

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

## **Kolagen, nový induktor rezistence u rostlin?**

Bakalářská práce

**Iveta Mikolášová**

Školitel: Ing. Martin Janda, Ph.D.

České Budějovice 2023

Mikolášová, I., 2023: Kolagen, nový induktor rezistence u rostlin? [Collagen, a new inducer of resistance in plants? Bc. Thesis, in Czech] – 63 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

Plants defend themselves against pathogens by their innate immune system, which is divided into two layers. The first one is called PTI (pattern-triggered immunity). It is induced by the perception of molecules from pathogens as microbes or viruses and harmful organisms, including non-pathogens. The second layer caused by the recognition of effectors is ETI (effector-triggered immunity). Pathogens release effectors to promote virulence. Plant immunity can also be artificially induced by molecules from pathogens or by synthetic compounds that can cause resistance against the pathogens. In this study, we are focusing on collagen. We investigated if collagen could induce prototypic plant immune responses and, if yes, if such induction could lead to higher resistance against selected pathogens.

### **Čestné prohlášení**

**Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.**

V Českých Budějovicích dne 13. 4. 2023

.....

Jméno a příjmení

### **Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Ing. Martinu Jandovi, Ph.D., za vedení během mé práce, inspiraci, trpělivost, ochotu mi kdykoliv pomoci během mé práce a zodpovědět všechny mé dotazy. Také mým kolegům z Laboratoře molekulární interakce rostlin s mikroorganismy, Ing. Hernándezovi Orozco Jhonnymu Stalynovi za ochotnou pomoc a trpělivé vedení během mých experimentů až do pozdních hodin. Či Iakovenko Oksaně Ph.D. za pomoc při zhotovení snímků během mikroskopie a cenné rady které urychlily mou práci. Dále také Markétě Macho Bc. za ochotnou pomoc a metodické vedení při práci s mikrobiologickým materiálem. Mé poděkování také patří i ostatním kolegům za ochotu pomoci a povzbuzení. Také Bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za časté povzbuzení, podporu a rozptýlení během mé práce a celých studií.

## Obsah:

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	2
2.1	Obrana rostlin před napadením škodlivými organismy .....	2
2.2	Pasivní obrana rostlin.....	2
2.2.1	Cesta patogenu do rostlinného těla .....	3
2.3	Aktivní obrana rostlin – rostlinná imunita .....	4
2.3.1	Rozpoznání patogenu .....	4
2.3.1.1	Rozpoznávané molekuly .....	5
2.3.1.2	Receptory rozpoznávající molekulární vzory .....	10
2.3.2	Signalizace po rozpoznání patogenu a následné imunitní odpovědi .....	14
2.3.2.1	Zvýšení koncentrace $Ca^{2+}$ v cytosolu buňky.....	14
2.3.2.2	ROS .....	14
2.3.2.3	MAPK .....	15
2.3.2.4	Akumulace kalózy.....	15
2.3.2.1	Hypersenzitivní odpověď .....	16
2.3.3	Rezistence (odolnost) vůči patogenům.....	16
2.3.3.1	Systémově získaná rezistence .....	16
2.3.3.2	Indukovaná systémová rezistence .....	17
2.3.3.3	Induktory rezistence .....	17
2.3.3.4	Kolagen .....	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	20
3.1	Materiál a metody .....	20
3.1.1	Rostlinný materiál .....	20
3.1.2	Mikrobiální materiál.....	22
3.1.3	Ošetření rostlin chemikáliemi.....	23
3.1.3.1	Ošetření kolagenem.....	23

3.1.3.2	Kontrolní ošetření.....	23
3.1.4	Analýza produkce mimobuněčného H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	23
3.1.5	Analýza akumulace kalózy.....	24
3.1.6	Analýza aktivity promotorů <i>pPRI</i> a <i>pFRKI</i> .....	24
3.1.7	Analýza inhibice růstu klíčnicích rostlin.....	25
3.1.8	Test rezistence proti bakteriálnímu patogenu <i>Pst</i> DC3000.....	25
3.1.9	Test rezistence proti houbovému patogenu <i>Botrytis cinerea</i> .....	26
3.1.10	Vyhodnocení dat.....	26
4	VÝSLEDKY.....	27
4.1	Analýza produkce mimobuněčného H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> po ošetření kolagenem .....	27
4.2	Analýza akumulace kalózy po ošetření rostlin kolagenem.....	28
4.3	Analýza aktivity promotorů <i>pPRI</i> a <i>pFRKI</i> po ošetření kolagem .....	29
4.4	Analýza inhibice růstu klíčnicích rostlin po ošetření kolagenem.....	32
4.5	Test rezistence proti bakteriálnímu patogenu <i>Pst</i> DC3000 u rostlin ošetřených kolagenem.....	33
4.6	Test rezistence proti houbovému patogenu <i>Botrytis cinerea</i> po ošetření kolagenem.. ..	35
5	DISKUZE.....	36
5.1	Analýza produkce mimobuněčného H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> po ošetření kolagenem.....	37
5.2	Analýza akumulace kalózy po ošetření kolagenem.....	38
5.3	Analýza aktivity promotorů <i>pPRI</i> a <i>pFRKI</i> po ošetření kolagenem.....	39
5.4	Analýza inhibice růstu klíčnicích rostlin po ošetření kolagenem.....	40
5.5	Testy rezistence proti patogenům .....	40
6	ZÁVĚR.....	41
7	BIBLIOGRAFIE .....	42

## Seznam zkratek:

Zkratka	Význam
ATP	adenosintrifosfát
Avr gen	avirulentní gen
BABA	kyselina $\beta$ – amino máselná
BAK1	„ <i>Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1</i> “
BIK1	„ <i>Botrytis-induced kinase 1</i> “
BMM	minimální médium pro biofilm
BTH	benzothiadiazol
CDPK	proteinkináza závislá na vápníku
CTD	C-terminální doména
DAMP	molekulární vzory spojené s nebezpečím či poškozením
eATP	extracelulární ATP
EFR	receptor rozpoznávající EF-Tu
EF-Tu	elongační faktor Tu
elf18	18 aminokyselin dlouhý peptid z elongačního faktoru (EF-Tu)
elf16	16 aminokyselin dlouhý peptid z elongačního faktoru (EF-Tu)
ETI	efektory spuštěná imunitní reakce
FAC	kojugáty mastných kyselin a aminokyselin
Flg22	22 aminokyselin dlouhý peptid z flagelinu rozpoznávaný receptory
FLS2	Receptor rozpoznávající flagelin
FRK1	flagelinem indukovaná kináza 1
HAMP	molekulární vzory spojené s herbivorií
HR	hypersenzitivní odpověď
ISR	indukovaná systémová rezistence
JA	kyselina jasmonová
LPS	lyposacharidy
PRR LRR	receptor rozpoznávající molekulární vzory bohatý na leucinové opakování
PRR LysM	receptor rozpoznávající molekulární vzory s lysinovým motivem
MAMP	molekulární vzory spojené s mikroorganismy
MAPK	mitogenem aktivované kinázy
MS médium	Murashige a Skoog médium
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NLR	proteiny s nukleotid vázající doménou
OG	oligogalakturonid
PAMP	molekulární vzory spojené s patogeny
Peps	rostlinné elicitorové peptidy
PPFD	fotosyntetický tok fotonů
PR1	protein spojený s patogenezí 1
PRR	receptor rozpoznávající molekulární vzory
PTI	vzory spuštěná imunita
RBOHD	„ <i>Respiratory Burst Oxidase Homolog D</i> “
RLK	receptory podobné kinázám
RLP	receptory podobné proteinům
ROS	reaktivní formy kyslíku
SA	kyselina salicylová
SAR	systémově získaná rezistence
PTI	vzory vyvolaná imunitní reakce

## 1 ÚVOD

Rostliny se na naší planetě začaly vyskytovat daleko dříve než lidé. A za dobu své existence se naučily potýkat s nepříznivými vlivy, které na ně působí. Těmto vlivům lze obecně říkat působení stresu, ten může být biotického či abiotického původu. Biotický stres je vyvolaný škodlivými organismy jako jsou rostlinné patogeny a rostlinní škůdci. Jako rostlinné patogeny označujeme organismy, které způsobují choroby rostlin. Jsou to především viry či mikroorganismy jako bakterie a houby. Nebo se rostliny mohou stát potravou býložravých škůdců. Za abiotický stres lze označit například působení nízkých teplot, nedostatek srážek či nízkou dostupnost živin v půdě.

Člověk se naučil pěstovat rostliny a využívat je ke své obživě během zemědělské revoluce před zhruba 10 000 lety. S pěstováním rostlin se však pojí řada problémů, ve formě již zmíněných stresů, které na rostlinu působí. Jejich dopady poté snižují množství a kvalitu rostlinné produkce. Potřeba rostlinné produkce v současné době i v souvislosti s klimatickou změnou, stoupá. A existují odhady, že její význam i nadále poroste. Člověk je tak nucen se se škodlivými stresy vypořádat a zamezit jim.

V naší laboratoři se, mimo jiné, snažíme najít sloučeniny, které by rostlinám mohly poskytnout odolnost proti patogenům. Rostliny se s patogeny naučily bojovat vytvořením imunitního systému, kterým rozpoznávají různé molekuly přítomné během výskytu patogenu v rostlinném těle. Těmito sloučeninami jsou např. molekulární vzory spojené s mikroorganismy (MAMPs) nebo efektory. MAMPs by se daly označit jako elicitory, které organismus produkuje sám o sobě, svojí pouhou existencí a nemůže tomu plně zabránit, neboť tyto molekuly jsou pro něj nezbytné. Efekторы jsou naopak látky, které škodlivý organismus vysílá cíleně, aby potlačil imunitní reakci nebo modifikoval fyziologii rostliny. Sloučeniny vylučované škodlivým organismem jsou následně rozpoznány rostlinou a spouští imunitní reakci, která na rozdíl od rozpoznání MAMPs často končí i buněčnou smrtí ve formě hypersenzitivní reakce.

Existují také látky, které jsou schopné indukovat rezistenci (mezi ně se mohou řadit i některé elicitory) proti některým patogenům a škůdcům. Nazývají se induktory rezistence. Indukovaná rezistence může být na polích v budoucnu mocnou zbraní v cestě ochrany plodin proti napadení patogeny. Naše práce se zabývá testováním kolagenu, jako potenciálního induktoru rezistence u rostlin. Kolagen je strukturální protein, který se hojně vyskytuje napříč celou živočišnou říší a jedná se o hlavní stavební složku pojivových tkání. V rostlinách se

ovšem hojně nevyskytuje a i proto, by mohl být rostlinou „jednoduše“ rozpoznáván a mohl by spouštět rostlinou imunitu.

## **2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

Pěstování rostlin je pro člověka zásadní způsob obživy. S pěstováním také přichází řada již zmíněných problémů ve formě působení různých stresů, jako jsou biotické a abiotické stresy. Abiotické stresy jsou například působení nízkých teplot, nedostatek živin či sucho. Biotické stresy jsou působení škodlivých organismů. Jelikož jsou rostliny během svého života na stejném místě a nemohou se pohybovat, musely se proti těmto stresům naučit bránit. Z hlediska biotického stresu tuto skutečnost lze pojmut jako „závod ve zbrojení“ mezi škodlivými organismy a rostlinou. Rostliny vytváří obranné mechanismy, zatímco patogeny a škůdci vyvíjejí strategie k překonání těchto bariér (Bent & Mackey, 2007).

### **2.1 Obrana rostlin před napadení škodlivými organismy**

Rostliny se brání proti patogenům a škůdcům nejen během napadení, ale mají snahu napadení patogenem předejít. Obranu rostlin lze rozdělit na aktivní a pasivní. Pasivní obrana, je trvalá a je přítomna i bez napadení, i když napadení ji může zintenzivnit. Typickými příklady takové obrany je tvorba trichomů, trnů, či biosyntéza ligninu. Aktivní obrana neboli indukovaná obrana je spuštěna pouze při přítomnosti patogenu nebo škůdce a po jeho rozpoznání. Během života rostliny se poměr těchto dvou způsobů ochrany může i měnit. Ty části rostlinného těla, které jsou mladé a více lákavé pro škůdce mají velký poměr pasivní obrany, zatímco části, které jsou již v menším ohrožení mohou spoléhat více na indukovanou imunitní odpověď. Toto bylo prokázáno při studiu na rostlině *Pastinacia sativa*, kdy rostlinné orgány ohrožené herbivoií měly vyšší koncentraci rostlinných toxinů, než ty s menším rizikem (Zangerl & Rutledge, 1996).

### **2.2 Pasivní obrana rostlin**

Podle povahy obrany lze rozlišit v pasivní obraně strukturní a chemické bariéry. Produkce chemických bariér, je spojená s produkcí sekundárních metabolitů rostlin. Což jsou látky, které nejsou přímo potřebné pro růst či rozmnožování. Lze mezi ně zařadit rostlinné toxiny, jako jsou flavonoidy, terpeny, alkaloidy, kyanogenní glykosidy a další (Wink, 1988).

Rostliny se také naučily využívat synergistickou povahu působení jimi produkováných toxinů. Po sloučení vícero typů toxinů, dojde k vytvoření sloučenin, které mají mnohem škodlivější a silnější dopad, než každý typ toxinu zvlášť (Hummelbrunner & Isman, 2001).



Některé metabolity, které jsou rostlinami produkovány jsou jedovaté i pro rostliny samotné. Rostliny si tak musely vyvinout strategie, jak s těmito látkami zacházet a skladovat je. Skladují je v neaktivních formách prekursorů, které jsou při napadení škodlivými organismy aktivovány (Wittstock & Gershenzon, 2002).

Strukturní bariéry jsou většinou čistě morfologickou záležitostí. Mají za úkol zabraňovat průniku škodlivého organismu do rostlinného těla. Jednou z takových bariér je kutikula, která pokrývá povrch rostlin a odděluje tak epidermální buňky od okolí. Z hlavní části tvoří kutikulu degradovaný biopolymer kutin a epikutikulární vosky (Yeats & Rose, 2013). Rostliny chrání nejen před patogeny, ale především před ztrátou vody. Dále před některými dalšími abiotickými stresy (Serrano et al., 2014).

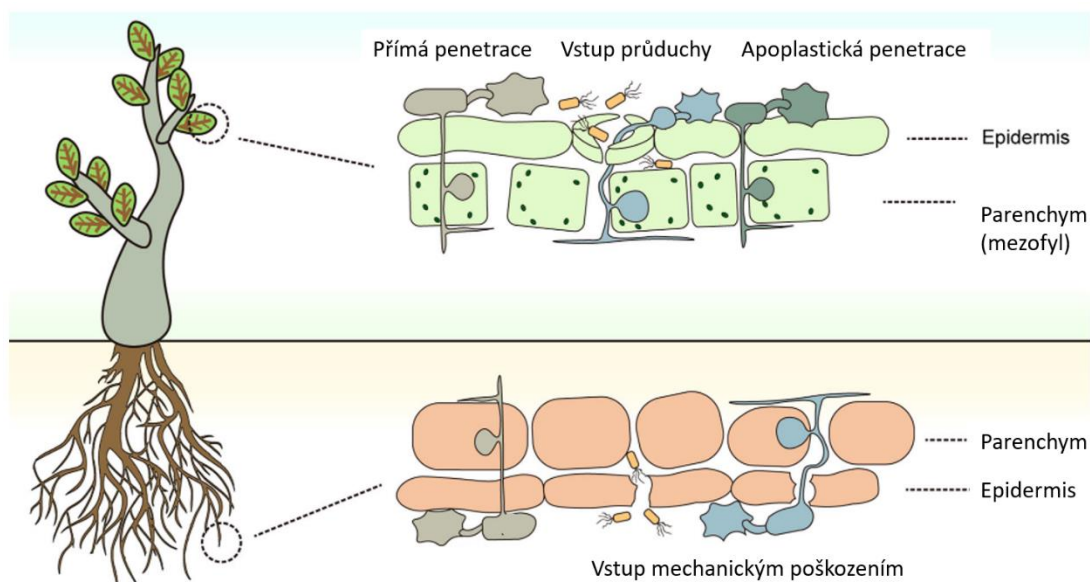
Strukturní bariéru proti patogenům nalezneme i uvnitř rostlinného těla. Struktura buněčné stěny může efektivně ovlivnit vzájemnou interakci mezi rostlinou a patogenem. Škodlivé organismy, které se dobývají do rostlinných buněk, musí překonat buněčnou stěnu. Rostliny se naučily své buněčné stěny vyztužovat například ligninem (Matusínský, 2019). Pasivní jak chemické, tak i mechanické bariéry mohou být po rozpoznání patogenu posíleny. Například napadení rostliny bakterií *Pseudomonas syringae* způsobuje akumulaci kalózy v buněčné stěně (Zhang et al., 2007). Jak naznačují, hlavním cílem pasivní obrany je „nepustit si útočníka k tělu“. Herbivoři ani škůdci se z principu nepotřebují dostat dovnitř rostlinného těla. Pro patogeny, které jsou mikroskopické velikosti, je ale situace odlišná.

### **2.2.1 Cesta patogenu do rostlinného těla**

Samotná cesta patogenu do rostlinného těla se liší i mezi jednotlivými skupinami organismů. Ale lze ji obecně rozdělit na aktivní („forced entry“) a pasivní cestu (**Obr.1**). Během pasivní cesty dochází k průniku přes průduchy nebo skrze mechanické poškození rostlinných pletiv. Poranění je v podstatě nejjednodušší vstupní brána do rostlinného těla. Za příklady cesty přes průduchy mohou sloužit infekce bakterie *Pseudomonas syringae* (Melotto et al., 2008), nebo houbového patogenu *Colleotrichum* který tvoří houbové mycelium na povrchu rostlin, ze kterého vyrůstají hyfy, které hledají otevřené průduchy, kterými pak vstoupí do těla hostitele (Latunde-Dada et al., 1999).

Aktivní průnik je pro patogeny složitější, protože musí překonat fyzické bariéry kutikuly na povrchu listu nebo buněčnou stěnu rostlinných buněk. U houbových patogenů dochází k přímé penetraci pomocí buněčných útvarů zvaných apresoria (Mendgen & Deising, 1993; Yi & Valent, 2013). Například houbový patogen *Golovinomyces orontii* proniká do buněk

rostlin rozbitím kutikuly na povrchu listů a následným rozbitím buněčné stěny (Braun et al., 2019). Patogen z třídy oomycetes *Hyaloperonospora arabidopsis* vrůstá pouze do apoplastického prostoru skrze spojení dvou epidermálních buněk (Underwood, 2012). Když patogen překoná pasivní bariéru a pronikne dovnitř do rostlinného těla spustí aktivní obranu.



**Obrázek 1: Vstupní cesty pro patogenní organismy do rostliny.** Rostliny jsou cílem mnoha patogenů, a to jak v nadzemní, tak ve své podzemní části. Patogeny mohou vstoupit do rostlinného těla aktivní či pasivní cestou. Během aktivního pronikání dochází k přímé penetraci. Během pasivního pronikání vstupuje patogen do rostliny přes otevřené průduchy, apoplastickou penetrací či vstupem skrze mechanické poranění. Převzato a upraveno podle Li et al. (2020).

## 2.3 Aktivní obrana rostlin – rostlinná imunita

Rostlina se může spolehnout jen na vrozený imunitní systém, protože se u ní nevyskytuje adaptivní imunitní systém. Ovšem výhodou rostlin je, že imunitní odpověď je schopna vyvolat v podstatě jakákoliv rostlinná buňka. Celá imunitní reakce spočívá v rozpoznání cizorodých látek nebo vlastních látek, najednou se vyskytujících na nesprávném místě (např. to co je normálně uvnitř buněk se náhle vyskytuje v mezibuněčném prostoru). Poté následuje adekvátní imunitní odpověď.

### 2.3.1 Rozpoznání patogenu

Rozpoznání patogenu je pro rostlinu zásadní krok k její obranně. Rostlina si hlídá napadení patogenem na více úrovních. Důležitými molekulami rozpoznávanými rostlinou jsou tzv. molekulární vzory spojené s mikroorganismy (MAMPs; „*Microbe-associated molecular patterns*“) (Lamparová, 2017), také nazývány PAMPs (*Pathogen-associated*

*molecular patterns*) (více viz kap.2.3.1.1 Rozpoznávané molekuly) (Choi & Klessig, 2016). Kdy pojem MAMP je nadřazený pojmu PAMP, který je pouze spojený s molekulárními vzory patogenů. Ukazuje se, že tyto konzervované vzory jsou přítomné v celých třídách mikroorganismů, i u těch které nejsou specializované na rostlinnou stravu (Trdá & Janda, 2016). Dalšími molekulární vzory rozpoznávané rostlinami, jsou vzory spojené s herbivorií (HAMPs; „*herbivores-associated molecular patterns*“) (více viz kap. 2.3.1.1 Rozpoznávané molekuly) (Mithöfer & Boland, 2008). Rozpoznávané mohou být i látky původem z vlastního těla, které jsou poškozením vypuštěny do mezibuněčného prostoru a zachyceny dalšími dosud nepoškozenými buňkami neboli DAMPs („*Damage-associated molecular patterns*“) (více viz kap. 2.3.1.1 Rozpoznávané molekuly) (Seong & Matzinger, 2004). Tyto vzory jsou v drtivé většině rozpoznány již v mezibuněčném prostoru pomocí receptorů, na plazmatické membráně. Rozpoznání molekulárních vzorů obecně vede ke spuštění imunitní odpovědi nazývané PTI („*Pattern triggered immunity*“) (více v kap. 2.3.2 Signalizace po rozpoznání patogenu a následné imunitní odpovědi).

Dále také může docházet k zachycení škodlivých organismů po rozpoznání takzvaných efektorů. To jsou molekuly vysílané škůdci či patogeny do rostliny, kde mají za úkol ovlivnit metabolické procesy tak, aby napomohly infekci patogenu (více viz kap. 2.3.1.1 Rozpoznávané molekuly) Po rozpoznání efektorů dochází ke spuštění ETI („*Effector triggered immunity*“;) (více v kap. 2.3.2 Signalizace po rozpoznání patogenu a následné imunitní odpovědi).

### **2.3.1.1 Rozpoznávané molekuly**

Jedny z prvních molekul rozpoznávaných rostlinou při výskytu škodlivého organismu jsou **MAMPs**. Jsou to molekuly evolučně konzervované a pro mikroorganismy životně důležité (Li et al., 2020). Vyskytují se nejen u patogenů, ale i u nepatogenních či saprotrofních organismů (Newman et al., 2013). Typickými zástupci MAMPs jsou flagelin, bakteriální lipopolysacharidy, elongační faktory, krátké mastné kyseliny či i samotná mikrobiální DNA nebo houbový chitin (Choi & Klessig, 2016).

Nejlépe charakterizovaným MAMP v rámci interakcí rostlin s mikroorganismy je bakteriální flagelin, konkrétně jeho 22 aminokyselinový peptid (flg22) (Gómez-Gómez & Boller, 2000). S aminokyselinovou sekvencí: QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA (Lia et al., 2019). Flagelin je základní stavební jednotkou bakteriálních bičíků a zajišťuje jejich schopnost pohybu (Newman et al., 2013). V roce 2004 byl v rostlině *Arabidopsis thaliana*

identifikován receptor FLS2 („*Flagellin sensing2 receptor*“) rozpoznávající flg22 (Gómez-Gómez & Boller, 2000). Kromě flg22, jsou dalšími receptory v rostlinách rozpoznávány i jiné úseky flagelinu (Hind et al., 2016).

Dalším, velmi dobře charakterizovaným MAMP je elongační faktor. Během proteosyntézy na ribozomu je genetická informace z mRNA překládána (proces translace) do sekvence aminokyselin, které se skládají v protein. Translaci lze rozdělit do několika fází a během fáze elongace jsou na ribozom navázané různé elongační faktory, které řídí růst nového polypeptidového řetězce (Cammack, 2011). Na rostlinné cytoplazmatické membráně je rozpoznáván bakteriální elongační faktor (EF-Tu) receptorem EFR (EF-Tu receptor). Z celého elongačního faktoru je rozpoznávána konzervovaná N-terminální sekvence elf26, resp. elf18 (Newman et al., 2013) s aminokyselinovou sekvencí: SKEKFERTKPHVNVGTIG (Lia et al., 2019).

Rostlinami mohou také být rozpoznávané lyposacharidy (LPS). LPS jsou hlavními stavebními prvky vnější membrány u Gram – negativních bakterií. Aktivace imunitních odpovědí po rozeznání LPS byly poprvé pozorovány již v roce 1995 (Newman, 1995). Rozpoznání LPS může bránit imunitní odpovědi spuštěním hypersenzitivní reakce – smrti buňky.

Všechny tyto vzory jsou přítomné společně s patogeny a jsou přítomné v okamžiku kdy je přítomný i patogen (Wang et al., 1999). Rozpoznání těchto vzorů se odehrává hned na prvním místě, kde se s nimi rostlinná buňka může setkat, a to na cytoplazmatické membráně. Tímto spouští tak imunitní reakci spuštěnou vzory, PTI („*pattern triggered immunity*“) (více v kap. 2.3.2 Signelizace po rozpoznání patogenu a následné imunitní odpovědi).

Dalším molekulárním vzorem, který rostliny rozpoznávají jsou molekulární vzory spojené s herbivorií neboli **HAMPs** („*herbivore associated molecular patterns*“) (Acevedo et al., 2015). Je zajímavé, že stejným principem, kterým je rozpoznávána přítomnost patogenů je rozpoznávána i přítomnost herbivorů. V orálních sekretech hmyzu s kousavým ústrojím byly objeveny HAMPs, jako jsou konjugáty mastných kyselin violician, dále inceptiny, kaeliferiny a další (Schmelz, 2015). Orální sekrety mohou obsahovat širokou škálu HAMPs a efektorů, jejichž efekty na rostlinu se společně mohou překrývat.

Orální sekrety které obsahují konjugáty mastných kyselin jsou rozpoznávány na cytoplazmatické membráně, aktivují MAPK kaskády a podporují tvorbu kyseliny salicylové

a jasmonové. Z čehož vyplývá že jimi vyvolaná imunitní odpověď je podobná PTI (Acevedo et al., 2015).

Mezi nejlépe prostudované HAMPs patří konjugáty mastných kyselin a aminokyselin (FAC; „*fatty acid-amino acid conjugates*“), byly objeveny v orálním sekretu *Spodoptery exigua* a mnoha dalších lepidopter (Halitschke et al., 2001). FAC hrají zásadní roli v metabolismu dusíku u hmyzu (Yoshinaga et al., 2008), proto jsou pro hmyz zásadní a nemůže tak zabránit jeho produkci. Byla prokázáno, že způsobují aktivaci MAPK kaskády či podporují tvorbu fytohormonů (Schäfer et al., 2015).

Dalším již charakterizovaným HAMP jsou takzvané inceptiny, což jsou peptidové elicitory izolované z orálního sekretu pancéřníčka *Spodoptera frugiperda*, tvořené proteolytickými fragmenty chloroplastické ATP syntázy, již rozštěpené hmyzím střevem (Schmelz et al., 2006). Přesné určení aminokyselinové sekvence u inceptinů je poměrně složitá záležitost, a to právě kvůli proteolytickému štěpení v hmyzím střevu (Mithöfer & Boland, 2008). Inceptiny dokáží stimulovat tvorbu etylenu nebo zvýšit hladinu kyseliny salicylové a jasmonové (Mithöfer & Boland, 2008).

Nejnověji identifikovaným HAMP jsou kaeliferiny, skládají se z nasycených sulfatovaných  $\alpha$ -hydroxymastných kyselin (Alborn et al., 2007), které byly poprvé extrahovány ze sekretu lučních kobylek. Po rozpoznání kaeliferinů dochází, například v kukuřici, k tvorbě těkavých látek. Ačkoliv zatím není znám přímo ekologický důvod k takovéto obraně vzhledem k velké mobilitě kobylek (Wu & Baldwin, 2010).

Přítomnost herbivorů může být také rozpoznána pomocí vzorů pocházejících z jejich vajíček, která jsou kladena jak na povrch, tak dovnitř rostlinného těla. V reakci na jejich rozpoznání dochází k aktivaci obranných odpovědí. Takovými HAMP jsou například bruchiny přítomné v tekutině při kladení vajíček u zrnokazů. Bruchiny jsou dioly s dlouhými řetězci které jsou mono- či diesterifikovány s kyselinou 3-hydroxypropanovou (Doss et al., 2000).

To, jaké vzory jsou přítomné během napadení herbivory nezáleží pouze na herbivorech samotných, ale i na jejich symbiontech. Kteří se u herbivorů hojně vyskytují, pomáhají jim zpracovávat těžce rozložitelnou potravu a získávat tak potřebné živiny. Symbiotické organismy dokáží regulovat množství vyskytujících se HAMPs a efektorů a modifikovat tak rostlinnou fyziologii, nebo blokovat imunitní reakce ve prospěch hostitele (Stuart, 2015). Přítomnost bakteriálních symbiontů může být naopak využívána jejich

hmyzím hostitelem. V takovém případě jsou bakterie přenášeny pomocí orálního sekretu do již poškozených míst, což indukuje obranou reakci proti bakteriím, ale snižuje obranyschopnost proti herbivorům (Acevedo et al., 2015).

Třetím molekulárním vzorem, který rostliny rozpoznávají jsou již rostlinného původu a pochází z rostliny samotné se nazývají **DAMPs**. Jedná se o molekuly, které se vyskytnou v mezibuněčném prostoru, ačkoliv se tam za normálních okolností nevyskytují. Uvolněné v důsledku napadení patogenem či herbivorním škůdcem. Mezi DAMPs patří takové molekuly, jako jsou oligogalacturonidy (části buněčné stěny), monomery kutinu (části kutikuly), dále také mimobuněčná ATP (eATP) či rostlinné elicitorové peptidy (Choi et al., 2014). Tyto látky aktivují imunitní odpověď, když jsou zaznamenány na plazmatické membráně pomocí receptorů. Přítomnost DAMP v důsledku napadení je pro rostliny z principu pasivní proces. Je zajímavé, že rostliny se naučily proti patogenům bránit i tím, že DAMPs aktivně vypouštějí sami. A to pro signalizaci napadení nebo k zesílení obranných reakcí. Například řízená produkce fragmentů buněčné stěny aktivuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) (Bergey et al., 1999), což je typický obranný projev.

Peps, neboli rostlinné elicitorové peptidy („*plant elicitor peptides*“) jsou molekuly velmi dobře rozpoznávané jako DAMPs. Jsou to 20-23 aminokyselin dlouhé peptidové řetězce (Bartels et al., 2013). Tyto krátké aminokyselinové sekvence jsou rozpoznávány pomocí receptorů dalších rostlinných buněk (Huffaker & Ryan, 2007). Cesta Peps do apoplastického prostoru není ještě zcela objasněna. Jedna z možností je přímé vypouštění do mezibuněčného prostoru během napadení patogenem cíleně, a to z ještě žijících buněk. To bylo pozorováno při napadení bakteriálním patogenem *Pseudomonas syringae* (Huffaker & Ryan, 2007), nebo může docházet k pasivnímu úniku elicitorových peptidů do mezibuněčného prostoru z mrtvých buněk. Produkovanými peptidy mohou být tzv. systeminy (Pearce et al., 1991).

Systeminy se řadí mezi Peps. Jedná se o molekuly, které rostliny produkují v odpovědi na poškození pletiv (Pearce et al., 2001). Nejlépe jsou charakterizované u rajčat, tedy čeledi *Solanaceae* (Pearce et al., 1991). Systeminy jsou krátké peptidové sekvence o délce 18 aminokyselin. K působení systeminu dochází v cytoplazmě vaskulárního floému parenchymatických buněk. Systemin působí na průvodní buňky a na sítkové elementy, aby syntetizovaly kyselinu jasmonovou (JA), která následně může aktivovat další imunitní odpovědi (Ryan & Narváez-Vásquez, 2004).

Dalším známým DAMP jsou látky pocházející z extracelulární matrix neboli z mezibuněčné hmoty, která vyplňuje prostor mezi buňkami. U živočichů jde především o kolagen či glykosaminoglykany (Cammack, 2011). U rostlin se jedná o pektinový polysacharid homogalakturonan, který je v rostlinách součástí buněčné stěny. Při napadení se patogen musí dostat přes buněčnou stěnu, může k tomu docházet jak chemickými způsoby – pomocí enzymů, nebo mechanickými způsoby – pomocí tlaku. Vytvořené fragmenty z buněčné stěny z homogalakturonanu se nazývají oligogalakturonidy (OG) (Choi & Klessig, 2016). Zaznamenání těchto fragmentů jinou buňkou, pomocí receptorů také vyvolává imunitní reakci (Denoux et al., 2008).

Přítomnost herbivorů nemusí být rozpoznána pouze pomocí HAMPs či efektorů, ale i rozpoznáním specifických mechanických vzorů poranění spojenými s konkrétním způsobem herbivorie. Způsob, rychlost a frekvence u požívání rostlinných pletiv u škůdců je druhově specifická. Samotné poranění rostliny či poškození pletiv se odvíjí přímo od organismu který rostlinu napadá. U hmyzích škůdců se typ poranění odvíjí od typu jejich ústních ústrojí. Rozeznáváme bodavěsavý hmyz a kousavý hmyz (Felton et al., 2014). Bodavěsavý hmyz se obecně živí floémovou tekutinou ve které se nachází většina živin v rostlině. Dochází k minimálnímu možnému poranění pletiv přímou penetrací přes rostlinné buňky do vodivých svazků (Felton et al., 2014). Mezi bodavě savý hmyz se řadí například mšice, molice či křísi.

U kousavého hmyzu dochází ke specifickému poranění pletiva a jeho následnému odstranění. Do této skupiny se například řadí larvální stádium mandelinky bramborové (Gosset et al., 2009).

Každá z těchto strategií získávání potřebných živin z rostliny vede k vypouštění DAMPs různých typů. Při napadení bodavě savým hmyzem se jedná především o fragmenty buněčné stěny a jejich koncentrace oproti napadení kousavým hmyzem bude menší. Kousavý hmyz naopak vypouští požíváním rostlinných pletiv široké spektrum DAMPs včetně fragmentů buněčné stěny a fragmentů jako jsou eATP, rostlinná DNA a další.

Protože se rostlina patogenům brání pomocí rozpoznání molekulárních vzorů svým imunitním systémem, snaží se jej patogeny různým způsobem potlačit. Vysílají tak do rostliny molekuly nazývané **efektory**. Ty mají za úkol potlačit imunitní odpověď rostlin nebo působit na významné metabolické dráhy v rostlině (Macho & Zipfel, 2015). Jsou sekretovány do intracelulárního či extracelulárního prostoru. Existuje celá řada typů

efektorů, obecně však lze říci, že se jedná o 50-3000 aminokyselin dlouhé sekvence obsahující N-terminální signální peptid, který je vysoce specifický pro daný typ efektoru. Některé z apoplastických efektorů působí přímo na první vlnu obrany, a to na receptory na plazmatické membráně. Cytoplazmatické efekторы mohou působit také na receptory nebo na další části imunitní signalizace jako je MAP kinázová kaskáda, hormonální signalizace, systémy ovládání vezikulů či přímo ovlivňují genovou expresi (např. na principu RNA interference) (Giraldo & Valent, 2013).

Aby rostliny dokázaly potlačit útok škodlivých organismů a odhalit efekторы, vytvořily si pro ně své vlastní receptory z většiny lokalizované v cytoplazmě. Jejich rozpoznání spouští efekторы spuštěnou imunitní odpověď (ETI; „*Effectors triggered immunity*“) (Jones & Dangl, 2006) (více viz kap. 2.3.2 Signalizace po rozpoznání patogenu a následné imunitní odpovědi).

Například během napadením houbovým patogenem se po úspěšné penetraci vytváří haustoria v buňce, ze kterých jsou vypouštěny efekторы, které tak houbě pomáhají v infekci (Giraldo & Valent, 2013). Jako efekторы může být vnímána většina proteinů vypouštěných viry, za cílem jejich rozmnožení (Toruño et al., 2016).

Typickým efektozem, který je spojený s herbivorií, konkrétněji s herbivorním hmyzem jsou apyrázy. Jedná se o ATPázy které rozkládají eATP vypuštěné během požívání rostlinných pletiv. Tím pomáhají herbivorům předcházet rozpoznání (Wu et al., 2012).

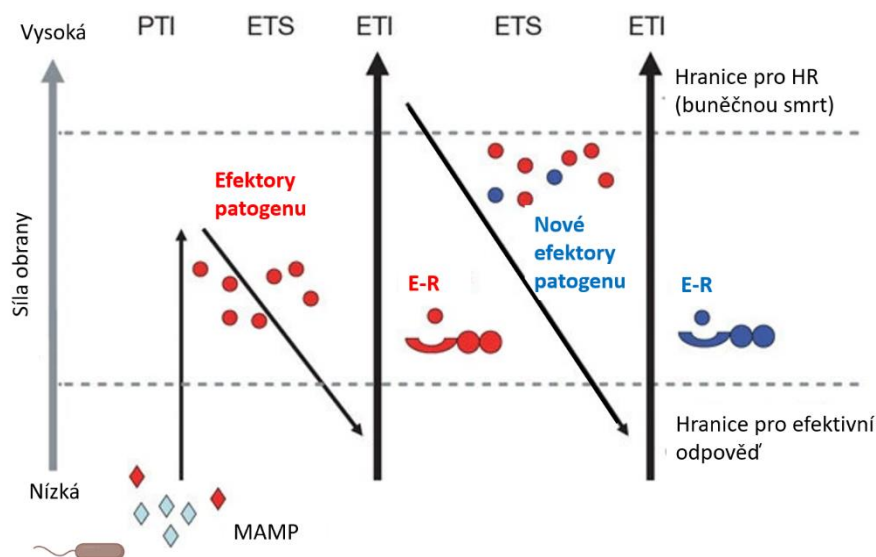
### **2.3.1.2 Receptory rozpoznávající molekulární vzory**

Vztah rozpoznávání molekulárních vzorů či efektorů rostlinou a snaha škodlivých organismů tomu předejít, má velmi dynamický charakter. Po rozpoznání MAMPs pomocí receptorů rozpoznávající molekulární vzory (PRR; „*Pattern Recognition Receptors*“), dochází ke spuštění první vlny rostlinné imunity nazývané PTI („*Pattern-triggered immunity*“). Tomu se škodlivý organismus snaží zabránit a vysílá tak efekторы, které cílí na příslušné proteiny odpovědné za imunitní odpovědi a zastavují tak PTI. Efekторы se rostlina snaží rozpoznat pomocí proteinů s nukleotid vázající doménou a s doménou bohatou na leucin (NLR; „*nucleotide-binding, leucine-rich repeat receptors*“) a je spuštěna ETI („*effector triggered immunity*“) (Yuan et al., 2021), která může vést k drastičtějším odpovědím nebo přímo k HR, a to k buněčné smrti (Delledonne et al., 2001). Následně dochází k závodu mezi rostlinou a patogeny. Vlivem přírodního výběru jsou patogeny vedeni k tomu, aby se snažili předejít ETI a produkují tak nové efekторы. Dochází tím



k modifikacím již používaných efektorů, nebo vytváření nových, pro které rostliny nemají odpovídající R-gen.

Takto tento dynamický vztah popisuje Zig-zag model podle moderního pojetí podle Jonese a Dangla (Jones & Dangl, 2006) (**Obr. 2**).



**Obrázek 2: „Zig-zag“ model.** Patogen je odhalen rozpoznáním MAMP pomocí receptorů a je spuštěna PTI. Tu se patogen snaží potlačit pomocí efektorů, které rostlina dokáže zaznamenat vnitrobuněčnými receptory a dojde k potlačení infekce spuštěním ETI. Patogen se tak snaží vytvořit nové efektory. Pro ty rostliny nemusí mít odpovídající R-proteiny (R) a nedokáží tak potlačit infekci. PTI – imunita spuštěná po rozpoznání vzorů; ETI – imunita spuštěná rozpoznáním efektorů; ETS – efektory spuštěná náchylnost; HR – hypersenzitivní reakce; MAMP – molekulární vzory spojené s mikrobi. Převzato a upraveno podle Jones & Dangl (2006).

**PTI** je zajišťována pomocí PRRs které jsou ukotvené v buněčné membráně (Wang & Chai, 2020). V rámci PRRs rozpoznáváme dvě rodiny receptorů a to RLKs („receptor-like kinases“) a RLPs („receptor-like proteins“) (Boutrot & Zipfel, 2017).

RLKs jsou membránové proteiny s jedním průchodem přes membránu. Do mezibuněčného prostoru ční variabilní N-terminální doména. Úkolem této domény je navázání a rozpoznání vzorů. Do intracelulárního prostoru je směřována kinázová doména, která má za funkci zprostředkovávat předání signálu následným kaskádovým systémům či dalším součástem rostlinné imunity (Wang & Chai, 2020). Podle struktury kinázové domény lze rozdělit RLK do dalších dvou rodin. Ty, které mají v katalytické smyčce před asparátem

arginin se nazývají RD kinázy. Ty, kterým arginin chybí „*non-arginine-aspartate kinases*“ (non-RD kinázy) (Greeff et al., 2012).

RLPs jsou také membránové proteiny s jednoduchým průchodem přes membránu a jsou podobné RLKs. RLPs ovšem nemají intracelulární doménu, ale pouze krátký intracelulární ocas přibližně o délce 24 aminokyselin (Wang & Chai, 2020).

Receptory, kterým chybí kinázová doména, nemohou dále předávat signál o rozpoznání vzoru. Potřebují takzvaný koreceptor který je této funkce schopen (Jamieson et al., 2018), čímž jsou právě RLKs s RD funkční doménou.

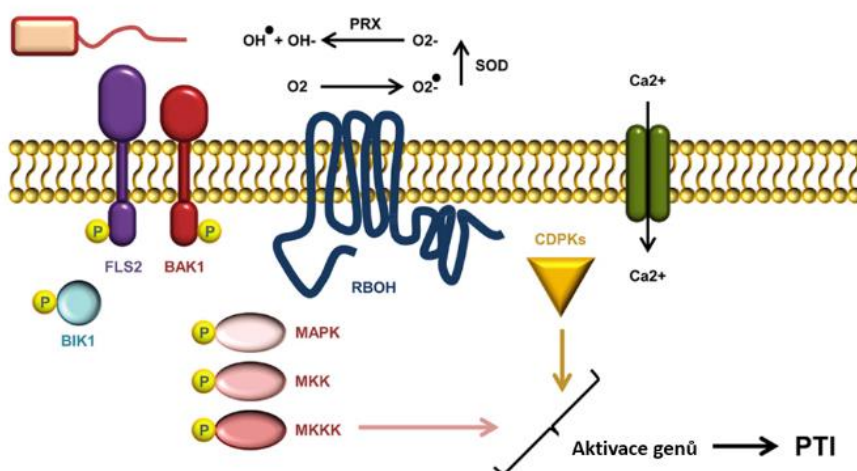
Podle typu extracelulární domény mohou být obě skupiny rozděleny do dalších podrodin (Monaghan & Zipfel, 2012). Rozeznáváme receptorové kinázy bohaté na leucinový motiv (LRR), receptory s lysinovým motivem (LysM) a další (Böhm et al., 2014). Velikost těchto domén určuje, jak se bude celý receptor chovat. Pro větší domény platí, že mají funkci rozpoznávání a vázání molekulárního vzoru. Ty menší bývají naopak upřednostňovány jako koreceptory (Miya et al., 2007).

Receptorové kinázy bohaté na leucinový motiv slouží přednostně k vázání peptidů a proteinů (Yamaguchi et al., 2006). Do této skupiny patří receptor pro rozpoznání flagelinu – FLS2 (Zipfel et al., 2006). Některé receptorové kinázy bohaté na leucinový motiv mohou také rozpoznávat DAMPs ve formě Peps (Krol et al., 2010). Některé z těchto kináz rozpoznávají malé peptidové ligandy, ale i velké apoplastické efekторы patogenu *Cladosporium fulvum* (Dixon et al., 1996).

Receptory s lysinovým motivem (LysM) pomáhají rostlinám rozpoznávat vzory ve kterých je přítomný karbohydrát N-acetylglukosamin, ten se vyskytuje v houbovém chitinu, (Liu et al., 2012) bakteriální peptidoglykenu (Willmann et al., 2011) či OG (Souza et al., 2017).

Po navázání ligandu (vzoru) na receptor dochází k následné signalizaci. Celý princip rozpoznání je nejlépe charakterizovaný na rozpoznání flagelinu. Ten je nejprve navázán pomocí FLS2, což spustí tvorbu heterokomplexu společně s koreceptorem BAK1 („*Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1*“), což je receptorová kináza bohatá na leucinový motiv (Tang et al., 2015). A s intracelulární kinázou BIK1 („*Botrytis-induced kinase 1*“). Signál o rozpoznání je pomocí fosforylace BIK1 přenesen do extracelulárního prostoru, kde pokračuje dalšími přenašeči (Bentham et al., 2020) (více viz

kap. 2.3.2 Signalizace po rozpoznání škodlivého organismu a následné imunitní odpovědi (Obr. 3).



**Obrázek 3: Model rozpoznání Flg22 a spuštění PTI.** Flg22 je navázán na receptor pro rozpoznání flagelinu – FLS2, což způsobí formaci heterokomplexu složeného z „*Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1*“ – BAK1 a „*Botrytis-induced kinase 1*“ – BIK1. BIK1 je vypuštěn do intracelulárního prostoru a indukuje vtok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, stimuluje aktivitu MAPK kináz, aktivitu NADPH oxidáz zvaných RBOH pro tvorbu mezibuněčného  $\text{H}_2\text{O}_2$  a aktivitu proteinkináz závislých na vápníku – CDPK. Které jsou důležité pro aktivaci obranných genů a je spuštěna vzorem spuštěná imunitní reakce – PTI. SOD – superoxid dismutáza; PRX – peroxidáza. Upraveno a převzato podle Malinovsky et al. (2014).

Patogen se snaží PTI vyhnout či ji potlačit. Jedním ze způsobů, a velmi efektivní, jak potlačit PTI je, že patogen vysílá do rostlinné buňky efekторы. K jejich detekci slouží rostlinám R proteiny (Peng et al., 2018), přesněji proteiny s nukleotid vázající doménou a s doménou bohatou na leucin (NLR; „*nucleotide-binding, leucine-rich repeat receptors*“), které se vyskytují uvnitř rostlinné buňky. Rozpoznání přítomnosti efektorů pomocí NLR vede k tzv. efektoru spuštěné imunitě, **ETI**. Rozpoznání přítomnosti efektorů pomocí NLRs se děje vícero mechanismy (Bentham et al., 2020): přímé rozpoznání, nepřímé rozpoznání („*guard model*“) a rozpoznání s využitím návnady („*decoy model*“).

Během přímého rozpoznání dochází k navázání efektoru na NLR a dojde k aktivaci NLR a spuštění ETI (Bentham et al., 2020). Patogen se snaží přímému rozpoznání předejít (Cesari, 2018) a dochází k evolučním změnám, při kterých mohou vznikat nové efekторы, pro které rostliny nemají vytvořené NLRs (Nguyen et al., 2021). I z tohoto důvodu si rostliny vytvořily další způsob pro rozpoznání přítomnosti efektorů, a to nepřímou cestou. Nepřímé rozpoznání lze rozdělit do dvou modelů. V obou modelech NLRs hlídají strukturu proteinů,

kteře jsou cílem efektorů (Cesari, 2018). K jejich aktivaci dojde po biochemické změně jako je například posttranslační modifikace, degradace či jejich rozštěpení (Bentham et al., 2020). V modelu „guard“ (tzv. model strážce) NLR hlídá strukturu proteinů, které jsou pro buňku důležité a mají i svou vlastní metabolickou roli mimo imunitu rostlin. Naopak v modelu „decoy“ (tzv. model návnady) hraje protein, který je hlídán NLR jen návnadu, která žádnou jinou metabolickou funkci nemá.

### **2.3.2 Signalizace po rozpoznání patogenu a následné imunitní odpovědi**

Po rozpoznání patogenu dochází ke spuštění mnoha procesů v buňce. Některé slouží čistě jako přenašeči informace a další jako imunitní odpovědi. Jiné mohou zastávat obě funkce jako je ROS (Marcec et al., 2019).

#### **2.3.2.1 Zvýšení koncentrace $\text{Ca}^{2+}$ v cytosolu buňky**

Nejrychlejší odpovědí po rozpoznání patogenu je zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu. K této odpovědi dochází během 30 s – 2 min (Lamparová, 2017) během PTI. Koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů je následně důležitá pro řadu dalších odpovědí jako je právě ROS vzplanutí či ovládnutí průduchů (Thor et al., 2020). Mimo jiné je zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu důležité pro správnou funkci na vápníku závislých proteinkináz (CDPK; „*Calcium dependent protein-kinases*“) (Trdá & Janda, 2016). Během ETI se také zvyšuje koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu, ale jedná se méně intenzivní vtok s delší dobou trvání (Grant et al., 2000).

#### **2.3.2.2 ROS**

Po zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu velmi rychle následuje produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Ačkoliv k produkci mimobuněčného  $\text{H}_2\text{O}_2$  dochází jak u ETI, tak u i PTI, tak se její intenzita produkce se však liší. Během PTI dochází k jednoduchému a velmi rychlému vzplanutí. Během ETI naopak dochází k dvoufázovému vzplanutí, kdy silnější vzplanutí nastává až během druhé vlny (Yuan et al., 2021).

K produkci ROS během PTI dochází obecně až po signalizaci PRRs po rozpoznání vzoru po cca 2-3 minutách (Boller & Felix, 2009), kdy nejsilnější projev přichází po 10 - 14 minutách (Trdá & Janda, 2016) v RBOHD („*respiratory burst oxidase homolog D*“), který se chová jako NADPH oxidáza (Yuan et al., 2021). RBOHD nejdříve produkuje  $\text{O}_2$  v apoplastickém prostoru, což je superoxidový radikál, který sám o sobě nemůže projít

membránou. Z O<sub>2</sub> je pomocí superoxid dismutázy vytvořen peroxid vodíku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který už membránou prochází a může tak pronikat dále (Trdá & Janda, 2016).

První transienční produkce ROS spuštěná během ETI probíhá obecně stejným způsobem jako u PTI. Dochází však k rozpoznání efektoru a následné signální kaskády vedou k posílení produkce (Yuan et al., 2021).

### 2.3.2.3 MAPK

Dalším projevem imunitního systému rostlin je aktivace mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK; „*Mitogen-activated protein kinase*“). MAPK mají svou signální roli nejen během imunitních odpovědí, ale podílí se i na řadě dalších signálních drah v buňkách. Například se podílí na buněčném růstu, diferenciaci buněk či na smrti buněk, a to nejen u rostlin (Jonak, 2002). Pomáhají přenést mimobuněčný signál zachycený receptory do odpovídajících buněčných odpovědí (Lamparová, 2017).

Signalizace pomocí MAPK probíhá v kaskádách, kdy za sebou následuje sekvence několika kináz, ve třech úrovních (Jonak, 2002). První z nich je MAPKKK (Mitogenem aktivovaná proteinová kináza kináza kináza), druhá MAPKK (Mitogenem aktivovaná proteinová kináza kináza) a poslední MAPK (Mitogenem aktivovaná proteinová kináza). Cílové proteiny těchto kináz jsou různorodé, u všech však platí, že každý z nich je po následné kinázové aktivitě fosforylován (Jonak, 2002).

System funkce MAPK kináz je dobře znázorněna prací Asai et al. (2002). Kdy po rozpoznání flagelinu receptorem FLS2 dochází k aktivaci první kinázy MEKK1 patřící do MAPKKK. Následně MKK4/5 ze skupiny MPKK a ta aktivuje poslední kinázu MAPK – MPK3/6 která už působí na cílový protein jenž je aktivován. V případě rozpoznání flagelinu je to transkripční faktor WRKY22/29.

### 2.3.2.4 Akumulace kalózy

Kalóza je amorfní lineární polymer složený z  $\beta$ -(1,3) – D-glukanu (Bacic et al., 2009), hromadící se přímo v místě napadení po rozpoznání MAMPs (Lamparová, 2017). Během napadení rostlin mikroorganismy dochází ke specifickým formacím jako jsou kalózové zátky, kapky či destičky (Donofrio & Delaney, 2001) obecně nazývané kalózové papily (Jacobs et al., 2003). Jedná o lokální ztluštění v buněčných stěnách, které jsou vytvořeny mezi plazmatickou membránou a vnitřkem buněčné stěny (Voigt, 2014), jenž dále slouží jako mechanická bariéra proti její penetraci (Sabol & Pilátová, 2020) Kalózová vrstva

slouží také jako antimikrobiální složky zachytávající síť, jako jsou například glukosinoláty (Lamparová, 2017).

### **2.3.2.1 Hypersenzitivní odpověď**

Hypersenzitivní odpověď (HR; „*hypersensitive response*“) je, zjednodušeně řečeno, lokalizovaná buněčná smrt v místě, kde patogen pronikl do rostliny (Balint-Kurti, 2019). Jedná se o způsob obrany, která je společná většině vyšších rostlin a může být indukovaná širokým spektrem patogenů, jako jsou houby, oomycety bakterie a viry (Balint-Kurti, 2019). Spuštění akumulace kalózy je spojeno více s ETI než s PTI a pro její spuštění je důležitá produkce ROS a NO (Delledonne et al., 2001).

Princip spuštění HR nebyl dlouho znám, byl objasněn v roce 2020 (Ma et al.). Ma pozoroval navázání specifického efektoru na receptor, při kterém následně došlo ke změně konformace receptoru. Vzniklý enzym má hydrolázovou aktivitu a proděraví plazmatickou membránu čímž způsobí úmrtí buňky. Protože se jedná o zásadní proces pro rostlinné buňky, musí být také velmi přísně regulován. To, jestli bude HR aktivována se pohybuje mezi extrémy, jak umlčení, tak maximální aktivity. V okamžiku, kdy není patogen přítomný, musí být umlčena, ale v monetě, kdy je patogen přítomný dojde k maximální aktivaci v místě infekce (Balint-Kurti, 2019).

## **2.3.3 Rezistence (odolnost) vůči patogenům**

Po odhalení napadení a následných imunitních odpovědích může interakce vyústit dvěma možnými konci. Dojde buď k rozvinutí infekce, nebo k získání rezistence, přičemž je patogen potlačen. Kromě lokální odpovědi na napadení, známe ještě dva typy získané odolnosti: systémově získanou rezistenci a indukovanou systémovou rezistenci.

### **2.3.3.1 Systémově získaná rezistence**

Z hlediska obranných mechanismů jsem popisovala pouze lokální obranné mechanismy. Rostliny si však vyvinuly cestu, jak se bránit dále. Naučily se informaci o napadení rozšířit po celém těle. Po spuštění jak ETI či PTI dochází k tvorbě kyseliny salicylové (SA), která předává informaci o napadení patogenem do celé rostliny a dojde k vytvoření systémově získané rezistence (SAR; „*Systemic acquired resistance*“) (Vlot et al., 2009). SAR lze charakterizovat jako vývoj zvýšené rezistence ve vzdálených částech rostliny, které nebyly napadené (Kohler et al., 2002). Tato rezistence je účinná proti

širokému spektru patogenů a může trvat týdny, nebo dokonce i celou vegetační sezónu (Kuč, 1987).

Jak již bylo zmíněno důležitou roli při SAR hraje SA, která se hromadí během SAR jak lokálně, tak systematicky. V roce 2009 bylo prokázáno, že pomocí aktivity bakteriální SA hydrolázou (*NahG*) lze jak lokální imunitu, tak i SAR potlačit (Vlot et al.). SA je v rostlině sice sama mobilní a může se pohybovat v apoplastickém prostoru (Lim et al., 2016), ale není jisté, zda je to právě ona, kdo tyto informace roznáší přímo z místa napadení. SA sice hraje hlavní roli během šíření obranné signalizace, ale potřebuje k tomu také další signální molekuly (Vernooij et al., 1994).

### **2.3.3.2 Indukovaná systémová rezistence**

Další způsob rezistence je indukovaná systémová rezistence (ISR; „*induced systemic resistance*“), ta se od SAR liší tím, že je ve většinovém případě indukována mikroorganismy v půdě přes kořenový systém (Pieterse et al., 2014). ISR také nezávisí na SA, ale na kyselině jasmonové (JA) a etylenu (Pozo et al., 2008). Následně poskytuje rezistenci v celém kořenovém systému a také v nadzemních částech rostlin. Chrání rostlinu proti mykorhizním patogenům či herbivorům (Song et al., 2013).

### **2.3.3.3 Induktory rezistence**

V současné době dochází k velmi silnému nadužívání chemických látek pro ochranu rostlin. Kvůli zvýšené potřebě používání pesticidů pravděpodobně dochází k selekci rezistentních kmenů patogenů, se kterými pak ani chemické látky nedokáží bojovat. Je zde jasná potřeba alternativních metod, které podpoří zdravý růst rostlin.

Proto je potřeba využít již existujících principů v rostlině, jako jsou SAR a ISR. Které mohou být v rostlinách uměle indukovány pomocí látek, které spouštějí imunitní reakci neboli elicitorů. Těmi jsou v tomto případě molekuly přírodního původu pocházející buď z rostliny samotné anebo to mohou být sloučeniny typu MAMP či synteticky vyrobené molekuly, které imitují napadení rostliny patogenem či stav ohrožení (Burketova et al., 2015).

Příkladem uměle syntetizovaných sloučenin je acibenzolar-S-metyl neboli benzothiadiazol (BTH). Je to induktor proti bakteriálním, houbovým a virovým onemocněním (Walters et al., 2013). BTH u rostlin vyvolává rezistenci stejným způsobem jako SA během SAR. Toto bylo zjištěno, když byly použity transgenní rostliny, které postrádaly kyselinu salicylovou. Ty byly ošetřeny BTH, které u nich následně spustilo SAR

(Gozzo & Faoro, 2013). Ošetření pomocí BTH ukázalo rezistenci proti rzím *Uromyces viciaefabae* a *Ascochyta fabae* na fazolích (Sillero et al., 2012). BTH aplikované přímo na výhonky poskytlo ochranu proti parazitické rostlině *Orobancha crenata* a to opět u fazolí (Sillero et al., 2012). Ačkoli má tato sloučenina velký potenciál, bylo pozorováno podpoření infekce pozdní listové skvrnitosti *Cercosporidium personatum* u olejnice podzemní (Zhang et al., 2011). V současnosti se v zemědělství používá i její komerční forma Bion a Actigard.

Dalším z chemických elicitorů, který rostlinám propůjčuje rezistenci je kyselina  $\beta$  – aminomáselná (BABA). Jedná se o aminokyselinu, která netvoří žádný protein. BABA má schopnost chelátovat  $Fe^{3+}$  ionty. Následně s nimi tvoří komplexy a snižuje jejich koncentraci v půdě, což poté ovlivňuje rostlinu. Protože fenotypový projev rostlin ošetřených BABA je stejný jako rostlin pěstovaných v prostředí s nedostatkem Fe. Reakce na toto prostředí u rostliny vyvolává stav, ve kterém je rostlina schopna reagovat na napadení patogeny mnohem efektivněji (Koen et al., 2014). BABA poskytuje rezistenci například u salátu proti patogenu *Bremia lactucae*. Když byly rostliny před infekcí ošetřeny BABA, tak nedošlo k rozvinutí infekce (Cohen et al., 2010).

Šašek et. al také prokázal, že efekt BABA není pouze indukce rezistence v rostlinách, ale také má antimykotické účinky proti některým houbovým patogenům jako je *Leptosphaeria maculans* (Šašek et al., 2012).

#### **2.3.3.4 Kolagen**

V dřívější práci našich kolegů se ukázalo, že odpad hydrolyzátů kůží vzniklý v kožešnickém průmyslu indukuje rezistenci. Hlavní složkou hydrolyzátů byl kolagen. Naší domněnkou je, že by kolagen mohl být novým elicitem imunitních reakcí rostlin. Kolagen je hojný strukturní protein, který se vyskytuje napříč veškerou živočišnou říší, dokonce je to v ní také nejhojněji zastoupený protein (Fratzl, 2008). Jedná se o hlavní stavební složku pojivových tkání, bazálních membrán a rohovek. V organismech plní hlavně opěrnou a ochrannou funkci, jeho hlavní mechanické vlastnosti jsou ohebnost a odolnost vůči tahu. Z fyzikálně chemického hlediska se kolagen řadí mezi gely. Ty se obecně charakterizují tím, že při ponoření do vody omezeně nabobtnají a dochází ke změně jejich objemu nebo pružnosti a délky jejich vláken. To však neznamená, že by byl kolagen ve vodě rozpustný, protože se jedná o skleroprotein, nelze jej ve vodním prostředí rozpustit (Peterková & Lapčík, (Jr), 2000). Štěpení a degradace kolagenu jsou katalyzovány pomocí kolagenáz (Di Pasquale et al., 2019).



Struktura kolagenu je jednou z nejvíce elegantních mezi proteiny. Primární struktura kolagenu je tvořena převážně pravidelně se opakujícím glycinem, prolinem a hydroxyprolinem či hydroxylysinem. Sekundární struktura je levotočivá protáhlá šroubovice (Shoulders & Raines, 2009). Ta nemůže existovat sama o sobě a musí se spojit s těsně sousedícími řetězci s podobnými vlastnostmi a vzniká tak terciální struktura. Ta se u kolagenu skládá ze tří řetězců které společně vytvářejí pravotočivou trojšroubovici se stejnou osou pro všechny tři vlákna. Vytváří se tím struktura zvaná tropokolagen (Shoulders & Raines, 2009), která je stavebním kamenem kvarterní struktury, neboli vlákna, které se již nachází v extracelulárním prostředí.

Syntéza kolagenu probíhá na polyribosomech sedících na membráně drsného endoplazmatického retikula které syntetizují tak zvaný protokolagen. Následně dochází k iniciální glykosylaci a hydroxylaci na aminokyselinových zbytcích prolinu a lysinu za vzniku hydroxyprolinu a hydroxylysinu. Na konci každého vlákna protokolagenu se nachází registrační peptidy, které pomáhají k vytvoření trojitě šroubovice a vzniku prokolagenu. Protokolagen je z hrubého endoplazmatického retikula přepraven pomocí golgiho aparátu do extracelulárního prostoru. Uvnitř jsou pomocí enzymů odštěpeny restriční peptidy a vzniká tak tropokolagen. Sousední buňky uspořádají vzniklý tropokolagen do kolagenních fibril a vytváří se tak dlouhá vlákna (Cowin & Doty, 2007).

Z rostlinných škůdců nalezneme kolagen například u háďátek ve kterých se nachází v jejich vícevrstvé kutikule (Cox et al., 1981) a je pro ně zásadní evolučně konzervovanou součástí těla a je tak ideálním kandidátem pro rozpoznání.

V této práci jsme se, na základě výsledků kolegů z Laboratoře patofyziologie rostlin (ÚEB AV ČR), rozhodli studovat vliv ošetření kolagenu na imunitní reakce *Arabidopsis thaliana*. K tomuto účelu jsme se rozhodli použít hydrolyzovaný hovězí kolagen, který už je dobře rozpustný ve vodě.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Materiál a metody

##### 3.1.1 Rostlinný materiál

V práci byly použity genotypy rostliny *Arabidopsis thaliana*: Columbia-0 (WT, planě rostoucí ekotyp); *NahG* (genetické pozadí Columbia-0) (Šašek et al., 2014); *pFRK1::GUS* (genetické pozadí Columbia-0) (Kunze et al., 2004) a *pPR1::GUS* (genetické pozadí Columbia-0) (Meldau et al., 2014). Rostliny byly pěstovány třemi různými způsoby: v zemině, hydroponicky a za sterilních podmínek v tekutém i na gelritem ztuženém médiu.

U rostlin pěstovaných **v zemině** byla semena nejprve přesypána do 1,5 ml Ependorfové mikrozkušavky (dále uváděno jako 1,5 ml mikrozkušavka), která byla následně označena. Byla provedena sterilizace semen 30% roztokem SAVA obsahujícím kapku Tweenu-20 (**Tab. 1**). V tomto roztoku byla semena ponechána 5 - 7 minut a po propláchnutí 4-5krát destilovanou vodou umístěny do lednice na 1-2 dny (možno až 7 dní). Následně byla semena vyseta na vodou nasáklou rašelinovou tabletu (Jiffy 7, Bohemiaseed), ze které po uplynutí 7 dní byly semenáčky přesazeny po jedné rostlině do menších květináčů, opět s rašelinovou tabletou. Květináče s tabletami byly umístěny do plastového boxu, který zároveň sloužil jako miska pro zálivku. Takto připravené boxy byly přeneseny do kultivačního boxu na Ústavu molekulární biologie rostlin, Biologické centrum, Akademie věd České republiky (ÚMBR), kde byly rostliny pěstovány v kontrolovaných podmínkách osvětlení PPFD  $\sim 130 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , fotoperioda 10/14h den/noc s teplotou 22 °C (Růstová jednotka („Growth unit“) – Photon Systém Instruments, Česká republika).

---

**Tabulka 1:** Složení roztoku pro sterilizaci semen

---

Látka	Množství
SAVO® (chlornan sodný 5 %)	15 ml
Destilovaná voda	35 ml
Detergent: Tween 20	1 kapka

---

U rostlin pěstovaných **hydroponicky** byla semena nejprve vysterilizována stejně jako u pěstování v zemině a druhý den následně napipetována na pěstební médium gronan v hydroponických květináčích (průměr 5,5 cm). Které byly před výsevem zalaty destilovanou

vodou. Tyto květináče byly po osmi umístěny do hydroponické nádoby, která byla zalita opět destilovanou vodou. Hydroponické nádoby byly poté přeneseny do kultivačních boxů s kontrolovanými podmínkami, osvětlení PPFD  $\sim 130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperioda 10/14h den/noc s teplotou 22 °C (Pěstební jednotka, PSI, ČR). Po 7 dnech bylo provedeno jednocení a na každém květináči byla ponechána pouze jedna rostlina. Květináč byl překryt alobalem s vytvořeným otvorem pro rostlinu, tak aby nebyl omezený její růst. Destilovaná voda byla vyměněna za pěstební médium  $\frac{1}{4}$  Hoaglanův roztok (**Tab. 2**). Tento roztok byl následně doplňován každých 7 dní, tak aby byly hydroponické květináče z nejméně z poloviny ponořeny.

**Tabulka 2:** Složení Hoaglanova zásobního roztoku pro hydroponie.  
*Výsledný roztok byl následně čtyřikrát zředěn destilovanou vodou.*

Látka	Objem (ml)/l
1M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1
1M $\text{KNO}_3$	6
1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4
1M $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
Roztok mikroelementů a vitaminů	10
Citrát železitý	1

U rostlin pěstovaných **za sterilních podmínek** v MS médiu nejprve na gelritem ztuženém médiu v Petriho miskách a poté v jamkové destičce v tekuté formě byla semena nejprve vysterilizována, stejným způsobem jako u ostatních výsevů. Ale bylo pracováno za sterilních podmínek v laminárním boxu a k propláchnutí semen byla použita sterilní destilovaná voda. Semena se nechala do druhého dne, kdy byla přenesena ve sterilních podmínkách na Petriho misky. Jako médium sloužilo  $\frac{1}{2}$  MS medium s 1% sacharózy a ztuženým Gelritem (**Tab. 3**). Plotny byly poté překryty parafilmem a umístěny do prostoru učenému ke kultivaci rostlin na Katedře experimentální biologie rostlin (KEBR) s kontrolovanými podmínkami se světelnou periodou o délce 10/14h den/noc s intenzitou osvětlení PPFD  $\sim 130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a o teplotě 22°C. Po 4 dnech byly klíčící rostliny z média sebrány a přesunuty do MS média v tekuté formě v 96 jamkové transparentní destičce, kde probíhala další kultivace (**Tab.3**).

---

**Tabulka 3:** Složení MS media

*Pro MS medium v tekuté formě proběhla příprava bez Gelritu.*

---

Látka	Množství (mg)/l
Murashige a Skoog s vitamíny	2,2 g
1% Sacharóza	10 g
1,5 % Gelrit	5 g

---

### 3.1.2 Mikrobiální materiál

V této práci jsme pracovali s fytopatogenní bakterií *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) (Katagiri et al., 2002) a fytopatogenní houbou *Botrytis cinerea* BMM (Govrin & Levine, 2000).

Kultivace bakteriálního patogenu byla prováděna za sterilních podmínek laminárního boxu. Z originálních ploten Luria – Bertani (LB) média (**Tab.4**) obsahujícím rifampicin 50 $\mu$ g / ml (nebo z glycerolového „stocku“ skladovaném při -80 °C) byl přenesen nový vzorek na nové s agarovým médiem s antibiotickou složkou. Takto připravené plotny byly uzavřeny a převázány parafilmem a přeneseny na 24 hodin do inkubátoru s teplotou 18 °C. Po 24 h byla bakterie sebrána z povrchu média a pomocí spektrometru změřena její koncentrace a následně připravena suspence o optické hustotě OD<sub>600</sub>=0,0005. Takto připravená suspence byla použita pro infekci rostlin.

---

**Tabulka 4:** Složení Luria – Bertani media

Látka	Množství (mg)/l
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	950 ml
Trypton	10 g
NaCl	10 g
Kvasinkový extrakt	5 g

---

Houbový patogen *B. cinerea* nám byl laskavě poskytnut z laboratoře patofyziologie rostlin v Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Praze. Kultivace byla opět provedena ve sterilních podmínkách flowboxu. Kdy z původních ploten byla houba přenesena na nové s PDA médiem. Poté opět uzavřeny a převázány parafilmem. Plotny s nanesenou houbou byly kultivovány po dobu 10 dnů ve tmavém prostředí během prvních 4 dnů při teplotě 18 °C, zbylých 6 již na světle. Poté byly sebrány z ploten opět ve sterilních podmínkách laminárního boxu spory. A pomocí světelného mikroskopie spočítána hustota spor a

připraven roztok o hustotě spor  $1 \times 10^{-6}$ /ml. Takto připravená suspenze byla použita pro infikaci rostlin.

### **3.1.3 Ošetření rostlin chemikáliemi**

V této práci bylo cílem studovat možné imunitní odpovědi rostlin na ošetření kolagenem, k tomu byly rostliny ošetřovány hydrolyzovaným hovězím kolagenem (4fitness), jako pozitivní kontrola byl použit peptid flg22 (QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA; EZ biolabs) a jako negativní kontrola sloužila voda.

#### **3.1.3.1 Ošetření kolagenem**

Rostliny byly ošetřovány hydrolyzovaným kolagenem v různých koncentracích (od 0,1 % - 10 %). Informace o přesných koncentracích je u každého konkrétního experimentu. Roztok hydrolyzovaného kolagenu byl buď dialyzován nebo byl použit bez dialýzy. 20% hydrolyzovaný kolagen byl dialyzován s použitím membrány s velikostí pórů o 3,5 kDa. Kvůli dialýze klesla výsledná koncentrace dialyzovaného kolagenu. Všechny uvedené koncentrace dialyzovaného kolagenu jsou oproti nedialyzovanému přibližně 200krát zředěné.

U rostlin pěstovaných v zemině byl kolagen pokaždé infiltrován pod tlakem do spodní strany listu 1 ml stříkačkou bez jehly tj, rostliny byly ošetřeny do listů. V případě pěstování rostlin v hydroponiích byl kolagen přidáván přímo do pěstebního média, tj, rostliny byly ošetřeny ke kořenům.

#### **3.1.3.2 Kontrolní ošetření**

Jako pozitivní kontrola byly rostliny ošetřovány peptidem flg22 o koncentraci 100 nM (Gómez-Gómez & Boller, 2000). Flg22 byl jako kontrola použit pouze u rostlin pěstovaných v zemině a za sterilních podmínek. Ošetření bylo prováděno stejným způsobem jako kolagenem. Jako negativní kontrola byla použita voda.

### **3.1.4 Analýza produkce mimobuněčného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Při stanovení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jsme vycházeli z protokolu (Smith & Heese, 2014) kde ke stanovení využívají roztok luminolu a křenové peroxidasy. Použili jsme rostliny o stáří 4-6 týdnů z jejichž listů byly vyříznuty disky (průměr 3 mm). Které byly přes noc inkubovány jednotlivě v jamkách bílé netransparentní 96 jamkové destičky obsahující 150  $\mu$ l destilované vody v každé jamce, umístěné do tmy.

Následující den byl pro stanovení výskytu  $H_2O_2$  použit roztok obsahující 100 mM luminol a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  křenovou peroxidázu (**tab. 5**). Voda byla z každé jamky odsáta a vyměněna 200  $\mu\text{l}$  reakčního roztoku (Bisceglia et al., 2015). Chemiluminiscence byla měřena na luminometru TECAN. Měření probíhalo po dobu 45–60 minut od iniciace reakce ošetřením kolagenem či 100 nmol flg22 jako pozitivní kontrolou.

**Tabulka 5:** Reakční roztok pro sledování výskytu reaktivních forem kyslíku

Látka	Množství
Luminol (100 mM)	3 $\mu\text{l}$
Křenová peroxidáza (10 mg/ml)	3 $\mu\text{l}$

### 3.1.5 Analýza akumulace kalózy

Kalóza byla obarvena v celých listech čtyř až pětítýdenních rostlin. Nejprve byla provedena infiltrace kolagenu, flg22 nebo destilované vody na 24 a 48 hodin. Po sběru byl z pletiva nejprve odstraněn chlorofyl promytím směsí etanol/ledová kyselina octová (3/1, v/v). V průběhu odbarvování byla směs jednou až dvakrát vyměněna. Poté byly listy rehydratovány nejméně 2 h v 70 % etanolu, nejméně 2 h v 50 % etanolu, nejméně 2 h v 30 % etanolu a na závěr ponechány ve vodě.

Následně byly přeneseny do 10 % NaOH a inkubovány nejméně 2 h při 37 °C. Poté bylo pletivo třikrát promyto vodou a inkubováno nejméně 4 h v roztoku 150 mmol  $K_2HPO_4$  (pH 9,5) obsahujícím 0,01% anilinovou modř. Poté byly listy přeneseny na podložní sklíčko a přikryty krycím sklíčkem. Pozorování proběhlo pod fluorescenčním mikroskopem OLYMPUS BX63 s digitální kamerou OLYMPUS DP74 (Entomologický ústav, Biologické centrum AV ČR). Z každého listu byla pořízena fotografie pomocí aplikace CellSens Dimension při konstantní délce expozice pro všechny snímky. K následné kvantifikaci kalózy analýzou obrazu byl použit program ImageJ.

### 3.1.6 Analýza aktivity promotorů *pPRI* a *pFRK1*

K analýze aktivity promotorů byla použita metoda využívající analýzu GUS pomocí X-Gluc (Schenk & Schikora, 2015). Nejprve byl připraven X-gluc roztok obsahující komponenty  $NaH_2PO_4$  (pH=7), X-Gluc v práškové formě (Biosynth), K-ferricyanid (Merck), Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a DMSO (Sigma-Aldrich). X-Gluc v práškové formě musel nejprve být rozpuštěn v DMSO a až poté přidán do konečného roztoku (**Tab. 6**). Po uplynutí požadovaného času působení kolagenu byly z každé rostliny sebrány 3 listy a umístěny do 2 ml mikrozkušavek. Pokud bylo pracováno s celými rostlinami byly umístěny

do falkon o objemu 50 ml. Do každé zkumavky byl přidán X-Gluc roztok, tak aby byly listy či celé rostliny ponořené. Takto připravené vzorky byly umístěny do exikátoru pro vakuovou infiltraci roztoku do celé plochy listů či rostlin.

Vzorky se následně ponechaly nejméně na 6 hodin v teplotě 37 °C ve tmě. Po 6 hodinách proběhlo odbarvení. Byl odpipetován X-Gluc roztok a nahrazen 100% etanolem, ve kterém se listy ponechaly po dobu 2 hodin, kdy došlo k jeho výměně. Po ztrátě chlorofylu, byl 100% etanol vyměněn za 80% a ponechán opět nejméně na 2 hodiny. Po kompletním obarvení vyměněn za destilovanou vodu.

**Tabulka 6:** Složení X-Gluc roztoku

Látka	Množství (mg)/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 ml
X-Gluc prášková forma	0,0104 g
K-Ferricyanid	10 µl
Triton X-100	50 µl

### 3.1.7 Analýza inhibice růstu klíčících rostlin

Byly použity rostliny pěstované ve sterilních podmínkách nejprve 4 dny na Petriho miskách na gelritem ztuženém médiu. Poté přesunuty do 96 jamkové transparentní destičky s tekutým MS médiem a zde ponechány po dalších sedm dní. Do vybraných jamek v destičce byl přidán kolagen v nedialyzované formě. Po uplynutí sedmi dnů se klíčky rostlin zvažily.

### 3.1.8 Test rezistence proti bakteriálnímu patogenu *Pst* DC3000

K testu rezistence byly použity rostliny o stáří 4–5 týdnů. Před ošetřením rostlin byla připravena kultura bakterie (postup viz kap. 3.1.2 Mikrobiální materiál). Rostliny byly ošetřeny kolagenem infiltrací do listů a s kontrolním ošetřením destilovanou vodou. Takto ošetřené rostliny byly následně umístěny do kultivační místnosti na KEBR na 24 hodin v kontrolovaných podmínkách. Po 24 hodinách byla provedena infekce bakterií infiltrací do listů. Po 3 dnech od infiltrace bakterií, byly z listů zhotoveny disky (průměr 5 mm). Které se pro následnou homogenizaci umístily do 1,5 ml mikrozkuvek, po homogenizaci byl rostlinný materiál zalit 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Každý homogenizovaný list byl několikrát pečlivě promíchán pomocí vortexového míchadla. Bylo provedeno decimální ředění, k němuž byla použita transparentní 96jamková destička. Do každé jamky bylo napipetováno 180 µl 10mM MgCl<sub>2</sub>. Do první řady bylo přidáno 20 µl homogenizovaného roztoku. Po řádném

promíchání do druhé řady přeneseno 20  $\mu\text{l}$  z té první a opět promícháno, tímto postupem bylo zředěno do koncentrace  $1 \times 10^{-6}$ . Z každé jamky bylo poté odebráno 10  $\mu\text{l}$  na destičku s antibiotickým agarovým médiem. Takto zhotovené plotny byly přeneseny do inkubátoru s teplotou 28 °C, kde dochází ke kultivaci. Po 12–24 hodinách byly narostlé kolonie spočteny a zaznamenány.

### **3.1.9 Test rezistence proti houbovému patogenu *Botrytis cinerea***

Nejprve proběhla kultivace patogenu (více viz kap. 3.1.2 Mikrobiální materiál). Bylo pracováno s rostlinami o stáří 6 týdnů. Nejprve bylo provedeno ošetření kolagenem do listů. Jako kontrola byly použity roztoky flg22 (pozitivní) a destilované vody (negativní). Po všech infiltracích do listu byly rostliny umístěny do kultivační místnosti KEBR na 24 hodin v kontrolovaných podmínkách. Poté byla provedena inokulace patogenem.

Následně byla provedena infekce rostlin sporama *B. cinerea*. Na každý ošetřený list bylo aplikováno 4  $\mu\text{l}$  roztoku s houbovým organismem. Takto ošetřené rostliny byly náhodně umístěny do plastových transparentních beden s víkem. Do každé bedny bylo nalito 500 ml destilované vody pro zvýšení vlhkosti a tyto bedny opět umístěny do kultivační místnosti KEBR na 6 dní. Poté byly listy z každé rostliny sklizeny a zhotoven sken ze kterého byla provedena analýza obrazu pomocí programu ImageJ.

### **3.1.10 Vyhodnocení dat**

K vyhodnocení dat byl použit software Microsoft excel. Tvorba grafů byla provedena v programech Microsoft excel, PowerPoint a Prism 9.3.1 GraphPad. Pro statistické vyhodnocení byl použit Prism 9.3.1 GraphPad.

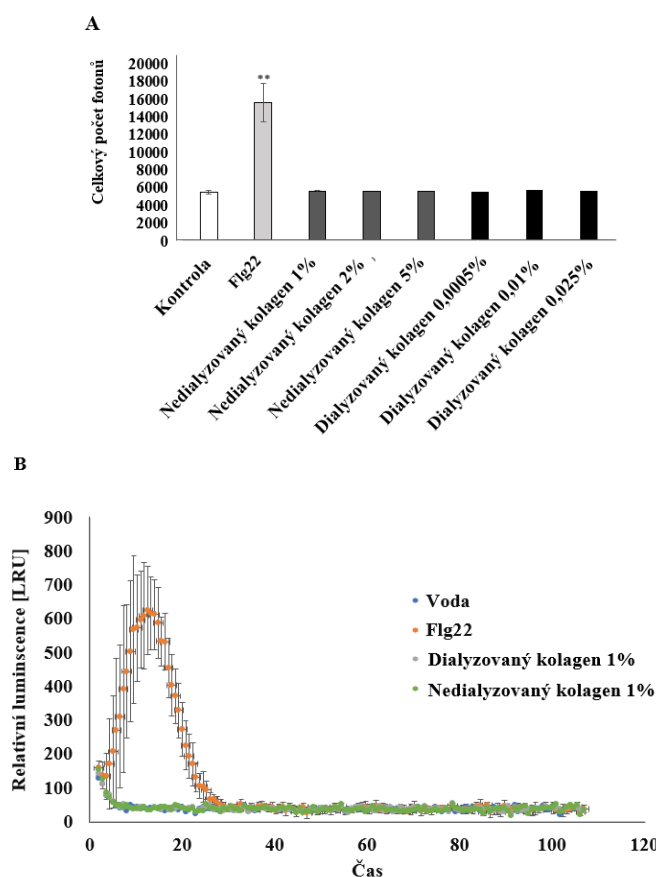


## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Analýza produkce mimobuněčného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po ošetření kolagenem

Jednou z prvních imunitních reakcí, která nastává po rozpoznání přítomnosti patogenu je dočasně zvýšená produkce mimobuněčného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. My jsme analýzou této reakce po ošetření s kolagenem začali, neboť metoda stanovení je rychlá a levná. Rozhodli jsme se tedy ověřit, zda po ošetření rostliny kolagenem dojde ke spuštění produkce pomocí chemické bioluminiscence (Smith & Heese, 2014).

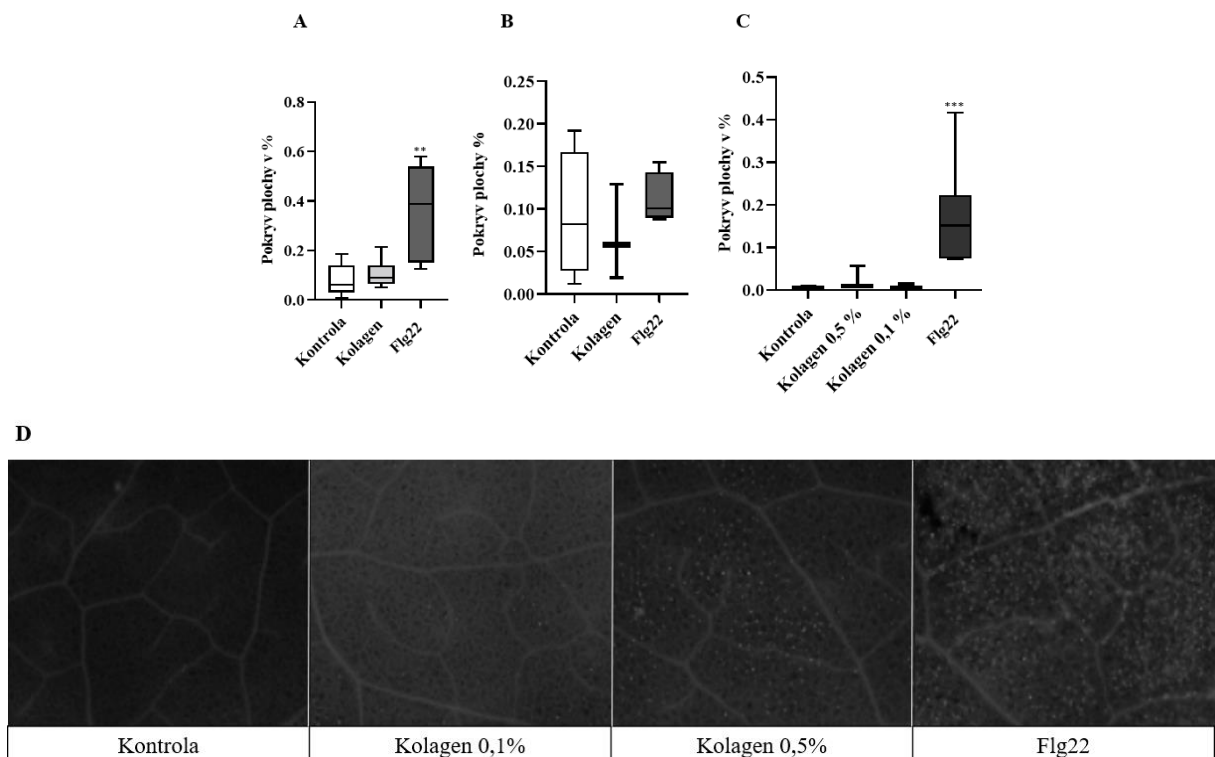
Vyříznuté disky *A. thaliana* jsme ošetřovali různými koncentracemi dialyzovaného i nedialyzovaného kolagenu. Po žádném z ošetření kolagenem nedocházelo ke zvýšené produkci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jediný případ, kdy jejich produkci docházelo bylo při působení flg22, což byla naše pozitivní kontrola (**Obr. 4**).



**Obrázek 4: Produkce mimobuněčného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po ošetření kolagenem.** K experimentům byly použity disky ze 4-5 týdenních rostlin, které byly přímo v jamce ošetřeny buď kolagenem nebo 100 nM flg22. Jako kontrola byly disky ošetřeny destilovanou vodou. **A** – znázornění produkce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pomocí celkového počtu odrazu detekovaných fotonů v průběhu měření. Kdy hodnoty představují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku z osmi disků. Hvězdičky znázorňují statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a ošetřovanou variantou (\*\* = p<0,01; ANOVA s následným Dunnettovým testem). **B** – znázorněn časový průběh analýzy ROS. Kdy dané hodnoty znázorňují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku z osmi měřených disků.

## 4.2 Analýza akumulace kalózy po ošetření rostlin kolagenem

Jako další typickou imunitní odpověď jsme analyzovali akumulaci kalózy (Kalachova et al., 2020). Po ošetření rostlin kolagenem infiltrací do listů po dobu 24 (dvě opakování) a 48 hodin nedošlo dle analýzy obrazu k prokazatelně zvýšené produkci, která by se lišila od kontrolního ošetření (**Obr. 5**). I přesto, že při vyhodnocení se efekt kolagenu neprojevil, tak se nám okem z fotografií jevilo, že při vyšších koncentracích kolagenu byla akumulace kalózy zvýšená (**Obr 5D**). Po 48 hodin od ošetření se nezdál být pozorovaný efekt ani u flg22, což napovídá nějaké chybě v postupu (**Obr. 5B**).

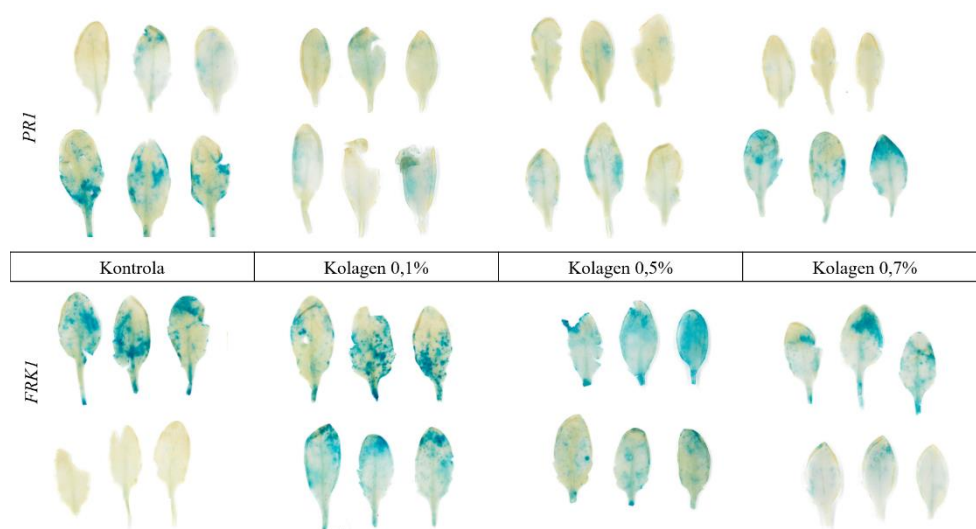


**Obrázek 5: Akumulace kalózy.** Ošetření bylo prováděno infiltrací do listů u 4-5týdenních rostlin *A. thaliana*. Flg22 byl používán v 100 nM koncentraci. **A** – Ošetření nedialyzovaným 0,7% kolagenem po dobu 24 h. **B** – Ošetření nedialyzovaným 0,7% kolagenem po dobu 48 h. **C** – Ošetření 4týdenních rostlin různými koncentracemi nedialyzovaného kolagenu po dobu 24 h. **A** až **C** – medián vyjádřen příčnou čarou. Boxy ukazují 25 a 75 % percentily hodnot a chybové úsečky ukazují na krajní hodnoty. Hvězdičky znázorňují statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a ošetřovanou variantou (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ANOVA s následným Dunnettovým testem). **D** – Reprezentativní fotografie akumulace kalózy po ošetření rostlin po dobu 24 h.

### 4.3 Analýza aktivity promotorů *pPRI* a *pFRKI* po ošetření kolagem

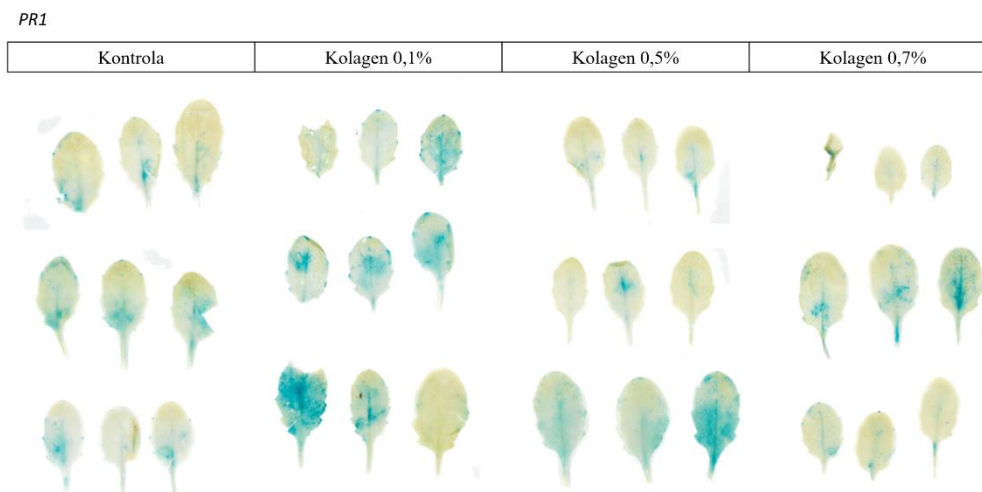
V naší laboratoři máme k dispozici semena transgenních rostlin s vneseným genem GUS, který je exprimován pod aktivitou promotorů (*pPRI* a *pFRKI*) jež jsou promotory genů aktivovaných při indukované imunitní odpovědi (Meldau et al., 2014). Rozhodli jsme se tyto rostliny využít a aktivitu těchto promotorů po ošetření kolagenem analyzovat.

Bylo uděláno celkem šest různých provedení analýzy aktivity promotorů. U každého, až na „čtvrté“ provedení (2 opakování), bylo uděláno pouze jedno opakování. Při prvním provedení byly použity hydroponické rostliny staré 4 týdny s ošetřením kolagenem do listů. Aktivita obou promotorů byla poměrně variabilní. U *pPRI* nejsme schopni říci, zda dochází k aktivaci, přičemž *pFRKI* se zdá být mírně aktivován, nicméně jsme u jedné sady listů pozorovali aktivitu i v kontrole, což znesnadňuje možnost říci, zda k indukci skutečně došlo (Obr.6).



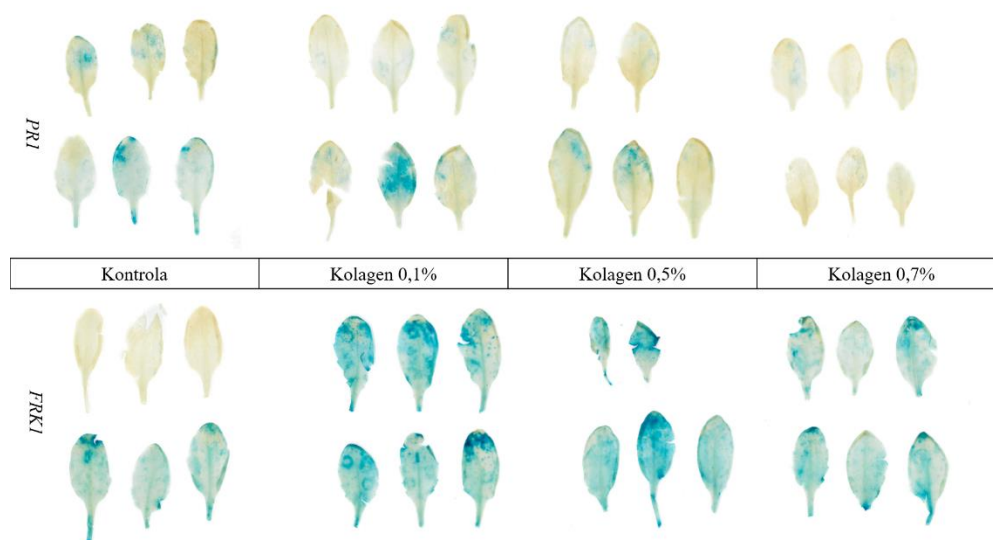
**Obrázek 6:** Aktivita promotorů genů *pPRI* a *pFRKI* po ošetření nedialyzovaným kolagenem. Čtyřtýdenní rostliny *A. thaliana* (*pPRI*::GUS; *pFRKI*::GUS) pěstované hydroponicky byly ošetřeny, infiltrací do listu po dobu 6 h. Kontrola znamená ošetření destilovanou vodou.

Při druhém provedení bylo ošetření provedeno infiltrací opět po dobu 6 hodin. Byly použity rostliny *pPRI*::GUS pěstované v zemině staré 4 týdny. Viditelná vyšší aktivita promotoru se projevuje při koncentraci 0,1 % a 0,5 % (Obr. 7).



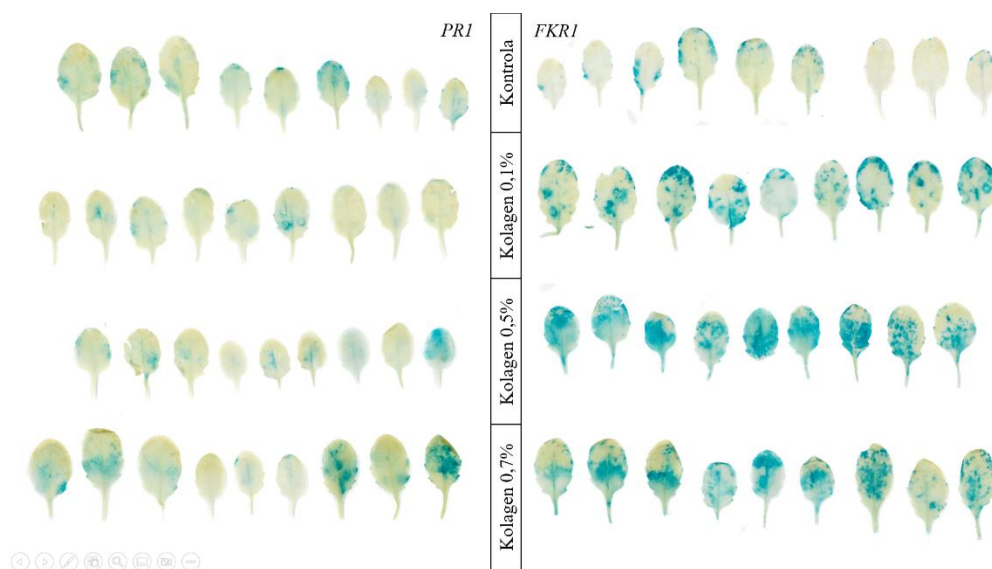
**Obrázek 7: Aktivita promotorů genu *pPR1* po ošetření nedialyzovaným kolagenem.** Čtyřtýdenní rostliny *A. thaliana* (*pPR1*::GUS;) pěstované hydroponicky byly ošetřeny, infiltrací do listu po dobu 6 h. Kontrola znamená ošetření destilovanou vodou.

Třetí provedení bylo realizováno infiltrací do listů po dobu 24 hodin u čtyřtýdenních hydroponicky pěstovaných rostlin. Promotor *pPR1* není aktivován, ani při vyšších koncentracích. Kdežto promotor *pFRK1* aktivován byl ovšem opět se nám v polovině případů ukázala indukce i v kontrolních rostlinách (**Obr. 8**).



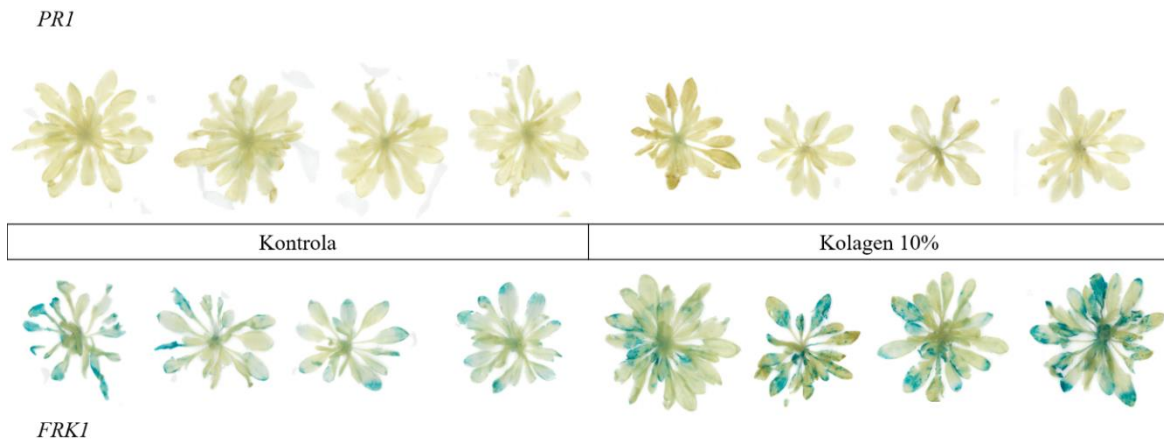
**Obrázek 8: Aktivita promotorů genů *pPR1* a *pFRK1* po ošetření nedialyzovaným kolagenem.** Čtyřtýdenní rostliny *A. thaliana* (*pPR1*::GUS; *pFRK1*::GUS) pěstované hydroponicky byly ošetřeny, infiltrací do listu po dobu 24 h. Kontrola znamená ošetření destilovanou vodou.

Při čtvrtém provedení bylo pracováno s rostlinami pěstovanými v zemině. Ošetření probíhalo infiltrací do listů hydrolyzovaným nedialyzovaným kolagenem po dobu 24 hodin. Aktivita promotoru *pPRI* není viditelná, zatím co aktivita promotoru *pFRKI* je zřejmá (**Obr. 9**). Toto provedení bylo opakováno mým kolegou Jhonnym Stalynem Hernándezem s velmi podobnými výsledky.



**Obrázek 9: Aktivita promotorů genů *pPRI* a *pFRKI* po ošetření nedialyzovaným kolagenem.** Čtyřtýdenní rostliny *A. thaliana* (*pPRI*::GUS; *pFRKI*::GUS) pěstované v zemině byly ošetřeny, infiltrací do listu po dobu 24 h. Kontrola znamená ošetření destilovanou vodou.

Po prokázání aktivity promotoru *pFRKI* nás zajímalo, zda by kolagen mohl vzbudit aktivitu při ošetření ke kořenům. Byly použity 5 týdnů staré hydroponické rostliny, kolagen byl přidán do pěstebního média na 24 hodin. Jako kontrolní ošetření byla použita destilovaná voda. Aktivita nebyla pozorována ani u jednoho z promotorů. *pPRI* nebyl aktivní vůbec, zatímco *pFRKI* byl aktivní i v kontrole (**Obr. 10**).

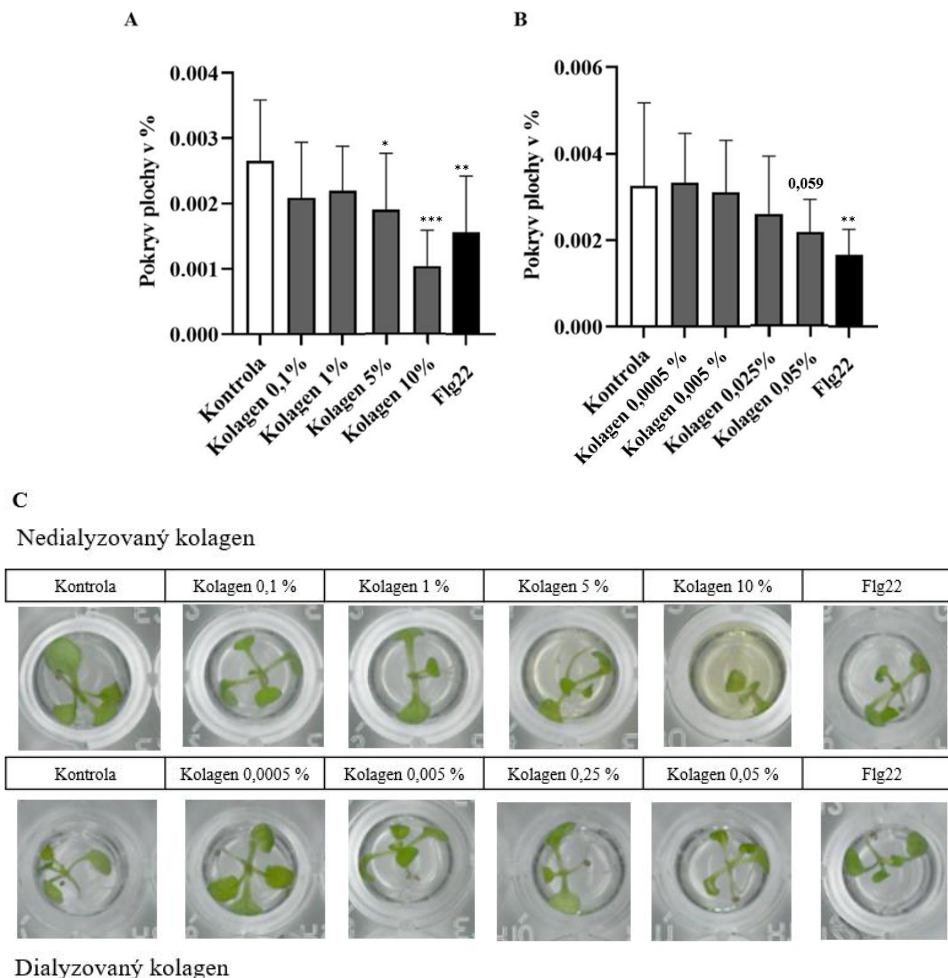


**Obrázek 10: Aktivita promotorů genů *pPRI* a *pFRKI* po ošetření nedialyzovaným kolagenem.** Pětítýdenní rostliny *A. thaliana* (*pPRI*::GUS; *pFRKI*::GUS) pěstované hydroponicky byly ošetřeny přidáním kolagenu přímo do média (tj. ke kořenům) po dobu 24 h. Kontrola znamená ošetření destilovanou vodou.

#### 4.4 Analýza inhibice růstu klíčnicích rostlin po ošetření kolagenem

Po testech aktivity promotorů genů, které indikovaly možný efekt kolagenu na imunitu, nás zajímalo, zda by kolagen mohl vést k inhibici růstu rostlin. Inhibice růstu po ošetření molekulami (potenciálně) aktivujících rostlinou imunity se řadí mezi klasické screeningové metody efektu dané molekuly (Janda et al., 2021).

Bylo uděláno pouze jedno provedení ošetření s kolagenem jak v nedialyzované, tak dialyzované formě. Bylo potvrzeno že obě formy při vyšších koncentracích inhibují růst (**Obr. 11A a B**). Rostliny ošetřené kolagenem o vyšších koncentracích měly viditelně menší růst než ty ošetřené s nejnižší koncentrací (**Obr. 11C**).

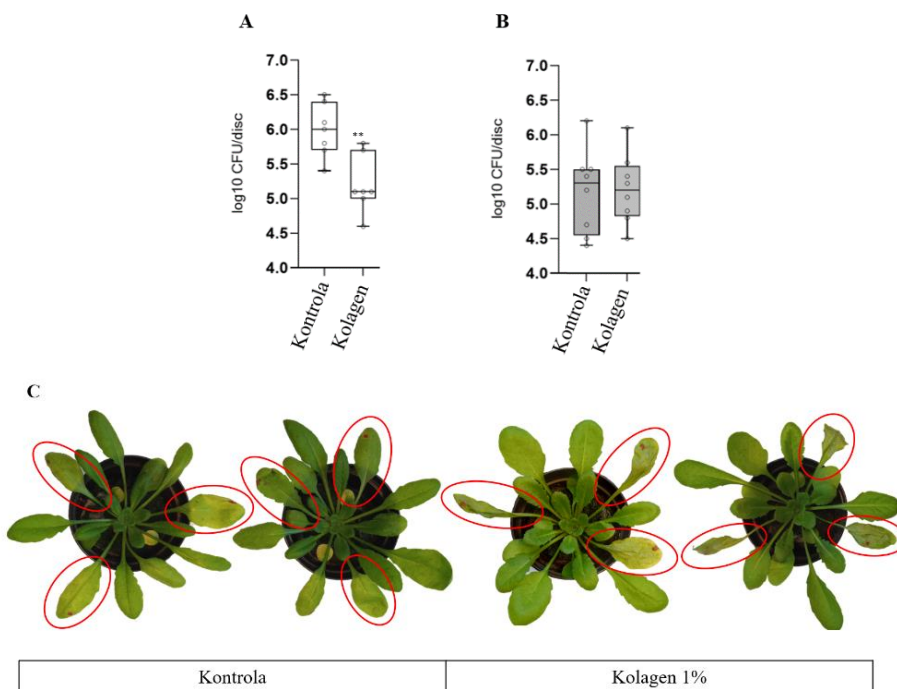


**Obrázek 11: Inhibice klíčících rostlin po ošetření kolagenem.** Čtyřdenní klíčící rostliny *A. thaliana* byly ošetřeny kolagenem, vodou (kontrola) nebo 100 nM flg22 po dobu 7 dnů. Poté byla změřena hmotnost klíčících rostlin. **A** – Klíčící rostliny ošetřeny nedialyzovaným kolagenem. **B** – Klíčící rostliny ošetřeny dialyzovaným kolagenem. U obou grafů hodnoty sloupců znázorňují průměr a chybové úsečky a směrodatnou odchylku z 8 semenáčků. Hvězdičky znázorňují statisticky významné rozdíly mezi ošetřovanými variantami a kontrolou (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ANOVA s následným Dunnettovým testem). **C** – Inhibice růstu v klíčících rostlin v po šetření kolagenem.

#### 4.5 Test rezistence proti bakteriálnímu patogenu *Pst* DC3000 u rostlin ošetřených kolagenem

Pozorovali jsme efekt na aktivitu promotorů a také inhibici růstu způsobenou ošetřením kolagenem, proto jsme se rozhodli analyzovat efekt ošetření kolagenem na rezistenci vůči patogenům. V tomto případě vůči bakteriálnímu patogenu *Pst* DC3000, neboť tento patogen máme v naší laboratoři dostupný a je typickou první volbou pro tento typ experimentů. Test rezistence vůči *Pst* DC3000 byl opakován celkem třikrát, přičemž druhý pokus se nepovedl z důvodu chyby v ředění při nanášení vzorků na plotny, proto jeho

výsledky neuvádíme. Při prvním opakování byla pozorována zvýšená rezistence rostlin po ošetření 1% hydrolyzovaným kolagenem (po dobu 24 h před ošetřením bakterií) (**Obr. 12A**). Ačkoliv fenotypový projev napadení bakterie byl u těchto rostlin silnější než u rostlin neošetřených kolagenem (**Obr. 12C**). Ale koncentrace bakterie v listech byla nižší, protože analýza CFU („*colony forming unit*“; česky kolonie tvořící jednotky) vyšla nižší. Ve druhém (resp. třetím) opakování jsme však tento efekt kolagenu na rezistenci vůči *Pst* DC3000 neprokázali (**Obr. 12B**).

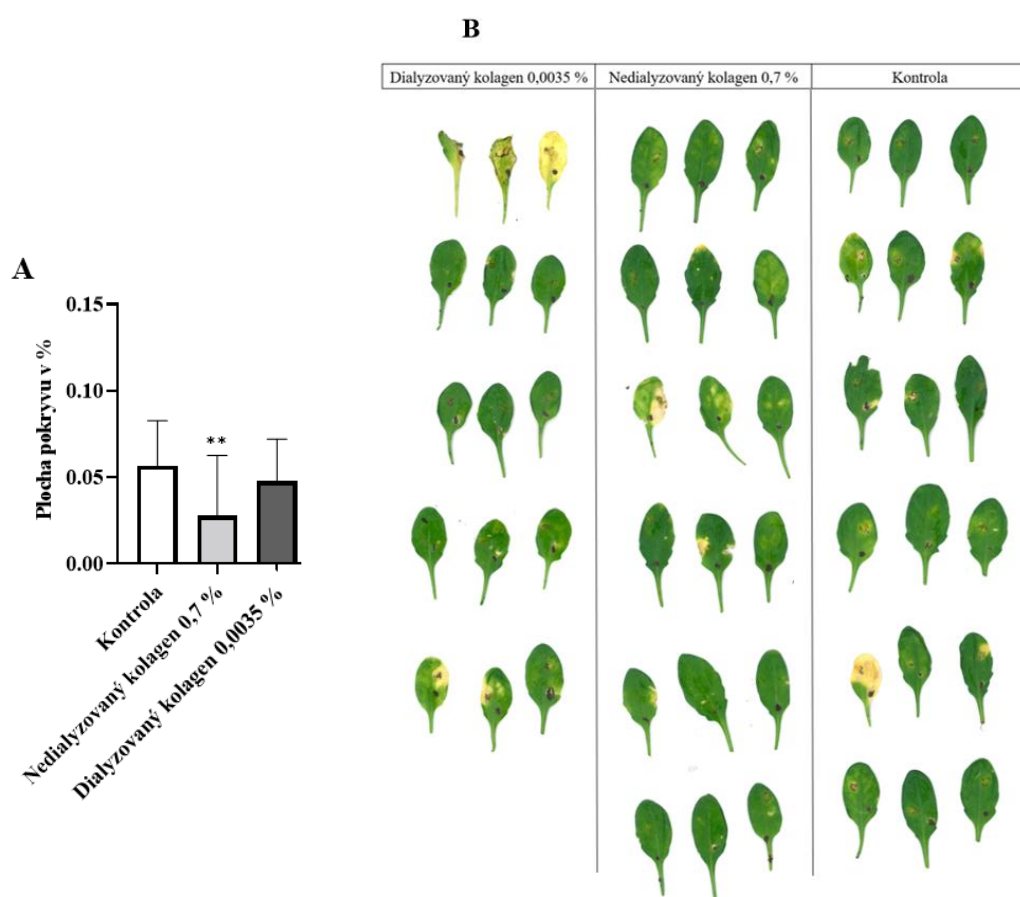


**Obrázek 12: Test rezistence *A. thaliana* vůči *Pst* DC3000 po ošetření kolagenem.** Pětítýdenní rostliny *A. thaliana* pěstované v zemině byly ošetřeny 1% nedialyzovaným kolagenem (nebo vodou, která je uvedena jako kontrola) infiltrací do listu 24 h před inokulací *Pst* DC3000 ( $OD_{600}=0,0005$ ) **A, B** – Sloupce znázorňují průměr hodnot vyjadřující kolonie tvořící jednotky na jeden disk (CFU = „*colony forming units*“). Boxy ukazují 25 a 75 % percentily hodnot, příčná čára znázorňuje medián a chybové úsečky ukazují na krajní hodnoty. Hvězdičky znázorňují statisticky významné rozdíly mezi ošetřovanými variantami a kontrolou \*\*  $p < 0,01$ ; Studentův t-test). **C** – Reprezentativní fotografie demonstrující fenotypový projev napadení bakterie *Pst* DC3000. Ošetřené listy jsou zvýrazněné v červených oválech.



#### 4.6 Test rezistence proti houbovému patogenu *Botrytis cinerea* po ošetření kolagenem

Jako druhý test rezistence proti patogenu jsme vybrali houbový patogen *Botrytis cinerea*, který má oproti *Pst* DC3000 jiný mechanismus infekce rostliny. Kolagenem jsme vždy ošetřovali 24 h před inokulací rostliny *B. cinerea*. Lze vidět že nedialyzovaný kolagen v rostlinách indukuje rezistenci proti patogenu na rozdíl od dialyzovaného. Protože kontrolní ošetření má větší plochu léze způsobenou patogenem (Obr.13A). Srovnání, jak se vyvíjela patogeneze *B. cinerea* (Obr. 13B).



**Obrázek 13: Test rezistence *A. thaliana* vůči *Botrytis cinerea* po ošetření kolagenem.** Šest týdnů staré rostliny *A. thaliana* pěstované v zemině, byly ošetřeny různými koncentracemi kolagenu (nebo vodou, která je uvedena jako kontrola) infiltrací do listu 24 h před inokulací *Botrytis cinerea*. **A** – Hodnoty znázorňují průměrné pokrytí plochy infekce patogenem. Hvězdičky znázorňují statisticky významné rozdíly mezi ošetřovanými variantami a kontrolou (\*\* =  $p < 0,01$ ; ANOVA s následným Dunnetovým testem). **B** – Reprezentativní fotografie demonstrující fenotypový projev napadení bakterie *B. cinerea*

## 5 DISKUZE

Předchozí výsledky našich kolegů z Laboratoře patofyziologie rostlin na Ústavu experimentální botaniky AV ČR, ukázaly, že ošetření řepky olejky odpadem z hydrolyzátů kůží v kožedělném průmyslu (kde se jedná z drtivé většiny o kolagen), zvyšuje rezistenci vůči napadení patogenem (patent č. 305 975). Kolegové, včetně mého školitele, dále pokračovali s výzkumem využívajícím hydrolyzovaný kolagen z krysích ocásků a jejich pokusy naznačily, že by kolagen mohl indukovat rezistenci u rostlin. My jsme se v této práci na zmíněný výzkum rozhodli navázat.

Rostliny u svého imunitního systému velmi spoléhají na přesné a citlivé rozpoznávání cizorodých látek, které se objeví v jejich těle. Kolagen se v rostlinách nevyskytuje, zatímco pro živočichy, a především pro některé druhy, je nepostradatelnou sloučeninou. A výjimkou nejsou ani škůdci rostlin. Takovým příkladem mohou být háďátka, u kterých se nachází v jejich vícevrstvé kutikule (Cox et al., 1981) a je pro ně zásadní evolučně konzervovanou součástí těla. Z toho důvodu se kolagen jeví jako velmi zajímavý kandidát pro rozpoznání rostlinami.

Navíc, jak ukazuje patent našich kolegů, kolagen má velký agronomický potenciál z toho důvodu, že se jedná o velmi snadno dostupnou látku a jejíž cena je nízká. Nevýhodou kolagenu je však to, že není rozpustitelný ve vodě.

V naší práci jsme pracovali s hypotézou, že kolagen vyvolává v rostlinách imunitní odpověď, kdy kolagen by se mohl zařadit mezi molekulární vzory související s útokem patogenu či škůdce.

V dřívější práci kolegové využívali čistý kolagen z krysích ocásků, který hydrolyzovali štěpením trypsinem či kolagenázou. Takto hydrolyzovaný kolagen byl dále hydrolyzován za účelem zbavení se proteolytického enzymu (informace od školitele). V naší práci jsme využívali komerčně dostupný doplněk stravy, sedmkrát hydrolyzovaný hovězí kolagen (4Fitness), který je ve vodě rozpustný a pro screening velmi dobře cenově dostupný. V práci jsme požívali jak dialyzovaný (3,5 kDa membrána), tak nedialyzovaný kolagen. U nedialyzovaného jsme byli schopni docílit ošetření i za vyšší koncentrací kolagenu, zatímco u dialyzovaného je výhodou, že se z roztoku zbavíme malých molekul jako jsou aminokyseliny a velmi krátké peptidy, které by mohly, sami o sobě, působit rostlině stres (např. osmotický).

Díky přechozím studiím, využívajícím při svém výzkumu především modelovou rostlinu *A. thaliana*, známe poměrně detailně molekulární procesy, které rostlina využívá, pokud aktivuje svou imunitu (Ben Khaled et al., 2015). V naší laboratoři máme některé z typických screeningových metod analyzujících aktivitu rostlinné imunity dobře zavedenou u *A. thaliana*. Rozhodli jsme se proto tyto testy využít ke studiu reakce rostliny na kolagen. Analyzovanými událostmi byli: zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), resp.  $H_2O_2$  do mezibuněčného prostoru (apoplastu) (Janda et al., 2019), akumulace kalózy (Kalachova et al., 2020), analýza aktivity promotorů genů souvisejících s imunitou (*pPRI* a *pFRKI*) s využitím GUS analýzy (Janda et al., 2021), inhibice růstu klíčnicích rostlin (Janda et al., 2021) a nakonec jsme testovali rezistenci vůči patogenům (*Pseudomonas syringae* a *Botrytis cinerea*) (Kalachova et al., 2020) po ošetření kolagenem.

### 5.1 Analýza produkce mimobuněčného $H_2O_2$ po ošetření kolagenem

Jako první jsme se zaměřili na jednu z nejrychlejších imunitních odpovědí, která následuje po rozpoznání cizorodé molekuly pomocí receptorů nalézajících se na plasmatické membráně, produkci ROS (Kadota et al., 2015). Jedná se o klasickou screeningovou metodu, která může být velmi dobře využita pro identifikaci nových molekulárních vzorů (Smith & Heese, 2014). Námi zvolená metoda detekce ROS je založena na principu chemické bioluminiscence. Ta vzniká v důsledku reakce luminolu s  $H_2O_2$  (Smith & Heese, 2014). Z našeho měření nevyplývá žádná produkce ROS po ošetření kolagenem (Obr. 4A). Experiment jsme provedli správně, což nám dokazuje zvýšená produkce  $H_2O_2$  po ošetření flg22 (Obr. 4B). Otázkou však zůstává, jestli to, že kolagen nezvyšuje produkci ROS skutečně dokládá, že nemůže aktivovat imunitu. Zvolená metoda analýzy ROS má své výhody, rychlost a cena experimentu, a je vynikající ve chvíli kdy je reakce zaznamenána, protože pozitivní výsledek s velkou pravděpodobností indikuje aktivovanou imunitní odpověď. Nicméně tato metoda má i svá negativa, může jím být senzitivita na danou molekulu, nedostatečná koncentrace rozpoznávané molekuly v apoplastu. To může být způsobeno například nedostatečným průchodem cílové molekuly z roztoku dovnitř rostliny. Citlivost metody také může být způsobena nízkou aktivací této imunitní události a neposlední řadě může kolagen indukovat imunitní události i bez aktivace rychlé transienční produkce ROS. Mohl by například aktivovat až sekundární či terciální produkci ROS (Ngou et al., 2021). V našem případě jsme sledovali produkci ROS po dobu 60 minut od ošetření, sekundární produkce nastává po 2-5 hodinách (Ngou et al., 2021).

Bylo by proto dobré vzít v úvahu jinou techniku, která umožňuje stanovení ROS. Takovou metodou je např. barvení ROS pomocí DAP barviva (Liu et al., 2014). Barvení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bylo v naší laboratoři zprostředkováno mým kolegou Ing. Jhonnym Hernandézem s pozitivním výsledkem, kolagen zvyšoval produkci ROS oproti ošetření vodou (data neukázána, komunikace s Jhonnym Hernandézem). Dále bychom také mohli měřit aktivitu enzymu superoxid dismutázy, která je také za tvorbu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v mimobuněčném prostoru zodpovědná (Holzmeister et al., 2015).

## **5.2 Analýza akumulace kalózy po ošetření kolagenem**

Poté co jsme neviděli žádnou aktivitu, u jedné z nejrychlejších odpovědí, tak jsme se zaměřili naopak na jednu z pomalejších imunitních odpovědí, kterou je hromadění kalózy v buněčné stěně. U této odpovědi je vyžadován delší časový rámeček, než u produkce ROS.

Po ošetření kolagenem po dobu 24 a 48 hodin jsme nepozorovali žádný statisticky výrazný rozdíl mezi ošetřením a kontrolou (Obr. 5A – C) po analýze obrazu. Při ošetření po dobu 48h jsme nepozorovali akumulaci u flg22, který ji prokazatelně způsobuje (Sangi et al., 2023) (Bardoel et al., 2011), což naznačuje chybu v provedení experimentu a je nutné jej zopakovat.

Ačkoliv nebyl prokázán statistický rozdíl mezi kontrolou a ošetřením kolagenem, tak byla kalóza, podle nás, viditelně (okem z fotografie) více akumulovaná po ošetření kolagenem (Obr. 5D). To že nebyl prokázán žádný rozdíl analýzou obrazu, by se dalo vysvětlit, tím že jsme pro analýzu obrazu nezvolili nejméně parametry a bylo by dobré se na vyhodnocení fotografií znovu zaměřit. Vyhodnocení akumulace kalózy pomocí spočítání procentuálního pokryvu plochy nemusí být optimální. Během analýzy kalózy z obrazu je možné, se zaměřit například na počet kalózových bodů stejným způsobem, jako to ve své práci použili Ngou et al. (2021). Současně bychom experiment měli znovu zopakovat, a ještě více se zaměřit při zhotovování mikroskopických snímků na co nejlepší rozlišení snímku.

Lze také položit otázku, zda je ošetření rostlin do listů správné. Námi předpokládaná teorie je, že se rostliny s kolagenem mohly setkat v půdě. Protože víme, že se kolagen přirozeně nachází v kutikule hád'átek (Cox et al., 1981), které s rostlinou interagují v půdě. Je tedy možné, že akumulace kalózy bude v listech slabší než v kořenech. Jelikož by kolagen mohl být elicitor aktivující imunitní odpověď v kořenech.

### 5.3 Analýza aktivity promotorů *pPRI* a *pFRKI* po ošetření kolagenem

Promotory *pPRI* a *pFRKI* jsou součástí genů spojených s imunitní reakcí. PR1 protein patří do rodiny tvořící CAP proteiny, které v rostlině zastávají řadu funkcí. PR1 je považován za protein rostlinami používaný proti houbovým patogenům (Pečenková et al., 2022). Promotor *pFRKI* je aktivován především jako odpověď pro rozpoznání bakteriálního flg22. Tento gen kóduje receptoru podobnou proteinkinázu, která se spouští především v časně imunitní reakci (Kunze et al., 2004). Zajímavé je, že protein FRK1 byl původně spojen se stárnutím rostlin, podle čehož byl také tak nazván „*senescence induced receptor-like kinase*“ (SIRK) (Robatzek & Somssich, 2002).

Oba tyto promotory jsou aktivovány během PTI. V práci (Chen et al., 2018) po ošetření bakteriálním flg22, či elongačním faktorem elf26, byla zaznamenána zvýšená produkce obou genů. K expresi těchto dvou genů dochází v řádu několika hodin od rozpoznání.

V naší laboratoři disponujeme transgenními rostlinami *pFRKI::GUS* (Kunze et al., 2004) a *pPRI::GUS* (Meldau et al., 2014). Gen *PRI* byl také použit při studiu rezistence rostliny *A. thaliana* proti bakteriálnímu patogenu *Pectobacterium carotovorum*. Přitom byl použit, jako marker pro produkci kyseliny salicylové, která může být zodpovědná za následnou produkci BABA, což indukuje rezistenci (Po-Wen et al., 2013). Gen *FRKI* byl použit při identifikaci nového efektoru HopF2 bakteriálního patogenu *Pst* DC3000. Tento efektor potlačuje rozpoznávání MAMPs působením na cytoplazmatickou membránu (Wu et al., 2011).

Analýza aktivity těchto dvou promotorů byla první kladnou odpovědí, kterou jsme pozorovali (když nebudeme počítat naše tvrzení, že si myslíme, že jsme nenastavili šťastně obrazovou analýzu fotografií kalózy, že okem jsme indukci na fotografiích viděli). Jednalo se především o aktivitu promotoru *pFRKI* u rostlin ošetřených do listů, pěstovaných v půdě (Obr. 9). V několika případech se nám ukázala indukce i v kontrolních rostlinách. Důvod proč k tomu došlo nám není zcela zřejmý. Mohlo to způsobit nechtěné poranění v důsledku infiltrace do listů nebo nějaký nechtěný stres vyvolaný v průběhu kultivace rostlin. Nicméně aktivace *pFRKI* byla po ošetření kolagenem konzistentnější než v kontrolních vzorcích. Je také zajímavé, že aktivita promotoru *pPRI* se od sebe liší při ošetření na 6 a na 24 hodin, kdy dochází k větší aktivitě při ošetření na 6 hodin u obou způsobů pěstování (Obr. 6 – 9).

Na základě předpokladu, že se rostliny mohly s kolagenem setkat skrze hád'átka v půdě, jsme se rozhodli vyzkoušet, zda bude aktivita viditelná i při ošetření ke kořenům (tj. do pěstebního média). A žádný efekt viděn nebyl (Obr. 10). Je však zajímavá silná aktivita promotoru *pFRK1* v rostlinách ošetřených i kontrolních, zatímco u *pPRI* jsme nepozorovali u různých aktivit žádnou (Obr 10). V budoucnu by bylo vhodné také analyzovat aktivitu obou genů pomocí transkryptomické analýzy. V úvahu přidá například PCR.

#### **5.4 Analýza inhibice růstu klíčících rostlin po ošetření kolagenem**

Obrana proti rostlinným patogenům je pro rostliny nezbytně nutná. Aktivace obranných mechanismů v rostlině vyžaduje spoustu energie a dochází tak k inhibici růstu rostliny (Wang & Wang, 2014). Inhibice růstu je například typickým projevem při ošetření rostlin flg22. Toho bylo využito při práci Goméz et. al (Gómez-Gómez & Boller, 2000) a při identifikaci nového lokusu FLS2. Dále například při studii transkriptománli regulace FLS2 (Zou et al., 2018), ale také například v práci mého školitele (Janda et al., 2021) týkající se imunitní reakce rostlin na mimobuněčné bakteriální váčky. Lze očekávat, že pokud bude kolagen rostlinami rozpoznávaný a spustí imunitní odpověď, bude viditelná i inhibice růstu.

Po ošetření rostlin kolagenem byla jasně viditelná inhibice, zvyšující se společně s koncentrací kolagenu (Obr. 11). Je však otázkou, zda způsobená inhibice byla imunitního charakteru. Mohlo totiž dojít k působení osmotického stresu, který by byl způsoben například vyšším obsahem aminokyselin. K osmotickému stresu dochází vlivem vysoké koncentrace iontů, a dalších rozpustných látek v půdě, či v našem případě v pěstebním médiu. Dochází tak k odčerpávání vody z rostlinných buněk. Rostliny se tomuto jevu snaží zabránit a dochází tak ke snížení růstu (Zhu et al., 2010). Zajímavé ovšem je, že jsme zaznamenali inhibici růstu i po ošetření dialyzovaným kolagenem, kde je možnost osmotického stresu výrazně nižší a celkově je koncentrace proteinů přibližně 200krát nižší než u nedialyzovaných vzorků.

#### **5.5 Testy rezistence proti patogenům**

Vzhledem k předchozím pozitivním výsledkům analyzujícím aktivitu promotoru *pFRK1*, inhibice růstu, a my věříme i akumulace kaložy, jsme se rozhodli studovat potenciál indukce rezistence ošetření rostlin hovězím hydrolyzovaným kolagenem. Testy rezistence jsou klasickým způsobem testování nových induktorů rezistence. Po ošetření s novým potenciálním induktorem rezistence, jsou rostliny vystavené nejčastěji se vyskytujícím škodlivým organismům. Poté je sledován průběh patogeneze. V našich

experimentech jsme použili bakteriální patogen *P. syringae* a houbový patogen *B. cinerea*.

*P. syringae* je houbový hemibiotrofní patogen, který do rostliny vstupuje skrze otevřené průduchy (Xin et al., 2018), nebo přes poraněná rostlinná pletiva a množí se v mezibuněčných prostorech. Jakmile dojde k dostatečnému namnožení v hostitelském pletivu, způsobuje rozsáhlé nekrózy. Tímto se liší od nekrotrofních patogenů, které způsobují nekrózy již ve svých ranných stádiích (Xin et al., 2018). Takovým je *B. cinerea*, který se striktně řadí mezi nekrotrofní patogeny. Patogeneze začíná vyklíčením spory na povrchu listu a následnému vytvoření apresoria. To při napadení rostliny produkuje široké spektrum enzymů, které degradují buněčnou stěnu a dojde k usmrcení buňky (Xin et al., 2018).

V našich experimentech jsme pozorovali při testu rezistence proti patogenu *Pst* DC3000 při prvním provedení (Obr. 12A). U testu rezistence proti patogenu *B. cinera* byl pozorován snížený rozsah infekce (Obr. 13).

Díky námi provedeným testům přichází v úvahu možnost, že by kolagen mohl indukovat rezistenci proti oběma patogenům. Zajímavý je projev patogeneze *Pst* DC3000, při kterém rostliny ošetřené kolagenem mají horší fenotypový projev, než kontrolní rostliny (Obr. 12C). Důvodem tohoto zhoršeného projevu by mohla být hypersenzitivní odpověď (HR) způsobená kolagenem. V budoucnu se chceme na měření HR, po ošetření kolagenem, zaměřit, a to například kvantifikací množství, do vody vypuštěných, intracelulárních elektrolytů, po ošetření s předpokládaným původcem HR (Johansson et al., 2015).

## 6 ZÁVĚR

- Nepozorovali jsme efekt kolagenu na tvorbu mimobuněčného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Akumulace kalózy nebyla statisticky prokázána, avšak byla viditelná pouhým okem.
- Pozorovali jsme indukci aktivity promotoru genu *pFRK1* po ošetření kolagenem.
- Ukázali jsme, že ošetření klíčnic rostlin kolagenem vede k inhibici růstu *A. thaliana*.
- Testy rezistence proti bakteriálnímu (*Pst* DC3000) i houbovému (*B. cinerea*) patogenu naznačily, že kolagen má potenciál indukovat rezistenci vůči *Pst* DC3000 a *B. cinerea*.

## 7 BIBLIOGRAFIE

- Acevedo, F., Rivera-Vega, L., Chung, S., Ray, S., & Felton, G. (2015). Cues from chewing insects — the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.029>
- Alborn, H., Hansen, T., Jones, T., Bennett, D., Tumlinson, J., Schmelz, E., & Teal, P. (2007). Disulfooxy fatty acids from the American bird grasshopper *Schistocerca americana*, elicitors of plant volatiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(32), 12976-12981. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705947104>
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M., Chiu, W., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F., & Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, 415(6875), 977-983. <https://doi.org/10.1038/415977a>
- Bacic, A., Stone, B., & Fincher, G. (eds.). (2009). *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373971-1.X0001-5>
- Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology*, 20(8), 1163–1178. <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>
- Bardoel, B., van der Ent, S., Pel, M., Tommassen, J., Pieterse, C., van Kessel, K., van Strijp, J., & DeLeo, F. (2011). Pseudomonas Evades Immune Recognition of Flagellin in Both Mammals and Plants. *PLoS Pathogens*, 7(8), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002206>
- Bartels, S., Lori, M., Mbengue, M., van Verk, M., Klauser, D., Hander, T., Boni, R., Robatzek, S., & Boller, T. (2013). The family of Peps and their precursors in Arabidopsis: differential expression and localization but similar induction of pattern-triggered immune responses. *Journal of Experimental Botany*, 64(17), 5309-5321. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert330>
- Ben Khaled, S., Postma, J., & Robatzek, S. (2015). A Moving View: Subcellular Trafficking Processes in Pattern Recognition Receptor–Triggered Plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 379-402. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120347>



- Bent, A., & Mackey, D. (2007). Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), 399-436. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094427>
- Bentham, A., De la Concepcion, J., Mukhi, N., Zdrzałek, R., Draeger, M., Gorenkin, D., Hughes, R., & Banfield, M. (2020). A molecular roadmap to the plant immune system. *Journal of Biological Chemistry*, 295(44), 14916-14935. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010852>
- Bergey, D., Orozco-Cardenas, M., de Moura, D., & Ryan, C. (1999). A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1756-1760. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1756>
- Bisceglia, N., Gravino, M., & Savatin, D. (2015). Luminol-based Assay for Detection of Immunity Elicitor-induced Hydrogen Peroxide Production in Arabidopsis thaliana Leaves. *BIO-PROTOCOL*, 5(24), 1-7. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1685>
- Böhm, H., Albert, I., Fan, L., Reinhard, A., & Nürnberger, T. (2014). Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Current Opinion in Plant Biology*, 20(15), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.007>
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 379-406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Boutrot, F., & Zipfel, C. (2017). Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 257-286. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>
- Braun, U., Shin, H., Takamatsu, S., Meeboon, J., Kiss, L., Lebeda, A., Kitner, M., & Götz, M. (2019). Phylogeny and taxonomy of Golovinomyces orontii revisited. *Mycological Progress*, 18(3), 335-357. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1453-y>
- Burketova, L., Trda, L., Ott, P., & Valentova, O. (2015). Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology Advances*, 33(6), 994-1004. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.004>
- Cammack, R. (ed.). (2011). *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology* (Rev. ed). Oxford University Press.

- Cesari, S. (2018). Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytologist*, 219(1), 17-24. <https://doi.org/10.1111/nph.14877>
- Cohen, Y., Rubin, A., & Kilfin, G. (2010). Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL- $\beta$ -amino-butyric acid (BABA). *European Journal of Plant Pathology*, 126(4), 553-573. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9564-6>
- Cowin, S., & Doty, S. (eds.). (2007). Collagen. In *Tissue Mechanics* (pp. 289-339). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-49985-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-0-387-49985-7_10)
- Cox, G., Kusch, M., & Edgar, R. (1981). Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization. *Journal of Cell Biology*, 90(1), 7-17. <https://doi.org/10.1083/jcb.90.1.7>
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., & Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13454-13459. <https://doi.org/10.1073/pnas.231178298>
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F., & Dewdney, J. (2008). Activation of Defense Response Pathways by OGs and Flg22 Elicitors in Arabidopsis Seedlings. *Molecular Plant*, 1(3), 423-445. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn019>
- Di Pasquale, R., Vaccaro, S., Caputo, M., Cuppari, C., Caruso, S., Catania, A., & Messina, L. (2019). Collagenase-assisted wound bed preparation: An in vitro comparison between *Vibrio alginolyticus* and *Clostridium histolyticum* collagenases on substrate specificity. *International Wound Journal*, 16(4), 1013–1023. <https://doi.org/10.1111/iwj.13148>
- Dixon, M., Jones, D., Keddie, J., Thomas, C., Harrison, K., & Jones, J. (1996). The Tomato Cf-2 Disease Resistance Locus Comprises Two Functional Genes Encoding Leucine-Rich Repeat Proteins. *Cell*, 84(3), 451-459. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81290-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81290-8)
- Donofrio, N., & Delaney, T. (2001). Abnormal Callose Response Phenotype and Hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in Defense-Compromised Arabidopsis nim1-1 and Salicylate Hydroxylase-Expressing Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 14(4), 439-450. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.4.439>

- Doss, R., Oliver, J., Proebsting, W., Potter, S., Kuy, S., Clement, S., Williamson, R., Carney, J., & DeVilbiss, E. (2000). Bruchins: Insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 6218-6223. <https://doi.org/10.1073/pnas.110054697>
- Felton, G., Chung, S., Hernandez, M., Louis, J., Peiffer, M., & Tian, D. (2014). Herbivore Oral Secretions are the First Line of Protection Against Plant-Induced Defences. In C. Voelckel & G. Jander (eds.), C. Voelckel, G. Jander, *Annual Plant Reviews* (47 ed., pp. 37-76). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118829783.ch2>
- Fratzl, P. (2008). *Collagen: structure and mechanics*. Springer.
- Giraldo, M., & Valent, B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 800-814. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3119>
- Gómez-Gómez, L., & Boller, T. (2000). FLS2. *Molecular Cell*, 5(6), 1003-1011. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80265-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80265-8)
- Gómez-Gómez, L., & Boller, T. (2000). FLS2. *Molecular Cell*, 5(6), 1003-1011. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80265-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80265-8)
- Gosset, V., Harmel, N., Gobel, C., Francis, F., Haubruge, E., Wathelet, J., du Jardin, P., Feussner, I., & Fauconnier, M. (2009). Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1231-1240. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp015>
- Govrin, E., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10(13), 751-757. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00560-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00560-1)
- Gozzo, F., & Faoro, F. (2013). Systemic Acquired Resistance (50 Years after Discovery): Moving from the Lab to the Field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(51), 12473-12491. <https://doi.org/10.1021/jf404156x>
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., & Mansfield, J. (2000). The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium

that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal*, 23(4), 441-450. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00804.x>

Greeff, C., Roux, M., Mundy, J., & Petersen, M. (2012). Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Frontiers in Plant Science*, 3, 1-7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00209>

Halitschke, R., Schittko, U., Pohnert, G., Boland, W., & Baldwin, I. (2001). Molecular Interactions between the Specialist Herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and Its Natural Host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty Acid-Amino Acid Conjugates in Herbivore Oral Secretions Are Necessary and Sufficient for Herbivore-Specific Plant Responses. *Plant Physiology*, 125(2), 711-717. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.711>

Hind, S., Strickler, S., Boyle, P., Dunham, D., Bao, Z., O'Doherty, I., Baccile, J., Hoki, J., Viox, E., Clarke, C., Vinatzer, B., Schroeder, F., & Martin, G. (2016). Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nature Plants*, 2(9), 1-8. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.128>

Holzmeister, C., Gaupels, F., Geerlof, A., Sarioglu, H., Sattler, M., Durner, J., & Lindermayr, C. (2015). Differential inhibition of Arabidopsis superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 989-999. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru458>

Huffaker, A., & Ryan, C. (2007). Endogenous peptide defense signals in Arabidopsis differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10732-10736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703343104>

Hummelbrunner, L., & Isman, M. (2001). Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 715-720. <https://doi.org/10.1021/jf000749t>

Chen, Z., Wang, J., Li, Y., Zhong, Y., Liao, J., Lu, S., Wang, L., Wang, X., & Chen, S. (2018). Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* activates defense via gene regulation of salicylic acid and jasmonic acid signaling in Arabidopsis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103(103), 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.04.006>

Choi, H., & Klessig, D. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*, 16(1), 2-10. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0921-2>

- Choi, H., & Klessig, D. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0921-2>
- Choi, J., Tanaka, K., Cao, Y., Qi, Y., Qiu, J., Liang, Y., Lee, S., & Stacey, G. (2014). Identification of a Plant Receptor for Extracellular ATP. *Science*, *343*(6168), 290-294. <https://doi.org/10.1126/science.343.6168.290>
- Jacobs, A., Lipka, V., Burton, R., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., & Fincher, G. (2003). An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *The Plant Cell*, *15*(11), 2503-2513. <https://doi.org/10.1105/tpc.016097>
- Jamieson, P., Shan, L., & He, P. (2018). Plant cell surface molecular cypher: Receptor-like proteins and their roles in immunity and development. *Plant Science*, *274*(247), 242-251. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.030>
- Janda, M., Lamparová, L., Zubíková, A., Burketová, L., Martinec, J., & Krčková, Z. (2019). Temporary heat stress suppresses PAMP-triggered immunity and resistance to bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, *20*(7), 1005-1012. <https://doi.org/10.1111/mpp.12799>
- Janda, M., Ludwig, C., Rybak, K., Meng, C., Stigliano, ,, Botzenhardt, L., Szulc, B., Menke, F., Malone, J., Brachmann, A., & Robatzek, S. (2021). Biophysical and proteomic analyses suggest functions of *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 extracellular vesicles in bacterial growth during plant infection. *bioRxiv: The preprint for biology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2021.02.08.430144>
- Johansson, O., Nilsson, A., Gustavsson, M., Backhaus, T., Andersson, M., & Ellerström, M. (2015). A quick and robust method for quantification of the hypersensitive response in plants. *PeerJ*, *3*(3), 1-21. <https://doi.org/10.7717/peerj.1469>
- Jonak, C. (2002). Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*(5), 415-424. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00285-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00285-6)
- Jones, J., & Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

- Kadota, Y., Shirasu, K., & Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant and Cell Physiology*, 56(8), 1472-1480. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv063>
- Kalachova, T., Janda, M., Šašek, V., Ortmannová, J., Nováková, P., Dobrev, I., Kravets, V., Guivarc'h, A., Moura, D., Burketová, L., Valentová, O., & Ruelland, E. (2020). Identification of salicylic acid-independent responses in an Arabidopsis phosphatidylinositol 4-kinase beta double mutant. *Annals of Botany*, 125(5), 775-784. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz112>
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. (2002). The Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas Syringae Interaction. *The Arabidopsis Book*, 1(0039), 764-767. <https://doi.org/10.1199/tab.0039>
- Koen, E., Trapet, P., Brulé, D., Kulik, A., Klinguer, A., Atauri-Miranda, L., Meunier-Prest, R., Boni, G., Glauser, G., Mauch-Mani, B., Wendehenne, D., & Besson-Bard, A. (2014).  $\beta$ -Aminobutyric Acid (BABA)-Induced Resistance in Arabidopsis thaliana: Link with Iron Homeostasis. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 27(11), 1226-1240. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-14-0142-R>
- Kohler, A., Schwindling, S., & Conrath, U. (2002). Benzothiadiazole-Induced Priming for Potentiated Responses to Pathogen Infection, Wounding, and Infiltration of Water into Leaves Requires the NPR1/NIM1 Gene in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 128(3), 1046-1056. <https://doi.org/10.1104/pp.010744>
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., Postel, S., Arents, M., Jeworutzki, E., Al-Rasheid, K., Becker, D., & Hedrich, R. (2010). Perception of the Arabidopsis Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor AtPEPR1 and Its Close Homologue AtPEPR2. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), 13471-13479. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.097394>
- Kuč, J. (1987). Translocated Signals for Plant Immunization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 494(1), 221-223. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb29529.x>
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G. (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *The Plant Cell*, 16(12), 3496-3507. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026765>

- Lamparová, L. (2017). První vlna obrany v rostlinách vůči napadení patogeny a možnosti jejího sledování. *Bioprospect*, 27(1), 13-18. [http://bts.vscht.cz/sites/default/files/Bioprospect\\_1\\_2017\\_3.pdf](http://bts.vscht.cz/sites/default/files/Bioprospect_1_2017_3.pdf)
- Latunde-Dada, ., O'connell, ., Nash, ., & Lucas, . (1999). Stomatal penetration of cowpea (*Vigna unguiculata* ) leaves by a *Colletotrichum* species causing latent anthracnose. *Plant Pathology*, 48(6), 777-784. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00405.x>
- Lia, A., Gallo, A., Marti, L., Roversi, P., & Santino, A. (2019). EFR-Mediated Innate Immune Response in *Arabidopsis thaliana* is a Useful Tool for Identification of Novel ERQC Modulators. *Genes*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.3390/genes10010015>
- Lim, G., Shine, M., de Lorenzo, L., Yu, K., Cui, W., Navarre, D., Hunt, A., Lee, J., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2016). Plasmodesmata Localizing Proteins Regulate Transport and Signaling during Systemic Acquired Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe*, 19(4), 541-549. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.006>
- Li, P., Lu, Y., Chen, H., & Day, B. (2020). The Lifecycle of the Plant Immune System. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39(1), 72-100. <https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1757829>
- Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., Fan, F., Wang, J., Jin, C., Chang, J., Zhou, J., & Chai, J. (2012). Chitin-Induced Dimerization Activates a Plant Immune Receptor. *Science*, 336(6085), 1160-1164. <https://doi.org/10.1126/science.1218867>
- Liu, Y., Offler, C., & Ruan, Y. (2014). A simple, rapid, and reliable protocol to localize hydrogen peroxide in large plant organs by DAB-mediated tissue printing. *Frontiers in Plant Science*, 5(5), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00745>
- Macho, A., & Zipfel, C. (2015). Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Current Opinion in Microbiology*, 23(23), 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.10.009>
- Malinovsky, F., Fangel, J., & Willats, W. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 5(5), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00178>
- Marcec, M., Gilroy, S., Poovaiah, B., & Tanaka, K. (2019). Mutual interplay of Ca<sup>2+</sup> and ROS signaling in plant immune response. *Plant Science*, 283, 343-354. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.004>

- Ma, S., Lapin, D., Liu, L., Sun, Y., Song, W., Zhang, X., Logemann, E., Yu, D., Wang, J., Jirschitzka, J., Han, Z., Schulze-Lefert, P., Parker, J., & Chai, J. (2020). Direct pathogen-induced assembly of an NLR immune receptor complex to form a holoenzyme. *Science*, 370(6521), 1-10. <https://doi.org/10.1126/science.abe3069>
- Matušinsky, P. (2019). *Obrana rostlin proti houbovým patogenům*. Česká technologická platforma pro zemědělství. Retrieved 2023-03-06, from <https://www.ctpz.cz/vyzkum/obrana-rostlin-proti-houbovym-patogenum-851>
- Meldau, S., Kästner, J., von Knorre, D., & Baldwin, I. (2014). Salicylic acid-dependent gene expression is activated by locomotion mucus of different molluscan herbivores. *Communicative & Integrative Biology*, 7(3). <https://doi.org/10.4161/cib.28728>
- Melotto, M., Underwood, W., & He, S. (2008). Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 101-122. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.121107.104959>
- Mendgen, K., & Deising, H. (1993). Infection structures of fungal plant pathogens – a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist*, 124(2), 193-213. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03809.x>
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2008). Recognition of Herbivory-Associated Molecular Patterns. *Plant Physiology*, 146(3), 825-831. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113118>
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., & Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19613-19618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705147104>
- Monaghan, J., & Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 349-357. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.006>
- Newman, M. (1995). Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* Induces Defense-Related Gene Expression in *Brassica campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(5). <https://doi.org/10.1094/MPMI-8-0778>



- Newman, M., Sundelin, T., Nielsen, J., & Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00139>
- Ngou, B., Ahn, H., Ding, P., & Jones, J. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature*, 592(7852), 110-115. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03315-7>
- Nguyen, Q., Iswanto, A., Son, G., & Kim, S. (2021). Recent Advances in Effector-Triggered Immunity in Plants: New Pieces in the Puzzle Create a Different Paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ijms22094709>
- Pearce, G., Moura, D., Stratmann, J., & Ryan, C. (2001). Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature*, 411(6839), 817-820. <https://doi.org/10.1038/35081107>
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., & Ryan, C. (1991). A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science*, 253(5022), 895-897. <https://doi.org/10.1126/science.253.5022.895>
- Pečenková, T., Pejchar, P., Moravec, T., Drs, M., Haluška, S., Šantrůček, J., Potocká, A., Žárský, V., & Potocký, M. (2022). Immunity functions of Arabidopsis pathogenesis-related 1 are coupled but not confined to its C-terminus processing and trafficking. *Molecular Plant Pathology*, 23(5), 664-678. <https://doi.org/10.1111/mpp.13187>
- Peng, Y., van Wersch, R., & Zhang, Y. (2018). Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 31(4), 403-409. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0145-CR>
- Peterková, P., & Lapčík, (Jr), L. (2000). Kolagen - vlastnosti, modifikace a aplikace. *Chemické listy*, 94(6), 371 ñ 379. <http://chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2501>
- Pieterse, C., Zamioudis, C., Berendsen, R., Weller, D., Van Wees, S., & Bakker, P. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

- Po-Wen, C., Singh, P., & Zimmerli, L. (2013). Priming of the Arabidopsis pattern-triggered immunity response upon infection by necrotrophic *Pectobacterium carotovorum* bacteria. *Molecular Plant Pathology*, *14*(1), 58-70. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00827.x>
- Pozo, M., Van Der Ent, S., Van Loon, L., & Pieterse, C. (2008). Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, *180*(2), 511-523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02578.x>
- Robatzek, S., & Somssich, I. (2002). Targets of At WRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes & Development*, *16*(9), 1139-1149. <https://doi.org/10.1101/gad.222702>
- Ryan, C., & Narváez-Vásquez, J. (2004). The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta*, *218*(3), 360-369. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1115-3>
- Sabol, P., & Pilátová, J. (2020). Jak funguje imunita u rostlin?. *Živa*, (1), 17-19. <https://ziva.avcr.cz/2020-1/jak-funguje-imunita-u-rostlin.html>
- Sangi, S., Olimpio, G., Coelho, F., Alexandrino, C., Da Cunha, M., & Grativol, C. (2023). Flagellin and mannitol modulate callose biosynthesis and deposition in soybean seedlings. *Physiologia Plantarum*, *175*(2), 1433–1444. <https://doi.org/10.1111/pp1.13877>
- Seong, S., & Matzinger, P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *4*(6), 469-478. <https://doi.org/10.1038/nri1372>
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., Lâ€™Haridon, F., & MÃ©traux, J. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *5*(1-18), 1-18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00274>
- Shoulders, M., & Raines, R. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, *78*(1), 929-958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
- Schäfer, M., Meza-Canales, I., Navarro-Quezada, A., Brütting, C., Vanková, R., Baldwin, I., & Meldau, S. (2015). Cytokinin levels and signaling respond to wounding and the perception of herbivore elicitors in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Integrative Plant Biology*, *57*(2), 198-212. <https://doi.org/10.1111/jipb.12227>

- Schenk, S., & Schikora, A. (2015). Staining of Callose Depositions in Root and Leaf Tissues. *BIO-PROTOCOL*, 5(6), 1-4. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1429>
- Schmelz, E. (2015). Impacts of insect oral secretions on defoliation-induced plant defense. *Current Opinion in Insect Science*, 9(9), 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.002>
- Schmelz, E., Carroll, M., LeClere, S., Phipps, S., Meredith, J., Chourey, P., Alborn, H., & Teal, P. (2006). Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(23), 8894-8899. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602328103>
- Sillero, J., Rojas-Molina, M., Avila, C., & Rubiales, D. (2012). Induction of systemic acquired resistance against rust, ascochyta blight and broomrape in faba bean by exogenous application of salicylic acid and benzothiadiazole. *Crop Protection*, 34(34), 65-69. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.001>
- Smith, J., & Heese, A. (2014). Rapid bioassay to measure early reactive oxygen species production in Arabidopsis leaf tissue in response to living *Pseudomonas syringae*. *Plant Methods*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-6>
- Song, Y., Ye, M., Li, C., Wang, R., Wei, X., Luo, S., & Zeng, R. (2013). Priming of Anti-Herbivore Defense in Tomato by Arbuscular Mycorrhizal Fungus and Involvement of the Jasmonate Pathway. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 1036-1044. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0312-1>
- Souza, C., Li, S., Lin, A., Boutrot, F., Grossmann, G., Zipfel, C., & Somerville, S. (2017). Cellulose-Derived Oligomers Act as Damage-Associated Molecular Patterns and Trigger Defense-Like Responses. *Plant Physiology*, 173(4), 2383-2398. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01680>
- Stuart, J. (2015). Insect effectors and gene-for-gene interactions with host plants. *Current Opinion in Insect Science*, 9(9), 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.010>
- Šašek, V., Janda, M., Delage, E., Puyaubert, J., Guivarc'h, A., López Maseda, E., Dobrev, P., Caius, J., Bóka, K., Valentová, O., Burketová, L., Zachowski, A., & Ruelland, E. (2014). Constitutive salicylic acid accumulation in pi4k III  $\beta 1\beta 2$  Arabidopsis plants stunts rosette but not root growth. *New Phytologist*, 203(3), 805-816. <https://doi.org/10.1111/nph.12822>

- Šašek, V., Nováková, M., Dobrev, P., Valentová, O., & Burketová, L. (2012).  $\beta$ -aminobutyric acid protects Brassica napus plants from infection by *Leptosphaeria maculans*. Resistance induction or a direct antifungal effect?. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 279-289. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9897-9>
- Tang, J., Han, Z., Sun, Y., Zhang, H., Gong, X., & Chai, J. (2015). Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase PEPR1. *Cell Research*, 25(1), 110-120. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.161>
- Thor, K., Jiang, S., Michard, E., George, J., Scherzer, S., Huang, S., Dindas, J., Derbyshire, P., Leitão, N., DeFalco, T., Köster, P., Hunter, K., Kimura, S., Gronnier, J., Stransfeld, L., Kadota, Y., Bücherl, C., Charpentier, M., Wrzaczek, M. et al. (2020). The calcium-permeable channel OSCA1.3 regulates plant stomatal immunity. *Nature*, 585(7826), 569-573. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2702-1>
- Toruño, T., Stergiopoulos, I., & Coaker, G. (2016). Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1), 419-441. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100204>
- Trdá, L., & Janda, M. (2016). Rostlinná imunita. In *Bioprospect: bulletin Biotechnologických společností v České republice a Slovenské republice* (pp. 20-24). Biotechnologická společnost.
- Underwood, W. (2012). The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. *Frontiers in Plant Science*, 3(3), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00085>
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., & Ryals, J. (1994). Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction. *The Plant Cell*, 6(7), 959-965. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.7.959>
- Vlot, A., Dempsey, D., & Klessig, D. (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 177-206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Voigt, C. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science*, 5(5), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00168>

- Walters, D., Ratsep, J., & Havis, N. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, *64*(5), 1263-1280. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert026>
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P., Abumrad, N., Sama, A., & Tracey, K. (1999). HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice. *Science*, *285*(5425), 248-251. <https://doi.org/10.1126/science.285.5425.248>
- Wang, J., & Chai, J. (2020). Structural Insights into the Plant Immune Receptors PRRs and NLRs. *Plant Physiology*, *182*(4), 1566-1581. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01252>
- Wang, W., & Wang, Z. (2014). At the Intersection of Plant Growth and Immunity. *Cell Host & Microbe*, *15*(4), 400-402. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.03.014>
- Willmann, R., Lajunen, H., Erbs, G., Newman, M., Kolb, D., Tsuda, K., Katagiri, F., Fliegmann, J., Bono, J., Cullimore, J., Jehle, A., Götz, F., Kulik, A., Molinaro, A., Lipka, V., Gust, A., & Nürnberger, T. (2011). Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(49), 19824-19829. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112862108>
- Wink, M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*, *75*(2), 225-233. <https://doi.org/10.1007/BF00303957>
- Wittstock, U., & Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*(4), 300-307. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00264-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00264-9)
- Wu, J., & Baldwin, I. (2010). New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores. *Annual Review of Genetics*, *44*(1), 1-24. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163500>
- Wu, S., Peiffer, M., Luthe, D., Felton, G., & Feldlaufer, M. (2012). ATP Hydrolyzing Salivary Enzymes of Caterpillars Suppress Plant Defenses. *PLoS ONE*, *7*(7), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041947>

- Wu, S., Lu, D., Kabbage, M., Wei, H., Swingle, B., Records, A., Dickman, M., He, P., & Shan, L. (2011). Bacterial Effector HopF2 Suppresses Arabidopsis Innate Immunity at the Plasma Membrane. *Molecular Plant-Microbe Interactions*<sup>®</sup>, 24(5), 585-593. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0150>
- Xin, X., Kvitko, B., & He, S. (2018). Pseudomonas syringae: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316-328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>
- Yamaguchi, Y., Pearce, G., & Ryan, C. (2006). The cell surface leucine-rich repeat receptor for At Pep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), 10104-10109. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603729103>
- Yeats, T., & Rose, J. (2013). The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiology*, 163(1), 5-20. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222737>
- Yi, M., & Valent, B. (2013). Communication Between Filamentous Pathogens and Plants at the Biotrophic Interface. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 587-611. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172916>
- Yoshinaga, N., Aboshi, T., Abe, H., Nishida, R., Alborn, H., Tumlinson, J., & Mori, N. (2008). Active role of fatty acid amino acid conjugates in nitrogen metabolism in Spodoptera litura larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(46), 18058-18063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809623105>
- Yuan, M., Jiang, Z., Bi, G., Nomura, K., Liu, M., Wang, Y., Cai, B., Zhou, J., He, S., & Xin, X. (2021). Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature*, 592(7852), 105-109. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03316-6>
- Yuan, M., Ngou, B., Ding, P., & Xin, X. (2021). PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 62(62), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102030>
- Zangerl, A., & Rutledge, C. (1996). The Probability of Attack and Patterns of Constitutive and Induced Defense: A Test of Optimal Defense Theory. *The American Naturalist*, 147(4), 599-608.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., Chen, S., Tang, X., & Zhou, J. (2007). A Pseudomonas syringae Effector Inactivates

- MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe*, 1(3), 175-185. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.03.006>
- Zhang, Z., Bi, Y., Ge, Y., Wang, J., Deng, J., Xie, D., & Wang, Y. (2011). Multiple pre-harvest treatments with acibenzolar-S-methyl reduce latent infection and induce resistance in muskmelon fruit. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.024>
- Zhu, J., Hasegawa, P., Bressan, R., & Bohnert, H. (2010). Molecular Aspects of Osmotic Stress in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16(3), 253-277. <https://doi.org/10.1080/07352689709701950>
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell*, 125(4), 749-760. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.037>
- Zou, Y., Wang, S., Zhou, Y., Bai, J., Huang, G., Liu, X., Zhang, Y., Tang, D., & Lu, D. (2018). Transcriptional Regulation of the Immune Receptor FLS2 Controls the Ontogeny of Plant Innate Immunity. *The Plant Cell*, 30(11), 2779-2794. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00297>