CHOROBY ROSTLIN	51
5.1 Příznaky viróz	52
5.2 Změny v metabolismu hostitelských rostlin.....	55
5.2.1 Změny ve fotosyntéze	56
5.2.3 Změny v aktivitě a expresi antioxidantních enzymů	59
5.2.2 Úloha hormonů v interakcích rostlin a virů	61
6. MATERIÁL A METODY.....	64
6.1 Rostlinný materiál a stresový faktor (pub. I).....	64
6.2 Rostlinný materiál a stresový faktor (pub. II a pub. III).....	65
6.3 Použité metody	68
7. SOUHRN VÝSLEDKŮ.....	70
7.1 Role cyklu voda-voda a konverze V na Z při modelovém oxidačním stresu.....	70
7.2 Změny ve fotosyntetických reakcích při biotickém stresu vyvolaném PEMV	72
7.3 ROS, RNS a hormonální nerovnováha při biotickém stresu vyvolaném PEMV	74
8. ZÁVĚRY.....	79
9. CITOVANÁ LITERATURA.....	81
10. PŘÍLOHY	97

CÍLE PRÁCE

- 1) Rešerše poznatků týkajících se oxidačního stresu u rostlin
 - faktory vyvolávající oxidační stres u rostlin
 - produkce a degradace ROS (enzymatická, neenzymatická)
 - obranné mechanismy zabraňující oxidačnímu poškození fotosyntetického aparátu: xantofylový cyklus, cyklus voda-voda, nefotochemické zhášení fluorescence

- 2) Rešerše poznatků týkajících se biotického stresu rostlin
 - úloha RONS během patogeneze rostlin
 - změny ve fotosyntéze rostlin po biotickém stresu vyvolaném viry
 - pea enation mosaic virus – popis a základní vlastnosti
 - role fytohormonů a HSP70 během virové infekce

Na základě teoretických poznatků a po osvojení si měřících technik uvedených v části materiál a metody v jednotlivých publikacích, byly řešeny následující projekty:

- vliv mírného oxidačního stresu vyvolaného aplikací methyl viologenu (MV) na funkci fotosyntetického aparátu (efektivita fotochemie fotosystému II, celkový elektronový transport, Calvinův cyklus) se zaměřením na ochrannou roli zeaxanthinu (peroxidace lipidů a NPQ) a antioxidačních enzymů
- vliv virové infekce na funkčnost fotosyntetického aparátu (fotochemie PSII, Calvinův cyklus, fluorescence Chl a), monitorování změn vyvolaných virovým napadením na úrovni plazmatické membrány a obsahu fotosyntetických pigmentů v PPC, zapojené obranné mechanismy (xantofylový cyklus – zeaxantin, NPQ, peroxidace lipidů TMB), změny v heterogenitě fluorescenčního signálu na listech způsobené virovou infekcí
- studium úlohy ROS, RNS, fytohormonů (SA, JA, ABA), HSP70, antioxidačních enzymů během kompatibilní interakce *Pisum sativum* cv. Merkur a Pea Enation Mosaic Virus (PEMV) společně s lokalizací tvorby ROS a RNS v rostlinném pletivu napadeném virovým patogenem

1. PŘEHLED PROBLEMATIKY

1. SPOLEČNÉ MECHANISMY STRESOVÝCH REAKCÍ

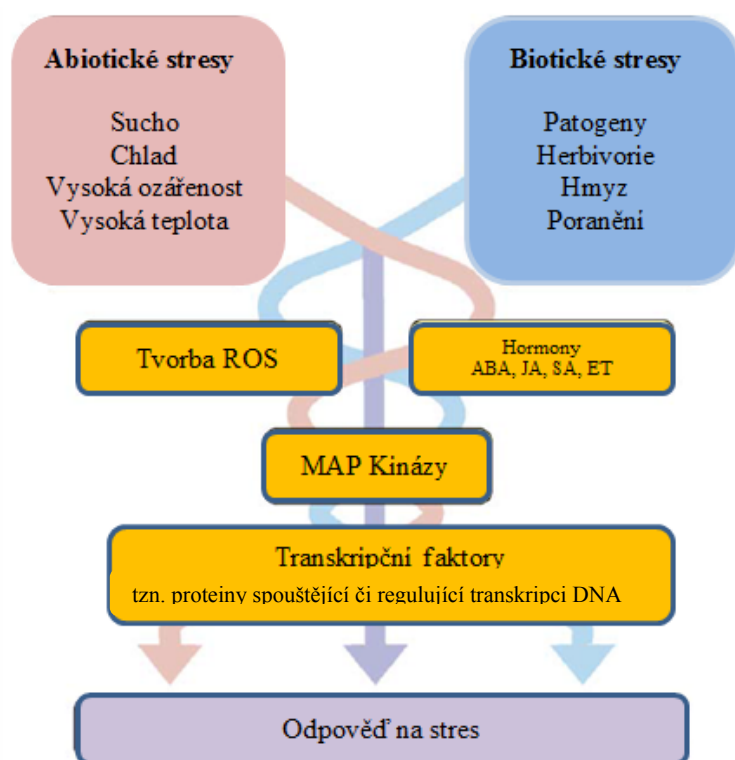
Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí závažně ohrožující rostlinu označujeme jako stresové faktory neboli stresory. Stres rostlin se dělí dle charakteru působícího stresoru na stres abiotický a stres biotický. Biotický stres pozorujeme při napadení patogenem, herbivory a při vzájemném ovlivňování rostlin (alelopatie, parazitismus). Abiotický stres bývá způsoben přírodními stresory (např. UV záření, nedostatek/nadbytek vody, extrémní teploty) nebo stresory plynoucími z antropogenní činnosti (např. působení toxických látek ve vzduchu/půdě, herbicidů, pesticidů) (např. *Wojtaszek, 1997; Buchanan a kol., 2000; Mittler, 2006*). Jelikož rostliny žijí přisedlým způsobem života, který jim neumožňuje únik před působením stresorů, vyvinuly se u nich účinné obranné mechanismy potřebné pro přežití v jejich přirozeném prostředí. Pokud rostlina není schopna zvládnout působení stresorů, dochází u ní ke zpomalení životních funkcí, poškození jednotlivých orgánů, sterilitě nebo dokonce i k uhynutí části nebo celé rostliny (*Buchanan a kol., 2000*).

Stresové podmínky vyvolávají u rostlin specifické odpovědi, které se liší v závislosti na intenzitě a typu působícího stresu. Stresové a aklimační reakce neprobíhají nahodile, ale jsou závislé na programech aktivace určitých genů, které mohou být za jistých okolností spuštěny, a to někdy i několika odlišnými mechanismy (*Lichtenthaler, 1998*).

Ukazuje se, že u rostlin existují komplexy společných stresových reakcí, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči několika stresorům současně. Mezi společné změny, které vedou ke zvýšení odolnosti rostlin během působení stresů, patří tvorba stresových proteinů (HSP-proteiny teplotního šoku, inhibitory proteáz Pin1 a Pin2, ELIPs-„*early light-inducible proteins*“; PR-proteiny spojené s přítomností patogenu) (např. *Bol a kol., 1990; Bowle, 1990; Ryan 1990; Adamska a kol., 1992; Aranda a kol., 1996; Adamska, 1997; Aranda a kol., 1999*), produkce a odstraňování reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) (např. *Elstner a Osswald, 1994; Wendehenne a kol., 2004; Mur a kol., 2006*), produkce stresových hormonů (kyseliny abscisové ABA, kyseliny jasmonové JA, ethylenu ET, metyljasmonátu MeJA a polyaminů) (např. *Peña-Cortéz a kol., 1989; Hildman a kol., 1992*) a syntéza osmoregulačních sloučenin (cukry, polyalkoholy) (např. *Pearce a kol., 1991*).

Metabolické změny v buňkách při působení i velmi odlišných stresorů mají sice řadu společných znaků, nicméně představa jediné stresové reakce je zcela nereálná. Navíc u rostlin

existuje i značná nejednotnost ve způsobech příjmu a převodu signálu od receptorů k efektorům. Konečnou odpovědí rostlin na stres je metabolická odezva, aktivace transportních proteinů nebo aktivace specifických genů. U biotických stresů, spojených s průnikem patogenů do buňky, je způsob indukce stresové reakce značně nejednotný. Při působení stresového faktoru jsou spouštěny, upravovány a kombinovány různé fyziologické procesy. Podobnost obecných charakteristik signálních drah při abiotickém a biotickém stresu vedly k návrhu modelu s propojenými společnými uzly (Obr.1) (Fujita a kol., 2006; Sedlářová, 2009).



Obr. 1: Model poukazující na propojenost signálních drah při působení abiotických a biotických stresů (Fujita a kol., 2006, upraveno) legenda: ABA-kyselina abscisová; SA-kyselina salicylová; JA- kyselina jasmonová; ET-ethylen; MAP Kinázy-mitogeny-aktivované proteinkiny

Přenos signálu z receptoru ke konečným efektorům není realizován jedním lineárním řetězcem mezičlánků (druhotných přenašečů), ale spíše složitou sítí více paralelních cest (Trewavas a Malhó, 1997).

Klíčovou úlohu v přenosu signálů mají jak vápenaté kationty (Ca^{2+}), tak i početná skupina mitogeny-aktivovaných proteinkinas (MAPKs) (Yang a kol., 1997). Z proteinů, které jsou schopné vázat Ca^{2+} , jsou předmětem studií především kalmodulin, annexiny a proteinkiny C (např. Sedlářová, 2009). Na koncentraci Ca^{2+} je mimo jiné závislá i depozice kalózy (β -1,3-glukan). Urychlení toku iontů přes plazmatickou membránu vlivem penetrace patogenu a následné zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytosolu, pak vede k tvorbě kalózních usazenin kolem infekčních struktur patogenu (např. Sedlářová a Lebeda, 2001a; Vellosillo a kol., 2010). Pro šíření signálu jsou významné také změny fosforylace proteinů, aktivace transkripčních faktorů genů, jejichž produkty zahrnují glutathion S-transferasy, peroxidasy, proteiny buněčné stěny, hydrolytické enzymy, PR-proteiny, enzymy biosyntézy fytoalexinů (např. Yang a kol., 1997; López a kol., 2008; Sedlářová, 2009).

2. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU

Běžný molekulární kyslík je poměrně málo reaktivní, protože je v základním stavu tripletem ($^3\text{O}_2$). Jedná o biradikál obsahující dva nepárové elektrony s paralelním spinem (např. *Elstner a Osswald, 1994; Blokhina a kol., 2003*). Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou částečně redukováné nebo aktivované deriváty kyslíku, které mají původ v molekule kyslíku v tripletním stavu popřípadě některých jeho sloučeninách (např. *Mehdy a kol., 1996; Lamb a Dixon, 1997; Halliwell, 2006; Mittler, 2002*). Mezi ROS řadíme singletní kyslík ($^1\text{O}_2$), superoxidový radikál (O_2^-), hydroxylový radikál (OH^\cdot) a peroxid vodíku (H_2O_2). Ve srovnání s molekulárním kyslíkem jsou ROS velmi reaktivní a toxické a mohou způsobit oxidační poškození buněk (*Asada, 2006*).

Bylo prokázáno, že stresové reakce rostlin jsou neodmyslitelně spojeny se zvýšením tvorby ROS. Například při napadení patogenem může rostlina prodělat oxidační stres. Jedná se vlastně o lokální hyperakumulaci ROS, jako důsledek jejich intenzivní tvorby a/nebo snížené aktivity enzymů schopných ROS odbourávat (*Piterková a kol., 2005*). ROS jsou však generovány i v průběhu normálních buněčných metabolických procesů, jako je buněčné dýchání nebo fotosyntéza, intra- a inter-buněčné signální cesty, a bývají tvořeny i membránově vázanými nebo volnými enzymy v cytoplazmě (*Wojtaszek, 1997; Mano, 2002; Arora a kol., 2002; Mittler, 2002; Asada, 2006*).

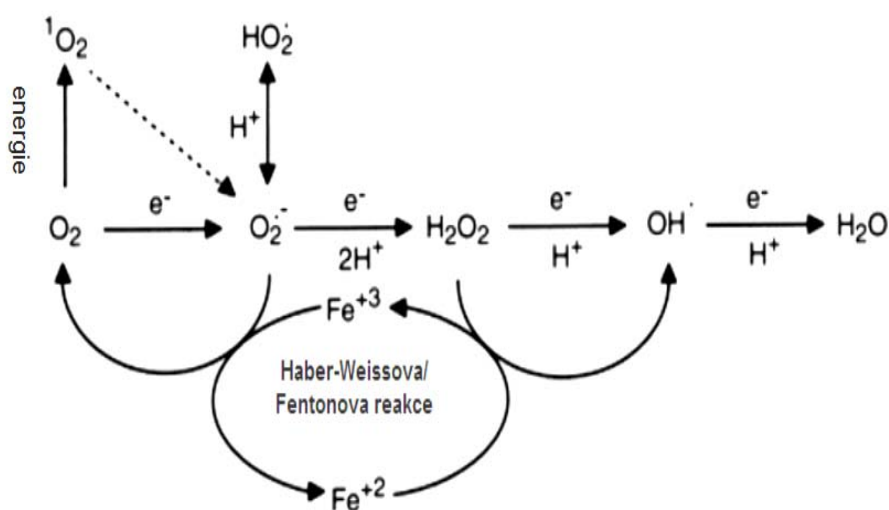
Za zmínku stojí, že rostlinné buňky jsou na rozdíl od živočišných buněk velmi odolné vůči vyšším koncentracím H_2O_2 (0,1-200mM) (*Halliwell a Gutteridge, 1999*). Dále bylo zjištěno, že rostliny ošetřené H_2O_2 byly odolnější jak ke stresu vyvolanému vyšší ozářeností, tak k chladovému stresu (*Karpinski a kol., 1999; Karpinska a kol., 2000; Yu a kol., 2003*).

2.1 NEENZYMATICKÁ A ENZYMATICKÁ PRODUKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU

ROS v rostlinném organismu mohou vznikat enzymovými nebo neenzymovými reakcemi. Která ze dvou cest vzniku ROS bude upřednostněna, závisí na koncentraci O_2 uvnitř rostlinného pletiva. Obecně platí, že čím menší je intracelulární koncentrace O_2 , tím více je blokován elektronový transportní řetězec (ETC) v mitochondriích a tím i vznik ROS. Jestliže je koncentrace O_2 v rostlinném pletivu nižší než $5 \cdot 10^{-7}\text{M}$, nedochází k saturaci terminálních oxidas v dýchacím řetězci a rychlost respirace je limitována dostupností O_2 . Za této situace je vznik ROS zanedbatelný. Je-li koncentrace O_2 v rostlinném pletivu $5 \cdot 10^{-7}\text{M}$ až

10^{-5}M k saturaci terminálních oxidas již dochází. Stále však je koncentrace O_2 nízká na to, aby se ROS hromadily. Toto rozmezí koncentrací O_2 uvnitř rostlinného pletiva je optimální pro aerobní způsob metabolismu. Při koncentracích O_2 vyšších jak 10^{-5}M jsou oxidasy dýchacího řetězce plně saturovány, a tak dochází v rostlinném pletivu k nárůstu koncentrace $\text{O}_2^{\cdot-}$ a dalších druhů ROS díky neenzymatické jedno-elektronové redukci O_2 (Skulachev, 1997).

Průběh neenzymatického vzniku ROS je zobrazen na (Obr.2). Jedno-elektronové redukce probíhají samovolně anebo za asistence vhodného donoru elektronů (např. *Dat a kol., 2000*). Jako donory elektronů slouží v biologických systémech přechodné kovy (Fe^{2+} , Cu^+) a semichinony. Čtyřelektronová redukce kyslíku v respiračním ETC je vždy spojena s částečnou jedno- až tříelektronovou "parazitickou" redukcí, která vede k formování ROS (Blokhina a kol., 2003). Singletní kyslík je velice reaktivní molekula a může buď předat excitační energii dalším organickým molekulám ve svém okolí anebo s nimi reagovat a tím dávat vzniku hydroperoxidů (Vranová a kol., 2002). Univalentní redukce O_2 vede ke vzniku $\text{O}_2^{\cdot-}$, což je molekula mající vlastnosti redukční i oxidační, neschopná přechodu přes biologické membrány, s poločasem života 2-4 μs . Hlavní podíl na tvorbě $\text{O}_2^{\cdot-}$ má cytochrom C oxidasa a NADH oxidasa. Nicméně nemalý podíl na tvorbě $\text{O}_2^{\cdot-}$ mohou mít i xanthin oxidasa, aldehyd oxidasa a NO-syntasa (např. Fridovich, 2001; Piterková a kol., 2005).



Obr 2: Produkce reaktivních forem kyslíku. K přeměně molekulárního kyslíku na singletní kyslík ($^1\text{O}_2$) v thylakoidních membránách je třeba dodání energie (22 kJ mol^{-1}), jež je získána přenosem excitační energie světelných kvant pigmenty fotosyntetického reakčního centra fotosystému a která postačuje k obrácení spinu jednoho z nepárových elektronů O_2 . Celková redukce molekulárního kyslíku na vodu vyžaduje čtyři elektrony a je vždy doprovázena postupnou jedno až tři elektronovou redukcí, kdy dochází k tvorbě superoxidového radikálu ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxidu vodíku (H_2O_2) a hydroxylového radikálu (OH^{\cdot}) (podle Vranová a kol., 2002).

Při reakci $O_2^{\cdot-}$ s dieny se produkují škodlivé hydroperoxydy. $O_2^{\cdot-}$ může oxidovat řadu aminokyselin (histidin, methionin, tryptofan), Asc, NADPH, redukovaný cytochrom C, chinony a komplexy přechodných kovů, čímž ovlivňuje aktivitu metaloenzymů (např. Vranová a kol., 2002). Protonovaná forma superoxidového radikálu, perhydroxylový radikál (O_2H^{\cdot}), je hydrofóbnější oproti $O_2^{\cdot-}$ a díky tomu snadněji proniká biologickými membránami, kde může odebírat atomy vodíku z polynenasycených mastných kyselin a lipidových hydroperoxidů, čímž je spuštěna řetězová peroxidace lipidů (např. Vranová a kol., 2002). $O_2^{\cdot-}$ dismutuje samovolně nebo může být jeho dismutace katalyzována metaloenzymem superoxiddismutasou (SOD) (Wojtaszek, 1997; Blokhina a kol., 2003). V chloroplastech, kde je vysoký obsah Asc, může dojít právě díky Asc k rychlé redukci $O_2^{\cdot-}$ (Noctor a Foyer, 1998).

H_2O_2 je produkován dvouelektronovou redukcí kyslíku, je středně reaktivní a řadí se mezi významné oxidanty (Halliwell, 2006). H_2O_2 má relativně dlouhou dobu života (poločas života je přibližně 1 ms), čímž je zajištěno, že se může snadno přemísťovat z místa své produkce do míst vzdálenějších a plnit tak signalizační funkci (např. Bhattacharjee, 2005). H_2O_2 může inaktivovat enzymy oxidací jejich thiolových skupin (Bowler a kol., 1994; Noctor a Foyer, 1998; Alscher a kol., 2002). Jelikož enzymy s thiolovými skupinami (enzymy Calvinova cyklu, Cu/Zn-SOD a Fe-SOD) jsou pro správnou funkčnost fotosyntézy velice důležité, je žádoucí, aby v chloroplastech byla zachována nízká hladina H_2O_2 (Noctor a Foyer, 1998). Detoxifikace H_2O_2 probíhá během tzv. askorbát-glutathionového neboli Foyer-Halliwell-Asadova cyklu, který je typický spolupůsobením enzymů askorbátperoxidasy (APX), dehydroaskorbátreduktasy (DHAR) a glutathionreduktasy (GR) a je lokalizován v chloroplastech, peroxisomech, cytosolu a mitochondriích (Noctor a Foyer, 1998; del Río a kol., 2002) (více v kapitole 3.2.). Dalším způsobem odbourání H_2O_2 v rostlinných pletivech je jeho rozklad na O_2 a H_2O v reakci katalyzované katalasou (CAT) (Wojtaszek, 1997; Noctor a Foyer, 1998; Dat a kol., 2000). V současné době je na H_2O_2 nahlíženo nejen jako na silný toxický oxidant způsobující silné poškození buněk během oxidačního stresu, ale i jako na signální molekulu, která aktivuje a obranný systém k opětovnému nastolení buněčné homeostázy (Hung a kol., 2005). H_2O_2 se podílí na regulaci rostlinného vývoje a biologických procesů např. programované buněčné smrti (PCD) (Apel a Hirt, 2004; Geschev a Hille, 2005), zavírání průduchů zprostředkovaného pomocí kyseliny abscisové (ABA) (např. Pei a kol., 2000), gravitropismu (např. Joo a kol., 2001), odpovědi na mechanické poranění (např. Orozco-Cardenas a kol., 2001), systémově získané rezistenci (SAR) (např. Ryals a kol., 1994; Inzé a van Montagu, 1995), interakci rostlina-patogen (např. Mittler a kol., 1999). Experimenty potvrdily, že H_2O_2 je důležitou složkou kaskádních přenosů signálů během

adaptace rostlin k měnícím se podmínkám vnějšího prostředí a při aktivaci obranných mechanismů (např. Knight a Knight, 2001; Neill a kol., 2002a).

Nejreaktivnější ze všech ROS je hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$), který vzniká rozkladem H_2O_2 během Fentonovy reakce za využití katalytického účinku železnatých nebo měďnatých iontů, nebo je formován během interakce $\text{O}_2^{\cdot-}$ s H_2O_2 Haber-Weissovou reakcí. Hydroxylový radikál je velmi silný oxidant, který snadno iniciuje radikálové řetězové reakce s mnohými organickými molekulami jako je peroxidace lipidů, inaktivace enzymů nebo poškození nukleových kyselin a má poločas života menší než 1 μs (např. Piterková a kol., 2005). Jelikož v buňkách neexistuje žádný enzymatický mechanismus, který by eliminoval hydroxylový radikál, jeho nadprodukce vede přímo k buněčné smrti (např. Vranová a kol., 2002).

Mimo neenzymovou produkci se mohou ROS v rostlinném organismu generovat i cestou enzymových reakcí (např. Piterková a kol., 2005). $\text{O}_2^{\cdot-}$ vzniká při reakcích katalyzovaných enzymy xanthinoxidasou, aldehydoxidasou, NADPH-dependentní oxidasou plazmatické membrány nebo diaminoxidasou (Wintson, 1990). Další skupinu enzymů, které redukují molekulární kyslík přímo, bez tvorby $\text{O}_2^{\cdot-}$ jako meziprojektu, tvoří: guanylátcyklasa, glukosaoxidas a prostaglandinsyntasa. Peroxid vodíku vzniká při reakcích katalyzovaných oxalát oxidasou (Wei a kol., 1998) nebo aminoxidasou (Allan a Fluhr, 1997). Zdrojem produkujícím ROS během hypersenzitivní reakce jsou pH-dependentní peroxidasy buněčné stěny (Siegel, 1993). Dalším možným zdrojem ROS je reakce katalyzovaná lipoxygenasou, při níž dochází k peroxidaci polynasycených mastných kyselin. Vznikající peroxyderiváty podléhají autokatalytické degradaci, při které dochází k tvorbě radikálů iniciujících řetězové reakce peroxidace lipidů (Blokina a kol., 2003).

2.2 ÚLOHA REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU, OXIDAČNÍ STRES

Úloha ROS v rostlinných buňkách je značně rozmanitá a do jisté míry rozporná. Na jednu stranu ROS vznikají jako nebezpečné toxické produkty během aerobního metabolismu rostlin, ale naproti tomu mají i prospěšné funkce (např. Heber a kol., 1996; Polle, 1996).

Z ROS působí jako signální molekula především H_2O_2 . H_2O_2 je významným regulátorem mnoha biologických procesů: přispívá ke zpevnění či přestavbě buněčné stěny, biosyntéze ET, úzce souvisí s hypersenzitivní reakcí (HR), metabolismem fenolických látek, plní signalizační funkci při uzavírání průduchů, funguje jako signální molekula ovlivňující expresi genů, má přímý toxický účinek při napadení patogeny. Vzhledem k esenciálním úlohám ROS v rostlinném organismu, je žádoucí, aby byla udržena koncentrace ROS v

buňkách na určité úrovni. (např. *Scandalios, 1990; Kuźniak a Urbanek 2000; Neill a kol., 2002b; Mano, 2002; Mittler, 2002; Foyer a Noctor 2005; Apel a Hirt, 2004, Mittler a kol., 2004; Torres a kol., 2006; Sedlářová, 2009*).

Oxidační stres rostlin představuje finální fázi působení řady abiotických a biotických stresových faktorů a je charakteristický prudkou přechodnou tvorbou značného množství ROS a následným porušením rovnováhy mezi produkcí a odbouráváním ROS. Mezi faktory, které přispívají ke vzniku oxidačního stresu u rostlin, patří nadměrná hladina fotosynteticky aktivní radiace (FAR) (např. *Niyogi 1999; Hideg a kol., 2000*), UV-B záření (např. *Hideg a Vass, 1996*), teplotní změny (např. *Hippeli a Alstner, 1996; Wise, 1995*), působení patogenů (např. *Tiedemann, 1997; Mlíčková a kol., 2004*) nebo mechanické poranění (např. *Orozco-Cardenaz a kol., 2001*). Zvýšená hladina ROS má také velký vliv na spuštění a rozvoj senescence (např. *Ye a kol. 2000; Jing a kol., 2003; Bhattacharjee 2005*). Jednou z příčin zvýšené hladiny ROS během senescence je rostoucí nerovnováha mezi transportem a funkčním využitím elektronů v ETR, která je způsobena přednostní inhibicí stromálních reakcí v porovnání s inhibicí fotochemie PSII (*Grover 1993; Špundová a kol., 2003*). Tím, že jsou blokovány stromální reakce fotosyntézy, zvýší se pravděpodobnost přenosu elektronů na molekulární kyslík, což vede k hromadění ROS a vzniku fotooxidačního poškození komponent chloroplastů.

Při nedostatečné aktivitě antioxidantních enzymů, nedostatečném množství antioxidantů a/nebo vlivem velké nadprodukce ROS dojde k porušení rovnováhy a buňka je vystavena oxidačnímu stresu. K poškození ROS jsou náchylné především nukleové kyseliny, proteiny a nenasycené mastné kyseliny v lipidech (např. *Sedlářová, 2009*). Oxidačním poškozením DNA dochází ke zlomům vláknů, DNA-DNA nebo DNA-protein "crosslink", anebo ke změně báze DNA, což má za následek syntézu poškozených proteinů, které mohou mít vliv na funkčnost buňky. Oxidace proteinů s enzymatickou funkcí může způsobit narušení nebo úplné „vypnutí“ jejich katalytické schopnosti. U proteinů jsou terčem škodlivého účinku ROS téměř všechny aminokyseliny, přičemž methionin a cystein jsou k oxidaci extrémně náchylné (*Bokov a kol., 2004*). Nejcitlivějším místem pro atak radikálů v molekule mastné kyseliny je -CH₂- skupina obklopena z obou stran dvojnou vazbou. Z toho důvodu často podléhají peroxidaci polynenasycené mastné kyseliny, které jsou součástí fosfolipidové buněčné membrány (*Bokov a kol., 2004*). Peroxidační poškození plazmalemy potom vede k úniku buněčného obsahu a k buněčné smrti. Poškození membrán uvnitř buňky má vliv na respirační aktivitu mitochondrií a rovněž způsobuje ztrátu schopnosti chloroplastu fixovat CO₂ (např. *Scandalios, 1990; Mittler, 2002*).

2.3 LOKALIZACE TVORBY REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU

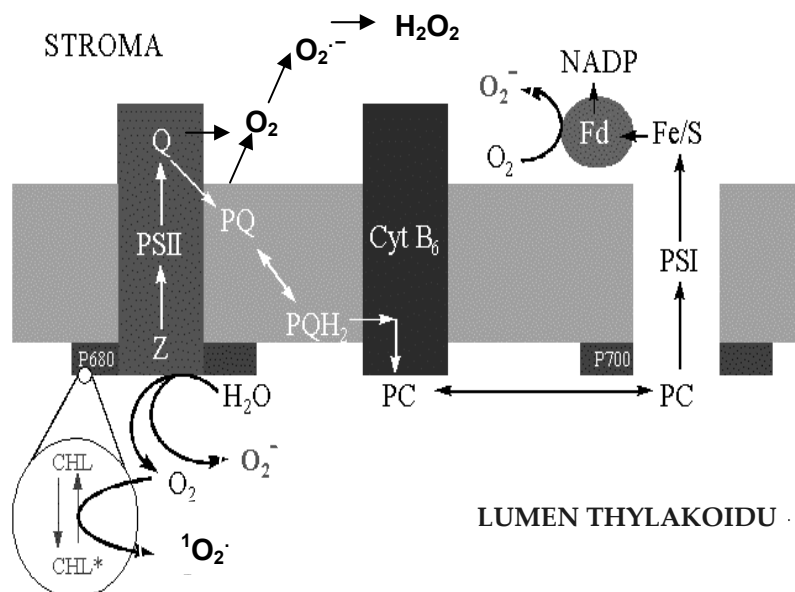
Hlavními zdroji produkce ROS v rostlinných buňkách jsou organely s vysoce oxidační metabolickou aktivitou nebo s intenzivní rychlostí elektronového toku (Mittler, 2002; Mittler a kol., 2004).

Jedná se o chloroplasty (fotosyntéza \rightarrow O_2^- ; excitace chlorofylu \rightarrow 1O_2), mitochondrie (respirační řetězec \rightarrow O_2^-), peroxisomy (glykolát oxidasa \rightarrow H_2O_2 ; xanthin oxidasa \rightarrow O_2^- ; lipoxygenasa \rightarrow H_2O_2), endoplazmatické retikulum (cytochrom P-450, cytochrom P-450 reduktasa \rightarrow O_2^-) a glyoxysomy (glyoxylátový cyklus \rightarrow H_2O_2) (Asada, 1999; Mittler, 2002; Apel a Hirt, 2004; del Río a kol., 2006). Mimo uvedené vnitrobuněčné kompartmenty, můžeme produkci ROS zaznamenat v apoplastu (aminoxidasa \rightarrow H_2O_2 ; s klíčením související ("germin-like") oxalát oxidasa \rightarrow H_2O_2), buněčné stěně (peroxidasy vázané na buněčnou stěnu \rightarrow O_2^- , oxidasy vázané na buněčnou stěnu \rightarrow H_2O_2 ; polyaminoxidasa buněčné stěny \rightarrow H_2O_2), plazmatické membráně (NADPH oxidasa \rightarrow O_2^-) a cytoplazmě (cytosolická forma SOD přeměňuje O_2^- na H_2O_2). Peroxidasy vázané na buněčnou stěnu jsou schopné oxidovat NADH, při oxidaci zároveň katalyzují vznik O_2^- . Oxidasy vázané na buněčnou stěnu katalyzují oxidaci NADH, který je schopen redukce O_2 na O_2^- . (Allan a Fluhr, 1997; Wojtaszek, 1997; Grant a Loake, 2000; Dat a kol., 2002).

2.3.1 CHLOROPLASTY

Dříve přetrvával názor, že chloroplasty jsou hlavním místem produkce ROS v rostlinné buňce a tudíž i hlavním terčem ROS během stresu (Mittler, 2002; Dat a kol., 2000; Apel a Hirt, 2004). Nicméně, v posledním desetiletí je přijímán názor, že chloroplasty nejsou tak citlivé k oxidačnímu poškození, jako se uvažovalo dříve (Karpinska a kol., 2000). Je-li faktorem limitujícím využití excitační energie kapacita lineárního transportu elektronů, může být míra nadměrné excitace RC obou fotosystémů výrazně snížena každým procesem, který urychlí odčerpání elektronů z nadměrně redukováných složek řetězce lineárního transportu elektronů.

Ve fotosyntetickém aparátu rostlin je tvorba ROS lokalizována zejména na oblast světlosběrných komplexů fotosystému II (LHCII), v reakčních centrech PSII (RC PSII) a na akceptorové straně fotosystému I (PSI) (Obr.3) (Asada, 1999; Arora a kol., 2002; Ivanov a Khorobrykh 2003).



Obr.3: Schematické znázornění produkce superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$), peroxidu vodíku (H_2O_2) a singletního kyslíku (1O_2) v chloroplastu v místě fotosystému I (PS I) a fotosystému II (PS II). Použité zkratky: Chl - chlorofyl, Chl* - excitoná molekula chlorofylu, P680-reakční centrum PSII; Z - thyrozin; Q-plastochinon; PQ-plastochinonový pool; PQH₂-plastochinol; PC-plastocyanin; cytB6-cytochrom B6; P700-reakční centrum PSI; Fe/S-Rieskeho protein; Fd-ferredoxin; (Arora a kol., 2002, upraveno).

V rámci lineárního ETC v chloroplastech elektrony směřují z molekuly vody (donorová strana PSII) do reakčních center (RC) fotosystémů přes řetězec přenašečů až k $NADP^+$, který je redukován na NADPH. Následně NADPH vstupuje do Calvinova cyklu a redukuje finální elektronový akceptor CO_2 a sám se oxiduje na $NADP^+$. Existují i alternativní elektronové transportní cesty zahrnující Mehlerovu reakci, cyklický transport elektronů kolem PSI, cyklický elektronový transport uvnitř PSII a nitrátovou asimilaci (Makino a kol., 2002). Redukce kyslíku u PSI po přijetí elektronů z ETC se nazývá Mehlerova reakce (Mittler a kol., 2004). Primárním produktem této reakce je $O_2^{\cdot-}$, který je disproporcionován za katalytického účinku SOD na H_2O_2 a kyslík. Poté je H_2O_2 zneškodněn díky APX, na vodu, čímž se celý cyklus uzavírá. Mehlerova reakce je konkurenční reakcí standardně probíhající redukcí $NADP^+$ a za normálních podmínek je podíl Mehlerovy reakce menší než 10% (Badger a kol., 2000). Fotoredukce O_2 na $O_2^{\cdot-}$ u PSI probíhá nevyhnutelně za využití 10-20% elektronů z ETC dokonce při podmínkách, kdy množství CO_2 dosahuje saturačních hodnot (Mano, 2002). Ovšem Mehlerova reakce nabývá na významu za stresových podmínek, kdy je inhibován Calvinův cyklus, když je rostlina adaptována na tmu (aktivita Calvinova cyklu je minimální), anebo když je PSII nadměrně redukován elektrony a část elektronů v rámci PSI jde z ferredoxinu (Fd) na O_2 místo k $NADP^+$. Mimo tvorbu zvýšeného ΔpH přes TMB (spotřeby H^+ ve stromatu; aktivace xantofylového cyklu; následné indukce nezářivé disipace absorbované energie), zprostředkovává Mehlerova reakce výrazné odčerpání elektronů především z akceptorové strany PSI (Park a kol. 1996), čímž je minimalizovaný energetický přenos mezi energeticky aktivovaným stavem chlorofylu a kyslíku v základním stavu a tím je zabráněno vzniku 1O_2 (Noctor a Foyer, 1998). Kapacita tohoto ochranného mechanismu je podmíněna

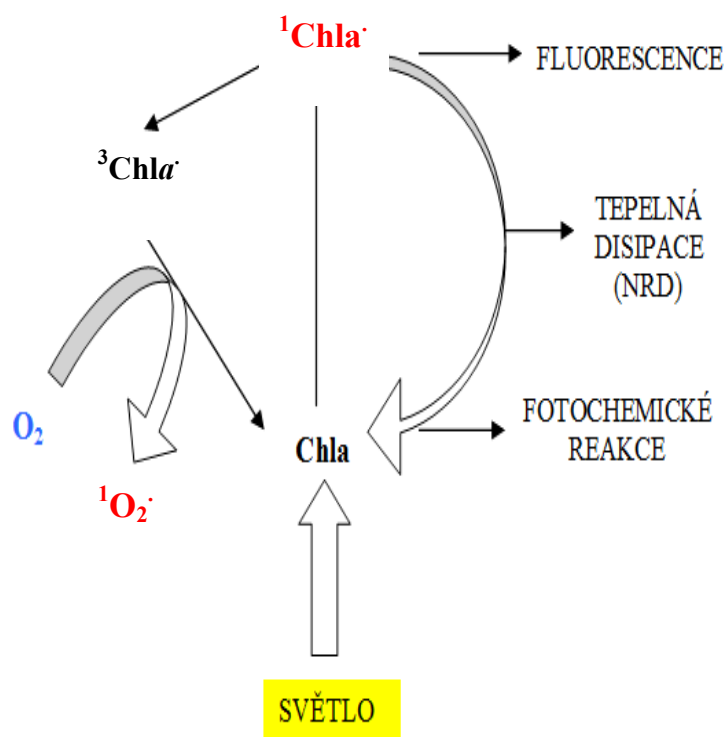
dostupností kyslíku a kapacitou detoxifikačních mechanismů (Polle, 1996). Celý pseudocyklický transport elektronů začíná z molekuly vody na lumenární straně TMb v PS II a končí molekulou vody ve stromální části membrány, proto bývá označován také jako cyklus voda-voda (WWC) (Obr.12) (Asada, 1999; Asada 2000). Při podmínkách nadměrné ozáření je až 30% z celkového ETC spotřebováno ve WWC a to naznačuje, že O_2 hraje důležitou úlohu alternativního elektronového akceptoru ve fotoprotekci (Asada, 1999; Apel a Hirt, 2004). Dokonce při vysoké koncentraci CO_2 v chloroplastech tok elektronů na O_2 zabraňuje fotoinhibici a tím produkci $O_2^{\cdot-}$ (Mano, 2002). WWC je proto považován za významný ochranný proces při disipaci nadměrného množství excitační energie (Asada 1999, Asada 2000) (více v kapitole 3.4 a 3.4.1).

Místem vzniku ROS je i donorová strana PSII, kde probíhá fotolýza 2 molekul vody za uvolnění čtyř elektronů, čtyř protonů a molekuly kyslíku. Elektrony jsou přenášeny do RC PSII, může se ale stát, že i v tomto místě dojde k jejich úniku. Jestliže pak uniknuvší elektrony z ETC přecházejí na molekulu kyslíku, dojde následně ke vzniku ROS.

Akceptorová strana PSII v místech chinonových přenašečů (Q chinon, PQ plastochinon) je dalším možným zdrojovým místem úniku elektronů na O_2 . Kyslík se po přijetí elektronu redukuje na $O_2^{\cdot-}$. Na stromální straně membrány je $O_2^{\cdot-}$ dismutován na H_2O_2 za katalytického účinku CuZn-SOD (Quan a kol., 2008).

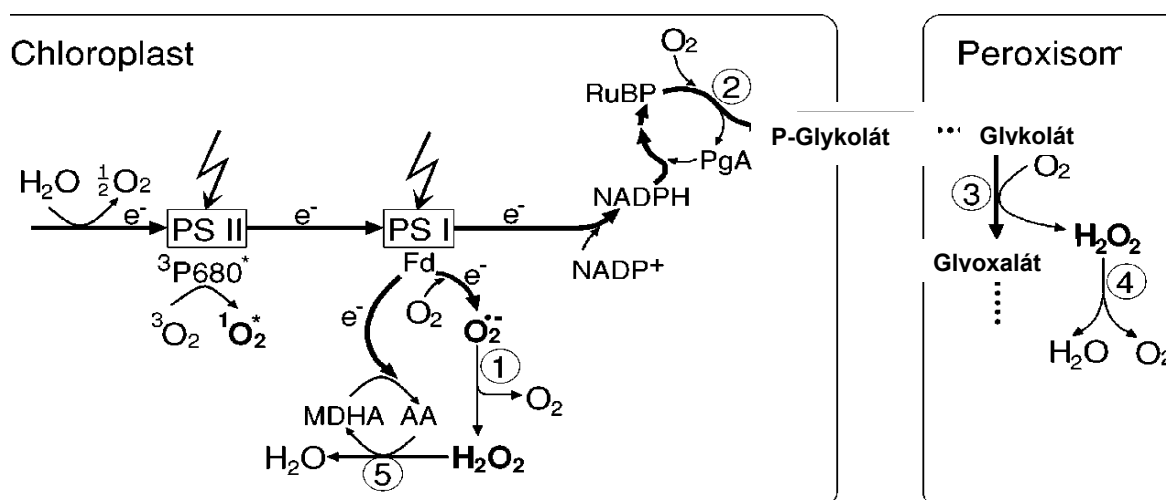
Dalším místem vzniku ROS je fotoaktivovaná molekula chlorofylu ($^1Chla'$) v LHCII (Obr.4). Fotoaktivovaný $^1Chla'$ v podmínkách, kdy je ETC přesycen elektorny (nadměrná ozáření, sucho, nedostatek živin, zavřené průduchy, herbicidy apod.), může přejít do tripletního stavu a pak reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku singletního stavu (1O_2), který může poškodit jemné struktury TMb (Niyogi 2000).

Existují dvě strategie bránící vzniku 1O_2 v TMb chloroplastu. První je regulace velikosti LHC, díky níž se omezuje generace $^3Chla'$. Druhým způsobem deaktivace 1O_2 je reakce se zhášeči vázanými na TMb. Deexcitace $^1Chla'$ přes $^3Chla'$, je významným deexcitačním procesem nadbytečné energie, protože se touto cestou deexcituje 4% - 25% z absorbovaného množství fotonů PSII (Foyer a Harbinson 1999; Niyogi 2000). Protože v rámci LHCII je průměrná doba života $^1Chla'$ několikrát delší než v LHCI, je pravděpodobnějším místem vzniku reaktivních molekul kyslíku v LHC právě LHCII (Niyogi 1999). Možnými způsoby deexcitace $^1Chla'$, které brání vzniku 1O_2 jsou také tepelná disipace, fluorescence a fotochemické reakce (Obr. 4). Hlavní fotoprotekční podíl je připisován tepelné disipaci, čímž je omezená rychlost redukce primárního stabilního akceptoru elektronů v PSII chinonu A (Q_A).



Obr.4: Možné způsoby deexcitace excitované molekuly Chla. Jestliže molekula Chla absorbuje světlo přejde do singletního excitovaného stavu, $^1\text{Chla}^*$. Existuje několik cest, kterými se excitovaná molekula může vrátit zpět do základního stavu. Molekula může relaxovat do základního stavu vyzářením světla, tedy fluorescencí. Energie excitovaného stavu může být využita pro pohon fotochemických reakcí (qP) nebo může být disipována jako teplo (NRD). Dále může být mezisystémovou konverzí přeměněna molekula $^1\text{Chla}^*$ na molekulu chlorofylu v tripletním stavu $^3\text{Chla}$, která je schopná reakce s molekulárním kyslíkem za vzniku velmi reaktivního $^1\text{O}_2$ (Müller a kol., 2001; upraveno).

Důležitým zdrojem ROS u C3 rostlin jsou reakce spojené s fotorespiračním cyklem zahrnující oxygenázovou aktivitu enzymu RUBISCO (ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylasa-oxygenasa) (EC 4.1.1.39) v chloroplastech napojenou na glykolát-oxidázový cyklus a aktivní zapojení katalasy a peroxidasy v peroxisomech (Willekens a kol., 1997; Apel a Hirt, 2004). Jestliže jsou rostliny vystaveny stresovým podmínkám a dostupnost CO_2 je velice omezená, což může nastat při podmínkách sucha, teplotního stresu nebo při vysokých ozářeních, zastávají důležitou fotoprotektivní úlohu právě Mehlerova reakce (redukce O_2 u PSI) a fotorespirace (Obr.5) (Apel a Hirt, 2004). Fotorespirace je slunečním zářením stimulované dýchání, tj. příjem O_2 a výdej CO_2 , zejména ve stavu s uzavřenými průduchy. Díky mechanismu fotorespirace je spotřebováno ATP a dochází ke spotřebě elektronů z nadměrně redukováných složek lineárního elektronového transportu, čímž je udržována částečná oxidace akceptorů PSII a je tím zabráněno fotoinkativaci PSII v podmínkách omezené dostupnosti CO_2 v rostlinném pletivu (Asada, 1999; Apel a Hirt, 2004). V listech C3 rostlin je fotorespirační adice kyslíku k ribulóza-1,5-bisfosfátu (RuBP) za vzniku fosfoglykolátu a fosfoglycerátu katalyzována enzymem RUBISCO. Oxygenační reakce vedou k uvolnění glykolátu, který je translokován z chloroplastů do peroxisomů. Zde je glykolát oxidován na glyoxalát a H_2O_2 díky aktivitě glykolát oxygenasy. Při saturačních ozářeních se rychlost fotorespirační produkce H_2O_2 v listech C3 rostlin zvyšuje a může dosahovat hodnot cca $70\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{g FW}^{-1}$ (Willekens a kol., 1997).

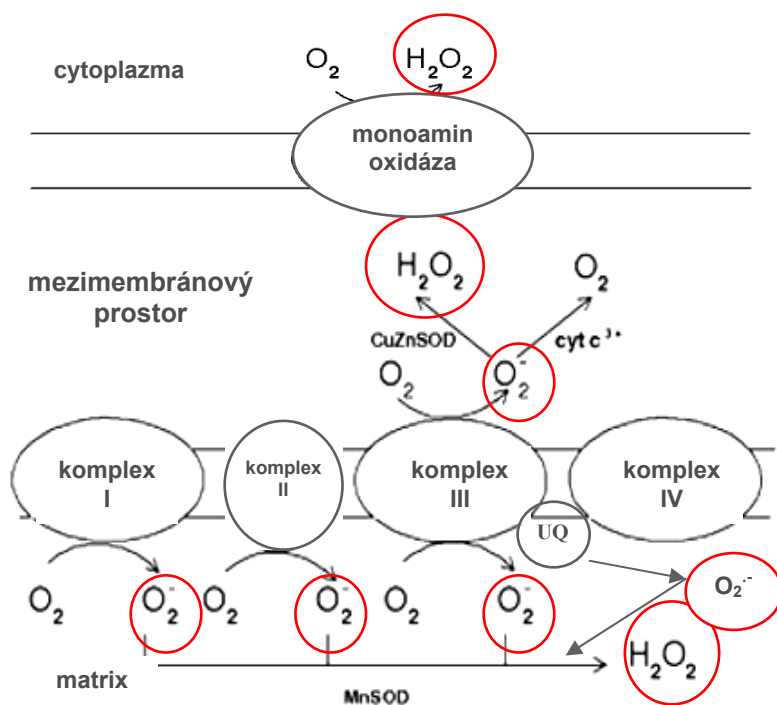


Obr. 5: Fotosyntetický elektronový transport v podmínkách vysokých ozáření vede k produkci ROS v místech chloroplastů a peroxisomů. Jestliže dojde k nadměrné redukci přenašečů ve fotosyntetickém transportním řetězci jsou místem spotřeby elektronů Mehlerova reakce a fotorespirace. Mehlerovou reakcí je generován O_2^- a H_2O_2 . Oxygenázovou aktivitou RUBISCO a fotorespirační dráhou vzniká H_2O_2 uvnitř peroxisomů. Čísla v kruhu značí zapojené enzymy: 1) SOD 2) RUBISCO 3) glykolát oxidasa, 4) CAT 5) APX. PSI a PSII- fotosystémy I a II; Fd-ferredoxin; RuBP- ribulósa-1,5-bisfosfát; PgA-3fosfoglycerát; MDHA-monodehydroaskorbát; AA-kyselina askorbová; P680*-excitované reakční centrum PSII; NADPH-nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, redukovaná forma; $NADP^+$ -nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, oxidovaná forma (podle Apel a Hirt, 2004).

2.3.2 MITOCHONDRIE

Rostlinné mitochondrie jsou hlavním místem produkce H_2O_2 při průběhu aerobní respirace. Mitochondriální ETC je složený ze čtyř komplexů: NADH-dehydrogenasy (komplex I), sukcinát dehydrogenasy (komplex II), cytochrom bc1 (komplex III) a cytochrom C oxidasy (komplex IV). Nachází se zde také pětice enzymů charakteristická výhradně pro rostlinnou říši: alternativní oxidasa (AOS) a čtyři NAD(P)H dehydrogenasy, jež se skládají z flavoproteinů a právě tyto enzymy jsou potenciálními zdroji ROS (Møller, 2001).

Za normálních podmínek jsou komplex I a komplex III místy produkce ROS v mitochondriálním řetězci (Obr. 6). Na komplex III je navázána molekula ubiquinonu, která je hlavním zdrojem O_2^- , který je pohotově enzymem MnSOD přeměněn na H_2O_2 . Kolem 1-5% mitochondriální spotřeby kyslíku vede k produkci H_2O_2 (Møller, 2001). Aktivita komplexu I může být inhibována účinkem rotenonu a difenyleniodiem. Aktivitu komplexu III inhibuje KCN, který přerušuje Q-cyklus a tím inhibuje produkci semichinonů (Quan a kol., 2008). V komplexu I je hlavním zdrojem O_2^- jeden z Fe-S klastrů tj. Rieskeho centrum (buď N-1 α nebo N-2).



Obr. 6: Místa produkce superoxidového radikálu v mitochondriálním dýchacím řetězci. Superoxidové radikály mohou redukovat cytC v mezimembránovém prostoru, nebo mohou být převedeny na peroxid vodíku a kyslík (jak v matrix, tak v mezimembránovém prostoru). Zvýšené koncentrace superoxidového radikálu mohou redukovat přechodné kovy (které reagují s peroxidem vodíku H_2O_2 a tvoří se hydroxylový radikál OH) nebo mohou reagovat s NO a tvořit peroxydisitan. Jak OH , tak peroxydisitan jsou velmi silné oxidanty, které pohotově reagují s nukleovými kyselinami, lipidy a proteiny. UQ-ubichinon (Turrens, 2003).

V komplexu III se nejvíce $O_2^{\cdot-}$ tvoří jako výsledek autooxidace ubisemichinonu na vnější a vnitřní straně mitochondriální membrány (Turrens, 2003). Produkce $O_2^{\cdot-}$ v mitochondriálním elektronovém transportním řetězci je zjevně zvýšená v přítomnosti antimycinu A, který blokuje tok elektronů přes ubichinon, což vede k hromadění redukovaného ubichinonu, jenž pak podléhá autooxidaci za tvorby $O_2^{\cdot-}$. Platí, že čím více je respirační řetězec redukován, tím více $O_2^{\cdot-}$ je produkováno. Ovšem ne všechny mitochondriální inhibitory mají tento účinek. Většina produkce $O_2^{\cdot-}$ z komplexu III je zastavena, jestliže je přerušen elektronový tok mezi Rieskeho Fe-S centrem a kyslík je blokován např. KCN a myxothiazolem. Tento inhibiční efekt naznačuje, že $O_2^{\cdot-}$ musí být produkován jako výsledek autooxidace ubisemichinonu (UQ), jež je tvořen během Q-cyklu v komplexu III (Turrens, 2003).

2.3.3 PEROXISOMY

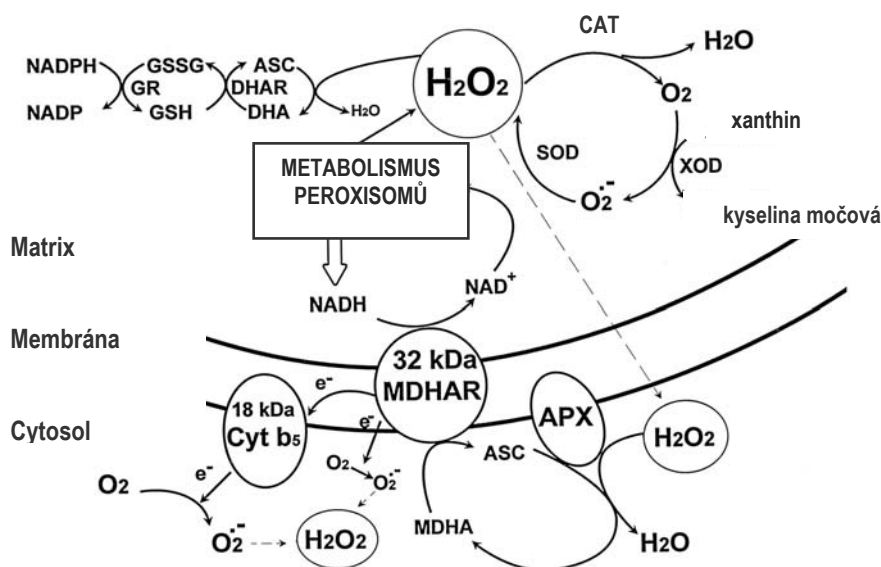
Peroxisomy jsou strukturně jednoduché, ale funkčně velmi rozmanité buněčné orgány. Jsou to sférické buňkové kompartmenty ohraničené jednou membránou a jsou tvořeny v endoplazmatickém retikulu. Hlavní funkcí peroxisomů je redukce H_2O_2 a oxidace pro buňku škodlivých látek. Peroxisomy vždy obsahují enzym katalasu (CAT) (marker peroxisomů), který se podílí na štěpení peroxidu vodíku a mimoto i flavinové oxidasy

produkující H_2O_2 (*del Río a kol., 1998*). V rostlinných peroxisomech probíhají metabolické děje jako fotorespirace, glykolát oxidázový cyklus, metabolismus ureidů, enzymatické reakce flavinových oxidáz, metabolismus ROS (dismutace $O_2^{\cdot-}$) a odbourávání mastných kyselin v procesu nazvaném β -oxidace mastných kyselin (*del Río a kol., 2002*).

Peroxisomů existuje v rostlinné říši několik typů, z nichž každý má specifickou funkci a je lokalizován v různých pletivech. Listové peroxisomy jsou specializované peroxisomy, které jsou lokalizované ve fotosyntetizujících pletivech a probíhá v nich fotorespirace (u C_3 rostlin). Dalším typem peroxisomů jsou glyoxisomy obsažené v zásobních pletivech olejnatých semen a obsahují enzymy, které jsou potřebné pro přeměnu zásobních lipidů v semenech na cukry (rostlina je využívá během klíčení a růstu) a také enzymy glyoxylátového cyklu. Dále u rostlin rozeznáváme gerontosomy vyskytující se v odumírajících listech, které obsahují enzymy katabolismu lipidů. V hlízkách tropických nodulujících bobovitých rostlin se nachází peroxisomy specializované na dusíkatý metabolismus tzv. urikosomy, které jsou schopny odbourávat guanin přes kyselinu močovou na allantoin (hlavní metabolit transportu dusíku) za současné produkce H_2O_2 (*del Río a kol., 1998*).

V peroxisomech jsou nejméně dvě místa vzniku $O_2^{\cdot-}$ a to v matrix a peroxisomální membráně (*Obr. 7*). V matrix probíhá oxidace xanthinu a hypoxanthinu na kyselinu močovou za uvolnění $O_2^{\cdot-}$, která je katalyzovaná xanthinoxidasou (XOD). Peroxisomy mají důležitou úlohu v katabolismu xanthinu, který je produkovaný jako výsledek metabolismu purinových bází (*del Río a kol., 2002*). V membráně peroxisomů je tvorba $O_2^{\cdot-}$ závislá na NADH a je zde ukotven krátký transportní řetězec. Transportní řetězec je tvořen peroxisomálními membránovými polypeptidy (PMP): cytochromem b5 (Cyt b5) (18kDa), flavoproteinovou NADH: ferrikyanid reduktasou (32kDa) a proteinem o molekulární hmotnosti 29kD. Protein o molekulové hmotnosti 32kDa (PMP32), produkující $O_2^{\cdot-}$ v závislosti na NADH, odpovídá podle imunochemických a biochemických vlastností monodehydroaskorbát reduktáze (MDHAR) (*del Río a kol., 2002; Quan a kol., 2008*).

Tato produkce $O_2^{\cdot-}$ je výsledkem reoxidace NADH v peroxisomálním elektronovém transportním řetězci, regenerovaný NAD^+ je dále využitý v metabolických procesech v peroxisomu. Při normálním průběhu metabolismu není $O_2^{\cdot-}$ vyprodukovaný peroxisomální membránou pro buňku nebezpečný, protože ochranné antioxidační procesy v buňkách jsou plně funkční a adekvátní k množství vznikajícího $O_2^{\cdot-}$. Ovšem ve stresových podmínkách dochází k nárůstu uvolněného $O_2^{\cdot-}$ z peroxisomální membrány do cytosolu (*del Río a kol., 1998*).



Obr. 7: Produkce peroxidu vodíku a superoxidového anionu v peroxisomech. Matrix a membrána peroxisomu jsou dvě místa generace O_2^- . XOD oxiduje xanthin na kyselinu močovou a poskytuje elektrony, jež redukují O_2 na O_2^- . Cyt b5 také dodává elektrony k redukcí O_2 na O_2^- . O_2^- je převeden na H_2O_2 pomocí SOD. Znárodněn je i askorbát-glutathionový cyklus mající své zastoupení v matrix peroxisomu. XOD-xanthinoxidasa, Cytb5-cytochrom b5, MDHAR-monodehydro-askorbát reduktasa, DHAR-dehydroaskorbát reduktasa; SOD-superoxiddismutasa; CAT-katalasa; ASC-askorbát redukovaná forma; DHA-dehydroaskorbát, GR- glutathion reduktasa; GSSG-glutathion oxidovaná forma; GSH-glutathion redukovaná forma; NADPH-nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, redukovaná forma; NADP-nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, oxidovaná forma (del Río a kol., 1998; Quan a kol., 2008, upraveno)

2.3.4 PLAZMATICKÁ MEMBRÁNA

Plazmatická membrána neboli plazmalema je tenký semipermeabilní obal ohraničující buňku, který se skládá z lipidové dvouvrstvy a v ní ukotvených proteinů. Základní funkcí plazmatické membrány je zajištění selektivního přesunu látek mezi buňkou a jejím okolím a dále kontakt a zprostředkovávání informací mezi buňkou a jejím okolím. V plazmatické membráně dochází k produkci O_2^- díky činnosti enzymu NADPH-dependentní oxidasy (NOX) ukotveného na vnější straně plazmatické membrány (Penel a Castillo, 1991). NOX (Obr. 8) obsahuje flavocytochromy, které tvoří transportní řetězec. V odpovědi na cytokininy, Ca^{2+} a růstové faktory přenáší NOX elektrony z intracelulárního NADPH na kyslík za vzniku O_2^- . Superoxidový radikál je tvořen v apoplastovém prostoru a následně je přeměněn na H_2O_2 buď spontánně, nebo působením extracelulární SOD (Karpinska a kol., 2001; Bolwell a kol., 2002; Torres a Dangl, 2005; Torres a kol., 2006; Bolwell a Daudi, 2009).

Rostlinné NOX jsou strukturálně i funkčně podobné NADPH oxidásam vyskytujících se v savčích neutrofilech (neboli oxidasy respiračního vzplanutí, RBO). Během respiračního vzplanutí v živočišných fagocytech, stejně jako při úspěšném rozpoznání patogenu v

roslinných buňkách, nastává uvolňování O_2^- (Mehdy, 1994; Jabs a kol., 1997; Mittler a kol., 2004; Torres a Dangl, 2005). Tvorbu ROS lze pozastavit difenyliodidem, což je známý inhibitor savčí NADPH oxidasy a enzymů obsahujících flavin (Low a Merida, 1996; Jabs a kol., 1997). Při navození jak abiotických, tak i biotických stresových podmínek dochází u rostlin, po aplikaci difenyliodidu, k blokaci tvorby ROS (Allan a Fluhr, 1997; Pellinen a kol., 1999).

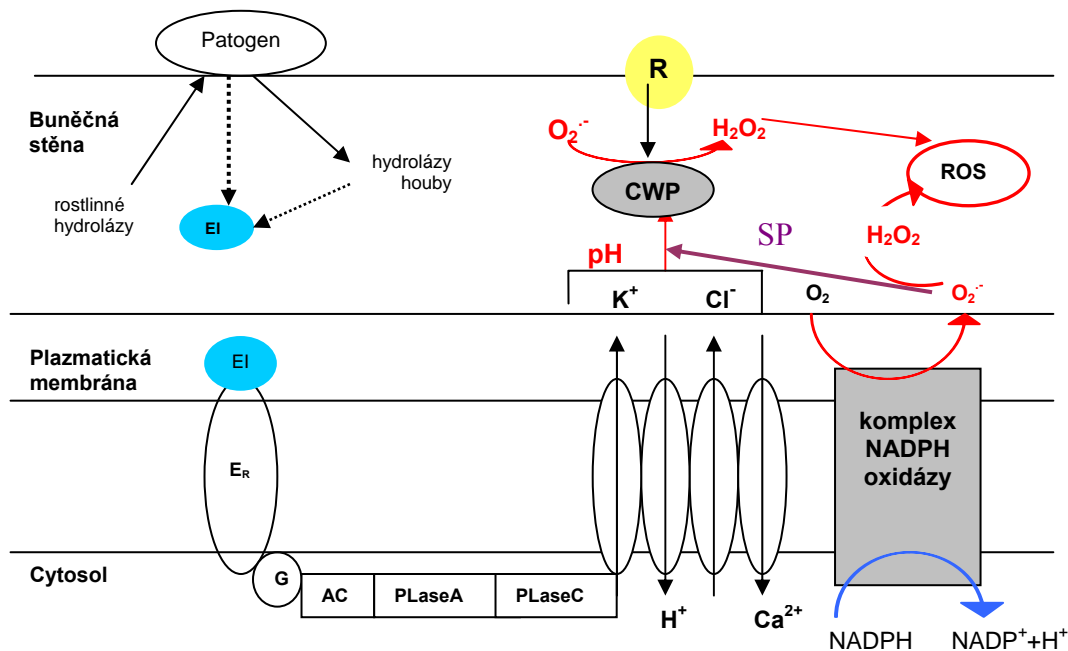
Bylo prokázáno, že patogenní nebo houbové elicitory způsobují nárůst v transkripci genů NOX (*Rboh* geny) (Simon-Plas a kol., 2002). Studie s mutanty s eliminovanými *Rboh* geny poukázaly na odlišnosti v růstu patogenního organismu a HR. Například u rostlin tabáku s umlčeným *Ntrboh* genem, který nevykazoval zjizitelný vliv na genotyp, se zjistilo, že jsou více náchylné k avirulentnímu kmenu *Phytophthora infestans* a došlo také k potlačení HR (Yoshioka a kol., 2003).

Aktivita rostlinných NOX roste během odpovědi buněk na infekci způsobenou virem, bakteriemi nebo houbami a také při poranění (Penel a Castillo, 1991). Maximum aktivity NOX bylo zjištěno během formování lézí u napadených rostlin tabáku virem tabákové mozaiky (TMV). Léze byly pozorovány časněji a ve větším rozsahu u rezistentních odrůd ve srovnání s nerezistentními odrůdami. Uvažuje se tedy, že rezistence rostlin vůči patogenům je následek zvýšené aktivity NOX a peroxidáz (Penel a Castillo, 1991).

2.3.5 BUNĚČNÁ STĚNA

Peroxidasy buněčné stěny produkují O_2^- za spotřeby NADPH v reakci závislé na manganatých iontech (Dat a kol., 2000). Aktivita peroxidasy buněčné stěny (CWP) je silně závislá na pH, proto je přesný název těchto enzymů pH dependentní-peroxidasy buněčné stěny (Mittler a kol., 2004). Během patogenního napadení dojde k rozpoznání molekul produkovaných mikroorganismy (např. oligosacharidy, proteiny a glykoproteiny), obecně označovaných jako MAMPs/PAMPs (*microbe/pathogen associated molecular patterns*), odpovídajícími vysoce afinitními PRPs receptory (*pattern recognition receptors*) lokalizovanými na povrchu plazmatické membrány (Bari a Jones, 2009; Sedlářová, 2009). Po rozpoznání je informace o přítomnosti patogenu přenášena v rámci rostliny plasmodesmy nebo cévními svazky prostřednictvím signálních molekul, metabolitů patogenu a/nebo napadených buněk (Sedlářová a Lebeda, 2002). V úvodních fázích přenosu signálu jsou důležité procesy přechodu iontů přes membránu specifickými kanály (Sedlářová, 2009). Otevření iontových kanálů vede k nastolení zásaditého pH v exocelulární matrix a následně

aktivaci CWP (**Obr. 8.**) (Wojtaszek, 1997). Díky aktivitě CPW je O_2^- dále metabolizován na H_2O_2 , který se podílí na vzniku nových vazeb mezi polysacharidy a glykoproteiny bohatými na hydroxyprolin a na tvorbě ligninu.



Obr. 8: Schematické znázornění hypotézy popisující tvorbu ROS v buněčné stěně a plazmatické membráně. Zkratky: AC-adenylát cyklasa; PLaseA-fošfolipasaA; PLaseC-fošfolipasaC; CWP-peroxidasa buněčné stěny; SP-spotřeba protonů; R-reduktant; EI-dříve elicitor nyní MAMP/PAMP; ER-dříve receptor nyní PRP; G-GTP vázané proteiny (Wojtaszek, 1997; upraveno).

Peroxidasy buněčné stěny jsou důležité díky své úloze při lignifikaci a suberinizaci. Aktivně přispívají k tvorbě difenylových můstků a hydroxyprolinových proteinů (extensin) v matrix buněčné stěny. CWP se dále podílí na regulaci redoxního stavu v apoplastu. Bylo dokázáno zapojení peroxidáz ve stresových fyziologických procesech (Low a Merida, 1996), a stejně tak jejich úloha při patogenním napadení rostlin (Montalbini a kol., 1995; Wojtaszek, 1997).

3. OBRANNÉ MECHANISMY ROSTLIN PROTI OXIDAČNÍMU STRESU

Živé organismy si vytvořily, ve snaze zabránit nežádoucím oxidačním reakcím, obranné mechanismy. Tyto mechanismy u rostlin můžeme rozdělit do dvou skupin.

První skupinou jsou mechanismy, které se snaží tvorbě ROS předejít jako např. kvalita a kvantita reakčních center (RC) fotosystémů, rovnováha mezi PSI a PSII, účinná regulace transportu elektronů a světlosběrné funkce. V ochraně proti působení oxidačního stresu mají

důležitou roli karotenoidy. V RC obou fotosystémů rostlin a řas má nezanedbatelnou úlohu β -karoten, který chrání fotosyntetický aparát před fotooxidativním poškozením zhášením tripletního stavu chlorofylu a singletního kyslíku (např. *Scandalios, 1993*). Dalším ochranným mechanismem chránící fotosyntetický aparát před poškozením, které působí nadměrné množství absorbované radiační energie je xantofylový cyklus (více kapitola 3.3). Mezi xantofyly má nezanedbatelnou úlohu zeaxanthin (Z), který má schopnost disipovat energii singletního chlorofylu na teplo. Druhou funkcí Z je snižování fluidity TMb. Čím více klesne fluidita membrány, tím méně ROS projde dovnitř thylakoidní membránou (*Demmig-Adams a Adams, 1996*). Mezi další ochranné mechanismy patří cyklický elektronový transport (CET) okolo PSI (např. *Allen, 2003*) a pseudocyklický elektronový transport (WWC), jež poskytují alternativní cestu toku elektronů za podmínek kdy je inhibován Calvinův cyklus a zároveň generují ΔpH přes TMb, který je potřebný pro konverzi violaxanthinu (V) na Z a pro disipaci nadbytku absorbované energie (např. *Miyake a kol., 2005*). Tyto regulační mechanismy předchází nekontrolovatelnému toku elektronů na O_2 a tím snižují pravděpodobnost oxidačního poškození.

Druhou skupinou jsou mechanismy, které se již aktivně snaží ROS vychytávat a zněškodňovat. Tato skupina mechanismů zahrnuje ochrannou funkci nízkomolekulárních antioxidantů a antioxidantních enzymů. Mezi nízkomolekulární antioxidanty patří kyselina askorbová, tokoferoly, karotenoidy a glutathion (více kapitola 3.1.). Mezi antioxidantní enzymy (více kapitola 3.2) řadíme takové enzymy, které 1) regenerují redukované formy antioxidantů (DHAR, GR, MDHAR), 2) reakce mezi antioxidanty a ROS katalyzují nebo jim napomáhají (APX, DHAR, GR, glutathionperoxidasa (GPOX)), guaiakolová peroxidasa (POX) a 3) přímo aktivně ROS odbourávají nebo přeměňují (CAT, SOD). Popsaný komplexní antioxidantní systém poskytuje buňkám vysoce účinný mechanismus detoxifikace O_2^- a H_2O_2 . Antioxidantní kapacita je velmi závislá na působení stresových faktorů, stejně jako na druhu, stádiu vývoje a na fyziologickém věku rostliny (např. *Niyogi 1999; Dat a kol., 2000; Foyer a Noctor, 2005; Apel a Hirt, 2004; Mittler a kol., 2004; Piterková a kol., 2005*).

Mimo jiné i mnohé fenolické sloučeniny (flavonoidy, taniny a prekurzory ligninu) mohou v rostlinných pletivech sloužit jako potenciální antioxidanty, které snižují účinky působení ROS (*Blokhina a kol., 2003; Grace, 2005*).

3.1 ANTIOXIDANTY

Karotenoidy, zahrnující xantofyly, jsou antioxidanty vázané na proteiny TmB. Karotenoidy zabráňují peroxidaci lipidů, zajišťují stabilizaci membrán a podílejí se na odstraňování $^1\text{O}_2$ z pigment-proteinových komplexů (např. *Tardy a Havaux, 1997; Havaux a Niyogi, 1999; Niyogi 1999*). Ve fotosyntéze chlorofyl působí ve stavu singletní excitace ($^1\text{Chla}$), kdy má velmi krátkou dobu života (řádově 10^{-9} s). Díky vhodnému uspořádání kofaktorů v RC dojde i v tomto krátkém čase k přenosu elektronu na primární akceptor. $^1\text{Chla}$ přechází s malou, ale nezanedbatelnou, pravděpodobností v $^3\text{Chla}$, který má dosti dlouhou dobu života (řádově 10^{-3} s) na to, aby se setkal s $^3\text{O}_2$. Při jejich srážce přejde $^3\text{Chla}$ do základního stavu a kyslík do $^1\text{O}_2$, který je velmi reaktivní a oxiduje bílkoviny i barviva fotosyntetického aparátu. Karoteny (v RC) a některé xanthofyly (v anténách) přejímají od $^3\text{Chla}$ excitaci, která na nich zaniká, aniž by způsobila škody. Je to proto, že karotenoidy v tripletním stavu s kyslíkem nereagují a excitovaný tripletní stav karotenoidů se velmi snadno vrací do základního stavu za uvolnění tepla. Karotenoidy tedy velmi účinně brání reakci $^3\text{Chla}$ s O_2 , která by vedla ke vzniku nebezpečného $^1\text{O}_2$ (např. *Foyer a Harbinson 1999*). β -karoten se nachází v RC PSII a podílí se na zhášení $^1\text{O}_2$; odstranění radikálů hydroperoxidů lipidů produkovaných během peroxidace lipidů, zvyšuje fluiditu TmB a je hlavním prekurzorem vitamínu A (*Niyogi, 1999*). Xantofyly vázané na LHC proteiny jsou lokalizované v těsné blízkosti Chla , proto mají nezanedbatelný podíl na zhášení $^3\text{Chla}$ i $^1\text{O}_2$ (*Niyogi, 1999*).

Účinným systémem chránícím membránové lipidy před destrukcí ROS může být přechodná přítomnost Z v lipidové matrix TmB (*Havaux a kol., 2000*). V závislosti na prostorovém uspořádání molekul Z a β -karotenu v TmB dochází ke změnám fluidity této membrány. Kolmým uspořádáním molekul Z v lipidické dvojvrstvě, klesá fluidita TmB. Naopak β -karoten svým náhodným uspořádáním v lipidické dvojvrstvě membrány fluiditu TmB zvyšuje (*Gruszecki a Srtzałka, 1991; Havaux, 1998*). Na druhou stranu dochází k nárůstu termostability TmB (*Tardy a Havaux, 1997*), a tím se snižuje citlivost lipidů z TmB k peroxidaci (*Havaux, 1998; Havaux a Niyogi, 1999*). Antioxidační efekt Z v TmB se pravděpodobně projeví terminací řetězce peroxidačních reakcí lipidů iniciovaných $^1\text{O}_2$ (*Baroli a kol., 2000*). Z pravděpodobně doplňuje antioxidační efekt α -tokoferolu. Přítomnost relativně malého množství Z v TmB lipidové matrix může mít podstatný vliv na fotoprotektivní aktivitu α -tokoferolu (*Havaux a Niyogi 1999*).

Dalším důležitým antioxidačním činidlem TmB je lipofilní sloučenina α -tokoferol (vitamín E), která je schopna deaktivovat $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ a $\text{OH}\cdot$ a chránit membránové lipidy před peroxidací tím, že zneškodňuje volné peroxylové radikály (Niyogi 1999). Zatímco karotenoidy jsou vázané na proteiny TmB, α -tokoferol se vyskytuje volně v lipidové složce membrán a zdá se, že má vliv na řízení membránové fluidity a stability. Důležitou úlohou α -tokoferolu je účast při úspěšném zakončování řetězových reakcí lipidové peroxidace za průvodního vzniku radikálu α -tokoferolu tj. α -chromanoxylu.

Askorbát (Asc) je antioxidant, který se uplatňuje především v přímém zhášení $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ a $\text{OH}\cdot$, při tvorbě molekuly α -tokoferolu z radikálu α -chromanoxylu a při redukci H_2O_2 na vodu v reakci s APX (Noctor a Foyer, 1998). V chloroplastu funguje Asc respektive kyselina askorbová jako kofaktor violaxantin de-epoxidasy (VDE), která převádí V na Z přes A (Foyer a kol., 1994). Kyselina askorbová v lumenu thylakoidu je donorem elektronů do PSII. Přestože se Asc v chloroplastech vyskytuje velice hojně (~25 mM), byla teprve v roce 1998 objasněna jeho syntéza a fotoprotektivní funkce (Niyogi 1999).

Dalším důležitým antioxidantem je glutathion (GSH) vyskytující se hojně v cytosolu, mitochondriích a dalších buněčných kompartmentech, kde vykonává různé funkce, mezi nimiž dominuje obranná funkce před oxidačním stresem (Alscher, 1989). Redukovaná forma GSH je hlavní zásobárnou síry a spolu se svou oxidovanou formou (GSSG) udržuje redoxní rovnováhu v buněčných odděleních (Noctor a kol., 1998, Noctor a Foyer, 1998). Díky redoxním vlastnostem se dvojice GSH/GSSG může účastnit regulace buněčného cyklu (Blokina a kol., 2003). GSH zabraňuje peroxidaci lipidů odstraněním lipidových alkylů nebo lipoxylových radikálů. Jednou z hlavních funkcí GSH je zabránění oxidace thiolové skupiny stromálních enzymů, jež by způsobila jejich okamžitou inaktivaci (např. Piterková a kol., 2005). Během působení fotooxidačního stresu dochází ke změnám v obsahu glutathionu (Tausz a kol., 2004). V počátečních fázích fotooxidačního stresu byla pozorována změna v poměru GSSG/GSH, kdy bylo zaznamenáno více oxidované formy GSSG, což mohlo být způsobeno mírnou degradací celkového glutathionového poolu. Avšak při dalších, alklimačních fázích fotooxidačního stresu bylo zjištěno více GSH a celkový glutathionový pool se navyšuje ve srovnání s nestresovými podmínkami. Glutathion odstraňuje H_2O_2 a reaguje neenzymově i s dalšími ROS: $^1\text{O}_2$, $\text{OH}\cdot$ a $\text{O}_2^{\cdot-}$. Významná role GSH v antioxidační obraně spočívá v jeho schopnosti regenerovat askorbát cestou askorbát-glutathionového cyklu (Niyogi 1999; Blokina a kol., 2003).

3.2 ANTIOXIDAČNÍ ENZYMY

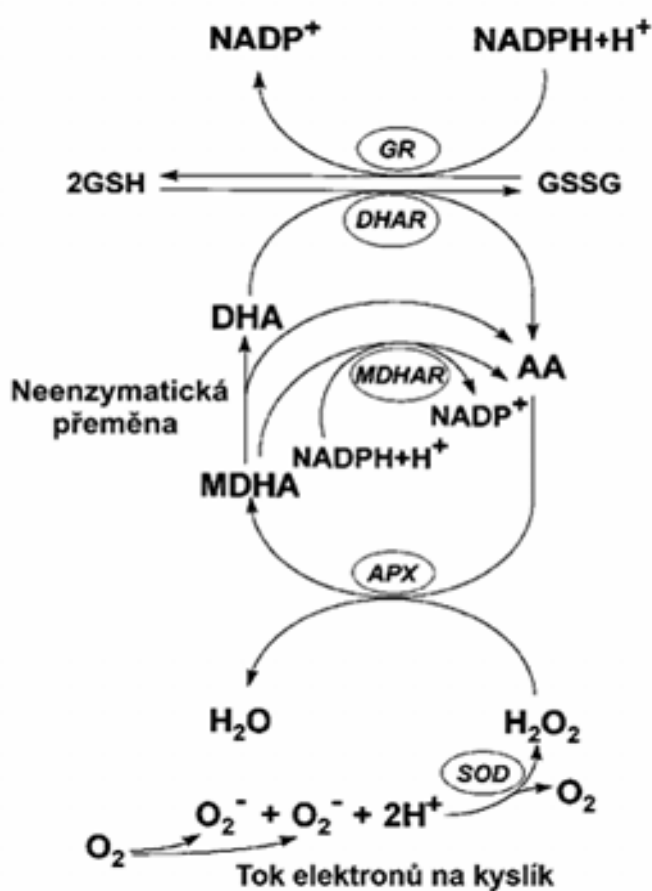
Superoxiddismutasa (SOD) je metaloenzym odstraňující $O_2^{\cdot-}$, čímž snižuje nebezpečí tvorby OH^{\cdot} ze $O_2^{\cdot-}$ v procesu Haber-Weissovy reakce. SOD je lokalizována ve všech kompartmentech rostlinné buňky, které jsou citlivé na oxidační stres tj. mitochondrie, chloroplasty, glyoxysomy, peroxisomy, apoplast a cytosol. Díky SOD je dismutace $O_2^{\cdot-}$ 10 000x rychlejší než by byla rychlost dismutace spontánní (*Blokhina a kol., 2003*). Bylo dokázáno, že fosfolipidová membrána není propustná pro nabitě $O_2^{\cdot-}$ molekuly, z toho důvodu je nezbytné, aby SOD byla přítomna ve všech místech produkce $O_2^{\cdot-}$ (*Alscher a kol., 2002*). Podle kovového kofaktoru SOD dělíme do tří skupin (izoenzymů): Fe SOD, Mn SOD a Cu/Zn SOD (*Inzé a van Montagu, 1995*). Fe SOD je lokalizována v chloroplastech, Mn SOD v mitochondriích a peroxisomech a Cu/Zn SOD v chloroplastech, cytosolu a možná i v mimobuněčném prostoru. Jednotlivé izoenzymy mohou být identifikovány na základě jejich citlivosti k H_2O_2 a KCN, jsou geneticky kódované, přičemž geny reagují na zvýšenou tvorbu ROS (*Blokhina a kol., 2003*). Fe SOD můžeme nalézt u eukaryot i prokaryot. V buňce se Fe SOD nachází v chloroplastech. Rozlišujeme dvě skupiny Fe SOD. Jeden typ je homodimer, tvořen dvěma stejnými jednotkami, proteiny o 20 kDa a 1-2 atomy Fe v aktivním centru. Druhý typ Fe SOD je tetramer tvořený čtyřmi stejnými podjednotkami o molekulové hmotnosti 80-90 kDa. Tento typ Fe SOD má v aktivním centru 2-4 atomy Fe (*Alscher a kol., 2002*). Fe SOD je nevratně inhibována H_2O_2 , ale KCN ji neinaktivuje (*Scandalios, 1993*). Mn SOD se v buňce vyskytuje v mitochondriích a peroxisomech. Je to buď homodimerický nebo homotetramerický enzym s jedním atomem Mn na podjednotku. Vyskytuje se jak u eukaryot, tak u prokaryot (*Alscher a kol., 2002*). Mn SOD není ovlivňována KCN ani H_2O_2 (*Scandalios, 1993*). Zatímco Fe SOD a Mn SOD mají podobnou strukturu díky podobným vlastnostem jejich kovových kofaktorů, struktura Cu/Zn se od nich výrazně liší. Cu/Zn SOD se objevuje převážně u eukaryot, a to ve dvou formách. Jedna z nich je homodimerická a najdeme ji v cytoplasmě nebo periplasmě bakterií. Druhá je homotetramer a je lokalizována v chloroplastech a extracelulárně v intersticiální matrix (*Alscher a kol., 2002*). KCN Cu/Zn SOD reverzibilně inhibuje, H_2O_2 způsobuje nevratnou inhibici Cu/Zn SOD (*Scandalios, 1993*). V poslední době byl objeven i čtvrtý izoenzym s niklem v aktivním centru (Ni SOD) a zatím byl prokázán pouze u bakterií rodu *Streptomyces* (*Alscher a kol., 2002*).

Katalasy (CAT) jsou tetramerní hemové proteiny nacházející se v buněčných mikroorganelách téměř všech aerobních organismů, kde katalyzují přeměnu H_2O_2 (*např. Willekens a kol., 1995; Dat a kol., 2000; Luhová a kol., 2003*). CAT je jedním z mála enzymů

vykazujícím dvojí enzymovou aktivitu. Hyperoxidázovou aktivitu vykazuje CAT během přímé dekompozice H_2O_2 na vodu a kyslík. Peroxidasovou aktivitu katalasy pozorujeme při oxidacích substrátů tj. metanolu, etanolu, formaldehydu, nitritu, formátu peroxidem vodíku (*Dat a kol., 2000; Luhová a kol., 2003*). CAT se nacházejí v peroxisomech, glyoxysomech a jim příbuzným organelám, v nichž jsou přítomny enzymy produkující H_2O_2 , např. glykolát oxidasa. Rozlišujeme tři hlavní isoformy tohoto enzymu CAT1, CAT2 a CAT3, které dále řadíme do tří tříd (*Willekens a kol., 1994a; Willekens a kol., 1997; Dat a kol., 2000*). Enzymy 1. katalasové třídy jsou lokalizovány v listech, jejich činnost je závislá na světle a podílejí se na odstraňování H_2O_2 během fotorespirace. Enzymy 2. katalasové třídy se nacházejí převážně v cévních svazcích. Ve třetí katalasové třídě jsou seskupené enzymy zapojené hlavně v procesu odstraňování H_2O_2 z glyoxysomů a jsou hojně přítomné v semenech a mladých semenáčcích rostlin (*Willekens a kol., 1995; Dat a kol., 2000*). Expresce CAT genů není regulována pouze během vývojových stádií rostlin, ale byla potvrzena citlivost exprese CAT genů na signály z vnějšího prostředí (*Scandalios, 1994; Willekens a kol., 1994b; Dat a kol., 2000*). K fotoinaktivaci CAT dochází již při vystavení rostlin mírným světelným intenzitám při současném působení stresového faktoru (*Streb a Feierabend, 1996*). Hladina CAT v buňce se mění okamžitě jako odpověď na stresové podmínky tj. může být rychle snížena při stresu, který má za následek inhibici translace CAT genů nebo zvýšení degradace genů CAT (*Feierabend a kol., 1996*). Množství mRNA isoenzymů CAT1 a CAT2 je při reakci na světlo zvýšené, zatímco množství mRNA CAT3 postupně klesá (*McClung, 1997*). Vliv světelných podmínek na enzymovou aktivitu CAT v semenáčcích hrachu (*Pisum sativum*) pěstovaných za kontrolovaných světelných podmínek a u etiolovaných rostlin byl zkoumán např. v práci *Luhová a kol. (2003)*. Zvýšená aktivita CAT zjištěná u neetiolovalých rostlin v porovnání s etiolovanými poukazuje na mnohem intenzivnější produkci toxického H_2O_2 v zelených rostlinách. Mimo jiné je CAT aktivita značně inhibována během nízkých teplot i vysokotelotních šoků (*Hertwig a kol., 1992; Dat a kol., 2000*) Byly publikovány práce, které poukazují na změny v aktivitě CAT během stresů vyvolaných UV-B zářením, zvýšenou koncentrací SO_2 nebo ozónu (*Willekens a kol., 1994a*).

Askorbát-glutathionový cyklus (*Obr. 9*) někdy také nazývaný Foyer-Halliwell-Asadův cyklus je zodpovědný za odbourávání H_2O_2 na H_2O z takových buněčných kompartmentů, v nichž není přítomna CAT. V tomto cyklu jsou zapojeny neenzymové antioxidanty kyselina askorbová a GSH a antioxidantní enzymy DHAR, MDAR, APX a GR. Místem činnosti askorbát-glutathionového cyklu jsou chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy a cytosol (*např. del Río a kol., 2002*). Na povrchu TMB je $O_2^{\cdot-}$ efektivně změněn enzymem

SOD, (konkrétně Cu/Zn-SOD) na H_2O_2 a ten je následně redukován na H_2O enzymem APX za současné oxidace kyseliny askorbové na monodehydroaskorbát (MDHA) (více v kapitole 3.4.). Tyto reakce mohou probíhat nejen v bezprostřední blízkosti TMB, ale i ve stromatu, neboť SOD i APX byly nalezeny jak vázány na TMB tak i volně ve stromatu (Ogawa a kol., 1995). Celý sled antioxidačních reakcí se uzavírá regenerací (opětovnou redukcí) MDHA zpět na Asc. Dochází k ní hlavně neenzymaticky redukováným ferredoxinem během Mehler-peroxidázového cyklu (Asada 1999). Možná je také enzymatická redukce enzymem MDHAR za současné spotřeby NAD(P)H nebo neenzymatická reakce dvou molekul MDHA za vzniku Asc a dehydroaskorbátu (DHA). DHA je pak redukován na Asc pomocí DHAR, za současné oxidace GSH na GSSG. Oxidovaný glutathion se redukuje zpět na GSH v reakci katalyzované GR za spotřeby NADPH (např. Inzé a van Montagu, 1995; Asada 1999; Kotabová, 2007). Nutno dodat, že kyselina askorbová ani GSH nejsou touto cestou spotřebovávány, pouze se účastní cyklických redoxních reakcí za použití 4 enzymů, které dovolují redukci H_2O_2 na vodu s využitím elektronů získaných z NAD(P)H.



Obr.9: Askorbát-glutathionový cyklus. DHA-dehydroaskorbát; AA-kyselina askorbová; GSH-glutathion; GSSG-oxidovaný glutathion; DHAR-dehydroaskorbát reductasa; GR-glutathion reductasa; MDHAR-monodehydroaskorbát reductasa; APX-askorbát peroxidasa; SOD-superoxiddismutasa; NADPH-nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, redukována forma; NADP-nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, oxidovaná forma (Noctor a Foyer 1998, upraveno).

3.3 XANTOFYLOVÝ CYKLUS

Fotosynteticky aktivní radiace (FAR) představuje nejen zdroj excitační energie pro pohon primárních fotosyntetických reakcí, ale je na druhou stranu také potenciálním stresovým faktorem. Pokud jsou rostliny vystaveny vysokým intenzitám FAR, snaží se množství přijaté FAR omezit. Jedním ze způsobů omezení dopadů vysoké ozáření na fotosyntézu je snížení velikosti LHCII, což vede ke snížení absorpčního průřezu PSII. Toto snížení obsahu LHC je spojeno s relativním zvýšením obsahu pigmentů xantofylového cyklu (*Niyogi 1999*).

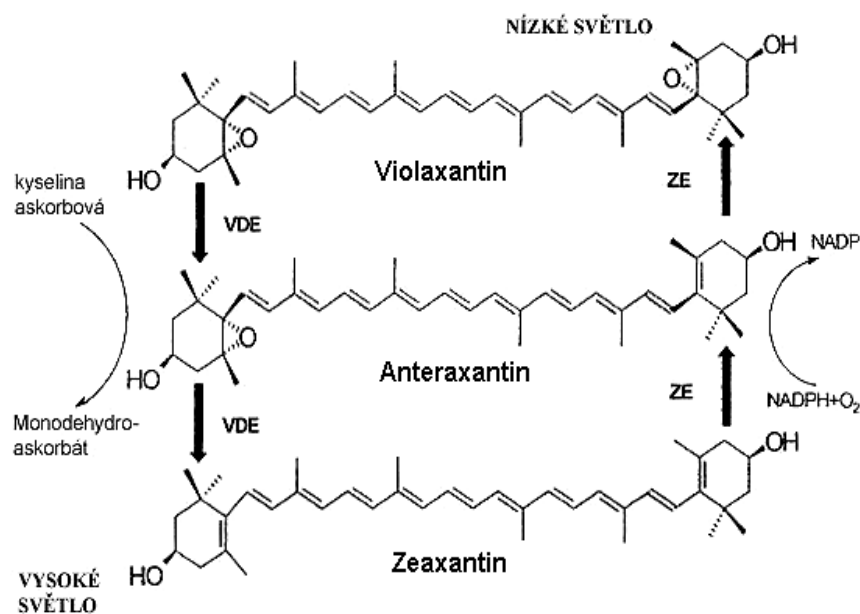
V rámci xantofylového cyklu dochází k vzájemné konverzi tří xantofylů – violaxantinu (V), anteraxanthinu (A) a zeaxanthinu (Z), které se liší počtem konjugovaných dvojných vazeb (*Obr. 10*). Reakce xantofylového cyklu, deepoxidace V na Z a zpětná epoxidace, spočívá právě ve změně počtu přítomných konjugovaných dvojných vazeb v molekulách xantofylů, tedy změnu z devíti (V) na jedenáct (Z) přes A, který jich má deset. Význam této reakce je dvojnásobný. Za prvé, počet dvojných vazeb ovlivňuje životnost molekuly a energii jejích excitovaných stavů. Podle *Josue a Frank (2002)* je nejnižší hodnota excitovaného stavu (S_1) Chla 14880 cm^{-1} ; u V byla naměřena hodnota 15580 cm^{-1} a u Z 14610 cm^{-1} (*více kapitola 3.3.1*). *Young a Frank (1996)* uvádí následující doby života (τ) singletních excitovaných stavů karotenoidů: $V(\tau) = 23,9\text{ ps}$; $A(\tau) = 14,4\text{ ps}$; $Z(\tau) = 9,0\text{ ps}$. Za druhé, prodloužení základního řetězce zamezí rotaci koncových skupin, k níž dochází u karotenoidů obsahujících např. epoxidovou skupinu, jako je violaxantin. Výsledkem je rozdílná konformace molekul V a Z. Koncové skupiny mohou být umístěny vůči hlavnímu řetězci buď kolmo, nebo mohou být v jedné rovině s hlavním řetězcem. Karotenoidy tak mohou snadno tvořit agregáty a předpokládá se, že konformační změny probíhající během xantofylového cyklu mohou ovlivňovat uspořádání světlosběrných komplexů (*Young a Frank 1996; Bassi a Caffarri 2000*).

Konverze xantofylů jsou katalyzovány enzymy violaxanthin de-epoxidasou (VDE) a zeaxanthin epoxidasou (ZE). Při nadměrné ozáření dochází k de-epoxidaci V přes A na Z enzymem VDE. Tato reakce je reverzibilní a zpětná epoxidace probíhá pomocí enzymu ZE (*Obr. 10*).

Enzym zeaxanthin epoxidasa (ZE) je vázán na membránu na stromální straně TMB (*např. Pfundel a Bilger 1994; Eskling a kol. 1997*). Epoxidace Z přes A na V probíhá ve tmě, je stimulována slabým světlem a byla prokázána závislost průběhu epoxidace na kosubstrátech O_2 a redukovaném ferredoxinu (Fd) za spotřeby NADPH (*Eskling a kol., 1997*).

Optimální pH pro aktivitu ZE se pohybuje v rozmezí 7-7,5. V průběhu této reakce je redukční síla z NADPH přenášena na ZE prostřednictvím ferredoxinu (Bouvier a kol., 1996).

Enzym VDE se nachází v lumenu thylakoidů a kromě Asc respektive kyseliny askorbové potřebuje pro svou aktivaci lumenární pH okolo 5,2 a v neposlední řadě také V (Eskling a kol. 1997; Müller a kol. 2001). Vazba na TmB se uskuteční pravděpodobně v místech, kde je přítomný lipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) tvořící invertované hexagonální struktury (Latowski a kol. 2004). Ve tmě (při neutrálním pH) se VDE pohybuje volně ve vodní fázi lumenu thylakoidů. Při zvýšeném ozáření dochází ke snížení pH v lumenu díky transportu protonů ze stromatu do lumenu thylakoidu. Důsledkem tohoto poklesu je aktivace enzymu VDE, tedy její připojení k TmB (Eskling a kol., 2001; Morosinotto a kol., 2003). Mezitím dojde u V, který je za obvyklých světelných podmínek vázán v LHCII ve své *cis* konformaci (15, 15'-*cis* konformace), k izomeraci z *cis* na *trans* konformaci, indukovanou světlem. Bylo zjištěno, že pouze 5,6.-epoxy xantofyly v *trans* konformaci za přítomnosti lipidů mohou být substrátem pro VDE (Grotz a kol., 1999).



Obr. 10: Schématické znázornění xantofylového cyklu. Deepoxidace violaxantinu na zeaxantin probíhá za katalytických účinků violaxantin deepoxidasy (VDE) při působení vysoké ozáření. Naopak epoxidace Z na V přes A probíhá při nízké ozáření nebo ve tmě a je katalyzována enzymem zeaxantin epoxidasou (ZE) (Foyer a Harbinson 1999; upraveno).

Po uvolnění V do lipidové matrix se V stává přístupným pro VDE, která postupně odstraní jeho epoxidové skupiny. Vzniká A, z jehož molekuly se po odstranění zbylé epoxidové skupiny vzniká Z, který má dvojí umístění (Eskling a kol., 2001). Část Z se vyskytuje volně v TmB a část je vázaná na proteiny světlosběrných antén. Ukazuje se, že volný Z se podílí na ochraně lipidů před peroxidací (Havaux a Niyogi, 1999). Z vázaný na vnitřních světlosběrných komplexech PSII (CP 26, CP 29) (Morosinotto a kol., 2003) působí jako „zhášec“ $^1\text{Chla}$ a podporuje vznik agregátů LHCII, v nichž probíhá disipace nadměrné

excitační energie (Demmig-Adams a Adams 1996; Gilmore, 1997). Při dalším poklesu pH lumenu na hodnotu okolo 6 dochází k protonaci Asc na kyselinu askorbovou, která je skutečným substrátem pro VDE (Eskling a kol., 1997). Za normálních podmínek se pH lumenu pohybuje v rozmezí 5,8 – 6,5 (Kramer a kol., 1999), z čehož plyne, že limitujícím faktorem pro aktivitu VDE není pH lumenu, ale dostupnost V (Morosinotto a kol., 2003; Kotabová, 2007). Tento předpoklad byl potvrzen díky studiu na mutantu ječmene *chlorina f2* (nemá Chlb a postrádá některé LHC proteiny), kde deepoxidace V probíhala rychleji. Za nízké ozáření je V vázáný v pigment proteinových komplexech a je tedy prakticky nepřístupný pro VDE. Ovšem při vysoké ozáření dojde k indukci strukturně funkčních změn v PPC, které umožňují odpojení V od apoproteinů LHCI a tím se V dostane lipidové fáze thylakoidu, čímž se stane přístupným pro VDE (Eskling a kol., 2001).

Zajímavým aspektem regulace xantofylového cyklu je skutečnost, že zatímco maximální míra konverze V na Z v podmínkách nadměrné ozáření je většinou dosažena během 10-15 minut, může doba zpětné konverze Z na V výrazně kolísat v časovém rozmezí několika minut až hodin (např. Jahns a Miede, 1996; Färber a kol., 1997) a v extrémních podmínkách až několika dnů (např. Ottander a kol., 1995).

3.3.1 SPOJENÍ XANTOFYLOVÉHO CYKLU S NPQ

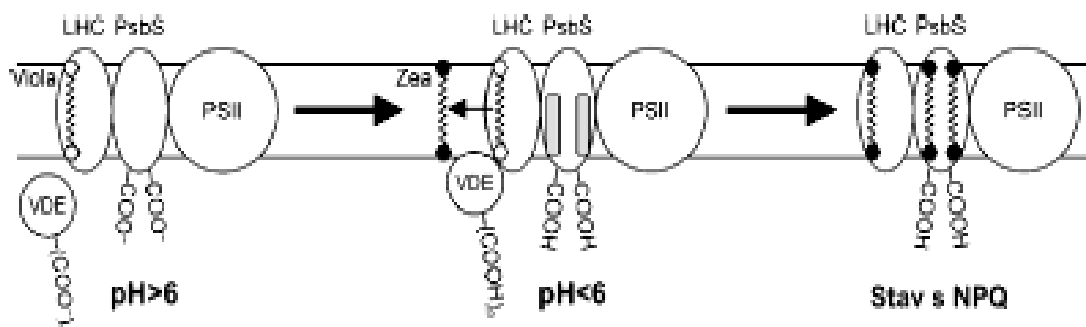
Fluorescence Chla odráží změny v účinnosti fotosyntetických procesů. Fotochemické zhášení (qP) odpovídá obecně energii spotřebované při separaci náboje v RC PSII. Nefotochemické zhášení (NPQ) je vyvoláno tvorbou ΔpH na TMB, jakož i aktivací četných regulačních mechanismů, které zajišťují efektivní využití excitační energie a jsou schopny se vypořádat s fotoinhibiční ozáření nebo jiným druhem poškození fotosyntetických komplexů.

Přesný mechanismus, kterým se Z podílí na NPQ, není dosud zcela objasněn. Existují zde dva hlavní myšlenkové proudy – přímé a nepřímé zhášení excitovaného chlorofylu Z díky konformační změně LHC. Důležitou úlohu při konformační změně hraje protein PsbS (Li a kol., 2000; Niyogi a kol., 2005). PsbS protein má funkci regulační podjednotky LHC a slouží jako senzor lumenálního pH (např. Li a kol., 2002; Li a kol., 2004; Kotabová, 2007). Jak přímý, tak nepřímý mechanismus zhášení excitovaného chlorofylu, zabraňuje tvorbě ROS ve fotoinhibičních podmínkách.

První hypotéza předpokládá, že konformační změna umožní přímou interakci mezi Z a excitovaným 1Chla . Dojde k přenosu energie z molekul 1Chla na heterodimer chlorofyl-Z a následnou velmi rychlou separaci náboje na $Chla^-$ a Z^+ (Holt a kol., 2004). Z^+ se vrátí do

původního stavu mechanismem vnitřní konverze (např. Demmig-Adams 1990; Polívka a kol. 2002; Morosinotto a kol. 2003; Ma a kol., 2003; Kotabová, 2007).

Podle druhé hypotézy je Z pouze jakýmsi zprostředkovatelem, který se podílí na změnách ve struktuře PSII, a zajišťuje tak zhášení nepřímo (Obr.11). Tato hypotéza vychází ze strukturních vlastností molekul karotenoidů. Díky rozdílné konformaci, kterou zaujímají koncové skupiny u V a Z, se jejich molekuly také odlišují ve své polaritě. Z je mnohem více hydrofobní než V, protože postrádá epoxidové skupiny (Pfündel a Bilger, 1994; Horton a kol., 1994; Young a Frank, 1996; Bassi a Caffarri, 2000). Tím jsou pigmenty xantofylového cyklu předurčeny k odlišné vazbě s proteiny LHCII a mohou tak ovlivňovat jejich strukturu. Snížené pH uvnitř lumenu aktivuje protonaci vazebných míst pro koncové skupiny xantofylů, které jsou umístěny na CP komplexech. Právě tyto vnitřní světlosběrné komplexy PSII (CP 26 a CP 29) byly určeny jako místo, kde NPQ probíhá (Horton a kol., 1994). Protože V nemá díky své odlišné polaritě potřebnou afinitu k těmto místům, mohou se zde vázat jen deepoxidované xantofyly. Navázání Z na PsbS protein je možné jen v případě, když je PsbS protein protonovaný (Aspinall-O'Dea a kol., 2002). Ty pak následně způsobí výrazné konformační změny, díky nimž může dojít k přiblížení molekuly Z a $^1\text{Chla}$, co nejblíže k sobě, čímž je usnadněn následný přenos energie. Tyto strukturní změny mohou také vyústit v přímou ztrátu energie z $^1\text{Chla}$ mechanismem vnitřní konverze (Demmig-Adams a Adams 1996).



Obr.11: Mechanismus NPQ. S poklesem pH lumenu dojde k aktivaci enzymu VDE a k protonaci proteinu PsbS. V je pomocí VDE konvertován na Z, který se poté váže na protonovaný PsbS. Komplex (PsbS/H⁺/Z) pak interaguje s LHC vyvolá stav s nárůstem NPQ (Niyogi a kol., 2005; převzato z Kotabová, 2007).

3.4 CYKLUS VODA-VODA

Příliš velké množství FAR přijaté LHC je pro rostliny nebezpečné (viz. kapitola 3.3), protože by mohlo způsobit vznik ROS schopných oxidovat buněčné komponenty. Cyklus voda-voda (WWC) neboli pseudocyklický transport elektronů je dalším ochranným

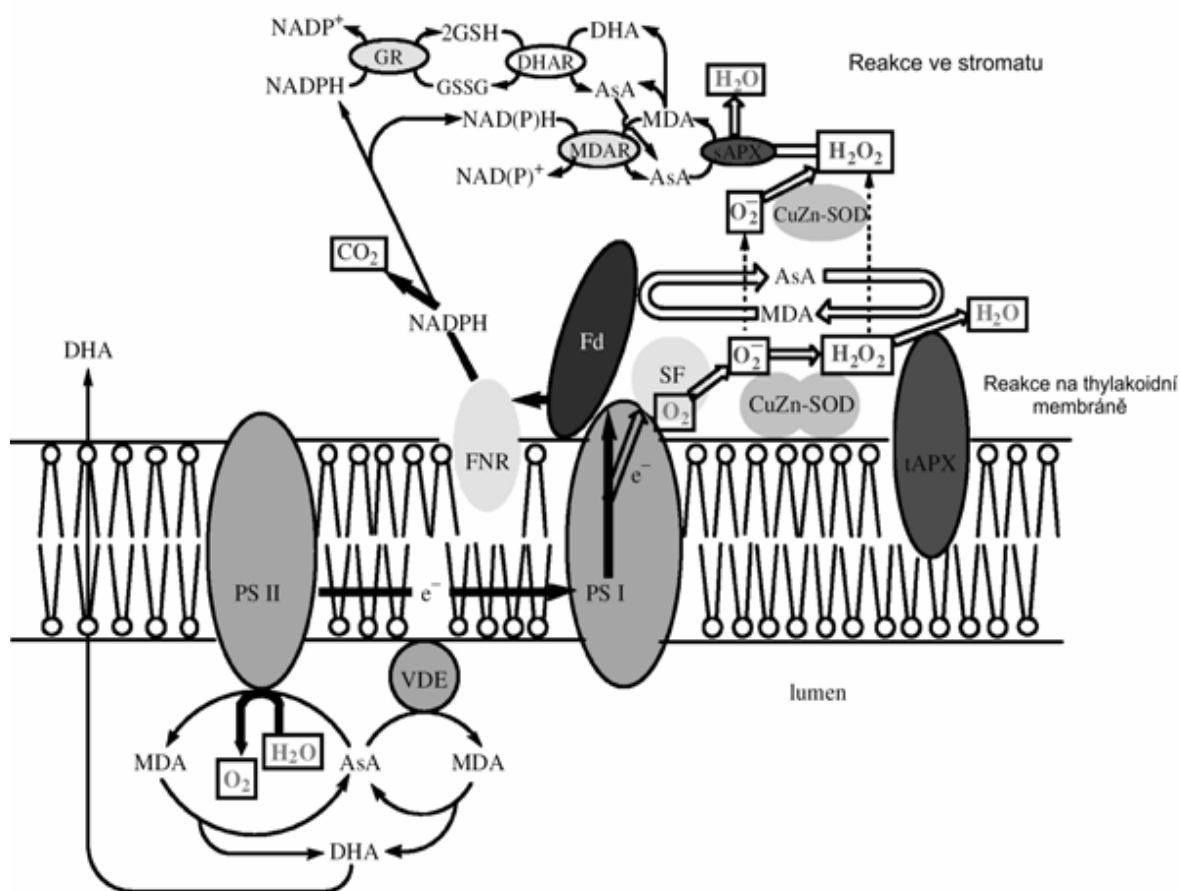
mechanismem, který je schopen likvidovat již vzniklé a nebezpečné ROS zejména $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . Název cyklu plyne ze skutečnosti, že voda je jak počátečním, tak i konečným produktem cyklu (Obr.12) (Asada, 1999; Asada, 2000).

Nejen že WWC odklízí škodlivé ROS, ale také generuje ΔpH na TmB v podmínkách, když je dostupný pouze malý počet akceptorů elektronů v PSI tj. když je blokován Calvinův cyklus. Pak jsou elektrony přes ETC pumpovány do PSI s rychlostí větší, než s jakou probíhá zpětná oxidace NADPH na $NADP^+$ v Calvinově cyklu (Foyer a kol., 1994; Arora a kol., 2002). Díky nárůstu ΔpH dojde ke zvýšení nezářivé disipace absorbované energie, což pozorujeme nárůstem NPQ. Vytvořený ΔpH může být využit enzymem VDE, jež katalyzuje konverzi V na Z (Foyer a Noctor 2005).

WWC probíhá v chloroplastech za účasti specifických enzymů. Těmito enzymy jsou SOD, APX, GR, MDAR a DHAR. Zmíněné enzymy jsou vázané na TmB anebo se vyskytují volně rozpuštěné ve stromatu. Prvním krokem WWC je fotooxidace vody na kyslík probíhající v PSII. Získané elektrony jsou přenášeny řetězcem přenašečů umístěných v tylakoidní membráně na PSI a odtud na ferredoxin (Fd) nebo v menší míře také na stromální faktor či přímo na O_2 . Stromální faktor (MDAR) výrazně zvyšuje kapacitu cyklu tím, že zprostředkovává přenos elektronů na O_2 (např. Asada 1999).

Pokud molekula O_2 přijme elektron, vzniká z ní $O_2^{\cdot-}$. Tato reakce je nejpomalejší reakcí v celém WWC. $O_2^{\cdot-}$ je odstraňován enzymaticky SOD vázanou na TmB, anebo SOD ve stromatu. V obou případech je $O_2^{\cdot-}$ disproporcionován na O_2 a H_2O_2 . Dalším způsobem odstranění $O_2^{\cdot-}$ je spontánní reakce s glutathionem, Asc nebo Mn^{2+} , ale příspěvek těchto reakcí je velice zanedbatelný z důvodu malé reaktivity $O_2^{\cdot-}$ s těmito látkami. H_2O_2 vznikající ze $O_2^{\cdot-}$ je odstraňován v rámci thylakoidního systému pomocí APX vázané na TmB (tAPX), která je umístěna poblíž SOD. Ve stromatu tuto činnost zastává stromální APX (sAPX). V obou případech je pro reakci nutný Asc, který dodává elektrony na redukci H_2O_2 . Katalytický cyklus APX zahrnuje dvouelektronovou oxidaci tohoto enzymu H_2O_2 . V dalším kroku reaguje oxidovaná forma enzymu s Asc za vzniku monodehydroaskorbátu (MDA). Posledním krokem je redukce enzymu pomocí Asc. Enzym se regeneruje do výchozího stavu a vzniká druhá molekula MDA. MDA, který vzniká jedoelektronovou oxidací Asc, již neplní svou fyziologickou funkci, a proto je v chloroplastu redukován zpět na Asc. Pokud MDA vzniká v rámci thylakoidního systému poblíž membrány thylakoidu, poskytuje elektrony pro redukci přímo Fd. Ten redukuje MDA dokonce ochotněji než $NADP^+$. V tomto případě probíhá tedy obnova Asc převážně neenzymaticky. Ve stromatu probíhá naopak enzymatická

obnova Asc, a to pomocí enzymu MDAR. Možnými donory elektronů pro tuto reakci jsou přednostně NADH anebo také NADPH.



Obr.12: Cyklus voda-voda, který probíhá v chloroplastech a zahrnuje fotoredukci molekulárního kyslíku na superoxid u PSI, disproporcionaci superoxidu na H_2O_2 , redukcí H_2O_2 na vodu a zpětnou redukcí oxidovaného askorbátu na askorbát. Enzymy zapojené do popsaných reakcí jsou podrobně uvedeny v textu. SF-stromální faktor (Asada, 2000; upraveno).

V prvním kroku enzymové reakce dochází k dvouelektronové redukci FAD a navázání NADPH, následuje redukce MDA a tvorba semichinonu a finální reakcí je odštěpení $NADP^+$ ze semichinonu. MDA podléhá spontánní disproporcionaci na DHA+askorbát. Tento proces je ovlivněn hodnotou pH prostředí, přičemž probíhá nejrychleji při pH v rozsahu 3-5. Ve stromatu je pH většinou v rozsahu 7-8, takže MDA, pokud není enzymaticky přeměněn, zde zůstává relativně dlouho oxidován (Asada, 2000). Dehydroaskorbát (DHA) vznikající dvouelektronovou oxidací Asc se v rámci WVC redukuje zpět na Asc pomocí enzymu DHAR. Donorem elektronů je v tomto případě glutathion. Glutathion je zpět redukován pomocí enzymu GR.

3. 4. 1 FUNKCE CYKLU VODA-VODA

Cyklus voda-voda zastává v rostlině dvě základní funkce: likviduje ROS a podílí se na disipaci přebytečné excitační energie. Enzymy účastníci se WWC jsou schopny přímo odklízet $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 a podílejí se tak na ochraně především stromálních enzymů účastnících se Calvinova cyklu. Dalším důvodem, proč je rostlinná buňka vybavena tak dokonalým ochranným systémem, je zabránění vzniku silně reaktivních radikálů OH \cdot , které jsou hlavním původcem oxidačního poškození chloroplastů. Důležitá je i funkce WWC v ochraně PSI, jehož případná inhibice, je narodil od PSII, ireverzibilní. Pokud systém není schopen chránit PSI, nastává přednostně fotoinhibice PSII, který je k oxidačnímu poškození citlivější (Gilmore a Govindjee 1999). Přejídnou inaktivací PSII se sníží tok elektronů do PSI a tím dojde i ke snížení tvorby nebezpečného $O_2^{\cdot-}$. Degradovaný D1 protein, obsažený v PSII, je pak nahrazen novým D1 proteinem a funkce PSII je obnovena.

WWC přispívá k lineárnímu toku elektronů v TMB. Tímto dějem vzniká na membráně ΔpH , který vede ke tvorbě ATP. Při průběhu WWC ovšem nedochází k produkci NADPH ani redukovaného Fd, ale vzniká pouze ATP. Proto je tento děj také označován jako pseudocyklická fosforylace. Odtud plyne důležitá funkce WWC, kterou je regulace poměru ATP/NADPH v chloroplastech. Nedostatek ATP se objevuje např. v prvních sekundách po osvětlení rostliny, kdy je limitována funkce Calvinova cyklu. Díky WWC se však rychle vytvoří ΔpH a začne se syntetizovat ATP. Množství ATP potřebného za normálních podmínek pro fixaci CO_2 závisí na typu rostliny. V C3 rostlinách je pro fixaci CO_2 lineární elektronový tok dostačující. Jiné procesy podílející se na tvorbě ATP, kterými jsou WWC a CET, nejsou z tohoto důvodu nutné. Naproti tomu C4 rostliny vyžadují více ATP, než je možno získat lineárním ETC, proto se WWC u nich podílí na fixaci CO_2 i při normálních podmínkách (Asada 2000).

WWC se rovněž účastní disipace přebytečné světelné energie a to jak přímo, tak i nepřímo. Nepřímý způsob souvisí se zvyšováním hladiny ATP ve stromatu. Cyklus WWC tímto umožňuje průběh fotorespirace, která potřebuje více ATP (vyšší poměr ATP/NADPH) než fixace CO_2 . Procesem fotorespirace je disipována nadbytečná excitační energie, ale zároveň je dodáván CO_2 do chloroplastů. WWC funguje jako „odbočka“ pro elektrony, které následně ve WWC redukují O_2 na H_2O_2 . Tento děj probíhá ve větší míře především při stresových podmínkách, kdy je kapacita využití fotonové energie a tedy i elektronů pro redukci CO_2 snížena.

Další funkcí WWC je udržení Asc a glutathionu v redukované formě, jež jsou nezbytné nejen pro průběh samotného WWC, ale zastávají i další důležité funkce v rostlinách (více kapitola 3.1.).

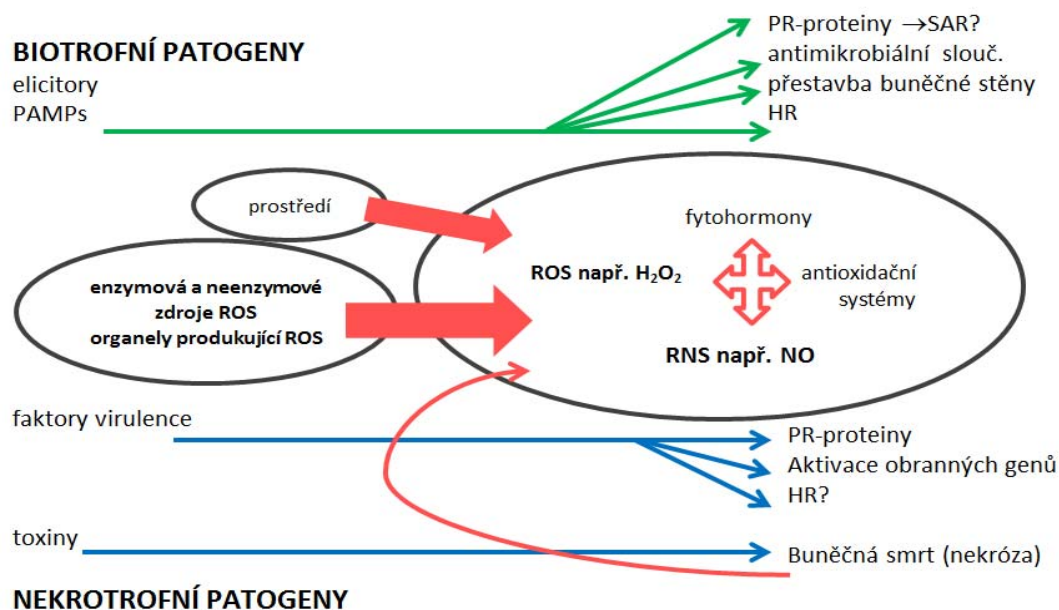
4. CHARAKTERISTIKA INTERAKCÍ HOSTITEL-PATOGEN

Interakce rostliny s živými organismy může být vzájemně výhodná (mykorhiza, symbióza) nebo pro rostlinu nepříznivá, která navodí stres označovaný jako biotický. Při biotickém stresu jsou rostliny ohrožovány patogeny, konkurujícími rostlinami nebo býložravými živočichy. I když jsou rostliny vůči většině patogenů imunní, představuje biotický stres nebezpečný faktor ohrožující život rostlin a způsobující značné ekonomické ztráty na kulturních rostlinách (Agrios, 1997; Dangl a Jones, 2001; Berger a kol., 2007). Rostliny, jako nepohyblivé organismy, mají vyvinutý značně komplexní, efektivní, konstitutivní i indukovatelný obranný systém. Pro rostlinu je důležité, aby co nejdříve identifikovala původce stresoru a navodila odpovídající způsob obrany (Pavlová, 2005).

Pojmem patogen označujeme takový buněčný či nebuněčný organismus, který je schopen způsobovat chorobu na jednom hostiteli nebo okruhu hostitelů (Landa a kol., 2002). Patogeny dělíme podle nutričních nároků na biotrofní, hemibiotrofní a nekrotrofní. Z hlediska lokalizace infekčních struktur jsou rozděleni na ektoparazity a endoparazity. V závislosti na životní strategii patogenu a průběhu infekčního procesu je pozorována odlišná úloha ROS a aktivace signálních drah (Obr. 13) (Shetty a kol., 2006; López a kol., 2008; Bari a Jones, 2009) (více v kapitole 4.3).

Specializovaní parazité (nejčastěji biotrofní, např. *Pseudomonas* spp., rzi) mají značně vyhraněný okruh hostitelů. Naopak nesespecializovaní parazité (nekrotrofní, např. hnilobu způsobující bakterie *Erwinia* spp, *Botrytis cinerea* způsobující plíseň šedou) mají okruh hostitelů velmi široký a jsou schopni produkovat širokou řadu extracelulárních enzymů, umožňující jim vstoupit do rostlinných buněk prostřednictvím odbourávání polymerů buněčné stěny. Biotrofní patogeny jsou nutričně vázány na živé hostitelské buňky, což je odlišuje od patogenů nekrotrofních, kteří získávají organické látky z usmrcených buněk hostitele (např. Hammond-Kosack a Jones, 2000; Glazebrook, 2005). Hemibiotrofové (např. *Phytophthora infestans*) jsou přechodnou formou mezi biotrofií a nekrotrofií a během svého vývoje v hostiteli-rostlině mohou projevit oba způsoby výživy, zpočátku žijí biotrofně, ale s postupující infekcí mění způsob výživy na nekrotrofní nebo saprotrofní (např. Kúdela a kol., 1989; Ashby 2000; Hammond-Kosack a Jones, 2000; Berger a kol., 2007). Mezi biotrofy

řadíme i viry, protože jsou striktně z hlediska nutričního a reprodukčního závislí na živých buňkách hostitele. U hub a bakterií byly popsány jak biotrofní, hemibiotrofní, tak i nekrotrofní způsob výživy (např. Panstruga, 2003; Berger a kol., 2007). Pojmem hostitel charakterizujeme organismus, jenž přechovává jiný buněčný nebo nebuněčný organismus (virus), který je na něm částečně nebo úplně závislý.



Obr.13: Zdroje a funkce ROS a RNS během interakce rostlin s biotrofními a nekrotrofními patogeny (Shetty a kol., 2008).

Téměř každá interakce hostitel-patogen je jedinečná v aktivaci, lokalizaci, časovém rozvržení a míře obranných reakcí. Aktivita patogenu směřují na kolonizaci rostlinného hostitele, zatímco rostliny jsou „naprogramovány“ ke zjištění přítomnosti patogenu a ke spuštění obranné reakce (např. Agrios, 1997; Bolwell a Daudi, 2009). Odezva na infekci a případný rozvoj či potlačení projevů choroby primárně závisí na genetické výbavě hostitele i patogenu. Skutečnost, zda rostlina bude vůči patogenu odolná nebo ne, vysvětluje hypotéza „gen-proti-genu“ (např. Greenberg, 1997).

Specifičnost vztahu hostitel-patogen závisí na tom, zda je rostlina schopna patogen rozpoznat. Z tohoto hlediska můžeme dělit interakce mezi rostlinou a patogenem na interakce kompatibilní a nekompatibilní (např. Almási a kol., 2001). Ke kompatibilní interakci dochází tehdy, jsou-li obě složky vztahu hostitel-patogen biologicky slučitelné. U kompatibilních interakcí rostlina nerozezná patogen a dojde k infekci, kolonizaci a šíření patogenu v rostlině (např. Walton, 1997). Při interakci nehostitel-nepatogen, kdy jsou obě složky biologicky

neslučitelné, mluvíme o nekompatibilní interakci. Mezi nekompatibilní interakce patří případy, kdy je rostlina nehostitelská a patogen se na ní nemůže uchytit. U nekompatibilní interakce nedochází k typickému vývoji symptomů choroby, dochází k zapojení obranné reakce spouštěné po aktivaci signálních drah zahrnujících kyselinu salicylovou a/nebo jasmonovou a také k akumulaci ROS vedoucí k programované buněčné smrti tzv. hypersenzitivní reakci (HR) (např. Sedlářová a Lebeda, 2001b; Pavlová, 2005) (více v kapitole 4.1.2).

4.1 MECHANISMY REZISTENCE ROSTLIN

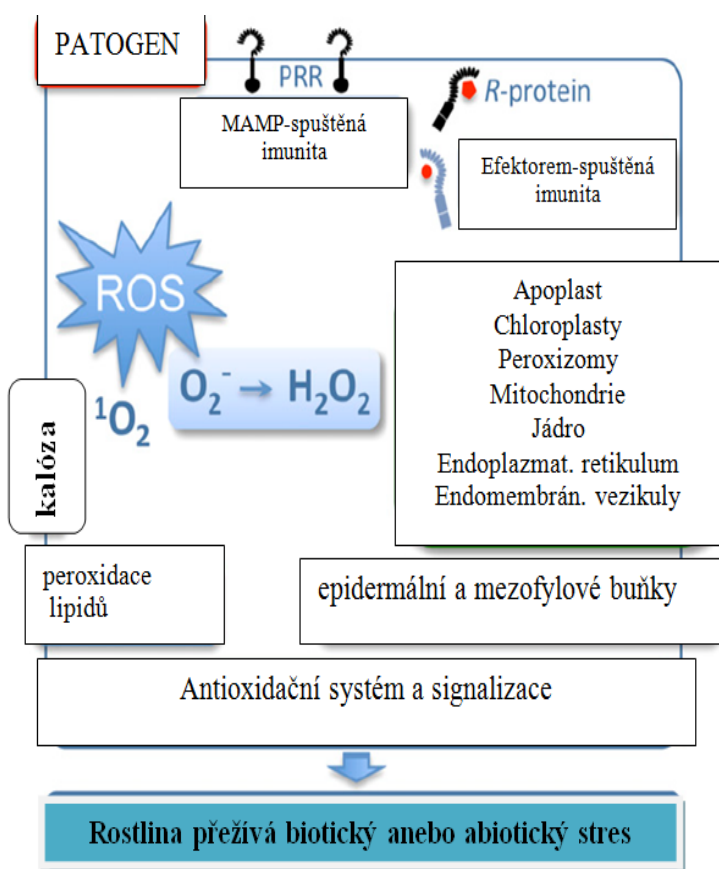
Obrana rostlin proti patogenům zahrnuje různé strategie, má rozličné projevy a využívá mnoha mechanismů působících na různých úrovních (Walton, 1997). Hlavním cílem těchto pochodů je posílení stávajících mechanických bariér, vytvoření nových bariér v buněčné stěně, nastolení podmínek pro patogen nepříznivých a poškození nebo usmrcení patogenu. Obrana rostlin proti patogenům je proces komplexní a jeho součástí je i aktivace regulačních mechanismů koordinujících průběh jednotlivých reakcí v prostoru i čase (Pavlová, 2005). Nicméně vzhledem k jedinečnosti dosud známých interakcí mezi rostlinami a různými skupinami patogenů nelze stanovit obecné schéma průběhu patogeneze ani obranných mechanismů (Tsuda a kol., 2008; Walton, 1997; Sedlářová, 2009).

Rostliny se proti patogenům brání tím, že jsou schopny vytvářet strukturní bariéry, jež zabraňují vstupu a rozšíření patogenů po rostlině. Jiným obranným mechanismem je biochemická obrana, která spočívá v produkci látek pro patogen toxických anebo silně brzdících jeho vývoj (Agrios, 1997; Gloser, 1998). Obranné mechanismy dělíme i podle toho, zda jsou v rostlině přítomny vždy (preformované), anebo je-li jejich tvorba indukována až v průběhu patogeneze (mechanismy indukované neboli aktivní) (Sedlářová a Lebeda, 2001b; Walton, 1997). Podle délky časového úseku uplynulšího od infekce rostliny patogenem rozeznáváme časné lokální obranné reakce a zpožděné systémové reakce.

4.1.1 KONSTITUTIVNÍ OBRANA

Strukturní obranu proti patogenům zajišťují preformované fyzické bariéry, ale také bariéry produkované až jako odpověď na infekci. Preformované fyzické bariéry jsou vlastně primární a sekundární krycí pletiva, chránící rostlinu před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí i před napadením rostliny patogeny (Walton, 1997).

Základní strukturální bariérou je buněčná stěna. Mnohé patogeny pronikají do rostliny poraněním nebo využívají přirozené otvory (průduchy, lenticely, hydatody) nebo jsou do rostliny aktivně vpravovány pomocí vektoru (bodavě sací ústrojí mšic – viry), nicméně řada houbových patogenů je schopna penetrovat přímo přes buněčnou stěnu, což je podmíněno vyvinutím vysokého mechanického tlaku a produkcí lytických enzymů. Mechanická pevnost buněčné stěny je zajištěna zvýšením počtu vazeb mezi látkami již přítomnými i vkládáním látek syntetizovaných *de novo*. Aktivují se enzymy nezbytné pro syntézu základních stavebních kamenů ligninu (fenylalaninamoniak lyasa (PAL), chalkonsyntasa, chalkonizomerasa, guaiacol peroxidasa), nutné k polymeraci složek buněčné stěny. Zvyšuje se syntéza glykoproteinů bohatých na hydroxyprolin. Aktivuje se NADPH-oxidasa, lokalizovaná na vnější straně plazmatické membrány, která katalyzuje vznik $O_2^{\cdot-}$. $O_2^{\cdot-}$ je dále metabolizován na H_2O_2 , jež je mimo jiné potřebný v procesu lignifikace buněčné stěny a tvorby papily (Olson a Varner, 1993; Bolwell a Daudi, 2009). V místě průniku buněčné stěny se vytváří papily, které zabraňují pronikání patogenu dále do buňky. Papily jsou utvářeny v místě mezi plazmalemou a buněčnou stěnou zesíťovanými proteiny, kalózou (β -1,3 glukan)



a ligninem, což zabezpečí posílení mechanické odolnosti buněčné stěny v místě infekce (Lamb a Dixon, 1997; Walton, 1997; Bolwell a Daudi, 2009; Vellosillo a kol., 2010) (Obr. 14).

Obr. 14: Přesně regulovaná produkce ROS v různých organelách a typech buněk je rozhodující pro přežití rostliny. Ukládání kalózy a lipidová peroxidace jsou spuštěny následkem interakce rostlinných buněk s patogenem (Vellosillo a kol., 2010, upraveno).

Při virové infekci se kalóza ukládá v plazmodezmech, čímž zamezuje šíření virů mezi buňkami, ale i přenosu vody a

živin do infikovaných oblastí (Pavlová, 2005). Ze strukturálních proteinů, účastnících se reorganizace buněčné stěny, mají velký význam extensiny - hydroxyprolinové glykoproteiny.

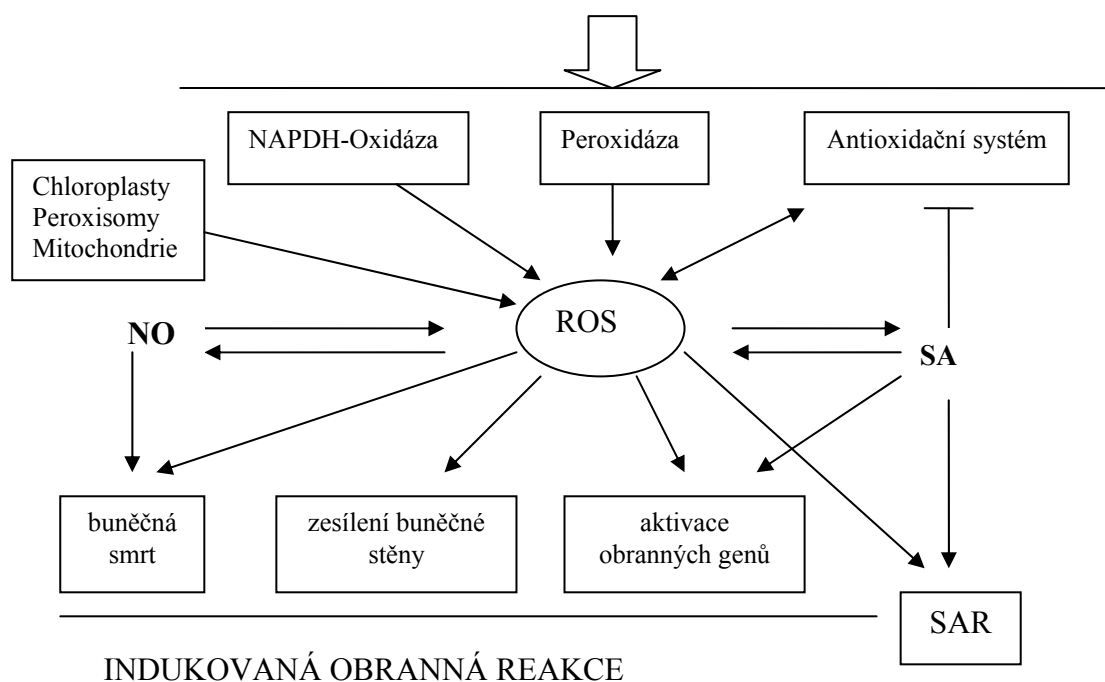
K jejich zesíťování dochází již několik minut po napadení patogenem v přítomnosti H_2O_2 a tyrosinu (Sedlářová a Lebeda 2002). Kutikula a vosky na povrchu listů a plodů vytvářejí hydrofobní povrch, který eliminuje vlhkost potřebnou pro vývoj fytopatogenních hub nebo šíření bakterií. Množství dostupné vody snižují i trichomy (Agrios, 1997).

Cytologické změny je možno pozorovat již v úvodních fázích kontaktu rostlinné buňky s patogenem. Jednou z prvních reakcí je přestavba cytoskeletu. Aktinový cytoskelet se podílí už na rozpoznání patogenu a je nepostradatelný pro expresi nehostitelské rezistence (Kobayashi a kol., 1997). Rychlá reorganizace cytoskeletu provází proces penetrace fytopatogenních hub, ovlivňuje vývoj patogenu v buňkách a určuje další průběh infekce; mikrotubuly se např. mohou podílet na přenosu virových proteinů mezi sousedními buňkami. V obranných procesech se cytoskelet účastní přesunu organel, přestavby membrán a fibril celulózy v buněčné stěně (Sedlářová a Lebeda, 2001b).

Přírozenou ochranu rostlině poskytují fytoncidy a inhibitory, které jsou pro patogeny toxické. V rostlině jsou přítomny stále nebo ve formě prekurzorů, kdy k syntéze aktivní látky dochází až při poškození buňky. Tyto přírodní metabolity bývají nejčastěji uloženy ve vakuolách povrchových vrstev buněk nebo v buňkách krycích pletiv. Chemicky se řadí mezi terpenoidy, fenolické látky, flavonoidy nebo alkaloidy (Grace, 2005).

4.1.2 OBRANA INDUKOVANÁ PATOGENEM

Po rozpoznání patogenu je informace o jeho přítomnosti přenášena v rámci rostliny přes plazmodesmy nebo cévními svazky prostřednictvím signálních molekul, metabolitů patogenu a/nebo napadených buněk (Sedlářová a Lebeda, 2002). Poté dojde k aktivaci obranných mechanismů, které podle rychlosti jejich nástupu můžeme rozdělit na děje rychlé a pomalé (Obr. 15). Rychlé děje jsou založené na aktivaci již existujících složek, dochází k syntéze ROS, změnám v propustnosti membrán, otevření iontových kanálů, depolarizaci membrán, syntéze NO a k aktivaci MAPKs. Rychlé děje probíhají ve velké míře pouze v infikovaných buňkách případně v buňkách k nim těsně přiléhajícím, kde mají za následek HR, která vede k nekróze rostlinného pletiva spojené s usmrcením patogenu.



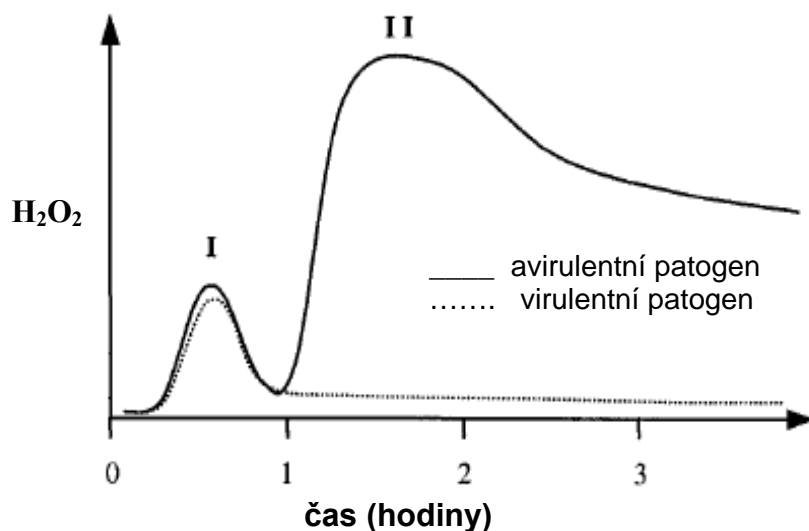
Obř.15: ROS zastávají stěžejní úlohu při aktivaci obranných mechanism, které jsou aktivovány po napadení patogeny (Torres a kol., 2006).

HR je rychlé programované odumřeni napadených buněk, zahájený na úrovni transkripce specifických genů, které vede k odumřeni napadených buněk, čímž patogen ztrácí zdroj výživy (Levine a kol., 1994; Baker a Orlandi, 1995; Mittler a kol., 1996; Bestwick a kol., 1997; Greenberg, 1997; Walton, 1997; Pontier a kol., 1998; Torres, 2010). Dochází k prudkému hromadění H_2O_2 a NO, jsou aktivované lipasy, roste hladina toxických polyfenolů (Delledonne a kol., 2001). Dále dochází v místě ataku k uvolnění obranných proteinů a toxických metabolitů, a také signálů, které aktivují obranné mechanismy sousedních i vzdálených buněk. HR představuje jeden ze čtyř typů programované buněčné smrti (PCD) (Torres, 2010). Jedná se o vysoce regulovaný proces, který zahrnuje: kondenzaci jádra a cytoplasmy; oddělení protoplastu od buněčné stěny; přerušení spojení sousedních buněk přes plasmodesmy; rozpad membránového systému buněk; aktivaci proteas a nukleas; aktivaci K^+/H^+ a Ca^{2+} transportu přes plazmatickou membránu; rozložení chloroplastů, degradaci proteinů a nukleových kyselin následkem prudké akumulace ROS a NO (např. Greenberg, 1996; Levine a kol., 1996; Montillet a kol., 2005; Ptáčková, 2006). Charakteristická je tmavě hnědá pigmentace odumřelé buňky, případně stěn protoplastu sousedních živých buněk, v důsledku tvorby melaninu (např. Sedlářová, 2009). Základním znakem HR je peroxidace membránových lipidů, při které dochází ke ztrátě integrity a funkčnosti jak plazmatické membrány, tak membrán jednotlivých organel. Lipidová

peroxidace je iniciována pomocí ROS nebo také činností lipoxygenas. Produkty lipidické peroxidace (např. malondialdehyd a těkavé uhlovodíky) mají antibakteriální vlastnosti i signalizační funkci (Rustérucci a kol., 1999; Jalloul a kol., 2002, Ptáčková, 2006). Při porušení membrán dochází k uvolnění kyseliny α -linolenové, z níž se následně syntetizuje JA (např. Conconi a kol., 1996; Vick a Zimmerman, 1984). Některé kmeny biotrofních hub produkují látky zvané supresory, které potlačují vznik a průběh HR (např. Greenberg, 1997; Pontier a kol., 1998; Hammond-Kosack a Jones, 2000; Pavlová, 2005). Uvedená strategie ochrany je založena na rozpoznání patogenu a na komunikaci buňky patogenu s buňkou hostitele v pletivu přilehlému k místu infekce (Thomma a kol., 2001). Funkce ROS při HR nejsou pouze destruktivní. H_2O_2 také funguje jako signální molekula, která ovlivňuje sekundární metabolismus.

Mezi pomalé děje patří změny v genové expresi, modifikace sekundárního a primárního metabolismu, zesílení buněčné stěny a syntéza látek produkovaných *de novo* tj. fytoalexinů, PR-proteinů, akumulace signálních molekul SA, JA, ET). Bylo zjištěno, že patogen může způsobit nemalé změny ve funkčnosti antioxidační sítě rostlinného hostitele, čímž dojde k narušení ROS homeostázy v buňce a také ke změnám v HR (Torres, 2010). Ovlivnění HR zprostředkovává vysoká hladina SA, která může omezit expresi klíčových antioxidačních enzymů a tím se zvyšuje produkce ROS v buňkách hostitele (Torres, 2010). Současně s HR je v odumírajících nebo sousedních buňkách zahájena tvorba fytoalexinů a fytoanticipinů. Fytoalexiny jsou specifické nízkomolekulární sloučeniny s antimikrobiálním účinkem, které jsou produkovány v místě infekce *de novo*, a jsou účinné i ve velmi nízkých koncentracích (10^{-6} až $10^{-5}M$) (Hammerschmidt, 1999; Walton, 1997; Dixon, 2001). Jejich charakter je převážně lipofilní, což jim umožňuje průchod membránami a vstup do buněk patogenu (Walton, 1997; Pavlová, 2005). Fytoanticipiny anebo jejich prekurzory bývají v rostlinném pletivu přítomné již před infekcí (Dixon, 2001). Stejná látka může sloužit v různých rostlinách jako fytoalexin i fytoanticipin. Příkladem je flavonoid sakuranetin, který se hojně vyskytuje v listech černého rybízu (fytoanticipin), ovšem v listech rýže je jeho tvorba indukována až po napadení fytopatogeny (fytoalexin) (Dixon, 2001). Mnohdy jsou v literárních zdrojích obě tyto látky s antimikrobiálním účinkem souhrnně označovány jako fytoalexiny (Sedlářová, 2009). Pomocí produktů pomalých reakcí rostlina zvyšuje odolnost vůči sekundárnímu ataku stejnými nebo i jinými patogeny. Pokud se tyto mechanismy rozšíří do celé rostliny tedy i do neinfikovaných buněk, nastává tzv. systémově získaná rezistence (SAR, *systemic acquired resistance*), která je však nespecifická a přechodná (Pavlová, 2005) (více v kapitole 4.3.).

Významný je i přímý antimikrobiální účinek ROS, nazvaný oxidační vzplanutí, které je jednou z prvních odpovědí buňky na kontakt s patogenem (Wu a kol., 1997; Chamnongpol a kol., 1998). Produkce ROS během interakce rostliny s patogenem probíhá ve dvou fázích (Obr. 16). První fáze tvorby H_2O_2 začíná 1-2min od počátku působení elicitoru s maximem kolem 10. min a označuje se jako nescifická odpověď a nastává jak u kompatibilní, tak nekompatibilní interakce rostlina-patogen (Kuźniak a Urbanek, 2000). Druhá, specifická fáze, typická markantní tvorbou a akumulací ROS, je nazývána oxidační vzplanutí (*oxidative burst*), nastává 1-3 hod od počátku působení patogenu a to pouze u interakce inkompatibilní, kde oxidační vzplanutí spouští HR (Levine a kol., 1994; Baker a Orlandi, 1995; Wojtaszek, 1997; Dat a kol., 2000; Torres, 2010). Při napadení patogeny se uplatňuje i NAPDH-dependentní oxidasa, jejímž působením vzniká superoxid. Ten je pomocí SOD dismutován na H_2O_2 , který indukuje akumulaci SA (Dat a kol., 2000). SA inhibuje CAT, což vede ke zvyšování hladiny H_2O_2 a dále až k aktivaci obranných genů a programované buněčné smrti (Dat a kol., 2000).



Obr. 16: Dvoufázová akumulace H_2O_2 během oxidačního vzplanutí u rostlin, která je typickou odpovědí rostliny na napadení avirulentním patogenem (nekompatibilní interakce). Jednofázová akumulace H_2O_2 je typická pro napadení rostliny virulentním patogenem (kompatibilní interakce). Fáze I je nescifická a vyskytuje se jako odpověď na mnohé stresové stimuly, jako je např. poranění. Fáze II koreluje s ustanovením rezistence proti patogenu. (Grant a Loake, 2000).

Reaktivní formy dusíku (RNS) a to zejména oxid dusnatý (NO) (více v kapitole 4.4) jsou tvořeny záhy po infekci a zřejmě působí synergisticky s ROS s tím, že se oba signály navzájem modulují. Synergistické působení NO a H_2O_2 vede k lokalizované buněčné smrti a omezuje invazi patogenu (Zaninotto a kol., 2006), přestože mechanismus interakce mezi NO a ROS není stále objasněn (Mur a kol., 2006; Wilson a kol., 2008). NO se váže na hem, který je funkční skupinou CAT a APX, inhibuje odbourávání H_2O_2 a tím může navodit smrt buňky. Pro indukci buněčné smrti vyvolané patogenem je nezbytná velice těsná rovnováha mezi NO

a H₂O₂ (Gloser, 1998; Agrios, 1997; Wojtaszek, 1997; Apel a Hirt, 2004; Pavlová, 2005; Chisholm a kol., 2006; Bolwell a Daudi, 2009; Torres, 2010).

4.1.3 BIOCHEMICKÁ REZISTENCE

Biochemická obrana spočívá v tvorbě látek, které jsou pro patogeny toxické a brzdí jejich vývoj. Odpověď rostliny začíná aktivací genů zodpovědných za syntézu obranných látek již několik minut po navázání kontaktu rostliny a patogenu (Sedlářová, 2009). Inhibitory působící přímo na patogen nebo látky interagující s iritanty vytvořenými patogenem bývají v rostlině přítomny buď již před infekcí, anebo se nově syntetizují až jako odpověď na infekci (Agrios, 1997).

Náchylnost či rezistence rostlin může být do jisté míry ovlivněna podmínkami převládajícími na povrchu rostlinných orgánů. Na semenech, kořenech a nadzemních částech rostlin se mohou vyskytovat látky působící na patogenní organismy stimulačně nebo inhibičně. Tyto exsudované látky jsou vylučovány na povrch rostliny sekundárními žlázkami nebo hydátodami, příp. difundují z vnitřních pletiv. Chemické složení těchto látek je velmi různorodé, jsou to sacharidy, organické kyseliny, proteiny, fenolické látky, enzymy, éterické oleje aj. (Lebeda a kol., 2001). Tyto látky ovlivňují fytopatogenní mikroorganismy několika způsoby: buď jsou pro mikroorganismy substrátem, anebo působí lyticky, inhibičně nebo toxicky přímo na patogeny, ale také mohou stimulovat klíčení dormantních struktur hub a jejich další vývoj (Kúdela, 1989).

Reakcí rostlin v průběhu patogeneze je produkce proteinů, označovaných jako PR-proteiny (proteiny indukované patogeny, *pathogenesis-related proteins*) (van Loon a van Strien, 1999; Edreva, 2005). Tyto proteiny zahrnují mimořádně početnou a různorodou skupinu, která je dále dělena na podskupiny podle velikosti a převažujících funkcí. Podle isoelektrických bodů dělíme PR-proteiny na kyselé a bazické. Kyselé PR-proteiny se vyskytují v mezibuněčném prostoru a bazické ve vakuolách. Kyselé PR-proteiny jsou syntetizovány jako odpověď rostliny na napadení mikroorganismy, kdežto bazické se vyskytují po napadení rostliny herbivorním hmyzem (Kitajima a Sato, 1998). Dělíme je do čtrnácti rodin tj. PR-1 až PR-14 (van Loon et van Strien, 1999) (Tab.1). Nejdříve byly pomocí molekulárních a molekulárně-genetických technik v rostlinách tabáku charakterizovány proteiny PR-1 až PR-5, jež jsou seřazeny podle klesající elektroforetické mobility (Edreva, 2005). Později bylo rozpoznáno a klasifikováno dalších 11 rodin (PR-6 až PR-16) a to nejen u

tabáku, ale i u rajčat, okurky (PR-8) a petržele (PR-10), u ředkviček byly rozpoznány PR-12, u *Arabidopsis* PR-13, u ječmene PR-14.

PR-proteiny mají některé společné fyzikální a chemické vlastnosti, např. jsou selektivně extrahovatelné při nízkém pH nebo vysoce odolné vůči proteolytickým enzymům. PR-proteiny deaktivují proteasy, rozkládají buněčné stěny patogenu a jeho proteiny, mohou inhibovat sporulaci patogenu, deaktivují ribozomy a omezují pronikání patogenu. Řada těchto proteinů vykazuje enzymové vlastnosti, např. chitinasy a glukanasy. Peroxidasy a lipoxygenasy se podílí na produkci lipidových peroxidů a sekundárních metabolitů s antimikrobiální aktivitou. Mechanismus účinku řady PR proteinů není doposud zcela objasněn (Benešová a kol., 2011).

PR-proteiny nehrají primární roli v rozpoznávacím procesu, ale mají neobyčejný význam v mechanismech indukované rezistence (Dangl a Jones, 2001; Berger a kol., 2007). Za normálních podmínek nejsou v rostlině přítomny, po kontaktu s patogenem dochází k jejich expresi. Syntéza PR-proteinů je indukována rostlinnými hormony: SA, cytokininy a auxiny. PR-proteiny nemusí být exprimovány pouze v místě infekce, ale i systémově ve spojitosti s rozvojem SAR proti následným houbovým, bakteriálním nebo virovým infekcím. Jiné skupiny PR-proteinů jsou nezbytné ke spuštění HR, či tvorbě signálních molekul nutných ke správnému fungování obranné reakce (syntéza JA a peroxidovaných lipidů) (Walton, 1997; van Loon a van Strien 1999). Maximální hladiny dosahují PR-proteiny přibližně po 48hod a zvýšená hladina přetrvává i několik měsíců po infekci, v tomto období je rostlina odolnější vůči případnému dalšímu patogennímu napadení (Edreva, 2005).

Tab. 1.: Rozpoznané a navržené rodiny PR-proteinů (van Loon a van Strien, 1999).

RODINA	DRUHOVÝ ZÁSTUPCE	VLASTNOSTI
PR-1	tabák PR-1a	neznámé
PR-2	tabák PR-2	β -1,3-glukanasa
PR-3	tabák P, Q	chitánasový typ I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	tabák "R"	chitánasový typ I, II
PR-5	tabák S	tabák S "thaumatin-like"
PR-6	rajčatový inhibitor I	proteinasový inhibitor
PR-7	rajče P69	endoproteinasa
PR-8	okurková chitinasa	chitinasový typ III
PR-9	tabáková lignin tvořící peroxidasa"	peroxidasa
PR-10	petržel "PR-1"	"10 ribonuclease-like"
PR-11	tabák třída V chitinasa	chitinasový typ I
PR-12	12 ředkev Rs-AFP3	defensin
PR-13	Arabidopsis THI2.1	thionin
PR-14	ječmen LTP4	proteinový přenašeč lipidů

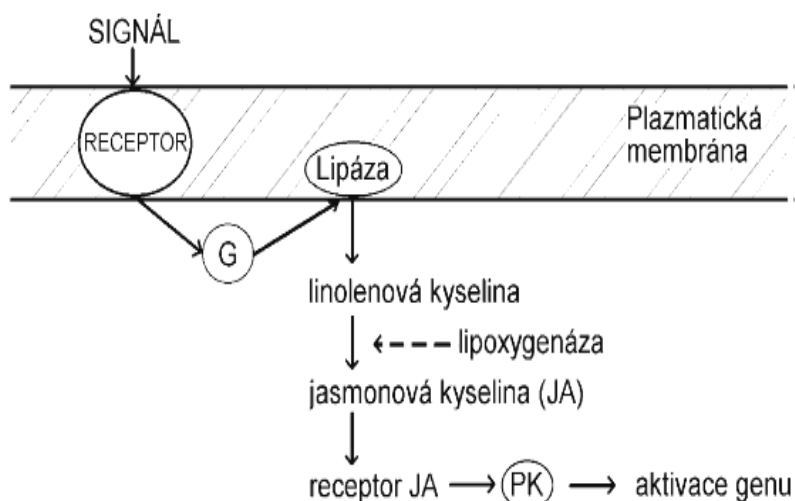
4.2 PŘENOS SIGNÁLU PŘI VZNIKU OBRANNÉ REAKCE

Rozpoznání patogenu je důležitým procesem následujícím ihned po kontaktu s rostlinou a může probíhat dvojnásobným způsobem. Prvním je rozpoznávání nízkomolekulárních látek produkovaných mikroorganismy (dříve elicitory), které jsou obecně označovány jako PAMPs nebo MAMPs (*pathogen- nebo microbe-associated molecular patterns*), odpovídajícími vysoce afinitními receptory PRRs (*pattern recognition receptors*) umístěnými na vnější straně plazmatické membrány (Bolwell a Daudi, 2009; Bari a Jones, 2009). Tento typ rozpoznání navozuje základní rezistenci v nehostitelských a hostitelských rostlinách a plní funkci primární bariéry k zastavení infekce patogenem (Berger a kol., 2007; López a kol., 2008). MAMP/PAMP může mít charakter proteinu, peptidu nebo sterolu. Jako MAMP/PAMP mohou sloužit jednak metabolity vylučované patogenem, ty jsou nazývány exogenními elicitory, patří sem polysacharidy, specifické enzymy a peptidy, ale i sloučeniny, které se uvolňují z narušovaných buněčných stěn patogenu (tj. stavební jednotky chitinu, oligoglukany, glykoproteiny buněčné stěny hub nebo flagelin uvolňovaný z bakteriálních patogenů) (Torres, 2010). Jako endogenní elicitory označujeme sloučeniny uvolněné z buněčných stěn rostliny tj. oligogalakturonany - látky, které vznikají při rozkladu pektinů stěny napadené rostlinné buňky působením enzymů produkovaných patogenem (Gloser, 1998; Pavlová, 2005; Bolwell a Daudi, 2009). U rostlinných virů bylo prokázáno, že jako elicitory působí proteiny tvořící jejich obal (CP, „coat protein“), replikasy i proteiny důležité pro šíření viru plasmodesmy (MP, „movement protein“). Elicitory zpravidla neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí specifických receptorů v plazmatické membráně a navazující sítě vnitrobuněčného přenosu signálu. Během spouštění obranné reakce rostlin byla pozorována signalizace pomocí zvýšené koncentrace Ca^{2+} s aktivací MAPK a CDPK (protein kinasy závislé na Ca^{2+}), ale také signalizace pomocí ROS (Romeis a kol., 2000; Romeis a kol., 2001; Jonak a kol., 2002). Elicitor se váže na receptorový protein rostlinné buňky, obvykle značený R (*resistence*), který dává rostlinné buňce schopnost patogen rozeznat. R proteiny jsou často lokalizovány na vnější straně plazmatické membrány, mohou se však nacházet i v cytoplazmě. Vytvoření komplexu R-proteinu s elicitem je signálem pro spuštění obranných reakcí. R protein je produktem genu *R* a rezistence rostliny je podmíněna přítomností jeho dominantní alely. Zatím známé R-proteiny mají množství opakujících se sekvencí bohatých na leucin nebo jinou hydrofobní aminokyselinu. Sekvence se označují LRR („leucine-rich repeats“). Obvykle se u R proteinů vyskytuje také oblast schopná vázat nukleotidy, označovaná jako

NBS („*nucleotide-binding site*“) (Jones, 2001). Navázání nukleotidu ATP nebo GTP je nutné pro přenos signálu, komplexy mohou, ale nemusí mít kinasovou aktivitu. Některé typy NBS-LRR R proteinů mají ještě strukturu leucinového zipu (LZ), což jim dává schopnost vázat další proteiny (Pavlová, 2005).

Druhý způsob rozpoznávání patogenu je vysvětlován teorií „gen-proti-genu“, při níž hlavní roli hrají specifické produkty avr-genů daného patogenu a působí pouze na ty rostliny, které vlastní receptorové proteiny kódované odpovídajícími geny rezistence (*R-genů*), lokalizované uvnitř hostitelské buňky (Bonas a Lahaye, 2002; Sedlářová, 2009). Zmíněné rasově specifické elicitory jsou sekretovány do mezibuněčného prostoru nebo jsou vpouštěny přímo do buněk přes sekreční systém (Peck, 2003). V tomto případě je rozpoznán patogen, který překonal základní rezistenci, tj. bariéru v podobě preformovaných obranných mechanismů (López a kol., 2008).

NADPH-oxidasou ukotvenou na vnějším povrchu plazmatické membrány je produkován O_2^- , který je následně dismutován na H_2O_2 pomocí SOD. H_2O_2 je schopen plazmalemu překonat a vstoupit do protoplastu, kde aktivuje detoxifikační enzymy a reaguje s 2-hydroxylasou kyseliny benzoové (BA2-H) za vzniku SA, jejíž funkce je signální a regulační (León a kol., 1995; Hammond-Kosack a Jones, 2000). Kromě možného přímého účinku H_2O_2 na expresi genů existuje ještě nepřímá cesta, při které nejprve peroxidací lipidů v membránách vzniká JA spolu s methyljasmonátem a ty pak následně ovlivňují transkripci (Obr. 17).



Obr.17: Schéma přenosu signálu pomocí jasmonové kyseliny, která se tvoří z linolenové kyseliny (dehydrací a β -oxidací) za účasti enzymu lipoxygenasy. Linolenová kyselina je uvolňována membránově vázanou lipasou po její aktivaci signálem přeneseným z receptoru. Tato cesta, běžná při poranění listu herbivory i některými patogeny, vede zejména k tvorbě inhibitorů proteas, které působí herbivorům poruchy trávení. (G, G-protein, PK, proteinkinasa) (Gloser, 1998).

4.3 HORMONY A JINÉ SIGNÁLNÍ MOLEKULY

Fytohormony jsou obecně se vyskytující organické nízkomolekulární látky, s funkcí endogenních signálních látek. Tyto přirozené metabolity jsou v rostlinách přítomny ve velmi nízkých koncentracích (10^{-6} až 10^{-9} M) a slouží k přenosu informací mezi pletivou a orgány v rostlině. Jsou transportované na krátké vzdálenosti především buněčným transportem, na dlouhé vzdálenosti vodivými pletivou. Mezi fytohormony a látky s fytohormonálním charakterem řadíme: auxiny, cytokininy, gibereliny, ABA, ET, JA, SA, brassinosteroidy, polyaminy, strigolaktony a peptidové hormony. Efekt fytohormonů je dále dán schopnostmi buňky signál rozeznat a reagovat na něj. Signál je rozeznáván specifickými receptory, jejichž množství určuje citlivost buňky k signálu. Síla signálu fytohormonu odpovídá jeho koncentraci. Hladina fytohormonu je řízena na mnoha úrovních – především intenzitou jeho biosyntézy a degradace v místě jeho vzniku, rychlostí transportu do místa odpovědi a intenzitou odbourávání nebo reverzibilní inaktivace v místě působení (Pavlová, 2005).

Je nezbytné uvést, že aktivace signálních drah silně závisí na životní strategii patogenu a průběhu infekčního procesu (López a kol., 2008; Bari a Jones, 2009). JA-ET a SA signální dráhy se mohou vzájemně ovlivňovat jak synergisticky, tak inhibičně (např. Rojo a kol., 2003; Loake, Grant, 2007; Bari a Jones, 2009). Aktivace dráhy JA/ET nastává při napadení nekrotrofními patogeny anebo jako odpověď na poranění rostliny (např. Smith a kol., 2009; Garcia-Brugger a kol., 2006; Kessler a Baldwin, 2002). Při interakci rostliny s nekrotrofním patogenem je důležitá role ABA, která jednak zvyšuje rezistenci rostliny prostřednictvím interakce s JA anebo může zvyšovat náchylnost k patogenu potlačením tvorby JA. Je pravděpodobné, že i sám nekrotrofní patogen interaguje s produkty ABA ke zvýšení náchylnosti rostliny (např. López a kol., 2008; Sedlářová, 2009). Naopak rezistence rostlin vůči biotrofům vyžaduje nejen aktivaci obranných odpovědí závislých na SA, ale také potlačení signálních drah auxinů a ABA, vedoucích ke snížení dostupnosti živin a vody pro patogen (Glazebrook, 2005). Dráha SA kromě zahájení HR, zprostředkovává produkci fytoalexinů a proteinů souvisejících s patogenezí (PR-proteinů), což následně vede ke spuštění systémově získané rezistence (SAR) proti širokému spektru patogenů (např. Ryals a kol., 1994; Durrant a Dong, 2004; Loake a Grant, 2007). Patogenem aktivované auxinové a ABA signální cesty postačují k produkci antimikrobiálních látek závislých na SA signalizaci.

Kromě lokální odpovědi v místě kontaktu rostlinné buňky a patogenu existují i systémové reakce, kdy dochází k aktivaci obranných mechanismů i v nezasazených částech

rostliny. Rozlišujeme tři typy rezistence: systémově získanou rezistenci (SAR), systémově indukovanou rezistenci (SIR) a indukovanou systémovou rezistenci (ISR).

HR aktivuje SAR, při níž se akumulují SA a PR-proteiny a navozuje dlouhodobou odolnost vůči široké škále patogenů. Signálem, který je při SAR transportován floémem je SA, methylsalicylát a kyselina gentisová. SAR je spojena s produkcí kyselých PR-proteinů. SIR bývá navozena mechanickým poškozením, herbivory a nekrotrofními parogeny. SIR je vyvolaná signálními drahami, které jsou spojeny s JA/ET. Signalizace se děje prostřednictvím methyl jasmonátu, změn elektrického potenciálu a je doprovázena akumulací bazických PR-proteinů (*např. Sedlářová, 2009*). Nepatogenní bakterie rizosféry rostlin, působí přechodnou aktivaci obranných mechanismů tj. ISR. ISR je spojena s přechodným zvýšením hladiny ET a JA, nezměněna však zůstává hladina SA a PR-proteinů (*Robert-Seilaniantz a kol., 2007*).

Bylo prokázáno, že odezva rostlin na infekci patogenem je spojena také se změnami hladin auxinů, brasinosteroidů, cytokininů, giberelinů a ABA. Fytopatogenní mikroorganismy zasahují do metabolismu hormonů rostlin nepřímo, ovlivněním jejich endogenních hladin anebo jsou samy producenty hormonů nebo jejich analogů (*Robert-Seilaniantz a kol., 2007; Bari a Jones, 2009; Sedlářová, 2009*). Narušení rovnováhy auxinů a cytokininů po napadení patogeny vyvolává histopatologické změny tj. hypertrofie (růst pletiva vlivem zvětšování objemu jednotlivých buněk) a hyperplazie (růst pletiva masivní dělením buněk) (*Šutić a Sinclair, 1991*). Pro průběh obranných mechanismů je významná i kombinace metabolických signálů s fytohormony, které se podílejí na senescenci tj. ABA, ET a cytokininy (*např. Sedlářová, 2009*).

Důležitými signálními molekulami jsou i sacharidy, jež regulují expresi fotosyntetických genů (*Wingler a Roitsch, 2008*). Během patogeneze dochází k nárůstu aktivity enzymů štěpících cukry tj. invertasy vázané na buněčnou stěnu a fruktohyrolasy v apoplastu, čímž se radikálně zvýší poměr glukóza+fruktóza/sacharóza (*Berger a kol., 2007*). Změny v hladinách sacharidů ovlivňují buněčnou aktivitu od transkripce přes translaci až po stabilitu či aktivitu proteinů a mají vliv na zpětnovazebnou inhibici rychlosti fotosyntézy (*např. Wingler a Roitsch, 2008; Sedlářová, 2009*).

V poslední době se usuzuje, že kalóza a zejména pak produkty jejího štěpení, jsou dalšími možnými signálními molekulami (*např. Sedlářová a Lebeda, 2002; Panstruga, 2003; Sedlářová, 2009*).

Důležitou signální úlohu v rostlinném organismu, v závislosti na koncentraci, zastává H₂O₂. Při nízkých koncentracích působí H₂O₂ jako signální molekula při spouštění aklimatizační tolerance na různé abiotické a biotické stresy (*např. Laloi a kol., 2004; Mittler a*

kol., 2004), nicméně jeho nadměrná akumulace může vést k oxidačnímu stresu, který spouští buněčnou smrt (*Dat a kol.*, 2000; *Neill a kol.*, 2002a). Rovnovážený stav hladiny buněčného H₂O₂ závisí na redoxním stavu buňky (*Mateo a kol.*, 2006). V rostlinných buňkách je proces produkce a odstranění H₂O₂ přísně regulován a koordinován pomocí vícestupňového antioxidačního systému (*Apel a Hirt*, 2004). Většina studií dokazuje, že samotný H₂O₂ je u rostlin klíčovou signální molekulou zprostředkovávající řadu reakcí (*Desikan a kol.*, 2003) a aktivující mnoho dalších důležitých signálních molekul, jako je Ca²⁺, SA, ABA, JA, ET, NO (*např. Neill a kol.*, 2002b; *Desikan a kol.*, 2004; *Wendehenne a kol.*, 2004).

Účinnou signální molekulou, která je v posledních letech v popředí zájmu fytopatologů je oxid dusnatý (*více kapitola 4.4*).

4.4 OXID DUSNATÝ

Reaktivní formy dusíku (RNS, *reactive nitrogen species*) můžeme rozdělit do dvou skupin. Na skupinu volných radikálů, kam řadíme (oxid dusnatý (NO) a oxid dusičitý (NO₂)) a skupinu látek, do které patří kyselina dusitá (HNO₂), oxid dusitý (N₂O₃), peroxydusitan (ONOO⁻). Nejznámější a nejvíce studovanou formou RNS je NO.

Hydrofóbní povaha a malé rozměry molekuly NO usnadňují její pohyb a případné lokální zvýšení koncentrace v prostředí buněčných membrán, což následně podporuje reaktivitu NO s lipofilními látkami, jako jsou radikálové meziprodukty peroxidace lipidů (*např. Piterková a kol.*, 2008). Nejdříve byl NO popsán jako velmi důležitá molekula v živočišných buňkách. V rostlinných buňkách byl popsán při různých stresových podmínkách antioxidační a ochranný vliv NO snižující míru lipidové peroxidace (*např. Piterková a kol.*, 2008). NO má funkci vnitrobuněčného a mezibuněčného posla nejen během patogeneze, ale i v mnoha dalších fyziologických procesech u rostlin tj. při regulaci otevírání průduchů, kvetení, opylení, klíčení, ukončení dormance semen (*Delledonne a kol.*, 1998; *De Gara a kol.*, 2003; *Romero-Puertas a kol.*, 2004; *Piterková a kol.*, 2008; *Šírová a kol.*, 2011). Bylo prokázáno, že NO působí synergisticky s ROS v iniciaci a propagaci HR v místě infekce (*Delledonne a kol.*, 1998; *Delledonne a kol.*, 2001; *Zaninotto a kol.*, 2006; *Mur a kol.*, 2006). Byla popsána účast NO na expresi genů kódujících proteiny se vztahem k obranným reakcím (PR-proteiny), metabolismu, buněčné detoxifikaci, transportu, homeostáze železa, signalizaci, kvetení a biosyntéze ligninu (*Delledonne*, 2005).

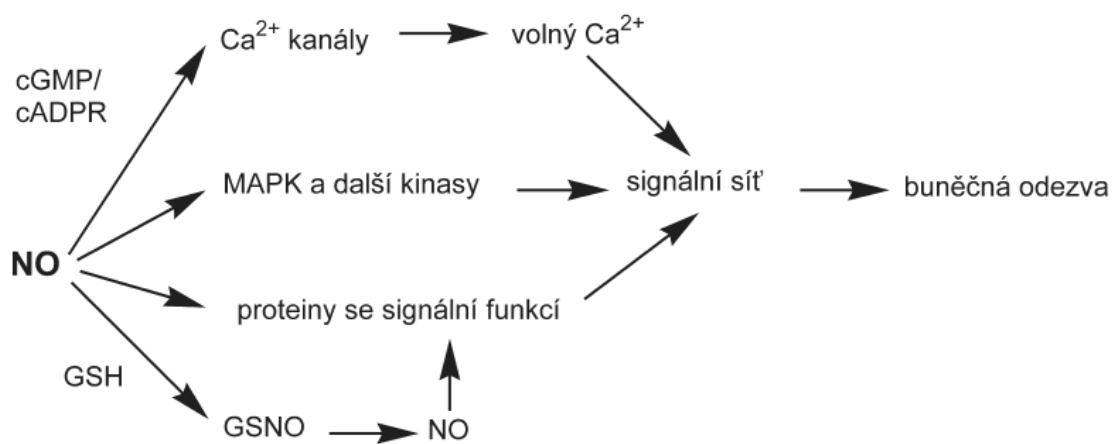
NO reaguje jak přímo s kovovými komplexy a dalšími radikály, tak nepřímo s DNA, proteiny, a lipidy (*Wink a Mitchell*, 1998). Mimo jiné bylo navrženo, že NO funguje jako

signální molekula aktivující obranný antioxidační systém v obraně rostlin vůči oxidativnímu stresu vyvolanému teplotním stresem (např. Song a kol., 2006). NO reguluje tvorbu ET a může měnit strukturu Chlps. Pokud je koncentrace NO vyšší než 10 μM dochází ke změně vizkozity thylakoidů, poškození ETR a je inhibováno dýchání. Nicméně NO může sloužit i jako faktor oddalující senescenci (např. Leshem a kol., 1998). NO je schopen nitrosylovat thiolové skupiny cysteinů a tak reverzibilně regulovat strukturu proteinů a enzymovou aktivitu. Dle současných poznatků je nitrosylace cysteinů považována za jednu z nejvýznamnějších posttranslačních modifikací proteinů v rostlinných buňkách, která navíc hraje stěžejní úlohu v obranných reakcích rostlin při napadení patogeny (např. Lindermayr a kol., 2005). Je známo, že NO se může vázat na hem, čímž může inhibovat enzymy s hemovou podstatou tj. CAT a APX, jež mají nezastupitelnou roli v odklízení H_2O_2 (Hammond-Kosack a Jones, 2000).

Samotná produkce NO u rostlin buněčnou smrt nenavozuje. Smrt hostitelských rostlinných buněk během HR je způsobena současnou produkcí NO a ROS, nicméně přesný molekulární mechanismus této souhry NO a ROS během HR nebyl doposud objasněn (Delledonne a kol., 2001). U rostlin součinnost NO s H_2O_2 způsobuje uvolnění cytochromu C z mitochondrií a během HR je to indukce kaspázové signální kaskády (Mur a kol., 2006). NO a H_2O_2 mohou mezi sebou chemicky reagovat za vzniku $^1\text{O}_2$ nebo OH^\cdot , které pak mohou navozovat buněčnou smrt. Úlohu NO v interakci rostlina-patogen během počáteční fáze infekce se zaměřením na možnou úlohu NO v systémové reakci u modelového systému *Solanum* spp. - *O. neolyopersici* studovali Piterková a kol. (2009). Specifický dvoufázový nárůst produkce NO stanovený pomocí oxyhemoglobinové metody byl pozorován v extraktech infikovaných listů středně a vysoce rezistentních genotypů rajčete. Dále byla detekována systematická odezva ve formě narůstající produkce NO v intaktních listech sousedících s listy inokulovanými. Na základě získaných výsledků autoři předpokládají zapojení NO v obranné reakci studovaných genotypů *Solanum* spp. vůči infekci patogenem *O. neolyopersici*, probíhající s různou intenzitou a mechanismem v závislosti na stupni odolnosti jednotlivých genotypů.

Signální reakce NO zahrnují syntézu sekundárních přenašečů, jako jsou cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a cyklická adenosindifosfát ribóza (cADPR), které vedou ke změnám hladiny cytosolického Ca^{2+} . Signální funkce NO jsou také zprostředkovány kovalentními modifikacemi proteinů jako nitrosylace cysteinů a nitrace tyrosinů a fosforylace prostřednictvím MAPK (Garcia-Brugger a kol., 2006) (Obr. 18). cADPR má velmi zásadní vliv na uvolnění Ca^{2+} z vakuoly do cytosolu. Ve studii na rostlinách tabáku infikovaných

virem tabákové mozaiky (TMV) prokázali *Durner a kol.*, (1998), že aktivace obranných genů je vyvolána zvýšenou syntézou NO v rostlinné buňce a tento mechanismus je zprostředkován cADPR-závislým zvýšením koncentrace Ca^{2+} . Další významnou signální dráhou NO v rostlinných buňkách je aktivace kaskády MAPK. Aktivace MAPK vede k reverzibilní fosforylaci enzymů regulující jejich aktivitu. Externí aplikace NO stimuluje MAPK aktivity v listech tabáku a *A.thaliana* (*Capone a kol.*, 2004). Je známo, že stejné MAPK mohou být u tabáku aktivovány také dalšími chemickými signály jako SA nebo H_2O_2 (*Piterková a kol.*, 2008).



Obr. 18: Schématické znázornění signálních drah NO v rostlinných buňkách; primární cíle NO zahrnují mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK) a Ca^{2+} kanály regulované prostřednictvím změn hladin cGMP (cyklického gyanosinmonofosfátu) a cADPR (cyklické andenosindifosfát ribosy). NO moduluje aktivitu proteinů nitrosylací thiolových skupin. Stabilní metabolit S-nitrosoglutathion (GSNO) může sloužit jako přena.eč signálu NO pro jeho uvolnění a interakce ve vzdálených cílech. (*Piterková a kol.*, 2008).

U rostlin bylo dokázáno, že NO společně s dalšími RNS a ROS zprostředkovává buněčné účinky hormonů na molekulární úrovni. Příkladem může být NO produkovaný enzymaticky, zprostředkovávající uzavření stomat vyvolané aplikací ABA (*Desikan a kol.*, 2002). Podstatou tohoto jevu je regulace iontových kanálů svěřacích buněk vlivem NO prostřednictvím změn intracelulární koncentrace Ca^{2+} (např. *García-Mata a kol.*, 2003). NO signální dráhy jsou dále propojeny s drahami SA, JA, ET během odpovědi rostliny na vnější faktory a podílí se i na regulaci biosyntézy kyseliny giberelinové. NO produkovaný v rostlinných buňkách během patogeneze může mít tyto hlavní úlohy, které souvisí s H_2O_2 : NO může působit jako antioxidant, kdy odklízí přebytečný H_2O_2 , dále má schopnost ukončovat peroxidaci lipidů a inhibovat signální dráhu H_2O_2 , která vede k buněčné smrti; NO

spolupůsobí s H₂O₂ při indukci SAR (např. Hammond-Kosack a Jones, 2000; Urszula a Rozalska 2005).

4.5 PROTEINY TEPLOTNÍHO ŠOKU

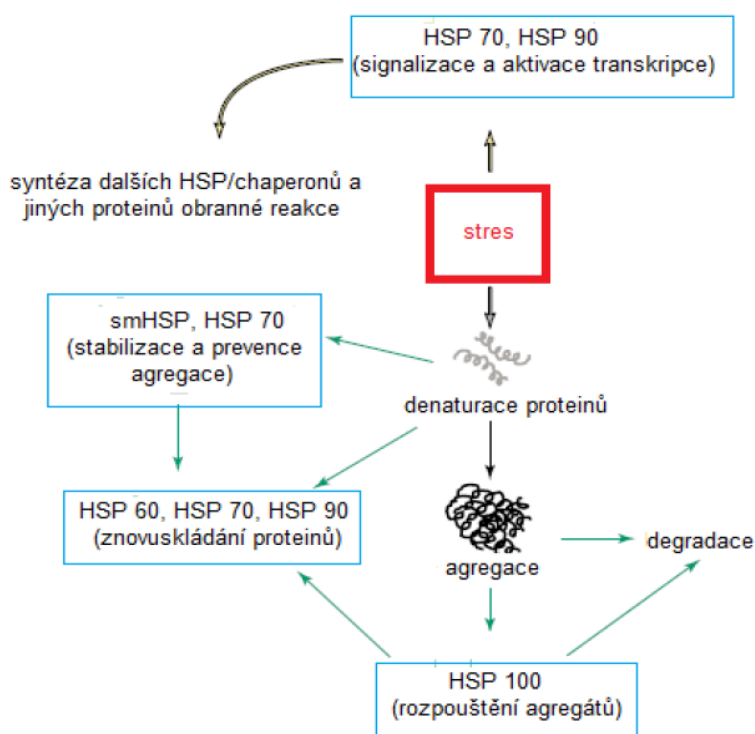
Označení proteiny teplotního šoku (HSP, *heat shock proteins*) je spíše historické a souvisí s jejich objevem právě během teplotního stresu v roce 1962 (např. Horáková, 2012). U vyšších rostlin je zvýšená produkce HSP vyvolána teplotami kolem 38 - 40 °C (Iba, 2002). Ovšem většina HSP je v živých organismech přítomna konstitutivně. Zvýšenou produkci HSP indukují různé stresové podmínky (vysoké teploty, těžké kovy, sucho, chlad, detergenty) nebo biotický stres (virová infekce) (Boston a kol., 1996; Waters a kol., 1996; Sikorová, 2010; Chen a kol., 2008) HSP jsou označovány jako molekulární chaperony, které jsou důležité pro správné posttranslační složení proteinů a stimulaci opravných mechanismů. HSP působí v regulaci membránové fluidity a homeostáze proteinů a v ochraně před buněčnou smrtí (Parsell a Lindquist, 1993). HSP se vyskytují ve všech organismech, mají rozličné funkce a jsou na základě své molekulové hmotnosti rozděleny do pěti základních rodin: smHSP, HSP60, HSP70, HSP90 a HSP100 (Tab.2) (Kregel, 2002; Wang a kol., 2004).

Tab.2: Rozdělení HSP na základě jejich molekulové hmotnosti, lokalizace a funkce u rostlin (Wang a kol., 2004; upraveno Chlps-chloroplasty; Mit-mitochondrie; ER-endoplazmatické retikulum).

HSP rodina	buněčná lokalizace	funkce
smHSP	cytosol, Chlps, Mit, membrány	stabilizace narušených proteinů
HSP60	Mit, Chlps, cytosol	prevence agregace denaturovaných proteinů, znovuskládání proteinů
HSP70	Chlps, Mit	prevence agregace proteinů, signalizace, import a translokace proteinů, aktivace transkripce
HSP70 - Hsc70	cytosol	molekulární chaperony
HSP70- Hsp91	cytosol	molekulární chaperony
HSP70-Bip	ER	molekulární chaperony
HSP90	cytosol, ER, Chlps, Mit	signalizace, translokace proteinů
HSP100	cytosol	rozkládání proteinových agregátů

HSP jsou zapojeny v importu proteinů a usnadňují proteolytickou degradaci nestabilních proteinů jejich nasměrováním do lysosomů nebo proteasomů (Mayer a Bukau, 2005; Wang a kol., 2004). Různé rodiny HSP spolupracují při ochraně buněčných proteinů

proti stresu udržováním proteinu v jejich funkční konformaci a odstraněním nefunkčních, ale potenciálně škodlivých polypeptidů (Wang a kol., 2004; Horáková, 2012) (Obr. 19). *In vivo* bylo prokázáno, že se smHSP váží na poškozené proteiny, brání jejich agregaci a tím zajistí snadný přístup HSP70 a HSP100 pro následné znovusložení proteinů do správné konformace (Sun a kol., 2002). HSP100 hraje důležitou roli při rozpouštění proteinových agregátů. Rozpuštěné proteiny jsou pak následně skládány do správné konformace díky HSP70 a HSP60 (Wang a kol., 2004).



Obr. 19: Vzájemná spolupráce různých rodin HSP při stresu rostlin. HSP jednak stabilizují konformaci proteinů, brání agregaci proteinů a podílejí se na znovuskládání proteinů. Poškozené agregující proteiny jsou rozpouštěny za účasti HSP100 a následně skládány do funkční konformace nebo jsou degradovány proteasou. Některé HSP doprovázejí transdukcí signálu, dochází k aktivaci transkripce a syntéze dalších HSP a jiných proteinů obranné reakce (Horáková, 2012-převzato).

Akumulace HSP70 je průvodním znakem virové infekce rostlin, nicméně vliv akumulace HSP70 na virovou infekci zůstává neobjasněn (Aranda a kol., 1996; Chen a kol., 2008). Je známo, že replikace viru uvnitř organismu hostitele způsobuje zastavení exprese mnoha genů hostitele (Wang a Maule, 1995), což může být spojeno s konkurenční indukcí genů *Hsp70* a polyubiquitinu (Aranda a kol., 1996). Ve studii Chen a kol. (2008) bylo zjištěno, že čtyři různé RNA viry – virus tabákové mozaiky (TMV), virus bramboru X (PVX), virus mozaikovitosti okurky (CMV) a virus mozaikovitosti melounu (WMV) indukují expresi šesti genů *Hsp70*. Chen a kol. (2008) dospěli k závěru, že díky akumulaci HSP70 v cytoplazmě dochází k nárůstu projevů virové infekce u rostlin. U *Closterovirů* (např. *BYV*, *Beet yellow virus*) u nichž nebyl identifikovaný žádný speciální protein sloužící k pohybu viru (MP, *movement protein*), se uvažuje že tuto funkci pohybu viru mezi buňkami přebírá

HSP70h (Peremyslov a kol., 1999). Navíc se ukázalo, že HSP70h má funkci při systémovém šíření viru (Prokhnovsky a kol., 2002). Některé studie poukazují na to, že členové rodiny HSP70 mohou hrát různé role při replikacích rostlinných RNA virů, tj. při skládání virových proteinů a virionu i expresi proteinů (Chen a kol., 2008). HSP70 a HSP90 hrají také významnou roli při přenosu signálů během HR (např. Kanzaki a kol., 2003).

5. VIROVÉ INFEKCE ROSTLIN

Viry jsou obligátní vnitrobuněční parazité, jež pro svou replikaci využívají pouze intracelulární prostředí, v němž je jejich množení závislé na systémech hostitele dodávajících energii. Částice viru je tvořena jedním typem nukleové kyseliny, která je obalena proteinovou složkou (kapsidou). Je známo přes 40 rodin RNA a DNA rostlinných virů, ovšem většinu z nich řadíme mezi jednovláknové (ss) RNA viry (Hammond-Kosack a Jones, 2000). Většina rostlinných virů nemá lipoproteinový obal a nejsou schopny aktivního průniku do buňky. Do rostlinné buňky viry pronikají až po mechanickém narušení buněčné stěny tj. oděrkami nebo hmyzím přenašečem. Dále mohou být viry přenášeny vegetativním množením (viry bramboru, viry ovocných stromků), generativním množením (semeny-virus tabákové mozaiky). Viry vstupující do buňky významným způsobem mění její metabolické procesy - hned po infekci je blokována syntéza DNA, RNA a bílkovin rostlinné buňky a veškerý enzymatický aparát se připravuje na syntézu virů.

Dle interakce virus-vektor dělíme přenos viru na perzistentní, neperzistentní a semiperzistentní. K perzistentnímu přenosu je potřeba dlouhé sání z infikované rostliny. Virus postupuje do trávicího traktu, hemolymfy a slin, jimiž je při sání infikovaná další rostlina. Po prodělání inkubace se hmyz stává infekčním do konce svého života. Neperzistentní přenos je takový, kdy je virus přenášen pouze z povrchu bodavě sacího ústrojí (stiletů), k čemuž stačí i krátké akvizitní sání z infikované rostliny (v řádu vteřin), ovšem hmyzí vektor zůstává infekčním pouze několik hodin. Pro semiperzistentní přenos je potřeba delší sání z infikované rostliny a doba infekčnosti vektoru je delší, maximálně však do jeho svlékání. Ve vztahu virus-vektor dochází k perzistentnímu přenosu např. u viru výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV) přenášeného mšicemi. Neperzistentní přenos je popsán u potyvírů přenášených mšicí broskvoňovou a semiperzistentní přenos u viru žloutenky řepy (*Beet yellows virus, BYV*) přenašeneho mšicemi.

Ve světovém měřítku způsobují viry asi 15% všech ztrát způsobených patogeny a patří hned po mykózách k ekonomicky nejzávažnějším chorobám rostlin (Arias a kol., 2003). U

některých plodin dokonce předčí mykózy svou zákeřností a výší způsobených škod tj. virózy bramboru, šarka u peckovin, rizománie cukrové řepy (*Kazda a kol., 2003*). V podmínkách střední Evropy jsou viry původci asi 10% všech ekonomicky významných chorob a působí přibližně 30% všech ztrát. Vážné důsledky viróz postihují zvláště vegetativně rozmnožované a vytrvalé rostliny (*Čača a kol., 1981*).

Během napadení rostliny viry, stejně jako i dalšími biotrofními patogeny, dochází ke změnám v metabolismu, které jsou velmi energeticky náročné (*Essmann a kol., 2008*). Biotrofní patogen představuje pro hostitelskou rostlinu další spotřebu energie a asimilátů, jež využívá pro svůj růst a vývoj. Další spotřeba energie je spojena se snahou rostliny spustit obranné reakce. Dochází ke změnám v tvorbě asimilátů, jejich transportu a distribuci. Z výše uvedených důvodů hraje při napadení rostlin viry velmi důležitou roli fotosyntéza.

Proti virům nelze přímo bojovat prostředky na ochranu rostlin. Nápravu nepřinese ani odstranění napadených částí rostlin, protože viry se rychle šíří po celé rostlině. Rostliny napadené viry by se měly zpravidla zcela zlikvidovat. Nepřímou metodou v boji proti virózám je hubení hmyzích přenašečů virů aplikací insekticidů. Tato nepřímá metoda je však účinná jen proti perzistentnímu druhu přenosu virů. Nejúčinnějším řešením ochrany rostlin proti virózám je vyšlechtění a pěstování rezistentních odrůd (*Dostálová a kol., 2008*).

5.1 PŘÍZNAKY VIRÓZ

Virové choroby se projevují celou řadou příznaků. Nejběžnější jsou různé formy mozaiky, pestrokvětosti, žloutnutí, chloróz, deformací orgánů a nekróz (*Kazda a kol., 2003*). Habitus virózní rostliny může být změněn zpomalením růstu, projeví se vadnutí, snížení výnosu, zhoršení kvality sklizené produkce. Mimo uvedené, virózy zvyšují dispozice rostlin k napadení kořenovými chorobami, zvyšují výskyt škůdců (třásněnek), způsobují pokles nebo ztrátu rezistence proti fusariozám (*Kúdela a kol., 1989*).

K histologickým příznakům kromě hyperplazií (masivní dělení buněk neboli proliferace) patří u mozaik neúplná diferenciacie mezofylu či nestejný růst povrchu listů, kde se buňky v tmavě zelených částech listu vyvíjejí zcela normálně na rozdíl od žlutých ploch listu, které obsahují buňky menší velikosti. Množením a růstem buněk ze zelených částí listu dochází k puchýřkovitosti, pokroucení a vzniku konkávního nebo konvexního tvaru listu. Další abnormalitou způsobenou viry jsou enace (výrůstky z adaxiální nebo abaxiální strany listu, obvykle spojené s nervaturou rostliny) nebo nádory na listech, stoncích a plodech (*Kúdela a kol., 1989; Bos, 1999*).

V průběhu virové infekce dochází často v rostlinné buňce k tvorbě intracelulárních inkluzí, které většinou představují aglomerace virionů, napojených na složky buňky. Morfologie a umístění inkluzí závisí na virové infekci. Většina virů tvoří jen intracytoplasmatické inkluze. Některé viry - *Potyviridae* vytvářejí krystalické inkluze v jádře. Virus žloutenky řepy (*Beet yellows virus, BYV*) způsobuje tvorbu krystalických inkluzí v chloroplastech.

V chloroplastech infikovaných listů dochází i k cytologickým změnám (*Zechmann a kol., 2003; Radwan a kol., 2008*). Velmi často je důsledkem viróz snížení počtu chloroplastů v mezofylu, kdy u viru mozaiky tuřinu neboli viru nekrotické kroužkovitosti zelí (*Turnip mosaic virus, TuMV*) dochází k postupné strukturální a biochemické degeneraci chloroplastů. Zdá se, že závažnost chlorotických symptomů přímo koreluje s přítomností virových protenu uvnitř plastidů (*Reinero a Beachy, 1989*). Virové částice v hostitelské buňce způsobují vznik váčků podél vnitřní membrány chloroplastů, kde dochází k syntéze virové RNA (*Matthews, 1991*). Chloroplasty z listů *Eupatorium makinoi* infikovaných *Eupatorium yellow vein virus (EpYVV)* obsahovaly menší počet thylakoidů ve srovnání s chloroplasty z listů zdravých (*Funayama-Noguchi a Terashima, 2006*). *Radwan a kol., (2008)* pozorovali u rostlin u bobu infikovaných virem žluté mozaiky fazolu (*bean yellow mosaic virus, BYMV*) ztrátu běžného vnitřního uspořádání chloroplastů, které měly sférický tvar s částečně nebo úplně poškozenými chloroplastovými membránami. Poškození chloroplastů se projevuje chlorózou listů, kdy se na listech mozaikovitě střídají světle zelená až žlutá místa s oblastmi tmavě zelenými. Ukázalo se, že tato tmavě zelená místa, obsahují velmi málo virových částic a chloroplasty jsou zde téměř nepoškozeny (*Moore a kol., 2001*). Těmto oblastem, jež obsahují vysoké koncentrace chlorofylu, se říká tmavě zelené ostrůvky (*dark green islands*). U rostlin tabáku infikovaných virem mozaiky okurky (*Cucumber mosaic virus, CMV*) bylo potvrzeno, že ve žlutých oblastech na listu je vyšší respirace a naopak nižší fotosyntetická kapacita v porovnání s tmavě zelenými ostrůvky (*Shang a kol., 2010*).

Při virové infekci rostliny je někdy pozorovatelné nepřirozené tloušťnutí buněčné stěny, způsobené ukládáním kalózy (*Bos, 1999*). Depozice kalózy nastává i během HR v plasmodesmech, čímž dochází k blokaci těchto „spojovacích kanálů“ mezi buňkami, čímž dojde k zabránění šíření virových částic. Bylo doloženo, že TGB2 protein, který je součástí viru bramboru X (*Potato virus X, PVX*) je schopen interagovat s enzymem, který rozkládá kalózu tj. β -1,3 glukanasou a zvyšovat jeho aktivitu. Následně dojde k rozkladu kalózy a tím je obnoven pohyb virových částic mezi buňkami (*Fridborg a kol., 2003*).

U většiny infekcí je v buňce abnormální počet a velikost škrobových zrn ve srovnání se zdravou rostlinou např. u infekce způsobené virem svinutky bramboru (*potato leaf-roll virus, PLRV*) (Matthews, 1991) nebo virem bramboru Y (*potato virus Y, PVY*), kde byl zaznamenán i zvýšený obsah sacharidů (Herbers a kol., 2000). Akumulace škrobu v Chlps může být způsobena sníženou propustností Chlps membrány, poruchami v odtoku asimilátů (inhibice proteinů podílejících se na transportu cukrů) nebo změnami v aktivitě enzymů hydrolyzujících škrob v infikovaných Chlps. Jelikož se nejedná se o škrob hydrolyzovaný, je rostlinou patrně nevyužitý (Herbers a kol., 2000).

Obvyklým jevem u virových infekcí jsou změny v metabolismu sacharidů, kdy dochází k rozdílům v zastoupení jednotlivých sacharidů. Klesá zastoupení disacharidů, ale naopak roste množství monosacharidů (Herbers a kol., 2000; Shalitin a Wolf, 2000; Shalitin a kol., 2002; Arias a kol., 2003). U rostlin byly popsány tři typy izoenzymů invertasy, které jsou umístěny v cytoplazmě, buněčné stěně a vakuolách (Herbers a kol., 2000; Roitsch a Gonzáles, 2004). Invertasa buněčné stěny (EC 3.2.1.26) se podílí na štěpení sacharózy, na monomery hexózy tj. glukózu a fruktózu. Viry se šíří mezi buňkami přes plazmodesmy pomocí MP („movement protein“ – má schopnost ovlivnit velikostní limit plazmodesmů a tím umožňuje průchod virových částic). Ovšem mnohdy při virové infekci dochází k blokování transportu přes plasmodesmy (tvoří se membránové vezikulární struktury např. při PEMV infekci (De Zoeten a Gaard, 1983)), tudíž se sacharóza hromadí v apoplastu a je dostupná pro enzym invertasu (Herbers a kol., 2000; Roitsch a kol., 2003). Byly doloženy i změny v translokaci sacharidů během patogenní infekce u rostlin a změna vztahu zdroj-sink (pokles podílu transportovatelné sacharózy na úkor hromadění glukózy a fruktózy v apoplastu) (Herbers a kol., 2000; Biemelt a Sonnewald, 2006). Jelikož mají sacharidy vliv na expresi mnoha rostlinných genů, mohou být změny způsobené vyšší aktivitou invertasy při patogenním napadení odpovědné za potlačení exprese určitých fotosyntetických genů (*cab geny* – exprimující protein jež váže Chla/b; *rbcS geny* – exprimující enzym RUBISCO) a tím může zpětnovazebně dojít k inhibici fotosyntézy (Scholes a kol., 1994; Chou a kol., 2000; Herbers a kol., 2000; Prokopová a kol., 2010). Nicméně změny ve funkčnosti fotosyntetického aparátu během patogenní infekce nemusejí být zapříčiněné pouze inhibicí exprese fotosyntetických genů, neboť reakce rostliny na patogenní napadení bývá podstatně rychlejší než by byl časový úsek nutný pro změnu v genové expresi. Ukázalo se, že akumulace sacharidů u biotrofních interakcí hostitel-patogen, může mít kromě výše uvedeného, vliv na limitaci anorganického fosfátu, který je nezbytný pro tvorbu ATP (Scholes a kol., 1994).

5.2 ZMĚNY V METABOLISMU HOSTITELSKÝCH BUNĚK

Virová onemocnění rostlin způsobují závažné změny v procesech jako je fotosyntéza, respirace, aktivita antioxidantních enzymů, hormonální rovnováha, transport živin anebo akumulace asimilátů (např. Zhou a kol., 2004; Chaerle a kol., 2006; Funayama-Noguchi a Terashima 2006, Song a kol., 2009). Je nutné podotknout, že vliv virové infekce na fyziologické parametry rostlin není uniformní a výrazně se liší u různých kombinací virus-hostitelská rostlina, a velmi záleží zejména na tom, zda se jedná o kompatibilní či nekompatibilní interakci a také na probíhajícím životním cyklu viru (Almási a kol., 2001).

Obecně u onemocnění způsobených obligátními parazity dochází ke zvýšené permeabilitě membrán Chlps a tím i ke změnám v koncentracích metabolitů uvnitř Chlps. Asimilace CO₂ u infikovaných rostlin je ovlivněna poruchami ve funkci průduchů, kdy se na světle průduchy zcela neotevírají, což vede ke snížené stomatální transpiraci na světle a ke zhoršené difúzi O₂ do intercelulárních prostor. Pokles čisté fotosyntézy může být způsoben více faktory a to: sníženou asimilační schopností chloroplastů, poklesem obsahu chlorofylu, zvýšeným stomatálním odporem při difúzi CO₂, sníženým odtokem asimilátů z infikovaných listů (projevuje se zejména hromaděním volných sacharidů a aminokyselin v infikovaném pletivu) a také zvýšenou úrovní respirace a fotorespirace (Berger a kol., 2007), ale i poklesem funkčnosti, případně snížením obsahu komponent, elektronového transportního řetězce (Scholes a Rolfe, 1995).

Průběh fotosyntetických reakcí se může měnit během probíhajícího životního cyklu viru uvnitř hostitelských buněk. V Chlps izolovaných z listů čínského zelí infikovaného virem žluté mozaiky vodnice (*Turnip yellow mosaic virus, TYMV*) byl pozorován rychlejší průběh cyklické i necyklické fotofosforylace pouze v prvních fázích infekce, kdy docházelo k masivnímu množení viru. V pozdějším stádiu infekce byla naměřena fotosyntetická aktivita u infikovaných Chlps nižší v porovnání s kontrolou (Matthews, 1991).

U systémových viróz se intenzita respirace rostlin v průběhu choroby buď nemění anebo se zvyšuje (Ryšlavá a kol., 2003; Arias a kol., 2003). Odlišné výsledky byly zjištěny pro různé typy interakce, kdy u nekompatibilních interakcí nastalo zvýšení respirace dřívě, než k tomu došlo u interakcí kompatibilních. Je to zejména díky rychlé aktivaci biosyntetické aktivity napadených orgánů, která souvisí se spuštěním obranných reakcí. Náchylné genotypy rostlin reagují na přítomnost patogenu zpočátku slabě, mají buď zpomalené specifické obranné reakce, nebo se tyto reakce vůbec neaktivují a tudíž dojde k infekci. K nárůstu respirace dochází v pozdějším stádiu choroby, kdy zvýšená respirace slouží jako zdroj energie

a meziproduktů látkového metabolismu na krytí nutričních požadavků patogenu (*Arias a kol., 2003*).

Je nutné poznamenat, že efekt biotického stresu může být prohlouben při současném působení stresu abiotického. Ovšem některý typ abiotického stresu (teplotní šok, vodní stres, změna pH) může zvýšit rezistenci hostitelské rostliny, působí-li před počátkem nebo během inokulace, ovšem s tím, že kompletní odolnost rostliny vůči patogenu nikdy nezajistí (*Walters a kol., 2005a*). Pokud byly rostliny vystaveny působení některého z výše uvedených abiotických faktorů, byl zaznamenán 20-85% nárůst rezistence (*Walters a kol., 2005b*). Nicméně, jsou známy i případy, kdy vystavení rostlin teplotnímu šoku nebo vodnímu stresu, způsobilo potlačení rezistence a tím zvýšilo náchylnost rostliny k patogenní infekci (*Oerke a kol., 1992*). Efekt teploty na náchylnost rostlin bramboru k infekci PLRV (*potato leafroll virus*) zkoumal *Syller (1991)*. Nejvyšší náchylnost rostlin bramboru k infekci PLRV zjistil u modelového systému nízká před-inokulační teplota (15°C) - inokulace PLRV- vyšší po-inokulační teplota (27°C).

5.2.1 ZMĚNY VE FOTOSYNTÉZE

Virová infekce obvykle ovlivňuje procesy fotosyntézy. Inhibice fotosyntézy vyplývá z biochemických a fyzikálních změn uvnitř buňky. Rostliny postižené mozaikovitostí mají často omezenou fixaci CO₂ v listech. Tyto změny jsou obvykle pozorovatelné několik dní po inokulaci. Fotosyntetická aktivita může být inhibována změnami ve struktuře chloroplastů, sníženým obsahem fotosyntetických pigmentů nebo enzymu RUBISCO, dále může aktivitu fotosyntézy ovlivnit snížení obsahu specifických proteinů připojených k PSII (*Matthews, 1991; Balachandran a kol., 1994*).

U tabáku infikovaným TMV došlo při snížení obsahu chlorofylu k poklesu rychlosti elektronového transportu. V inokulovaných listech bylo zjištěno ireversibilní poškození PSII ještě před vizualizací makroskopických symptomů (*van Kooten a kol., 1990*). *Almási a kol., (2000)* zjistili studiem 77K fluorescenčních emisních spekter inhibici biosyntézy chlorofylových proteinových komplexů při infekci rostlin ječmene virem proužkovitosti ječmene (*Barley stripe mosaic virus, BSMV*). Inhibice biosyntézy Chl se lišila mezi listy různého stáří s tím, že nejmarkantnější změny byly pozorovány na nejmladších listech. *Rahoutei a kol., (2000)* porovnávali obsah Chl u symptomatických listů tabáku na přítomnost viru skvrnitosti pepře (*Pepper Mild Mottle Virus, PMMoV*) a listů bezpříznakových. U příznakových listů došlo k poklesu obsahu celkového Chl o 50%. Jako možnou příčinu

snížení obsahu Chl u virem napadených listů, považuje *Goodman a kol., (1986)* vyšší aktivitu chlorofylasy.

Velká odlišnost panuje mezi publikovanými výsledky, které se týkají změn v poměru Chla/b. Výzkum, který byl veden *Funayamou a kol., (1997)* odhalil, že virem infikované listy *Eupatorium makinoi* měly vyšší poměr Chla/b, než listy kontrol tzn., že u infikovaných rostlin docházelo k přednostnímu úbytku Chlb. Stejný výsledek získali také *Funayama-Noguchi (2001)* a *Nanda a Biswal (2008)*. Naopak nižší poměr Chla/b u tabákových listů infikovaných TMV virem, ukázal na přednostní degradaci Chla z RC (*Synková a kol., 2006; Naidu a kol., 1984*).

Ve studii *Ehara a Misawa (1975)* virus mozaiky okurky (*Cucumber mosaic virus, CMV*) způsobil degradaci chloroplastů (Chlps), jež byla mnohem markantnější v pozdních fázích infekce. *Radwan a kol., (2008)* se zaměřili na změny ve struktuře Chlps způsobené virem žluté mozaiky fazolu (*Bean yellow mosaic virus, BYMV*). Virová infekce způsobila zvětšení stromální části Chlps, redukci gran, částečnou ztrátu Chlps membrány, měnil se také tvar Chlp. V několika studiích bylo pozorováno poškození a deformace TMB, akumulace škrobových zrn uvnitř Chlps, ztráta stromálních lamel anebo nárůst počtu plastoglobulí a inkluzí. Změny, které byly popsány výše a týkají se snížení počtu Chlps a změn v ultrastruktuře Chlps, jsou běžným projevem přirozené senescence a byly popsány mnoha autory (*Balachandran a kol., 1997; Almási a kol., 2001; Ghosh a kol., 2001; Zechman a kol., 2003; Schnablová a kol., 2005; Pérez-Bueno a kol., 2006*).

Ve většině případů dochází během virové infekce k přednostní inhibici aktivity PSII na donorové straně, což bývá spojeno s poklesem množství proteinů tvořících komplex vyvíjející kyslík (OEC). *Naidu a kol., (1986)* detekovali během infekce pokles obsahu proteinů 14, 18, 19, 23 a 33 kDa v listech *Arachis hypogaea* L., která byla doprovázena poklesem ve vývoji kyslíku. V další studii bylo prokázáno, že změny v obsahu polypeptidů jsou podmíněny zejména vývojem symptomů nemoci, k degradaci OEC (24 a 33 kDa proteinů) tedy dochází až po systémovém rozšíření viru po rostlině (*Takahashi a kol., 1991; Takahashi a Ehara, 1992*). *Rahoutei a kol., (2000)* zjistili snížení v zastoupení 24 a 16 kDa proteinů a uvažují, že inhibice OEC nastává spíše jako primární proces, než jako důsledek rozvoje symptomů infekce.

V roce 1989, prokázali nezávisle na sobě, *Reinero a Beachy* a *Hodgson a kol.*, že plášťový protein (CP) viru tabákové mozaiky (*Tobacco mosaic virus, TMV*) se hromadí uvnitř Chlps, kde se napojuje na proteinové komplexy PSII. CP viru skvrnitosti pepře (*Pepper mild mottle virus, PMMoV*) byl nalezený v asociaci s Chlps a tylakoidními membránami a CP měl

přímý vliv na poškození elektronového transportu přes PSII (*Rahoutei a kol., 2000*). Inhibice elektronového transportu může být také způsobena snížením počtu otevřených RC a nižší účinností pohlcení excitací v PSII, což vyplývá z naměřených nižších hodnot q_P a F'_V/F'_M u infikovaných rostlin (*Rahoutei a kol., 2000*). *Wolf a kol., (1999)* studovali vliv proteinu nezbytného k šíření viru (*movement protein, MP*) TMV, na fotosyntetický aparát transgenních rostlin tabáku exprimující TMV-MP s virovým promotorem CaMV 35S. MP způsobil inhibici rychlosti asimilace CO_2 u mladých listů napadených rostlin asi o 20%. Byl prokázán vliv MP TMV na metabolismus, kdy docházelo k akumulaci cukrů a škrobu v infikovaných rostlinách. Tento jev je vysvětlován nižší rychlostí exportu cukrů z TMV infikovaných listů.

V listech čínské zelí infikovaných virem žluté mozaiky vodnice (*Turnip yellow mosaic virus, TYMV*) byl zaznamenán podstatný rozdíl v produktech fixace CO_2 , oproti obvyklé produkci cukrů došlo k značnému zvýšení tvorby organických kyselin a aminokyselin. Tyto změny byly většinou zaznamenány během prvotní prudké replikace virových částic a po snížení rychlosti replikace viru se navrátil původní stav (*Matthews, 1991*). U tabáků infikovaných virem bramboru Y (*Potato virus Y, PVY*), zjistili *Herbers a kol., (2000)* nárůst hladiny volně transportovatelných cukrů. Zvýšení koncentrace cukrů v apoplastu bylo spojeno s poklesem fotosyntetické fixace CO_2 , nárůstem aktivity invertasy a postupným poklesem poměru disacharidy/monosacharidům. Autor uvažuje následující model, kdy invertasa hydrolyzuje sacharózu na glukózu a fruktózu, které jsou transportovány do mezofylu, kde jejich nahromadění může zpětně negativně ovlivňovat fotosyntézu.

Nižší fotosyntetická aktivita může být následkem snížené průduchové vodivosti, což bylo pozorováno u cukrové řepy infikované virem žloutenky řepy (*Beet yellows virus, BYV*) (*Matthews, 1991*), tabáku cv. Petit Havana SR1 infikovaného PVY (*Synková a kol., 2006*), tabáku infikovaného PVY a virem bramboru A (*Potato virus A, PVA*) (*Ryšlavá a kol., 2003*).

Fotoinhibičnímu poškození fotosyntetického aparátu, ke kterému dochází zejména v pozdních fázích virové infekce, se rostliny často vyvarují zvýšením nefotochemického zhášení (NPQ), dále redukcí počtu otevřených RC, což následně vede k nárůstu redukovaného stavu primárního chinonového akceptoru, Q_A . Nárůst NPQ změřil *Seaton a kol., (1996)* u nižších rostlin (řasa *Chlorella*) infikovaných *Chlorella* virem, již několik desítek minut po inokulaci. Tento proces vysvětluje navázáním VDE na LHCI v chlps hostitelské rostliny, kde pak dochází k tvorbě Z. Naopak ale, nižší hodnoty NPQ byly naměřeny pomocí zobrazovací fluorescenčního imagingu v místech chloróz na listech rostlin infikovaných virem mozaiky mračňáku (*Abutilon mosaic virus, AbMV*). Pokles NPQ vysvětluje akumulaci karbohydrátů v okolí žilek, poškozením biosyntézy LHCI proteinů a snížením obsahu složek

elektronové transportní dráhy. Pokles NPQ je doprovázen nižší koncentrací xantofylů ve světlých mozaikovitých poškách listu (*Osmond a kol., 1998*). Rahoutei a kol., (2000) zjistili, že tyto procesy ochraňující RC fotosystémů jsou účinné pouze v prvních stádiích infekce. Zhruba po třech týdnech došlo k poškození RC a tím k poklesu kvantového výtěžku fotochemie PSII (F_V/F_M). Nárůst NPQ u rostlin a řas se jeví jako obecný ochranný mechanismus, který je spuštěn během působení virové infekce. Obdobný nárůst NPQ byl pozorován i u infekcí způsobených houbovými patogeny (*Scholes a Rolfe 1996*). *Balachandran a kol., (1994)* studovali efekt fotoinhibice u rostlin napadených virem tabákové mozaiky (*Tobacco mosaic virus, TMV*), u kterých byl/nebyl dodáván dusík (NO_3^-) do zálivky. Zjistili, že virová infekce zvyšuje citlivost rostlin tabáku k fotoinhibici, zejména při níké dodávce dusíku v zálivce. S rozvojem virózy rostlo fotoinhibiční poškození a fotooxidace Chl, což následně vedlo k urychlení procesu senescence.

5.2.2 ZMĚNY V AKTIVITĚ A EXPRESI ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ

Aktivity antioxidačních enzymů se výrazně mění v průběhu patogeneze. V raných fázích kompatibilní interakce (hod) dochází k masivnímu množení virových částic, roste lokální aktivita pentózo-fosfátového cyklu (pentózy jsou nutné pro tvorbu RNA, DNA viru), hromadění škrobů, nárůstu aktivity CAT. V pozdějším časovém úseku (dny) narůstá rychlost respirace a glykolýzy a dochází k oxidativnímu stresu díky nerovnováze mezi produkcí a odklizením ROS (*Maule a kol., 2002*). Nekompatibilní interakce je typická lokálním nárůstem aktivity enzymů generujících ROS (NADPH-oxidasa) v důsledku probíhající HR, naopak u kompatibilní interakce bývá zaznamenána zvýšená činnost enzymů odbourávajících ROS.

Obecně, během biotického stresu dochází k potlačení činnosti enzymů odklizejících H_2O_2 (APX a CAT) díky činnosti SA a NO (*Chen a kol., 1993; Lamb a Dixon, 1997; Klessig a kol., 2000; Clark a kol., 2000*). Byl pozorován přímo rozpor v chování ROS a jejich odklizení během biotického napadení při současném působení abiotického stresu. Rostliny tabáku dříve vystavené působení oxidačního stresu (mají vyšší hladinu antioxidačních enzymů) měly oddálený nástup PCD ve srovnání s kontrolami (*Mittler a kol. 1999*). Bylo prokázáno, že u rostlin s nadměrnou aktivitou CAT, dochází k poklesu rezistence vůči patogenní infekci (*Polidoros a kol., 2001*). Pro aktivaci obranné reakce v rostlinách hraje důležitou roli GSH. Pokles GSH, nebo nárůst jeho oxidované formy (GSSG), indukuje akumulaci fytoalexinů.

Clarke a kol., (2002) pozorovali pokles aktivit CAT, GR a SOD a nárůst aktivity POX u rostlin *Phaseolus vulgaris* infikovaných virem mozaiky jetele (*White clover mosaic virus, WCIMV*). Autoři předpokládají, že snížení kapacity antioxidačních reakcí, pomáhá udržet vysokou hladinu ROS, která je žádoucí pro replikaci viru. Hernández a kol., (2001) našli rozdílné chování v antioxidačních enzymech u kultivarů meruněk jak rezistentních, tak náchylných k šarce švestky (*Plum pox virus, PPV*). Z odlišného chování SOD a APX u obou kultivarů vlivem působení viru usuzují, že H_2O_2 hraje důležitou roli během odezvy rezistentního kultivaru meruňky na PPV. U náchylného kultivaru byla zaznamenána akumulace H_2O_2 a zvýšená hladina peroxidace lipidů. Amari a kol., (2007) zjistili, že virus nekrotické kroužkovitosti slivoně (*Prunus necrotic ringspot virus, PNRSV*) u semen meruněk způsobil oxidační stres měřený jako nárůst lipidové peroxidace, jež byl souběžný s poklesem v hladinách enzymů askorbát-glutathionového cyklu (APX, MDHAR, DHAR, GR) a POX. Usuzují, že infikovaná semena nemají schopnost eliminovat zvýšenou produkci H_2O_2 (pokes POX a APX) a také u nich nedochází k „recyklaci“ Asc a GHS. V případě dlouhodobé infekce listů meruňky virem šarky švestky (PPV) došlo k nárůstu apoplastického H_2O_2 , což korelovalo se nárůstem porušení plazmalemy (výtok elektrolytů), nárůstem v lipidové peroxidaci a oxidaci proteinů (Diaz-Vivancos a kol., 2006). Změny enzymových aktivit v tábáku náchylného k viru PVY^{NTN} studovala Doubnerová a kol., (2007). Sledována byla systémová infekce, tedy rozšíření viru z místa inokulace po celé rostlině. U antioxidačních enzymů zapojených do okamžitých obranných reakcí (GR, APX, CAT a SOD) došlo k nárůstu během hod po inokulaci. Zaznamenali přechodné zvýšení v aktivitách GR a APX 2 hod po inokulaci. Následně s rozvojem symptomů (10dpi) byla spjata vyšší aktivita SOD a GR. Enzymy s doplňkovým účinkem (NADP-dependentní malátdehydrogenasa, PEPC-fosfoenolpyruvátcarboxylasa, PPK-pyruvát fosfátdikinas) zvýšily svou aktivitu až po systémovém rozšíření infekce (10 až 25 dní po inokulaci), shodně jako pozorovala Ryšlavá a kol., (2003).

Ve své studii Milavec a kol., (2001) zkoumali vliv virové infekce na hladinu POX, jež jsou považovány za jeden z prvních enzymů, u nichž dochází ke změnám v aktivitě během biotického stresu. U rezistentních rostlin je POX aktivita mnohem vyšší, ovšem i u náchylných kultivarů může dojít ke zvýšení POX aktivity (Lagrimini a Rothstein 1987; Ye a kol., 1990). U mock-inokulovaných bramborových sazenic došlo k poklesu POX aktivity ve srovnání s kontrolou, avšak u infikovaných PVY^{NTN} byl pozorován nárůst v POX (cytosolické i iontově vázané). Rozdíly v aktivitách POX, pigmentů a proteinů mezi studovanými variantami ukazují na odlišnost procesů vyvolaných virovým napadením a mechanickým

poškozením. Autor usuzuje, že virem indukovaná senescence je opožděná (vyšší aktivita iontově-vázané POX) oproti senescenci přirozené.

Arias a kol., (2005) při studiu kompatibilní interakce mezi slunečnicí a virem chlorotické skvrnitosti slunečnice (*Sunflower chlorotic mottle virus, SuCMoV*) zjistili, že ještě před vizualizací symptomů došlo k nárůstu aktivit SOD a CAT a hladiny O_2^- .

5.2.3 ÚLOHA HORMONŮ V INTERAKCÍCH ROSTLIN A VIRŮ

Stejně jako bakterie a houby, i viry mají schopnost značně zasahovat a ovlivňovat hladiny endogenních regulátorů (*Clarke a kol., 1999, Jameson 2000*). SA, JA a ET jsou považovány za klíčové fytohormony, které aktivují obranné mechanismy a řídí signální dráhy vedoucí k rezistenci rostlin během patogenního napadení a herbivorního poškození rostliny (*např. Howe, 2004; Pozo a kol., 2004; Lorenzo a Solano, 2005; Grant a Lamb, 2006; van Loon a kol., 2006; von Dahl a Baldwin, 2007; Koornneef a Pieterse, 2008*). Při virové infekci byl popsán jak nárůst činnosti určitých hormonů, tak pokles aktivity jiných (*např. Jameson, 2000; Jameson a Clarke, 2002*).

V obranných mechanismech jsou zapojeny i další hormony, jako je ABA (*Mauch-Mani a Mauch, 2005*), brasinnosteroidy (*Nakashita a kol., 2003; Bajguz a Hayat 2009*) a auxin (*Navarro a kol., 2006; Wang a kol., 2007*), nicméně jejich role ještě není zcela objasněna. Na rozdíl od bakteriálních a houbových infekcí, které vedou ke zvýšení hladiny cytokininů (CK) a auxinů v infikovaných pletivech, virové infekce vedou ke specifickému snížení množství aktivních forem CK (volných bází a ribozidů) a zvýšení fyziologicky neaktivních forem (9-glukozidů) (*Dermastia a kol., 1995*). *Clarke a kol. (1999)* zkoumali ovlivnění hladiny CK při virové infekci způsobené virem mozaiky jetele plazivého (*White clover mosaic virus, WCIMV*). Autoři doložili, že infekce silně ovlivnila metabolismus CK. Počet virových částic nenarůstal, dokud nedošlo ke snížení koncentrace aktivních CK. Předpokládají tedy, že snížení hladiny CK je nutné pro úspěšnou replikaci viru.

V průběhu virové infekce se snižuje koncentrace auxinů a giberelinů a dochází k nárůstu koncentrace ABA. Produkce ET je spojena vždy se vznikem nekrotických a chlorotických lokálních lézí. *Whenham a kol., (1986)* zjistili, že infekce virem tabákové mozaiky (*Tobacco mosaic virus, TMV*) zvyšuje koncentraci nechloroplastové ABA, zatímco koncentrace ABA uvnitř chloroplastů změněna nebyla. Naopak v případě TMV infekce rajčat nebyl nárůst v koncentraci ABA zjištěn, dále byla u rezistentních odrůd rajčat (obhahujících

Tm-1 gen) prokázána vyšší koncentrace ABA než u náchylného genotypu (*Fraser and Whenham, 1989*).

Ve studiích *Clarke a kol., (1998)* a *Clarke a kol., (2000a)* bylo pozorováno, že exogenní aplikace JA (koncentrace do 25 nM) může inhibovat replikaci viru, následně tak snižovat jeho koncentraci a tím zamezovat systémovému rozšíření viru po rostlině. Dále se ukázalo, že u PVY^{NTN} infikovaných *in vitro* pěstovaných brambor se JA přednostně akumuluje v kořenech a potlačuje jejich růst, zatímco v infikovaných listech její koncentrace srovnatelná jako u listů neinfikovaných (*Petrovič a kol., 1997*). *Clarke a kol., (2000b)* popsali dvojí nárůst endogenní hladiny JA. První, nastává okamžitě po inokulaci virem WCIMV, jako odpověď rostliny fazolu na mechanické poškození. Zatímco druhý nárůst hladiny JA, koreluje se zvýšením koncentrace virových částic (5dpi) a podle autorů byl způsoben poškozením membrán během replikace viru. Při porušení membrán dochází k uvolnění kyseliny α -linolenové, z níž se následně syntetizuje JA (*Conconi a kol., 1996; Vick a Zimmerman, 1984*). *Preston a kol., (1999)* ve svém experimentu sledovali ovlivnění signálů spuštěných při mechanickém poranění a samotné virové infekci u rezistentních rostlin. JA koncentrace vzrostla 4hod po inokulaci virem (mechanické poškození). Pokud rostlinu (4dpi) lokálně poranili, žádný nárůst v hladině JA nepozorovali. Uvažují tedy antagonistický účinek mezi JA/SA tzn., že zvýšená hladina SA v souvislosti s TMV infekcí, potlačila JA odpověď na poranění. *Kovač a kol., (2009)* zkoumali zapojení signálních drah JA, SA a ABA u velmi časných obranných reakcí (1 hod a 3 hod po inokulaci) proti působení viru PVY na náchylný/rezistentní kultivar bramboru. Ukázalo se, že v raných obranných reakcích rostliny je hladina JA zvýšena jen lokálně, nikoliv systémově. Platilo také, že změny v hladinách všech studovaných hormonů byly výraznější u rezistentního kultivaru bramboru. Listy fazolu infikované virem mozaiky jetele (*White clover mosaic virus, WCIMV*) měly stejný endogenní obsah JA jako „mock-inokulované“ kontroly. Autoři uvažují, že tento souběžný brzký (12hod po inokulaci) nárůst v hladině JA u obou studovaných variant byl způsoben mechanickým poraněním při inokulaci (*Clarke a kol., 2000b*). Naopak *Seo a kol., (2001)* zjistili, že TMV infekce u rezistentních tabáků (*Samsun NN*) vyvolala nárůst v koncentraci JA (5hod po inokulaci) a až následně došlo ke spuštění HR. Později, bylo prokázáno, že JA zvyšuje expresi genů spojených s obrannými reakcemi u rostlin (*Jameson a Clarke 2002, Whitham a kol., 2006*).

Byla doložena úloha SA v rezistenci rostlin proti mnohým virovým infekcím (*Murphy a kol., 1999*). V případě exogenní aplikace SA na listy před inokulací virem žluté mozaiky cukety (*ZYMV*), došlo k nárůstu počtu Chlps, obahu Chla zvýšení rychlosti fotosyntézy

(Radwan a kol., 2007). Radwan a kol., (2008) prokázali, že se SA podílí na indukci rezistence proti viru žluté mozaiky fazolu (BYMV). Guo a kol., (2000) zjistili, že po 6 hod od počátku HR byla zvýšená endogenní koncentrace SA v listech tabáků infikovaných TMV. Bylo potvrzeno, že SA má úlohu v aktivaci při buněčné smrti (PCD) v místě lokalizace patogenu, aktivaci obranných genů a SAR (Dempsey a kol., 1999). SA také reguluje tvorbu proteinů souvisejících s patogenezí (PR-proteins) a expresi R genů zapojených do rezistence proti bakteriím, houbovým patogenům i virům (např. Romeis a kol., 1999). Exogenní aplikace 1mM SA na listy slunečnice napadené virem chlorotické skvrnitosti slunečnice (SuCMoV) měla za následek snížení koncentrace virových částic, ale také nárůst hladiny H_2O_2 na úkor zvýšení aktivit antioxidantních enzymů (CAT, SOD, APX) (Arias a kol., 2005). Autoři usuzují, že nárůst v aktivitách antioxidantních enzymů přerušuje H_2O_2 signály generované při vyšších koncentracích ROS, jež by jinak mohly spouštět obranné reakce u hostitelské rostliny, a tím dochází ke kompatibilní interakci.

6. MATERIÁL A METODY

Během postgraduálního studia jsem se podílela na třech hlavních projektech. Nejdříve jsme pracovali s modelovým abiotickým oxidačním stresem, který byl uměle vyvolán aplikací methyl viologenu (MV) na segmentech listů ječmene. Následovalo studium biotického stresu na rostlinách hrachu infikovaných enační mozaikou, kdy jsme se snažili popsat a zaznamenat změny ve fotosyntéze hostitele. Závěrečný projekt navazoval a rozšiřoval předchozí studii věnovanou enační mozaice. Zaměřili jsme se na to, jakým způsobem virový patogen ovlivňuje biochemické parametry hostitele, jaké je načasování produkce ROS a RNS, jaká je variabilita v expresi hormonů a v kterých oblastech listu dochází ke tvorbě RNOS.

Při kompatibilní interakci virus-rostlina dochází po vniknutí viru k jeho okamžité replikaci za využití replikačního aparátu hostitele, akumulaci virových částic, jejich mezibuněčnému a systémovému šíření, potlačení obranných reakcí hostitele a nastávají velké změny v genové expresi. Při kompatibilní interakci: enační mozaika (PEMV) - hrách, která se řadí mezi nejčastější virózy hrachu v ČR, dochází až k 80 % ztrátě výnosu semen. Této virové chorobě zatím nebyla v patologických studiích věnována odpovídající pozornost, proto jsme se provedli velmi podrobnou analýzu fotosyntetických a biochemických parametrů, které virová infekce u hostitelské rostliny ovlivňuje.

6.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL A STRESOVÝ FAKTOR (PUB. I)

Rostliny ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Akcent) byly pěstovány v agroperlitu při definovaných podmínkách (24° C; 16 hod světlo/8 hod tma; 100 μmol fotonů $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, FAR) a zalévány Knopovým roztokem. K experimentům byly použity primární listy rostlin ječmene ve stáří 8 dní. Listy ječmene byly nařezány na segmenty dlouhé 5 cm, poté byly segmenty přeneseny do Petriho misek s 10 μM MV. Segmenty zde byly ponechány 1 hodinu v temnotních podmínkách a po následující 4 hodiny byly vystaveny působení bílého světla (100 μmol fotonů $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, FAR; Tungsram 18 W, Hungary).

MV (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid) je herbicid, jenž funguje jako akceptor elektronů na akceptorové straně PS I., V redukovaném stavu MV dodává elektrony na kyslík za vzniku $\text{O}_2^{\cdot-}$ a následně peroxidu vodíku ve stromatu chloroplastů (Kim a Lee, 2005). Mimo jiné MV brání regeneraci NADP^+ a Asc.

Buněčné poškození indukované MV probíhá následovně: MV urychluje fotoprodukcii $O_2^{\cdot-}$ u PS I a zároveň inhibuje regeneraci Asc z MDA. Chloroplastové APX jsou rapidně inaktivovány, pokud koncentrace Asc klesne pod 20 μM . Jakmile dojde ke snížení kapacity odklizení H_2O_2 v Chlps, H_2O_2 se v Chlps akumuluje a posléze difunduje do dalších buněčných částí. Mezi potenciální cíle H_2O_2 v Chlps patří CuZnSOD, která je relativně hodně citlivá, zatímco CAT, DHAR, MDHAR jsou ke H_2O_2 spíše tolerantní (Mano a kol., 2001).

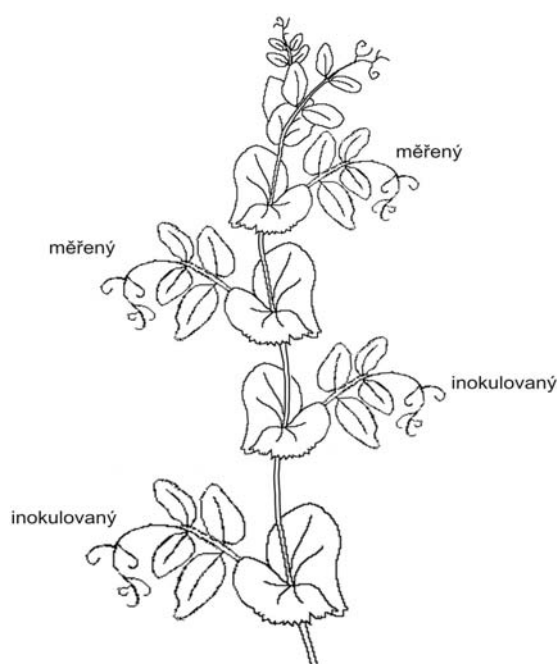
Obecně platí, že při mírném oxidačním stresu aktivity antioxidantních enzymů narůstají. Ovšem při silném oxidačním stresu, kdy dochází k prudkému nárůstu hladin ROS, aktivity enzymů klesají. Účinek MV na aktivitu antioxidantních enzymů se mění také s intenzitou použitého světla. To znamená, že použijeme-li při experimentu vyšší intenzitu FAR, stačí k navození oxidačního stresu jen nízká koncentrace MV cca 100 nM (Casano a kol., 1999).

Jakmile jsou chloroplasty v přítomnosti MV osvětleny, dochází ke ztrátě aktivity APX během několika minut. Sníží se obsah Asc, jelikož je spotřebováván v důsledku redukce H_2O_2 , která je katalyzována právě APX. Aktivita APX a obsah Asc jsou však pro udržení WWC a fotosyntetické kapacity velmi důležité (Yabuta a kol., 2002). U listů po aplikaci MV a osvětlení pozorujeme produkci radikálu MDHA \cdot , což lze přičíst ztrátě aktivity APX v chloroplastech (Mano, 2002). Následně dochází k inaktivaci dalších chloroplastových enzymů odklizejících ROS a dochází k uvolnění ferredoxin-NADP $^+$ oxidoreduktasy (FNR) z TMB. Značný pokles obsahu Asc vlivem MV byl pozorován u rostlin hrachu (Iturbe-Ormaetxe a kol., 1998) a tabáku (Ederli a kol., 1997). U listů pšenice po aplikaci MV a vystavení ozáření 200 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, FAR, byla nejdříve pozorována inaktivace APX a DHAR a po několika hod. byly inaktivovány enzymy SOD a GR (Mano, 2002). Naopak Ederli a kol. (1997) pozorovali stimulaci aktivit APX, DHAR, a GR vlivem MV, s tím, že stimulace aktivity APX byla mnohem markantnější ve srovnání s aktivací GR, nebo DHAR. Tato silná aktivace APX, může omezit dostupnost Asc pro enzym VDE. Bylo zjištěno, že během působení oxidačního stresu vyvolaného MV, mohou být po aplikaci kyseliny salicylové (SA) fotosyntetické funkce zachovány (Ananieva a kol., 2002).

6.2 ROSTLINNÝ MATERIÁL A STRESOVÝ FAKTOR (PUB. II A III)

Rostlinný materiál použitý v dalších publikacích byl připraven na Katedře botaniky UP v Olomouci. Hrách setý (*Pisum sativum* cv. Merkur), náchylný genotyp, byl pěstován v zahradnickém substrátu (Klassman Substrate 4, Germany) při definovaných podmínkách

(22/18° C; 16 hod světlo/8 hod tma; 100 μmol fotonů $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, FAR) a zalévám vodou. Ve stáří 14 dnů byly rostliny inokulovány PEMV virem; izolát UP58 (Obr.20). V publikaci II byly jako kontrola použity neinokulované rostliny. Ve snaze monitorovat vliv mechanického poškození, jež je nezbytnou součástí inokulace, byly v další publikaci (publikace III) zkoumány nejen neinokulované kontrolní rostliny (C), ale i kontroly inokulované pomocí inokula připraveného z pletiva zdravých rostlin hrachu (MI). Všechny inokulované rostliny byly podrobeny DAS-ELISA testu, který potvrdil PEMV infekci (publikace II a III). Pro posouzení šíření virových částic rostlinou jsme použili kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci RT-PCR (publikace II).



Obr.20: Schéma uspořádání experimentu použité v publikaci II a III. První dva pravé listy u 14 dní starých rostlin hrachu byly inokulovány virem PEMV. Ke studiu fotosyntetických a fluorescenčních parametrů, znaků oxidačního stresu, HSP70, hladiny fytohormonů, H_2O_2 , POX activity a vizualizaci RONS akumulace, byl použit třetí a čtvrtý list nad listy inokulovanými. Odpověď rostlin na virovou infekci byla vyhodnocována 5, 15, 30 a 40 dní po inokulaci.

PEMV byl poprvé popsán na listech *Vicia faba* L. v roce 1935 v USA. Na území ČR byl první výskyt PEMV zaznamenán v roce 1953. Taxonomicky patří do skupiny virů s pozitivně orientovanou jednořetězcovou RNA (+ssRNA), čeledi *Luteoviridae*, rodu *Enamovirus*. Virus napadá rostliny z čeledi *Viciaceae*, *Chenopodiaceae* a *Solanaceae* (Dostálová a kol., 2008). PEMV je celosvětově označován za nejnebezpečnější a ekonomicky nejzávažnější virózu hrachu. Vyskytuje se víceméně periodicky a způsobuje téměř kalamitní výnosové ztráty často přesahující 50 – 80 %.

Rostliny napadené PEMV lze identifikovat podle řady typických příznaků, které se u různých hostitelských druhů liší, v závislosti na odrůdě rostliny, ekologických podmínkách a izolátu viru (Skaf a de Zoeten, 2000).

U rostlin hrachu (*Pisum sativum* L. cv. Merkur) infikovaných PEMV se první příznaky začínají objevovat mezi 4. až 6. dnem po napadení jako mírné kroucení listů směrem dolů. Kolem 7. až 10. dne začíná blednout listová žilnatina, na listech je nápadná žlutá mozaika a u

infikovaných rostlin dochází k růstové depresi (*publikace II, Fig.2A; 2B*). Mezi 7. a 14. dnem od inokulace se na rostlině začínají objevovat růstové malformace (*publikace III, Fig.2B; 2C*). Virózní rostliny tvoří menší listy, internodia se zkracují, vegetační vrchol se deformuje a zasychá. Napadené rostliny zmlazují a tvoří množství krátkých postranních prýtů s květy. Lusky jsou žlutozelené, kratší, s výrazně zdrsňeným povrchem - vystouplou nervaturou. Napadené rostliny ztrácejí obranné imunitní schopnosti spojené se ztrátou rezistence proti mykózám (*antraknózy, fuzariózy, rzivost*).

PEMV se mezi hostitelskými rostlinami v přírodě přenáší zoochoricky pomocí vektoru, kterým bývá nejčastěji mšice kyjatka hrachová (*Acyrtosiphon pisum*), méně často mšicíc broskvoňová (*Myzus persicae*) nebo kyjatka zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*) (*Syller, 2003*). K silnému přenosu virózy mšicemi dochází již po krátkém sání (cca po 10 až 15 min). Nakažená mšice je schopna aktivně přenášet virózu i několik měsíců. Inkubační doba je poměrně velmi krátká, obvykle trvá 2 až 4 dny. PEMV je snadno přenosný mechanicky, ale osivem se nepřenáší. (*Kazda a kol., 2003; Piáková a kol., 2006*).

Ve screeningových testech byl v USA nalezen pouze jediný genotyp zahradního hrachu PI 140 295, který obsahoval ojedinělý počet rostlin se slabými příznaky napadení. Po jejich namnožení, reinfekci a opakované reselekcii se podařilo získat rezistentní linii G 168, s dominantním genem rezistence En. Tato linie se stala základem pro odvození všech ostatních rezistentních odrůd zahradního hrachu proti PEMV (*Ondřej, 2009*).

PEMV je nejvíce rozšířen v severním mírném podnebném pásmu Severní Ameriky a Evropy ale byl zaznamenán také v teplejších oblastech, jako je Sicílie a Írán (*Syller, 2003*). Mezi státy s největším výskytem PEMV patří Kanada, Čína, Írán, Velká Británie a USA (*Büchen-Osmond, 2006*). PEMV patří mezi významné virózy hrachu i v České republice. Poslední sledování vybraných lokalit na území ČR bylo provedeno v letech 2003 – 2005. Přítomnost PEMV byla prokázána u 43 % testovaných rostlin (*Piáková a kol. 2006; Nováková, 2007*).

PEMV se řadí mezi +ssRNA rostlinné viry se složeným genomem. Genom je vždy tvořen dvěma ribonukleovými kyselinami označovanými jako *RNA 1* a *RNA 2*. Podle současné taxonomie je každá z genomických RNA (*RNA 1, RNA 2*) zařazena do jiného virového rodu. Některé izoláty mohou navíc obsahovat také třetí, satelitní RNA (*RNA 3*) (*Demler a kol., 1994*). *RNA 1* je jako *Pea enation mosaic virus 1 (PEMV-1)* řazena do rodu *Enamovirus*, čeledi *Luteoviridae*. Virová *RNA 2* je jako *Pea enation mosaic virus 2 (PEMV-2)* řazena do rodu *Umbravirus* (*Mayo a D'Arcy, 1999*). *RNA 1* a *RNA 2* dohromady vytváří komplexní genom PEMV a jejich vzájemná spolupráce je nezbytná pro realizaci životního

cyklu PEMV. *RNA 1* je odpovědná za tvorbu kapsidu a vektorový přenos PEMV, zatímco *RNA 2* zajišťuje přenos viru mechanickou inokulací a jeho systémové šíření v rostlině. Každá z virových RNA se však dokáže samostatně replikovat (Nováková, 2007).

6.3 POUŽITÉ METODY

Pro kvantifikaci intenzity oxidačního stresu rostlin jsme použili spektrofotometrické stanovení míry peroxidace membránových lipidů založené na detekci obsahu malondialdehydu, který vzniká působením ROS na membránové lipidy, jako sekundární produkt z nestabilních hydroperoxidů (TBARPs, *thiobarbituric acid reactive products*) (Unicam UV 550, Thermo Spectronic, Cambridge, UK) (*publikace I a II*). Stabilita membrány je důležitým parametrem ukazujícím míru poškození buněk patogenem. Funkčnost plazmalemy jsme určili pomocí konduktometrického měření (WTW, Weilheim, Germany) založeném na monitorování vylití iontů z plazmalemy do okolního média (*publikace II*).

Změny ve variabilní fluorescenci chlorofylu byly měřeny fluorimetrem PAM 2000 (Walz, Effeltrich, Germany) (*publikace I*) a PEA (Hansatech Instruments, Norfolk UK) (*publikace II*). V publikaci I byly změny absorbance u 820 nm detekovány systémem MFMS (Hansatech, King's Lynn, UK). V *publikaci II* jsme využili techniku fluorescenčního imagingu FluorCam 700MF (Photon System Instrument, Brno, Czech Republic) pro detekci místních a časových změn fluorescence chlorofylu na celé ploše listu.

Obsah fotosyntetických pigmentů byl zjištěn spektrofotometricky (Unicam UV 550, Thermo Spectronic, Cambridge, UK) (*publikace II*). Dále bylo posuzováno zastoupení jednotlivých pigmentů xantofylového cyklu pomocí HPLC (Aliance 2695 Separations Module, Waters, USA) (*publikace I a II*). Pro zjištění ochranné role WWC jsme spektrofotometricky (Unicam UV 550, Thermo Spectronic, Cambridge, UK) sledovali aktivity antioxidantních enzymů: APX, GR, CAT a SOD (*publikace I*). Aktivita guaiakolové peroxidasy (POX) byla zjišťována v *publikaci III*.

Změny v rychlosti asimilace CO₂, po vystavení rostlin abiotickému (*publikace I*) nebo biotickému stresu (*publikace II*), byly měřeny pomocí otevřeného gazometrického systému LCA-4 (ADC, Hoddesdon, UK).

Monitorování reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) bylo jedním z cílů *publikace III*. Produkce peroxidu vodíku v rostlinném pletivu byla zjišťována histochemickým barvením pomocí DAB (Fluca) a následně kvantifikována metodou Amplex-Red (*publikace III*). Histochemické barvení bylo použito i pro stanovení aktivity POX.

Pomocí fluorescenčních sond a s použitím konfokální skenovací mikroskopie byly lokalizovány ROS a RNS 2',7'- dichlorofluorescein diacetát (H₂DCF DA) a NO 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA) v rostlinném pletivu. Stanovení obsahu JA, SA, ABA bylo analyzováno metodou HPLC-MS. Změny v koncentraci proteinů teplotního šoku (HSP70) byly stanoveny pomocí metody Western blot.

Všechny použité metody a postupy jsou podrobně popsány v příložených publikacích.

7. SOUHRN VÝSLEDKŮ

7.1 Role cyklu voda-voda a konverze V na Z při modelovém oxidačním stresu

Eva Kotabová E., Radek Kaňa, Helena Kyseláková, Lenka Lípová, Ondřej Novák, Petr Ilík (2008): A pronounced light-induced zeaxanthin formation accompanied by unusually slight increase in non-photochemical quenching. A study with barley leaves treated with methyl viologen at moderate light. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1563-1571

Jedním z našich cílů bylo studium obranných mechanismů rostlin před oxidačním poškozením. Z literatury je známo, že nejvíce podobný přirozenému oxidačnímu stresu je stres navozený MV, což je umělý akceptor elektronů z PSI (*více kapitola 6.1*).

Mírný oxidační stres rostlin byl stimulován pomocí samovolné infiltrace 10 μM MV do listových segmentů s následným ozářením světlem relativně nízké intenzity (100 μmol fotonů $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, FAR) po dobu 4 hod. Správnost funkce MV v chloroplastech listů, jako akceptoru PSI, jsme ověřovali měřením redoxního průběhu P700 indukovaným světlem (*Fig.3; publikace I*). Za těchto podmínek jsme nepozorovali žádné výrazné projevy oxidačního poškození: nedocházelo k lipidové peroxidaci ani k poklesu maximálního kvantového výtěžku fotochemie PS II (F_v/F_m) (*Tab.1; publikace I*). Pomocí elektroforézy a spektrofotometrického měření jsme zjistili, že beze změny zůstával po dobu experimentu jak obsah pigmentů, tak složení pigment-proteinových komplexů v TMb (*nepublikovaná data*).

Aplikovaný stres MV ovšem značně inhiboval aktivitu nejcitlivějšího z antioxidačních enzymů - APX a naopak stimuloval enzymatickou aktivitu GR (*Tab.1; publikace I*). K poklesu aktivity APX došlo pravděpodobně díky nedostatku Asc (substrátu APX), jehož regenerace je přítomností MV inhibována. Za podmínek, kdy je Asc pro APX nedostupný, dochází k inhibici a následnému rozkladu APX pomocí H_2O_2 (*Miyake a Asada 1996, Mano a kol. 2001*) (*více kapitoly 3.2 a 3.4*). Zvýšená spotřeba Asc korespondovala s nárůstem aktivity GR, což je jeden z enzymů podílející se na regeneraci Asc.

Pozorovali jsme výrazný pokles v rychlosti asimilace CO_2 a vodivosti průduchů (*Tab. 1; publikace I*). K uzavírání průduchů dochází s největší pravděpodobností díky H_2O_2 (*Pei a kol., 2000*), který se při stresu navozeném MV akumuluje (*Kim a Lee, 2005*). Ověřili jsme gazometrickým měřením, že uzavírání průduchů nebylo primární příčinou inhibice fixace CO_2 , jelikož intercelulární koncentrace CO_2 nebyla infiltrací MV změněna. Příčinou mohl být

nedostatek NADPH, anebo poškození některého z enzymů Calvinova cyklu (Tanaka a kol., 1982).

De-epoxidace V na Z přes A souvisí zejména s indukcí nefotochemického zhášení fluorescence (NPQ). Vysoká hodnota NPQ *in vivo* koreluje s vysokým obsahem Z v TmB (Demmig-Adams 1990; Gilmore a Yamamoto 1993). V naší práci jsme poukázali na nerovnováhu mezi vysokým obsahem Z a nízkou hodnotou NPQ, které byly pozorovány při použité pěstební ozáření (100 μ mol fotonů m⁻² s⁻¹, FAR) v přítomnosti MV (Fig.2A; publikace I). Vysoká míra konverze V na Z za přítomnosti MV bývá obvykle přisuzována stimulaci ETR (Büch a kol., 1994). Stimulace ETR přispívá k acidifikaci lumenu a tím k aktivaci enzymu VDE a protonaci Asc. V našem případě však ke stimulaci ETR vlivem MV nedocházelo, naopak po 4 hodinovém vystavení světelným podmínkám klesla rychlost ETR na 85% původní hodnoty (Fig.2B; publikace I). Z našich výsledků vyplývá, že rychlost ETR byla limitována světlem a tedy nedocházelo k acidifikaci lumenu v takové míře, která by byla dostačující pro vznik zhášecích center s účastí Z. Z výsledků dále vyplynulo, že limitujícím faktorem pro fungování VDE je uvolnění V z LHC. Předpokládáme, že v našem případě k uvolnění V z LHC přispívá právě oxidační stres navozený aplikací MV. Dále jsme zjistili, že de-epoxidace V, která je podmíněná trans-cis izomerací V v LHCII (viz kap. 3.3), je závislá na spektru použitého zdroje světla a je stimulována světlem v Soretově oblasti spektra (konferenční příspěvek III).

Zvyšování míry de-epoxidace je obecným rysem během aklimace na zvýšenou ozáření a souvisí s ochrannou funkcí Z. Z má nižší singletní energetickou hladinu než je singletní hladina Chl_a a rostlina pomocí Z může disipovat nadbytečnou excitační energii, která by jinak způsobovala fotoinhibiční poškození (Demmig-Adams 1990; Demmig-Adams a Adams 1996) (více kapitoly 3.3 a 3.3.1). V listech ječmene jarního infiltrovaných 10 μ M MV jsme pozorovali při pěstební ozáření výraznou stimulaci de-epoxidace V.

Během 4 hod osvitů po aplikaci MV však došlo také k cca 50 % nárůstu pigmentů xantofylového cyklu (Tab.1; Fig. 1; publikace I). Abychom ověřili, že A a Z nejsou nasyntetizovány při osvitě s MV přímo, ale že vznikly konverzí z V, provedli jsme dodatečný experiment s inhibitorem VDE. Zjistili jsme, že přidáním 1 mM DTT byla produkce Z zcela inhibována (nepublikovaná data). Na základě experimentů jsme mohli vyslovit závěr, že v listech ošetřených MV, měl nárůst DEPS původ v enzymatické de-epoxidaci V zprostředkované pomocí aktivity VDE.

7.2 Změny ve fotosyntetických reakcích při biotickém stresu vyvolaném PEMV

Helena Kyseláková, Jitka Prokopová, Jan Nauš, Ondřej Novák, Milan Navrátil, Dana Šafářová, Martina Špundová, Petr Ilík (2011): Photosynthetic alterations of pea leaves infected systemically by Pea enation mosaic virus: A coordinated decrease in efficiencies of CO₂ assimilation and photosystem II photochemistry. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 1279-1289

Při kompatibilní interakci virus-rostlina dochází po vniknutí viru k jeho okamžité replikaci za využití replikačního aparátu hostitele, akumulaci virových částic, jejich mezibuněčnému a systémovému šíření, potlačení obranných reakcí hostitele a nastávají velké změny v genové expresi. Při kompatibilní interakci: enační mozaika (PEMV) - hrách, která se řadí mezi nejčastější virózy hrachu v ČR i ve světovém měřítku, dochází až k 80 % ztrátě výnosu semen. Není to dávno, kdy se výzkum interakcí hostitel-patogen začal zabývat podrobně změnami v primárním metabolismu hostitele a hledáním jejich příčin. Jelikož PEMV zatím nebyla v patologických studiích věnována odpovídající pozornost, provedli jsme velmi podrobnou analýzu fotosyntetických parametrů, které PEMV infekce u hostitelské rostliny ovlivňuje.

V první fázi experimentu (5 dpi) nebyl zjištěn žádný rozdíl ve fotosyntetických ani fyziologických parametrech mezi kontrolami a infikovanými (PEMV) rostlinami. Což bylo potvrzeno výsledky real-time PCR, kdy 5 dpi ještě nedošlo k systémovému rozšíření virové *RNA-I* do studovaných listů na listy inokulovanými (viz kapitola 6.2; Obr.20). Stanovení *RNA-I* ve vzdálených listech nad listy inokulovanými bylo „markerem“ šíření viru v rostlině. V této fázi od bylo zjištěno největší relativní zastoupení virových částic v místě inokulace a v nově se vyvíjejících listech na vrcholu rostliny (Fig.1; publikace II).

PEMV infekce způsobila v rozsahu 15dpi - 40dpi pokles v rychlosti fotosyntetické asimilace CO₂ (P_N) a stomatální vodivosti. U kontrol podstupujících přirozenou senescenci, došlo k poklesu obsahu Chl, který koreloval s poklesem rychlosti asimilace CO₂, ovšem u PEMV byl pokles rychlosti asimilace CO₂ mnohem markantnější (Fig.5; publikace II). Usoudili jsme, že snížená průduchová vodivost spolu s hromaděním asimilátů v listech (nárůst Ci), sníženou fotochemickou účinností PSII a možný pokles karboxylační kapacity RUBISCO by mohly být považovány za faktory limitující rychlost fixace CO₂ v listech infikovaných PEMV. Další možné vysvětlení poklesu stomatální vodivosti je akumulace virových částic ve svěracích buňkách průduchů (Synková a kol., 2006; Schnablová a kol., 2005). Nemůžeme

také vyloučit, že k nárůstu počtu uzavřených průduchů mohla přispívat virem vyvolaná produkce H₂O₂ (Zhang a kol., 2001).

Měření velmi rychlé fluorescenční indukce (křivka O-J-I-P) potvrdilo poškození PSII způsobené virovou infekcí (Fig.9; publikace II). Se systémovým rozvojem infekce byl spojen nárůst relativní výšky vlny J (V_J) v křivce indukce, což odráží nárůst Q_B neredukujících center fotosystému II v thylakoidních membránách Chlps. Parametr W_K ($W_K = (F_K - F_0) / (F_J - F_0)$), kde hodnoty F jsou intenzity fluorescence v určitých místech O-J-I-P křivky) začal narůstat u PEMV-rostlin 15 dpi, naopak u kontrol až 40 dpi. Objev vlny K v O-J-I-P křivce (200-300μs) u PEMV je indikátorem narušení funkce PSII na donorové straně v místě OEC (komplexu vyvíjejícího kyslík). Objev vlny K u kontrol 40dpi považujeme za charakteristický znak senescence (Liu a kol. 2006, Prakash a kol., 2003).

Z měření chlorofylového „imagingu“ jsme zjistili, že pokles v hodnotách Φ_{PSII} a naopak nárůst v nefotochemickém zhášení (NPQ) nastával nejdříve u okrajů listové čepele a s přibývajícím dobou od inokulace se nižší/vyšší hodnoty jednotlivých parametrů vyskytovaly po celé ploše listové čepele (Fig.7; publikace II).

Předpokládáme, že PEMV-infekce urychlila proces senescence u rostlin hrachu, stejně jako dříve popsali u virových infekcí Funayama-Noguchi (2001) nebo Arias a kol. (2003). Po systémovém rozšíření viru v rostlině (30 a 40dpi) jsme zaznamenali: pokles v rychlosti asimilace CO₂, snížení obsahu Chl a Car (Fig.4; publikace II), akumulaci ROS a RNS (publikace III), oxidační poškození (Fig.3; publikace II) (peroxidace membránových lipidů) a ztrátu celistvosti buněčných membrán (porušení plazmalemy). Bylo publikováno, že virovou infekcí způsobený pokles rychlosti asimilace CO₂ je spojený s akumulací sacharidů, jež zpětnovazebně inhibuje fotosyntézu rostlin (Herbers a kol., 2000; Arias a kol., 2003; Noodén a kol., 2004; Wingler a kol., 2006). U čeledi *Luteoviradae*, kam se řadí rod *Enamovirus* (PEMV-1), byl výše popsán efekt ovlivňující rychlost fotosyntetických reakcí také publikován (Conçalves a kol., 2005; Lehrer a kol., 2007). Omezení transportu asimilátů a jejich následná akumulace je spojována s nárůstem aktivity invertasy buněčné stěny a následnou akumulací hexóz (Kocal a kol., 2008; Essmann a kol., 2008). Další limitací, která brání volnému toku asimilátů u rostlin napadených viry, je tvorba tzv. vezikulárních struktur. V rostlinných pletivech infikovaných PEMV byly objeveny membránové vezikulární struktury v plasmodesmech, sítkovicích a floému (De Zoeten a Gaard, 1983).

PEMV infekce vyvolala degradaci celkových xantofylů (VAZ), avšak obsah Z byl u infikovaných rostlin oproti kontrolám navýšen. Dále jsme zjistili, že virová infekce, zejména v pozdních stádiích (30 a 40dpi) vyvolala navýšení míry de-epoxidace V. Byla zjištěna

pozitivní korelace mezi nárůstem de-epoxidovaných xantofylů ($DEPS = \frac{([Z] + [A])}{([V] + [A] + [Z])}$) a NPQ (Fig.8; publikace II), což odlišný závěr od publikace I. Ukázali jsme, že virová infekce značně omezila elektronový transport v TmB a stimulovala tepelnou disipaci excitovaných molekul Chl v infikovaných listech. Podobný trend ve zvýšení míry de-epoxidace V, pozorovala u senescentních listů Vlčková a kol. (2006). Špundová, a kol. (2005) poukazují na obrannou roli xantofylového cyklu před fotooxidací v senescentních listech ječmene zejména při vyšších ozářenostech. Pokles v obsahu celkových xantofylů (VAZ) v důsledku infekce virem PVY (virus bramboru Y) zaznamenala ve své studii na rostlinách tabáku Synková a kol.(2006), což vysvětlují vyšší citlivostí infikovaných rostlin k vysoké ozářenosti. Vyšší hodnoty NPQ byly zjištěny u náchylných kultivarů tabáku (Samsun a SR1) po napadení virem bramboru Y (PVY) (Ryšlavá a kol. 2003).

Usuzujeme, že snížení asimilace CO₂ vyvolané PEMV infekcí mělo vliv na průběh stromálních reakcí, což se projevilo na snížení kvantového výtěžku fotochemické funkce PSII. Stimulace NPQ u infikovaných rostlin je zpětnovazebnou odpovědí stresované rostliny. Následkem zvyšující se NPQ se snižuje ETR v TmB (Demmig-Adams a Adams, 2006). Stimulace de-epoxidace V a NPQ, které jsme pozorovali v pozdějších fázích infekce (30 a 40dpi), tedy mohla přispívat k udržení rovnováhy mezi asimilací CO₂ a funkcí PSII u PEMV.

7.3 ROS, RNS a hormonální nerovnováha při biotickém stresu vyvolaném PEMV

Helena Kyseláková, Michaela Sedlářová, Martin Kubala, Vladimíra Nožková, Jana Píterková, Lenka Luhová, Ondřej Novák, Petr Ilík (2012): Reactive oxygen and nitrogen species and hormone signalling in systemic infection of pea by pea enation mosaic virus. *Plant Protection Science – v recenzním řízení*

V tomto projektu, který navazuje na publikaci II, jsme pracovali se stejným patosystémem: *Pisum sativum* cv. Merkur (náchylný genotyp)-PEMV. Ve stejných časových intervalech byly odebírány vzorky a studována byla reakce rostlin vystavených působení současnému vlivu různých stresových faktorů. Jak již bylo zmíněno, studovali jsme kompatibilní interakci, mezi hostitelskou rostlinou a virem, při které dojde ke kolonizaci hostitelské rostliny a propuknutí infekce. Naopak nekompatibilní interakce je charakteristická rychlým spuštěním obranných mechanismů, signalizačních drah hormonů, akumulací ROS, RNS, které brání rozšíření patogenu v rostlině a snaží se patogen v místě penetrace zabavit

výživového základu (HR). Nicméně je to právě kompatibilní interakce, která způsobuje značné ztráty v zemědělství, proto by se těmto interakcím měla věnovat zvláštní pozornost (více kapitoly 4 a 4.1.2).

Po vystavení rostlin mechanickému stresu, který je nezbytný pro úspěšnou virovou inokulaci, byly rostliny inokulovány buď pomocí inokula s PEMV anebo inokulem neobsahujícím virové částice (mock). Zaměřili jsme se na detekci vlivu patogenezise na produkci signálních molekul NO a H₂O₂, HSP70, hladiny hormonů ABA, SA a JA, a aktivitu POX. Pomocí histochemických metod byla v infikovaném rostlinném pletivu lokalizována tvorba H₂O₂, dále byla provedena *in situ* lokalizace aktivity POX. NO byl histochemicky detekován pomocí fluorescenční sondy DAF-FM DA, k detekci reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů (RNOS) byla použita méně specifická značka H₂DCF DA, která reaguje především s H₂O₂ a ONOO⁻.

Vliv mechanického poškození pletiva při inokulaci byl testován v experimentu porovnávajícím produkci HSP70 u intaktních rostlin, „mock“-inokulovaných (MI) a infikovaných PEMV. Z našich výsledků měření hladiny HSP70 je zřejmé, že odráží nejen projev systémové virové infekce, ale také inokulace a senescence. Hromadění HSP70 může být potřebné pro komplementaci virionů anebo pro průchod viru přes plasmodesmy (*Escaler a kol., 2000; Peremyslov a kol., 1999; Maule a kol., 2002*). S rostoucí dobou od inokulace, narůstala i míra oxidačního stresu a tím rostlo také poškození proteinů. Jako odpověď na tento stav jsme pozorovali nárůst v hladině HSP70.

Již 5dpi byl zaznamenán systémový nárůst hladiny ABA v měřených listech, což ještě nemůžeme považovat za následek systémového rozšíření virové infekce, jelikož PCR metodou bylo potvrzeno, že systémové rozšíření virové *RNA-1* nastalo až 15dpi (*Fig.1; publikace III*). Obsah ABA dosáhl maximama 15 dpi (*Fig.3; publikace III*). Nárůst endogenního obsahu ABA zjistil i u listů rýže infikovaných virem čárkovitosti rýže (*Rice tungro virus, RTV*) (*Mohanty a kol., 1979*). Velice často je nárůst ABA spojován s vodním deficitem. Na zvýšenou endogenní hladinu ABA rostlina reaguje uzavíráním svěřacích buněk průduchů, čímž dojde ke snížení transpirace (*Pei a kol., 2000*). Ukázalo se, že v našem případě nebyl časný nárůst v hladině ABA spojený se zavíráním stomat (*Fig.5; publikace II*). Dále je známo, že ABA se spoluúčastní při regulaci senescence, opadu listů, kvetení, dornanci a syntéze enzymů (*Mohanty a kol., 1979*). Ovšem primární roli během senescence mají auxin a ethylen, účinek ABA spočívá ve zvýšení biosyntézy ethylenu. Dále ABA zvyšuje míru lipidické peroxidace, indukuje nárůst aktivit proteas, RNAas a změny v membránové permeabilitě (*Panavas a kol., 1998*). Můžeme také usuzovat, jako ve studii *Anderson a kol.,*

(2004b), že nárůst ABA může mít regulující efekt na signální dráhu JA/ET (viz kapitola. 4.3 a 5.2.3). Nárůst ABA, který se vyskytuje se při kompatibilní interakci, potlačuje signalizaci SA a HR (Cao a kol., 2011). Bylo zjištěno, že SA indukuje mechanismy rezistence proti virové infekci (Radwan a kol., 2007). Hladina SA dosáhla svého maxima u MI variant 5 dpi a od tohoto okamžiku postupně klesala. U PEMV jsme pozorovali nárůst SA 15dpi, kdy bylo potvrzeno systémové rozšíření virové PEMV-1 RNA po rostlině pomocí real time-PCR (Fig. 1; publikace III). Podobný výsledek zjistili Baebler a kol. (2011) u kompatibilní interakce mezi PVY a rostlinami bramboru, kdy zvýšená hladina SA potlačila multiplikaci a rozšíření viru. SA může inaktivovat CAT, čímž dochází ke zvýšení koncentrace H₂O₂ v rostlinných buňkách (Lamb a Dixon, 1997). Jak již bylo prokázáno několika autory (např. Spoel a kol., 2003, Radwan a kol., 2008), i my jsme potvrdili antagonistický vztah mezi změnami v hladinách SA/JA u studovaného patosystému (Fig. 3B,C; publikace III). V našem případě zřejmě došlo k inhibici JA signálem SA s tím, že obsah JA v rostlinném pletivu u všech variant narůstal se zvyšujícím se časovým úsekem od inokulace. Ve studii provedené na modelu TMV-tabák (*Nicotiana tabacum*) se ukázalo že SA narůstá okamžitě po inokulaci, zato hodnoty JA zůstávají redukováné až do 4dpi. Infekce TMV tedy potlačila signál z poranění (wound signal) tzn., udržovala nízkou hladinu JA. (Preston a kol., 1999). Clarke a kol., (2000b) zaznamenali dvojfázový nárůst v hladině JA. První maximum bylo dosaženo v časovém úseku hodiny po inokulaci a druhé zjistili, až se systémovým rozšířením virové infekce tzn., v čase, kdy dochází k poškození membrán, degradaci chlorofylu a akumulaci antokyanů. Pozdější nárůst obsahu JA, u všech zkoumaných variant můžeme pokládat za znak senescence (He a kol. 2002). Předpokládáme, že v našem případě se SA podílela na akumulaci JA. Na druhou stranu exogenně aplikovaná JA způsobuje expresi několika obranných genů např., fenylalaninamoniaklyasy PAL a lipoxygenasy. Skutečnost, že PAL je hlavním enzymem v biosyntéze fenolických sloučenin zahrnujících SA poukazuje na možnou interakci mezi oběma signály, které musí být během kompatibilních interakcí potlačeny. Arias a kol., (2005) poukázal na skutečnost, že se při kompatibilních interakcích nemůže zapomínat na to, že zvýšená aktivita antioxidantních enzymů, brání signalizační funkci ROS.

Studiem ROS a RNS jsme chtěli odhalit změny, které probíhají při kompatibilní interakci rostlina-virus. Podle našich výsledků byl nárůst v propustnosti membrán (Fig. 3B; publikace II) provázen poklesem aktivity volné POX (Fig. 5; publikace III). V našem případě byl pokles v aktivitě volné POX provázen snížením obsahu Chl a Car (Fig. 4A,B; publikace II). Předpokládá se, že nárůst v aktivitě POX přispívá k rozvoji oxidačního stresu u systémových interakcí virus-rostlina (Riedle-Bauer, 2000). Riedle-Bauer (2000) předpokládá, že zvýšená

POX aktivita může způsobit oxidaci kyseliny indol-3-octové (IAA, auxin), a tím být zodpovědná za růstové redukce a malformace u rostlin infikovaných virem. Drobné nádorovité výrůstky na žilkách na spodní straně listů, nazývané též histoidní enace, jsou typickým projevem PEMV (*Fig 1A, B, C; publikace III*). Bylo zjištěno, že za histopatologické změny v rostlinném pletivu (hypertrofie, hyperplazie, enace) je odpovědná zvýšená koncentrace cytokininů, respektive narušení rovnováhy mezi obsahem auxinů a cytokininů, které jsou regulátory buněčného cyklu (*Šutić a Sinclair, 1991*). Listový parenchym hrachu po infekci PEMV získává opět schopnost dělit se, tj. vlastnosti meristému, podobně jako u podobných modelů rostlina-virus (*Choi a kol., 2011*). Změny v anatomii indukují změny v koncentracích hormonů a signální molekuly tj., RONS. Za pomoci histochemických metod jsme detekovali nejvyšší aktivitu POX v místech vývoje enací (abaxiální strana listu, v blízkosti žilek) a signál byl silnější s rozvojem symptomů infekce (*Fig.7; publikace III*). Produkce oxidu dusnatého (NO) byla zvýšena s rozvojem virové infekce. NO společně s dalšími RNS a ROS zprostředkovává buněčné účinky hormonů na molekulární úrovni. NO reguluje syntézu SA, JA a ET během obranné reakce na vnější stresové faktory.

Z našich výsledků vyplývá, že intenzita oxidačních procesů, jež ovlivňuje hladiny hormonů, určuje náchylnost hrachu k PEMV. Systémové rozšíření virových částic po rostlině potvrdila 15dpi real-time PCR, ale také nárůst hladin SA a ABA a zvýšená aktivita POX. Nízká aktivita antioxidantních enzymů, měla za následek akumulaci RONS a také rozvoj symptomů virózy. Lokální akumulace RONS v listech byla zaznamenána v oblastech přestavby pletiva při vzniku enací, které jsou doprovázeny často chlorózami.

V rámci tohoto projektu byla studována možná role NO (*více kapitola 4.4*) v interakci rostlina-patogen během infekce se zaměřením na možnou úlohu NO v systémové reakci u modelového systému *Pisum sativum* cv. Merkur – PEMV. Byla detekována systemická odezva ve formě narůstající produkce NO v intaktních listech sousedících s listy inokulovanými. U infikovaného náchylného genotypu hrachu byla v infikovaných pletivech lokalizována zvýšená produkce NO konfokální laserovou mikroskopií s využitím fluorescenční sondy H₂DCF DA. Produkce NO pozorovaná v intaktních listech sousedících s inokulovaným listem, spolu se zvýšenou produkcí NO lokalizovanou ve vyvíjejících se enacích na abaxiální straně listů v okolí žilek, demonstruje komplexní roli NO v interakcích rostlina-patogen. Na základě získaných výsledků lze předpokládat zapojení NO v reakci studovaného náchylného genotypu *Pisum sativum* při infekci virem PEMV. Určitě by bylo vhodné rozšířit studii a zabývat se změnami nejen u náchylného genotypu, ale i genotypů s různým stupněm rezistence vůči PEMV. *Piterková a kol. (2009)* pozorovali velké změny

v produkci NO zejména u rezistentních genotypů rajčete v obraně proti padlí rajčatovému *O. neolycopersici*. Autoři předpokládají, že zapojení NO do obranných reakcí probíhá s různou intenzitou a mechanismem v závislosti na stupni odolnosti jednotlivých genotypů. NO a H₂O₂ tak pravděpodobně tvoří důležitou část molekulárních mechanismů rezistence rajčete k *O. neolycopersici*.

8. ZÁVĚRY

Práce je postavena jak na výsledcích modelových experimentů simulujících oxidační stres v listech rostlin tak na výsledcích získaných na celých rostlinách, kde byl oxidační stres navozen inokulací virem PEMV.

Modelový oxidační stres vyvolaný methyl viologinem se projevil výraznou de-epoxidací violaxanthinu a poklesem aktivity APX. Nicméně na mírnost zvoleného modelového oxidačního stresu poukazuje nezměněný obsah produktů lipidové peroxidace, fotosyntetických pigmentů a beze změn zůstaly i hodnoty maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII (F_V/F_M). Během modelového stresu jsme při slabé ozářenosti pozorovali výraznou nerovnováhu mezi vysokou hladinou Z a relativně nízkým nefotochemickým zhášením (NPQ) excitací v PSII. Usuzujeme, že během oxidačního stresu došlo pouze k omezené vazbě Z na LHCI a tudíž nevznikaly Z-zhášecí centra. Je známo, že enzym VDE je *in vivo* aktivní i za nižších intenzit světla, proto je za faktor limitující jeho aktivitu považováno uvolnění V z pigment-proteinových komplexů. Námí zvolený mírný oxidační stres vyvolaný MV k tomuto uvolnění V z LHC do lipidové fáze TmB výrazně přispěl. Z našich výsledků vyplývá, že i přes světelnou limitaci transportu elektronů v TmB, docházelo k takové acidifikaci lumenu, jež byla dostačující pro aktivaci enzymu VDE. Ovšem nedocházelo k acidifikaci lumenu v takové míře, která by byla dostačující pro vznik zhášecích center v LHC II s účastí Z. Dílčím závěrem bylo i to, že de-epoxidace je za modelových podmínek mírného oxidačního stresu silně závislá na spektru použitého zdroje světla a je stimulována zejména v Soretově oblasti spektra (350-450 nm). Tyto modelové výsledky mohou výrazným způsobem přispět k odhalení limitací v antioxidačních reakcích, které se uplatňují v rostlinách *in vivo* za stresových podmínek.

V projektu, kde byl oxidační stres navozen inokulací patogenem, byla sledována odezva fotosyntetických reakcí u náchylného genotypu hrachu setého na infekci PEMV. Prvotní pokles v asimilaci CO₂, který koreloval s poklesem hodnot účinnosti fotochemie PSII (Φ_{PSII}), jsme zaznamenali u infikovaných rostlin v čase 15dpi, kdy byla metodou PCR ověřeno systémové rozšíření virové *PEMV-1 RNA* do sledovaných listů. Funkce PSII nebyla výrazně poškozena během celého experimentu. Z měření chlorofylového „imagingu“ jsme zjistili, že pokles v hodnotách Φ_{PSII} a naopak nárůst v nefotochemickém zhášení (NPQ) nastával nejdříve u okrajů listové čepele a s přibývajícím dobou od inokulace se nižší/vyšší hodnoty jednotlivých parametrů vyskytovaly po celé ploše listové čepele. Virová infekce

vyvolala silný oxidační stres 30 a 40dpi, který jsme zaznamenali v podobě lipidové peroxidace a porušení integrity plazmalemy. V tomto časovém úseku byly zaznamenány projevy infekce, kterými jsou mozaikovitost listů a tvorba enací na abaxiální straně listové čepele. Byla zjištěna pozitivní korelace mezi fotoprotektivními mechanismy tzn. nárůstem de-epoxidovaných xantofylů (DEPS) a NPQ, což je odlišný výsledek od studie zabývající se modelovým oxidačním stresem (*publikace 1*). PEMV infekce způsobila u rostlin hrachu urychlení procesu přirozené senescence. Měření velmi rychlé fluorescenční indukce Chl (křivka O-J-I-P) potvrdilo poškození PSII způsobené virovou. Oxidační stres, ke kterému došlo v důsledku stimulované senescence, způsobil změny v Calvinově cyklu a teprve následkem toho došlo k poklesu Φ_{PSII} a to odpovídající měrou (Φ_{PSII}/Φ_{CO_2} se neměnilo). Domníváme se, že inhibici Calvinova cyklu toku mohla způsobit zvýšená aktivita invertasy buněčné stěny a pak také vezikulární struktury vytvořené činností virové *PEMV-1 RNA*, které tvoří překážku volnému toku asimilátů v plasmodesmech, sítkovicích a floému.

Bylo potvrzeno, že ROS, NO a POX se podílí na reorganizaci buněčné stěny (enace-výrůstky podél žilek) během virové infekce vyvolané PEMV. Pozorovali jsme systémovou odezvu hrachu na virovou infekci ve formě narůstající produkce NO a H₂O₂ v intaktních listech sousedících s listy inokulovanými. Na základě našich výsledků předpokládáme synergistické působení NO a H₂O₂ v reakci hrachu setého na infekci PEMV. U patosystému hrách setý cv. Merkur- PEMV bylo zjištěno antagonistické chování signalizačních drah JA/SA. Překvapivě již 5 dpi byl zaznamenán systémový nárůst hladiny ABA v měřených listech, což ještě nemůžeme považovat za následek systémového rozšíření virové infekce, jelikož PCR metodou bylo potvrzeno, že systémové rozšíření *PEMV-1 RNA* nastalo až 15dpi. Se systémovým rozvojem infekce koreluje nárůst koncentrace SA.

9. CITOVANÁ LITERATURA

- Adamska, I., Ohad, I., Kloppstech, K. (1992) Synthesis of the early light-inducible protein is controlled by blue light and related to light stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2610-2613
- Adamska, I. (1997) ELIPs – Light-induced stress proteins. *Physiol. Plant.* **100**: 794-805
- Agrios, G.N. (1997) Plant Pathology 4th Ed. *Academic Press*. 1-616
- Allan, A.C., Fluhr, R. (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* **9**: 1559-1572
- Allen, R.D., Webb, R.P., Schake, S.A. (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defences. *Free Radical Biology and Medicine* **23**: 473-479
- Allen, J.F. (2003) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci.* **8**: 15-19
- Almási, A., Apatini, D., Bóka, K., Boddí, B., Gáborjányi, R. (2000) BSMV infection inhibits chlorophyll biosynthesis in barley plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **56**: 227 - 233
- Almásí A., Harsányi A., Gáborjányi R.. (2001) Photosynthesis alterations of virus infected plants. *Acta Phytopathol. et Entomol. Hungarica* **36** (1-2): 15-29
- Alscher, R.G. (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plantarum* **77**: 457-464
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Botany* **53**:1331-1341
- Amari K., Díaz-Vivancos P., Pallás V., Sánchez-Pina M.A., Hernández J.A. (2007) Oxidative stress induction by *Prunus necrotic ringspot virus* infection in apricot seeds. *Physiol. Plant* **131**: 302-310
- Ananieva, E.A., Alexieva, V.S., Popova, L.P. (2002) Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *J. Plant Physiol.* **159**: 685-693
- Anderson, J.P., Badruzaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, Ch., Maclean, D.J., Ebert, P.R., Kazana, K. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defence gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 3460-3479
- Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373-399
- Aranda, M.A., Escaler, M., Wang, D., Maule, A.J. (1996) Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 15289-15293
- Aranda, M.A., Escaler, M., Thomas, C.L., Maule A.J. (1999) A heat shock transcription factor in pea is differentially controlled by heat and virus replication. *Plant J.* **20**: 153-161
- Arias, M.C., Lenardon, S., Taleisnik, E., (2003) Carbon metabolism alternations in sunflower plants infected with the Sunflower chlorotic mottle virus. *J. Phytopathology* **151**: 267-273
- Arias, M.C., Luna, C., Rodríguez, M., Lenardon, S., Taleisnik, E. (2005) *Sunflower Chlorotic Mottle Virus* in Compatible Interactions with Sunflower: ROS Generation and Antioxidant Response. *Eur. J Plant Pathol.* **113**: 223-232
- Arora A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* **82**: 1227-1238
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 601-639
- Asada, K. (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**:1419–1431
- Asada, K. (2006) Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiol.* **141**: 391-396
- Ashby, A.M. (2000) Biotrophy and the cytokinin condurum. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **57**: 147-158
- Aspinall-O'Dea, M., Wentworth, M., Pascal, A., Robert, B., Ruban, A., Horton, P. (2002) *In vitro* reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **10**: 16331-16335
- Badger, M.R., von Caemmerer, S., Ruuska, S., Nakano, H. (2000) Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **355**: 1433-1446
- Baebler, Š., Stare, K., Kovač, M., Blejec, A., Prezelj, N., Stare, T., Kogovšek, P., Pompe-Novak, M., Rosah, S., Ravnikar, M., Gruden, K. (2011) Dynamics of Responses in Compatible Potato - Potato virus Y Interaction Are Modulated by Salicylic Acid. *PLoS ONE* **6(12)**: 1-12

- Bajguz, A., Hayat, S. (2009)** Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. and Biochem.* **47**: 1-8
- Baker, C.J., Orlandi, E.W. (1995)** Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**: 299-321
- Balachandran, S. Osmond, C.B., Makino, A. (1994)** Susceptibility of tobacco leaves to photoinhibition following infection with two strains of tobacco mosaic virus under different light and nitrogen nutrition regimes. *Plant Physiol.* **104**: 1051-1057
- Balachandran, S., Hurry, V.M, Kelley, S.E., Osmond, C.B., Robinson, S.A., Rohozinski, J. Seaton, G.G.R., Sims, D.A. (1997)** Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiol. Plant.* **100**: 203-213
- Baroli I., Niyogi K.K (2000)** Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Phil. Trans. R. Soc. Land. B* **355**: 1385-1394
- Bari, R., Jones, J.D.G. (2009)** Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* **69**: 473-488
- Bassi, R., Caffari, S. (2000)** Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls. *Photosynth. Res.* **64**: 243-256
- Benešová, K., Mikulíková, R., Běláková, S., Svoboda, Z., Psota, V. (2011)** Identifikace látek vznikajících při interakci patogen – obilka a jejich vliv na kvalitu sladu. *Kvasný průmysl* **57(1)**: 2-7
- Berger, S., Sinha, A.K., Roitsch, T. (2007)** Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J. Exp. Botany* **58**: 4019-402
- Bestwick, C. S., Brown, I. R., Bennett, M. H. R., Mansfield, J. W. (1997)** Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* **9**: 209-221
- Bhattacharjee, S. (2005)** Reactive oxygen and oxidative burst: Roles in stress senescence and signal transduction in plants. *Curr. Sci.* **89**: 1113-1121
- Biemelt, S., Sonnewald, U. (2006)** Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *J Plant Physiol.* **163**: 307-318
- Bilger, W., Björkman, O., Thayer, S.S. (1989)** Light induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. *Plant Physiol.* **91**: 542-551
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003)** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* **91**:179-194
- Bol, J.F., Linthorst, H.J.M., Cornelissen, B.J.C. (1990)** Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**: 113-138
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibayeva, F. (2002)** The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Botany* **53**: 1367-1376
- Bolwell, G.P., Daudi, A. (2009)** Reactive Oxygen Species in Plant-Pathogen Interaction. In: Reactive Oxygen Specie in Plant Signaling, del Río L.A., Puppo A. (eds.) Springer 113-133
- Bokov, A., Chaudhuri, A., Richardson, A. (2004)** The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing and Dev.* **125**: 811-826
- Bonas, U., Lahaye, T. (2002)** Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Opinion Microbiol.* **5**: 44-50
- Bos, L. (1999)** Plant viruses, unique, and intriguing pathogen - a textbook of plant virology, Backhuys Publishers, Leyden
- Boston, R.S., Viitanen, P.V., Vierling, E. (1996)** Molecular chaperones and protein holding in plants. *Plant Mol. Biol.* **32**: 191-222
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Hugueney, P., Marin, E., Marion-Poll, A., Camara, B. (1996)** Xanthophyll biosynthesis – Cloning, expression, functional reconstitution of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J. Biol. Chem.* **271**: 28861-28867
- Bowle, D. (1990)** Defense-related proteins in a higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 873-907
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D. (1994)** Superoxide dismutase in plants. *CRC Critical Reviews in Plant Sci.* **13**: 199-218
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (2000)** Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists
- Büch, K., Stransky, H., Bigus, H.J., Hager, A. (1994)** Enhancement by artificial electron acceptors of thylakoid lumen acidification and zeaxanthin formation. *J. Plant Physiol.* **144**: 641-648
- Büchen-Osmond, C., (2006)** Enamovirus. ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4: 00.039.0.03.
- Cao, F.Y., Yoshioka, K., Desveaux, D. (2011)** The role of ABA in plant-pathogen interactions, *J. Plant Res.* **124**: 489-499
- Capone, R., Tiwari, B.S., Levine, A. (2004)** Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 425-428

- Casano LM., Martín M., Zapata JM. and Sabatter B. (1999) Leaf age- and paraquat concentration-dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress. *Plant Science* **149**: 13-22
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A., Klessig, D.F. (2000) Nitric Oxide Inhibition of Tobacco Catalase and Ascorbate Peroxidase. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **13**(12): 1380–1384
- Clarke, S.F., Burritt, D.J., Jameson, P.E., Guy, P.L. (1998) Influence of plant hormones on virus replication and pathogenesis-related proteins in *Phaseolus vulgaris* L. infected with *white clover mosaic potexvirus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **53**: 195-207
- Clarke, S.F., McKenzie, M.J., Burritt, D.J., Guy, P.L., Jameson, P.E. (1999) Influence of white clover mosaic potexvirus infection on the endogenous cytokinin content of bean. *Plant Physiol.* **120**: 547-552
- Clarke, S.F., Burritt, D.J., Jameson, P.E., Guy, P.L. (2000a) Effect of plant hormone on white clover mosaic potexvirus double-stranded RNA. *Plant Pathol.* **49**: 428-434
- Clarke, S.F., Guy, P.L., Jameson, P.E., Schmiere, D., Burritt, D.J. (2000b) Influence of *white clover mosaic potexvirus* infection on the endogenous levels of jasmonic acid and related compound in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *J. Plant Physiol.* **156**: 433-437
- Clarke, S.F., Guy, P.L., Burritt, D.J., Jameson, P.E. (2002) Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiologia Plantarum* **114**:157-164
- Conconi, A., Miquel, M., Browse, J.A., Ryan, C.A. (1996) Intracellular levels of free linolenic acid and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.* **111**: 797-803
- Crawford, N.M. (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot* **57**: 471-478
- Čača, Z., Kollár, V., Novák, J.B., Zvára, J. (1981) *Zemědělská fytopatologie*. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. pp 344
- Dangl, J.L., Jones, J.D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–833
- Dat, J.F., Vandenabeele, S., Vranová, E., van Montagu, M., Inzé, D., van Breusegem, F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* **57**: 779-795
- Dat, J.F., Pellinen R., Beeckman T., van De Cotte B., Langebartels, Ch., Kangasjärvi J., Inzé D., van Breusegem, F. (2002) Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J.* **33**: 621-632
- De Gara, L., de Pinto, M.C., Tommasi, F. (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochem.* **41**: 863-870
- De Zoeten, G.A., Gaard, G. (1983) Mechanisms underlying systemic invasion of pea plants by pea enation mosaic-virus. *Intervirology* **19**: 85-94
- del Río, L.A., Pastori, G.M., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Sevilla, F., Corpas, F.J., Jiménez, A., López-Huertas, E., Hernández, J.A. (1998) The Activated Oxygen Role of Peroxisomes in Senescence. *Plant Physiol.* **116**: 1195-1200
- del Río, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gomez, M., Barroso, J.B. (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Botany* **53**: 1255-1272
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B. (2006) Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. *Plant Physiol.* **141**: 330-335
- Delledonne M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, Ch. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature.* **394**: 585-588
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, Ch. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 13454-13459
- Delledonne, M. (2005) NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 390-396
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**: 1-24
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W.III. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Sci.* **1**: 21-26
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W.III. (2006) Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.* **172**:11-21
- Demler, S. A., Borkhsenius, O. N., Rucker, D. G., de Zoeten, G. A. (1994) Assessment of the autonomy of replicative and structural functions encoded by the luteo-phase of pea enation mosaic-virus. *Journal of General Virology* **75**: 997-1007
- Dempsey, D.A., Shah, J., Klessig, D.F. (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**: 547-575
- Dermastia, M., Ravnikar, M., Kovač, M. (1995) Increased cytokinin-9-glucosylation in roots of susceptible *Solanum tuberosum* cultivar infected by potato virus YNTN. *MPMI* **8**: 327-330

- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., Neill, S. (2002)** A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **99**: 16314-16318
- Desikan, R.J., Hancock, J.T., Neil, S.J. (2003)** Oxidative stress signaling. In: Hirt, H., Shinozaki, K. (eds) Plant responses to abiotic stresses: topic in current genetics. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, pp 121-148
- Desikan, R., Cheng, M.K., Clarke, A., Golding, S., Sagi, M., Fluhr, R. (2004)** Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Funct Plant Biol* **31**: 913-920
- Diaz-Vivancos P., Rubio M., Mesonero V., Periago P.M., Ros Barcelo A., Martínez-Gómez P., Hernández J.A. (2006)** The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term *Plum pox virus* infection. *J Exp. Bot.* **57**: 3813-3824
- Dixon, R.A. (2001)** Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847
- Dostálová, R., Ondřej, M., Trojan, R., Hasalová, I., Tyller, R. (2008)** Šlechtění hrachu na rezistenci proti komplexu významných patogenů. *Významné choroby hlavních šlechtitelských plodin- Šlechtitelský seminář*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., pp. 32-36
- Doubnerová, V., Janošková, M., Synková, H., Šubr, Z., Čerovská, N., Ryšlavá, H. (2007)** Effect of potato virus Y on the activities of antioxidant and anaplerotic enzymes in *Nicotiana tabacum* L. transgenic plants transformed with the gene for P3 protein. *Gen. Appl. Plant Physiol.* **33**: 123-140
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F. (1998)** Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10328-10333
- Durrant, W.E., Dong, X. (2004)** Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 185-209
- Ederli L., Pasqualini S., Batini P. and Antonioli M. (1997)** Photoinhibition and oxidative stress: effects on xanthophyll cycle, scavenger enzymes and abscisic acid content in tobacco plants. *J. Plant. Physiol* **151**: 422-428
- Edreva, A. (2005)** Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiol.* **31(1-2)**: 105-124
- Ehara Y., Misawa T. (1975)** Occurrence of abnormal chloroplasts in tobacco leaves infected systemically with the ordinary strain of cucumber mosaic virus. *Phytopath. Z.* **84**:233-252
- El-Fahaam, Y.M., Fegla, G.I., Wagih, E.E., El-Karyoni, H.A. (1990)** Biochemical changes in lettuce plants infected with lettuce mosaic virus, *J. King Saud Uni.*, 271-277
- Elstner, E.F., Osswald, W. (1994)** Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, **102B**: 131-154
- Escaler, M., Aranda, M.A., Roberts, I.M., Thomas, C.L., Maule, A.J. (2000)** A comparison between virus replication and abiotic stress (heat) as modifiers of host gene expression in pea. *Mol. Plant Pathol.* **1(3)**: 159-167
- Eskling, M., Arvidsson, P.O., Akerlund, H.E. (1997)** The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plant* **100**: 806-816
- Eskling, M., Emanuelsson, A., Åkerlund, H.E. (2001)** Enzymes and Mechanisms for Zeaxanthin – Zeaxanthin Conversion. In: E.M. Aro, B. Andersson (eds): Regulation of Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 433-452
- Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schön, H., Sonnewald, S., Weis, E., Scharte, J. (2008)** RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defence in source leaves of tobacco. *Plant Physiol.* **147**: 1288-1299
- Farrington, J.A., Ebert, M., Land, E.J., Fletcher, K. (1973)** Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochim. Biophys Acta* **314**: 372- 381
- Färber, A., Young, A.J., Ruban, A.V., Horton, P., Jahns, P. (1997)** Dynamics of xanthophyll cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants. *Plant Physiol.* **115**: 1609-1618
- Feierabend, J., Streb, P., Schmidt, M., Dehne, S., Shang, W. (1996)** Expression of catalase and its relation to light stress and stress tolerance. In: Physical Stresses in Plants: Genes and Their Products for Tolerance, Grillo S. and Leone A. (eds), pp. 223-234, Springer, Berlin
- Fridovich, I. (2001)** Oxidative Stress. *Encyclopedia of Life Sciences.* 1-5
- Fridborg, I., Grainer, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K., Angell, S. (2003)** TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of potato virus X. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**: 132-140
- Foyer, Ch., Lelandais, M., Kunert, K.J. (1994)** Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* **92**: 696-717

- Foyer, Ch., Harbinson, J. (1999)** Relationships between antioxidant metabolism and carotenoids in the regulation of photosynthesis. In: Frank, H.A., Young, A.J., Britton, G., Cogdell, R.J. (eds.). *The Photochemistry of Carotenoids*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 305-322
- Foyer, Ch., Noctor, G. (2005)** Redox homeostasis and antioxidant signalling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866-1875
- Fraser R.S.S., Whenham R.J. (1989)** Abscisic acid metabolism in tomato plants infected with tobacco mosaic virus: relationship with growth, symptoms and the *tm-1* gene for TMV resistance. *Physiol.Mol.Plant Pathol.* **34**: 215-226
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006)** Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. in Plant Biology* **9**:436-442
- Funayama S., Hikosaka K., Yahara T. (1997)** Effect of virus infection and growth irradiance on fitness components and photosynthetic properties of *Eupatorium makinoi* (Compositae). *Am. J. Bot.* **84**: 823-829
- Funayama-Noguchi S. (2001)** Ecophysiology of Virus-Infected Plants: A Case Study of *Eupatorium makinoi* Infected by *Geminivirus*. *Plant Biology* **3**: 251 – 262
- Funayama-Noguchi, S., Terashima, I. (2006)** Effects of *Eupatorium yellow vein virus* infection on photosynthetic rate, chlorophyll content and chloroplast. *Func. Plant Biology* **33**: 165-175
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A. (2006)** Early signalling events induced by elicitors of plant defenses. *MPMI* **19**: 711-724
- Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L., Blatt, M.R. (2003)** Nitric oxide regulates K^+ and Cl^- channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signalling pathways. *Proc. Nat. Acad.Sci. USA* **100**: 11116-11121
- Geschev, T.S., Hille, J. (2005)** Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J. Cell Biol.* **168**: 17-20
- Ghosh S., Mahoney S.R., Penterman J.N., Peirson D., Dumbroff E.B. (2001)** Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during *Brassica napus* senescence. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 777-784
- Gilmore, A.M., Yamamoto, H.Y. (1993)** Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to nonphotochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynth. Res.* **35**: 67-78
- Gilmore, A.M. (1997)** Mechanistic aspects of xanthophyll cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant.* **99**: 197-209
- Gilmore, A.M., Govindjee (1999)** How higher plants respond to excess light: Energy dissipation in photosystem II. In: Singhal, G.S., Renger, G., Sopory, S.K., Irrgang, K.-D., Govindjee (eds.): *Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis*. Narosa Publishing House, India, 513-548
- Glazebrook, J. (2005)** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205-227
- Gloser, J. (1998)** Fyziologie rostlin, skripta, MU Brno, ISBN 80-210-1789-9, pp. 1-157
- Goodman, R.N., Kiraly, Z., Wood, K.R. (1986)** *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. University of Missouri Press, Columbia. pp. 1-433
- Gonçalves, M.C., Vega, J., Oliveira, J.G., Gomes, M.M.A. (2005)** Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves, *Fitopatologia Brasileira* **30**: 10-16
- Grace, S.C. (2005)** Phenolics as antioxidants. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Smirnoff N. (ed.), Blackwell publishing, pp 141-168
- Grant, J.J., Loake, G.J. (2000)** Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* **124**: 21-29
- Grant, M., Lamb, C. (2006)** Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 414-420
- Greenberg, J.T. (1996)** Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12094–12097
- Greenberg, J.T. (1997)** Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 525-545
- Grotz, B., Molnar, P., Stransky, H., Hager, A. (1999)** Substrate specificity and functional aspects of violaxanthin-de-epoxidase, an enzyme of the xanthophyll cycle. *J. Plant Physiol.* **154**: 437-446
- Grover, A. (1993)** How senescing leaves lose photosynthetic activity. *Curr. Sci.* **64**: 226-234
- Gruszecki, W.I. Strzalka, K. (1991)** Does the xanthophyll cycle take part in the regulation of fluidity of the thylakoid membrane? *Biochem. Biophys. Acta* **1060**: 310-314
- Guo, A.L., Salih, G., Klessing, D.F. (2000)** Activation of a diverse set of genes during the tobacco resistance response to TMV is independent of salicylic acid; induction of a subset is also ethylene independent. *Plant J.* **21**: 409-418

- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **141**: 312-322
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999) The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. In *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, pp. 36-104
- Hammerschmidt, R. (1999) Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 285-306
- Hammond-Kosack, K., Jones, J.D.G. (2000) Responses to plant pathogens. In: Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville* 1102-1155
- Harbinson, J., Hedley, C.L. (1993) Changes in P-700 oxidation during early stages of the induction of the induction of photosynthesis. *Plant Physiology* **103**: 649-660
- Havaux, M. (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* **3**: 147-151
- Havaux, M., Niyogi, K.K. (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 8762-8767
- Havaux M., Bonfils J.P., Lütz C., Niyogi K.K. (2000) Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the npq1 Arabidopsis mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiology* **124**: 273-284
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D.F., Gan, S. (2002) Evidence Supporting a Role of Jasmonic Acid in Arabidopsis Leaf Senescence. *Plant Physiol.* **128(3)**: 876-884
- Heber, U., Bligny, R., Streb, P., Douce, R. (1996) Photorespiration is essential for the protection of the photosynthetic apparatus of C3 plants against photoinactivation under sunlight. *Bot. Acta* **109**: 307-315
- Herbers K., Takahata Y., Melzer M., Mock H.-P., Hajirezaei M., Sonnewald U. (2000) Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol. Plant Pathol.* **1**: 51-59
- Hernández, J. A., Talavera, J. M., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., Sevilla, F. (2001) Response of antioxidative enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. *Physiol. Plant.* **111**: 313 - 321
- Hertwig, B., Streb, P., Feierabend, J. (1992) Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol.* **100**: 1547-1553
- Hideg, E., Vass, I. (1996) UV-B induced free radical production in the plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Sci.* **115**: 251-260
- Hideg, E., Kálai, T., Hideg, K., Vass, I. (2000) Do oxidative stress conditions impairing photosynthesis in the light manifest as photoinhibition? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**: 1511-1516
- Hildman, T., Ebneith, M., Peña-Cortéz, H., Sánchez-Serrano, J., Willmitzer, L., Prat, S. (1992) General role of abscisic and jasmonic acid in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* **4**: 1157-1170
- Hippeli, S., Estner, E.F. (1996) Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants. *J Plant Physiol.* **148**: 249-257
- Hodgson, R.A.J., Beachy, R.N., Pakrasi, H.B. (1989) Selective inhibition of photosystem II in spinach by tobacco mosaic virus: an effect of the viral coat protein. *FEBS Lett.* **245**: 267-270
- Holt, N.E., Fleming, G.R., Niyogi, K.K. (2004) Toward an understanding the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. *Biochemistry* **43**: 8281-8289
- Horáková, J. (2012) Vliv nanočástic stříbra na obrannou reakci *Solanum* spp. v průběhu patogenese. *Diplomová práce, Katedra biochemie, UP Olomouc*
- Horton, P., Ruban, A.V., Walters, R.G. (1994) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 655-684
- Howe, G.A. (2004) Jasmonates as signals in the wound response. *J. Plant Growth Regul.* **23**: 223-237
- Hung, S-H., Yu, Ch-W., Lin, Ch.H. (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **46**: 1-10
- Chaerle L., Pineda M., Romero-Aranda R., Van Der Straeten D., Barón M. (2006) Robotized Thermal and Chlorophyll Fluorescence Imaging of Pepper Mild Mottle Virus Infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol.* **47(9)**: 1323-1336
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H. Jr, Van Montagu, M. (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5818-5823
- Chen, Z.X., Silva, H., Klessig, D.F. (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired-resistance by salicylic-acid. *Science* **262 (5141)**: 1883-1886
- Chen, Z., Zhou, T., Wu, X., Hong, Y., Fan, Z., Li, H. (2008) Influence of cytoplasmic heat shock protein 70 on viral infection of *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Pathol.* **9(6)**: 809-817
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J. (2006) Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803-814

- Choi, J., Choi, D., Lee, S., Ryu, C.-M., Hwang, I. (2011)** Cytokinins and plant immunity: Old foes or new friends? *Trends Plant Sci.* **16**(7): 388-394
- Chou, H.-M., Bundock, N., Rolfe, S.A., Scholes, J.D. (2000)** Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol. Plant Pathol.* **1**: 99-113
- Iba, K. (2002)** Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 225-245
- Inzé, D., van Montagu, M. (1995)** Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotech.* **6**: 153-158
- Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P.R., Arrese-Igor C. and Becana M. (1998)** Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol.* **116**: 173-181
- Ivanov, B., Khorobrykh, S. (2003)** Participation of photosynthetic electron transport in production and scavenging of reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.* **5**: 43-53
- Jabs, T., Colling, C., Tschöpe, M., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1997)** Elicitor-stimulated ion fluxes and reactive oxygen species from the oxidative burst signal defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4800-4805
- Jahns, P., Miehe, B. (1996)** Kinetic correlation of recovery from photoinhibition and zeaxanthin epoxidation. *Planta* **198**: 202-210
- Jalloul, A., Montillet, J.L., Assigbetsé, K., Agnel, J.P., Delannoy, E., Triantaphylidès, C., Daniel, J.F., Marmey, P., Geiger, J.P., Nicole, M. (2002)** Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant J* **32**: 1-12
- Jameson P. (2000)** Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions-an overview. *Plant Growth Regul.* **32**: 369-380.
- Jameson, P., Clarke, S.F (2002)** Hormone-virus interactions in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **21**: 205-228
- Jing, H.C., Hille, J., Dijkwel, R.R. (2003)** Ageing of plants: Conserved strategies and novel pathways. *Plant Biol.* **5**: 455-464
- Jonak, C., Okresz, L., Borge, L., Hirt, H. (2002)** Complexity, cross talk and intergration of plant MAP kinase signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 415-424
- Jones, J. D. G. (2001)** Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 281-287
- Joo, J.H., Bae, Y.S., Lee, J.S. (2001)** Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol.* **126**: 1055-1060
- Josue, J.S., Frank, H.A. (2002)** Direct determination of the S₁ excited-state energies of xanthophylls by low-temperature fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. Acta* **106**: 4815-4824
- Kanzaki, H., Saitoh, H., Ito, A., Fujisawa, S., Kamoun, S., Katou, S., Yoshioka, H., Terauchi, R. (2003)** Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF-1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Pathol.* **4**: 383-391
- Karpinska, B., Wingsle, G., Karpinski, S. (2000)** Antagonistic effects of hydrogen peroxide and glutathione on acclimation to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *IUBMB Life* **50**: 21-26
- Karpinska, B., Karlsson, M., Schinkel, H., Streller, S., Süß, K.-H., Melzer, M., Wingsle, G. (2001)** A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. Expression, regulation, and protein localization. *Plant Physiol.* **126**: 1668-1677
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., Mullineaux, P. (1999)** Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 654-657
- Kazda, J., Ryšánek, P., Kabíček, J., Prokinová, E., Stejskal, V., Volf, M., Baranyk, P., Bittner, V. (2003)** Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny. Vydavatelství zemědělských časopisů – Ing. Martin Sedláček. Praha. pp. 158
- Kessler, A., Baldwin, I.T. (2002)** Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 299-328
- Kim, J.H., Lee, Ch. (2003)** Mechanism for photoinactivation of PS II by methyl viologen at two temperatures in the leaves of rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Biol.* **46**: 10-16
- Kim, J.H., Lee Ch. (2005)** *In vivo* deleterious effects specific to reactive oxygen species on photosystem I and II after photo-oxidative treatments of rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Plant Sci.* **168**: 1115-1125
- Kitajima S., Sato, F. (1998)** Plant Pathogenesis-Related Proteins: Molecular Mechanisms of Gene Expression and Protein Function. *The Journal of Biochemistry.* **125** (1): 1-8
- Klessig, D. F., Durner, J., Zhou, J. M., Kumar, D., Navarre, D. A., Zhang, S., Shah, J., Wendehenne, D., Du, H., Trifa, Y., Noad, R., Kachroo, P., Pontier, D., Lam, E., Silva, H. (2000)** NO and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 8849-8855
- Knight, H., Knight, M.R. (2001)** Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* **6**: 262-267

- Kobayashi, Y., Yamada, M., Kobayashi, I., Kunoh, H. (1997)** Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants. *Plant Cell Physiol.* **38**: 725-733
- Kocal, N., Sonnewald, U., Sonnewald, S. (2008)** Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiol.* **148**: 1523-1536
- Koornneef A., Pieterse C.M.J. (2008)** Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiol.* **146**: 839-844
- Kovač M., Müller A., Milovanović Jahr D., Milavec M., Düchting P., Ravnikar M. (2009)** Multiple hormone analysis indicates involvement of jasmonate signalling in the early defence of potato to potato virus Y^{NTN}. *Biologia Plant.* **53**: 195-199
- Kotabová, E. (2007)** Mechanismy zapojené do ochrany fotosyntetického aparátu před oxidativním poškozením. *Disertační práce. PřF UP Olomouc*
- Kotabová E., Kaňa R., Kyseláková H., Lípová L., Novák O., Ilík P. (2008)** A pronounced light-induced zeaxanthin formation accompanied by unusually slight increase in non-photochemical quenching. A study with barley leaves treated with methyl viologen at moderate light. *J. Plant Physiol.*, **165**: 1563-1571
- Köhler, B., Hills, A., Blatt M.R. (2003)** Control of guard cell ion channels by hydrogen peroxide and abscisic acid indicates their action through alternate signaling pathways. *Plant Physiol* **131**: 385-388
- Kramer, D.M., Sacksteder, C.A., Cruz, J.A. (1999)** How acidic is the lumen? *Photosynth. Res.* **60**: 151-163
- Kregel, K.C. (2002)** Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* **92**: 2177-2186
- Kuźniak, E., Urbanek, H. (2000)** The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiologiae Plantarum* **22**: 195-203
- Kuźniak, E., Skłodowska, M. (1995)** Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* **222**: 192-200
- Kúdela, V., Bartoš, P., Čača, Z., Dirlbek, J., Frič, F., Lebeda, A., Šebesta, J., Ulrychová, M., Valášková, E., Veselý, D. (1989)** Obecná fytopatologie. Academia Praha. 388 pp.
- Lagrimini, L.M., Rothstein, S. (1987)** Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* **84**: 438-442
- Laloi, C., Apel, K., Danon, A. (2004)** Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 323-328
- Lamb, C., Dixon R.A. (1997)** The oxidative burst in plant disease. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251-275
- Landa, Z., Bobková, P., Bohatá, A. (2002)** Rostlinolékařská terminologie. 13. Biologická ochrana. *Plant Protection Science* **38**: I – XXXIV
- Latowski, D., Akerlund, H.E., Strazalka, K. (2004)** Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, requires lipid inverted hexagonal structures for its activity. *Biochemistry* **43**: 4417-4420
- Lebeda, A., Luhová, L., Sedlářová, M., Jančová, D. (2001)** The role of enzymes in the early stages of fungal plant pathogenesis. *J. Plant Dis. Protect.* **108** : 89-111
- Lehrer, A.T., Moore, P.H., Komor, E. (2007)** Impact of *sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) on the carbohydrate status of sugarcane: comparison of virus-free plants with symptomatic and asymptomatic virus-infected plants. *Phy. Mol. Plant Path.* **70**: 180-188
- León, J., Lawton, M.A., Raskin, I. (1995)** Hydrogen Peroxide Stimulates Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiol.* **108**: 1673-1678
- Leshem, Y.Y., Wills, R.B.H., Ku V.V-V. (1998)** Evidence for the function of the free radical gas — nitric oxide (NO•) — as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **36**: 825-833
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon R., Lamb, C. (1994)** H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R., Lamb, C. (1996)** Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biol.* **6**: 427-437
- Li, X.P., Bjorkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K. (2000)** A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**: 391-395
- Li, X.P., Gilmore, A.M., Caffari, S., Bassi, R., Golan, T., Kramr, D., Niyogi, K.K. (2004)** Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensin by the PsbS protein. *J. Biol. Chem.* **22**: 22866-22874
- Li, X.P., Phippard, A., Pasari, J., Niyogi, K.K. (2002)** Structure-function analysis of photosystem II subunit S (PsbS) *in vivo*. *Funct. Plant. Biol.* **29**: 1131-1139
- Lichtenthaler, H. (1998)** The Stress Concept in Plants: An Introduction. *In: Stress of life from molecules to man.* Csermely P. (ed.) *Annals of the NY Academy of Science* **851**: 187-198
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Durner, J. (2005)** Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **137**: 921-930

- Liu, Q., Zhu, Y., Tao, H., Wang, N., Wang, Y. (2006) Damage of PS II during senescence of *Spirodela polyrrhiza* explants under long-day conditions and its prevention by 6-benzyladenine, *J. Plant Res.* **119**: 145-152
- Loake, G., Grant, M. (2007) Salicylic acid in plant defence – the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 466-472
- López, M.A., Bannenberg, G., Castresana, C. (2008) Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 420-427
- Lorenzo, O., Solano, R. (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 532-540
- Low, P.S., Merida, J.R. (1996) The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol. Plantarum.* **96**: 532-542
- Luhová, L., Lebeda, A., Hederrová, D., Peč, P. (2003) Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedling of *Pisum sativum* L. under different light conditions. *Plant Soil Environ* **49**: 151-157
- Ma, Y.Z., Holt, N.E., Li, X.P., Niyogi, K.K., Fleming, G.R. (2003) Evidence for carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 4377-4382
- Madhusudhan, K.N., Srikanta, B.M., Shylaja, M.D., Prakash, H.S., Shetty, S.H. (2009) Changes in antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, salicylic acid and oxidative stress in compatible and incompatible host-tobamovirus interaction. *J. Plant Interact.* **4**: 157-166.
- Makino, A., Miyake, Ch., Yokota, A. (2002) Physiological Functions of the Water–Water Cycle (Mehler Reaction) and the Cyclic Electron Flow around PSI in Rice Leaves. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1017-1026
- Mano, J., Ohno, C., Domae, Y., Asada, K. (2001): Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methyl viologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate radical detected with *in vivo* ESR. *Biochim. Biophys. Acta* **1504**: 275-287
- Mano, J. (2002) Early events in environmental stresses in plants-Induction Mechanisms of oxidative stress. In: Inzé, D., Montagu, M. (eds). *Oxidative stress in plants*. pp. 217-245
- Mateo, A., Funck, D., Mühlhennock, P., Kular, B., Mullineaux, P.M., Karpinski, S. (2006) Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *J Exp Bot* **57**: 1795-1807
- Matthews, R. E. F. (1991) *Plant virology*, 3rd. ed. Academic Press, New York
- Mauch-Mani, B., Mauch, F. (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 409-414
- Maule A., Leh V., Lederer C. (2002) The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 279-284
- Mayer, M.P., Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* **62**: 670-684
- Mayo, M.A., D’Arcy C.J. (1999) Family Luteoviridae: a reclassification of luteoviruses. In: Smith, H.G., Barker, H. (eds.) *The Luteoviridae*. Wallingford, *The UK: CAB International*; 1999 p 15-22
- McClung, C. R. (1997) Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Rad. Biol. Med.* **23**: 489-496
- Mehdy, M.C. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* **105**: 467-472
- Mehdy, M.C., Sharma, Y.K., Sathasivan, K., Bays, N.W. (1996) The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant.* **98**: 365-374
- Milavec, M., Ravnikar, M., Kovač, M. (2001) Peroxidases and photosynthetic pigments in susceptible potato infected with potato virus Y^{NTN}. *Plant Physiol. Biochem.* **3**: 891-898
- Mittler, R., Shulaev V., Sesar M., Lam, E. (1996) Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. *Plant Cell* **8**: 1991-2001
- Mittler, R., Herr, E.H., Orvar, W., Van Camp, W., Wilekens, H., Inze, D., Ellis, B.E. (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hypersensitive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14165-14170
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**: 490-498
- Mittler, R. (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* **11**: 15-19
- Miyake, Ch., Asada, K. (1996) Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentrations of ascorbate; hydrogen peroxide decomposes Compound I of ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* **37**: 423-430
- Miyake, Ch., Horiguchi, S., Makino, A., Shinzaki, Y., Yamamoto, H., Tomizawa, K. (2005) Effects of light intensity on cyclic electron flow around PS I and its relation to non-photochemical quenching of chl fluorescence in tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1819-1830
- Mlíčková, K., Luhová, L., Lebeda, A., Mieslerová, B., Peč, P. (2004) Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 753-761

- Mohanty, S.K., Mohanty, S.K., Anjaneyulu, A., Sridhar, R. (1979) Physiology of Rice Tungro Virus Disease: Involvement of Abscisic Acid-Like Substance in Susceptible Host-Virus Interactions. *Physiol. Plantarum* **45**:132-136
- Montalbini, P., Buonauro, R., Umesh-Kumar, N.N. (1995) Peroxidase activity and isoperoxidase pattern in tobacco leaves infected with tobacco necrosis virus and other viruses inducing necrotic and non-necrotic alterations. *J. Phytopathol.* **143**: 295-301
- Montillet, J.-L., Chamnongpol, S., Rustérucchi, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J.-P., Battesti, C., Inzé, D., Van Breusegem, F., Triantaphylides, C. (2005) Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol* **138**: 1516–1526
- Moore, C.J., Sutherland, P.W., Forster, R.L., Gardner, R.C., MacDiarmid, R.M. (2001) Dark green islands in plant virus infection are the result of posttranscriptional gene silencing. *Mol Plant Microbe Interact.* **14(8)**: 939-946
- Morosinotto, T., Caffarri, S., Dall'Osto, L., Bassi, R. (2003) Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiol. Plant.* **119**: 347-354
- Møller, I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 561-591
- Mur, L.A., Carver, T.L., Prats, E. (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J Exp Bot* **57**: 489-505
- Murphy, A.M., Chivasa, S., Singh, D.P., Carr, J.P. (1999) Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends Plant Sci.* **4**: 155-160
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* **125**:1558-1566
- Müller-Moulé P., Conklin P.L, Niyogi K.K. (2002) Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiology* **128**: 970-977
- Naidu R.A., Krishnan M., Ramanujam P., Gnanam A., Nayudu M.V. (1984) Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. I. Photosynthesis and photochemical reactions. *Physiol Plant Pathol.* **29**: 53-58
- Naidu R.A., Krishnan M., Nayudu M.V., Gnanam A. (1986) Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves III. Changes in the polypeptides of photosystem II particles. *Physiol Plant Pathol.* **25**: 181-190
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., Yoshida, S. (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.* **33**: 887-898
- Nanda R.M., Biswal B. (2008) Biotic stress induced demolition of thylakoid structure and loss in photoelectron transport of chloroplasts in papaya leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **46**: 461-468
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, J.D.G. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436-439
- Niedzwiedzki, D., Krupa, Z., Gruszecki, W.I. (2005) Temperature-induced isomerization of violaxanthin in organic solvents and in light-harvesting complex II. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **78**:109-114
- Niyogi, K. K. (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 333-359
- Niyogi, K. K. (2000) Safety valves for photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 455-460
- Niyogi, K. K., Li, X.P., Rosenberg, V., Jung, H.S. (2005) Is PsbS the site for non-photochemical quenching in photosynthesis? *J. Exp. Bot.* **56**: 375-382
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J. (2002a) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 388-395
- Neill, S., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., Hancock, J. (2002b) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* **53**: 1237-1247
- Noctor, G., Arisi, A.C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H., Foyer, Ch. (1998) Glutathione: Biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Botany* **49**: 623-647
- Noctor, G., Foyer, Ch.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 249-279
- Noodén, L.D., Guimét, J.J., John, I. (2004) Whole plant senescence. in: L.D. Noodén (Ed.), *Plant Cell Death Processes*. Academic Press, London, UK, pp. 227-244

- Nováková L. (2007)** Molekulárně biologická charakteristika viru enační mozaiky hrachu (PEMV). *Bakalářská práce* Přf Univerzita Palackého, Molekulární a buněčná biologie.
- Oerke, E. C., Krone, C., Jacobi, I., Schonbeck, F. (1992)** Relations between stress-induced modifications of the pathogenesis of *Erysiphe graminis hordei* and the membrane components of barley. *J. Phytopathol.* **134**:157-169
- Ogawa, K., Kanematsu, S., Takabe, K., Asada, K. (1995)** Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation PSI in spinach chloroplasts: detection by immunogold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant Cell Physiol.* **36**: 565-573
- Olson., P.D., Varner, J.E. (1993)** Hydrogen peroxide and lignification. *The Plant J.* **4**: 887-892
- Ondřej, M. (2009)** Problematika viróz hrachu v ČR. *internetový zdroj*: http://www.zahradaweb.cz/informace-z-oboru/zelinarska-vyroba/Problematika-viroz-hrachu-v-CR_s512x45089.html
- Orozco-Cardenas, M.L., Narvaez-Vasquez, J., Ryan, C.A. (2001)** Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* **13**: 179-191
- Osmond C B, Daley P F, Badger M R and Lutge U (1998)** Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dick. Infected with Abutilon mosaic virus, observed with a field - portable imaging system. *Bot. Acta* **111**: 390 - 397
- Ottander, Ch., Campbell, D., Öquist, G. (1995)** Seasonal changes in photosystem II organisation and pigment composition in *Pinus sylvestris*. *Planta* **197**: 176-183
- Panavas, T., Walker, E.L., Rubinstein, B. (1998)** Possible involvement of abscisic acid in senescence of daylily petals. *J. Exp. Botany* **49**: 1987-1997
- Panstruga, R. (2003)** Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 320-326
- Park, Y.-I., Chow, W.S., Anderson, J.M., Hurry, V.M. (1996)** Differential susceptibility of photosystem II to light stress in light-acclimated pea leaves depends on the capacity for photochemical and non-radiative dissipation of light. *Plant Sci.* **115**: 137-149
- Parsell, DA, Lindquist, S. (1993)** The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* **27**: 437-496
- Pavlová, L. (2005)** Fyziologie rostlin. Skripta. *Karolinum*. pp 1-253
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C.A. (1991)** A polypeptide from tomato leaves induces the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**: 895-898
- Peck, S.C. (2003)** Early phosphorylation events in biotic stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 334-338
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schroeder, J.I. (2000)** Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid in guard cells. *Nature* **406**: 731-734
- Pellinen, R. Palva, T., Kangasjärvi, J. (1999)** Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J.* **20**: 349-356
- Penel, C., Castillo, F.J. (1991)** Peroxidases of plant plasma membranes, apoplastic ascorbate, and relation of redox activities to plant pathology. *In: Oxidoreduction at the Plasma Membrane: Relation to Growth and Transport-Plants* Crane F.L., Morre D.J., Loe J.E. (eds.). CRC Press, pp 121-147
- Peña-Cortéz, H., Sánchez-Serrano, J., Mertens, R., Willmitzer, L., Prat, S. (1989)** Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **86**: 9851-9855
- Pérez-Bueno M.L., Ciscato M., vandeVen M., García-Luque I., Valcke R., Barón M. (2006)** Imaging viral infection: studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus. *Photosynth Res.* **90**: 111-123
- Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y., Dolja, V.V. (1999)** HSP70 homolog functions in cell-to- cell movement of plant virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **96**: 14771-14776
- Petrovič, N., Miersch, O., Ravnikar, M., Kovač, M. (1997)** Potato virus Y^{NTN} alters the distribution and concentration of endogenous jasmonic acid in potato plants grown *in vitro*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **50**: 237-244
- Pfündel, E., Bilger, W. (1994)** Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth. Res.* **42**: 89-109
- Piáková, Z., Pokorný, R., Dostálová, R. (2006)** Výskyt virových patogenů hrachu na území ČR. *Úroda*, **2**: 10-11
- Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P. (2005)** Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem. listy* **99**: 455-466
- Piterková, J., Luhová, L., Petřivalský, M. (2008)** Signální dráhy oxidu dusnatého. *Chemické listy* **102**: 410-416

- Piterková, J., Petřivalský, M., Luhová, L., Mieslerová, B., Sedlářová, M., Lebeda, A. (2009) Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Mol. Plant Pathol.* **10**(4): 501-513
- Polle, A. (1996) Mehler reaction: friend or foe in photosynthesis? *Bot. Acta* **109**: 84-9
- Polívka, T., Zigmantas, D., Sundström, V., Formaggio, E., Cinque, G., Bassi, R. (2002) Carotenoid S₁ state in a recombinant light-harvesting complex of photosystem II. *Biochemistry* **41**: 439-450
- Polidoros, A.N., Mylona, P.V., Scandalios, J.G. (2001) Transgenic tobacco plants expressing the maize Cat2 gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress. *Transg. Res.* **10**: 555-569
- Politycka, B. (1997) Free and glucosylated phenolics, phenol beta-glucosyltransferase activity and membrane permeability in cucumber roots affected by derivatives of cinnamic and benzoic acids. *Acta Physiol. Plant.* **19**: 311-317
- Pontier, D., Balague, C., Roby, D. (1998) The hypersensitive response. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* **321**: 721-734
- Pozo, M.J., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. (2004): Jasmonates - signals in plant-microbe interactions. *J. Plant Growth Regul.* **23**: 211-222
- Prakash, J.S.S., Srivastava, A., Strasser, R.J., Mohanty, P. (2003) Senescence-induced alterations in the Photosystem II functions of *Cucumis sativus* cotyledons: probing of senescence driven alterations of photosystem II by chlorophyll a fluorescence induction O-J-I-P transients, *Indian J. Biochem. Biophys.* **40**: 160-168
- Preston, C.A., Lewandowski, C., Enyedi, A.J., Baldwin, I.T. (1999) Tobacco mosaic virus inoculation inhibits wound-induced jasmonic acid-mediated responses within but not between plants. *Planta.* **209**: 87-95
- Prokhnovsky, A.J., Peremyslov, V.V., Napuli, A.J., Dolja, V.V. (2002) Interaction between long-distance transport factor and Hsp70-related movement protein of Beet yellow virus. *J. Virol.* **76**: 11003-11011
- Prokopová J., Špundová M., Sedlářová M., Husičková A., Novotný R., Doležal K., Nauš J., Lebeda A. (2010) Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiol. and Biochem.* **48**: 716-723
- Ptáčková, N. (2006) Peroxidace lipidů a její role při obranné reakci rostlin. *Bakalářská práce MU Brno*, pp 1-62.
- Quan, L.-J., Zhang, B., Shi, W.-W., Li, H.-Y. (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integrative Plant Biol.* **50**: 2-18
- Radwan D.E.M., Fayez K.A., Mahmoud S.Y., Hamad A., Lu G. (2007) Physiological and metabolic changes of *Cucurbita pepo* leaves in response to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infection and salicylic acid treatments, *Plant Physiol. Biochem.* **45**: 480-489
- Radwan D.E.M., Lu G., Fayez K.A., Mahmoud S.Y. (2008) Protective action of salicylic acid against bean yellow mosaic virus infection in *Vicia faba* leaves. *J. Plant Physiol.* **165**: 845-857
- Rahoutei, J., García – Luque, I., Barón, M. (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiol. Plant.* **110**: 286 - 292.
- Reinero A., Beachy, R.N. (1989) Reduced Photosystem II activity and accumulation of viral coat protein in chloroplasts of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Plant Physiol.* **89**: 111-116
- Riedle-Bauer, M. (2000) Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *J. Phytopathol.* **148**: 297-302
- Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R., Shinha, A.K. (2003) Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Botany* **54**: 513-524
- Roitsch, T., González, M.-C. (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* **9**: 606-613
- Rojo, E., Solano, R., Sánchez-Serano, J.J. (2003) Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *J. Plant Growth. Regul.* **22**: 82-98
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., Jones J.D. (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. in Plant Biol.* **10**: 372-379
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S.Q., Klessing, D.F., Hirt H., Jones, J.D.G. (1999) Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**: 273-287
- Romeis, T., Piedras, P., Jones, J.D.G. (2000) Resistance Gene-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase in the Plant Defense Response. *Plant Cell* **12**: 803-815
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R., Jones, J.D.G. (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J* **20**: 5556-5567
- Romero-Puertas, M.C., Perazzolli, M., Zago, E.D., Delledonne, M. (2004) Nitric oxide signaling functions in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**: 795-803
- Rustérucci, C., Montillet, J.L., Agnel, J.P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J.J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J. P. (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid

- hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J Biol. Chem.* **274**: 36446–36455
- Ryan, C.A. (1990)** Protease inhibitors in plants: genes for improving defense against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**: 425-449
- Ryals, J., Uknes, S., Ward, E. (1994)** Systemic acquired resistance. *Plant Physiol* **104**: 1109-1112
- Ryšlavá H., Müller K., Semorádová Š., Synková H., Čerovská N. (2003)** Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by Potato virus A and *Potato virus Y*. *Photosynthetica* **41**:357-363
- Skaf, J.S., de Zoeten, G. A. (2000)** Pea enation mosaic virus. Description of plant viruses. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>
- Scandalios, J.G. (1990)** Response of plant antioxidant defence genes to environmental stress. *Adv. Genet.* **28(1)**: 1-41
- Scandalios, J.G. (1993)** Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* **101**: 7-12
- Scandalios, J.G. (1994)** Regulation and properties of plant catalases. In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, Foyer C. H. and Mullineaux P. M. (eds.), pp. 275-315, CRC, Boca Raton
- Seaton, G.G.R., Vaughan, M.H., Rohozinski, J. (1996)** Novel amplification of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching following viral infection in *Chlorella*. *FEBS Letters* **389**: 319 - 323
- Sedlářová, M., Lebeda, A. (2001a)** Histochemical detection and role of phenolic compounds in defence response of *Lactuca* spp. to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). *J of Phytopathol.* **149**:1-5
- Sedlářová, M., Lebeda, A. (2001b)** Buněčné mechanismy podmiňující interakce rostlin a patogenů. *Živa* **5**: 201-203.
- Sedlářová, M., Lebeda, A. (2002)** Cytologické aspekty interakce rostlin a patogenů. *Biol. listy* **67**: 59-73
- Sedlářová, M. (2009)** Patogeneze *Bremia lactucae* na *Lactuca* spp. Habilitační práce. Mendelova lesnická a zemědělská Univerzita. Brno
- Seo, S., Seto, H., Yamakawa, H., Oaci, Y. (2001)** Transient accumulation of jasmonic acid during the synchronized hypersensitive cell death in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 261-264
- Shalitin, D., Wolf, S. (2000)** Cucumber mosaic virus infection affects sugar transport in melon plants. *Plant Physiol.* **123**: 597-604
- Shalitin, D., Wang, D., Omid, A., Gal-On, A., Wolf, S. (2002)** Cucumber mosaic virus movement protein affects sugar metabolism and transport in tobacco and melon plants. *Plant, Cell and Environ.* **25**: 989–997
- Shang, J., Xi, D.H., Yuan, S., Xu, F., Xu, M.Y., Qi, H.L., Wang, S.D., Huang, Q.R., Wen, L., Lin, H.H. (2010)** Difference of physiological characters in dark green islands and yellow leaf tissue of Cucumber mosaic virus (CMV)-infected *Nicotiana tabacum* leaves. *Z Naturforsch C.* **65**:73-78
- Shetty, N.P., Jørgensen, H.J.L., Jensen, J. D., Collinge, D.B., Shetty, H.S. (2008)** Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* **121**: 267–280
- Schnablová R., Synková H., Čerovská N. (2005)** The influence of Potato virus Y infection on the ultrastructure of Pssu-ipt transgenic tobacco. *Int. J. Plant Sci.* **166**: 713-721
- Scholes, J.D., Lee, P.J., Horton, P., Lewis, D.H. (1994)** Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist* **126**: 213-222.
- Scholes, J.D., Rolfe, S.A. (1995)** How do biotrophic pathogens affect the photosynthetic metabolism of their hosts? *Aspects of Applied Biology* **42**: 91-99
- Scholes J.D., Rolfe S.A. (1996)** Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* **199**: 573–582
- Siegel, B.Z. (1993)** Plant peroxidases-an organismic perspective. *Plant Growth Regul* **12**: 303-312
- Sikorová, U. (2010)** Vliv stresových faktorů na fyziologii rostlin. *Diplomová práce. Katedra biochemie. UP Olomouc*
- Simon-Plas, F., Elmayan, T., Blein, J.-P. (2002)** The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* **31**:137-148
- Skulachev, V.P. (1997)** Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Biosci. Reports* **17**: 347-366
- Smith, J.L., De Moraes, C.M., Mescher, M.C. (2009)** Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Manag Sci* **65**: 497-503
- Song X.-S., Wang Y.-J., Mao W.-H., Shi K., Zhou Y.-H., Nogués S., Yu J.-Q. (2009)** Effect of cucumber mosaic virus infection on electron transport and antioxidant system in chloroplasts and mitochondria of cucumber and tomato leaves. *Physiologia Plantarum* **135**: 246-257
- Song, L, Ding, W., Zhao, M., Sun, B., Zhang, L. (2006)** Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Sci* **171**: 449-458

- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X., Pieterse, C.M.J. (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**: 760-770
- Šírová, J., Sedlářová, M., Piterková, J., Luhová, L., Petřivalský, M. (2011) The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Science* **181**(5): 560-572
- Špundová, M., Popelková, H., Ilík, P., Skotnica, J., Novotný, R., Nauš, J. (2003) Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *J. Plant Physiol.* **160**: 1051-1058
- Špundová, M., Strzalka, K., Nauš, J. (2005) Xanthophyll cycle activity in detached barley leaves senescing under dark and light. *Photosynthetica* **43**: 117-124
- Streb, P., Feierabend, J. (1996) Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rye leaves. *Bot. Acta* **109**: 125-132
- Sun, W., Montagu, M.V., Verbruggen, N. (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**: 1-9
- Syller, J. (2003) Molecular and biological features of umbraviruses, the unusual plant viruses lacking genetic information for a capsid protein. *Physiol. Mol. Plant Pathol* **63**: 35-46
- Syller, J. (1991) The effects of temperature on the susceptibility of potato plants to infection and accumulation of potato leafroll virus. *J. Phytopathol.* **133**: 216-224
- Synková, H., Semorádová, Š., Schnablová, R., Müller, K., Pospíšilová, J., Ryšlavá, H., Malbeck, J., Čerovská, N. (2006) Effect of biotic stress caused by *Potato virus Y* on photosynthesis in *ipt* transgenic and control *Nicotiana tabacum* L. *Plant Sci.* **171**: 607-616
- Šutić, D.D., Sinclair, J.B. (1991) Anatomy and physiology of diseased plants. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Takahashi H., Ehara Y., Hirano H. (1991) A protein in the oxygen-evolving complex in the chloroplasts is associated with symptom expression on tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus strain Y. *Plant Mol. Biol.* **16**: 689-698
- Takahashi H., Ehara Y. (1992) Changes in activity and the polypeptide composition of the oxygen-evolving complex in photosystem II of tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus strain Y. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 269-272
- Tanaka, K., Otsubo, T., Kondo, N. (1982) Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of Calvin cycle SH enzymes in SO₂-fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol* **23**: 1009-1018
- Tardy, F., Havaux, M. (1997) Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1330**: 179-193
- Tausz, M., Šircelj, H., Grill, D. (2004) The role of glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: Is a stress-response concept valid? *J. Exp. Botany* **55**: 1955-1962
- Tiedemann, A.V. (1997) Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **50**: 151-166
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., Cannue, B.P. (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* **13**: 63-68
- Torres, M.A., Dangl, J.L. (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 397-403
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L. (2006) Reactive oxygen species signalling in response to pathogens. *Plant Physiol.* **141**: 373-378
- Torres, M.A. (2010) ROS in biotic interactions. *Physiol. Plantarum* **138**: 414-429
- Trewavas, A.J., Malhó, R. (1997) Signal Perception and Transduction: The Origin of the Phenotype. *Plant Cell* **9**: 1181-1195
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D., Katagiri, F. (2008) Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant Journal* **53**: 763-775
- Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* **552**: 335-344
- Urszula, M., Rozalska, S. (2005) Nitric Oxide and hydrogen peroxide in tomato resistance: Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in O-hydroxyethylrutin-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* **43**: 623-635
- van Loon, L.C., van Strien, E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**: 85-97
- van Loon, L.C., Geraats, B.P.J., Linthorst, H.J.M. (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **11**: 184-191
- van Kooten O., Meurs C., van Loon L.C. (1990) Photosynthetic electron transport in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plantarum* **80**: 446-452

- Vellosillo, T., Vicente, J., Kulasekaran, S., Hamberg, M., Castresana, C. (2010) Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiol.* **154**: 444-448
- Vick, B.A., Zimmerman, D.C. (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol* **75**: 458-461
- Vlčková, A., Špundová, M., Kotabová, E., Novotný, R., Doležal, K., Nauš, J. (2006) Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiol. Plant.* **126**: 257-267
- von Dahl, C.C., Baldwin, I.T. (2007) Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions. *J Plant Growth Regul* **26**: 201-209
- Vranová, E., Inzé, D., van Breusegem, F. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp. Bot.* **53**:1227-1236
- Walters, D.R., McRoberts, N. (2006) Plants and cytokinins: a pivotal role for cytokinin? *Trends in Plant Sci.* **11**: 581-586
- Walters, D. R., Newton, A. C., Lyon, G. D. (2005a) Induced resistance: Helping plants to help themselves. *Biologist* **52**: 28-33
- Walters, D., Walsh, D., Newton, A., Lyon, G. (2005b) Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology* **95**: 1368-1373
- Waters, E.R., Lee, G.J., Vierling, E. (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Biol.* **46**: 325-338
- Walton, J.D. (1997) Biochemical Plant Pathology. *In*: Plant Biochemistry, Dey P.M. and Harborne J.B. (eds.). Academic Press Ltd pp 487-502
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., Dong, X. (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr. Biol.* **17**: 1784-1790
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* **9**: 244-252
- Wang, D., Maule, A.J. (1995) Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. *Science* **267**: 229-231
- Wei, Y.D., Zhang, Z., Andersen, C.H., Schmelzer, E., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Smedegaard-Petersen, V., Thordal-Christensen, H. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* **36**: 101-112
- Wendehenne, D., Dumer, J., Klessing, D.F. (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defense responses. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 449-455
- Whenham R.J., Fraser R.S.S., Brown L.P., Payne J.A. (1986) Tobacco-mosaic-virus-induced increase in abscisic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location in light and dark-green areas, and relationship to symptom development. *Planta* **168**: 592-598
- Whitham, S.A., Yang, C., Goodin, M.M. (2006) Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 1207-1215
- Wilson, I.D., Neill, S.J., Hancock, J.T. (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environ.* **31**: 622-631
- Willekens, H., Villarroel, R., van Montagu, M., Inzé, D., van Camp, W. (1994a) Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *FEBS Lett.* **352**: 79-83
- Willekens, H., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., Sandermann, H. Jr, Langebartels, C. (1994b) Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Plant Physiol.* **106**: 1007-1014
- Willekens, H., Inzé, D., van Montagu, M., van Camp, W. (1995) Catalases in plants. *Mol. Breed.* **1**: 207-228
- Willekens, H., Chammongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., van Montagu, M., Inzé, D., van Camp, W. (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J.* **16**: 4806-4816
- Wingler, A., Purdy, S., MacLean, J.A., Pourtau, N. (2006) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence, *J. Exp. Bot.* **57**: 391-399
- Wingler, A., Roitsch, T. (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interaction of sugar signalling with biotic and abiotic stresses responses. *Plant Biol.* **10**: 50-62
- Wink, D.A., Mitchell, J.B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biol. Med.* **25**: 434-456
- Wintson, G.W. (1990) Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defences. *In*: Stress responses in plants: Adaptation and Acclimation mechanism. Alscher R., Cumming J. (eds) Wiley-Liss Inc., NY pp 57-86
- Wise, R.R. (1995) Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth. Res.* **45**: 79-97

- Wojtaszek, P. (1997)** Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection *Biochemistry J.* **322**: 681-692
- Wolf, S., Millatiner, A. (1999)** Effect of Tobacco Mosaic Virus Movement Protein on Photosynthesis in Transgenic Tobacco Plants. *J.Plant Physiology* **156**: 253-258
- Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., León, J., Fitzsimmons, K. C., Levine, E. B. a kol. (1997)** Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol.* **115**: 427-435
- Yabuta Y., Motoki T., Yoshimura K., Takeda T., Ishikawa T. and Shigeoka S. (2002)** Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *The Plant Journal* **32**: 915-925
- Yang, Y., Shah, J., Klessing, D.F. (1997)** Signal perception and transduction in plant defense response. *Genes and Develop.* **11**: 1621-1639
- Ye, X.S., Pan, S.Q., Kuć, J. (1990)** Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mould (*Peronospora tabacina*) and tobacco mosaic virus. *Physiol. Biochem.* **80**: 1295-1299
- Ye, Z., Rodriguez, R., Tran, A., Hoang, de los Santos, D., Brown, S., Vellanoweth, R.L. (2000)** The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **158**: 115-127
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D., Doke, N. (2003)** *Nicotiana benthamiana* gp91(phox) homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* **15**:706-718.
- Young, A.J., Frank, H.A. (1996)** Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *J. Photochem. Photobiol.: Biology* **36**: 3-15
- Yu, C.-W., Murphy, T.M., Lin, C.-H. (2003)** Hydrogen peroxide- induced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation. *Funct Plant Biol* **30**: 955-963
- Zaninotto, F., La Camera, S., Polverari, A., Delledonne, M. (2006)** Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol.* **141**: 379–383
- Zechmann, Müller M., Zellnig G. (2003)** Cytological modifications in zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)-infected Styrian pumpkin plants. *Arch Virol* **148**: 1119-1133
- Zhang, X., Zhang, L., Dong, F.C., Gao, J.F. Galbraith, D.W., Song, C.P. (2001)** Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol.* **126**: 1438-1448
- Zhou, Y.-H., Peng, Y.-H., Lei, J.-L., Zhou, L.-Y, Zheng, J.-H., Yu J.-Q. (2004)** Effects of potato virus Y^{NTN} infection on gas exchange and photosystem 2 function in leaves of *Solanum tuberosum* L. *Photosynthetica* **42**: 417-423

10. PŘÍLOHY

V příloze jsou prezentovány odborné publikace na jejichž základě byla vypracována disertační práce.

ODBONÉ PUBLIKACE

- [I] Eva Kotabová E., Radek Kaňa, **Helena Kyseláková**, Lenka Lípová, Ondřej Novák, Petr Ilík (2008): A pronounced light-induced zeaxanthin formation accompanied by unusually slight increase in non-photochemical quenching. A study with barley leaves treated with methyl viologen at moderate light. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1563-1571
- [II] **Helena Kyseláková**, Jitka Prokopová, Jan Nauš, Ondřej Novák, Milan Navrátil, Dana Šafářová, Martina Špundová, Petr Ilík (2011): Photosynthetic alterations of pea leaves infected systemically by Pea enation mosaic virus: A coordinated decrease in efficiencies of CO₂ assimilation and photosystem II photochemistry. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 1279-1289
- [III] **Helena Kyseláková**, Michaela Sedlářová, Martin Kubala, Vladimíra Nožková, Jana Piterková, Lenka Luhová, Ondřej Novák, Petr Ilík (2012): Reactive oxygen and nitrogen species and hormone signalling in systemic infection of pea by pea enation mosaic virus. *Plant Protection Science – v recenzním řízení*

PUBLIKACE I – *Journal of Plant Physiology* (2008)

Journal of Plant Physiology 165 (2008) 1563–1571

Available online at www.sciencedirect.com**JOURNAL OF
PLANT PHYSIOLOGY**www.elsevier.de/jplph

A pronounced light-induced zeaxanthin formation accompanied by an unusually slight increase in non-photochemical quenching: A study with barley leaves treated with methyl viologen at moderate light

Eva Kotabová^{a,b}, Radek Kaňa^{a,b}, Helena Kyseláková^a, Lenka Lípová^a, Ondřej Novák^c, Petr Ilík^{a,*}

^aLaboratory of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University, Tr. Svobody 26, 77146 Olomouc, Czech Republic

^bInstitute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Opatovický mlýn, 37981 Třeboň, Czech Republic

^cLaboratory of Growth Regulators, Palacký University and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, 78371 Olomouc, Czech Republic

Received 6 September 2007; received in revised form 23 December 2007; accepted 2 January 2008

KEYWORDS

Methyl viologen;
Non-photochemical
quenching;
Oxidative stress;
Thylakoid
membrane;
Xanthophyll cycle

Summary

Light-induced deepoxidation of violaxanthin to antheraxanthin and zeaxanthin in plants is associated with the induction of pronounced xanthophyll-dependent non-photochemical quenching (NPQ). To date, a misbalance between a high amount of zeaxanthin in thylakoid membranes and low NPQ has been explained by an absence of lumen acidification (e.g. when NPQ is measured in the dark after high light stress). In this study, we report that this misbalance can also be observed under moderate light. We found this result (deepoxidation state, DEPS, above 55% and NPQ~0.9) in barley leaves treated with 10 μM methyl viologen (MV) under white light (100 μmol photons m⁻² s⁻¹, photosynthetically active radiation (PAR), growth irradiance). The addition of MV at this moderate light did not accelerate electron transport in thylakoid membranes, and induced only slight oxidative stress (no lipid peroxidation, almost unchanged maximum yield of photosystem II photochemistry, a

Abbreviations: A, antheraxanthin; APX, ascorbate peroxidase; DEPS, deepoxidation state of the xanthophyll cycle pigment pool; GR, glutathione reductase; LHC, light-harvesting complexes; MV, methyl viologen; NPQ, non-photochemical quenching; PAR, photosynthetically active radiation (400–700 nm); PC, plastocyanin; PSI(II), photosystem I(II); P700 (P680), the primary donor of PSI(II); TBARPs, thiobarbituric acid reactive products; V, violaxanthin; VAZ, violaxanthin+antheraxanthin+zeaxanthin, total pool of xanthophyll cycle pigments; VDE, violaxanthin deepoxidase; Z, zeaxanthin.

*Corresponding author. Tel.: +420 58 5634153; fax: +420 58 5225737.

E-mail address: ilik@prfnw.upol.cz (P. Ilík).

0176-1617/\$ - see front matter © 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jplph.2008.01.005

decrease in activity of ascorbate peroxidase, and an increase in that of glutathion reductase). We suggest that, in leaves treated under the conditions used here, the lumen acidification induced by light-limited electron transport in thylakoid membranes was high enough to activate violaxanthin deepoxidase, but not sufficiently high to form the expected number of zeaxanthin-dependent quenching centers in photosystem II antennae.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The xanthophyll cycle plays an important role in the protection of chloroplasts against oxidative stress under high light. In thylakoid membranes, violaxanthin (V) released from chlorophyll-containing complexes is converted to zeaxanthin (Z), via intermediate antheraxanthin (A), by violaxanthin deepoxidase (VDE) activated by light-driven lumen acidification (for reviews, see Eskling et al., 1997; Lin et al., 2002; Latowski et al., 2004). Low lumenal pH also triggers several processes leading to the formation of quenching centers in light-harvesting complexes (LHC) (for reviews, see Holt et al., 2004; Horton and Ruban, 2005; Horton et al., 2005), where Z plays the role of direct quencher (Ma et al., 2003) or allosteric activator (Horton et al., 2005; Crouchman et al., 2006). Non-radiative dissipation of absorbed light (non-photochemical quenching, NPQ) by these centers, protecting reaction centers of photosystem II (PSII) against overexcitation, is called xanthophyll-dependent NPQ. For high NPQ levels, the xanthophyll-dependent NPQ is taken as a major component of the energy-dependent NPQ.

A correlation between high NPQ level and large amounts of Z in thylakoid membranes has been found in numerous *in vivo* studies (e.g. Demmig et al., 1987; Demmig-Adams, 1990). The pronounced decrease of NPQ in leaves after high light exposure indicates that the formation of Z-dependent quenching centers requires light-driven lumen acidification. Model experiments with chloroplasts have suggested that some threshold lumenal pH must be passed in order to observe the xanthophyll-dependent NPQ (Gilmore and Yamamoto, 1993). Recent *in vivo* studies by Kramer's group (e.g. Kramer et al., 2003), supported by previous *in vitro* results (e.g. Günther et al., 1994), propose that VDE is active at lumenal pH below 6.5, and thus even moderate light should be enough for activation of VDE. The limiting step of V deepoxidation appears to be the availability of free V for VDE in the lipid phase of thylakoid membranes (for review see Morosinotto et al., 2003) as at normal conditions, V is bound in chlorophyll-containing com-

plexes (see Yamamoto and Bassi, 1996). As stress-induced (e.g. high light, heat stress) changes in the complexes cause a release of V into the lipid phase, VDE can mediate V deepoxidation.

Here, we present results showing that V deepoxidation *in vivo* also takes place at moderate light when the electron transport rate (ETR) in thylakoid membranes is limited by light. This was demonstrated with barley leaves treated with 10 μM methyl viologen (MV) under moderate light (100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, photosynthetically active radiation (PAR), growth conditions). The huge accumulation of Z in MV-treated leaves was accompanied by an unusually slight induction of NPQ, implying that the lumen acidification in treated leaves was not sufficient for the formation of Z-dependent quenching centers. Our results support the view that VDE *in vivo* is active even at normal light conditions.

Material and methods

Plant material and treatments

Barley seedlings (*Hordeum vulgare* L. cv. Akcent) were cultivated in a perlite substrate supplied with Knop solution at 24 ± 1 °C under a periodic 16/8-h day/night cycle (100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, PAR). All experiments were performed with 8-d-old primary leaves (1.1 growth phase according to Feekes, 1941) over a day period. Leaf segments (5 cm) were cut out 1 cm below the leaf tip and infiltrated with 10 μM MV in Petri dishes by floating on the solution surface up to 5 h. Leaf segments floating on distilled water were used as control samples. The segments were initially incubated in solutions in the dark for 1 h and then exposed to white light (100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, PAR; fluorescent tubes Tungsram 18 W, F33 cool white, Hungary) for up to 4 h. For an estimation of MV penetration into a leaf, the segments were incubated in MV solutions up to 5 h in the dark.

Absorption measurements

Measurements of absorption changes at 820 nm (ΔA_{820}) in dark-adapted leaf segments after the onset of light (white light, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$; PAR), reflecting

primarily a redox state of the primary donor of PSI (P700) and plastocyanin (PC), were used to monitor a penetration of MV inside leaf segments. This 10 s measurement was performed with a modulated fluorescence measurement system MFMS (Hansatech, King's Lynn, UK) equipped with an accessory kit suitable for monitoring of ΔA_{820} (Ogren and Baker, 1985). This ΔA_{820} induction was measured in a remission mode (Schreiber et al., 1988). Aluminum foil placed on the bottom part of the segment was used to improve the S/N ratio of the ΔA_{820} signal. The output signal from the MFMS instrument was adjusted by an external control box, which allowed the steady-state signal to back off and subsequently to amplify ($100\times$). The amplified analog signal was digitized with an A/D converter card (PCA-7228AL, Tedia, Plzeň, Czech Republic) and transferred to a PC every 1 ms. White light was taken from a cold-light KL 1500 electronic halogen lamp (Schott AG, Mainz, Germany). A shutter with an electronic driver (D122, Uniblitz Electronic, New York, USA) controlled the onset of light.

Pigment analysis

Leaf segments were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C before pigment analysis. Pigments were extracted using 80% acetone with a small amount of MgCO_3 . The homogenate was centrifuged at 3600g for 5 min. The supernatant was filtered through a $45\ \mu\text{m}$ filter and used for determination of xanthophyll content. Pigment separation was performed with a gradient reversed-phase HPLC (Alliance 2695 Separations Module, Waters, USA) using a reversed-phase column (250/4 RP 18, LICHROART, Germany) kept at 25°C and a PDA detector (2996, Waters, USA). The 15 min elution (flow rate of $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) with a solvent system consisted of acetonitrile, methanol, and 0.1M Tris (pH 8.0) in a volume ratio of 87:10:3 was followed by a 2 min linear gradient (flow rate of $0.8\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) to the second solvent, which was a 34:16 mixture of methanol and ethyl acetate (12 min elution, flow rate of $0.8\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Eluted pigments were monitored by their absorption at 440 nm. Factors converting the measured area below the absorption peak to the xanthophyll content were determined by calibration with pigment standards (DHI Water & Environment, Hørsholm, Denmark). The deepoxidation state of xanthophyll cycle pigments (DEPS) was calculated as $\text{DEPS} = ([Z]+[A])/([V]+[A]+[Z])$ (Demmig-Adams and Adams, 1996) where [V], [A], and [Z] are the concentrations of V, A, and Z, respectively.

Chlorophyll fluorescence measurements

Chlorophyll fluorescence was measured during the spontaneous infiltration of leaf segments with distilled water or $10\ \mu\text{M}$ MV using a PAM 2000 modulation chlorophyll fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany). The minimal and maximal fluorescence intensities in the dark-adapted state (F_0 , F_M) were measured using a 0.8 s saturation white light flash after 1 h incubation of samples in the dark. Consequently, a white actinic light

($100\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, PAR; fluorescent tubes Tungsram 18W) was switched on and the maximal fluorescence intensity (F_M') was measured 5 min, 1, 2, 3, and 4 h after the onset of light. The correctness of the F_M and F_M' determinations was checked by monitoring of the saturation pulse shape (the existence of the plateau). The non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching parameter (NPQ) was calculated as $(F_M - F_M')/F_M'$. The effective quantum yield of PSII photochemistry (Genty's parameter, $\Delta F/F_M'$), a measure of the ETR in thylakoid membranes, was calculated as $(F_M' - F_t)/F_M'$, where F_t was the actual fluorescence level at a given time excited by the actinic light. F_0 and F_M levels were also measured in dark-adapted samples 15 min after termination of the 4 h illumination.

Activities of antioxidative enzymes

Leaf segments (3g) were frozen in liquid nitrogen, ground to powder, and rapidly homogenized in 15 mL of extraction buffer containing 0.1M Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM DTT, 1 mM Na_2EDTA , 1% Triton X-100, 4% water-insoluble PVP, and 5 mM ascorbic acid. In order to release the membrane-bound enzymes, the plant material was homogenized and sonicated for 1 min. After a 30 min standstill the homogenate was centrifuged at 21,000g for 10 min and the supernatant was filtrated through four layers of cheesecloth. The filtrate was used for the measurement of enzyme activities and protein content. All procedures were performed at 4°C . Measurements of enzyme activities were carried out spectrophotometrically (Unicam UV 550, Thermo Spectronic, Cambridge, UK) at 25°C . Ascorbate peroxidase (APX) activity was assayed by recording the decrease in optical density at 290 nm according to Nakano and Asada (1981). The assay medium contained 0.1M HEPES-NaOH (pH 7.0), 0.1 mM Na_2EDTA and 0.5 mM sodium ascorbate. The reaction was initiated by the addition of H_2O_2 . A molar extinction coefficient of $2.8\ \text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ was used to calculate the activity. Glutathione reductase activity was measured spectrophotometrically as a rate of the decrease at 340 nm reflecting the oxidation of NADPH (Foyer and Halliwell, 1976). The assay medium contained 0.1M Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM Na_2EDTA , and 0.5 mM GSSG. The reaction was initiated by the addition of NADPH. A molar extinction coefficient of $6.2\ \text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ was used to calculate the activity. The protein content was determined according to Bradford (1976).

Photosynthetic rate

The rate of CO_2 fixation in leaf segments was measured using the open gasometric system LCA-4 (ADC, Hoddesdon, UK). The segments were equilibrated in a leaf chamber under standard conditions (CO_2 concentration in the air: $350\ \mu\text{mol mol}^{-1}$; temperature: $24 \pm 0.3^\circ\text{C}$; water pressure deficit: $1 \pm 0.2\ \text{kPa}$). After about 15 min of light adaptation ($100\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, PAR; growth irradiance), the net photosynthetic rate (A_n) was recorded. The gross photosynthesis rate A_g was calculated as

$A_n - R_{\text{dark}}$, where R_{dark} was the dark respiration measured 5 min after switching off the light.

Lipid peroxidation

The level of lipid peroxidation was estimated from the relative content of thiobarbituric acid reactive products (TBARPs) calculated as the difference of absorbancies at 532 and 600 nm (for a detailed description see Vlčková et al., 2006).

Results

Violaxanthin deepoxidation vs. electron transport and non-photochemical quenching

Barley leaves treated with 10 μM MV at moderate white light (1 h in the dark followed by 4 h at 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; PAR, growth conditions) accumulated a large amount of deepoxidized xanthophyll cycle pigments (Figure 1). In control leaves without MV, the xanthophyll cycle pigments (violaxanthin+antheraxanthin+zeaxanthin – VAZ) were represented almost solely by V. In leaves treated with MV, more than 55% of the pigments were present in the form of A and Z (see DEPS in Table 1). More than 40% of VAZ pigments were found in the form of Z in the MV-treated leaves (Figure 1). Similar results have been reported previously by Kim and Lee

(2003, 2005) for rice leaves treated with MV at moderate light intensity slightly exceeding growth light conditions.

Further, we observed that while the levels of chlorophylls, lutein, neoxanthin, and β -carotene were not significantly changed by the MV treatment (not shown), the total amount of VAZ pigments increased by about 50% in MV-treated leaves (Table 1). There was then the question of whether the accumulated Z and A directly represented the newly synthesized A and Z or whether they were produced by enzymatic deepoxidation of V. A marked suppression of A and Z accumulation in MV-treated leaves with added DTT (not shown), an inhibitor of VDE, implied that the observed MV-induced increase in DEPS originated in VDE-mediated V deepoxidation.

The MV-induced deepoxidation of V is attributed to the enhanced lumen acidification due to the increased ETR in thylakoid membranes (e.g. Buch et al., 1994). In order to show that this also takes place in our illuminated MV-treated leaves, we measured the effective quantum yield of PSII photochemistry (Genty's parameter, $\Delta F/F_M'$), which is a measure of ETR in thylakoid membranes (e.g. Schreiber et al., 1994). This measurement was performed by an application of saturation light pulses during 4 h illumination. The first pulse was applied after 5 min and then each hour after the beginning of the illumination. To our surprise, we observed no stimulation of ETR in MV-treated leaves during the 4 h illumination (Figure 2A). While ETR in MV-treated leaves was almost the same as that in control leaves after 1 h illumination, it progressively decreased to about 85% (Figure 2A). Similar $\Delta F/F_M'$ values observed after 5 min illumination in the control and MV-treated leaves were lower, as they did not represent steady-state values.

Using the saturation pulses applied during 4 h illumination, we also calculated the NPQ parameter ($= (F_M - F_M')/F_M'$) that is used for evaluation of xanthophyll-dependent NPQ. During 1 h illumination, the NPQ in MV-treated leaves was similar to that in control leaves (Figure 2B). This parameter gradually increased with prolonged illumination, and its value after 4 h illumination was about two times higher (NPQ~0.9) than in the control leaves. The NPQ parameter in MV-treated leaves was rather low considering the pronounced formation of A and Z observed after illumination (Figure 1). Such a pronounced accumulation of A and Z in thylakoid membranes under stress conditions is usually accompanied by much higher NPQ values (~2 or higher) (e.g. Xu et al., 1999).

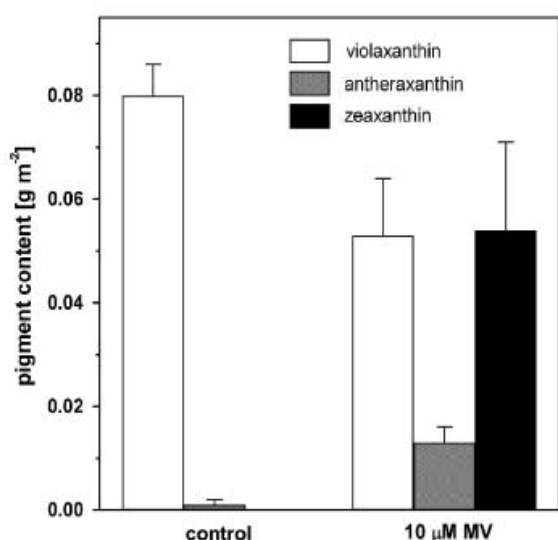


Figure 1. Area concentrations of violaxanthin, antheraxanthin, and zeaxanthin in control barley leaf segments and those treated with 10 μM MV for 5 h (1 h dark+4 h white light (100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; PAR)). Data represent the means \pm SD from four independent measurements.

Table 1. Various physiological parameters of control barley leaf segments and those treated with 10 μM MV (see the legend of Figure 1)

	DEPS (%)	[V]+[A]+[Z] (g m^{-2})	F_v/F_m	TBARPs (%)	APX activity ($\text{nmol AsA min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)	GR activity ($\text{nmol NADPH min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)	A_g ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	g_s ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Control	1 \pm 1	0.080 \pm 0.006	0.80 \pm 0.01	100 \pm 10	385 \pm 59	12.9 \pm 1.8	2.6 \pm 0.3	60 \pm 9
MV	56 \pm 11	0.121 \pm 0.020	0.75 \pm 0.05	81 \pm 10	205 \pm 26	17.6 \pm 0.4	0.4 \pm 0.4	19 \pm 5

These are the deepoxidation state of xanthophyll cycle pigments (DEPS), total pool of xanthophyll cycle pigments ([V]+[A]+[Z]) per leaf area, maximum quantum yield of PSII photochemistry detected as F_v/F_m chlorophyll fluorescence ratio 15 min after termination of 4 h illumination, the content of TBARPs (% of that in control), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) activities, gross photosynthetic rate (A_g), and stomatal conductance (g_s). Data represent the means \pm SD from four independent measurements.

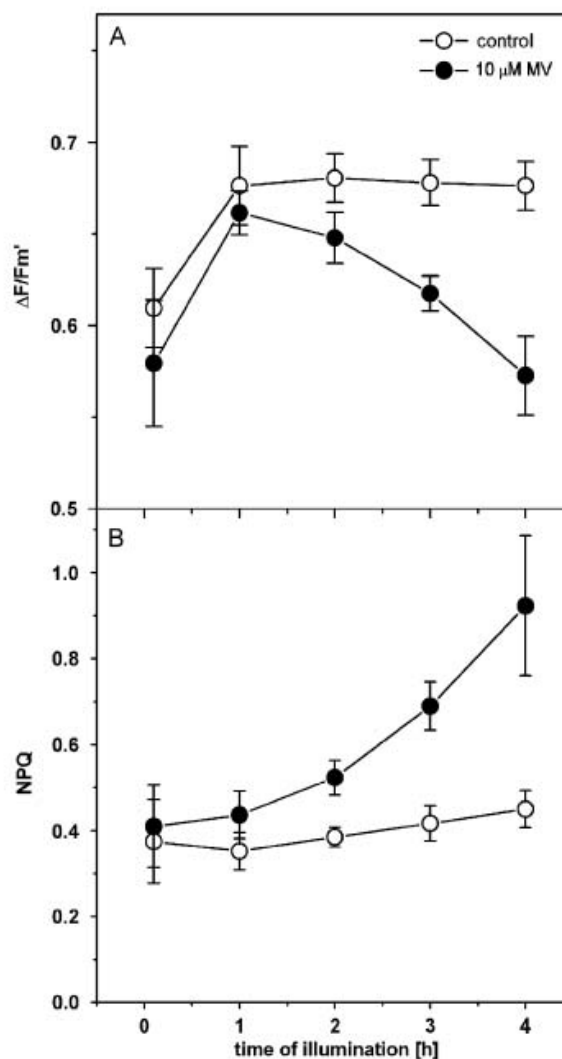


Figure 2. (A) Effective quantum yield of PSII photochemistry ($\Delta F/F_m'$) – a measure of electron transport rate (ETR) and (B) NPQ parameter during 4 h illumination (see the legend of Figure 1) – in control barley leaf segments and that treated with 10 μM MV. The NPQ parameter was calculated as $(F_M - F_M')/F_M'$, where F_M is the maximal chlorophyll fluorescence for dark-adapted leaf segments and F_M' was the same but recorded at a light-adapted state. ΔF is the difference between the F_M' and F_t (the momentary fluorescence level at light). Before illumination, the samples were in solutions for 1 h in the dark. Data represent the means \pm SD from 3 to 4 independent measurements.

Monitoring of MV penetration to PSI

The absence of an increase in ETR observed in illuminated MV-treated leaves led us to measure how MV penetrated into leaf segments, with an expected effect at the acceptor site of photosystem I (PSI). To monitor this MV action, we measured

the absorbance changes at 820 nm (ΔA_{820}) during 10 s after dark–light transition. This transition was performed with white light of the same intensity as that used in the 4 h illumination. The kinetics of the A_{820} induction primarily reflect the redox state of P700, the primary electron donor of PSI, and PC. Other photosynthetic components such as ferredoxin, P680, chlorophylls, and pheophytin could contribute to the ΔA_{820} induction as well, but their contribution can be regarded as negligible (e.g. Harbinson and Hedley, 1993). The initial light-induced oxidation of P700 and PC (ΔA_{820} increases) followed by their re-reduction (ΔA_{820} decreases) within the first 2 s of illumination in untreated leaves (Figure 3) is in accordance with the literature and reflects a transient traffic jam of electrons on the acceptor side of PSI (Harbinson and Hedley, 1993). MV, a very efficient alternative electron acceptor at PSI, prevents the transient re-reduction of P700 and PC, which is demonstrated by the disappearance of the decreasing phase in ΔA_{820} induction (Figure 3). After 1 h treatment with MV (in the beginning of the 4 h illumination), the re-reduction phase was partially reduced, i.e., the MV

action at PSI was not saturated. A complete disappearance of the re-reduction phase was observed in leaves treated for 2.5 and 5 h, implying that MV played the expected role at PSI during illumination. This result suggests that the absence of an increase of ETR in MV-treated leaves (Figure 2) reflects the limiting light conditions used in our treatment.

MV-induced oxidative stress

The MV treatment is often used to induce oxidative stress as MV reacts with molecular oxygen to produce superoxide radical O_2^- in stroma of chloroplasts (Farrington et al., 1973). In our MV-treated leaves, we observed an inhibition of the activity of APX, the most sensitive antioxidative enzyme, by more than half (Table 1). On the other hand, the activity of glutathion reductase (GR), one of the ascorbate-regenerating enzymes, slightly increased. The level of TBARPs, metabolites of lipid peroxidation, did not increase at all. An alternative method for detection of lipid peroxidation in

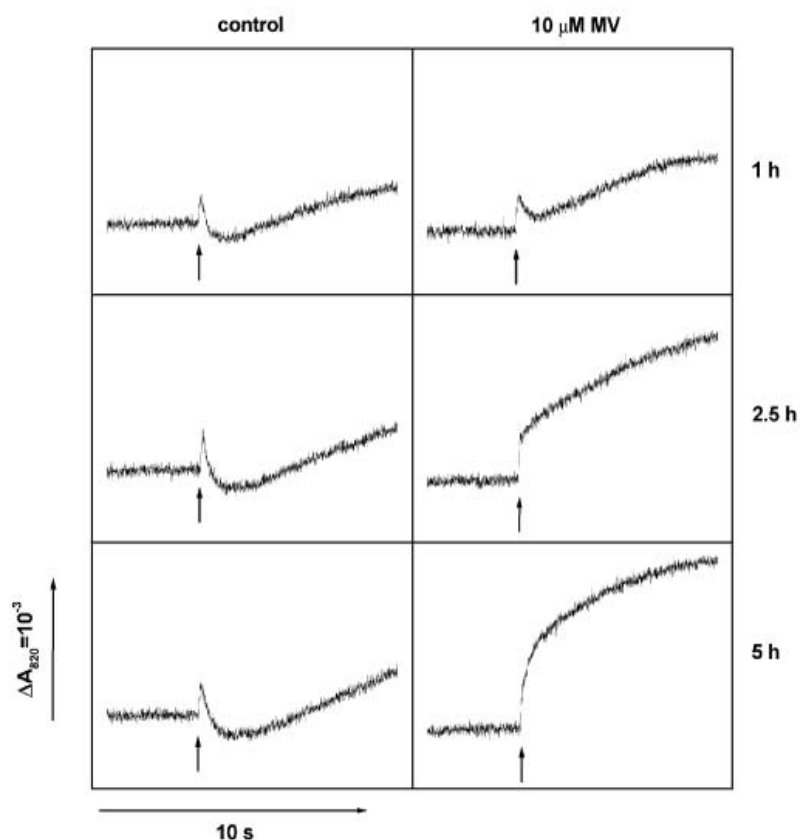


Figure 3. Absorption changes at 820 nm (ΔA_{820}) after the onset of moderate white light ($100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, PAR, growth conditions) in control barley leaf segments and in those treated with $10 \mu\text{M}$ MV for 1, 2.5, and 5 h in the dark. Arrows indicate the onset of the moderate light. Representative curves are shown.

leaves – the measurement of high-temperature chemiluminescence during linear heating (e.g. Havaux, 2003) – supported the result that our MV treatment did not induce lipid peroxidation (not shown). Moreover, no significant decrease in the maximum yield of PSII photochemistry was observed from the fluorimetric measurement of the F_V/F_M ratio after the treatment (Table 1). These findings, together with the observed absence of pigment degradation, imply that our MV treatment did not result in strong oxidative stress as is common in model MV treatments.

Together with the expected inhibition in CO_2 fixation in MV-treated leaves (Table 1), which is induced by NADPH depletion, we also observed a decline of stomatal conductance to about one-third (Table 1).

Discussion

In this work, we demonstrated that the treatment with $10\ \mu\text{M}$ MV, which ensured efficient MV reduction on the acceptor site of PSI, but which does not induce strong oxidative stress in barley leaf segments, stimulated pronounced V deepoxidation to Z under moderate light (Figures 1 and 3). The illumination was relatively low ($100\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, PAR), the same as that used during plant growth. Under these conditions, no pigment degradation, no lipid peroxidation, and no significant decrease in maximum quantum yield of PSII photochemistry appeared (Table 1). The MV-induced oxidative stress was documented by a pronounced decrease in activity of APX and stimulation of that of GR (Table 1). Our MV treatment was similar to that used by Kim and Lee (2003, 2005) for rice leaf segments; however, they observed much stronger oxidative stress. This is in accordance with the reported higher susceptibility of some rice genera to photoinhibition when compared with barley (Xu et al., 1999).

Our MV treatment led to an increase in the area concentration of xanthophyll cycle pigments (Table 1), which is common for acclimation of plants to excessive light (see e.g. Demmig-Adams, 1990; Thayer and Björkman, 1990). As our MV treatment took place at growth light intensity that was relatively low ($100\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, PAR), we suggest that the stimulation of synthesis of xanthophyll cycle pigments resulted from a misbalance between the linear electron flow in thylakoid membranes and CO_2 fixation in presence of MV (Table 1).

The enhanced V deepoxidation to A and Z in MV-treated samples is usually explained by the MV-

induced enhancement in lumen acidification, activating VDE. The enhanced acidification is being connected with the increase in ETR as MV is a very efficient PSI electron acceptor. A concomitant decline in NADPH, a co-substrate needed for the reverse enzymatic epoxidation of A and Z, contributes to the accumulation of A and Z in thylakoid membranes (see Buch et al., 1994). However, in our MV-treated barley leaves, we observed the pronounced V deepoxidation without the MV-induced enhancement in ETR. On the contrary, ETR was progressively decreasing after the first hour of illumination when compared with control barley leaves (Figure 2). Thus, there are questions as to: (i) why we did not observe the MV-induced stimulation of ETR and (ii) what caused the V deepoxidation in MV-treated leaves.

The simplest answer to the first question is that the moderate white light used was relatively low and limiting for the measured ETR in thylakoid membranes. Thus, the addition of the efficient acceptor at the acceptor side of PS (MV) did not lead to the increase in ETR. The answer to the second question is more difficult. On the basis of the ETR results, there is no reason to consider lower lumenal pH, and thus the extra activation of VDE, in MV-treated leaves during illumination. Rather, it seems that VDE is active in both control and MV-treated leaves and that some unknown MV-induced factor stimulates V deepoxidation. This is in accordance with the view that VDE is also active at normal conditions (Kramer et al., 1999) and that the limiting step for V deepoxidation is the release of V from LHC to the lipid phase of thylakoid membranes (for review see Morosinotto et al., 2003). We hypothesize that, in our MV-treated leaves, the release of V from LHC is initiated by the MV-induced oxidative stress.

Further, we observed that the huge MV-induced V deepoxidation to A and Z (DEPS above 55%, Table 1) was not accompanied by the expected increase in NPQ (NPQ parameter ~ 0.9 , Figure 2). Such an accumulation of A and Z in thylakoid membranes under stress conditions is usually connected with the induction of high NPQ (NPQ parameter ~ 2 or higher). Barley leaf segments, for example, chilled for 2 h (4°C) at moderate light ($250\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, PAR) had DEPS about 55% and an NPQ value around 2 (Xu et al., 1999). Our results support the view that Z was somehow restricted to bind to the antennae and form quenching centers. Since it is known that protonation of PsbS protein, the process needed to form the quenching center in LHCII, is optimal at relatively low pH ($\text{pK}_a \sim 5.2$, Li et al., 2002), we can explain this restriction by low lumen acidification due to

the limiting light conditions (see above). VDE is activated at a higher pH range (5.8–6.3, Pfündel and Dilley, 1993; 5.6–6.5, Günther et al., 1994). Thus, in our MV-treated leaves, the lumen acidification is probably high enough for activation of VDE, but not sufficient to form quenching centers. In contrast to our MV-treated leaves under light-limited conditions, in leaves exposed to high light, the lumen acidification is sufficient not only for activation of VDE and a release of V to the lipid phase of thylakoid membranes (Ruban et al., 1999; Caffarri et al., 2001), but also for the formation of Z-dependent quenching centers in LHCII.

Acknowledgments

This project was supported by Grant MSM 6198959215 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and by Grant 522/06/0979 of the Grant Agency of the Czech Republic. The research in the Institute of Microbiology (Academy of Sciences of the Czech Republic, Třeboň) was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (GACR 206-05-0335). We thank anonymous reviewers for their suggestions.

References

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- Buch K, Stransky H, Bigus HJ, Hager A. Enhancement by artificial electron acceptors of thylakoid lumen acidification and zeaxanthin formation. *J Plant Physiol* 1994;144:641–8.
- Caffarri S, Croce R, Breton J, Bassi R. The major antenna complex of photosystem II has a xanthophyll binding site not involved in light harvesting. *J Biol Chem* 2001;276:35924–33.
- Crouchman S, Ruban A, Horton P. PsbS enhances nonphotochemical fluorescence quenching in the absence of zeaxanthin. *FEBS Lett* 2006;580:2053–8.
- Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants. A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta* 1990;1020:1–24.
- Demmig-Adams B, Adams WW. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* 1996;1:21–6.
- Demmig B, Winter K, Kruger A, Czygan FC. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol* 1987;84:218–24.
- Eskling M, Arvidsson PO, Akerlund HE. The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol Plant* 1997;100:806–16.
- Farrington JA, Ebert M, Land EJ, Fletcher K. Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochim Biophys Acta* 1973;314:372–81.
- Feekes W. De tarwe en haar milieu. [Wheat and its growth conditions.] Vers XVII. *Tech Tarwe Comm Groningen* 1941:560–1.
- Foyer C, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 1976;133:21–5.
- Gilmore AM, Yamamoto HY. Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to nonphotochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynth Res* 1993;35:67–78.
- Günther G, Thiele A, Laasch H. A new method for the determination of the transthylakoid pH gradient in isolated chloroplasts. The pH-dependent activity of violaxanthin de-epoxidase. *Plant Sci* 1994;102:19–30.
- Harbinson J, Hedley CL. Changes in P-700 oxidation during the early stages of the induction of photosynthesis. *Plant Physiol* 1993;103:649–60.
- Havaux M. Spontaneous and thermoinduced photon emission: new methods to detect and quantify oxidative stress in plants. *Trends Plant Sci* 2003;8:409–13.
- Holt NE, Fleming GR, Niyogi KK. Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. *Biochemistry* 2004;43:8281–9.
- Horton P, Ruban A. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J Exp Bot* 2005;56:365–73.
- Horton P, Wentworth M, Ruban A. Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: the LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Lett* 2005;579:4201–6.
- Kim JH, Lee CH. Mechanism for photoinactivation of PSII by methyl viologen at two temperatures in the leaves of rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Biol* 2003;46:10–6.
- Kim JH, Lee CH. In vivo deleterious effects specific to reactive oxygen species on photosystem I and II after photo-oxidative treatments of rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Plant Sci* 2005;168:1115–25.
- Kramer DM, Sacksteder CA, Cruz JA. How acidic is the lumen? *Photosynth Res* 1999;60:151–63.
- Kramer DM, Cruz JA, Kanazawa A. Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. *Trends Plant Sci* 2003;8:27–32.
- Latowski D, Grzyb J, Strzałka K. The xanthophyll cycle – molecular mechanism and physiological significance. *Acta Physiol Plant* 2004;26:197–212.
- Li XP, Gilmore AM, Niyogi KK. Molecular and global time-resolved analysis of a psbS gene dosage effect on pH- and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical

- quenching in photosystem II. *J Biol Chem* 2002;277:33590–7.
- Lin RC, Xu CC, Li LB, Kuang TY. Xanthophyll cycle and its molecular mechanism in photoprotection. *Acta Bot Sin* 2002;44:379–83.
- Ma YZ, Holt NE, Li XP, Niyogi KK, Fleming GR. Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4377–82.
- Morosinotto T, Caffarri S, Dall'Osto L, Bassi R. Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiol Plant* 2003;119:347–54.
- Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 1981;22:867–80.
- Ogren E, Baker NR. Evaluation of a technique for the measurement of chlorophyll fluorescence from leaves exposed to continuous white light. *Plant Cell Environ* 1985;8:539–47.
- Pfündel EE, Dilley RA. The pH-dependence of violaxanthin deepoxidation in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol* 1993;101:65–71.
- Ruban AV, Lee PJ, Wentworth M, Young AJ, Horton P. Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. *J Biol Chem* 1999;274:10458–65.
- Schreiber U, Klughammer C, Neubauer C. Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse-modulation system. *Z Naturforsch C* 1988;43:686–98.
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze ED, Caldwell MM, editors. *Ecophysiology of photosynthesis, ecological studies*, vol. 100. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1994. p. 409–30.
- Thayer SS, Björkman O. Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynth Res* 1990;23:331–43.
- Vlčková A, Špundová M, Kotabová E, Novotný R, Doležal K, Nauš J. Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiol Plant* 2006;126:257–67.
- Xu CC, Jeon YA, Lee CH. Relative contributions of photochemical and non-photochemical routes to excitation energy dissipation in rice and barley illuminated at a chilling temperature. *Physiol Plant* 1999;107:447–53.
- Yamamoto HY, Bassi R. Carotenoids: localisation and function. In: Ort DR, Yokum CF, editors. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1996. p. 539–63.

PUBLIKACE II - *Plant Physiology and Biochemistry* (2011)

Plant Physiology and Biochemistry 49 (2011) 1279–1289



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Plant Physiology and Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plaphy

Research article

Photosynthetic alterations of pea leaves infected systemically by pea enation mosaic virus: A coordinated decrease in efficiencies of CO₂ assimilation and photosystem II photochemistry

Helena Kyseláková^a, Jitka Prokopová^a, Jan Naus^a, Ondřej Novák^b, Milan Navrátil^c, Dana Šafářová^c, Martina Špundová^a, Petr Ilík^{a,*}

^a Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, Olomouc CZ-78371, Czech Republic

^b Laboratory of Growth Regulators, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 11, Olomouc CZ-78371, Czech Republic

^c Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, Olomouc CZ-78371, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2011

Accepted 8 August 2011

Available online 23 August 2011

Keywords:

Chlorophyll fluorescence
Pea enation mosaic virus
Pea
Photosynthesis
Photosystem II
Senescence

ABSTRACT

We have investigated photosynthetic changes of fully expanded pea leaves infected systemically by pea enation mosaic virus (PEMV) that often attacks legumes particularly in northern temperate regions. A typical compatible virus–host interaction was monitored during 40 post-inoculation days (dpi). An initial PEMV-induced decrease in photosynthetic CO₂ assimilation was detected at 15 dpi, when the virus appeared in the measured leaves. This decrease was not induced by stomata closure and corresponded with a decrease in the efficiency of photosystem II photochemistry (Φ_{PSII}). Despite of a slight impairment of oxygen evolution at this stage, PSII function was not primarily responsible for the decrease in Φ_{PSII} . Chlorophyll fluorescence imaging revealed that Φ_{PSII} started to decrease from the leaf tip to the base. More pronounced symptoms of PEMV disease appeared at later stages, when a typical mosaic and enations appeared in the infected leaves and oxidative damage of cell membranes was detected. From 30 dpi, a degradation of photosynthetic pigments accelerated, stomata were closing and corresponding pronounced decline in CO₂ assimilation was observed. A concomitant photoprotective responses, i.e. an increase in non-photochemical quenching and accumulation of de-epoxidized xanthophylls, were also detected. Interestingly, alternative electron sinks in chloroplasts were not stimulated by PEMV infection, which is in contradiction to earlier reports dealing with virus-induced plant stresses. The presented results show that the PEMV-induced alterations in mature pea leaves accelerated leaf senescence during which a decrease in Φ_{PSII} took place in coordinated manner with an inhibition of CO₂ assimilation.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Abbreviations: AES, alternative electron sinks; Car, sum of carotenoids; Chl, chlorophyll; C_i, intercellular CO₂ concentration; DEPS, deepoxidation state of the xanthophyll cycle pigment pool; dpi, days post-inoculation; E, rate of transpiration; F₀, minimal chlorophyll fluorescence level in the dark-adapted state; F_M, maximal chlorophyll fluorescence level in the dark-adapted state; F_{M'}, maximal chlorophyll fluorescence level in the light-adapted state; F_v/F_M, maximal quantum yield of photosystem II photochemistry in the dark-adapted state; F_v, chlorophyll fluorescence induction; gs, stomatal conductance; NPQ, non-photochemical quenching; OEC, oxygen evolving complex; OJIP transient, chlorophyll fluorescence induction defined by the names of its intermediate steps; PAR, photosynthetically active radiation; PEMV, pea enation mosaic virus; PEMV-1, *Pea enation mosaic virus-1*; PEMV-2, *Pea enation mosaic virus-2*; P_N, net rate of CO₂ assimilation; PS II, photosystem II; R_D, dark respiration rate; TBARP, thiobarbituric acid reactive products; W_K, relative height of K step to height of J step in OJIP transient; Φ_{CO_2} , quantum yield of CO₂ assimilation; Φ_{PSII} , effective quantum yield of photosystem II photochemistry in the light-adapted state.

* Corresponding author. Tel.: +420 58 563 4153; fax: +420 58 563 4002.

E-mail address: ilik@prfnw.upol.cz (P. Ilík).

0981-9428/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.plaphy.2011.08.006

1. Introduction

Plant diseases induced by pathogens decrease crop productivity worldwide (for review see e.g. [1]). Anderson et al. [2] calculated that about a half of all infectious plant diseases are of viral origin. One of the economically important viral diseases, which affects legumes in northern temperate regions, is pea enation mosaic virus (PEMV) (see [3]). PEMV is usually spread by pea or green peach aphids but can also be transmitted mechanically [4]. The symptoms of PEMV vary with host species and cultivars, environmental conditions and viral isolates. Infected plants are usually stunted, pods are severely misshapen and produce raised wart-like outgrowths or proliferation on the surface. Typical foliar symptoms include chlorotic translucent flecks, small brown necrotic lesions and vein clearing. Enations are often formed on the lower side of leaves (e.g. [3]).

Substantial efforts have been exerted to ascertain a taxonomical classification of the virus responsible for PEMV disease. Due to its unusual features the virus has been previously classified as a sole member of the genus *enamovirus*. Later, a determination of complete sequence of the viral RNA revealed that PEMV disease is caused by the obligate symbiosis of two taxonomically distinct viral genomes, *Pea enation mosaic virus-1* (PEMV-1) that belongs to *enamoviruses* and *Pea enation mosaic virus-2* (PEMV-2) that belongs to *umbraviruses* [5,6]. While PEMV-1 controls the transmission of viruses into plants and cytopathology and does not encode the movement protein (MP), PEMV-2 is responsible for systemic movement of viruses in infected plants (see [7]). The present knowledge of the viral RNAs allows a development of transgenic plants resistant to PEMV (e.g. [8,9]).

To date, a lot of virological studies have been reported on PEMV, however, little attention has been paid to physiological processes that take place in plants infected by PEMV. Typical symptoms of PEMV disease together with the time course of their appearance after inoculation (see [7]) indicate that a compatible plant–virus interaction usually takes place in infected plants. Due to the absence of the fast hypersensitive response the infected plants suffer from the parasitism of PEMV viruses during a whole vegetation period.

Generally, a chloroplast is the most sensitive plant cell organelle to viral infection (e.g. [10]), therefore, the primary indicators of viral disease of plants are a decline in the rate of photosynthesis and chlorophyll (Chl) degradation. These physiological responses are associated with the accumulation of soluble sugars and starch in infected cells (e.g. [11]) and indicate that the cell metabolism switches from source to sink (for review see [12]). Primary causes of the virus-induced changes in the allocation of assimilates as well as the relationship between the decline in photosynthetic rate and accumulation of assimilates are under intensive investigation (for reviews see [13,14]). It has been reported that both the primary and secondary photosynthetic reactions in chloroplast are inhibited in infected plants. The rate CO₂ fixation is limited rather by the stromal reactions than by the primary photosynthetic processes in long-term virus–host interaction (e.g. [15–17]), although a decrease in the photosystem II (PSII) photochemistry also takes place. The virus-induced inhibition of PSII function can be connected with the impairment of the oxygen evolving complex (OEC) at the donor side of PSII [18,19].

As mentioned above, there is a few information about physiological changes taking place in plants infected by PEMV. To our knowledge, there is no report dealing with the influence of PEMV on photosynthetic processes in infected plants. The aim of this study was to examine physiological responses and particularly photosynthetic properties of fully developed leaves infected systemically by PEMV. A special focus was put on the functioning of PSII, CO₂ assimilation and their interrelation during progressive virus-induced plant disease. One of the most often affected crop species in nature, *Pisum sativum* L., was chosen to study the PEMV-host responses.

2. Results

We have investigated a physiological state of pea plants infected systemically by PEMV. The third leaf pair (the measured leaves), i.e. the first pair above the inoculated one, was used for the measurements at 5, 15, 30 and 40 post-inoculation days (dpi). For comparison, the leaves from the mock-infected (control) plants were analyzed. The results obtained with the measured leaves of control plants at 5 dpi did not differ from that obtained at 0 dpi.

2.1. Spreading of PEMV and symptoms development in pea plants

Spreading of PEMV from the inoculation site throughout the pea plant and its accumulation in various parts of the pea plant was

detected using a determination of the viral RNA of PEMV-1 by Q-RT PCR at different post-inoculation days (dpi) (Fig. 1). At 5 dpi the virus was detected in inoculated leaves and also in newly developed leaves on the top of the plant. The content of PEMV-1 in the new leaves was even higher than that in the inoculated leaves. No PEMV-1 was detected in the measured leaves at this stage of infection (Fig. 1). At later stages of infection, the virus content in both the newly developed and inoculated leaves significantly decreased. At 15 dpi, the content of PEMV-1 in the measured leaves was as high as in the inoculated leaves at 5 dpi. Afterwards, the virus content decreased as well as in the new leaves. At 30 dpi, the inoculated leaves were dropped off. These results are in line with a common virus spreading throughout a plant.

The first visual symptoms of PEMV disease, light green spots, appeared on the newly developed leaves at 7–8 dpi. In this phase of infection no symptoms were observed in fully developed leaves. From about 15 dpi, a distinct green/yellow mosaic was visible on all leaves. As disease progressed, pea plants were slightly stunted and the yellow mosaic spots on leaves become translucent and clearly delineated. First enations, i.e. outgrowths vertical to the leaf plane associated with veins, were formed on the abaxial leaf side at 21 dpi. The symptoms of PEMV disease are depicted in Fig. 2. Taken together, the observed virus spreading and concomitant symptoms of disease indicate a common compatible virus–host interaction.

2.2. Oxidative damage of membranes in PEMV-infected leaves

Virus infection causes oxidative stress in plants not only during incompatible virus–host interaction, but also in compatible one (e.g. [20]). We have estimated the extent of membrane damage caused by PEMV-induced oxidative stress in systemically infected leaves by a determination of thiobarbituric acid reactive products (TBARP), compounds formed during lipid peroxidation (Fig. 3A). Slightly increased level of lipid peroxidation appeared in the measured leaves of infected plants at 5 dpi even though the virus was not detected in the leaves (Fig. 1). This finding indicates a systemically induced oxidative stress at initial stage of PEMV

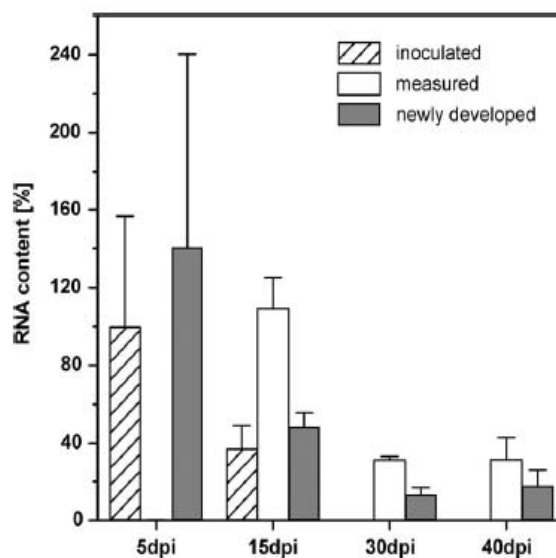


Fig. 1. A relative content of viral RNA of PEMV-1 in the inoculated, measured and newly developed leaves at 5–40 dpi related to the RNA content in the inoculated leaves at 5 dpi (100%). No viral RNA was detected in the measured leaves at 5 dpi. The inoculated leaves were dropped off after 15 dpi. Means and SD are shown ($n = 3–4$).

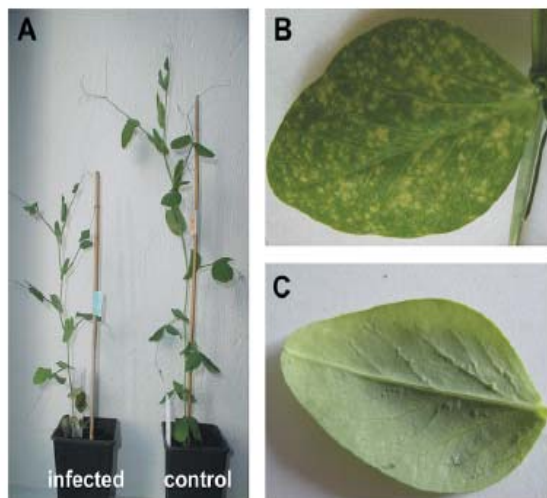


Fig. 2. (A) Typical control and infected pea plants at 30 dpi. As the PEMV-induced disease progressed, the plants became stunted and a typical mosaic appeared on the upper leaf side (B). At later stage of the infection, typical enations associated with leaf veins were observed on the abaxial leaf side (C).

infection. A pronounced accumulation of TBARPs in the measured leaves was found at later stages of infection (30 and 40 dpi). Very similar results were obtained by the measurement of ion leakage from the leaves (Fig. 3B). This method reflects lipid hydroperoxidation of the cell membrane (e.g. [21]) and is often used as a marker of stress-induced cell damage [22]. A slight increase in ion leakage of control leaves at 40 dpi is probably associated with natural senescence (see below).

2.3. Acceleration of degradation of photosynthetic pigments in PEMV-infected leaves

A decrease of photosynthetic pigments in leaves under virus attack belongs to typical responses of plant-virus disease (see Introduction). The leaf area concentration of Chl *a* + *b* and carotenoids (Car) progressively decreased in leaves of both control and infected plants during the whole pursued development (Fig. 4). More pronounced pigment decline in the leaves of infected plants became evident at later stages of infection (from 30 dpi for Chl *a* + *b*

and at 40 dpi for Car). The Chl *a/b* ratio was within 2.4–2.7 in leaves of both infected and control plants throughout the 40 days (not shown), which revealed an equable progressive breakdown of Chl *a* and Chl *b* in leaves of control and infected plants. These results imply that the PEMV–host interaction contributed significantly to progressive senescence of pea leaves.

2.4. Acceleration of decline in CO₂ assimilation in PEMV-infected leaves

Gas exchange parameters of systemically infected pea leaves in comparison to control leaves over 40 days are shown in Fig. 5. The rate of CO₂ assimilation (P_N – net photosynthetic rate) was gradually reduced in both infected and control leaves (Fig. 5A). This reduction was much faster in infected leaves. A markedly lower values of P_N in infected leaves appeared at 15 dpi. The gradual decrease of P_N values in both leaf types closely follows the gradual Chl degradation (Fig. 4A). When P_N was normalized on the Chl concentration, we observed almost constant values for control leaves whereas for infected leaves the values gradually decreased at 5–40 dpi (Fig. 6). This result shows that the decrease in P_N in control leaves can be easily explained by Chl degradation. The Chls remaining in senescing control leaves conserved their linkage to CO₂ assimilation in unchanged level. On the contrary, in virus-infected leaves the Chls were gradually disconnected from the CO₂ assimilation. We note that the dark respiration rate (R_D) in both leaf types was relatively low and did not markedly change over the 40 days (1.3–1.6 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for control leaves and 1.3–2.4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for infected leaves). This implies that the decrease in the rate of CO₂ assimilation in infected leaves can be attributed to the decrease in the rate of photosynthetic CO₂ assimilation in chloroplasts.

The decrease in P_N in control leaves was not accompanied by significant changes in transpiration rate (E) or stomata conductance (g_s) over 40 days (Fig. 5B,C) indicating that it is not associated with stomata closure. These results imply an increase in the estimated intercellular CO₂ concentration (C_i) in control leaves over the 40-day period (Fig. 5D). In virus-infected pea leaves we observed different responses in gas exchange parameters. While the initial decrease in P_N , which appeared at 15 dpi, was not followed by the decreases in E and g_s , the subsequent P_N decrease was (Fig. 5). These results indicate that the initial decrease in P_N is not induced by stomata closure whereas the subsequent decrease could be.

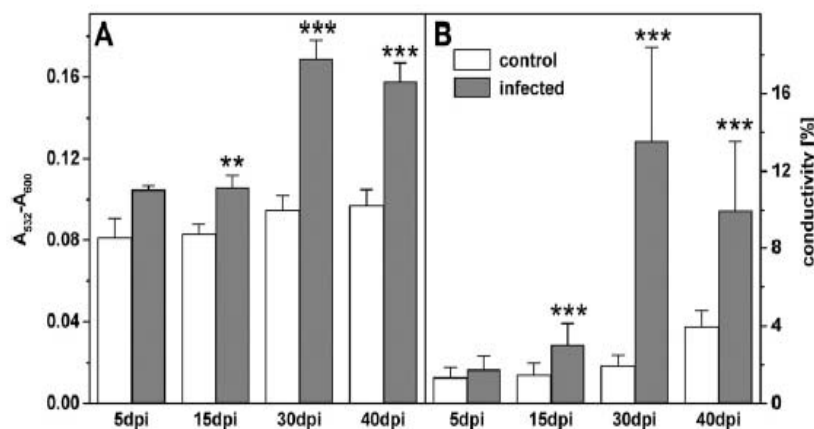


Fig. 3. (A) A relative content of thiobarbituric acid reactive products (TBARP) and (B) electrolyte leakage in the measured leaves of control and infected plants at 5–40 dpi. The TBARP content is calculated as a difference of absorbancies of leaf extracts at 532 and 600 nm. Electrolyte leakage is expressed by the relative conductivity of bathing solution (for details see Materials and methods). Data represent means and SD ($n = 6$). The statistically significant differences between controls and infected leaves are indicated by ** ($P < 0.01$) or *** ($P < 0.001$).

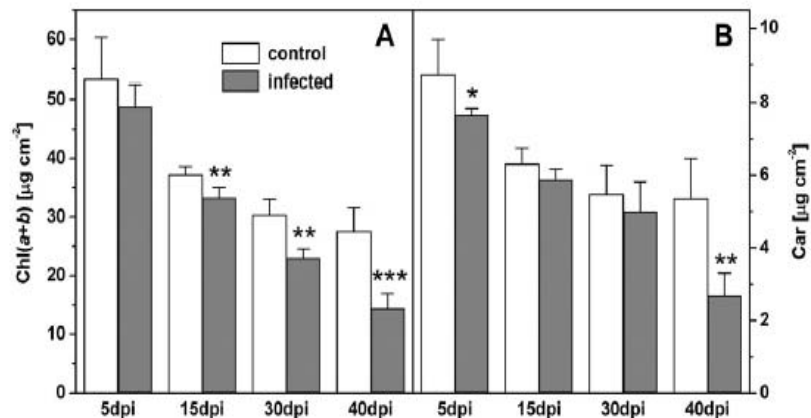


Fig. 4. The chlorophyll (Chl) $a + b$ (A) and sum of carotenoids (Car) (B) contents per leaf area in the measured leaves of control and infected pea plants at 5–40 dpi. Data represent means and SD ($n = 6$). The statistically significant differences between controls and infected leaves are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) or *** ($P < 0.001$).

2.5. Acceleration of decrease in PSII photochemistry and its heterogeneity in PEMV-infected leaves

Changes in photosynthetic processes *in vivo* can be nicely visualized by the Chl fluorescence imaging of whole leaves. Using this technique, the leaf surface heterogeneity of the processes corresponding with the changes in photochemical efficiency of photosystem II (PSII) in thylakoid membranes can be evaluated (for review see [23]). Various Chl fluorescence parameters (F_v/F_M , maximal quantum yield of PSII photochemistry in the dark-adapted state; Φ_{PSII} , effective quantum yield of PSII photochemistry in the

light-adapted state, and NPQ, non-photochemical quenching of excited Chls in the light-adapted state) were measured in control and infected leaves over 40 days (Figs. 7 and 8A). On the contrary to the measurement of photosynthetic rate, all these fluorescence parameters reflect the PSII function irrespective of the Chl concentration in leaves. The Chl fluorescence parameters presented in Figs. 7A,B and 8A were calculated from the averaged values obtained from whole imaged leaves.

In control leaves, we observed a relatively small decrease in F_v/F_M ratio during 40 days (from 0.78 to 0.74) (Fig. 7A,C). Taking into account that the area concentration of Chls declined to almost one

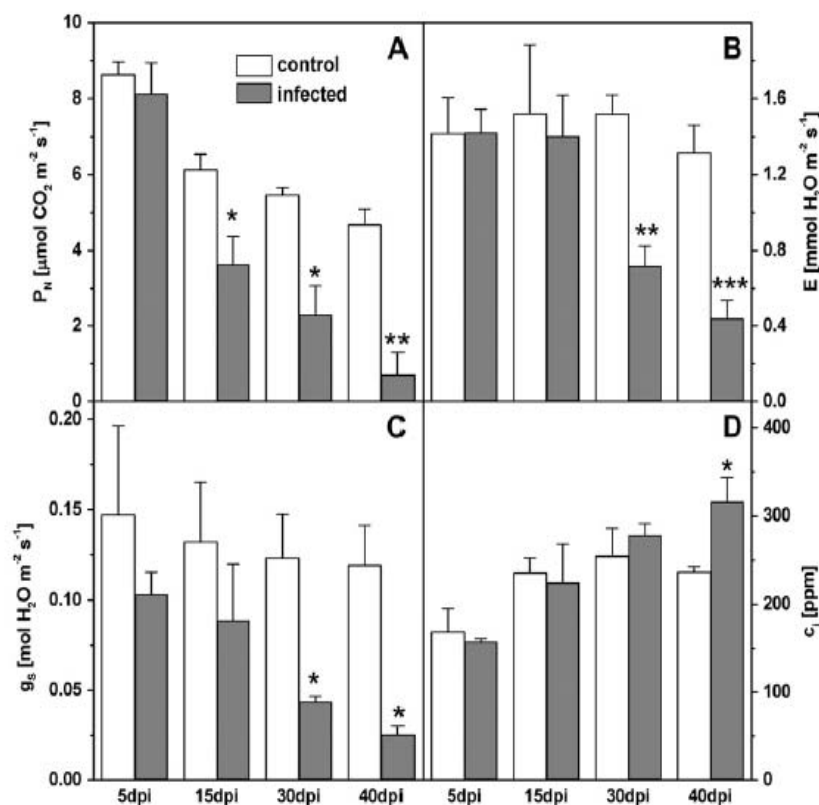


Fig. 5. Net CO₂ assimilation – P_N (A), transpiration – E (B), stomatal conductance g_s (C) and intercellular CO₂ concentration c_i (D) in the measured leaves of control and infected plants at 5–40 pi. Data represent means and SD ($n = 4$). The statistically significant differences between controls and infected leaves are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) or *** ($P < 0.001$).

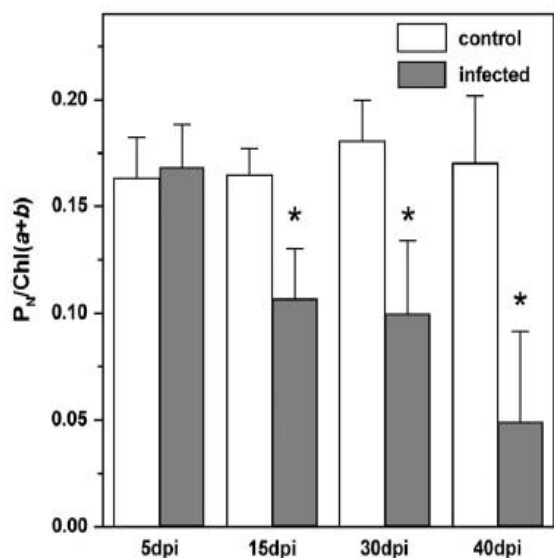


Fig. 6. Net CO₂ assimilation (P_N) from Fig. 5A related to the area concentration of Chl $a + b$ (Fig. 4A) in the measured leaves of control and infected plants at 5–40 dpi. Data represent means and SD ($n = 3-6$). The statistically significant differences between controls and infected leaves are indicated by * ($P < 0.05$).

half during 40 days (Fig. 4A), it is evident that the remaining Chls were kept in functional Chl-containing protein complexes and enabled almost unchanged maximum photochemical yield. Also other Chl fluorescence parameters, Φ_{PSII} (from 0.7 to 0.63) and NPQ (from 0.45 to 0.53), were relatively stable during 40 days (Fig. 7) implying that the remaining photosynthetic apparatus was kept functional.

The Chl fluorescence parameters in infected leaves were much more influenced. Although the F_V/F_M ratio gradually decreased only by 15% during 40 days (Fig. 7A,C), the Φ_{PSII} decreased almost to one third (Fig. 7B,C). The NPQ parameter was slightly higher than in control leaves until 30 dpi and then it markedly increased (more than twice) at 40 dpi (Fig. 8A). These results indicate that PEMV-host interaction markedly inhibited electron transport in thylakoid membranes and stimulated quenching of excited Chls to heat in light-adapted state. The virus-induced decrease in Φ_{PSII} can reflect either the overreduction of electron carriers in thylakoid membranes due to the inhibited CO₂ assimilation reactions in stroma (Figs. 5A and 6A), or the impairment of PSII centers. The gradual decrease in F_V/F_M to 0.65 (at 40 dpi) indicates that PSII is gradually damaged, which reduces the generation of electrons by PSII and restricts the rate of electron flow in thylakoid membranes. Moreover, the observed increase in NPQ indicates that the amount of excitations utilized in charge separation in PSII reaction centers is reduced, which further contributes to the suppression electron flow in thylakoid membranes.

The increase in NPQ is often connected with the Δ pH-dependent enzymatic deepoxidation of violaxanthin (V) to antheraxanthin (A) and zeaxanthin (Z) in thylakoid membranes [24]. Particularly Z is associated with the formation of quenching centers in light-harvesting complexes of PSII (for recent review see [25]). Also in our case, the virus-induced increase in NPQ corresponded with the relative increase in the amount of de-epoxidized xanthophylls (DEPS = $([Z] + [A]) / ([V] + [A] + [Z])$, compare Fig. 8A and B). While the DEPS did not exceed 15% in control leaves, in infected leaves it reached almost 40%.

Analysis of the images of Chl fluorescence parameters in control and infected leaves (Fig. 7C) showed that while in control leaves the

parameters changed only slightly and almost homogeneously during 40 days, in infected leaves they started to change very heterogeneously from 15 dpi, from the leaf top to the base.

2.6. Acceleration of impairment of OEC in PEMV-infected leaves

The more pronounced decrease in the F_V/F_M ratio in infected leaves (Fig. 7A,C) implies impairment of PSII in thylakoid membranes. The most sensitive part of PSII to viral infection seems to be OEC (see Introduction), thus we decided to monitor a potential impairment of the donor side of PSII *in vivo* by the measurement of the fast chlorophyll fluorescence induction (FI) in control and infected leaves (see Materials and methods). In healthy leaves a typical O–J–I–P transient can be detected at high intensity of exciting light. The individual steps in the transient reflect a temporary closure of PSII centers by the electrons originating from water in OEC (for detailed explanation see the review by [26]). When oxygen evolution in PSII is impaired, the O–J–I–P changes to O–K–J–I–P transient, with the additional K step which appears at about 300 μ s. The K step usually appears at the expense of the J step and represents fast closure of PSII center due to a slower donation of electrons at the donor side of PSII [27]. In the case of a marked K step in FI, the other following steps reflect temporary closure of PSII centers by the electrons donated to PSII from alternative source – ascorbate [28]. The gradual formation of the K step in FI can be monitored by the calculation of the W_K parameter that reflects the relative height of the K step to the height of the J step [29]. The increase in W_K can be taken as a measure of the OEC impairment.

Fig. 9 shows the FIs of leaves from control and infected plants at 5 and 40 dpi and the W_K parameter over 40 days (inset). At 5 dpi, the FIs of both leaf types were very similar and typical for healthy leaves (O–J–I–P transient). In infected leaves at 40 dpi the K step in FI was clearly visible, and the W_K parameter increased two times. The gradual increase in W_K , which appeared from 15 dpi in infected leaves, implies that the virus–host interaction influenced OEC function at the same time as CO₂ assimilation. An indication of the K step in FI appeared also in control leaves at 40 dpi. The progress of the W_K parameter over 40 days indicates that natural senescence in control leaves also led to the K step appearance in FI, which is in agreement with literature [30–32].

2.7. PEMV infection do not stimulate alternative electron sinks in chloroplasts

A question arises what is the relation between the virus-induced impairment of PSII function (Fig. 7), reducing the electron flow to NADP⁺, and the decrease in the rate of CO₂ assimilation (Fig. 5A). For this purpose, a ratio of Φ_{PSII} to the apparent quantum yield of the photosynthetic CO₂ assimilation (Φ_{CO_2}) is often estimated. An increase of this ratio indicates that a part of electrons from PSII is consumed by the sinks alternative to CO₂ assimilation (i.e. Mehler reaction, photorespiration, nitrogen metabolism) (see [33]). The Φ_{CO_2} is calculated as the rate of gross photosynthetic CO₂ assimilation ($P_N + R_D$) divided by the incident light intensity and leaf absorbance (see Materials and methods).

We calculated the Φ_{PSII}/Φ_{CO_2} ratio for the measured leaves of control and infected plants at 5–40 dpi (Fig. 10). At 5 dpi the ratio was very similar for both control and infected plants and relatively high (about 23). Such high values reflect a relatively low Φ_{CO_2} (about 0.03; not shown), which is typical for plants grown at moderate light. A slight increase of this ratio appeared in control and infected plants at 15 dpi indicating a partial activation of the alternative electron sinks. However, we did not observe any progress of this process up to 40 dpi either in control or in infected plants. The Φ_{PSII}/Φ_{CO_2} ratios in infected leaves did not differ from

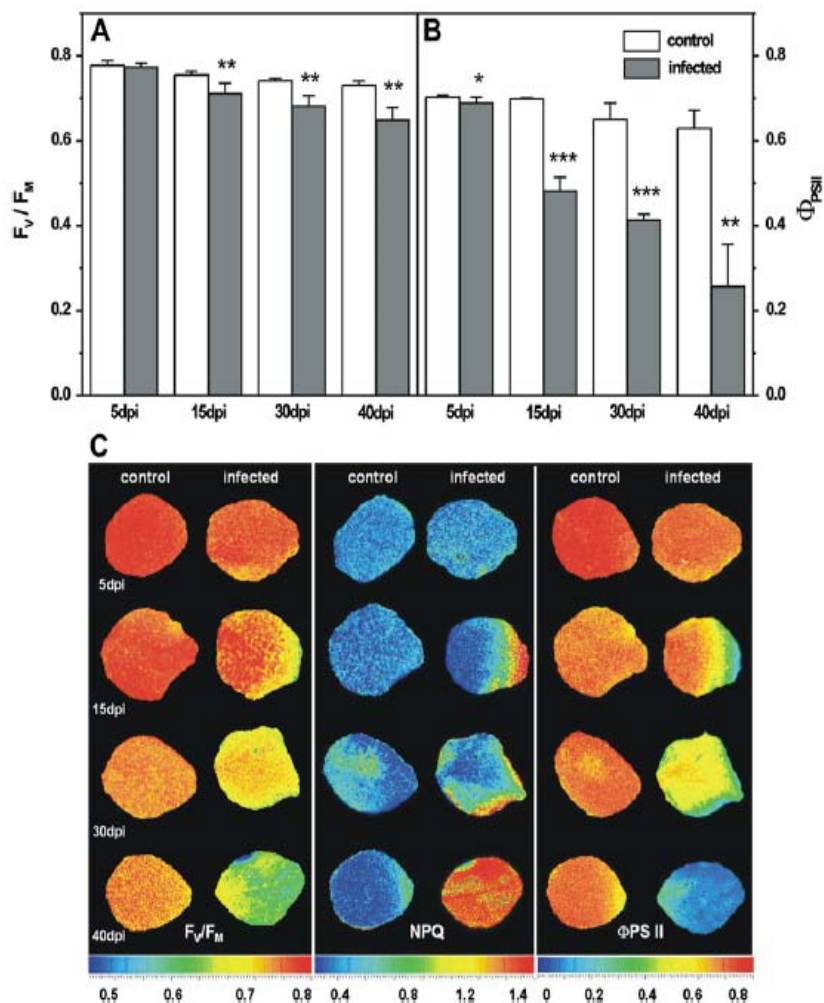


Fig. 7. Integral values of the maximal quantum yield of PSII photochemistry in the dark-adapted state (F_v/F_m), (A) and effective quantum yield of PSII photochemistry in the light-adapted state (Φ_{PSII}), (B) over the whole measured leaves of control and infected plants at 5–40 dpi. Data represent means and SD ($n = 4$). (C) Representative images of chlorophyll fluorescence parameters (F_v/F_m , NPQ, Φ_{PSII}) in the measured leaves of control and infected plants at 5–40 dpi. Pixel values of the parameters are displayed using artificial colors. For details see Material and methods. The statistically significant differences between controls and infected leaves are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) or *** ($P < 0.001$).

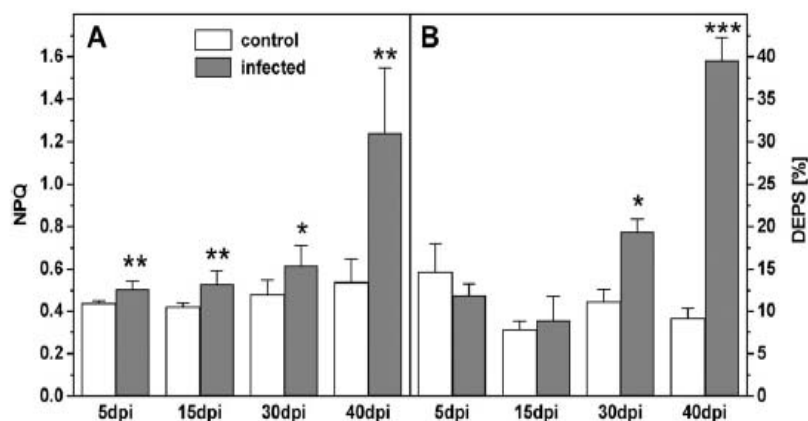


Fig. 8. Integral values of non-photochemical quenching (NPQ) of excited Chls over the whole measured leaves (A) and the deepoxidation state of the xanthophyll cycle pigments (DEPS) (B) in the measured leaves of control and infected plants at 5–40 dpi. DEPS was calculated as relative amount of (A + Z) to (A + V + Z) in percentage (for details see Material and methods). Data represent means and SD ($n = 4$). The statistically significant differences between controls and infected leaves are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) or *** ($P < 0.001$).

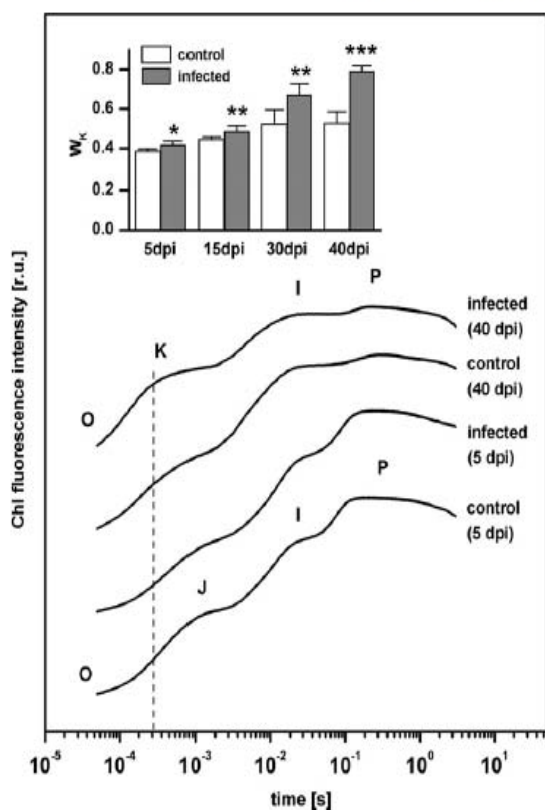


Fig. 9. Representative fast Chl a fluorescence induction curves (FI) of the dark-adapted leaves of control and infected plants at 5 and 40 dpi. FIs are plotted on a logarithmic time scale. Characteristic steps O, K, J, I and P in FI are indicated. Inset: the W_k parameter calculated from the FIs measured in the leaves of control and infected plants at 5–40 dpi. W_k is calculated as $(F_k - F_0)/(F_j - F_0)$, where the F values represent fluorescence intensities at the indicated steps. For details see the text. Data represent means and SD ($n = 6$). The statistically significant differences between controls and infected leaves are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) or *** ($P < 0.001$).

that of the control leaves over the 40-day period (Fig. 10). We should note that a standard deviation of the ratio in infected leaves at 40 dpi dramatically increased as relative errors of both the Φ_{CO_2} and Φ_{PSII} values were relatively high and were summed when the ratio was calculated. In summary, these results showed that at 15–40 dpi the Φ_{CO_2} as well as Φ_{PSII} decreases in similar extent in control and infected leaves despite of the differences in the degradation of photosynthetic pigments (Fig. 4).

3. Discussion

3.1. Photosynthetic responses in naturally senescing control leaves

The physiological responses of pea leaves on the systemic PEMV infection was investigated in naturally senescing pea leaves as documented by a decline in photosynthetic pigments in non-infected control leaves. Although the area concentration of Chls in control leaves was gradually reduced to about a half of the initial value during 40-day screening (Fig. 4), the Chls retained their linkage to CO_2 assimilation as indicated by the unchanged P_N/Chl ratio (Fig. 6). Minor changes in the Chl fluorescence parameters (Figs. 7 and 8) confirm that the remaining Chls were kept in functional Chl-containing protein complexes. The gradual appearance of the weak K step in FI of control leaves during 40 days (Fig. 9) indicates a slight impairment of OEC at the donor side of PSII, which

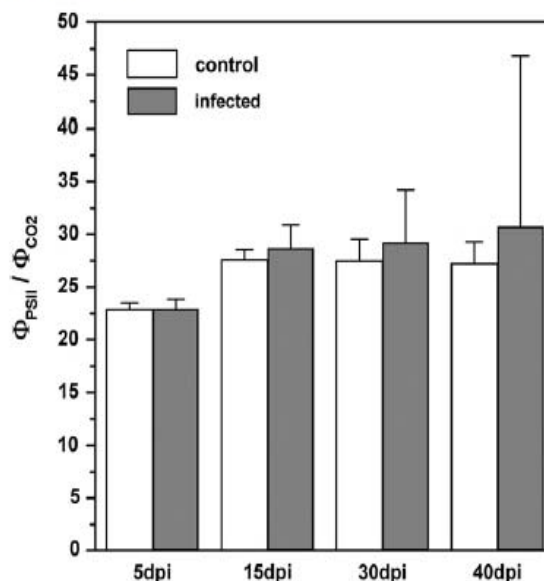


Fig. 10. The ratio of Φ_{PSII} (Fig. 7B) to the quantum yield of photosynthetic CO_2 assimilation (Φ_{CO_2}) in the measured leaves of control and infected plants at 5–40 dpi. Φ_{CO_2} was calculated as a ratio of $(P_N + R_D)$ to the absorbed light at 400–700 nm. For details see Material and methods. Data represent means and SD ($n = 3–4$).

is regarded as one of the initial events of chloroplast degradation during senescence [34]. However, this impairment was not much reflected in the efficiency of PSII photochemistry in the light-adapted state, Φ_{PSII} (Fig. 7), implying that the supply of electrons by PSII to electron transport chain was not limited by the reduced OEC function. The minor relevance of the OEC impairment to linear electron flow in thylakoid membranes is supported by the appearance of the I step in FI of control leaves up to 40th day (Fig. 9). The I step, reflecting the transient accumulation of reduced plastoquinone (for review see [26]), disappears in FI when OEC has become limiting for PSII electron transport [27]. The stable Φ_{PSII} in control leaves over 40 days implies that the observed slight increase in Φ_{PSII}/Φ_{CO_2} ratio, which appeared in after 15th day (Fig. 10), reflects a decrease in CO_2 assimilation (Fig. 7B). This finding indicates a partial activation of alternative electron sinks in chloroplasts, which is in agreement with the observed increase in the intercellular CO_2 concentration (see Fig. 5D).

3.2. Causes of the initial PEMV-induced decrease in CO_2 assimilation

The PEMV-induced changes in the measured physiological parameters were observed in the systemically infected leaves as far as the viral PEMV-1 RNA was detected, i.e. at 15 dpi (Fig. 1). At this stage, a mosaic, the first distinct symptom of infection (Fig. 2), became visible, which implies that this symptom was associated with the presence and/or pathogenicity of the virus. At 15 dpi, the most pronounced change induced by PEMV was observed in the rate of CO_2 assimilation per leaf area. The initial decrease in this parameter was influenced neither by stomata closure (Fig. 5C) nor by chlorophyll level (see Figs. 5A and 6). The extent of the decrease corresponded with the decline in Φ_{PSII} similarly to the control leaves, indicating that the Φ_{PSII}/Φ_{CO_2} ratio was not affected by PEMV (Fig. 10).

The measurements of FI in infected leaves at 15 dpi revealed a slightly higher K step in FI (a higher W_k parameter) in comparison with control leaves. This result indicates a more pronounced

impairment of OEC in infected leaves, which could be naturally taken as a cause of the decline in Φ_{PSII} . However, this explanation is not in line with the W_K and Φ_{PSII} values obtained in control leaves at 30 and 40 dpi (Figs. 7B and 9). In these two cases, the W_K values were higher than in the infected leaves at 15 dpi but the corresponding Φ_{PSII} values were much higher than those in the infected leaves at 15 dpi. Therefore, we conclude that the initial decline in Φ_{PSII} in infected leaves was not affected primarily by the impairment of OEC. This result is not surprising as the electron donor function of OEC can be substituted to a great extent by alternative endogenous electron donors (e.g. ascorbate; [28,35]). Moreover, some extent of OEC impairment may not be limiting for PSII photochemistry as under normal conditions the PSII function is limited rather by the captured light than by the OEC function [27,36]. The relatively low extent of OEC impairment in PSII was observed not only at 15 dpi but during the whole 40-day period, as indicated by the permanent appearance of the I step in FIs (Fig. 9) (see above). In summary, the above mentioned results indicate that the PEMV-induced initial decline in Φ_{PSII} at 15 dpi was not primarily caused by the impairment of OEC.

In general, the Φ_{PSII} can decrease even if PSII function is not impaired. This takes place when the rate of electron transport beyond PSII is slowed down and consequently the electron carriers in thylakoid membranes, including the acceptors at PSII, become more reduced. This kind of PSII down-regulation is usually associated with the inhibition of Calvin cycle reactions that are reflected in a decline of CO_2 assimilation. The reduction of stromal photosynthetic reactions is well documented also in virus-induced plant stresses (e.g. [37,38]). We suggest that this took place also in our PEMV-infected leaves at 15 dpi. The decrease in Φ_{CO_2} probably caused the proportional decrease in Φ_{PSII} level and therefore, the Φ_{PSII}/Φ_{CO_2} ratio remained unaffected by PEMV infection. This explanation can be applied for the unchanged Φ_{PSII}/Φ_{CO_2} ratio also at later stages of infection (Fig. 10).

3.3. Acceleration of senescence at later stages of PEMV infection

The decrease in CO_2 assimilation in infected leaves at 15 dpi continued at later stages of infection (30 and 40 dpi), when it was accompanied by stomata closure (Fig. 5). This pronounced decline together with the decrease in Chl and carotenoid content (Fig. 4) belong to typical symptoms of accelerated senescence. Generally, leaf senescence is associated with the accumulation of reactive oxygen species [39], subsequent oxidative damage [40] and a loss of membrane structural integrity [41]. We have also observed such responses in the leaves infected by PEMV. The increase of TBARP, a marker of membrane peroxidation, and the increased leakage of ions from leaf cells, a marker of cell membrane integrity, were observed (Fig. 3) together with the dramatic decreases of Chls and CO_2 assimilation at 30 and 40 dpi.

The other argument for the PEMV-induced acceleration of senescence came from the heterogeneous decrease in photosynthetic function in infected leaves as observed by Chl fluorescence imaging (Fig. 7C). If the PEMV inhibited photosynthesis directly, the changes would be preferentially detected in the areas with the high virus concentration, i.e. the areas near veins of systematically infected leaves [42]. However, the photosynthetic function started to decrease from the leaf tip and continued to its base (Fig. 7C), indicating that PEMV inhibited the photosynthetic activity indirectly. This type of heterogeneity in physiological parameters is typical for naturally senescing leaves (see [43]), which suggests that PEMV accelerated natural leaf senescence. However, comparing the relative declines of CO_2 assimilation and Chls in control and PEMV-infected leaves, the senescence processes were not the same. While in control pea leaves the natural decrease in Chl content correlated

with the decrease in CO_2 assimilation, in infected leaves the decrease in CO_2 assimilation was much more pronounced than the decrease in Chls (Fig. 6).

The virus-induced as well as the senescence-induced decrease in CO_2 assimilation are reported to be associated with increasing content of sugars that induce a feed-back inhibition of photosynthesis (e.g. [44–47]). This explanation has been reported also for the plant stresses induced by *Luteoviridae* [44,48,49], a family into which also PEMV-1 belongs. The inhibition of transport of assimilates from mature (source) tissues to the young (sink) tissues in senescing or virus-exposed plants is being associated with the increased activity of the cell wall invertase (e.g. [45,50,51]) that cleaves sucrose in the apoplast into glucose and fructose. An extra limitation of the sucrose transport in virus-infected leaves, which could be responsible for the virus-induced acceleration of senescence, can be caused by physical perturbations of the transport path. In the PEMV-infected tissue, membranous vesicular structures, whose production is controlled by PEMV-1 RNA [52], were found to be intimately associated with transversed plasmodesmata of mesophyll cells, the sieve pore plates and phloem elements [53]. This suggestion is in line with the observation that in transgenic plants expressing the movement protein of potato leaf roll virus (a member of *Luteoviridae*) the plasmodesmal function between mesophyll cells was modified and sucrose export was impaired [54].

The observed physiological responses of fully developed pea leaves to systemic PEMV infection showed that PEMV induced a compatible host reaction leading to accelerated leaf senescence. The PEMV infection stimulated the decrease of CO_2 assimilation to larger degree than Chl breakdown, which contrasted with the natural senescence of uninfected leaves. Despite of the pronounced decline in CO_2 assimilation, the PEMV-induced alterations did not stimulate alternative electron sinks in chloroplasts, which differs from earlier results obtained in virus-infected leaves [15–17]. Analysis of chlorophyll fluorescence data suggests that the PEMV-induced decrease in CO_2 assimilation occurred primarily at the level of stromal reactions in chloroplasts which caused traffic jam of electrons at thylakoid membranes and the consequent down-regulation of PSII photochemistry. This state favors acidification of thylakoid lumen, violaxanthin deepoxidation and formation non-photochemical quenching (NPQ) centers at PSII, dissipating excessive excitation to heat. The stimulation of NPQ represents a feed-back response of stressed plants decreasing the rate of electron transport in thylakoid membranes, which helps to maintain redox poise in stroma of chloroplast (for recent review see e.g. [55]). The stimulation of violaxanthin deepoxidation and NPQ observed by us at later stages of infection (see Figs. 7 and 8) thus could help to maintain a balance between CO_2 assimilation and PSII function in PEMV-infected plants.

4. Materials and methods

4.1. Plant cultivation and virus inoculation

Pea plants (*P. sativum* L. cv. Merkur, genotype susceptible to PEMV) were grown in substrate Klassman No. 4 in a growth chamber under a periodic 16/8-h day/night cycle (white light: 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; photosynthetically active radiation, PAR) at 22/18 °C day/night temperatures and relative humidity of 50%. The first and second bottom mature leaves of 14-day old plants were mechanically inoculated with PEMV isolate UP58 on the adaxial surface. For mechanical transmission 0.5 g of infected leaf tissue was grinded in 2.5 ml of 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) supplemented by 30 mg of Celite and 30 mg of the activated charcoal. Mock-infected plants were designated as control. The

third leaves of the plants were used for measurements (the measured leaves). The experiments were performed at 5, 15, 30 and 40 post-inoculation days (dpi).

4.2. Virus quantification by Q-RT PCR

Leaves were ground to a fine powder in liquid nitrogen using a mortar and pestle and total RNA were extracted using NucleoSpin® Plant RNA (Machery-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturers' directions. Primers (PEMVUP1: 5'-AAGCGAGG CGGGGGATGA-3' and PEMVUP2: 5'-CGGCGCCTTCTTAGTTGTGG-3') amplifying a 253 bp fragment of the coat protein (CP) gene of PEMV-1 were designed using the PrimerSelect software (Lasergene package, DNASTAR, Madison, USA) based on PEMV-1 nucleotide sequences available in the GenBank database.

The relative quantification of PEMV-1 was performed with real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Q-RT PCR) using Absolute™ Q-RT PCR SYBR® Green Mix (ABgene, Epsom, UK). Reaction volume mixtures 20 µl contained 4 µl of template RNA, and each primer at 1 µM concentration according to the manufacturer's instruction. Q-RT PCR procedure was initiated by reverse transcription (45 min incubation at 47 °C), followed by a polymerase activation step for 15 min at 94 °C and 35 cycles (denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 58 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 45 s). Q-RT PCR was performed using a Rotor-Gene RG-3000A thermal cycler (Corbett Research, Mortlake, Australia) and data were analyzed using Rotor-Gene 6 software. 'Comparative quantification' software module was used to determine the relative concentration of viral genome copies in the samples. Fluorescence readings were taken at the end of each annealing step. The amplicon size was checked by the separation on a 1.5% agarose gel in TBE buffer with ethidium bromide staining.

4.3. Pigment analysis

The leaves were homogenized in 80% acetone with a small amount of MgCO₃ and the homogenate was centrifuged at 3600 g for 5 min. The absorbance of the supernatant was recorded at wavelengths of 480.0, 646.8, and 663.8 nm (Unicam UV 550, Thermo Spectronic, Cambridge, UK). The content of Chl *a* and *b* and the sum of carotenoids (Car) were calculated using the equations reported by Lichtenthaler [56]. The filtered supernatant (0.22 µm membrane filter) was also used for the analysis of xanthophyll cycle pigments (V – violaxanthin, A – antheraxanthin and Z – zeaxanthin). The separation of xanthophylls was performed with a gradient reversed-phase HPLC (Alliance 2695 Separations Module, Waters, Milford, USA) using a reversed-phase column (250/4 RP 18, LICHROCART, Darmstadt, Germany) kept at 25 °C and a PDA detector (2996, Waters, Milford, USA). The 15 min elution (flow rate of 1 mL min⁻¹) with a solvent system consisting of acetonitrile, methanol, and 0.1M Tris (pH 8.0) in a volume ratio of 87:10:3 was followed by a 2 min linear gradient (flow rate of 0.8 ml min⁻¹) to the second solvent, which was a 34:16 mixture of methanol and ethyl acetate (12 min elution, flow rate of 0.8 ml min⁻¹). Eluted pigments were monitored by their absorption at 440 nm. Factors converting the measured area below the absorption peaks to the xanthophyll contents were used according to [57]. The deepoxidation state of the xanthophyll cycle pigments (DEPS) was calculated as $([Z] + [A])/([V] + [A] + [Z])$.

4.4. Gas exchange measurements

The rate of CO₂ assimilation (P_N) and transpiration rate (E) of control and infected leaves (g_s – stomatal conductance, E – transpiration rate, C_i – intercellular CO₂ concentration) were measured

using the open gasometric system LCA-4 (ADC, Hoddesdon, UK). Before measurements the physiological state of leaves were equilibrated in the leaf chamber at standard conditions (CO₂ concentration in the air: 350 µmol mol⁻¹; temperature 24 ± 0.5 °C; irradiance: 100 µmol photons m⁻² s⁻¹, PAR) for 20 min. The leaves were irradiated with white light (360 µmol photons m⁻² s⁻¹, PAR) for 40 min to obtain the steady-state values of P_N and E . The measured values were normalized to the leaf chamber area (6.25 cm²) fully occupied by leaves. Other physiological parameters – stomatal conductance (g_s) and intercellular CO₂ concentration (C_i) were calculated according to [58].

4.5. Lipid peroxidation

The level of lipid peroxidation in leaves was estimated from the measurement of the content of thiobarbituric acid reactive products (TBARP) according to the modified procedure by Dan et al. [59]. Leaves (0.5 g) were homogenized in 0.1% trichloroacetic acid in a ratio 1:5 (w/v) and centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant (1 ml) was incubated with 4 ml of 20% (v/v) trichloroacetic acid containing 0.5% (v/v) thiobarbituric acid for 30 min at 95 °C and then quickly cooled in an ice bath. The product was centrifuged at 10 000 g for 10 min. The relative concentration of the TBARP was measured as a difference of absorbancies at 532 and 600 nm using a spectrophotometer Unicam UV 550 (Thermo Spectronic, Cambridge, UK).

4.6. Electrolyte leakage

The leakage of ions from the leaf discs (diameter 12 mm) was estimated from the measurement of changes in electrical conductivity (EC) of bathing solution at 26 °C. EC was recorded by a conductivity meter pH/Cond 340i (WTW, Weilheim, Germany) according to [60]. Leaf discs (2 discs per sample) were floated on 6 ml of ultra-pure distilled water (high resistivity) in glass vials and the initial conductivity (EC₀) was recorded. In order to stimulate leakage of ions from leaf discs, samples were subjected to lowered pressure (5 kPa for 3 min) with the vacuum being broken every 30 s. Subsequently, the conductivity (EC₁) of the bathing solution was measured. After this measurement, leaf discs were boiled in the bathing solution for 30 min to destroy all cell membranes. Then, the bathing solution was cooled down to 26 °C and the maximal conductivity (EC_{MAX}) was measured. Results, i.e. (EC₁ – EC₀), were expressed as a percentage of total electrolyte leakage (EC_{MAX} – EC₀).

4.7. Chlorophyll fluorescence imaging

Measurements were performed using the kinetic imaging Chl fluorometer FluorCam 700MF (Photon Systems Instrument, Brno, Czech Republic). Chl fluorescence was excited and detected from adaxial side of dark-adapted (30 min) leaves. Continuous actinic light (80 µmol photons m⁻² s⁻¹) and measuring flashes ($\lambda = 650$ nm) were generated by two panels of red light-emitting diodes (LED), whereas saturating white pulses (4000 µmol photons m⁻² s⁻¹, white light) were provided by a 250 W halogen lamp. The chlorophyll fluorescence emission transients were captured by the CCD camera in a series of images. After the measurement of the minimum fluorescence in the dark-adapted state (F_0), the leaves were irradiated with a saturating pulse and the maximal fluorescence in the dark-adapted state (F_M) was determined. After 2 min of dark relaxation, the leaves were exposed to actinic light (80 µmol photons m⁻² s⁻¹, red light). During this irradiation a sequence of 1.6-s long saturating pulses was applied every 20 s to measure the maximal fluorescence in the light-adapted state (F_M'). Using the

measured Chl fluorescence parameters, following functional parameters of primary photochemical reactions in thylakoid membranes were calculated: maximum quantum yield of PSII photochemistry in the dark-adapted state (F_V/F_M ; $F_V = F_M - F_0$) [61], effective quantum yield of PSII photochemistry in the light-adapted state ($\Phi_{PSII} = (F_M' - F_S')/F_M'$, where F_M' and F_S' are maximal and steady-state fluorescence, respectively, in the light-adapted state) [62], and non-photochemical fluorescence quenching of excited Chls ($NPQ = F_M/F_M' - 1$) in the light-adapted state according to [63]. Results represent Chl fluorescence images of F_V/F_M , NPQ and Φ_{PSII} parameters on leaves and their integral values.

In order to estimate the relative extent of the electron sinks alternative to CO_2 assimilation (AES) in chloroplasts, a ratio of Φ_{PSII} to the apparent quantum yield of photosynthetic CO_2 assimilation (Φ_{CO_2}) was evaluated. The Φ_{CO_2} was calculated according to [33] as $(P_N + R_D)/I_L$, where R_D is dark respiration rate and I_L is the amount photons absorbed by leaf area unit per s. The I_L was calculated as the photon flux density incident on the leaf surface ($360 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, PAR) multiplied by the integral leaf absorbance over the spectral range of PAR (400–700 nm). A calculation of the leaf absorbance was performed by the measured leaf transmittance and reflectance spectra, which were recorded using a Portable Spectroradiometer LI-1800 equipped with an Integrating Sphere 1800-12 (LI-COR, Lincoln, USA) (see [64]).

4.8. Fast chlorophyll fluorescence induction

The 3-s Chl fluorescence transients with characteristic O–(K)–J–I–P steps were measured using the portable Chl fluorometer PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech, King's Lynn, UK) on attached leaves [65]. The plants were dark-adapted for 30 min before measurement. Chl fluorescence was excited by red light (650 nm) and detected above 700 nm. The intensity of exciting light was $2400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The fluorescence levels in O (F_0), K (F_K), J (F_J) and P (F_P) steps are defined as the levels at 50 μs , 300 μs , 2 ms, and in the maximum, respectively. The relative height of the K step to the J step is expressed as $W_K = (F_K - F_0)/(F_J - F_0)$ (see [29]).

4.9. Statistical analysis

A significance of differences of the measured parameters between control and infected pea leaves was tested by a two-sample *t*-test for unequal variance using Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft, USA).

Acknowledgments

We thank Dr. Iva Ilíková for language editing. This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grants No. MSM6198959215 and No. ED0007/01/01 – Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research) and by the Grant Agency of Czech Republic (grant No. 522/08/H003).

References

[1] B.C. Kang, I. Yeam, M.M. Jahn, Genetics of plant virus resistance, *Annu. Rev. Phytopathol.* 43 (2005) 581–621.
 [2] P.K. Anderson, A.A. Cunningham, N.G. Patel, F.J. Morales, P.R. Epstein, P. Daszak, Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers, *Trends Ecol. Evol.* 19 (2004) 535–544.
 [3] N.J. Grünwald, W. Chen, R.C. Larsen, Pea diseases and their management. in: S.A.M.H. Naqvi, K.G. Mukerji (Eds.), *Disease Management of Fruits and Vegetables, II. Vegetable Diseases*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, pp. 301–331.

[4] M.A. Mayo, W.A. Miller, The structure and expression of luteoviruses. in: H.G. Smith, H. Baker (Eds.), *The Luteoviridae*. CAB International, Wallingford, 1999, pp. 23–42.
 [5] S.A. Demler, G.A. de Zoeten, The nucleotide sequence and luteovirus-like nature of RNA 1 of an aphid non-transmissible strain of pea enation mosaic virus, *J. Gen. Virol.* 72 (1991) 1819–1834.
 [6] S.A. Demler, G.A. de Zoeten, G. Adam, K.F. Harris, Polyhedral virions and bipartite RNA genomes. in: B.D. Harrison, A.F. Murrat (Eds.), *The Plant Viruses*. Plenum Press, 1996, pp. 5303–5304.
 [7] G.A. De Zoeten, J.S. Skaf, Pea enation mosaic and the vagaries of plant virus, *Adv. Virus Res.* 57 (2001) 323–350.
 [8] G.M. Chowrira, T.D. Cavaleer, S.K. Gupta, P.F. Lurquin, P.H. Berger, Coat protein-mediated resistance to pea enation mosaic virus in transgenic *Pisum sativum* L, *Transgenic Res.* 7 (1998) 265–271.
 [9] L. Sváblová, P. Smýkal, M. Griga, V. Ondřej, Agrobacterium-mediated transformation of *Pisum sativum* in vitro and in vivo, *Biol. Plant* 49 (2005) 361–370.
 [10] J.A. Hernández, M. Rubio, E. Olmosa, A. Ros-Barceló, P. Martínez-Gómez, Oxidative stress induced by long-term plum pox virus infection in peach (*Prunus persica*), *Physiol. Plant* 122 (2004) 486–495.
 [11] S. Funayama, K. Hikosaka, T. Yahara, Effect of virus infection and growth irradiance on fitness components and photosynthetic properties of *Eupatorium makinoi* (Compositae), *Am. J. Bot.* 84 (1997) 823–829.
 [12] S. Balachandran, V.M. Hurry, S.E. Kelley, C.B. Osmond, S.A. Robinson, J. Rohozinski, G.G.R. Seaton, Concepts of plant biotic stress. Some insights into stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis, *Physiol. Plant* 100 (1997) 203–213.
 [13] S. Biemelt, U. Sonnenwald, Plant–microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism, *J. Plant Physiol.* 163 (2006) 307–318.
 [14] A. Wingler, T. Roitsch, Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress response, *Plant Biol.* 10 (2008) 50–62.
 [15] Y.H. Zhou, Y.H. Peng, J.L. Lei, L.Y. Zou, J.H. Zheng, J.Q. Yu, Effect of potato virus Y^{NTN} infection on gas exchanges and photosystem 2 function in leaves of *Solanum tuberosum* L, *Photosynthetica* 42 (2004) 417–423.
 [16] D.P. Guo, Y.P. Guo, J.P. Zhao, H. Liu, Y. Peng, Q.M. Wang, J.S. Chen, G.Z. Rao, Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection, *Plant Sci.* 168 (2005) 57–63.
 [17] X.-S. Song, Y.-J. Wang, W.-H. Mao, K. Shi, Y.-H. Zhou, S. Nogués, J.-Q. Yu, Effect of cucumber mosaic virus infection on electron transport and antioxidant system in chloroplasts and mitochondria of cucumber and tomato leaves, *Physiol. Plant* 135 (2009) 246–257.
 [18] J. Rahoutei, I. García-Luque, M. Barón, Inhibition of photosynthesis by viral infection: effect on PSII structure and function, *Physiol. Plant* 110 (2000) 286–292.
 [19] M. Bertamini, K. Muthuchelian, N. Nedunchezian, Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein), *J. Phytopathol.* 152 (2004) 145–152.
 [20] M. Riedle-Bauer, Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants, *J. Phytopathol.* 148 (2000) 297–302.
 [21] K. Yoshimura, K. Miyao, A. Gaber, T. Takeda, H. Kanaboshi, H. Miyasaka, S. Shigeoka, Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol, *Plant J.* 37 (2004) 21–33.
 [22] H. Wheeler, P. Hanchey, Permeability phenomena in plant disease, *Annu. Rev. Phytopathol.* 6 (1968) 331–350.
 [23] L. Nedbal, J. Whitmarsh, Chlorophyll fluorescence imaging of leaves and fruits. in: G. Papageorgiu, Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 389–407.
 [24] B. Demmig, K. Winter, A. Kruger, F.C. Czygan, Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves – a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy, *Plant Physiol.* 84 (1987) 218–224.
 [25] P. Horton, M.P. Johnson, M. Pérez-Bueno, A.Z. Kiss, A.V. Ruban, Photosynthetic acclimation: does the structure and macro-organisation of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states? *FEBS J.* 275 (2008) 1069–1079.
 [26] D. Lazar, The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light, *Funct. Plant Biol.* 33 (2006) 9–30.
 [27] B. Strasser, Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients, *Photosynth. Res.* 52 (1997) 147–155.
 [28] S.Z. Tóth, J.T. Puthur, V. Nagy, G. Garab, Experimental evidence for a scorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes, *Plant Physiol.* 149 (2009) 1568–1578.
 [29] R.J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, A. Srivastava, Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. in: G. Papageorgiu, Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 321–362.
 [30] J.S.S. Prakash, A. Srivastava, R.J. Strasser, P. Mohanty, Senescence-induced alterations in the Photosystem II functions of *Cucumis sativus* cotyledons: probing of senescence driven alterations of photosystem II by chlorophyll a fluorescence induction O–J–I–P transients, *Indian J. Biochem. Biophys.* 40 (2003) 160–168.
 [31] Q. Liu, Y. Zhu, H. Tao, N. Wang, Y. Wang, Damage of PS II during senescence of *Spirodela polyrrhiza* explants under long-day conditions and its prevention by 6-benzyladenine, *J. Plant Res.* 119 (2006) 145–152.

- [32] Y.J. Jia, D.D. Cheng, W.B. Wang, H.Y. Gao, A.X. Liu, X.M. Li, Q.W. Meng, Different enhancement of senescence induced by metabolic products of *Alternaria alternata* in tobacco leaves of different ages, *Physiol. Plant* 138 (2010) 164–175.
- [33] G.E. Edwards, N.R. Baker, Can CO₂ assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? *Photosynth. Res.* 37 (1993) 89–92.
- [34] U.C. Biswal, B. Biswal, Ultrastructural modifications and biochemical changes during senescence of chloroplasts, in: G.H. Bourne, K.W. Jeon, M. Friedlander (Eds.), *A Survey of Cell Biology, International Review of Cytology*, vol. 113, Academic Press, 1988, pp. 271–321.
- [35] S.Z. Tóth, G. Schansker, J. Kissimon, L. Kovács, G. Garab, R.J. Strasser, Biophysical studies of photosystem II-related recovery processes after a heat pulse in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.), *J. Plant Physiol.* 162 (2005) 181–194.
- [36] D. Lazár, P. Pospíšil, Mathematical simulation of chlorophyll a fluorescence rise measured with 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea-treated barley leaves at room and high temperatures, *Eur. Biophys. J.* 28 (1999) 468–477.
- [37] M. Šindelářová, L. Šindelář, I. Burgetová, Dynamic changes in the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase, ribulose biphosphate carboxylase and ribonuclease in tobacco leaves, leaf discs and mesophyll protoplasts in relation to TMV multiplication, *Phy. Mol. Plant Path.* 51 (1997) 99–109.
- [38] Y.P. Guo, D.P. Guo, Y. Peng, J.S. Chen, Photosynthetic responses of radish (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*) plants to infection by turnip mosaic virus, *Photosynthetica* 43 (2005) 457–462.
- [39] G.M. Pastori, L.A. del Río, Natural senescence of pea leaves - An activated oxygen-mediated function for peroxisomes, *Plant Physiol.* 113 (1997) 411–418.
- [40] S. Munné-Bosch, L. Alegre, Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts, *Planta* 214 (2002) 608–615.
- [41] M. Hopkins, L. McNamara, C. Taylor, T.-W. Wang, J. Thompson, Membrane dynamics and regulation of subcellular changes during senescence, in: S. Gan (Ed.), *Senescence Processes in Plants*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2007, pp. 39–68.
- [42] M.L. Pérez-Bueno, M. Ciscato, M. vandeVen, I. García-Luque, R. Valcke, M. Barón, Imaging viral infection: studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus, *Photosynth. Res.* 90 (2006) 111–123.
- [43] P.O. Lim, H.J. Kim, H.G. Nam, Leaf senescence, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 58 (2007) 115–136.
- [44] M.C. Arias, S. Lenardon, E. Taleisnik, Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the sunflower chlorotic mottle virus, *J. Phytopathol.* 151 (2003) 267–273.
- [45] K. Herbers, Y. Takahata, M. Melzer, H.P. Mock, M. Hajirezaei, U. Sonnewald, Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco, *Mol. Plant Pathol.* 1 (2000) 51–59.
- [46] L.D. Noodén, J.J. Guimét, I. John, Whole plant senescence, in: L.D. Noodén (Ed.), *Plant Cell Death Processes*, Academic Press, London, UK, 2004, pp. 227–244.
- [47] A. Wiegler, S. Purdy, J.A. MacLean, N. Pourtau, The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 391–399.
- [48] M.C. Gonçalves, J. Vega, J.G. Oliveira, M.M.A. Gomes, Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves, *Fitopatologia Brasileira* 30 (2005) 10–16.
- [49] A.T. Lehrer, P.H. Moore, E. Komar, Impact of sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) on the carbohydrate status of sugarcane: comparison of virus-free plants with symptomatic and asymptomatic virus-infected plants, *Phy. Mol. Plant Path.* 70 (2007) 180–188.
- [50] N. Kocal, U. Sonnewald, S. Sonnewald, Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, *Plant Physiol.* 148 (2008) 1523–1536.
- [51] J. Essmann, I. Schmitz-Thom, H. Schön, S. Sonnewald, E. Weis, J. Scharte, RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco, *Plant Physiol.* 147 (2008) 1288–1299.
- [52] S.A. Demler, O.N. Borkhsenius, D.G. Rucker, G.A. de Zoeten, Assessment of the autonomy of replicative and structural functions encoded by the luteo-phase of pea enation mosaic virus, *J. Gen. Virol.* 75 (1994) 997–1007.
- [53] G.A. De Zoeten, G. Gaard, Mechanisms underlying systemic invasion of pea plants by pea enation mosaic-virus, *Intervirology* 19 (1983) 85–94.
- [54] K. Kronberg, F. Vogel, T. Rutten, M.-R. Hajirezaei, U. Sonnewald, D. Hofius, The silver lining of a viral agent: increasing seed yield and harvest index in *Arabidopsis* by ectopic expression of the potato leaf roll virus movement protein, *Plant Physiol.* 145 (2007) 905–918.
- [55] B. Demmig-Adams, W.W. Adams, Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation, *New Phytol.* 172 (2006) 11–21.
- [56] H.K. Lichtenthaler, Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, *Meth. Enzymol.* 148 (1987) 350–382.
- [57] A. Färber, A.J. Young, A.V. Ruban, P. Horton, P. Jahns, Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants, *Plant Physiol.* 115 (1997) 1609–1618.
- [58] S. Von Caemmerer, G.D. Farquhar, Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves, *Planta* 153 (1981) 376–387.
- [59] K. Dan, M. Nagata, I. Yamashita, Changes in lipid peroxidation and antioxidants content in cotyledons of Japanese radish, *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 65 (1996) 603–608.
- [60] C.S. Bestwick, M.H. Bennerr, J.W. Mansfield, Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce, *Plant Physiol.* 108 (1995) 503–516.
- [61] W.L. Butler, M. Kitajima, Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* 376 (1975) 116–125.
- [62] B. Genty, J.-M. Briantais, N.R. Baker, The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta* 990 (1989) 87–92.
- [63] W. Bilger, O. Björkman, Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Heredia canariensis*, *Photosynth. Res.* 25 (1990) 173–185.
- [64] G. Agati, F. Fusti, P. Mazzinghi, M. Lipucci di Paola, A simple approach to the evaluation of the reabsorption of chlorophyll fluorescence spectra in intact leaves, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 17 (1993) 163–171.
- [65] R.J. Strasser, A. Srivastava, Govindjee, Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria, *Photochem. Photobiol.* 61 (1995) 32–42.

PUBLIKACE III - *Plant Protection Science (2012) – v recenzním řízení*

Reactive oxygen and nitrogen species and hormone signalling in systemic infection of pea by pea enation mosaic virus

Helena Kyseláková¹, Michaela Sedlářová^{2*}, Martin Kubala³, Vladimíra Nožková¹, Jana Piterková⁴, Lenka Luhová⁴, Ondřej Novák⁵, Petr Ilík¹

¹Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, ²Department of Botany, ³Department of Biophysics, ⁴Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc, Czech Republic, ⁵Laboratory of Growth Regulators, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc, Czech Republic

*Corresponding author:

Phone: +420 585634809

Fax: +420 585634824

E-mail: michaela.sedlarova@upol.cz

Abstract

This work shows physiological responses of pea plants during 40 days of compatible interaction with pea enation mosaic virus. PEMV induces systemic changes in concentration of hormones. At 5 days post inoculation (dpi) abscisic acid level increased while this of salicylic acid decreased, which is known to act in suppression of hypersensitive reaction. In our model it preceded the virus presence in the systemic leaves. To support its transmission PEMV induces accumulation of both hormones, Hsp70 and enhances POX activity at 15 dpi. Formation of enations relies on highly localized accumulation of nitric oxide, followed by reactive oxygen species, mostly in the vicinity of leaf veins. Such heterogeneity suggests involvement of these molecules in the control of hyperplasia and tissue differentiation.

Keywords

pea enation mosaic virus; *Pisum sativum*; heat shock proteins; hydrogen peroxide; nitric oxide; phytohormones

Abbreviations

ABA, abscisic acid;

CLSM, confocal laser scanning microscopy;

DAB, 3,3'-diaminobenzidine-4HCl;

DAF-FM DA, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate;

dpi, days post inoculation;

Φ_{PSII} , yield of photosystem II photochemistry;

FW, fresh weight

Hsp 70, heat shock protein family 70;

H₂DCF DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate;

JA, jasmonic acid;

LC-MS/MS, liquid chromatography – tandem mass spectrometry;

NBT, 2,2'-di-*p*-nitrophenyl-5,5'-diphenyl-3,3'[3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenylene]-ditetrazolium chloride;

POX, peroxidase;

ROS, reactive oxygen species;

RONS, reactive oxygen and nitrogen species;

SA, salicylic acid

1. Introduction

Viruses trigger numerous local and systemic responses in susceptible plants based on changes in gene expression as to facilitate their own replication and transmission (WHITHAM & WANG 2004). After mechanical damage to cell wall and plasma membrane the virus ingress is enabled. Virus remains within the symplast infecting surrounding cells only after passage through plasmodesmata attached to microtubules. In the absence of an active resistance response the progressive spread of the virus to most tissues follows, leading to appearance of disease symptoms (MAULE *et al.* 2002). Virion structural proteins were proposed to act as elicitors in the experiments comparing the inoculation by isolated nucleic acids and integral viral particles. Additionally, the fact that systemic signal is not viral was confirmed by rapid systemic response preceding virus transmission (LOVE *et al.* 2005).

Strong attention has been paid to the quest for the sources and markers of plant virus resistance. Genetic engineering strategies have been based on pathogen-derived concept that involves ‘coat-protein-mediated’ protection in transgenic plants or subsequently found RNA-silencing, triggered by a non-coding viral RNA. Alternative strategies such as virus-specific antibodies have also been successfully applied, for review see PRINS *et al.* (2008). Surprisingly, physiology of compatible plant-virus interactions is less understood despite the fact that disease causes economic losses in agriculture (LOVE *et al.* 2005; GRÜNWARD *et al.* 2004).

Peas are susceptible to a large group of aphid-transmitted viruses that cause diseases either individually or in combinations. Pea enation mosaic is incited by obligatory associated enamovirus *Pea enation mosaic virus-1* (PEMV-1) and umbravirus *Pea enation mosaic virus-2* (PEMV-2), both encapsidated in separate icosahedral particles (DEMLER *et al.* 1996). Being spread by green or pea aphid, PEMV infects legumes (pea, broadbean, sweet pea, alfalfa, etc.) mainly in temperate regions. Viral particles are transmitted in a circulate manner within a host plant leading to severe symptoms in juvenile plants, or attenuated ones in those infected after onset of bloom (GRÜNWARD *et al.* 2004). Commercially grown pea cultivars still lack the resistance to PEMV as breeding is complicated by the fact that pea enation mosaic is caused by two mutualistic RNA viruses.

PEMV symptoms include chlorotic, translucent or necrotic lesions, malformation of leaves and stipules, and plant distortion. The most characteristic is the formation of enations on the abaxial, *i.e.* downy, leaf side being derived from the cells of vascular bundles undergoing hyperplasia (GRÜNWARD *et al.* 2004). A little has been published about the metabolic processes underlying this interesting plant-virus interaction. Similarly to the

initiation of galls or cancer, the processes of enation formation presumably link to the alterations of phytohormone levels, esp. cytokinins and auxins, leading to the loss of cell cycle control (CHOI *et al.* 2011). Our previous work focused on the changes in pea photosynthesis during 40-days of PEMV pathogenesis (KYSSELÁKOVÁ *et al.* 2011). Here we continue the experiments to unveil oxidative processes and phytohormone signalling, which might influence the systemic plant response and enation formation.

Variation in the levels of reactive nitrogen and oxygen species (RONS) is viewed as a common feature of biotic stress, found both in compatible and incompatible plant-pathogen interactions (DÍAZ-VIVANCOS 2006; HINRICHS-BERGER 1999). RONS act as signalling molecules as well as effectors of programmed cell death which is essential for plant resistance (LAMOTTE 2005). Increased levels of ROS were reported to be involved e.g. in pathogenesis and development of symptoms in compatible interactions of cucumber mosaic virus and zucchini yellow mosaic virus-infected *Cucumis sativus* and *Cucurbita pepo* plants (RIEDLE-BAUER 2000). Among and within pathosystems the course of “oxidative stress” varies in timing, the amount of generated molecules and is strongly influenced by the extent of tissue antioxidant capacity (DÍAZ-VIVANCOS 2006; LOVE *et al.* 2005; SEDLÁŘOVÁ *et al.* 2007). Both enzymatic and non-enzymatic systems are involved in maintaining the levels and proportions of individual RONS molecules. Radical intermediates formed during lipid peroxidation co-oxidize pigment molecules and might account for chlorosis (RIEDLE-BAUER 2000; KYSELÁKOVÁ *et al.* 2011). Peroxidase (POX) not only scavenges but also catalyses the formation of H₂O₂ and thus can contribute to the oxidative stress in plant-virus interaction. Through oxidation of indole-2-acetic acid, the up-regulated peroxidases might also be responsible for growth reductions and malformations in virus-infected plants (RIEDLE-BAUER 2000).

Plants produce a specific blend of alarm signals which varies in quantity, composition, and timing following contact with pathogens (ADIE *et al.* 2007; KOORNNEEF & PIETERSE 2008). Apart from others, phytohormones such as salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), ethylene and abscisic acid (ABA), are indispensable for activation of defence responses as they transmit signals throughout the plant body. SA is involved in the activation of resistance to biotrophic and hemi-biotrophic parasites as well as in the establishment of systemic acquired resistance (BARI & JONES, 2009; GLAZEBROOK 2005). In compatible potato-*Potato virus Y* interaction the dynamics of responses was shown to be modulated by SA, which can delay viral multiplication and disease symptoms (BAEBLER *et al.* 2011). By contrast, JA and ethylene are usually associated with the defence against necrotrophic parasites and

herbivorous insects or injury (GLAZEBROOK 2005). The interaction between SA- and JA-dependent signalling pathways is often antagonistic, *i.e.* the induction of the first attenuates the second one (SMITH *et al.* 2009). Conversely, examples of the synergistic action of SA and JA/ET defence pathways have also been reported (MUR *et al.* 2006). ABA has recently emerged as a key determinant of a plant-pathogen interaction outcome (MAUCH-MANI & MAUCH 2005). However, the role of ABA appears to be more complex, and varies highly among plant pathosystems (BARI & JONES 2009). In general, ABA can negatively regulate the defence mechanisms (ADIE *et al.* 2007). A cross-talk between different signalling pathways influencing the processes involved in growth and development is utilized in defence responses or adaptation to abiotic stresses (FUJITA *et al.* 2006).

Heat shock proteins (Hsps) belong to molecular chaperones that participate in folding and right assembly of various proteins, facilitate their transport or degradation when damaged (MAYER & BAKAU 2005). These highly conserved proteins are ranked into five major families from which plant Hsp70s contribute substantially to the folding and turnover of viral proteins. Chaperons have been reported to interact with viral movement protein to enable virus translocation and thus development of the disease (VON BARGEN *et al.* 2001). Studies of CHEN *et al.* (2008) suggested that cytoplasmic Hsp70 family members play important roles in plant RNA virus multiplication, from gene expression to virion assembly which enhances the infection degree. Oppositely, Hsp70 is induced by avirulent strains of bacteria as part of the defence response to chaperone newly synthesized proteins in tomato (BYTH *et al.* 2001).

The published information concerning the processes in compatible plant-virus interaction are contradictory, there are exceptions and additional complexities hindering a definition of a simple general model. Thus the roles of individual molecules/pathways are best to verify for each pathosystem. Here, we report on pea-pea enation mosaic virus compatible interaction during formation of enations, the elaborate disease symptoms which pump out plant's energy needed for other physiological processes. Using both mock-inoculated (MI) and control (C) plants enabled the mechanical stress and natural senescence, respectively, to be distinguished from the processes induced by PEMV infection. An importance of precise regulation of oxidative processes, as well as phytohormone and Hsp70 levels, for PEMV-induced tissue reorganization are discussed together with the changes in photosynthetic parameters published earlier by KYSELÁKOVÁ *et al.* (2011).

2. Material and methods

2.1. Plant material

Plants of *Pisum sativum* L. cv. Merkur, susceptible to PEMV, were grown in commercial **substrate (Klassman Substrate 4, Germany)** in a growing chamber under following conditions: at 22/18°C, 16/8 h light/dark, photosynthetic photon flux density (PPFD) of 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{photons}/\text{m}^2/\text{s}$ and relative air humidity 50%. First and second true leaves of two weeks aged plants (three-leaf stage) were inoculated by mechanical abrasion as described below. The growing and inoculation of plants was repeated in three independent experiments.

2.2. PEMV multiplication, inoculation and experimental design

The experiments were performed with pea enation mosaic virus (PEMV) isolate UP58 from the collection of Department of Cell Biology and Genetics, Palacký University in Olomouc, included in the Czech National Collection of Microorganisms (collection number UPOC-VIR-020). Virus was maintained and multiplied on plants of *Pisum sativum* cv. Merkur. The inoculum was obtained from the leaves of 30 days old growth chamber-grown *Pisum sativum* plants expressing strong symptoms of PEMV. Inoculum was prepared by macerating the infected leaves in 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) supplemented by 30 mg Celite and 30 mg activated charcoal in a ratio 1:5 (v/w). The 1st and 2nd true leaves of plants were inoculated by gently rubbing of approximately 1 ml of viral inoculum over leaf surface, after the leaf had been gently wounded with carborundum and subsequently rinsed with sterile water. These plants are in text referred to as PEMV inoculated. Data collected from PEMV material provided the composite response to both leaf abrasion and PEMV infection, *i.e.* mechanical and biotic stress. In order to account for the responses caused by the pre-inoculation injury, another set of plants were abraded omitting PEMV inoculation, thus providing mock-inoculated (MI) control. The remaining third of the plants without any treatment provided a base-line healthy control (C) for all of the experiments.

The 3rd and 4th leaves were harvested from PEMV, MI and C plants 5, 15, 30 and 40 days post inoculation (dpi), frozen in liquid nitrogen and stored in -80°C until used to determine POX activity and endogenous concentrations of Hsp70, and phytohormones, *i.e.* abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA), and salicylic acid (SA). Moreover, in the fresh material the POX activity and accumulation of H₂O₂ and NO were localized histochemically. In order to ascertain the presence of the viruses in PEMV plants, remaining leaves were analysed by enzyme-linked immunosorbent assay double antibody sandwich (ELISA-DAS) (for details see KYSELÁKOVÁ *et al.* (2011)).

2.3. Endogenous concentrations of phytohormones

Levels of ABA, JA and SA were analysed in leaf extracts prepared as described before (HLAVÁČKOVÁ *et al.* 2006) with isotope-containing internal standards by LC-MS/MS. Detailed protocol of hormone analysis is given in NOŽKOVÁ-HLAVÁČKOVÁ *et al.* (2012).

2.4. Levels of Hsp 70

Leaf tissues were homogenized with sample buffer 0.2 g/ml before the Western-blotting analysis. Sample buffer (pH 8) was composed of 135 mM Tris, 15% (v/v) glycerol, 2% (v/v) mercaptoethanol, 3% (w/v) SDS. The homogenates of pea leaves were separated by the 10% SDS-PAGE. The gel was blotted onto the nitrocellulose membrane, which was subsequently blocked by an overnight incubation in 1% BSA (dissolved in TBST buffer (pH 7.4) containing 10 mM Tris, 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20). The Hsp 70 was detected by the incubation of the membrane with monoclonal mouse anti-Hsp 70 antibody (Sigma, 1:1500, 90 min, TBST), followed by amplification with antimouse IgG (Sigma, 1:3000, 90 min, TBST) and staining with 1.5% NBT+BCIP mixture (Fluka) in the buffer containing 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ (pH 9.5). The staining procedure was stopped by addition of distilled water. The membranes were scanned using the BioSpectrum AC Chemi HR 140 reader (UVP, U.S.A.) and the Hsp 70 content was calculated as the integral band density using the VisionWorksT LS Analysis Software (UVP, U.S.A.). In order to minimize the influence of the staining inhomogeneities, each value for leaf of PEMV or MI was normalized to the value for adjacent control leaf of the same age. The Hsp 70 content in the control leaves of different age was mutually normalized in a separate experiment. Each value was expressed as mean and standard deviation representing 3-10 independent experiments.

2.5. Peroxidase activity

The activity of cytosolic peroxidase (POX) was measured by method using guaiacol as a substrate (ANGELINY *et al.* 1990). Pea leaves were homogenized with 0.1 M K-phosphate buffer (pH 7.0) in a ratio of 1:2 (w/v) and the extracts centrifuged (12 000 × g, 10 min, 4°C). POX activity in the supernatant was analysed spectrophotometrically (Unicam UV550 Thermo Spectronic, Cambridge, U.K.), the reaction mixture contained 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6.0), 15 mM guaiacol, water and crude plant extract. The reaction was started by addition of 5 mM hydrogen peroxide and production of tetraguaiacol ($\lambda_{\text{max}} = 436 \text{ nm}$, $\epsilon = 4.5 \text{ nl/mol/cm}$) was followed continuously for 1 min at 30°C. Each value was expressed as mean and standard deviation representing 3 independent experiments.

2.6. Histochemical localization of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) and POX

Changes in RONS metabolism were studied *in situ* by histochemical staining of the leaves detached from plants at 5, 15, 30 and 40 dpi. To reduce the influence of injury, a fresh plant was used for each variant/time combination. The fluorescent signals for RONS were studied by confocal laser scanning microscopy (CLSM) while the products of oxidation standing for H_2O_2 and POX we studied by conventional light microscopy.

2.6.1. Localization of NO

Small pieces of tissues (different sizes) were cut off the leaves of C, MI and PEMV pea plants. Samples were incubated in 10 μ M solution of DAF-FM DA (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; Axxora, U.S.A.) for 30 min, mounted on microscopic slides and observed with confocal laser scanning microscope (Fluorview 1000 attached to inverted microscope IX81; Olympus, Japan). Excitation was provided by a 488 nm line of argon ion laser and emission recorded using a 505-525 nm band-pass filter. At the beginning of each experiment the unstained non-inoculated sample was examined to adjust the right intensity of lasers. Leaf samples treated with 0.1 mM c-PTIO (2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide; a specific NO scavenger) for 30 min prior to the staining with NO probe served as a negative control. To exclude other sources of NO than the enzymatic (with NOS-like activity) the tissues were pre-treated with 10 mM L-NAME (L-N^G-nitroarginine methyl ester; a competitive inhibitor of NO synthase) and 10 mM aminoguanidine (inhibitor of animal forms of NOS) (PITERKOVÁ *et al.* 2009).

2.6.2. Localization of RONS

Hydrogen peroxide and peroxynitrite were visualised with fluorescent probe H_2DCF DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; Axxora, U.S.A.). Pieces of tissues were incubated with 10 μ M H_2DCF DA in 20 mM HEPES buffer (pH 7.5) for 20 min and immediately subjected to CLSM as described above. The negative controls were pre-incubated with antioxidant (0.1 mM rutin) for 30 min before the staining procedure.

2.6.3. Localization of H_2O_2 by light microscopy

In situ production of H_2O_2 was detected by the formation of a brown precipitate after infiltration of leaves under low pressure with 1 mg/ml DAB-HCl (pH 3.5) dissolved in water

and incubation at room temperature in dark for 16 h (THORDAL-CHRISTENSEN *et al.* 1997). Boiling in 96% ethanol (v/v) was performed for 10 min in order to stop the reaction and to clear the leaves from chlorophylls. The observation was performed with Stereo-microscope SZ40 or light microscope BX60, both equipped with digital CCD camera DP70 (Olympus, Japan).

2.6.4. Localization of POX activity

Histochemical localization of endogenous POX was based on its reaction with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) to give a rise of a brown alcohol-resistant precipitate product. Leaf tissues were vacuum infiltrated with DAB-urea hydrogen peroxide solution (SigmaFast™) for 2 h. Boiling in ethanol stopped the reaction and bleached the leaves (SEDLÁŘOVÁ *et al.* 2007). Tissue samples were then mounted in 50% glycerol and stored at + 4°C prior to the light microscopy observation.

2.7. Digital image processing

The spatial distribution of fluorescent signals within tissues was visualized in '2.5D' reconstructions (volume and surface models, XYZ projections, etc.) from series of CLSM cross-sections by Imaris 7.3.1. software (Bitplane AG, Switzerland).

2.8. Statistical analysis

The significance of differences among variants was evaluated for each datasets of measured Hsp70, phytohormone levels and POX activity using the two-tailed paired Student's *t*-test (in-built utility of Microsoft Excel 2007®). The highlighted values significantly differed at $P=0.05$ from those in control (*) or mock-inoculated (#) plants.

3. Results

Recent data continue previous experiments focused on the alterations in photosynthetic parameters in *Pisum sativum* cv. Merkur plants during compatible interaction with pea enation mosaic virus (PEMV) (Kyseláková *et al.* 2011). The stress caused by artificial PEMV infection includes also mechanical stress due to leaf abrasion with carborundum. Thus a mock inoculation variant was added to study the combination of physiological responses. The activity of peroxidase (POX), accumulation of Hsp70 and phytohormones (JA, SA, ABA) were assayed in extracts from the infected (PEMV), mock inoculated (MI) and healthy control plants (C) as well as the accumulation of H₂O₂, ONOO⁻, NO, and POX activity were localized histochemically in leaf tissues at 5, 15, 30 and 40 dpi.

The symptoms of pea enation mosaic were not observed at 5 dpi, the first studied phase of disease progress preceding systemic spread of viral particles. Downward curling of young expanding leaves occurred from 8 dpi. Only later (at 15 dpi) a mosaic was formed that corresponded to the peak of virus titre found by qRT-PCR (Fig. 1). At 30 and 40 dpi, the severe chlorotic spots became translucent and clearly delineated (Fig. 2A) and enations developed above leaf veins (Fig. 2B, C) together with plant stunting.

Preferred position of Fig. 1, 2 (figure 2 in color)

3.1. Endogenous concentrations of abscisic, salicylic and jasmonic acids

Changes in endogenous concentrations of ABA, SA, and JA are compared in Fig. 3. In control plants the ABA content found at 5 dpi (12.8 pmol/g FW) doubled at 15 and 30 dpi and was almost 4 times higher at 40 dpi (46.1 pmol/g FW). Oppositely, it remained almost unchanged in MI plants during the whole experiment (20.8-25 pmol/g FW). PEMV infection caused increase in ABA concentration compared to MI and C plants with significant differences recorded at 5-30 dpi (Fig. 3A). The maximal ABA content was found at 15 dpi (79 pmol/g FW) followed by reduction to 49 pmol/g FW at 30 and 40 dpi.

The highest endogenous concentration of SA, *i.e.* 622 pmol/g FW, was found in MI plants at 5 dpi, significantly different from both control and PEMV plants (Fig. 3B). There was a gradual decrease in the concentration of SA for C as well as for MI plants from 5 dpi, while in PEMV-infected plants the SA concentration peaked at 15 dpi, followed by later decrease to the initial values.

The level of JA in control plants varied from *ca* 20 pmol/g FW at 5 and 15 dpi, followed by a decrease to 9.4 pmol/g FW at 30 dpi and an increase to 37.8 pmol/g FW at 40

dpi. In PEMV-infected plants at 5 dpi the JA content significantly lowered compared to the healthy plants. However, a similar decrease in JA appeared also in MI plants which indicate that the initial decrease in JA was caused by mechanical injury. From 15 to 40 dpi the JA concentration in diseased plants was higher but did not differ significantly from controls. While the JA content in MI plants was low at 5 dpi (7.6 pmol/g FW), at 30 and 40 dpi it was significantly higher than in control as well as in PEMV plants (Fig. 3C).

Preferred position of Fig. 3, 4

3.2. Hsp 70 content

Western-blotting followed by immunohistochemical staining visualized a single band with the molecular mass of 70 kDa (not shown) and enabled relative quantification of the Hsp 70 content (Fig. 4). In PEMV infected plants the amount of Hsp 70 was significantly higher than in control plants at 5-30 dpi, with the maximum at 30 dpi. During ontogeny Hsp 70 concentration gradually increased in all variants, thus there was no apparent difference between inoculated and control samples at 40 dpi. Notably, the mock-inoculation induced an insignificant decrease in Hsp 70 concentration at 5 dpi and a slight increase at 15-40 dpi compared to healthy plants.

3.3. POX activity and localization

The activity of soluble peroxidase (POX) was assayed spectrophotometrically using guaiacol as a substrate. The POX activity in control plants as well as both variants of inoculation was found maximal at 5 dpi with later gradual decrease, the most markedly in MI plants (Fig. 5). In control plants The POX activity ranged among 30-34 $\mu\text{kat/g FW}$ until 30 dpi, its moderate decrease was detected at 40 dpi (Fig. 5). The highest activity of POX was detected in PEMV-infected plants; at 5 dpi it reached 49 $\mu\text{kat/g FW}$, *i.e.* ca 144% of the POX activity in control plants. At 15 dpi the POX activity significantly differed not only from control but also from MI plants. Later the POX activity in PEMV plants dropped to the values similar to those measured in MI and control plants. POX activity was probed also by histochemical staining with DAB and visualized by light microscopy. *In situ* localization of POX activity correlated with biochemical data in leaves of PEMV infected plants. The strongest signal was found at 5 dpi in leaf regions close to veins where pathological changes might have been induced. During systemic spread of PEMV at 15 dpi and later appearance of symptoms the POX signal was weaker (Fig. 5).

Preferred position of Fig. 5

3.4. Production of hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide was localized within pea leaves by DAB staining as a red-brown precipitate (Fig. 6). The minor signal was observed in control and mock-inoculated plants while the stronger accumulation of H₂O₂ molecule was detected in PEMV-infected plants, mainly in mesophyll cells close to veins. At 5 dpi the signal for H₂O₂ was found mostly in leaf tips, at 15 dpi it was localized to central part of leaves while at 30 dpi it was spread all over the area of examined leaves. At 40 dpi strong signal for H₂O₂ corresponded with the area of newly formed enations but omitted the surrounding area (Fig. 6). In leaves of MI plants no apparent difference from non-treated plants was observed (data not shown).

Preferred position of Fig. 6

3.5. Localization of RONS by confocal microscopy

Cell-permeable fluorescence probes were used to track either NO (DAF-FM DA) or RONS (H₂DCF DA) in fresh leaves (green in Fig. 7). Fluorescent signal for RONS, *i.e.* hydrogen peroxide and peroxyxynitrite, localized to tissue regions in the vicinity of veins and developing enations at 5-40 dpi. CLSM enabled also software “2.5D” reconstructions from a series of optical sections in individual objects which revealed a presence of RONS within the volume of enations (Fig. 8). The accumulation of tracked molecules was intensive from 15 to 40 dpi, suggesting that in susceptible pea plants the local changes in RONS concentrations enable tissue reorganization due to PEMV infection. The signal for NO was weak and was found preferably in the initial phases of tissue reprogramming, *i.e.* at 5 and 15 dpi. Minor signal was detected also at 40 dpi.

Preferred position of Fig. 7, 8

4. Discussion

Viruses, similarly to bacteria, cannot pass actively through plant cell walls and require insect vectors (e.g. aphids for PEMV) or wounding to invade the cells of their hosts (SALGUEIRO & HULL 1999). There is rising evidence that even tiny wounding caused by aphids has deleterious effect on plant metabolism (REYMOND *et al.* 2000). During artificial inoculation by leaf abrasion the viral ingress is combined with injury (SMITH *et al.* 2004) as seen by systemic increase in POX activity at 5 dpi (Fig. 5). Components of signalling pathways compared in intact, mock-inoculated, and PEMV-infected plants showed that the processes induced by infection differ from those caused by mechanical stress (best exhibited at 5 dpi) and proceeding natural senescence. At 15 dpi the maximal content of viral RNA corresponded with increase of ABA and Hsp 70 level, and POX activity in systemic leaves.

Our previous study dealt with alterations of photosynthetic parameters in *Pisum sativum* infected by PEMV. During 40 dpi PEMV-accelerated senescence took place in the symptomatic leaves, guided by decrease in efficiency of both CO₂ assimilation and photosystem II photochemistry (Φ_{PSII}) but not linked to stomatal closure (KYSSELÁKOVÁ *et al.* 2011). Additionally, degradation of photosynthetic pigments was accelerated from 30 dpi when symptoms started to be exhibited macroscopically. Local changes shown by chlorophyll fluorescence imaging (a gradual decline of Φ_{PSII} photochemical efficiency starting from the leaf tip) and detected oxidative damage of cell membranes (KYSSELÁKOVÁ *et al.* 2011) link to oxidative processes and enation development as presented herein.

In pea-PEMV interaction the virus start to spread systemically at 5 dpi, while in the studied 3rd and 4th leaves the viral RNA was detected from only 15 dpi (Fig. 1). Activation of plant defence by viral attack is marked by changes in content of molecular chaperons, e.g. Hsp 70 (BYTH *et al.* 2001). However, in our study Hsp 70 expression was induced also by mechanical injury and senescence (Fig. 4). PEMV induced significant increase of the Hsp 70 content from 5 dpi with the maximum at 30 dpi but senescence caused its gradual increase in control plants. Wounding in MI plants led to the initial decrease in Hsp 70 concentration at 5 dpi, while at 15-40 dpi, the Hsp 70 concentration in MI plants was insignificantly higher than this in control plants.

Metabolism of reactive oxygen and nitrogen species provide insight in disease dynamics and plant's destiny. Prompt death due to unbalanced RONS accumulation is well described in several incompatible interactions where virus-attacked cells are sacrificed to limit the infection. Delayed cell death characterizes susceptible plants, e.g. in potato-PVY pathosystem (HINRICHS-BERGER 1999). Levels of ROS and capacity of antioxidant systems

have been investigated in several compatible plant-virus interactions, but opposing results have also been obtained (RIEDLE-BAUER 2000; HERNÁNDEZ *et al.* 2004). Both compatible (*Solanum esculentum* and *Capsicum annuum*) and incompatible hosts (*Nicotiana glutinosa* and *N. tabacum*) during tobamovirus (TMV and ToMV) infection were studied by MADHUSUDHAN *et al.* (2009). The increased SA, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, protein oxidation, POX activity and decreased catalase activity were recorded in the incompatible host-tobamovirus interaction. Minor changes in activity of enzymes, lipid peroxidation and hydrogen peroxide content were found in susceptible hosts (MADHUSUDHAN *et al.* 2009). Long-term infection by PPV studied by DÍAZ-VIVANCOS *et al.* (2006) in peach and apricot showed that general increase in H₂O₂ concentration led to lipid hydroperoxidation of cell membranes and proteins only in susceptible but not in resistant hosts. In compatible interactions the ion leakage, a marker of damaged plasmalemma, was guided by a decrease in POX and superoxide dismutase activity while these were increased in the incompatible interactions. MILAVEC *et al.* (2001) reported the inverse correlation between chlorophyll content and the activity of soluble and ionic-bound peroxidases in 4-weeks old potatoes at 5-7 dpi with potato virus Y^{NTN}, the most aggressive strain of PVY. Conversely, in our time-course study the decrease in the activity of soluble POX (Fig. 5) was found to correspond with the previously reported decrease in the content of chlorophylls and carotenoids (KYSSELÁKOVÁ *et al.* 2011).

Leaf enations, the specific PEMV symptom (Fig. 2), form days to weeks following infection due to the virus-altered regulation of cell cycles in leaf parenchyma which then turns into meristem (CHOI *et al.* 2011). This process seems to rely on the changes in hormonal levels and signalling molecules, *e.g.* RONS. For their wall reconstruction the newly derived cells require H₂O₂, regulated by POX activity (QUIROGA *et al.* 2000). During the systemic spread the PEMV infection poses an oxidative stress to plants as reflected by the increase in lipid peroxidation and electrolyte leakage at 15dpi and 30dpi (KYSSELÁKOVÁ *et al.* 2011). In our experiments strictly localized changes in H₂O₂ level were detected within PEMV-infected leaves (Fig. 6). The H₂O₂ production was observed in mesophyll cells near the minor veins (Fig. 7). Many exceptions in proposed patterns of oxidative processes can be found, *e.g.* in *A. thaliana*-CaMV pathosystem H₂O₂ accumulated both locally and systemically in virus- but not in mock-inoculated plants (LOVE *et al.* 2005). In several host-virus interactions the enhanced POX activity correlated with symptoms severity, but this does not seem to be the case in pea-PEMV (Fig. 5) or in lettuce-*Lettuce Mosaic Virus* (LMV) pathosystems (EL-FAHAAM *et al.* 1990). POX not only scavenges H₂O₂ but also catalyses its formation. It was

presumed that the increase in POX activity contributes to the oxidative stress in systemic plant-virus interactions (RIEDLE-BAUER 2000). Due to the PEMV inoculation, a remarkable enhancement of POX activity was recorded which gradually decreased. The wounding alone increased POX activity at 5 dpi, later its values were comparable with those in control peas. The major influence of PEMV is visible at 15 dpi (small graph in Fig. 5) which links to systemic virus transmission. Induction of antioxidant enzymes by pathogen may lead to disruption of signals generated by ROS, which may have otherwise triggered defence reaction in the host (ARIAS *et al.* 2005).

There is limited information about the mechanisms which lead to the generation of ROS in plant cells following ABA signalling (JIANG & ZHANG 2001). In guard cells of *Arabidopsis*, stomatal closure is enabled by ABA-induced H₂O₂ production and the H₂O₂-activated Ca²⁺ channels (PEI *et al.* 2000). In such tissue the availability of CO₂ for photosynthesis is reduced, which may generate ROS from the misdirecting of electrons in the photosystems. However, stomatal closure was not proved in our pathosystem (Kyseláková *et al.* 2011). In PEMV-infected plants ABA level peaked at 15 dpi (Fig. 3A) which corresponds to the highest value of PEMV-1 RNA detected by q-RT-PCR in sampled leaves (Fig. 1). It is well known that ABA up-regulates events that occur during SENESCENCE, such as increased lipid peroxidation, and membrane permeability, and the induction of proteinase AND RNase activities (PANAVAS *et al.* 1998).

It has been suggested that SA induces resistance mechanisms against virus infection (RADWAN *et al.* 2007). Increase of endogenous SA concentration due to mechanical injury at 5 and 15 dpi was reduced in PEMV-infected peas (Fig. 3B). Considering temporal changes in SA levels in PEMV plants an increase was recorded at 15 dpi which coincided with virus multiplication and spreading. Similarly, in compatible potato-*Potato virus Y* interaction the dynamics of the responses was shown to be modulated by SA, which can delay viral multiplication and disease symptoms (BAEBLER *et al.* 2011). The enhanced SA levels were found concurrently with the rise in CaMV levels in *A. thaliana* (LOVE *et al.* 2005).

In general, we observed antagonistic relationship in temporal changes of SA and JA concentrations, esp. for MI plants (Fig. 3B, C) which corresponds with previous results of other authors (e.g. RADWAN *et al.* 2008). The experiments with exogenously applied SA and JA showed antagonism in various plant species, suggesting an evolutionary conserved process (SPOEL & DONG 2008). SA may inactivate catalase which leads to an increase of ROS concentration and lipid peroxidation, which is the starting point of JA biosynthesis. Thus SA

can participate in delayed JA accumulation (PRESTON *et al.* 1999). Exogenous application of JA was found to induce expression of several defence-related genes, including lipoxygenase (LOX) (BELL *et al.* 1995) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (GUNDLACH *et al.* 1992). The fact that PAL is a key enzyme in the biosynthesis of phenolic compounds, including SA, demonstrates the tight interaction between both signals in plant defence which must be suppressed in compatible interactions.

Antagonistic interactions between multiple components of ABA and the JA-ethylene signalling pathways modulate gene expression in response to biotic and abiotic stresses (ANDERSON *et al.* 2004). Increase of ABA is common in compatible interaction suppressing SA signalling and HR (CAO *et al.* 2011). SMITH *et al.* (2004) identified a specific group of genes that exhibited differential transcript abundance in response to wounding and systemic viral infection. However, genes implicated in early wound responses, such as JA-induced genes and transcription factors (LI *et al.* 2001) did not exhibit an increase in transcript abundance in response to wounding alone. JA in high concentration might be involved in the inhibition of a virus replication. It was shown that JA as well as SA does not prevent systemic spread of the virus but reduces its titre (CLARKE *et al.* 1998). CLARKE *et al.* (2000) reported two phases of increase in endogenous JA level, first occurred during several hours after inoculation while the second rise during the increase of virus titre in plant body and anthocyanin accumulation. The peak of JA we found at 15dpi is linked particularly to host plasmalemma damage upon replication of virus (*i.e.* PEMV transmission) and chlorophyll degradation (KYSSELÁKOVÁ *et al.* 2011).

5. Conclusions

Considering the complexity of plant-virus interactions, the hypothesis that the increased activity of antioxidant enzymes interrupts signals generated by ROS and leads to compatibility cannot be neglected. Hormone-triggered defence reactions need to be suppressed which makes virus interaction with host's metabolism even trickier. From our results we can conclude that oxidative processes linked to balancing of hormone levels determine susceptibility to pea enation mosaic virus. Abiotic stress during inoculation might delay viral colonization as shown from interfering hormone levels. The increased peroxidation of membranes is not reflected in JA formation. The systemic transmission of PEMV coincides with ABA and SA accumulation and POX activity. In PEMV-colonized pea plants, the decrease in the activity of POX and higher RONS levels enable expression of symptoms. However, heterogeneity of reactions within a leaf must be taken into account e.g. accumulation of RONS was confirmed in altering tissue spots undergoing chlorosis. Localization of oxidative processes to regions of developing enations is quite unique and enables development of distinctive symptoms which significance has not been answered yet. For the first time we localized nitric oxide, an important signalling molecule, in plant tissues undergoing virus-triggered reorganization.

Acknowledgements

The work was financed by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 6198959215 and ED0007/01/01 – Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research) and the Czech Science Foundation (GACR 522/08/H003). PEMV isolate was provided by the Department of Cell Biology and Genetics (Faculty of Science, Palacký University in Olomouc), where the inoculation and DASI-ELISA tests were performed. Authors highly appreciate the assistance of U. Sikorová (Western blotting), P. Amakorová (extraction of hormones), and valuable comments to the manuscript by Dr. M. Špundová.

References

- ADIE B.A., PÉREZ-PÉREZ J., PÉREZ-PÉREZ M.M., GODOY M., SÁNCHEZ-SERRANO J.J., SCHMELZ E.A., SOLANO R. (2007): ABA Is an Essential Signal for Plant Resistance to Pathogens Affecting JA Biosynthesis and the Activation of Defenses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **19**: 1665-1681.
- ANDERSON J.P., BADRUZSAUFARI E., SCHENK P.M., MANNERS J.M., DESMOND O.J. EHLERT CH., MACLEAN D.J., EBERT P.R., KAZANA K. (2004): Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defence gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**: 3460-3479.
- ANGELINY R., MANES F., FEDERICO R. (1990): Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta*, **182**: 89-96.
- ARIAS, M. C., LUNA, C., RODRÍGUEZ, M., LENARDON, S., TALEISNIK E. (2005): *Sunflower chlorotic mottle virus* in compatible interactions with sunflower: ROS generation and antioxidant response. *European Journal of Plant Pathology*, **113**: 223-232.
- BAEBLER Š., STARE K., KOVAČ M., BLEJEC A., PREZELJ N., STARE T., KOGOVŠEK P., POMPE-NOVAK M., ROSAH S., RAVNIKAR M., GRUDEN K. (2011): Dynamics of Responses in Compatible Potato - Potato virus Y Interaction Are Modulated by Salicylic Acid. *PLoS ONE* **6(12)**: e29009. doi:10.1371/journal.pone.0029009
- BARI R., JONES J.D.G. (2009): Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, **69**: 473-488.
- BELL E., CREELMAN R.A., MULLET J.E. (1995): A chloroplast lipoxygenase is required for wound induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy of Science USA*, **92**: 8675-8679.
- BYTH H.-A., KUUN K.G., BORNMAN L. (2001): Virulence-dependent induction of Hsp70/Hsc70 in tomato by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39**: 697-705.
- CAO F.Y., YOSHIOKA K., DESVEAUX D. (2011): The role of ABA in plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Research* **124**: 489-499.
- CHEN Z., ZHOU T., WU X., HONG Y., FAN Z., LI H. (2008): Influence of cytoplasmic heat shock protein 70 on viral infection of *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology*, **9**: 809-817.

- CHOI J., CHOI D., LEE S., RYU C.-M., HWANG I. (2011): Cytokinins and plant immunity: Old foes or new friends? *Trends in Plant Science*, **16(7)**: 388-394.
- CLARKE S.F., BURRITT D.J., JAMESON P.E., GUY P.L. (1998): Influence of plant hormones on virus replication and pathogenesis-related proteins in *Phaseolus vulgaris* L. infected with white clover mosaic potexvirus. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, **53**: 195-207.
- CLARKE S.F., GUY P.L., JAMESON P.E., SCHMIERER D., BURRITT D.J. (2000): Influence of white clover mosaic potexvirus infection on the endogenous levels of jasmonic acid and related compounds in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *Journal of Plant Physiology*, **156**: 433-437.
- DEMLER S.A., DE ZOETEN G.A., ADAM G., HARRIS K.F. (1996): Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes. In: Harrison B.D., Murant A.F. (eds.) *The Plant Viruses*, Vol. 5. Plenum Press, New York, U.S.A., 303-304.
- DÍAZ-VIVANCOS P., RUBIO M., MESONERO V., PERIAGO P.M., ROS BARCELÓ A., MARTÍNEZ-GÓMEZ P., HERNÁNDEZ J.A. (2006): The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to plum pox virus. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 3813-3824.
- EL-FAHAAM Y.M., FEGLA G.I., WAGIH E.E., EL-KARYONI H.A. (1990): Biochemical changes in lettuce plants infected with lettuce mosaic virus. *Journal of King Saud University*, **2**: 271-277.
- FUJITA M, FUJITA Y, NOUTOSHI Y, TAKAHASHI F, NARUSAKA Y, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**: 436-442.
- GLAZEBROOK J. (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **43**: 205-227.
- GRÜNWARD N.J., CHEN W., LARSEN R.C. (2004): Pea Diseases and their Management. In: Naqvi S.A.M.H., Mukerji K.G. (eds): *Disease Management of Fruits and Vegetables: Volume II, Vegetable Diseases*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 301-331.
- GUNDLACH H, MULLER M.J., KUTCHAN T.M., ZENK M.H. (1992): Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **89**: 2389-2393.
- HERNÁNDEZ J.A., RUBIO M., OLMOS E., ROS-BARCELÓ A., MARTÍNEZ-GÓMEZ P. (2004): Oxidative stress induced by long-term plum pox virus infection in peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum*, **122**: 486-495.

- HINRICHS-BERGER J., HARFOLD M., BERGER S., BUCHENAUER H. (1999): Cytological responses of susceptible and extremely resistant potato plants to inoculation with potato virus Y. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**: 143-150.
- HLAVÁČKOVÁ V., KRCHŇÁK P., NAUŠ J., NOVÁK O., ŠPUNDOVÁ M., STRNAD M. (2006): Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta*, **225**: 235-244.
- JIANG M., ZHANG J. (2001): Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology* **42**: 1265-1273.
- KOORNNEEF A., PIETERSE C.M.J. (2008): Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*, **146**: 839-844.
- KYSELÁKOVÁ H., PROKOPOVÁ J., NAUŠ J., NOVÁK O., NAVRÁTIL M., ŠAFÁŘOVÁ D., ŠPUNDOVÁ M., ILÍK P. (2011): Photosynthetic alterations of pea leaves infected systemically by *pea enation mosaic virus*: A coordinated decrease in efficiencies of CO₂ assimilation and photosystem II photochemistry. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**: 1279-1289.
- LAMOTTE L, COURTOIS C, BARNAVON L, PUGIN A, WENDEHENNE D. (2005): Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta*, **221**: 1-4.
- LI L., LI C., HOWE G.A. (2001): Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. *Plant Physiology*, **127**: 1414-1417.
- LOVE A.J., YUN B.W., LAVAL V., LOAKE G.J., MILNER J.J. (2005): *Cauliflower mosaic virus*, a compatible pathogen of *Arabidopsis*, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiology*, **139**: 935-948.
- MADHUSUDHAN K.N., SRIKANTA B.M., SHYLAJA M.D., PRAKASH H.S., SHETTY H.S. (2009): Changes in antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, salicylic acid and oxidative stress in compatible and incompatible host-tobamovirus interaction. *Journal of Plant Interactions*, **4**: 157-166.
- MAUCH-MANI B., MAUCH F. (2005): The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**: 409-414.
- MAULE A., LEH V., LEDERER C. (2002): The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 279-284.
- MAYER M.P., BAKAU B. (2005): Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell and Molecular Life Sciences*, **62**: 670-684.

- MILAVEC M., RAVNIKAR M., KOVAČ M. (2001): Peroxidases and photosynthetic pigments in susceptible potato infected with potato virus Y^{NTN}. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39**: 891-898.
- Mur L.A.J., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C. (2006): The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*, **140**: 249-262.
- NOŽKOVÁ-HLAVÁČKOVÁ V., MIESLEROVÁ B., LUHOVÁ L., PROKOPOVÁ J., PITERKOVÁ J., NOVÁK O., ŠPUNDOVÁ M., NAUŠ J., LEBEDA A. (2012): Biochemical responses of susceptible and moderately resistant tomato plants to powdery mildew infection and the effect of heat-shock pre-treatment. *Plant Physiology and Biochemistry*, *submitted*.
- PANAVAS T., WALKER E.L., RUBINSTEIN B. (1998): Possible involvement of abscisic acid in senescence of daylily petals. *Journal of Experimental Botany*, **49**: 1987-1997.
- PEI Z.-M., MURATA Y., BENNING G., THOMINE S., KLUSENER B., ALLEN G.J., GRILL E., SCHROEDER J.I. (2000): Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, **406**: 731-734.
- 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.
- PRESTON C.A., LEWANDOWSKI C., ENYEDI A.J., BALDWIN I.T. (1999): Tobacco mosaic virus inoculation inhibits wound-induced jasmonic acid-mediated responses within but not between plants. *Planta*, **209**: 87-95.
- PRINS M., LAIMER M., NORIS E., SCHUBERT J., WASSENEGGER M., TEPFER M. (2008): Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*, **9**: 73-83.
- QUIROGA M., GUERRERO C., BOTELLA M.A., ROS BARCELÓ A., AMAYA I., MEDINA M.I., ALONSO F.J., DE FORCHETTI S.M., TIGIER H., VALPUESTA V. (2000): A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*, **122**: 1119-1127.
- RADWAN D.E.M., FAYEZ K.A., MAHMOUD S.Y., HAMAD A., LU G. (2007): Physiological and metabolic changes of *Cucurbita pepo* leaves in response to *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**: 480-489.
- RADWAN D.E., LU G., FAYEZ K.A., MAHMOUD S.Y. (2008): Protective action of salicylic acid against *Bean yellow mosaic virus* infection in *Vicia faba* leaves. *Journal of Plant Physiology*, **165**: 845-857.

- RIEDLE-BAUER M. (2000): Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *Journal of Phytopathology*, **148**: 297-302.
- REYMOND P., WEBER H., DAMOND M., FARMER E.E. (2000): Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **12**: 707-719.
- SALGUEIRO S., HULL R. (1999): Comparison of *Pea enation mosaic virus* (PEMV) isolates: sequence of coat protein and aphid transmission protein genes of a European isolate. *Journal of Phytopathology*, **147**: 391-396.
- SEDLÁŘOVÁ M., LUHOVÁ L., PETŘIVALSKÝ M., LEBEDA A. (2007): Localization and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**: 607-616.
- SMITH C.M., RODRIQUEZ-BUEY M., KARLSSON J., CAMPBELL M.M. (2004): The response of the poplar tricotome to wounding and subsequent infection by a viral pathogen. *The New Phytologist*, **164**: 123-136.
- SMITH J.L., DE MORALES C.M., MESCHER M.C. (2009): Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Management Science*, **65**: 497-503.
- SPOEL S.H., DONG X. (2008): Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host and Microbe*, **3**: 348-351.
- THORDAL-CHRISTENSEN H., ZHANG Z., WEI Y., COLLINGE D.B. (1997): Subcellular localization of H₂O₂ in plants in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, **11**: 1187-1194.
- VON BARGEN S., SALCHERT K., PAAPE M., PIECHULLA B., KELLMANN J.W. (2001): Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39**: 1083-1093.
- WHITHAM S.A., WANG Y.Z. (2004): Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**: 365-371.

Legend to figures

Fig. 1. Relative content of viral RNA of PEMV-1 for inoculated and systemic leaves at 5-40 dpi related to the RNA content in the inoculated leaves at 5 dpi (100%). No viral RNA was detected in the systemic leaves at 5 dpi. The inoculated leaves dropped off after 15 dpi. Values represent means \pm SD (n = 3-4).

Fig. 2. Symptoms of pea enation mosaic virus at 30 dpi include chloroses on adaxial (A), and enations on abaxial leaf side (B, C). Note formation of the enations in close vicinity of veins.

Fig. 3. Contents of abscisic acid (A), salicylic acid (B), and jasmonic acid (C) in control, mock-inoculated and PEMV-infected pea leaves during 40 dpi. Data show means \pm SD (n = 3). Values significantly different at P = 0.05 from control (C) (*) or mock-inoculated plants (MI) (#) are highlighted.

Fig. 4. Relative concentrations of Hsp70 in leaves of control (C), mock-inoculated (MI) and PEMV-infected (PEMV) pea plants. Data are normalized to the concentrations of the homogenate from control leaves harvested at 5 dpi and expressed as means \pm SD (n = 3-10), for details see Material and methods. Highlighted values significantly differ from C (*) or MI (#) at P = 0.05.

Fig. 5. Variations in the activity of cytosolic peroxidase in control (C), mock-inoculated (MI) and infected (PEMV) pea leaves during 40 dpi. Data are expressed as means \pm SD (n = 3). Highlighted values significantly differ from C (*) or MI (#) at P = 0.05.

Fig. 6. Accumulation of H₂O₂ within leaves of control (C) and PEMV-infected pea plants during 40 dpi. Visualized by light microscopy as a deposition of a brown pigment after DAB staining.

Fig. 7. Changes in RONS metabolism within leaf tissues of pea systemically infected by PEMV at 5, 15, 30 and 40 dpi. POX activity was localized by DAB staining protocol and light microscopy. Green signal for the RONS production was visualized by the reaction with H₂DCF DA and nitric oxide with DAF-FM DA. Both histochemical staining were followed by confocal laser scanning microscopy. Note brighter parts in greyscale channel corresponding to chlorotic cells within developing enations. Bar corresponds to 100 µm.

Fig. 8. Volume model of signal for RONS (green) was reconstructed from a series of eight optical sections through PEMV-infected pea leaf at 40 dpi. Note the highest intensity of signal in parts of tissue with altered morphology, *i.e.* enations.

FIGURE 1

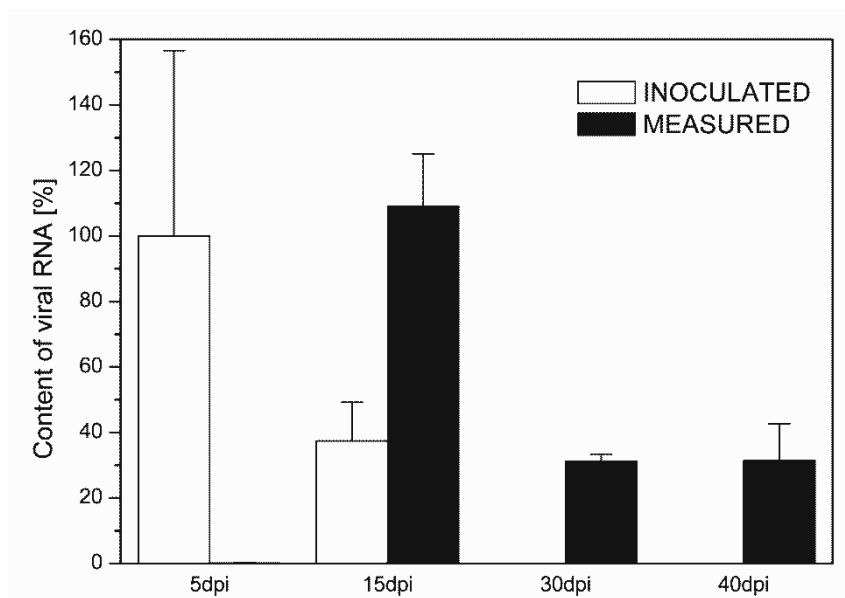


FIGURE 3

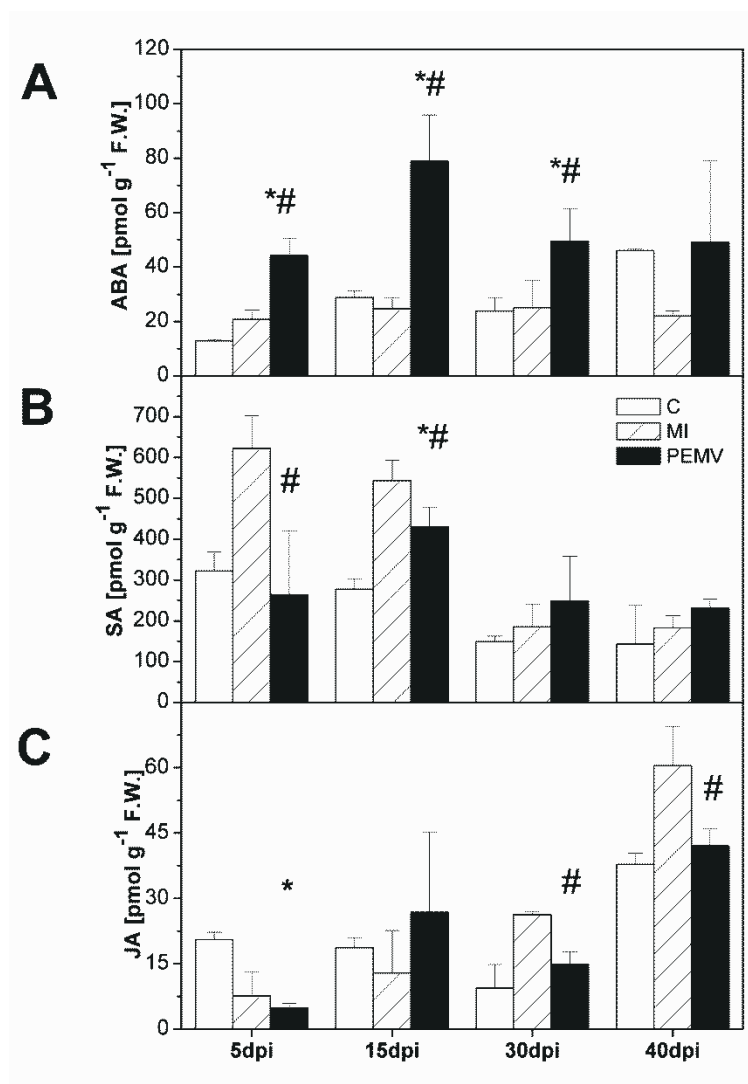


FIGURE 4

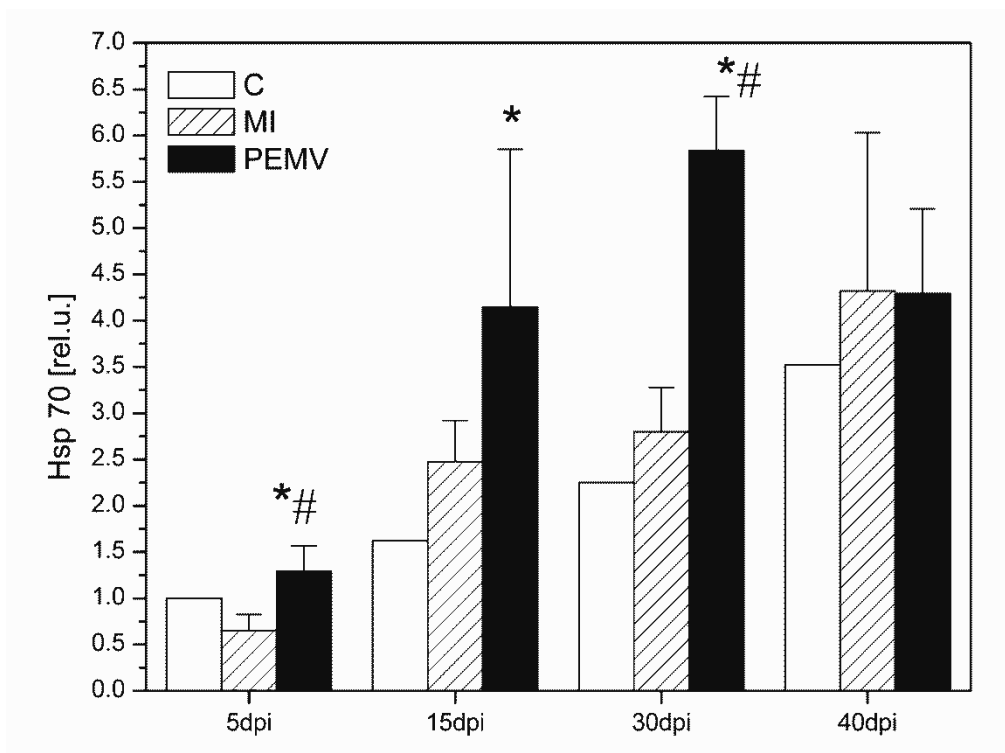


FIGURE 5

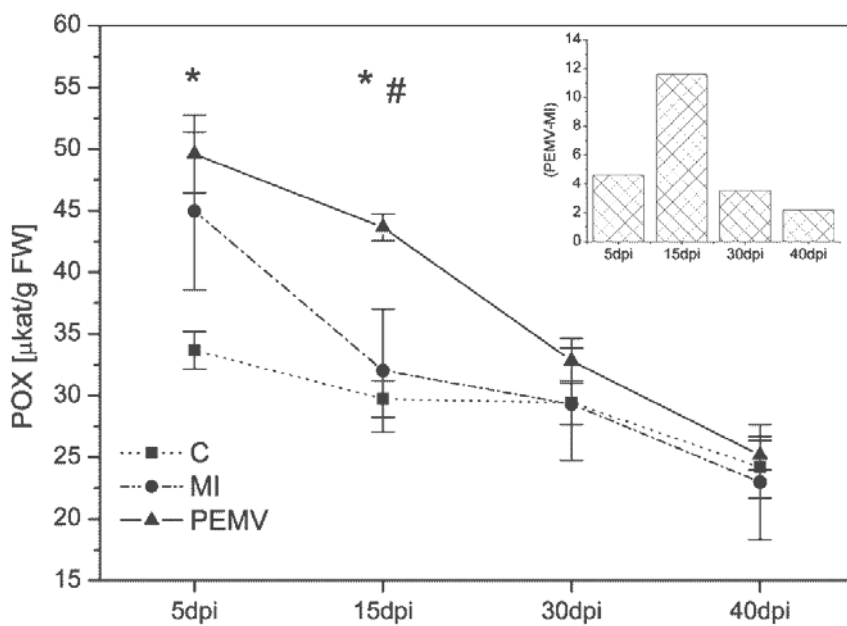


FIGURE 6

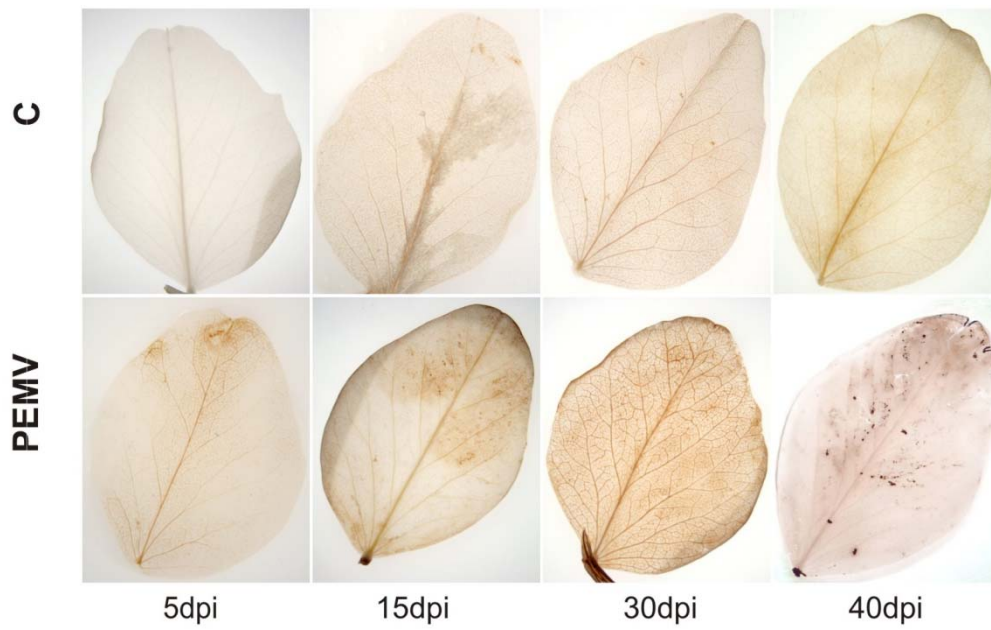


FIGURE 7

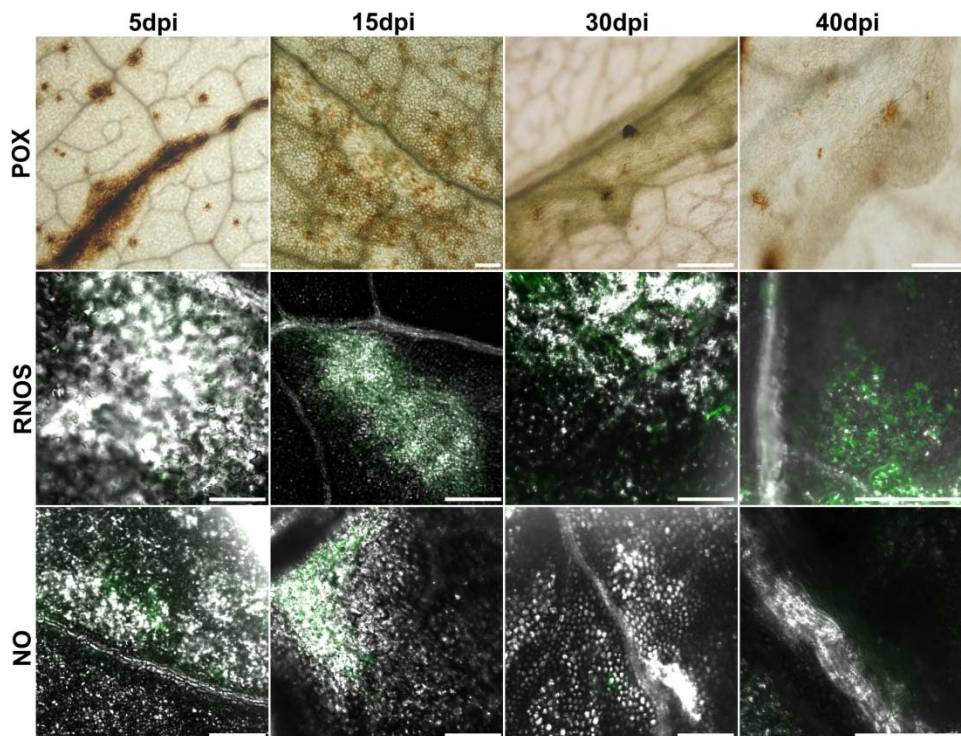


FIGURE 8

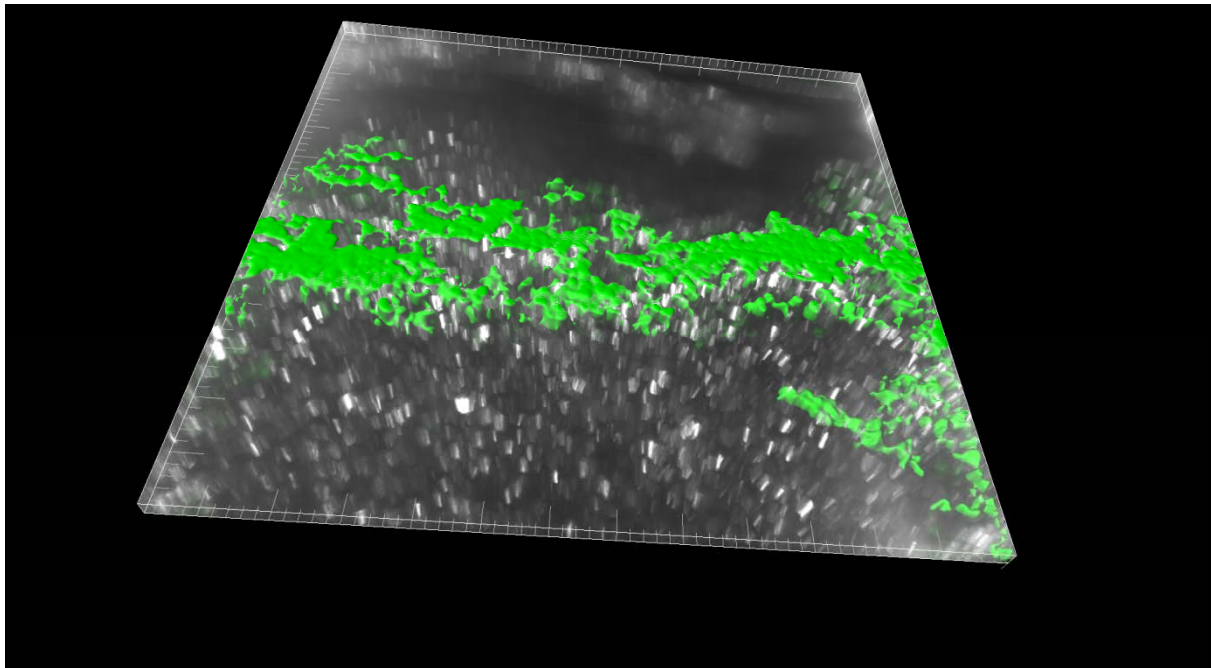


FIGURE 2

