

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium mechanismu působení vybraných elicitinů na
modelové rostlině *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Jarmila Králíková**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.**
Konzultant : Mgr. Tereza Jendrišáková
Rok: 2016

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 6.5.2016

Velmi ráda bych poděkovala především paní doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D za příjemné a odborné vedení, konzultace a poskytnutí potřebných materiálů pro vypracování teoretické a experimentální části předložené práce.

Dále bych ráda poděkovala slečně Mgr. Tereze Jendrišákové za pomoc, ochotu a trpělivost při vypracování experimentální části bakalářské práce, doc. RNDr. Barboře Mieslerové, PhD. za kultivaci patogenu a následnou inokulaci rostlin a také všem zaměstnancům katedry biochemie za vstřícný přístup během zpracování experimentální části práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jarmila Králíková
Název práce	Studium mechanismu působení vybraných elicitinů na modelové rostlině <i>Solanum lycopersicum</i> cv. MicroTom
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Lenka Luhová, Ph.D
Konzultant	Mgr. Tereza Jendrišáková
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Elicitory jsou důležité signální molekuly, které se uvolňují v rámci interakce mezi rostlinou a patogenem. Početnou skupinou elicitorů jsou tzv. elicitiny, malé proteiny produkované oomycetami rodu *Phytophthora* a *Pythium*. Cílem této bakalářské práce bylo stanovit rezistenci/citlivost modelové rostliny *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom vůči patogenu *Oidium neolycopersici*. Tento genotyp lze zařadit mezi středně rezistentní genotypy podobně jako *S. chmielewski*. Následně byl testován vliv aplikace vybraných elicitinů (infestin, kryptogein, oligandrin) na aktivaci obranných mechanismů vedoucí k ovlivnění rychlosti vývoje patogenu *O. neolycopersici*. Po aplikaci elicitinů, zejména oligandrinu a kryptogeinu byl u genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom pozorován rychlejší vývoj patogenních struktur. V rámci pilotních experimentů, vybraných s cílem seznámit se s širokou škálou biochemických metod používaných v rámci studia obranných mechanismů rostlin, byly detekovány změny peroxidasové aktivity (metodou nativní elektroforézy, spektrofotometrie), aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR), exprese genu pro GSNOR a změny v produkci Hsp 70 metodou Western blot, v listech *S. lycopersicum* cv. MicroTom po elicitaci a následné inokulaci patogenem *O. neolycopersici*.

Elicitiny, infestin, kryptogein, oligandrin, ROS, RNS, peroxidasa, S-nitrosoglutathionreduktasa, *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom,

Klíčová slova	<i>Oidium neolycopersici</i>
Počet stran	89
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Jarmila Králíková
Title	Study of selected elicitin's influence mechanisms on model plant <i>Solanum lycopersicum</i> cv. MicroTom
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. Lenka Luhová, Ph.D
Consultant	Mgr. Tereza Jendrišáková
Year of production	2016

Abstract

Elicitors are important signalling molecules, which are produced within plant-pathogen interactions. Large group of elicitors are elicitins, small proteins produced by *Phytophthora* and *Phytium* oomycetes. The aim of this bachelor thesis was to define resistance/sensitivity of the model plant *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom against the pathogen *Oidium neolycopersici*. This genotype can be included into group of genotypes with moderate resistance, as *S. chmielewskii*. Effects of the application of selected elicitins (infestin, cryptogein, oligandrin) on activation of defence mechanisms, which lead to modulation of the speed of pathogen development were tested. After elicitin application, mainly oligandrin and cryptogein, faster pathogen development was observed. Within the first experiments, selected with the aim to learn a wide range of biochemical methods, changes in peroxidase activity (by native electrophoresis and spectrophotometry), in S-nitrosogluthation reductase(GSNOR) activity, gene expression of GSNOR, and changes in Hsp70 production, using Western blot, were detected in *S. lycopersicum* cv. MicroTom, after elicitation and subsequent inoculation with *Oidium neolycopersici*.

Keywords	Elicitins, infestin, kryptogein, oligandrin, ROS, RNS, peroxidasa, S-nitrosogluthationreduktase (GSNOR), <i>Solanum lycopersicum</i> cv. MicroTom, <i>Oidium neolycopersici</i>
Number of pages	89
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Abiotické, biotické a antropogenní stresové faktory rostlin	2
2.1.2	Rostlinné patogeny a jejich průnik do organismu	4
2.1.3	Základní obranné mechanismy rostlin	4
2.1.4	Obranná odpověď na stresový faktor	5
2.1.5	Přirozená obrana vůči patogenům	5
2.1.6	Přehled obranných reakcí v rostlinné buňce	6
2.1.7	Rostlinná imunita	7
2.2	Charakterizace patogenního organismu <i>Oidium neolycopersici</i>	8
2.2.1	Původ patogenu	8
2.2.2	Morfologická charakteristika <i>Oidium neolycopersici</i>	9
2.2.3	Hostitelský rozsah patogenu	11
2.2.4	Symptomy onemocnění	11
2.2.5	Infekční cyklus <i>Oidium neolycopersici</i>	12
2.2.6	Ochrana rostlin před patogenem v zemědělství	12
2.3	Mechanismy obranné reakce po infekci patogenem <i>Oidium neolycopersici</i>	13
2.3.1	Intraspecifická variabilita patogenu	13
2.3.2	Nehostitelská rezistence	13
2.3.3	Hostitelská rezistence	14
2.3.4	Obranné reakce rostlin vůči <i>Oidium neolycopersici</i>	15
2.3.5	Úloha reaktivních forem kyslíku v obranných mechanismech rostlin v reakci na patogeny	17
2.3.5.1	Produkce ROS	18
2.3.5.2	Odbourávání ROS	19
2.3.6	Úloha reaktivních forem kyslíku v obranných mechanismech <i>Solanum</i> spp. v reakci na <i>Oidium neolycopersici</i>	21
2.3.7	Úloha reaktivních forem dusíku v obranných mechanismech rostlin v reakci na patogeny	23
2.3.7.1	Produkce NO a RNS	23
2.3.7.2	Odbourávání NO a RNS	25
2.3.8	Regulace homeostázy NO	26
2.3.9	Interakce mezi NO a ROS	28
2.3.10	Produkce reaktivních forem dusíku v obranných mechanismech <i>Solanum</i> spp. v reakci na <i>Oidium neolycopersici</i>	29
2.4	Obecná charakterizace elicitorů	29
2.4.1	Elicitory	29
2.4.2	Klasifikace elicitorů	30
2.4.3	Elicitiny	33
2.4.4	Aplikace elicitorů v zemědělství a biotechnologiích	36
2.5	Mechanismy obranné reakce aktivované elicitory	36
2.5.1	Elicitorová signální transdukce	36
2.5.2	MAPK signalizace	38
2.5.3	GTP-vazebné proteiny	38
2.5.4	Iontové toky a signalizace Ca ²⁺	39
2.5.5	H ⁺ /ATPasa	40

2.5.6	Inositol-1,4,5-trifosfáty a cyklické nukleotidy	41
2.5.7	Kyselina salicylová, kyselina jasmonová, ethylen, kyselina abscisová	41
2.5.8	Aktivace obranných genů rostlin	42
3.	Experimentální část	45
3.1	Použité chemikálie	45
3.2	Přístroje a experimentální vybavení	45
3.3	Rostlinný materiál	46
3.4	Patogen	46
3.5	Metody	47
	Příprava listových disků pro fytopatologickou studii citlivosti/rezistence rajčatového genotypu	
3.5.1	<i>S. lycopersicum</i> cv. MicroTom vůči patogenu <i>Oidium neolyopersici</i> Příprava rostlinného materiálu - elicitace listů	47
3.5.2	s následnou inokulací patogenem <i>Oidium neolyopersici</i>	47
3.5.3	Fytopatologické zhodnocení vývoje patogenu <i>O. neolyopersici</i> Příprava extraktů z listů rajčete <i>Solanum lycopersicum</i> cv. MicroTom pro elektroforetickou detekci peroxidasy	47
3.5.4	a pro spektrofotometrické měření peroxidasové aktivity	48
3.5.5	Detekce peroxidasové aktivity metodou nativní gelové elektroforézy	48
3.5.6	Měření peroxidasové aktivity	49
3.5.7	Měření obsahu proteinů v extraktu metodou Bradfordovou	49
3.5.8	Detekce Hsp70 a GSNOR metodou Western blot	49
3.5.8.1	Příprava vzorků pro SDS-PAGE	49
3.5.8.2	SDS-PAGE	49
3.5.9	Imunodetekce	50
3.5.10	Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR Příprava extraktů z listů rajčete <i>Solanum lycopersicum</i> cv. MicroTom	51
3.5.10.1	pro spektrofotometrické měření aktivity GSNOR	51
3.5.10.2	Měření enzymové aktivity GSNOR	52
3.5.11	Izolace a purifikace RNA z rostlinného materiálu	52
3.5.12	Měření koncentrace RNA po izolaci	53
3.5.13	Reverzní transkripce	53
3.5.14	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	53
4.	Výsledky a diskuze	55
	Fytopatologická studie stanovení citlivosti/rezistence	
4.1	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. MicroTom na <i>Oidium neolyopersici</i> Vliv elicitinů na vývoj patogenu <i>Oidium neolyopersici</i>	55
4.2	na listech <i>Solanum lycopersicum</i> cv. MicroTom	60
4.3	Vliv elicitinů na produkci a aktivitu peroxidasy	63
4.4	Vliv aplikace elicitinů na produkci Hsp70 Vliv aplikace elicitinů na expresi genu pro S-nitrosoglutathionreduktasu	68
4.5	a na aktivitu tohoto enzymu	70
5.	Závěr	73
6.	Literatura	75
7.	Seznam použitých zkratk	87

CÍLE PRÁCE

1. Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši zaměřenou na charakterizaci obranných mechanismů rostlin v průběhu infekce biotrofním patogenem *Oidium neolycopersici* a v reakci na přítomnost elicitinů produkovaných oomycetami rodu *Phytophthora* a *Pythium*.

2. V experimentální části práce bylo cílem:
 - 2.1. Stanovení citlivosti/rezistence genotypu *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom vůči biotrofnímu patogenu *O. neolycopersici*. Porovnání s genotypy *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*.

 - 2.2. Testování vlivu aplikace vybraných elicitinů (infestin, kryptogein, oligandrin) na posílení odolnosti genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom vůči infekci biotrofním patogenem *O. neolycopersici* na základě charakterizace vývoje patogenních struktur.

 - 2.3. Studium vlivu aplikace vybraných elicitinů na aktivaci obranných mechanismů
 - 2.3.1. Detekce aktivity peroxidas
 - 2.3.2. Produkce Hsp70
 - 2.3.3. Detekce aktivity a exprese S-nitrosoglutathionreduktasy

1. ÚVOD

Oidium neolycopersici je biotrofní patogen z oddělení *Ascomycota*, řádu *Erysiphales* a rodu *Oidium*. Během dvacátého století se tento patogen vlivem transportu a přežívání na alternativních hostitelích rozšířil z Austrálie do Evropy, Asie, Severní a Jižní Ameriky, ale také v posledních letech byl nalezen i v jižní Africe. *Oidium* parazituje především na rostlinné čeledi *Solanum spp.* a *Brassicaceae*. Tento patogenní organismus způsobuje rozsáhlé hospodářské škody v oblasti zemědělství, které zároveň vedou k významným ekonomickým ztrátám. Na pracovišti Katedry biochemie ve spolupráci s Katedrou botaniky Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci je intenzivně studovaná interakce *Solanum spp.* a *O. neolycopersici* včetně obranných mechanismů rezistence. V současnosti jsou řešené projekty zaměřeny na studium úlohy ROS a RNS v obranném mechanismu hostitelské rostliny v průběhu patogenese a na možnost aktivace obranných mechanismů aplikací proteinových elicitorů, tzv. elicitinů, vedoucí k ovlivnění vývoje patogenních struktur.

Elicitiny jsou 98 kDa proteiny původem z oomycet rodu *Phytophthora* a *Pythium*, které po aplikaci v průběhu rostlinno – patogenní interakce mohou u rostlin aktivovat řadu obranných dějů již v nízkých koncentracích. Po rozpoznání patogenu produkujícího elicitinu dochází u napadené rostliny k rychlé mobilizaci rozsáhlé sítě signálních drah včetně iontových kanálů, GTP-vazebných kanálů a kinas, kdy následně dochází k přenosu elicitinového signálu na další přenašeče, a poté je takto amplifikovaný signál využitý např. pro fosforylace defosforylace proteinů v buňce, regulaci homeostázy vápenatých iontů, produkci a ukládání fytoalexinů, produkci ROS a RNS včetně aktivace antioxidačních mechanismů a v neposlední řadě také aktivaci exprese obranných genů rostlin. Aplikace elicitorů může aktivovat obranné mechanismy rostliny a tak se podílet na zvýšení rezistence určitého druhu rostlin vůči patogenu, který je přirozeně atakuje, což vede k možnosti studia uplatnění těchto látek v biotechnologiích, např. při výrobě biologicky aktivních látek s ochranným potenciálem.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1.1 Abiotické, biotické a antropogenní stresové faktory rostlin

Rostlina se v průběhu svého života setkává s řadou vnějších příznivých i nepříznivých podmínek, na které odpovídajícím způsobem aktivně reaguje a také je zároveň ovlivňuje. Protože Země poskytuje velice různorodé prostředí pro život, lze tyto podmínky rozdělit do dvou základních skupin: fyzikálně-geografické a půdně-klimatické. Obě tyto skupiny zahrnují faktory jako zeměpisnou polohu, jež určuje délku dne, která se v průběhu roku cyklicky mění, proudění vzduchu a mořských proudů a také geologické podloží (Pavlová, 2006).

S těmito podmínkami souvisí stres, což je stav, ve kterém je rostlina nucena aktivovat obranné mechanismy pro přežití vůči řadě nepříznivých až extrémních faktorů, které na ni působí. Tyto faktory (stresory) je možné rozdělit do dvou velkých skupin: abiotické a biotické (Obr. 1). Dle Kolaříka *et al.* (2003) je možné rozdělit abiotické stresové faktory do dvou tříd na základě jejich charakteru:

Do skupiny **fyzikálních faktorů** patří:

- vysoká nebo naopak nízká teplota (horko, chlad, mráz)
- nedostatek světla nebo naopak nadměrné ozáření (UV)
- mechanické působení větru

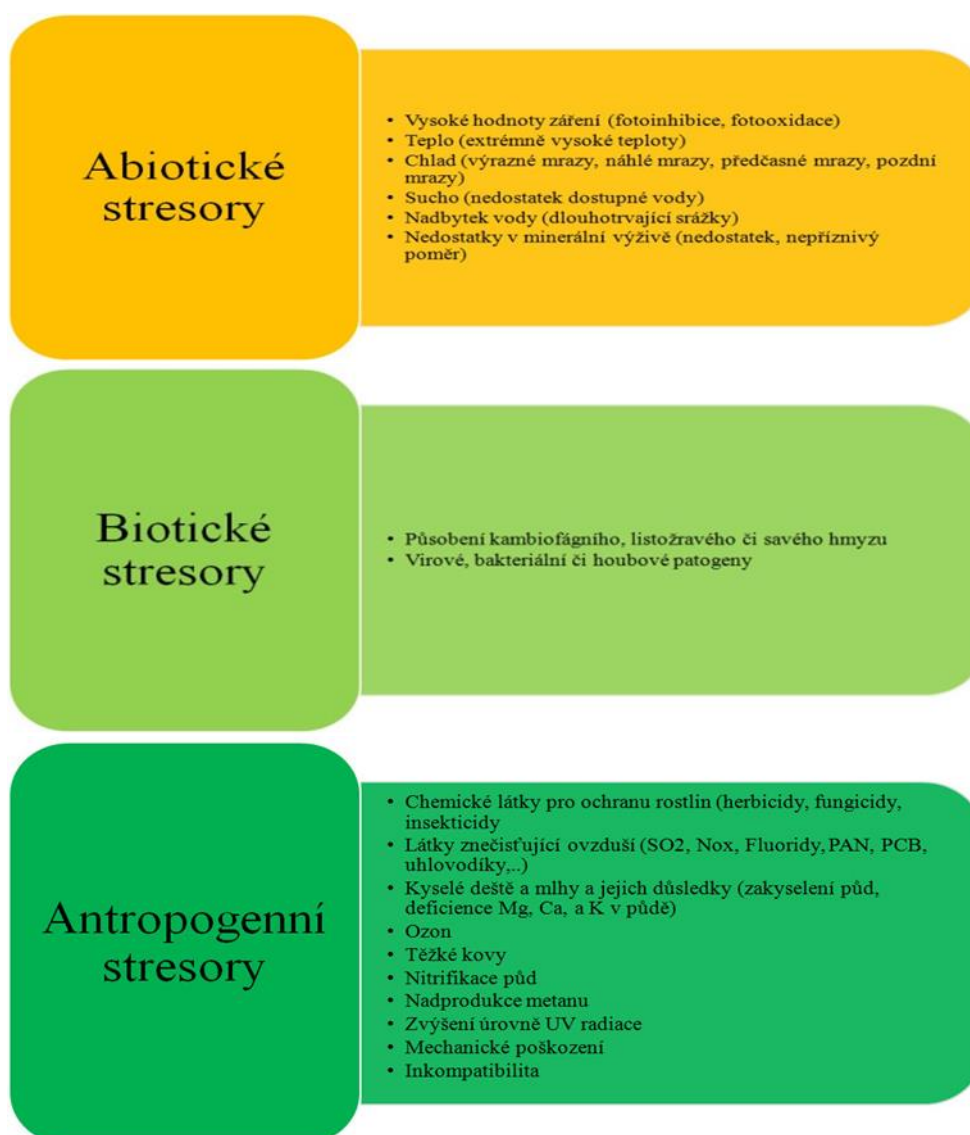
Do skupiny **chemických faktorů** řadíme:

- nedostatek vody v půdním prostoru a v čase (sucho)
- nedostatek půdního vzduchu
- nevyhovující skladba půd (nízké množství minerálních látek v půdě, překyselení/alkalizace půd)
- kontaminace půdy (přítomnost toxických látek ve vzduchu, vodě či půdě)
- zasolení půdy (zimní údržba komunikací)

Za odnož abiotických faktorů se považují **antropogenní stresové faktory**. Jedná se o působení látek, které se činností člověka významně podílí na znečištění životního prostředí. Jsou to například herbicidy, pesticidy, insekticidy, těžké kovy anebo další chemikálie, které se zemědělskou nebo průmyslovou činností dostávají do půdy, vody případně vzduchu. Častým antropogenním faktorem je v současné době vliv chloridu sodného, který má lokální vliv na kvalitu půdy ve vzdálenosti několika metrů od pozemní komunikace při zimním posypu. Způsobuje hlavně zvýšení pH, vyplavování půdních iontů a rozrušování půdní struktury. Nepříznivě na kvalitu půd působí také

nedostatek humusu (živin) při současném nedostatku vody. Většina půd má proto dnes antropogenní původ (Kolařík *et al.*, 2003).

Stresové faktory, které působí zpravidla současně, velmi často způsobují poškození buněčných proteinů, lipidů či nukleových kyselin a vlivem toho dochází k nezvratným trvalým následkům, které mohou vest až k buněčné smrti (Piterková *et al.*, 2005). Pro rostlinu je komplikované vyhnout se stresovým faktorům, protože nemá tu možnost uniknout z dosahu stresoru a také má velmi různorodé buňky a pletiva, ve kterých vlivem stresorů dochází ke značnému kolísání fyzikálních a biochemických procesů (Lutts a Kinet, 1998).



Obr. 1: Přehled abiotických, biotických a antropogenních stresových faktorů (přepřacováno z Kolařík *et al.*, 2010).

2.1.2 Rostlinné patogeny a jejich průnik do organismu

Jako rostlinné patogeny se označují takové organismy, které prožijí celý svůj život, nebo alespoň část života v blízkém kontaktu s rostlinou, kterou poškozují a zároveň na úkor rostliny získávají různé výhody, přičemž výsledkem jejich působení mohou být různé rostlinné choroby. Nejčastějšími rostlinnými patogeny jsou viry, bakterie, hlístice, houby, hmyz a býložravci. Často tyto parazity působí na danou rostlinu současně (Pavlová, 2006).

Průnik patogenu do rostliny má zpravidla tři fáze. První z nich je infekce (patogen vstoupí do rostliny skrz průduchy, lenticely nebo poškození buněčné stěny), poté nastává fáze kolonizace (patogen využívá energetické zdroje a metabolity rostliny pro svůj život) a konečnou fází je reprodukce, kdy se patogen rozmnožuje uvnitř rostliny a způsobuje onemocnění (Pavlová, 2006). Patogen, který parazituje jen na živých buňkách, bývá označován jako biotrofní, zatímco hemibiotrofní patogen usmrcuje buňku až po určité době, kdy na ní parazituje. Nekrotrofní patogeny zničí buňku velmi rychle a živí se jejími zbytky (Thomma *et al.*, 2001).

2.1.3. Základní obranné mechanismy rostlin

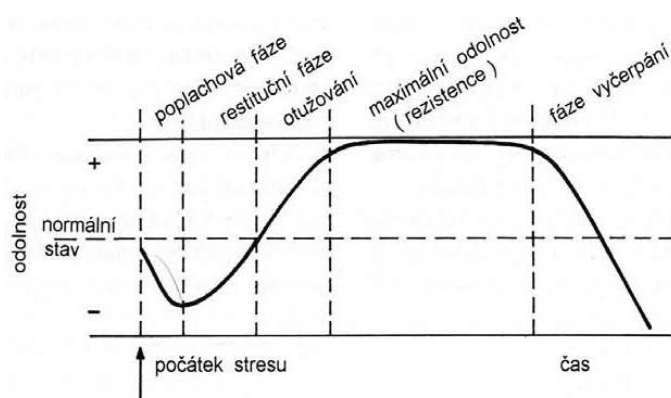
V průběhu evoluce i v průběhu svého života se rostlina snaží vytvářet si obranyschopnost (rezistenci) vůči nepříznivým podmínkám. Rezistence zahrnuje avoidanci a toleranci. Avoidance znamená, že se rostlina snaží zabránit interakci s patogenem a předcházet tak biotickému stresu např. tvorbou kutikuly specifického složení, vývojem specifického typu kořenového systému, tvorbou proti průduchové dutiny, vytvořením speciálních dormantních orgánů apod. Tyto specifické znaky jsou podmíněné geneticky a projeví se tak i na rostlině, která není aktuálně vystavena stresu. V průběhu ontogeneze si rostlina vytváří schopnost adaptace, která je projevem změny na úrovni fenotypu při dlouhodobé stresové zátěži. Jedná se například o opad listů při nedostatku vody, prodloužení internodií u rostlin, které jsou zastíněné porostem atd. (Gaspar *et al.*, 2002; Pavlová, 2006).

Dalším komplexem obranných reakcí, které vytváří rezistenci, je tolerance. Tolerance se projevuje jako aktivní schopnost rostliny odolávat určitému stresoru. Postupný proces získávání tolerance se označuje jako otužování, neboli aklimace, jehož výsledkem jsou reverzibilní krátkodobě získané vlastnosti (Gaspar *et al.*, 2002). Všechny rostliny zároveň produkují sekundární metabolity, z nichž některé mohou být toxické. Pokud se takový metabolit přenesl v dostatečné koncentraci na jinou rostlinu

a začne ji ovlivňovat, tak se tento jev nazývá alelopatie - např. u trav a jetelovin (Procházka, 1988; Kincl a Krpeš, 1993).

2.1.4 Obranná odpověď na stresový faktor

Stresová reakce, která vede k toleranci, probíhá v několika fázích (Obr. 2). Počáteční první fází je fáze poplachová, kdy rostlina rozpozná stresor, který narušuje vnitřní buněčné struktury a jejich správné funkce. Následně je prostřednictvím signálních drah přenesen signál k dalším buněčným složkám, dojde ke změnám v expresi genů a poté se šíří signál do zbývajících částí rostliny. Jako další následuje fáze restituční, kdy rostlina aktivně reaguje na stresor svými obrannými mechanismy, aby mohla přežít při nepříznivých podmínkách. Poslední je fáze rezistence, kdy rostlina vlivem otužení toleruje přítomnost stresoru a přežívá, dokud nejsou vyčerpány dostupné zdroje energie (Pavlová, 2006). Pokud stresor působí dlouhodobě, dochází ještě k fázi vyčerpání (Procházka *et al.*, 1998).



Obr. 2: Idealizovaný průběh stresové reakce (převzato z Procházka *et al.*, 1998).

Celkový průběh této odpovědi na stresový faktor závisí zejména na charakteru daného stresoru, rozsahu odchylky od normálních funkcí rostliny, na době působení a rychlosti nástupu a účinku stresoru, a mimo jiné i na genotypu, fyziologickém stavu rostliny a jejím stupni vývoje. Mezi nejčastější projevy reakce na stres patří přechodné, nebo trvalé zastavení růstu, nebo naopak zvýšená růstová aktivita (Bray *et al.*, 2000).

2.1.5 Přirozená obrana vůči patogenům

Primární přirozenou ochranu zajišťují krycí pletiva rostlin a sekundární metabolity. Svrchní vrstvu rostliny tvoří kutikula tvořená kutinem, vosky a epidermis. Pro lepší ochranu se vytváří na svrchní vrstvě trichomy, které obsahují sekundární metabolity,

vnitřní vrstva může být zpevněna buněčnými vrstvami tvořenými suberinem, ligninem či vrstvami sklerenchymu. Druhotné ochranné pletivo, které vzniká činností buněk primárního pletiva je felogen, jehož buňky tvoří korek. Kořeny rostlin jsou vůči patogenům chráněny rhizodermis, kterou tvoří buňky impregnované suberinem (Pavlová, 2006; Marek *et al.*, 2008).

Jako sekundární krycí pletivo kořenů je označován periderm, který se tvoří u druhotně tloustnoucích orgánů, ale i v místech poranění. Pro zahojení ran způsobených patogeny slouží pryskyřice, což jsou z chemického hlediska terpeny a aromáty, a další ochranné sekundární metabolity. Tyto látky označované jako inhibitory či fytoncidy zároveň zajišťují i preventivní ochranu před patogeny, protože jsou pro ně toxické. Z chemického hlediska mají velmi různý charakter (terpenoidy, flavonoidy, alkaloidy, isoprenoidy...) a jsou uloženy ve vakuolách či trichomech (Pavlová, 2006; Ryplová, 2014).

2.1.6 Přehled obranných reakcí v rostlinné buňce

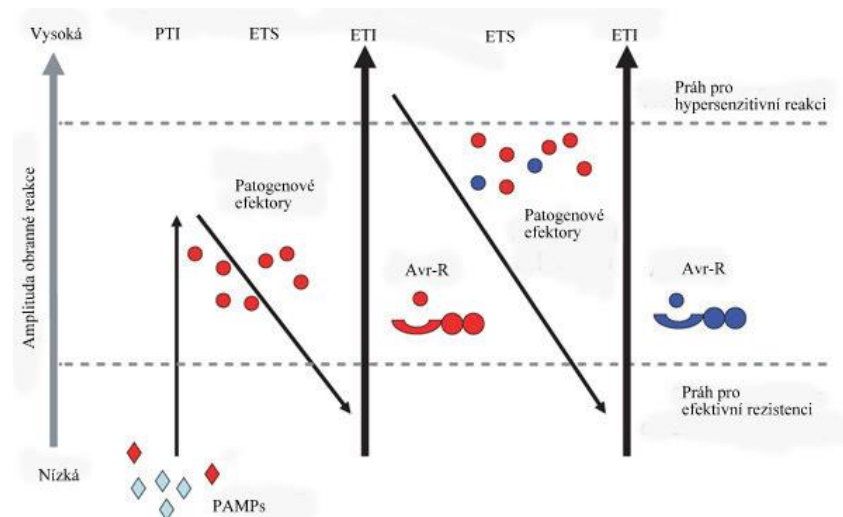
Obranné reakce rostlin jsou komplexními procesy, které probíhají variabilními mechanismy na mnoha úrovních. Zahrnují posilování mechanických bariér, vytváření nevýhodných podmínek pro patogen a poškození patogenu. Dochází také k transkripci genů, které jsou nezbytné pro vznik obranných sekundárních metabolitů, jako jsou fenolové sloučeniny, obecně alkaloidy, terpenoidy a fenyylpropanoidy (Mishra *et al.*, 2011). Dále je možné detekovat změny v produkci aktivních forem kyslíku, transportu iontů přes membrány a také aktivaci enzymů nutných pro syntézu ligninu buněčné stěny (Kazan *et al.*, 2012; Choudhury *et al.*, 2013).

Mezi obranné procesy je možné zařadit aktivaci NADPH oxidasy (EC 1.6.3.1), enzymu katalyzujícímu vznik superoxidu O_2^- , který se v reakci katalyzované superoxidodismutase (EC 1.15.1.1.) dále přeměňuje na peroxid vodíku a ten se následně podílí na tvorbě ligninu a zpevňování buněčné stěny, což je důležité pro mechanickou odolnost vůči patogenu (Sattler a Funnell-Harris, 2013). Rostlina reaguje na napadení virem nebo houbou tvorbou polysacharidu kalosy, která zamezuje šíření viru a průniku houbové hyfy. Významná je také produkce PGIP proteinů (polygalacturonase-inhibiting proteins), které inhibují polygalakturonasy (EC 3.2.1.15) patogenu, které se podílí na degradaci buněčné stěny hostitelské buňky. Důležitá je také produkce enzymů chitinas a glukanas, prostřednictvím kterých rostlina rozkládá buněčnou stěnu patogenních hub (Luna *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2012).

Již v prvních minutách po infekci patogenem je možné zaznamenat zvýšení hladiny superoxidu a peroxidu vodíku, který je schopen se přeměnit na hydroxylový radikál poškozující následně patogen. Zvýšená produkce ROS může spustit hypersenzitivní reakci (HR), kdy v důsledku rychlé smrti buněk v místě napadení rostliny patogenem je zamezeno šíření patogenu dále do organismu. Obranné reakce se aktivují zpočátku v místě infekce, následně v rámci pletiva, ale i orgánu a po několika dnech v celé rostlině – tento stav se označuje jako získaná systémová rezistence (SAR, *systemic acquired resistance*) (Pavlová, 2006; Thakur a Sohal, 2013).

2.1.7 Rostlinná imunita

Existují dva typy imunitních systémů rostlin, které navzájem spolupracují. Jeden využívá transmembránové receptory, které rozpoznávají struktury spojené s patogenem (PRRS) pro rozpoznání mikrobiálních či patogenních molekulárních struktur (MAMPs a PAMPs) – např. flagelin. Druhý typ imunitního systému se uplatňuje uvnitř buněk, hlavní funkci mají tzv. NB-LRR proteiny, které jsou kódovány specifickými rostlinnými R geny rezistence. Sekvence R proteinu značené jako LRR (*leucine-rich-repeats*) jsou bohaté především na leucin nebo jiné hydrofobní aminokyseliny, zároveň ale obsahují NBS (*nucleotide-binding-site*) sekvence, které jsou schopné vázat nukleotidy. NB-LRR proteiny jsou schopné rozpoznávat patogenní efekty z různých říší a navozovat podobné imunitní odpovědi. Tato vyvinutá rezistence platí ale pouze vůči obligátním biotrofním či pouze hemibiotrofním patogenům, vůči nekrotrofům se tato rezistence nevyvinula (Jones a Dangl, 2006; Zipfel a Felix, 2005). Princip vytváření a fungování rostliny popisuje tzv. “zig-zag“ model (Obr. 3).



Obr. 3: „Zig-zag“ model, který zobrazuje princip rostlinné imunity (převzato z: Jones a Dangl , 2006).

První fáze tvorby rostlinné imunity spočívá v tom, že patogeny, které napadají rostlinu, mají na svém povrchu vázány typické molekulární struktury tzv. PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), na které rostlina reaguje pomocí PRRs receptorů (*pattern recognition receptors*), což v konečném důsledku vyvolává u rostlin imunitu PTI (*pathogen-triggered immunity*), která může zastavit kolonizaci patogenu. Ve druhé fázi efekторы patogenů následně interferují s PTI, přičemž výsledkem je efektorově vyvolaná citlivost ETS (*effector-triggered susceptibility*). V následující fázi jeden z NB-LRR proteinů specificky rozezná efekторы, což nakonec vyústí v efektorově vyvolanou imunitu ETI. ETI je v podstatě zrychlená a zesílená PTI, vyvolávající hypersenzitivní reakci (HR) a rezistenci na chorobu. V poslední fázi se patogeny snaží vyhnout ETI odtržením nebo střídáním rozpoznávacího efektorového genu, nebo získáním dalších efektorů pro potlačení ETI (Jones a Dangl, 2006; Schwessinger *et al.*, 2008; Stotz *et al.*, 2014).

2.2. Charakterizace patogenního organismu *Oidium neolycopersici*

3.2.1 Původ patogenu

Oidium neolycopersici patří do říše hub z oddělení vřeckovýtrusných hub (*Ascomycota*) a spadá do řádu *Erysiphales* a rodu *Oidium* (Jones *et al.*, 2001). Jedná se o houbu, která způsobuje rozsáhlé epidemie na široké škále rostlinných druhů, přičemž nejčastěji parazituje právě na rajčeti (*Solanum spp.*) a způsobuje infekci zvanou rajčatové padlí (Ridout, 2009). První rozsáhlé epidemie rajčat vlivem tohoto patogenu byly

zaznamenány od roku 1980 v Západní Evropě, Severní a Jižní Americe, Asii a také dokonce v Jižní Africe (Kiss *et al.*, 2001; Lebeda *et al.* 2015). V Asii se podle dochovaných herbářských vzorků vyskytl tento patogen v roce 1947, nicméně podrobněji byl zkoumán až od 80. let minulého století, kdy se projevil rozsáhlé epidemie, pravděpodobně vlivem transportu rostlin, rozptýlení konidií pomocí vzduchu a jejich následného přežívání na alternativních hostitelích. Až dosud v Africe nebyla houba *O. neolycopersici* důvodem obav ze strany zemědělců a zahrádkářů, protože v této oblasti nezpůsobovala významné ekonomické ztráty, byl hlášen pouze jeden případ jejího výskytu a to v Tanzánii (Kiss *et al.*, 2001).

Od brzkého podzimu roku 2013 se projevila infekce padlí na polních rajčatech v Jižní Africe (Lebeda *et al.*, 2015). V této oblasti parazituje na rajčatech patogen *Leveillula taurica*, nicméně v tomto případě byly symptomy epifytní infekce odlišné, proto další morfologické a mikroskopické studie prokázaly, že se jedná o patogen *O. neolycopersici* (Braun a Cook, 2012).

Již v roce 1888 vědci Cooke a Massee objevili v Austrálii nový druh padlí, který byl později pojmenován jako *O. lycopersicum* (Noordeloos a Loerakker, 1989) a to na základě morfologických a molekulárních dat. Kiss *et al.* (2001) následně rozeznali původní druh padlí, zaznamenaných na rajčatech v Austrálii (*Oidium subgen. Reticuloidium*), od těch druhů, které byly zodpovědné za infekci rajčat v Evropě, Severní a Jižní Americe, Asii a jižní Africe a tento druh byl nazvaný *Oidium neolycopersici* (řazený jako *Oidium subgen. Pseudoidium*) (Kiss *et al.*, 2001).

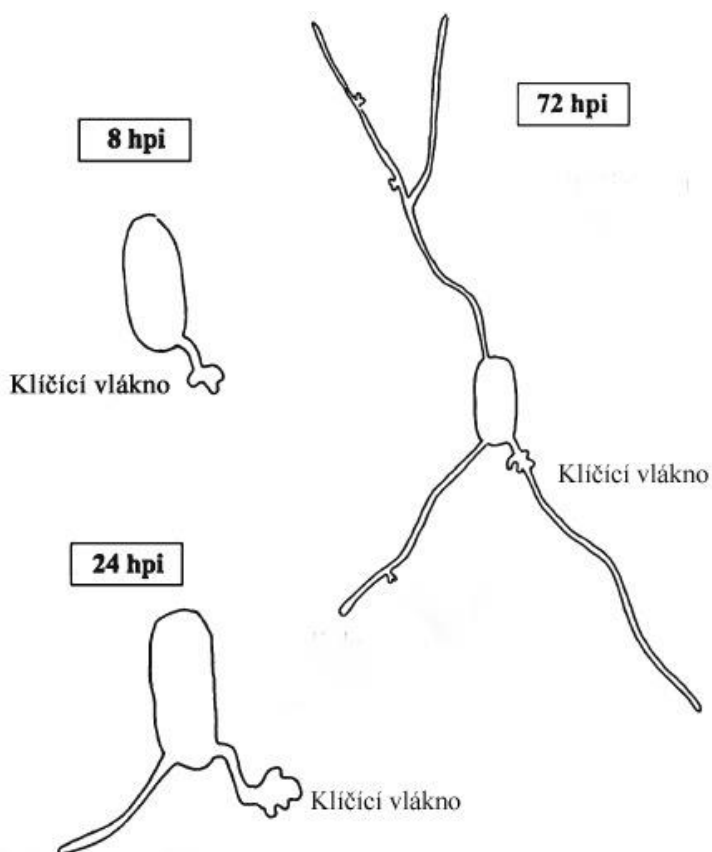
Teleomorf (stádium, kdy se houba pohlavně rozmnožuje) tohoto patogenu nebyl doposud nalezený, nicméně na základě experimentálních metod, jako je světelná mikroskopie, skenovací elektronová mikroskopie, ITS sekvenční analýza byl tento patogen zařazen do rodu *Erysiphe* (Jones *et al.*, 2001).

2.2.2 Morfologická charakteristika *Oidium neolycopersici*

Pro tento patogen je typické, že vytváří na povrchu listů, stonků, řapíků a v některých případech dokonce plodin bílé povlaky mycelia. Identifikace přesného druhu bývá ale složitá a to zejména v případě, že dosud známé informace o konidiogenesi patogenu společně s nově vznikajícími epidemiemi bývají často protichůdné, zejména za nepřítomnosti jakéhokoliv známého teleomorfu (Jankovics *et al.*, 2008).

O. neolycopersici tvoří charakteristické elipsoidní spory o průměrných rozměrech 30 µm x 15 µm. Povrch těchto spor je pokrytý nepravidelnými stužkovitými strukturami. Při klíčení se objeví klíční vlákno, které se postupně prodlužuje na špičce až do lalokovitého uspořádání (Obr. 4). Spojením tří buněk epidermu vzniká apresoriální struktura, z jejíhož centra vzniká klíční vlákno pronikající do hostitele, které zanechává po sobě otvor po vniknutí o průměru 0,2 µm (Jones *et al.*, 2001).

V případě velmi rychlé kolonizace hostitelské rostliny se hyfy šíří z konidia a primárního apresoria do hostitele. Sekundární apresorium vzniká buď samostatně, nebo párově z hyfy, která se postupně větví na povrchu napadené rostliny. Jak už bylo uvedeno, pohlavní životní cyklus u *O. neolycopersici* doposud nebyl nalezen, ovšem nepohlavní životní cyklus je kompletní díky uspořádání konidiofor, které leží kolmo vůči pletivu hostitele. Navíc *O. neolycopersici* vytváří konidie buď samostatně, nebo v pseudořetězcích, které jsou tvořené 2-6 konidii, oproti tomu australský druh *O. lycopersici* vytváří konidie pouze v řetězcích (Jones *et al.*, 2001).



Obr. 4: Schématický vývoj *Oidium neolycopersici* v průběhu 8, 24 a 72 hpi na listech citlivého genotypu *Solanum lycopersicum* (převzato od Mieslerová a Lebeda, 2010).

2.2.3 Hostitelský rozsah patogenu

O. neolycopersici je obligátní biotrofní patogen, který napadá přibližně 60 druhů rostlin a to zejména zástupce čeledi *Solanaceae* a *Cucurbitaceae*. V roce 1988 zjistil Fletcher *et al.* že *O. neolycopersici* napadl všechny testované druhy rajčat a k tomu ještě tabák, lilek a brambory. Výzkumem hostitelské škály patogenu se zabýval ve větším rozsahu Whipps *et al.* (1998), který testoval především hospodářsky významné hostitele a zjistil, že pro *O. neolycopersici* existuje široká škála alternativních hostitelů z třinácti čeledí. Názory ohledně hostitelského rozsahu tohoto patogenu se velmi liší. Některé výzkumy založené na umělých inokulacích značí, že *O. neolycopersici* je polyfágní, zatímco jiné výzkumy na základě experimentů potvrzují pouze několik málo dalších hostitelů kromě rajčete. Experimentálně bylo zjištěno, že *O. neolycopersici* není schopen infikovat rostliny z čeledi brukvovitých *Brassica oleracea var. botrytis*, *B. oleracea var. capitata*, *Compositae (Asteraceae)*, *Leguminoseae (Phaseolus lunatus, Pisum sativum)* a *Poaceae (Zea mays, Triticum aestivum)* (Corbaz, 1993; Arredondo *et al.*, 1996, Whipps *et al.*, 1998).

Velmi zajímavé jsou výzkumy realizované na rostlinách čeledi *Solanaceae*, které prokázaly existenci úplně rezistentních genotypů *Ancistus parviflorus*, *Atropa sp.*, *Browalia sp.*, mnoho členů *Capsicum spp.*, *Hyoscyamus albus*, *H. niger*, některé druhy rodu *Solanum (S. rostratum, S. labrum, S. macrocarpon...)*. Dále následují středně rezistentními genotypy *Datura metaloides*, *Lycium sp.*, *Physalis alkekengi*, *P. minima* a některé druhy *Solanum* (Fletcher *et al.*, 1988; Arredondo *et al.* 1996).

2.2.4 Symptomy onemocnění

První projevy infekce se obvykle objevují začátkem léta, výjimečně se mohou objevit také koncem jara. U napadených rostlin je možné pozorovat bílé puchýřky na horní straně listů, které se často šíří na stonky a řapíky listů (Obr. 5). U mladých listů se infekce zpravidla neprojevuje. Kolonie vzniklého padlí mají zpočátku v průměru 3-10 mm a nakonec splývají v mycelium, které pokrývá celý list. Infikované části rostliny také často světlají, rostliny předčasně stárnou a rostou pomaleji, což je možné pozorovat zejména u skleníkových plodin (Whipps *et al.*, 1998; Mieslerová a Lebeda, 1999).



Obr. 5: Příznaky infekce padlí způsobené *Oidium neolycopersici* (Lebeda *et al.* 2015).

2.2.5 Infekční cyklus *Oidium neolycopersici*

Klíčení konidií patogenu *O. neolycopersici* bylo pozorováno mezi 3-6. hodinou po inokulaci (hpi) patogenu na listy rajčete (Lebeda *et al.*, 2002; Mlíčková *et al.*, 2004;). Byla popsána ložiska extracelulární matrix (ECM) ležící pod klíčky a hyfami patogenu, tj. okolo okrajů apresoria v místě vniknutí do hostitele. Tato ložiska se nevyskytují pod neklíčícími sporami. ECM zároveň usnadňuje adhezi patogenu k rostlině a poskytuje prostředí pro lokalizaci enzymů zapojených do proniknutí patogenu do hostitele (Jones *et al.*, 2001). K úspěšné adhesi na hostitele pomáhají také dimerní transmembránové proteiny zvané integriny, které mají také rozpoznávací funkci, účastní se organizace cytoskeletu a intracelulární signalizace u mikrobiálních a živočišných systémů. Mimo to se integriny uplatňují také u specifických interakcí patogenních hub a jejich hostitelů, kde vyvolávají kaskády signálních reakcí (Bendel a Hostetter, 1993; Corrêa *et al.*, 1996).

Při proniknutí patogenu do hostitele vznikne hladký otvor, což v případě *O. neolycopersici* znamená, že patogen musí při proniknutí vyvinout mechanickou sílu. Tohoto procesu se účastní enzym kutinasa (EC 3.1.1.74), což se projeví zvýšením aktivity tohoto enzymu. Klíčovou roli při vytváření tlaku nutného pro mechanickou sílu hrají apresoria *O. neolycopersici*, která vyvíjí turgorový tlak okolo 3 MPA 11 hpi (Pryce-Jones *et al.*, 1999).

2.2.6 Ochrana rostlin před patogenem v zemědělství

Pro ochranu ekonomicky významných zemědělských plodin, které napadá *O. neolycopersici* se používají fungicidy obsahující efektivní přísady jako např. benomyl, bitertanol, bupirimát, karbendazim, fenarimol, thiabendazol, triforin a další sloučeniny síry, které se ale svojí účinností mohou významně lišit (Mieslerová a Lebeda, 1999). Mezi nejznámější fungicidy patří Quinoxifen, který výrazně inhibuje

klíčení spor *O. neolycopersici* a tak napomáhá předcházet infekci způsobené tímto patogenem (Jones *et al.*, 2001).

Biologická kontrola vůči tomuto patogenu se stále vyvíjí, je známo několik druhů mykoparazitů, které jsou aktivní vůči *O. neolycopersici* (např. *Ampelomyces quisqualis*, *Sporothrix flocculosa*, *Stephanoascus rugulosus*, druhy *Tilletiopsis* a *Verticillium lecanii*). V praxi se využívá také možnosti kombinace těchto mykoparazitů s listovými postřiky obsahujícími fosfáty a draselné soli např. *Sporothrix flocculosa*, kdy dochází k potlačení růstu patogenů (Falk *et al.*, 1995).

2.3 Mechanismy obranné reakce po infekci patogenem *Oidium neolycopersici*

2.3.1 Intraspecifická variabilita patogenu

Většina komerčních odrůd rajčat použitých pro studii rezistence je vůči patogenu *O. neolycopersici* citlivá (Lindhout *et al.*, 1994; Mieslerová *et al.*, 2000). Lebeda a Mieslerová v roce 2002 detekovali variabilitu u čtyř izolátů *O. neolycopersici* původem z Anglie, Nizozemí, Německa a České republiky vůči 35 genotypům rajčete rodu *Solanum*, přičemž se na základě virulenčního spektra nejvíce lišil anglický izolát tohoto patogenu. Pro studium byly použity molekulárně genetické metody a AFLP metoda (*Amplified fragment length polymorphism*) (Lebeda a Mieslerová, 2002; Bai *et al.*, 2005). Studie z roku 2007 potvrdila vysokou variabilitu *O. neolycopersici* na základě testování deseti izolátů z různých zemí Evropy, Severní Ameriky a Japonska (Bai *et al.*, 2005; Jankovics *et al.*, 2008).

2.3.2 Nehostitelská rezistence

Z pohledu rezistence rostlin na daný patogen lze rozlišit dvě formy tzv. nehostitelskou (nehostitelský organismus - nepatogenní interakce, základní inkompatibilita) a hostitelskou rezistenci (interakce hostitel - patogen, základní kompatibilita) (Heath, 2000).

Jako nehostitelská rezistence je označována odolnost rostlin vůči určitým patogenům. Jedná se o pasivní mechanismus přirozené rezistence, který je považován za nejběžnější formu rezistence u rostlin vůči patogenům (Heath, 2000). Rostlina v tomto případě není pro daný patogen hostitelem. V případě nehostitelské rezistence rostlin vůči potenciálním patogenům rozlišujeme dva typy rezistence. Typ 1, kdy nedochází

ke vzniku viditelných symptomů, zatímco 2. typ se projeví rychlou hypersenzitivní reakcí vede i k lokální buněčné smrti (Mysore a Ryu, 2004). Obecně lze ovšem uvést, že nehostitelská rezistence není dosud zcela prozkoumaná a to zejména z hlediska genetiky (Ridout *et al.*, 2009). Při studiu rezistence rostlin se využívají hlavně biochemické cytologické a histochemické metody (Huang *et al.*, 1998; Mieslerová *et al.*, 2004).

Rezistence rostlin k *O. neolycopersici* není primárně spojená s inhibicí klíčení spor, ale souvisí se schopností kolonizace rostlinného pletiva patogenem, což je spojeno s obrannými odpověďmi rostlinných buněk (Huang *et al.*, 1998). Huang *et al.* v roce 2000 prokázal u *Lactuca sativa* při stejném experimentu hypersenzitivní odpověď. Mieslerová *et al.* (2004) pozorovala, že *O. neolycopersici* zastaví svůj vývoj na *L. sativa* a *Pisum sativum* po vytvoření prvního apresoria a haustoria a zároveň potvrdila pozorování, že rezistence není založena na inhibici tvorby primárního haustoria, ale na post-haustoriální HR, tzn., nebyla nalezena tzv. pre-haustoriální rezistence.

2.3.3 Hostitelská rezistence

Hostitelská rezistence je aktivní mechanismus přirozené rezistence. Rostlina se zde stává hostitelem pro daný patogen, ale využívá své přirozené mechanismy k navození rezistence (jedná se o rozpoznání patogena prostřednictvím dominantních R genů i recesivních genů rezistence) (Pavlová, 2006).

Obecně jsou známy dva typy hostitelské rezistence a to druhově specifická a druhově nespecifická rezistence. Rostlina je v rámci druhově specifické rezistence schopná rozpoznávat daný patogen pomocí R genů, které kódují receptory, jež zachycují specifické elicitory, které zde fungují jako ligandy. V tomto případě se označují jako tzv. Avr elicitory, které bývají uváděny jako avirulentní faktory rostlinné patogenese (Procházka *et al.*, 1998; Pavlová, 2006).

Vytvoření komplexu elicitor-receptor (R protein) spouští kaskádu obranných mechanismů rostliny. R protein vzniká jako konečný produkt genu R a rezistence rostliny je dána dominantní alelou tohoto genu. Pro specifickou rezistenci rostliny je velmi důležitá kombinace dominantních genů R a Avr, jejímž výsledkem je model „gen for gen“, kdy pro každý rostlinný gen rezistence existuje odpovídající gen v patogenu, který je tak schopen zajišťovat jeho virulenci (Bent, 1996). Infekce je podporována naopak recesivními alelami *avr* genů, protože rostlina není schopná rozpoznat patogen (Procházka *et al.*, 1998; Pavlová, 2006). R proteiny se vyskytují v cytoplasmatické membráně a v cytoplasmě rostlinné buňky. Každý genom rostliny obsahuje mnoho

R genů lišících se strukturou, které kódují různé R proteiny, z nichž řada patří do tzv. NBS-LRR skupiny proteinů (Dixon *et al.*, 2000). Produkty těchto rostlinných genů mají společné některé rysy, jako např. vazebné místo nukleotidu a úseky opakování bohaté na leucin (Xiao *et al.*, 2001).

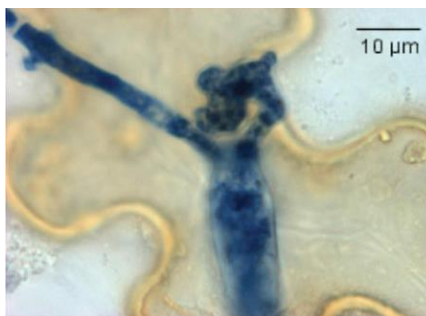
Druhově nespecifická rezistence působí proti veškerým odrůdám daného patogenu. Rostlina v tomto případě není opatřena specifickými receptory vůči patogenu, ale rezistence je vyvolána určitým množstvím minoritních genů, jejichž účinek se násobí nebo sčítá. Elicitory patogenu způsobující patogenesi se označují proto jako nespecifické, mohou to být např. fragmenty houbových buněk při infekci. Tento typ rezistence je významný z hlediska jejího dlouhodobého účinku, což lze využít např. při šlechtění rostlin (Věchet *et al.*, 2012).

U obou typů rezistence v průběhu transkripce genu pro patogenesi dochází k zesílení buněčné stěny a následně se v místě vniknutí patogenu tvoří reaktivní formy kyslíku ROS (*reactive oxygen species*), které hrají významnou roli v mechanismu obranné reakce vedoucí k lokální smrti napadených buněk, což je principem jednoho z hlavních obranných mechanismů rostlin (Věchet *et al.*, 2012).

2.3.4 Obranné reakce rostlin vůči *Oidium neolycopersici*

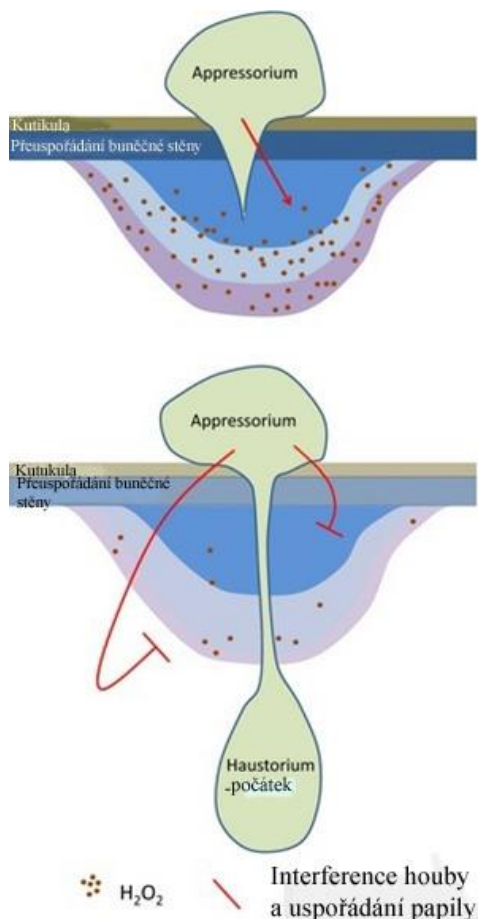
Již při klíčení a růstu houbového vlákna patogenu je možné pozorovat rozdíly v případě infekce citlivých nebo rezistentních druhů rostlin. Jedná se zejména o rozdíly v délce a počtu vytvořených klíčících vláken na konidiích *O. neolycopersici*, kdy na listech rezistentního rajčete vyklíčí hyfy později nebo vůbec a jejich růst je redukován (Meislerová *et al.*, 2004). Jak ukázala studie z roku 2009 trichomy na povrchu listů některých rajčat, jako je např. *S. pennellii*, mohou produkovat výměšky, které vykazují protihoubovou aktivitu vůči *O. neolycopersici*: inhibují klíčení spor a tvorbu apresoria a haustoria (Nonomura *et al.*, 2009).

Velmi důležitou roli v obranném mechanismu rostlin hraje epidermální buněčná reakce, která nastává při interakci patogenu s hostitelskou rostlinou. Konkrétně se jedná o tzv. hypersenzitivní reakci (HR)(Obr. 6) a tvorbu papily, které jsou svázané s vývojem haustoria a apresoria (Huang *et al.*, 1998). U rezistentních rostlin je tvar apresoria jednoduchý na rozdíl od citlivých rostlin, kdy po vniknutí patogenu se jejich tvar změnil na lalokovitý (Nonomura *et al.*, 2010).



Obr. 6: Nekrotická hypersenzitivní reakce *Solanum habrochaites* po inokulaci *Oidium neolyopersici* (převzato od Lebeda *et al.*, 2013).

Hypersenzitivní reakci poprvé popsal Lindhout *et al.* v roce 1994 jako rychlou nekrózu rostlinných epidermálních buněk spojenou s redukovaným růstem mycelia a omezením sporulace po infekci patogenem. Zároveň byla HR pozorována u všech rezistentních rostlin v různém rozsahu (Mieslerová *et al.*, 2004). Mezi další obranné mechanismy vůči *O. neolyopersici* patří tvorba papily (Obr. 7).



Obr. 7: Tvorba a uspořádání papily: Narušená a nenarušená papila se liší složením při formování jejich nespecifické rezistence. Papily jsou vícevrstvé součásti buněčné stěny, které se liší svým složením buněčné stěny a obsahem peroxidu vodíku (převzato z Hückelhoven, 2014).

Jedná se o extrahaustoriální útvar, který se tvoří kolem haustoriálního krčku těsně pod povrchem stěny hostitele. Dochází ke zmožnění buněčné stěny obsahující fenoly, křemík, kalosu a jiné často i toxické látky. Touto strukturou se rostlina obvykle brání pronikání hyfy houby do buňky rostlinného pletiva. Jedná se o obranný mechanismus typický např. pro interakci obilovin s *O. neolycoopersici*. Tento mechanismus byl detekován také u *L. pennellii* a *P. sativum*. U zástupců rodu *Solanum* spp. není tato forma obranného mechanismu příliš častá (Huang *et al.*, 1998).

Vniknutí patogenu do rostliny je doprovázeno ukládáním polysacharidu kalosy v buněčných stěnách nebo okolo haustoria v místě napadení rostliny, kde tvoří fyzickou bariéru zabraňující pronikání a vývoji *O. neolycoopersici*. Bylo zaznamenáno, že kalosa se také může ukládat v buňkách mezofylu. Akumulace kalosy je řízena dominantními rezistenčními (*Ol*-geny u *Solanum* spp.), které jsou zároveň spojené s produkcí peroxidu vodíku a aktivací HR (Li *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 1990). Na základě detailní genetické studie bylo u rajčete popsáno pět dominantních genů (*Ol-1*, *Ol-3*, *Ol-4*, *Ol-5* a *Ol-6*) a jeden recesivní gen *ol-2*, které hrají roli v rezistenci vůči patogenu (Bai *et al.* 2005).

Další obranný mechanismus spočívá v intenzivní lignifikaci buněčné stěny, zejména v místech proniknutí patogenu, vedoucí ke zvýšení pasivní rezistence rostliny (Cohen *et al.*, 1990).

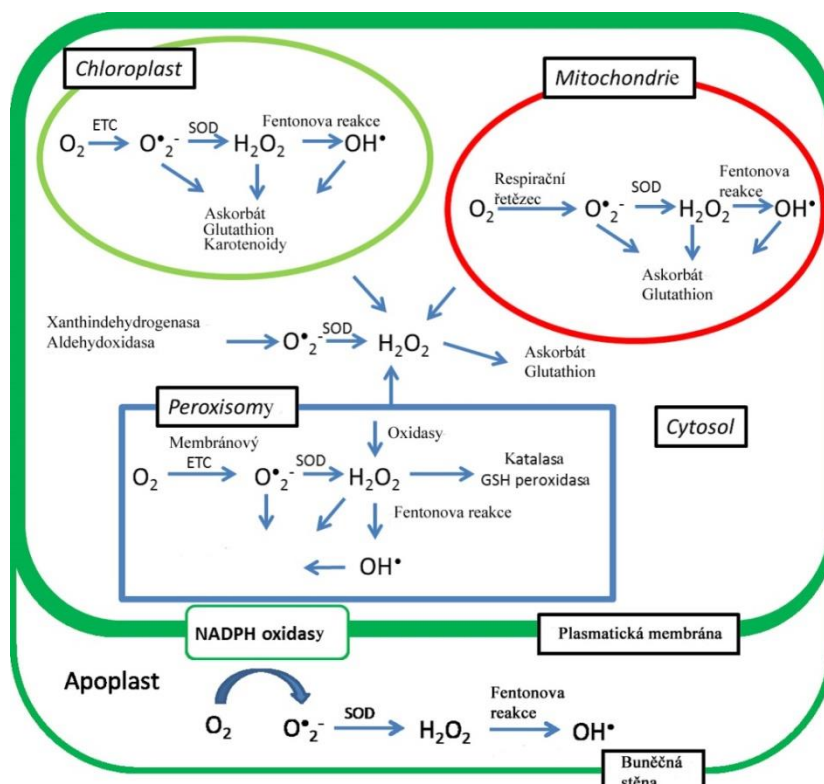
2.3.5 Úloha reaktivní forem kyslíku v obranných mechanismech rostlin v reakci na patogeny

V důsledku interakce rostliny s patogenem může docházet ke vzniku oxidačního stresu, tzn. zvýší se produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), jako je například superoxidový radikál O_2^- , hydroxylový radikál OH^\cdot , peroxid vodíku a singletový kyslík 1O_2 . Zvýšená hladina ROS inhibuje růst houbového patogenu, ale také hraje významnou roli při HR, primárním a sekundárním metabolismu, vývoji, senescenci a reakci na stresové faktory či expresi různých genů. ROS fungují jako signální molekuly v expresi genů a procesu programované buněčné smrti (Neill *et al.*, 2002). Při velkém nadbytku mohou tyto částice působit toxicky na proteiny, lipidy a nukleové kyseliny, což může mít pro buňku fatální následky. Proto je nutné udržovat rovnováhu mezi produkcí a odbouráváním ROS (Levine *et al.*, 1996).

2.3.5.1 Produkce ROS

Na produkci ROS se podílí řada enzymů lokalizovaných v peroxisomech, apoplastu, cytoplasmatické membráně ROS vznikají jako produkty redukce kyslíku při transportu elektronu v mitochondriích nebo v chloroplastech (Obr. 8) (Foyer a Noctor, 2009). Enzymy, jako např. NADPH oxidasa v cytoplasmatické membráně, superoxididismutasa (SOD), apoplastická peroxidasa (EC 1.11.1.7) v buněčné stěně a aminoxidasa (EC 1.4.3.4) v apoplastu, katalyzují tvorbu ROS, které následně mohou spustit kaskády signálních reakcí vedoucí ke specifické buněčné odpovědi (Bailey-Serres a Mittler, 2006).

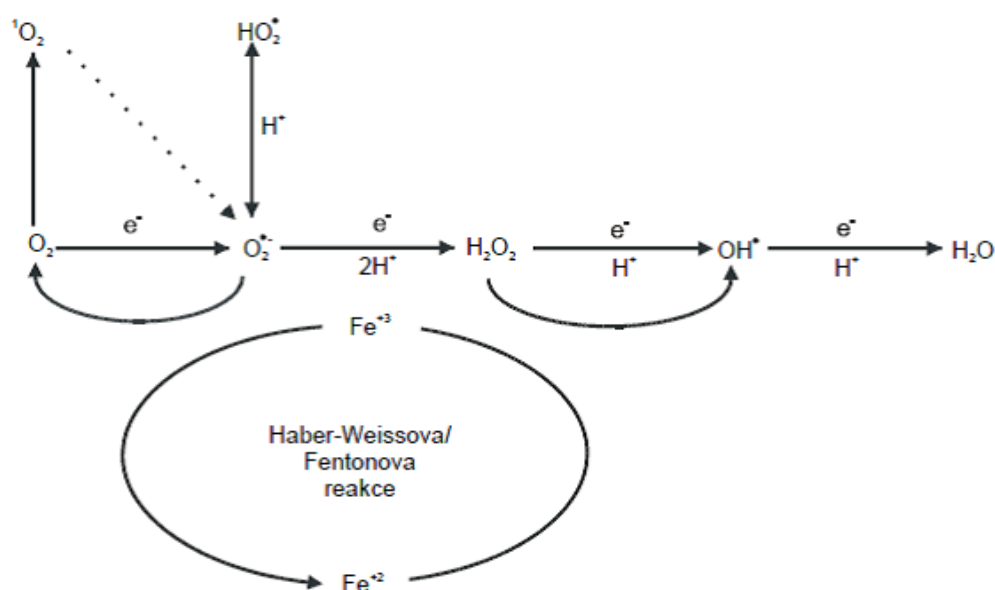
Nejstabilnější a zároveň nejméně reaktivní částicí z ROS je peroxid vodíku, který vzniká např. dismutací superoxidového aniontu pomocí SOD nebo činností ostatních enzymů. Peroxid vodíku je důležitou signální molekulou, která je schopná snadno přecházet přes plasmatickou membránu (Quan *et al.*, 2008). Účastní se především regulace reakcí spuštěných při biotickém a abiotickém stresu a ve vysokých koncentracích také aktivace buněčné smrti (Dat *et al.*, 2000).



Obr. 8.: Produkce a zachycování ROS v rostlinné buňce: SOD = superoxididismutasa; Fentonova reakce = rozklad peroxidu vodíku na vysoce reaktivní hydroxylový radikál v přítomnosti železa; ETC = elektronový transportní řetězec (převzato z Jajic *et al.*, 2015).

ROS mohou vznikat také neenzymatickou cestou a to díky nízké reaktivitě molekulárního kyslíku, jehož molekula je paramagnetická (obsahuje dva nepárové elektrony s paralelním spinem) (Blokhina *et al.*, 2003). Absorbací energie ve formě záření v oblasti viditelného světla pomocí pigmentů fotosyntetického reakčního centra I, dochází k obrácení jednoho spinu v molekule kyslíku a tím i k jeho aktivaci a vzniká mnohem reaktivnější singletový kyslík (Scandalios, 1990).

Dalším aktivačním mechanismem je jednoelektronová redukce kyslíku, kdy dochází postupně ke vzniku superoxidu, peroxidu vodíku, hydroxylového radikálu a vody (Obr. 9) (Vránová *et al.*, 2002).



Obr. 9: Redukce molekulárního kyslíku na vodu pomocí jednoelektronové redukce (převzato z Vránová *et al.*, 2002).

2.3.5.2 Odbourávání ROS

Mezi enzymy, které se naopak účastní odbourávání nadbytku ROS, patří superoxiddismutasa (SOD), katalyzující dismutaci $\text{O}_2^{\bullet -}$, kdy vznikne kyslík a peroxid vodíku, a askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11), která se účastní následné přeměny peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Obr. 10) (Tang *et al.*, 2006). Dle Reillyho *et al.* (2004) byly objeveny u aerobních organismů tři typy SOD, které se liší svým kofaktorem: MnSOD, Cu/ZnSOD, FeSOD.

Z cytosolu, peroxisomů, chloroplastů (ve stromatu a tylakoidech) a mitochondrií byly izolovány isoformy APX, kdy každá z nich má specifickou antioxidační roli a reaguje na odlišné podněty v důsledku stresových faktorů. Největší význam má cytosolická APX, protože jako první získává signály po vystavení rostliny stresu. Proto

byla také studována z hlediska molekulární biologie a genetiky, kdy se poprvé podařilo získat kompletní genetickou informaci APX z rajčete a hrášku (Mittler a Zilinskas, 1992).

Vedle SOD a APX vykazuje antioxidační aktivitu katalasa (CAT, EC 1.11.1.6), což je tetramerní enzym tvořený čtyřmi podjednotkami hemu. Katalasa je lokalizovaná v peroxisomech, kde se podílí na degradaci peroxidu vodíku, čímž zároveň chrání buňky rostlin před jeho toxickým efektem (Obr. 9, Tab.1) (Levine *et al.*, 1996; Lebeda *et al.*, 2001).

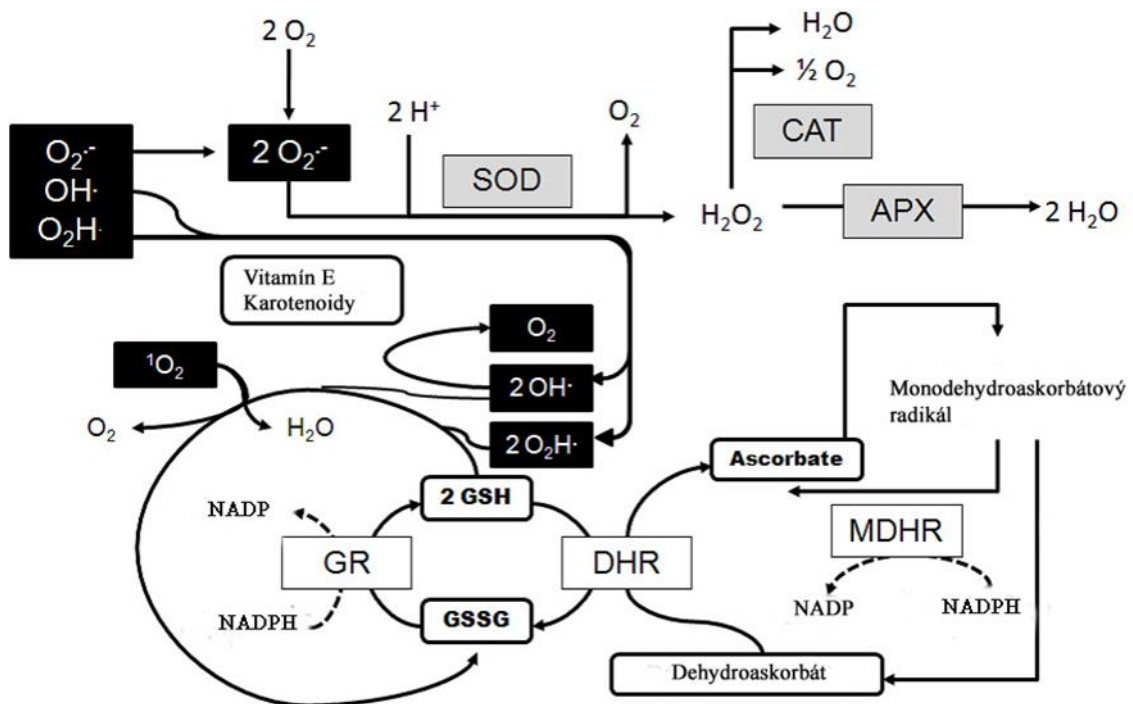
Tab. 1. Subcelulární a orgánová lokalizace antioxidačních enzymů (převzato z Mittler, 2002)

Antioxidační enzym	Zkratka	Subcelulární a orgánová lokalizace
Askorbátperoxidasa	APX	cytosol, stroma a membrána plastidů, mitochondrie, peroxisomy, apoplast, kořenové hlízky
Katalasa	CAT	peroxisomy
Dehydroaskorbátreduktasa	DHAR	cytosol, stroma plastidů, kořenové hlízky
Glutathionreduktasa	GR	cytosol, mitochondrie, stroma plastidů, kořenové hlízky
Monodehydroaskorbátreduktasa	MDHAR	stroma plastidů, kořenové hlízky
	Cu/ZnSOD	cytosol, peroxisomy, plastidy, kořenové hlízky
	MnSOD	mitochondrie
Superoxiddismutasa	FeSOD	plastidy

Neenzymové antioxidační mechanismy představují askorbát, β -karoten, redukovaný glutathion (GSH), flavonoidy, alkaloidy, α -tokoferol či fenolické sloučeniny (Obr. 10, Tab. 2) (Piterková *et al.*, 2005). Pro kontrolu hladin ROS využívají rostliny tzv. Foyer-Halliwell-Asadův cyklus, ve kterém dochází k odstranění ROS v buněčných kompartmentech, kde není přítomná katalasa. Hlavními složkami v tomto systému jsou redoxní páry askorbát (AsA)/dehydroaskorbát (DHA) a glutathion/glutathiondisulfid (GSSG) (Foyer a Noctor, 2009; Groß *et al.*, 2013).

Tab. 2: Subcelulární lokalizace neenzymatických antioxidantů (převzato z Mittler, 2002):

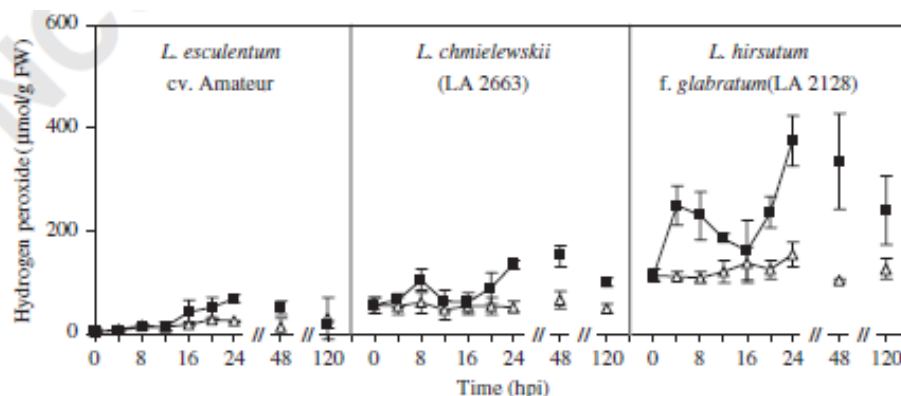
Antioxidant	Subcelulární lokalizace
Askorbát (vitamín C)	apoplast, cytosol, plastid, mitochondrie, peroxisom
β -Karoten	plastid
Redukovaný glutathion	cytosol, apoplast, mitochondrie, plastid, peroxisom
Polyaminy (putrescin)	cytosol, mitochondrie, jádro, plastid
α -Tokoferol (vitamín E)	buněčné membrány
Zeaxanthin	chloroplast



Obr. 10: Enzymatický a neenzymatický antioxidační systém u rostlin: Za účasti SOD dochází k přeměně $O_2^{\cdot-}$ na O_2 a H_2O_2 . Peroxid vodíku může být dále degradován pomocí CAT, APX, nebo být využitý při oxidaci askorbátu (AsA). V plastidech dochází k redukcí monodehydroaskorbátu (MDHA), jež spontánně dismutuje na dehydroaskorbát (DHA) za situace, kdy MDHA není redukován na askorbát monodehydroaskorbátoreduktasou. Dále dochází k reakci s redukováným glutathionem (GSH) za tvorby askorbátu a oxidovaného glutathionu (GSSG). Při regeneraci se oxidované formy přeměňují zpět na redukovanou. Poškození hydroxylovými ionty a dalšími ROS je sníženo vitamínem E a karotenoidy. (převzato a upraveno z Halliwell, 2006).

2.3.6 Úloha reaktivní forem kyslíku v obranných mechanismech *Solanum* spp. v reakci na *Oidium neolycopersici*

Významnou roli ROS v obranných mechanismech rostlin potvrzuje experiment realizovaný na modelovém systému tří genotypů (*S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*) lišících se rezistencí k patogenu *O. neolycopersici*, kdy byla prokázána po infekci patogenem zvýšená produkce ROS v závislosti na rezistenci daného genotypu (Obr. 11). Intenzivní produkce H_2O_2 byla detekovaná u rezistentního *S. habrochaites* a středně rezistentního *S. chmielewskii*, naopak produkce H_2O_2 byla minimální u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur (Mlíčková *et al.*, 2004; Tománková *et al.* 2006).



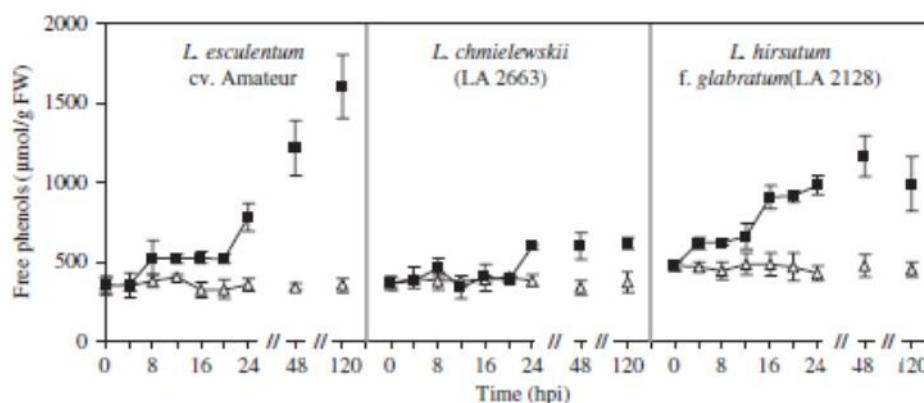
Obr. 11: Růst koncentrace peroxidu vodíku po inokulaci patogenem *O. neolycopersici* u tří genotypů *Solanum* spp. (převzato z Tománková *et al.*, 2006).

Zvýšení koncentrace H_2O_2 8 hpi je spojeno se signální transdukcí, která vede až k omezení vývoje patogenu (Mieslerová *et al.*, 2004). U citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur byla zjištěná vyšší produkce superoxidových radikálů (Mieslerová *et al.*, 2004). V případě rezistentních genotypů intenzivní produkce H_2O_2 korelovala s aktivitou cytosolické guajakolovéperoxidasy, syringaldazinperoxidasy a askorbátperoxidasy. Aktivita CAT se zvyšovala ve dvou fázích u všech tří genotypů *Solanum* spp., avšak u každého druhu rostla aktivita v jiné fázi různou rychlostí. Zvýšená katalasová aktivita byla pozorována zejména u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii*. Byla detekována korelace mezi intenzitou aktivity peroxidasy, intenzivní produkci H_2O_2 a prvními projevy nekrózy (Mlíčková *et al.*, 2004). Intenzivní HR byla zaznamenána 48 hpi v obou rezistentních genotypech. Rozsah aktivované HR je spojen s intenzitou produkce ROS. Jeden z prvních projevů HR je zvýšení lipidické peroxidace (Mlíčková *et al.*, 2004).

Vedle zapojení ROS v HR zvýšená produkce peroxidu vodíku u rezistentních genotypů souvisí i s jejich úlohou v procesu zesíťování glykoproteinů bohatých na hydroxyprolin a proteinů bohatých na prolin v rámci buněčné stěny rostlin, což představuje tvorbu strukturní bariéry vůči patogenu a vytváření antimikrobiálního prostředí (Bestwick *et al.*, 1995).

U studovaných genotypů *Solanum* spp. byla detekována vyšší produkce látek fenolové povahy (Obr. 12) a zvýšená aktivita antioxidantních enzymů opět v závislosti na rezistentních vlastnostech jednotlivých genotypů (Tománková *et al.*, 2006). Zvýšená hladina volných fenolů byla experimentálně zjištěna u všech tří genotypů, zajímavé je, že nejvyšší hladina byla detekována u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur (Rice-Evans *et al.*, 1995). U dalších dvou genotypů byla naopak detekována zvýšená

hladina syringaldazinperoxidasy (SPOX), která se účastní syntézy fenolového polymeru ligninu (Kuźniak *et al.*, 1999).



Obr. 12: Růst koncentrace volných fenolů po inokulaci patogenem *O. neolycopersici* u tří genotypů *Solanum* spp. (převzato z Tománková *et al.*, 2006).

2.3.7 Úloha reaktivních forem dusíku v obranných mechanismech rostlin v reakci na patogeny

Vedle studia úlohy ROS v mechanismu fyziologických i obranných reakcí rostlin v odpovědi na biotický i abiotický stres se výzkum dále zaměřil na studium role reaktivních forem dusíku (RNS, *reactive nitrogen species*), případně na vzájemnou kooperaci při působení ROS a RNS. Mezi RNS patří oxid dusnatý (NO), nitrosylový radikál (NO^+), nitroxidový radikál (NO^*), peroxyinitrit (ONOO^-) a vyšší oxidy jako jsou NO_2 a N_2O_3 . Tyto látky se účastní jak lokálních, tak systémových obranných a signalizačních reakcí často jako signální molekuly. Byla prokázána jejich významná role v regulaci uzavírání průduchů a obraně vůči patogenům (Gaupels *et al.*, 2011). Mimo jiné se také účastní procesu klíčení semen, růstu pylových láček, lignifikace buněčné stěny, kořenové organogeneze, kvetení, zrání plodů a stárnutí. Intenzivně je studovaná úloha RNS v rámci reakce rostlin na biotický a abiotický stres a jejich role jako induktoru nebo supresoru programované buněčné smrti (Gaupels *et al.*, 2011, Yu *et al.*, 2014).

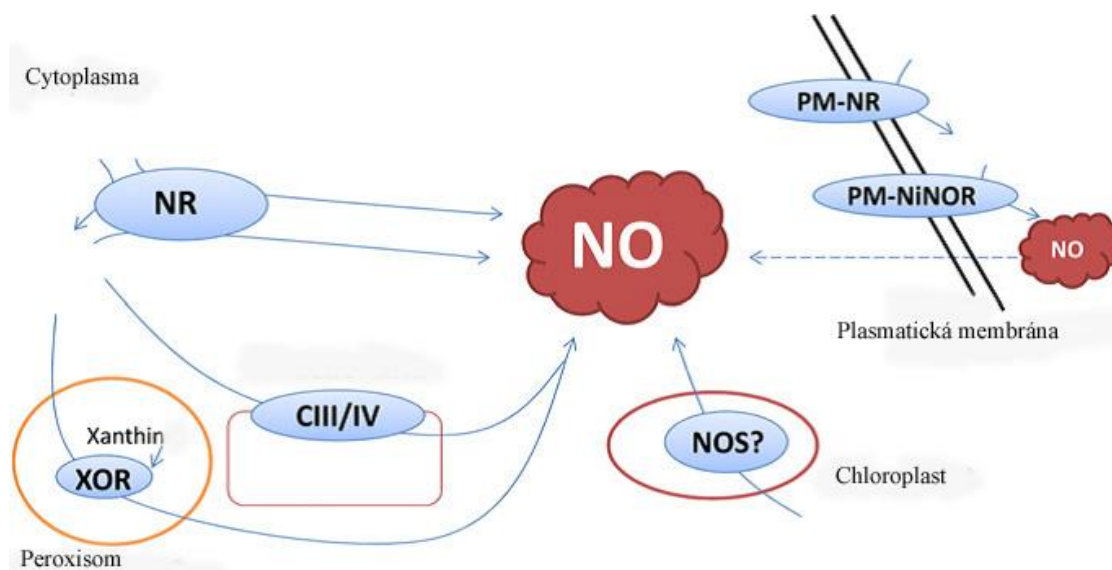
2.3.7.1 Produkce NO a RNS

Produkce hlavní formy RNS oxidu dusnatého NO závisí na induktoru či inhibitoru stresové tolerance, rostlinném druhu a provedení experimentu (Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2011). Obecně platí, že endogenní NO nemusí být vždy zahrnutý ve stresové toleranci, naopak exogenní NO zvyšuje stresovou toleranci vůči abiotickým faktorům, což doprovází snížení hladiny H_2O_2 a MDA (Li *et al.*, 2008). Poprvé byla produkce NO

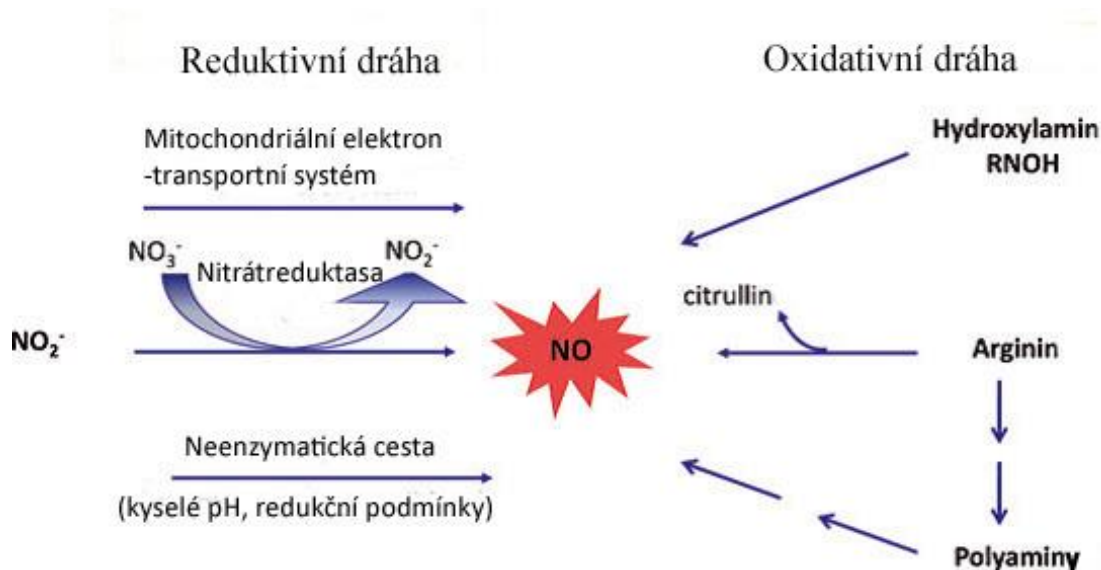
pozorována roku 1975 Klepperem *et al.*, při ošetření izolátů sóji herbicidy, chemikáliemi a za anaerobních podmínek ve tmě.

U rostlin bylo popsáno celkem sedm enzymových zdrojů NO, které jsou závislé na oxidaci či redukci. Za fyziologických podmínek se podílí na vzniku NO redukční enzymové děje za katalýzy cytosolické nitrátreduktasy (cNR, EC 1.7.99.4, koenzym NADPH), jejímž úkolem je přeměna dusičnanu na dusitan, který může být dále redukován až na NO a to především při vývojových procesech rostliny (Dean a Harper, 1988). Další zdroje NO jsou uvedeny na Obr. 13 a 14.

K oxidačním enzymovým dějům podporující produkci RNS patří NO synthasa (NOS, EC 1.14.13.39) a hydroxylaminem řízená produkce RNS (Gupta *et al.*, 2011). Při vývoji rostliny a obranné reakci na abiotický stres a působení elicitorů má velký význam pro rostliny arginin-dependentní tvorba NO, kdy dochází ke katalýze přeměny L- argininu na citrullin. Rostliny disponují enzymy podobnými savčí NOS (Corpas *et al.*, 2006). Také zvýšená koncentrace polyaminů, sperminu a spermidinu podporuje produkci RNS. Hydroxylaminem-řízená produkce RNS není zcela přesně lokalizována, ale je zahrnuta v regulaci hladin ROS (Yu *et al.*, 2014).



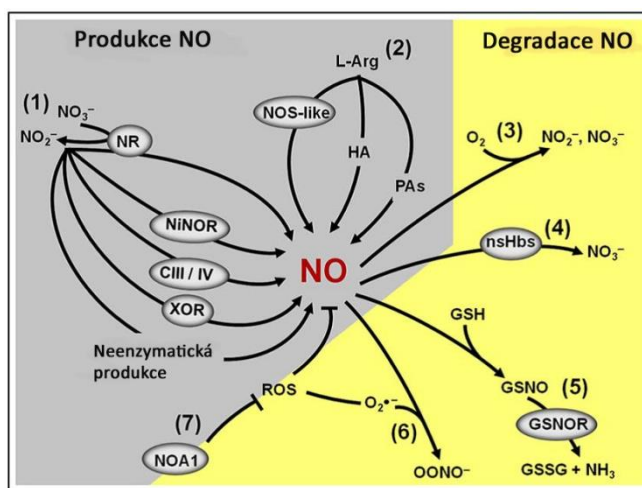
Obr. 13: Enzymové zdroje produkce NO: Nitrátreduktasa (NR), lokalizovaná v cytosolu, primárně katalyzuje redukcí dusičnanu na dusitan, nicméně tento enzym může také katalyzovat redukcí dusičnanu na NO (Yamamoto-Katou *et al.*, 2006). Aktivita membránově (PM) – vázané NO reduktasy (NiNOR) byla stanovena u kořenů (Stohr *et al.*, 2001). Tento enzym produkuje NO a má důležitou roli ve vnímání přítomnosti dusičnanu (Meyer a Stohr, 2002). NO může být také produkován redukcí dusitanu ve vnitřní mitochondriální membráně, pravděpodobně pomocí cytochrom c oxidasy anebo reduktasy (Planchet *et al.*, 2005). Enzym xanthinoxidoreduktasa (XOR, EC 1.17.3.2) může také redukovat dusitan na NO za účasti NADH či xanthinu jako redukujícího substrátu (převzato z Godber *et al.*, 2000).



Obr. 14: Dva hlavní způsoby tvorby NO u rostlin: Elektron nutný k redukci dusitanu na NO je poskytnutý mitochondriálním elektron-transportním systémem pomocí NADPH za katalýzy nitrátreduktasy nebo v kyselém redukčním prostředí. NO může být také tvořený oxidativní cestou, kdy hlavními substráty jsou aginin, hydroxylamin a polyaminy (převzato z Moreau *et al.*, 2010).

2.3.7.2 Odbourávání NO a RNS

Molekula NO může být z buňky eliminována prostřednictvím tří hlavních mechanismů. První z nich zajišťuje reakci NO s ROS za vzniku peroxynitritu, který je poté dále přeměňován. Druhým způsobem je oxidace NO až na dusičnan prostřednictvím interakce s tzv. nesymbiotickými hemoglobiny. Posledním nejčastějším způsobem je reakce s proteiny či peptidy s navázanou thiolovou (SH-) skupinou za vzniku S-nitrosothiolů (Obr. 15) (Perazzoli *et al.*, 2006).

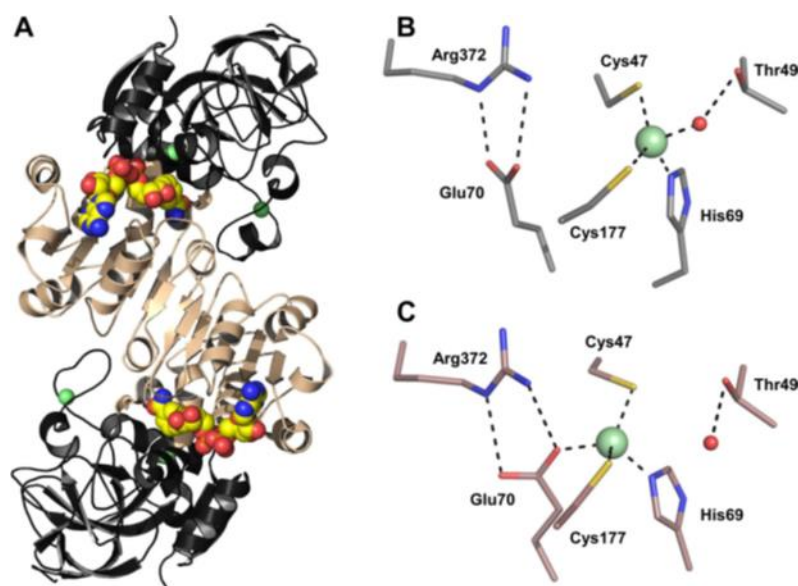


Obr. 15: Přehled produkčních a degradačních mechanismů NO u rostlin: A:(1) Dusitanově závislá produkce NO zahrnuje neenzymové a enzymové dráhy včetně činnosti nitrátreduktasy (NR), nitritreduktasy (NiNOR, EC 1.7.2.1), mitochondriálního elektron-transportního řetězce a xanthinoxidoreduktasy (XOR). (2) L-arginin-závislá produkce NO zahrnuje NOS-podobný enzym a hydroxylaminovou (HA) a polyaminovou dráhu (PAs). B: Složky NO degradačního mechanismu: (3) Reakce NO s kyslíkem vede ke spontánní produkci dusitanu a dusičnanu, (4) NO může reagovat s nesymbiotickými hemoglobiny (nsHbs) za vzniku dusičnanu. (5) Alternativně může NO reagovat s redukováným glutathionem (GSH) za vzniku S-nitrosoglutathionu (GSNO), který může být obratem přeměněn na oxidovaný glutathion (GSSG) a amoniak činností GSNO reduktázy (GSNOR). (6) NO může také reagovat s O_2^- za vzniku peroxynitritu ($OONO^-$). (7) Ovlivněním produkce ROS, NO-asociovaný protein 1 (NOA1) dochází k nepřímému zvýšení hladin NO u rostlin (převzato z Freschi *et al.*, 2013).

2.3.8 Regulace homeostázy NO

Hladina GSNO je kontrolována pomocí enzymu S-nitroglutathionreduktasy (GSNOR, EC 1.2.1.46), který patří do třídy III skupiny alkoholdehydrogenas (ADH3). GSNOR katalyzuje přeměnu GSNO na glutathiondisulfid (GSSG) a hydroxylamin (HA) v přítomnosti GSH a NADH. Jedná se o klíčový enzym, podílející se na udržování homeostázy NO. Jeho aktivita může významně ovlivnit růst rostliny a schopnost reagovat na stresové faktory biotického i abiotického charakteru (Liu *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2003).

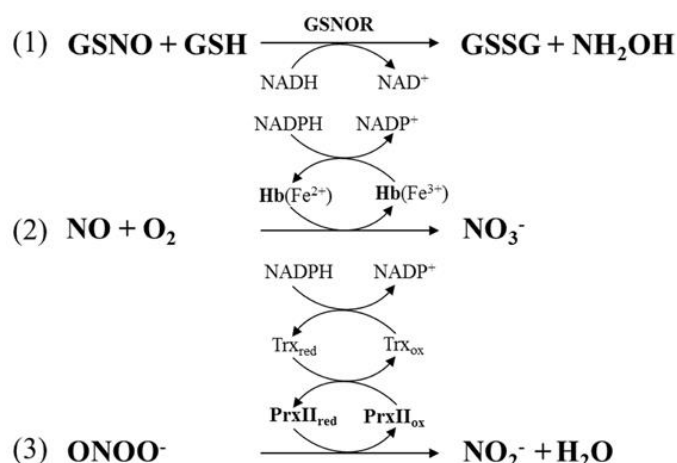
GSNOR je dimerní enzym – skládá se ze dvou 40 kDa podjednotek obsahujících zinečnaté ionty (Obr. 16). Jeden zinečnatý ion má pouze strukturní funkci, zatímco druhý funguje jako Lewisova kyselina, aktivuje alkoholy a jiné substráty při katalýze (Sanghani *et al.*, 2002). GSNOR je lokalizovaný zejména v cytosolu, ale jeho přítomnost byla prokázána i v jádře nebo v mitochondriích (Reumann *et al.*, 2007).



Obr. 16: Struktura GSNOR ze *Solanum lycopersicum*: **A** – Struktura v přítomnosti NAD⁺. Katalytická doména a koenzymová-vazebná doména jsou vyznačeny černě a světle hnědě. NAD⁺ koenzym je vyznačen žlutě, Zn²⁺ zeleně. **B** – Koordinace Zn²⁺ ve struktuře apoenzymu. **C** – binární komplex s NAD⁺. Aktivní místo – voda – je vyznačena červeně (převzato z Kubienová *et al.*, 2013).

Homeostázu NO řídí dále rostlinné hemoglobiny, které mohou být rozděleny do tří tříd. Hemoglobiny I. třídy mají vysokou afinitu ke kyslíku a fungují jako jeho přenašeče (Smaghe *et al.*, 2009). Hemoglobiny odvozené z II. třídy (tzv. symbiotické hemoglobiny) jsou často ve spojení s bakteriemi fixujícími dusík v kořenovém systému rostlin a mají zároveň nízkou afinitu ke kyslíku. Protože zásobují rostlinná pletiva kyslíkem, tak se vyskytují ve vysokých koncentracích, které byly studovány např. v podmínkách hypoxie (Hebelstrup *et al.*, 2012). Nesymbiotické hemoglobiny II. třídy se vyskytují v nízkých koncentracích (nsHbs). Při nadprodukci těchto hemoglobinů dochází zároveň k odstranění NO a RNS. Tento efekt byl prokázán i opačně u nestresovaných izolátů *Arabidopsis thaliana* se sníženou expresí genů kódujících nsHbs došlo ke zvýšení hladiny NO. III třídu tvoří zkrácené hemoglobiny s velmi nízkou afinitou ke kyslíku a dosud nejasnou funkcí (Mur *et al.*, 2012).

V *A. thaliana* peroxyredoxin II E (PrxII E) ovlivňuje NO homeostázu redukcí ONOO⁻ na NO₂⁻ (Sakamoto *et al.*, 2003; Groß *et al.*, 2013). Enzym je poté reaktivován thioredoxinem (Obr. 17) (Groß *et al.*, 2013).



Obr.17: Enzymová regulace homeostázy NO pomocí GSNOR (1), hemoglobinu (2) a peroxiredoxinu II (PrxII) (převzato z Groß *et al.*, 2013).

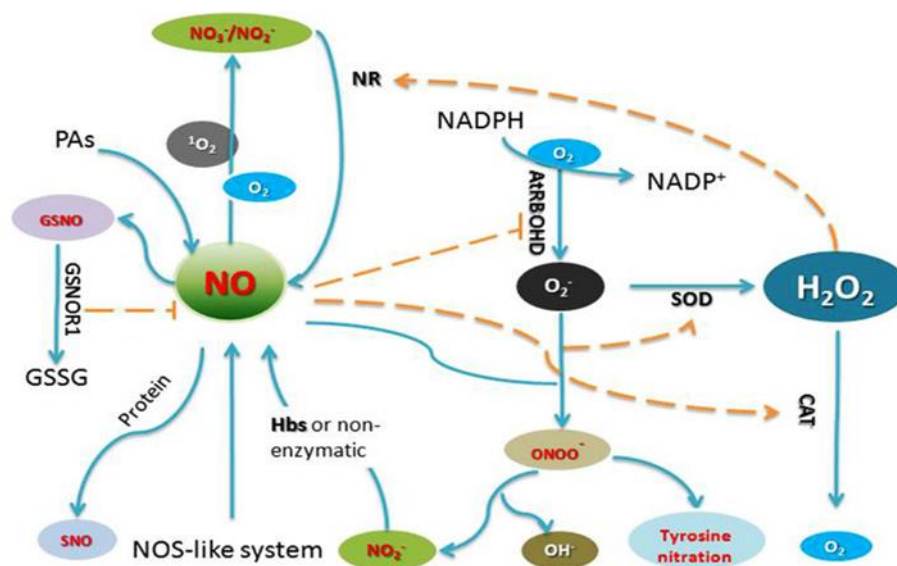
2.3.9 Interakce mezi NO a ROS

Vzájemné reakce ROS a RNS ovlivňují jejich koncentraci, vznik nových sloučenin a jejich účinek (Obr. 18). Jednou z nejvýznamnějších radikálových reakcí je spojení NO s O_2^- za vzniku ONOO^- a ONOOH , které společně tvoří peroxonitrát rozkládající se na NO_2^- , O_2 , $^1\text{O}_2$ a NO^- (Khan *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2010,). NO může také reagovat s O_2 za vzniku NO_2 , který se dále oxiduje na N_2O_3 (Liu *et al.*, 1998). Částice NO, NO^- , NO^+ a N_2O_3 způsobují nitrosaci nukleofilních zbytků proteinů a NO_2 a ONOO^- se účastní nitrace a oxidace proteinů (Hill *et al.*, 2010). Kromě bílkovin mohou být nitrované také mastné kyseliny, aminokyseliny a nukleotidy (Arasimowicz-Jelonek a Floryszak-Wieczorek, 2011). Jako příklad lze uvést 8-nitro-cGMP, který reguluje uzavírání průduchů přes den, zatímco cGMP reguluje uzavírání průduchů v noci (Joudoi *et al.*, 2013).

NO zároveň zpětně reguluje hladiny ROS inhibicí NADPH oxidasy. Bylo zjištěno, že bioaktivita NO závisí na jeho koncentraci. Při nízkých koncentracích může NO stimulovat antioxidační systém, vysoké koncentrace mohou naopak buňku poškodit nebo i usmrtit. (Thomas *et al.*, 2008).

RNS se mohou také účastnit reakcí s antioxidačním systémem, kdy nejprve redukovaný askorbát (DHA) reaguje s NO^+ , N_2O_3 a S-nitrosothioly za vzniku NO a AsA, který se ihned přemění znovu na DHA. DHA přejde na radikál, který se poté spojí s NO a vznikne O-nitrosoaskorbát. Ten se nakonec rozloží na askorbát a NO_2^- . Askorbát také zachycuje ONOO^- , který se přeměňuje na NO_2^- nebo NO_3^- (Scorza *et al.*, 1997).

Mezi další látky zachycující ONOO^- , NO a ROS patří γ -tokoferol (vitamín E), karotenoidy a flavonoidy – ebselen, epikatechin a quercitin (Haenen *et al.*, 1997). S-nitrosylací vzniká z GSH S-nitrosoglutathion (GSNO), který vystupuje jako zásobárna a endogenní donor NO (Broniowska *et al.*, 2013).



Obr.18: Křížové reakce mezi RNS a ROS v rostlinných buňkách: AtRBOHD = NADPH oxidasa; GSNO = S-nitrosoglutathion; GSNOR1, = S-nitrosoglutathionreduktasa 1; GSS = glutathiondisulfid; NR = nitrátreduktasa; SOD = superoxididismutasa; Hbs = Hemoglobin; PAs = polyaminy; CAT = katalasa (převzato z Wang, 2013).

2.3.10 Produkce reaktivních forem dusíku v obranných mechanismech *Solanum* spp. v reakci na *Oidium neolycopersici*

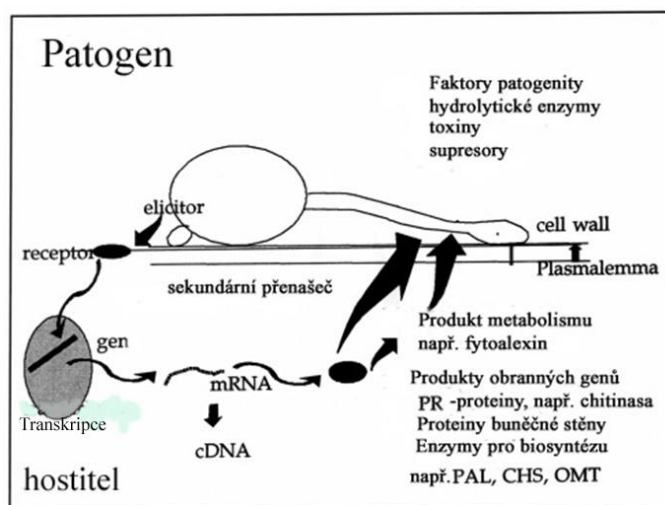
V průběhu patogeneze bylo pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie a speciálních fluorescenčních sond prokázáno u tří zvolených genotypů *Solanum* spp., lišících se rezistencí na patogen *O. neolycopersici*, zvýšení produkce RNS. Již 4-8 hodin po inokulaci (hpi) byla detekována u rostlin zvýšená produkce NO a aktivita NOS. 48-72 hpi, kdy se mycelium začíná větvit, bylo zaznamenáno druhé zvýšení produkce NO a to především u rezistentního a středně rezistentního genotypu (Piterková *et al.*, 2009).

2.4 Obecná charakterizace elicitorů

2.4.1 Elicitory

Elicitory jsou sloučeniny pocházející z velmi různorodých zdrojů, které se uplatňují při spuštění obranných reakcí rostlin, které mohou vést ke stimulaci rostlinné imunity. Pod

pojmem elicitor se v biologii rozumí sloučenina, která je schopna stimulovat tvorbu (biosyntézu) jiné sloučeniny uvnitř buněčného (rostlinného) organismu. Dříve byl termín elicitor obecně používaný pro označení sloučeniny, která byla schopná vyvolat biosyntézu fytoalexinů, ovšem dnes se tímto názvem označují sloučeniny aktivující různé typy rostlinné obrany (Hahn, 1996). Elicitory se účastní např. aktivace biosyntézy rostlinných sekundárních metabolitů, jako jsou fytoalexiny, pigmenty, flavony a další sloučeniny potřebné pro obranné reakce (Zhao *et al.*, 2005; Sreedhar *et al.*, 2009). Elicitory mohou vyvolávat obrannou reakci i v malé koncentraci, čímž se liší od toxinů, které působí až při vyšších koncentracích (Meenakshi a Baldev, 2013). Zvýšená produkce sekundárních metabolitů prostřednictvím elicitorů je jedním z dějů, který získal uplatnění také v komerčních biotechnologických aplikacích pro produkci terapeutik nebo biologicky aktivních látek (Savitha *et al.*, 2005). Tyto monomerní, oligomerní či polymerní látky (elicitory) se uvolňují např. při kontaktu rostliny s patogenem (Obr. 19) a jsou rozpoznány pomocí receptorů rostliny, která vystupuje jako hostitel (Procházka *et al.*, 1998, Věchet, 2012).



Obr. 19: Model odpovědi rostliny na patogen: Po rozpoznání elicitorů patogena receptorem hostitelské rostliny dochází za účasti sekundárních přenašečů k aktivaci řady obranných genů, jejichž produkty brání infekci (převzato z Collinge *et al.*, 1993).

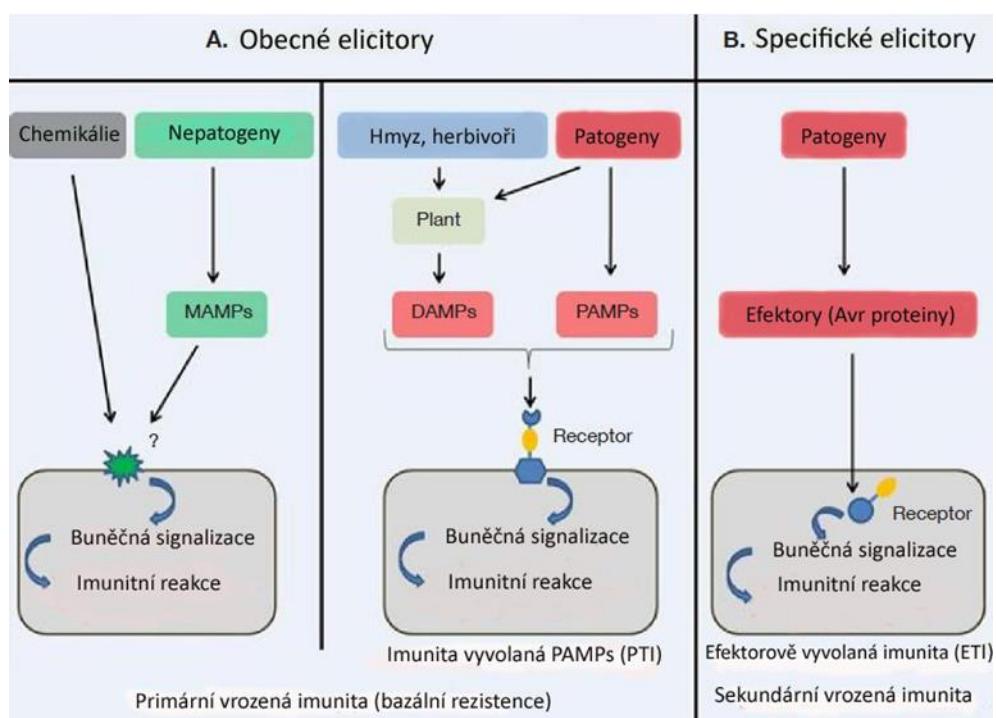
2.4.2 Klasifikace elicitorů

Elicitory lze obecně klasifikovat z různých hledisek (Hahn, 1996): 1) endogenní a exogenní (primární a sekundární), 2) specifické a obecné (nespecifické), 3) biotické a abiotické (fyzikální a chemické) a 4) bílkovinné a nebílkovinné povahy.

Exogenní elicitory jsou metabolity vylučované patogeny. Jedná se např. o oligosacharidy, proteiny nebo peptidy, které interagují s receptory hostitelské rostliny (Albersheim *et al.*, 1977; Procházka, 1998). Naopak endogenní elicitory jsou

sloučeniny, které uvolní rostlina až po napadení patogenem, např. oligoglukany, glykoproteiny, oligogalaktouronany atd., vznikající při narušení rostlinné buněčné stěny (Procházka, 1988; Hahn, 1996;).

Na základě schopnosti interagovat s hostitelskou buňkou dělíme elicitory na obecné (nespecifické) a specifické (Obr. 20). Mezi nespecifické elicitory patří takové látky, které lze prokázat u různých patogenů (mastné kyseliny, steroly, polysacharidy...) nebo vznikají např. při destrukci buněčné stěny po napadení rostliny patogenem. Mezi nespecifické (obecné) elicitory patří sloučeniny spojené s patogenem (PAMPs – Pathogen Associated Molecular Patterns), s poškozením (DAMPs – Damage Associated Molecular Patterns), s mikroby (MAMPs – Microbe Associated Molecular Patterns) a abiotické elicitory (Henry et al., 2012). Specifické elicitory jsou charakteristické pro určitý patogen, jedná se o produkty *Avr* genů, které rozpoznají pouze receptory hostitelských rostlin (Hahn *et.al.*, 1996).



Obr. 20: Klasifikace elicitorů: A: Obecné (nespecifické) elicitory se neliší významně ve svém působení na rostlinné kultivary v rámci rostlinných druhů a jsou zahrnuté v primární vrozené imunitě. Zahrnují sloučeniny spojené s působením mikrobus (MAMPs), patogenů (PAMPs) spojené s poškozením rostliny (DAMPs) patogeny, hmyzem nebo herbivorními organizmy. B: Specifické elicitory (efektory) jsou tvořené patogeny (disponujícími *Avr* geny) interagujícími pouze s rostlinnými kultivary nesoucími korespondující gen rezistence. Po intracelulárním receptorově-řízeném vnímání vedou efektory k sekundární vrozené imunitě. (převzato z Henry *et al.*, 2012).

Abiotické elicitory jsou látky, které nemají biologický původ. Dělí se na fyzikální faktory (UV záření, teplota (chlad/vysoká teplota, změny pH, změny osmotického potenciálu, mechanická poranění) a na chemické elicitory (soli těžkých kovů - chlorid rtuťnatý, chlorid kademnatý, atd., látky s vysokou afinitou k DNA, detergenty, fungicidy, herbicidy). Např. v kořenech *Brugmansia candida* vlivem AgNO_3 a CdCl_2 , v rámci obranných reakcí dochází k nadměrné produkci alkaloidů skopolaminu a hyoscyaminu (Stintzi *et.al.*, 2001). V buňkách *Taxus spp.* přispěly kovy vzácných zemin včetně lanthanu k mnohonásobnému zvýšení výtěžku alkaloidu taxolu (Wu *et.al.*, 2001). Kromě toho, některé syntetické látky, jako je např. S-methylester kyseliny benzol [1,2,3]-thiadiazol-7-karbothioové (BTH), mají prokazatelný účinek na stimulaci rostlinných alkaloidů (Seigrist *et.al.*, 1998). Biotické elicitory mají biologický původ. Pocházejí z hub, bakterií, virů a býložravců (Zhao *et.al.*, 2005). Může se jednat chemické látky produkované patogenními organizmy nebo uvolňované rostlinami po napadení patogeny či býložravci, např. komponenty stěn rostlinných buněk. Mezi biotické elicitory se řadí některé hydrolytické enzymy, peptidy, glykoproteiny apod. (Věchet, 2012). Hlavní rozdíl oproti abiotickým elicitorům spočívá v jejich schopnosti elicitace již za velmi nízkých koncentrací (Ozeretskovskaya *et al.*, 1994).

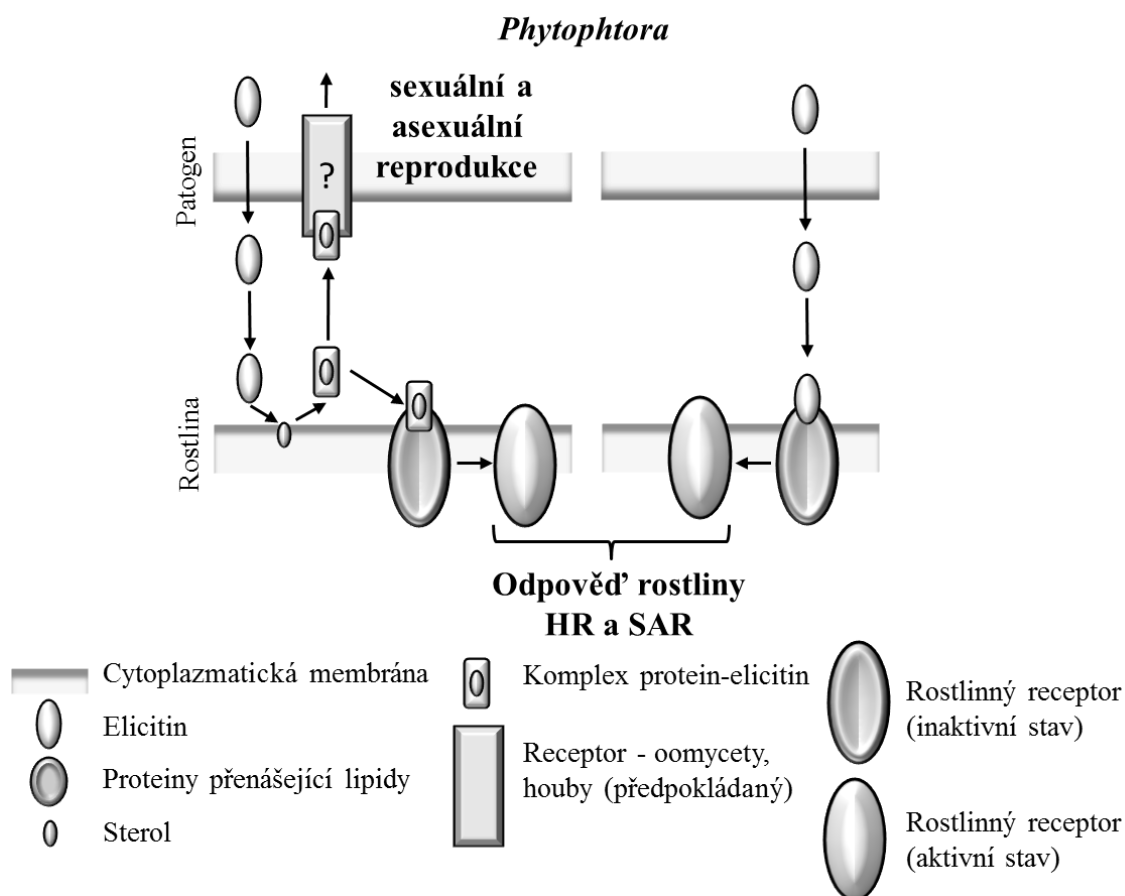
Na základě chemické struktury elicitorů lze tyto látky rozdělit do dvou skupin: elicitory nebílkovinné a bílkovinné povahy. Mezi nebílkovinné elicitory patří některé oligosacharidy (galakturonany, mannan, guluronát, mannuronát...), lipopolysacharidy, polysacharidy (pektin, celulóza, chitosan, chitin a glukany...), patogenní toxiny aj. získané ze stěn rostlinných buněk (oligogalaktouronidy) popř. ze stěn houbových buněk (chitosan) (Angelova *et al.*, 2006). Albersheim *et al.* v roce 1977 jako první izoloval oligosacharidy, u kterých byla prokázána schopnost aktivovat geny pro obranu rostlin. V r. 1984 studoval Sharp *et al.* vliv elicitorů na produkci fytoalexinů u buněčných kultur sóji a objevil osm elicitorů oligosacharidového charakteru po částečné kyselé hydrolyze myceliálních stěn *Phytophthora gasperma*. Významným elicitem polysacharidového charakteru je také chitosan, s navázaným β -1,4-glukosaminem, který dokáže elicitovat fytoalexiny a aktivovat zvýšenou produkci taxolu v kultuře *Taxus canadensis* (Linden a Phisalophon, 2000).

Jako elicitory mohou fungovat také některé rostlinné hormony jako je kyselina salicylová (SA = *salicylic acid*) a kyselina jasmonová (JA = *jasmonic acid*), které působí jako signální molekuly pro expresi obranných genů a mohou být aplikovány do rostlin exogenně (Raymond a Farmer, 1998). Mezi bílkovinné elicitory patří tzv

elicitiny, proteiny o molekulové hmotnosti cca 10 kDa. Některé bílkovinné elicitory mohou mít enzymovou aktivitu. Typickým příkladem jsou celulasy z buněčných kultur patogenu, které vyvolávají produkci fytoalexinů v *Nicotiana tabacum* (Threlfall a Whithead;1988).

2.4.3 Elicitiny

Tato skupina specifických proteinových elicitorů představuje malé extracelulární 10 kDa proteiny složené z cca 98 aminokyselin, které jsou produkovány oomycetami rodu *Phytophthora* a *Phytium* (Tab.3) (Bonnet *et al.*, 1996; Ponchet *et al.*, 1999). Elicitiny nemají enzymovou aktivitu, patří do skupiny tzv. proteinů přenášející lipidy (lipid transfer proteins, LTP), které jsou schopny transportovat mastné kyseliny a steroly. Oomycety nedokáží syntetizovat steroly, které jsou nezbytné pro jejich reprodukci. Elicitiny, které tyto organismy vytváří, váží steroly produkované hostitelským organismem pomocí hydrofobní dutiny ve své struktuře a zajišťují jejich transport do patogenní struktury (Obr. 21) (Mikes *et al.*, 1998).



Obr. 21: Úloha elicitinů při transportu sterolů a aktivaci obranných reakcí rostlin (převzato z Moricová *et al.* 2014 – převzato a upraveno z Blein *et al.*, 2002).

Elicitiny jsou strukturně tvořené jedním β -listem a pěti α -helixy, které jsou vzájemně propojené třemi disulfidickými můstky mezi šesti cysteiny. V řetězcích se nevyskytuje tryptofan, histidin a arginin, naopak je zde často zastoupený serin a threonin (Ponchet *et al.*, 1999). Na základě struktury se elicitiny dělí do 5 tříd (Kamoun *et al.* 1993). Podle pI lze rozlišit elicitiny kyselé (α -elicitiny, pI<5) a bazické (β -elicitiny pI>7,5) (Leberre *et al.*, 1994). Elicitiny I-třídy jsou tvořeny 98 aminokyselinami obsahujícími vždy 6 cysteinů, 3 methioniny, 2 fenylalaniny a 3 glyciny. Pozice pro leucin, isoleucin, prolin a threonin jsou vysoce konzervované. V rámci třídy I lze elicitiny dále členit na kyselé (α -elicitiny, třída IA) a bazické (β -elicitiny, třída IB) (Nespoulous *et al.*, 1992). Elicitiny třídy I' (Py) produkované patogeny rodu *Pythium* jsou tvořeny 98–101 aminokyselinami a je pro ně charakteristická přítomnost asparaginových glykosylačních míst. Do třídy II patří silně kyselé elicitiny, tvořené 103-104 aminokyselinami s hydrofilním C-terminálním koncem, produkované například *P. cryptogea* (Panabières *et al.*, 1996). Elicitiny třídy III jsou tvořeny 165-170 aminokyselinami. Mají kromě 98 pro elicitiny typických aminokyselin dalších 70 aminokyselin, které patří C-terminálnímu konci. Do této třídy patří především některé elicitiny produkované *Phytophthora infestans* (infestin), která způsobuje plíseň bramborovou a plíseň rajčatovou (Kamoun *et al.*, 1993).

Nejčastěji studovaným elicitem je kryptogein produkovaný oomycetou *Phytophthora cryptogea*, který patří mezi bazické β -elicitiny (hodnota pI 8,5), třída IB. Elicitin oligandrin, syntetizovaný oomycetou *Phytium oligandrum*, patří do třídy IA. Izoelektrický bod oligandrinu je 4,5 a řadíme ho mezi α -elicitiny (kyselé). Molekulovou hmotnost má cca 10 kDa a obsahuje 100 aminokyselin. Oomyceta *Phytophthora infestans* vytváří několik forem elicitinů (Tab. 3). Protein označovaný INF1 se řadí do třídy IA mezi kyselé elicitiny s pI 4,22, INF4 má pI 9,97 a patří mezi bazické elicitiny třídy IB. Další formy infestinu INF2a,b a INF4,5 řadíme mezi kyselé elicitiny třídy III. Strukturní rozdíly elicitinů mají vliv na tvorbu nekrózy u hostitelského organismu. Bazické elicitiny (např. z *P. cryptogea*, *P. megasperma*, *P. cinnamomi*) mají na svém povrchu vázané velké množství lysinu v pozici 13, což podporuje zvýšený nekrotický účinek a zároveň vyšší aktivaci HR (Huet *et al.*, 1992; Ponchet *et al.*, 1999). Oproti tomu, kyselé α -elicitiny (např. z *P. capsici*, *P. parasitica*, *P. cactorum*), které mají na stejné pozici valin, mají nižší schopnost vyvolat nekrózu a vyšší schopnost aktivace SAR (Huet *et al.*, 1992).

Tab. 3: Elicitory produkované různými zástupci rodu *Phytophthora* (převzato z Panabières *et al.*, 1997; Ponchet *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2006; Oswald *et al.*, 2014).

Oomyceta	Elicitin	Třída	pI
<i>Phytophthora alni</i>	AE1.1	IA	4,99
	AE1.2	IA	4,99
	BE1,2	IB	8,22
	HAE1	2	3,95
<i>Phytophthora brassicae</i>	Bra1	3	4,09
<i>Phytophthora cambivora</i>	AE2	IA	4,99
<i>Phytophthora cactorum</i>	AE1.1	IA	4,99
	CAC-A	IA	4
<i>Phytophthora capsici</i>	Capsicein	IA	3,5
	Cap-Pa28	IA	4,23
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	α -CIN	IA	4,4
	β -CIN	IB	8,9
	HAE1-cin	2	3,38
	HAE2-cin	2	3,54
<i>Phytophthora citrophthora</i>	Citro	IA	3,5
<i>Phytophthora cryptogea</i>	Cry- α	IA	3,6
	Cry- β	IB	9,8
	HAE1-cry	2	3,88
	HAE2-cry	2	3,34
<i>Phytophthora drechsleri</i>	Dre- α	IA	4,6
	Dre- β	IB	8,96
<i>Phytophthora fragariae</i>	AE1.1	IA	4,99
	AE2	IA	4,99
<i>Phytophthora infestans</i>	INF1	IA	4,22
	INF2a;b	3	3,37;3,73
	INF4	IB	9,97
	INF5;6	3	4,09;3,34
<i>Phytophthora hibernalis</i>	hib1	IA	
	hib2	IA	
	hib3	IA	
<i>Phytophthora megasperma</i>	α -megaspermin	IA	4
	β -megaspermin	IB	8,36
	γ -megaspermin	3	3,8
<i>Phytophthora nicotinae</i>	Parasiticein	IA	<4
<i>Phytophthora palmivora</i>	Palmivorein	IA	4
	310-Parasiticein	IA	4,7
<i>Phytophthora parasitica</i>	PARA-1	IA	4,22
<i>Phytophthora plurivora</i>	Plurivorin	IA	4,2
<i>Phytophthora quercina</i>	Quercinin	IA	3,6
	Quercinin	IB	8,3
<i>Phytophthora ramorum</i>	ram- α 1; ram- α 2	I	
<i>Phytophthora syringae</i>	Syringicin	IA	4,31
<i>Phytophthora sojae</i>	Sojein1		4
	Sojein2		6,16
	SOJA,SOJB	IA	3,5

2.4.4 Aplikace elicitorů v zemědělství a biotechnologiích

V současnosti se elicitory začaly využívat především jako prostředky pro ochranu zeleniny a hospodářsky významných plodin před chorobami a rostlinnými škůdci a to se stejnou účinností jakou mají různé pesticidy. Oproti pesticidům, které obsahují různé mutageny a karcinogeny, je použití elicitorů ekologické. Aktivací obranných reakcí ošetřených rostlin se zvyšuje jejich obranyschopnost. Jedná se o přirozené látky, které jsou dobře biodegradabilní (Ozeretskorskaya a Vasyukova, 2002).

Aplikace elicitorů má i svá negativa, čímž může být např. ztráta a kolísání elicitorové aktivity (Ozeretskorskaya a Vasyukova, 2002). Dochází také ke změnám buněčné struktury – zvýšení počtu mitochondrií, či reorganizaci plastidů kvůli hydrolýze uskladněných látek, což má za následek zvýšení rezistence rostlin. Rezervní zásoby takového organismu jsou průběžně vyčerpány a tak se může rezistence nakonec změnit v citlivost (Platonova *et al.*, 1982). Účinnost elicitorů v obraně rostlin je závislá na dávce a také na vegetaci. Z tohoto důvodu vysoké koncentrace elicitorů mohou inhibovat rezistenci anebo způsobit dokonce nekrózu a produkci toxických látek (Ozertskovskaya *et al.*, 1994). Málo častým, ale o to důležitějším faktorem jsou také supresory patogenu – tedy látky, které potlačují rostlinné imunitní odpovědi. Pokud jsou tedy použity elicitorové přípravky kontaminované supresorem, elicitor se stává inaktivním (Ozerstkovskaya a Vasyukova 2002).

Stejně elicitory proto nemohou být použité pro ochranu různých druhů rostlin ve stejných dávkách popř. stejných technologických procesech. Před komerční aplikací elicitorů, musí být nejprve proveden laboratorní výzkum elicitace na daném rostlinném druhu (Ozerstkovskaya a Vasyukova, 2002).

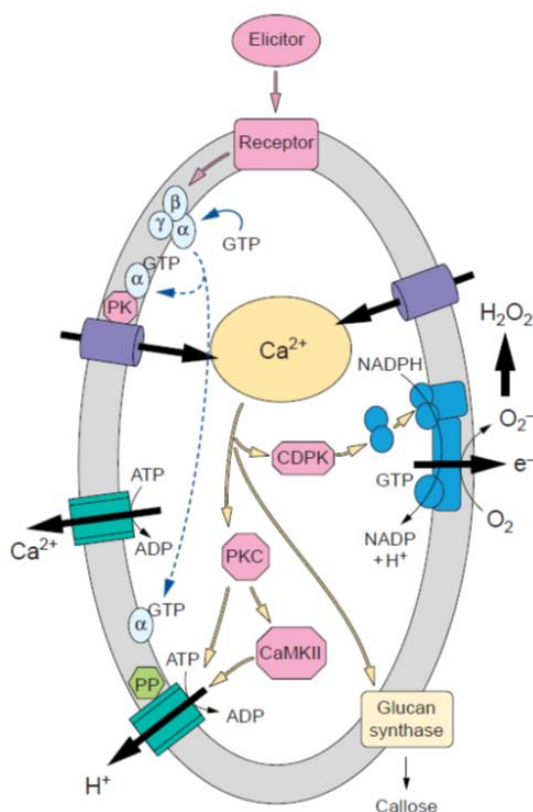
2.5 Mechanismy obranné reakce aktivované elicitory

2.5.1 Elicitorová signální transdukce

Jedná se o velmi komplexní síť mnoha signálních drah vedoucí k různým obranným odpovědím vůči napadení patogenem v závislosti na rozeznávání řady elicitorových signálů (Obr. 22) (Pieterse *et al.*, 2006). Okamžitě po rozpoznání elicitorů patogenu rostlina mobilizuje své efekторы (např. iontové kanály, GTP-vazebné proteiny a proteinové kinasy), které přenášejí elicitorové signály na další sekundární přenašeče, které signál amplifikují pro následující děje jako je fosforylace či defosforylace proteinů plasmatické membrány a cytosolových proteinů, zvýšení koncentrace cytosolového

vápníku, depolarizace cytoplasmatické membrány, toky chloridových, draselných a vodíkových iontů, cytoplasmatická acidifikace, extracelulární alkalizace, produkce NO a ROS a další (Rivas a Thomas 2005; Koornneef *et al.*, 2008).

Princip elicitorové transdukční sítě je možné popsat na intenzivně studovaném elicitoru, kterým je elicitin kryptogein (M = 10 323 kDa), produkovaný oomycetou *P. cryptogea* způsobující především nekrózu listových pletiv tabáku (Fefeu *et al.*, 1997). Po N-glykosidové vazbě na 162 kDa cukernou podjednotku receptoru cytoplasmatické membrány dochází k aktivaci Ca^{2+} kanálů a zvýšení hladiny intracelulárního vápníku. Díky produkci NO a ROS dochází k mobilizaci vápníku i z vnitřních zdrojů buňky (vakuola). Následuje regulace aktivity Ca^{2+} - dependentních proteinů jádra podílející se na regulaci exprese obraných genů (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Při působení kryptogeinu byla zaznamenána navíc zvýšená biosyntéza lipidů, účast NO v buněčné smrti či zastavení buněčného cyklu ve fázi G2 (Kulik *et al.*, 2015).



Obr. 22: Hypotetický model brzkých dějů signální transdukce v rostlino-patogenních interakcích: model zahrnuje G proteiny, jež vedou ke zvýšení koncentrace cytosolických Ca^{2+} iontů, které aktivují proteinkinasu s kalmodulinovou doménou (CDPK). Dochází k aktivaci NADPH oxidasové aktivity a následně ke zvýšené produkci ROS. Zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytosolu také aktivuje β -1,4-glukansynthasu podílející se na produkci kalózy. Ca^{2+} aktivují proteinkinasu C (PKC) a Ca^{2+} /CaM-závislou proteinkinasu, která refosforyluje H^+ -ATPasu. Přerušované šipky značí aktivaci heterotrimerních G proteinů (převzato z Blumwald *et al.*, 2015).

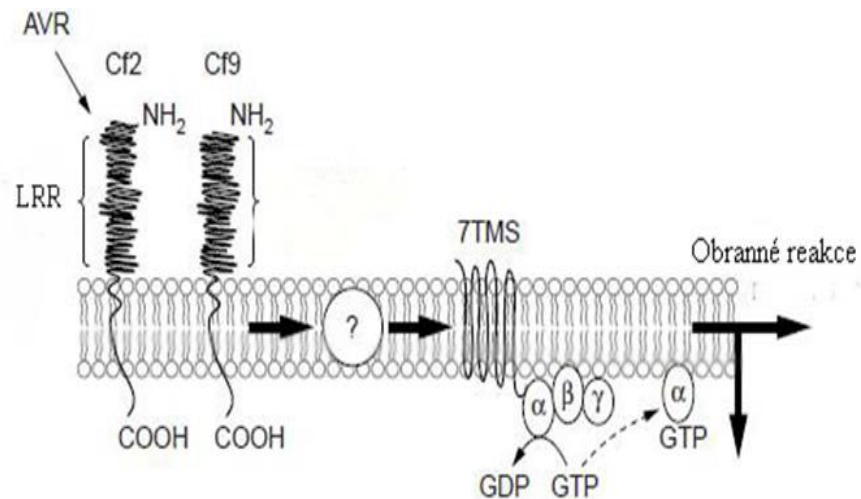
2.5.2 MAPK signalizace

MAPK (= *mitogen aktivovaná proteinkinasa*) kaskáda je jednou z nejdůležitějších složek buněčné signalizace, která je přítomná u rostlin i živočichů (Nishihama *et al.*, 1995). Určité rostlinné R geny kódují proteinkinasy, které fosforylují další proteiny (např. transkripční faktory), jež jsou zodpovědné za aktivaci genů kódujících PR proteiny (PR =pathogen related proteins) (Ebel a Scheel, 1997). Příkladem takového genu může být *Pt0* gen rajčete, který zajišťuje rezistenci vůči bakteriální skvrnitosti rajčete (Zhou *et al.*, 1997).

V MAPK kaskádě jsou klíčové tři proteiny, první z nich - MAPKKK fosforyluje MAPKK, která následně aktivuje fosforylací MAPK, což je poslední protein v této kinasové kaskádě. MAPK poté fosforyluje další signální složky a transkripční faktory, které regulují expresi obranných genů (Zhang a Klessing, 2001; Sinha *et al.*, 2011). MAPK kaskáda může být zároveň propojena s produkcí NO v rámci základních obranných mechanismů rostliny, jak bylo prokázáno při aplikaci elicitoru infestinu INF1 z oomycety *P. infestans* (Asai *et al.*, 2008).

2.5.3 GTP-vazebné proteiny (G-proteiny)

G proteiny jsou aktivovány a účastní se přenosu signálu v rámci mnoha buněčných a obranných procesů (Obr. 23). Do této proteinové třídy patří heterotrimerní komplexy složené z α , β a γ podjednotek a monomerní G proteiny, jejichž aktivní či inaktivní stav závisí na vazbě GDP nebo GTP. Heterotrimerické G proteiny jsou v neaktivním stavu asociovány se specifickými membránovými receptory. Po vazbě elicitoru na receptor dochází ke změně konformace G-proteinu a výměně navázaného GDP za GTP. Po vazbě GTP dochází k odštěpení komplexu α -GTP od $\beta\gamma$ podjednotky. Obě části komplexu zůstávají vázané v membráně, protože α a γ podjednotky mají kovalentně vázaný lipidový řetězec. α podjednotka s navázaným GTP aktivuje efektorové proteiny, dokud nedojde k hydrolýze navázaného GTP na GDP (Vera-Estrella *et al.*, 1994).



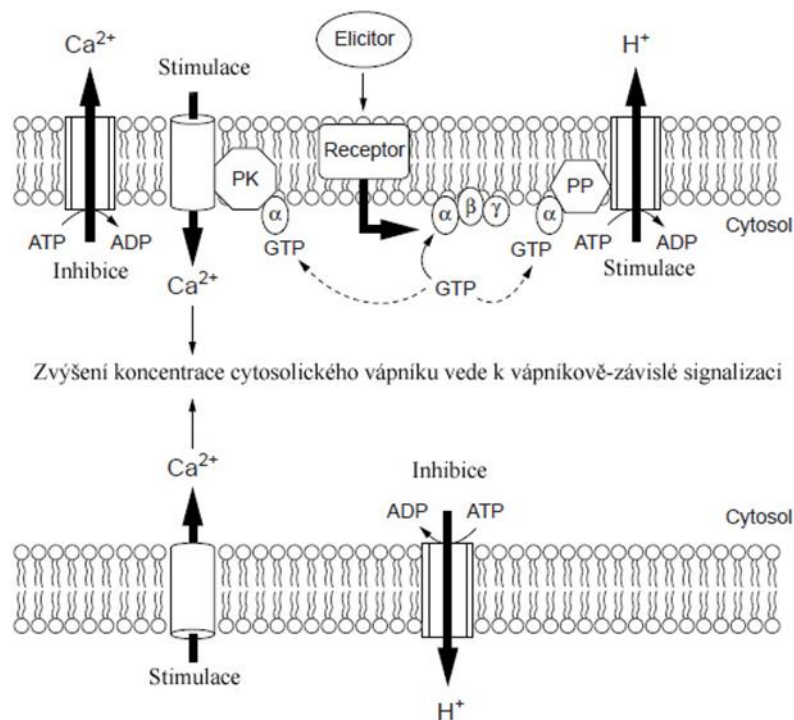
Obr. 23: Mechanismus účasti membránových G-proteinů v interakci hostitel-patogen. Receptorové proteiny, kódované Cf geny, se skládají z opakujících se sekvencí bohatých na leucin (LRR). Vazba avirulentního (AVR) peptidu na receptor vyústí v aktivaci receptoru párovaného s G-proteinem (7TMS) – pravděpodobně pomocí extracelulárních protein-protein interakcí skrz LRR sekvence (převzato z Blumwald *et al.*, 2015).

2.5.4 Iontové toky a signalizace Ca^{2+}

Jednou z prvních reakcí na avirulentní patogen nebo aplikaci elicitoru je změna koncentrace iontů v buňce (iontový transport-tok), ke které dochází během prvních několika minut po vzájemné interakci (Obr. 24). Mezi významné iontové toky patří výměna K^+/H^+ , vtok Cl^- a zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytosolu (White a Broadley, 2003). Vápenaté ionty fungují jako sekundární přenašeče v buněčných dějích a jako nezbytné mediátory obranných reakcí přes Ca^{2+} senzory, jako jsou Ca^{2+} závislé proteinkinasy (CDPKs), chimerní Ca^{2+} a kalmodulin závislé proteinkinasy (CCaMKs) a kinasy příbuzné CDPK (CRKs) (Luan, 2009; Boudsocq *et al.*, 2010). Aktivací těchto senzorů se stimuluje řada transkripčních faktorů, které poté regulují expresi obranných genů (Yang a Poovaiah, 2002). Přechodná zvýšená koncentrace Ca^{2+} , způsobená aktivací elicitoru, dále reguluje také aktivitu fosfolipas zodpovědných za biosyntézu dalších obranných látek (např. jasmonát, kyselina fosfatidová, diacylglycerol, ROS, kalóza) (De Jong *et al.*, 2004). Změny koncentrace vápenatých iontů mohou být zároveň propojené např. se signální dráhou NO a to díky S-nitrosylaci kalmodulinu a expresi genů, které regulují hladinu Ca^{2+} při působení kryptogenu (Jeandroz *et al.*, 2013).

Významnou roli v mechanismu přenosu signálu v rámci obranných reakcí aktivovaných elicitoru mají aniontové kanály. V důsledku ovlivnění jejich činnosti dochází následně k indukci dalších dějů jako je oxidační stres, MAPK kaskáda a transkripční aktivace obranných genů či HR (Jabs *et al.*, 1997). Zablokování aniontových toků vede k inhibici HR a buněčné smrti, jak bylo prokázáno na

tabákových a sójových buňkách ošetřených kryptogeinem a *P. syringae* pv. *Glycinea* (Levine *et al.*, 1996). Další funkcí těchto kanálů může být depolarizace plasmatické membrány, která okamžitě aktivuje napětově-závislé Ca^{2+} kanály a následně dochází ke zvýšení koncentrace cytosolického Ca^{2+} (Ward *et al.*, 1995). Takto vyvolaná depolarizace membrány může navíc stimulovat odtokové kanály K^+ (Wright a Beattie, 2004).



Obr. 24: Signální děje vedoucí ke zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{2+} : vazba elicitorů na receptory v hostitelské plasmatické membráně vyvolá aktivaci G-proteinů. Ty obratem přenášejí signál aktivací fosfatas (PP), které stimulují membránovou H^+ -ATPasu. Průvodní hyperpolarizace membránového potenciálu vyvolá otevření Ca^{2+} -kanálu. Další aktivace kanálu G-proteinem řízená membránově-vázanou proteinovou kinasou (PK) spolu s inhibicí Ca^{2+} -ATPasy vyústí v přechodné zvýšení Ca^{2+} koncentrace. Stejný efekt má také inhibice H^+ -ATPasy pomocí nespecifického elicitoru. Přerušované linie značí aktivaci G-proteinů (převzato z Blumwald *et al.*, 2015).

2.5.5 H^+ /ATPasa

Tento enzym zajišťující tok protonů přes cytoplasmatickou membránu řídí antiportní, symportní a uniportní transportní systémy v rostlině. Vznikající elektrochemický gradient napomáhá regulovat iontové kanály, které vyplavují z buňky K^+ a Cl^- . Výsledkem je depolarizace membrány, aktivace NADPH oxidasy, čímž se inhibuje H^+ /ATPasa (Zimmerman *et al.*, 1998). Tím dochází k acidifikaci cytosolu/alkalizaci extracelulárního média, která ovlivňuje vlastnosti buněčné stěny a také ke zvýšení intracelulární hladiny ATP (Blein *et al.*, 2002). Působením elicitorů dochází ke změnám potenciálu a tudíž i ke změnám v aktivitě H^+ /ATPasy (Vera-Estrella *et al.*, 1994).

U rajčete, na které byl aplikován elicitor z *Cladosporium fulvum* došlo ke zvýšení aktivity enzymu za pomoci G-proteinu, který aktivuje fosfatasu, jež dále defosforyluje protonovou pumpu (Xing *et al.*, 1997). Vlivem aplikace specifických či nespecifických elicitorů dochází tedy k acidifikaci nebo alkalizaci extracelulárního média (De Wit, P. J. G. M., 1995).

2.5.6 Inositol-1,4,5-trifosfáty a cyklické nukleotidy

Velký význam v regulaci obranných reakcí rostlin mají také fosfatidylinosinové dráhy. Za katalýzy fosfolipasy C (PLC) dochází k hydrolyze fosfatidylinositol-4,5-difosfátu (PIP₂). Tato reakce může být aktivována zvýšením koncentrace cytosolického Ca²⁺. PIP₂ se štěpí na inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) a 1,2-diacylglacerol (DAG). IP₃ je dále schopen stimulovat uvolňování Ca²⁺ do cytosolu z intracelulárních zdrojů jako je Golgiho aparát, endoplasmatické retikulum nebo vakuoly (Berridge, 1993) Tato IP₃-Ca²⁺ signální dráha reguluje např. elicitorově indukovanou biosyntézu fytoalexinů, furanokumarinů, např. v petrželi (Renelt *et al.*, 1993).

Byla prokázána významná role cyklických nukleotidů cAMP a cGMP jako sekundárních posílů v aktivaci obranných mechanismů rostliny po aplikaci elicitoru. cADP ribosa i cGMP aktivují procesy vedoucí ke zvýšení hladiny cytosolického Ca²⁺. cGMP prochází skrz iontové kanály v plasmatické membráně, zatímco cADP ribosa se váže na intracelulární Ca²⁺ kanály v endomembránových systémech. (Bowler *et al.*, 1994). Příkladem může být receptor *Arabidopsis thaliana* AtPepR1, který váže signální peptidy AtPep. Zároveň prostřednictvím své guanylylcyklasové domény produkuje cGMP z GTP což poté vyústí ve zvýšenou koncentraci cytosolického Ca²⁺ (Qi *et al.*, 2010). Podobně, pokud byla *A. thaliana* vystavena působení patogenu *Pseudomonas syringae*, došlo k rychlému zvýšení hladin cAMP a vtoku Ca²⁺, což nadále vyústilo ve zvýšenou produkci NO a ROS (Ma *et al.*, 2009).

2.5.7 Kyselina salicylová, kyselina jasmonová, etylen, kyselina abscisová

Kyselina salicylová je velmi známá pro svou schopnost vyvolat SAR u rostlin napadených patogenem. Kyselina salicylová se tvoří v místě infekce a v důsledku následného transportu – šíření po celé rostlině, zajišťuje aktivaci široké škály obranných odpovědí včetně exprese genů a produkce sekundárních metabolitů (Taguchi *et al.*, 2001). Příkladem může být syntéza indolových alkaloidů v buněčné kultuře *Catharanthus roseus* pomocí kyseliny acetylsalicylové nebo syntéza alkaloidů

v kořenových kulturách *Brugmansis candida* či indolových glukosinolátů u řepky olejky a *Arabidopsis* po aplikaci SA (Zhao *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2011).

Kyselina jasmonová a jí podobné sloučeniny patří mezi další přenašeče elicitorového signálu (Farmer *et al.*, 2003). Bylo prokázáno, že při exogenní aplikaci této látky dochází k biosyntéze různých sekundárních metabolitů – např. terpenoidů, flavonoidů, alkaloidů a mnoha dalších (Wang *et al.*, 2005).

Etylen slouží jako fytohormon rostlin, který mimo jiné působí synergicky s kyselinou jasmonovou (Xu *et al.*, 1994). Funguje jako signální molekula v rostlinné rezistenci a také jako faktor virulence, který může vést dále k patogeneri a rostlinné citlivosti. Jeho produkce může být vyvolaná rozmanitými stresory jako je ozón, mechanické poškození, napadení patogenem nebo aplikace elicitorů. Etylen v nízkých koncentracích podporuje produkci sekundárních metabolitů, ale naopak ve vysokých koncentracích může tuto produkci inhibovat (Mishra *et al.*, 2011). Obecně etylen ovlivňuje produkci flavonoidů, antrocyaninu a stilbenoidu pomocí zvýšené regulace genů biosyntézy, ale pouze u některých rostlin, např. u *Vitis vinifera* a také produkci fytoalexinu, např. v mrkvi (Chung *et al.*, 2001). Naopak má negativní vliv na ukládání antrocyaninu, antrocyanidinu a karotenoidu v buňkách *Vaccinium pahalae* (Shibli *et al.*, 1997).

Kyselina abscisová (ABA), patřící rovněž mezi fytohormony, ovlivňuje řadu fyziologických procesů, jako je klíčení a růst. Hraje významnou roli v regulaci obranných mechanismů rostlin v reakci na řadu stresových faktorů jako je např. hyper- nebo hypoosmotický stres, chlad, sucho nebo solný stres. Má významnou roli při regulaci exprese obranných genů a biosyntéze sekundárních metabolitů (Zhao *et al.*, 2000).

2.5.8 Aktivace obranných genů rostlin

Konečným krokem elicitorové signální transdukce je aktivace obranných genů, které kódují obranné proteiny, které se zapojují do obranných reakcí rostlinného organismu. Je možné rozlišit tři základní skupiny exprimovaných proteinů (Mishra *et al.*, 2011).

Proteiny pro modifikaci buněčné stěny se podílejí na zesílení buněčné stěny v rámci obrany proti ataku patogenů (Rose *et al.*, 2004). Důležitou roli hrají glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin (HRGPs-extensiny), proces lignifikace, suberinizace a ukládání kalozy. V souvislosti s tím bylo zjištěno, že např. po infekci prosa patogenem *Sclerospora graminicola*, dojde k rychlému zesílení a zvýšení koncentrace HRGPs v buněčných stěnách (Shailrasree *et al.*, 2004). Syntéza strukturních bariér ligninu

a suberinu je katalyzována peroxidasou TPX1. Stresové faktory vyvolávající tuto syntézu ovlivňují expresi genu *TPX1* (Quiroga *et al.*, 2000).

Druhou skupinou jsou proteiny zahrnuté v sekundárním metabolismu. Jedná se o proteiny, které pomáhají rostlinám adaptovat se na změnu environmentálních či růstových podmínek díky regulaci produkce sekundárních metabolitů. Aminokyseliny fenylalanin a tyrosin vstupují do šikimátové dráhy, která vede ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů. Tyto aminokyseliny jsou substrátem pro enzym fenylalaninammoniaklyasu (PAL), která se účastní metabolické dráhy vedoucí k biosyntéze SA, klíčových propanoidů a řady dalších sekundárních metabolitů. Na základě aplikace elicitorů na pletiva *Araceae* se dospělo k závěru, že pro ukládání fenylpropanoidových sloučenin v průběhu napadení patogenem je nutné zvýšit regulaci genů šikimátové a fenylpropanoidové dráhy (Mishra *et al.*, 2011).

Významnou skupinou proteinů, která má důležitou roli v obranném mechanismu rostlin jsou tzv. PR proteiny (PR =pathogen related proteins) (Tab. 4). Jedná se o proteiny, které se kumulují při infekci patogenem. Tyto proteiny byly klasifikovány na základě homologie a sérologie do 17 tříd (Van Loon *et al.*, 2006). V rámci každé skupiny mohou mít proteiny podobnou biologickou aktivitu, ale liší se substrátovou specifitou a lokalizačními vlastnostmi (Van Loon, 1997). Chitinasy (PR-3, PR-4, PR-8 a PR-11) se účastní degradace chitinu v buněčných stěnách houbových patogenů (Gorjanovic, 2009). Významný efekt v obraně vůči bakteriím, oomycetám a virům mají také glukonasy (PR-2), proteínasy (PR-7) a RNAsy (PR-10) nebo inhibitor proteas (PR6), který zpomaluje hmyzí a bakteriální proteasy (Park *et al.*, 2004; Abdeen *et al.*, 2005). Stejně tak peroxidasy (PR-9) zaujímají nepřímou antimikrobiální aktivitu a to díky oxidační katalýze zesílení proteinů a fenolů, které jsou lokalizované v buněčné stěně rostlin, což vede k přeuspořádání fyzické bariéry (Ođjakova a Hadjiivanova, 2001). Proteiny přenášející lipidy (PR-14) se účastní obrany vůči bakteriálním, houbovým a virovým patogenům uspořádáním kutin a suberinu, čímž dochází k zesílení strukturních bariér vůči mechanickému poškození (Blein *et al.*, 2002;). PR-15 a PR-16 proteiny jsou indukované působením patogenu a účastní se regulace HR, stejně jako PR17 proteiny, které navíc fungují jako proteolytické enzymy (Park *et al.*, 2004).

Tab. 4.: Klasifikace PR proteinů v rostlinách a jejich pravděpodobné funkce (převzato z Van Loon *et al.*, 2006).

Třída proteinů	Charakterizace	Cílová místa/sloučeniny
PR-1	prekurzor PR-1 proteinu	houbová membrána
PR-2	1,3- β -glukanasa	glukan buněčné stěny
PR-3	endochitinasa	chitin buněčné stěny
PR-4	endochitinasa	chitin buněčné stěny
PR-5	osmotin	houbová membrána
PR-6	inhibitor proteas	proteiny
PR-7	endoproteasa	endoproteiny
PR-8	endochitinasa	chitin buněčné stěny
PR-9	peroxidasa	lignifikace buněčné stěny rostlin
PR-10	ribonukleasa	patogenová-RNA
PR-11	endochitinasa	chitin buněčné stěny
PR-12	defensin	houbová membrána
PR-13	thionin	houbová membrána
PR-14	lipid-přenášející protein	nespecif. lipidy přenášející proteiny
PR-15	oxalát oxidasa	superoxiddismutasová aktivita
PR-16	oxalát oxidasa	superoxiddismutasová aktivita
PR-17	neznámá	neznámá

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Agarosa (Serva, Německo); akrylamid/bis-akrylamid (Sigma, USA); bromfenolová modř (Acros Organics, Belgie), BSA (Sigma, USA), 4-chlor-1-naftol (Sigma, USA) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, USA), dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR); dithiothreitol DTT (Sigma, USA); Evansova modř (Fluka, Švýcarsko); gelRed (Biotium, USA); glutathion (Acros Organics, USA); glycerol bezvodý (Sigma, USA); glycin (Sigma, USA); guajakol (Sigma, USA); hydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR); HyperLadder 50 bp (Bioline, USA); chlorid sodný (Lachema, Česká republika); infestin (Ústav biochemie MU, Brno); kryptogein - X24 rekombinantní protein (Ústav biochemie MU, Brno); kyselina octová (Lach-Ner, ČR); methanol (Sigma, USA); n-butanol (Sigma, USA); *N, N'*-metylenbisakrylamid; *N, N, N', N'*-tetramethylethylendiamin - TEMED (Fluka, Švýcarsko); NADH (AppliChem, Německo), nitrotetrazoliová modř/5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát - NBT-BCIP (Sigma, USA); oligandrin (Ústav biochemie MU, Brno); peroxid vodíku (Lach-Ner, ČR); persíran sodný - APS (Fluka, Švýcarsko); PMSF (Fluka, Švýcarsko); Ponceau S (Merck, Německo); primární polyklonální protilátka SIGSNOR1- králíčí (Sigma, USA); primární monoklonální protilátka anti Hsp70 - myší (Sigma, USA); sekundární anti-myší protilátka značená alkalickou fosfatasou (Sigma, USA); sekundární anti-králíčí protilátka IgG značená alkalickou fosfatasou (Sigma, USA); SDS (Sigma, USA); sušené mléko (AppliChem, Německo); standard Hsp70 (Sigma, USA); standard GSNOR1 (UPOL, Česká republika); TBE (Sigma, USA); TBS (Fluka, Švýcarsko); Tris HCl (MP Biomedicals, Francie); Triton-X100 (Sigma, USA); Tween-20 (Sigma, USA); B-merkaptioethanol (Fluka, Švýcarsko);

3.2. Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); digitální pH metr WTW 526 (InoLab, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); dokumentační zařízení BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP, USA); elektroforetické komůrky (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka IKA (Labortechnik, Německo); eksikátor (Kavalierglass, Česká republika); EURx Color Taq DNA Polymerasa plant kit (EURx, Polsko); Gel Doc, EZ Imager (Bio-rad, USA); GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit

(EURx, Polsko); chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo); kolonky NAP-5 (GE Healthcare, USA); kyvety (Brand, Německo); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek instruments, USA); minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika); PCR termocykler (Eppendorf, Německo); spektrofotometr UV-VIS (Agilent technologies, USA); světelný mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko); termostat (Grant, UK); Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systém (Bio-Rad, USA); Trans-BlotR Transfer Medium – nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA); Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche – applied science, Švýcarsko); třepačka Mixing Block MB-102 (BIOER technology, Čína); vortex (Biosan, USA); vyhřívací box do 100°C (AescuLab, Taiwan); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA); zdroj pro Western blot Power supply model 1000/500 (Bio-Rad, USA)

3.3 Rostlinný materiál

Pro experimenty byly použity čtyři genotypy *Solanum spp.*, které se lišily rezistencí vůči patogenu *O. neolyopersici*:

- *S. lycopersicum* cv. Amateur – citlivý genotyp
- *S. chmielewskii* – středně rezistentní genotyp
- *S. habrochaites* - rezistentní genotyp
- *S. lycopersicum* cv. MicroTom – citlivost/rezistence neznámá

Semena jednotlivých genotypů byla zaseta do perlitu a po vyklíčení děložních listů přesazena do květináčů se zahradnickou zeminou. Ve stáří 6-8 týdnů byly posléze rostliny použity pro experimentální zpracování.

3.4 Patogen

Pro experimenty byl použit patogen padlí rajčatové (*Oidium neolyopersici*; C2), získaný z rajčete (*L. lycopersicum*, cv. Lucy) ze skleníku Státní rostlinolékařské správy v Olomouci. Patogen *O. neolyopersici* byl poskytnutý a napěstovaný doc. RNDr. Barborou Mieslerovou, Ph.D. z Katedry botaniky UPOL. Patogen byl udržován na 2-3 měsíce starých rostlinách vysoce náchylného genotypu rajčete (*L. lycopersicum*, cv. Amateur) pěstovaných ve fytotronu při teplotě 18 - 20 °C a se světelným režimem 12/12 h (den/noc). Padlí bylo ve dvoutýdenních intervalech přeinkulovááno vždy na nové čisté rostliny.

3.5. Metody

3.5.1 Příprava listových disků pro fytopatologickou studii citlivosti/rezistence rajčatového genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom vůči patogenu *Oidium neolycopersici*

Listy jednotlivých genotypů byly nainokulované patogenem metodou listového otisku. Jako zdroj patogenu byly použity listy *S. lycopersicum* cv. Amateur, jejichž povrch byl z 90-100% pokrytý bílým myceliem rajčatového padlí. Celkem bylo inokulováno 24 rostlin. Rostliny byly pěstovány ve skleníku při teplotě 25°C. Materiál pro experimenty byl odebrán 24 a 48 hpi. Pro každý časový interval byly nainokulované tři rostliny pro každý ze čtyř genotypů. Poté bylo z kontrolních a inokulovaných listů připraveny pomocí korkovrtu listové disky o průměru 12 mm. Disky byly následně uloženy do skleněných flakonek s ledovou kyselinou octovou po dobu dvou dní. Po uplynutí této doby byly disky důkladně propláchnuty destilovanou vodou, nabarveny a inkubovány s 1% Evansovou modří po dobu 10 minut a uchovávány v glycerolu.

3.5.2 Příprava rostlinného materiálu - elicitace listů s následnou inokulací patogenem *Oidium neolycopersici*

Pro experiment byly použity čtvrté pravé listy rostliny *S. lycopersicum* cv. MicroTom. Aplikaci elicitinů byla realizována metodou nasávání listu řapíkem. Listy byly vloženy do mikrozkušavek se 150 µl 100 nM elicitinu (infestin, kryptogein, oligandrin). Jako kontrola sloužil list, který byl ponořen do 150 µl destilované vody. Nasávání probíhalo v exikátoru pod vakuem po dobu 60 minut. Listy byly po dobu realizace experimentu umístěny v Petriho miskách ve fytotronu při teplotě 18 - 20 °C a světelném režimu 12/12 h (den/noc). Řapík listů byl obalen vlhkou vatou. 24 h po elicitaci byla část listů nainokulovaná patogenem *O. neolycopersici* metodou listového otisku. 48 hpi byly listy zmrazeny tekutým dusíkem a uchovány při -80°C pro následující experimenty nebo byly z listů připraveny disky, které byly dále zpracovány dle návodu v kapitole 8.1.. Disky byly použity pro fytopatologické vyhodnocení vývoje patogenu.

3.5.3 Fytopatologické zhodnocení vývoje patogenu *Oidium neolycopersici*

Připravené listové disky inokulované patogenem *O. neolycopersici* byly vyhodnoceny pomocí světelného mikroskopu (200x zvětšení). Na každém disku bylo vyhodnoceno

100 konidií. Hodnotil se procentuální počet naklíčených a nenaklíčených konidií, délka a počet vyklíčených vláken.

3.5.4 Příprava extraktů z listů rajčete *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom pro elektroforetickou detekci peroxidas a pro spektrofotometrické měření peroxidasové aktivity

Extrakty byly připraveny vždy čerstvé. Listy rajčete byly homogenizovány ve třecí misce s 0,1 M K-fosfátovým pufrům o pH 7 v poměru 1:2 (w/v). Extrakty byly centrifugovány po dobu 15 minut, při 12 000 g a při teplotě 4 °C. V případě přípravy vzorků pro nativní elektroforézu byl supernatant smíchán s 60% glycerolem v poměru 3:1.

3.5.5 Detekce peroxidasové aktivity metodou nativní gelové elektroforézy

Vlastní dělení proteinů v polyakrylamidovém (PAGE) gelu je založeno na jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Principem polymerace gelu je reakce mezi akrylamidem (AA) a N,N'-metylenbisakrylamidem (BIS). Jako stabilizátor volných radikálů se do směsi přidává N, N,N', N'- tetramethyldiamin (TEMED). Polymerace každého gelu je zahájena přidávkem persíranu amonného (APS). Byl připravený 10% dělicí gel (pH 8,8) a 4% zaostřovací gel (pH 6,8) dle Tab. 5. Byly použity 0,75 mm spacery. Dělicí gel polymeroval cca 15 minut a zaostřovací gel 20 minut. Do každé jamky gelu bylo nanášeno 10 µl připraveného vzorku. Do dvou krajních jamek bylo aplikováno 15 µl bromfenolové modři. Diskontinuální elektroforéza probíhala během prvních 15 minut při 100 V, po doputování zóny bromfenolové modři na rozhraní obou gelů bylo napětí na zdroji zvýšeno na 180 V (cca 45 minut). Vizualizace izoenzymů s peroxidasovou aktivitou byla provedena reakcí s 4-chlor-1-naftolem v přítomnosti H₂O₂. Dokumentace byla provedena pomocí BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP,USA) a programu ImageLab.

Tab. 5: Složení dělicího a zaostřovacího gelu (objemy jsou uvedeny v ml):

	AA/BIS	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	Voda	TEMED	APS
10% dělicí gel, pH 8,8	1,625	1,25	-	1,975	0,005	0,12
4% zaostřovací gel, pH 6,8	0,325	-	0,625	1,475	0,005	0,075

Roztok bromfenolové modři: bromfenolová modř, 20% glycerol, destilovaná voda

Elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, destilovaná voda

Barvicí roztok: 0,1M K-fosfátový pufr o pH 7; 4-chlor-1-naftol; vychlazený metanol; 30% H₂O₂

3.5.6 Měření peroxidasové aktivity

Aktivita peroxidasy byla stanovena modifikovanou guajakolovou metodou. Reakční směs v kyvetě obsahovala 1 ml 0,1 M K-fosfátového pufru o pH 7; 0,4 ml 65,5 mM guajakolu; 50 µl 175 mM peroxidu vodíku; 295 µl destilované vody a 5 µl extraktu z rajčatových listů. Reakce byla zahájena přidáním 50 µl peroxidu vodíku. Absorbance byla měřena při vlnové délce 436 nm po dobu 1 minuty ($\epsilon = 4500 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.5.7 Měření obsahu proteinů v extraktu metodou Bradfordovou

Měření bylo prováděno na mikrodestičkovém readeru. Do jamek bylo napipetováno 45 µl destilované vody, 5 µl standardu BSA a 200 µl činidla Bradfordové. Roztok činidla byl připraven ředěním zásobního roztoku Coomassie Brilliant Blue s vodou v poměru 1:4 (složení zásobního roztoku: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 ml 95% metanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné). Po 10 minutách byla stanovena absorbance při vlnové délce 595 nm. Jako kalibrační standardy byly použity roztoky BSA v koncentracích 0,02-1,4 mg/ml.

3.5.8 Detekce Hsp70 a GSNOR metodou Western blot

3.5.8.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Extrakty byly připraveny rozdrcením zamražených listů v třecí misce pomocí tekutého dusíku a poté byly rostlinný materiál zvážen a smíchán s extrakčním puforem v poměru 1:2 (w/v). Po 20 minutové centrifugaci při 16 000 g při teplotě 4 °C byl supernatant smíchán se vzorkovacím puforem v poměru 3:1 a inkubován po dobu 10 minut při 100 °C.

3.5.8.2 SDS-PAGE

Jedná se o denaturační metodu diskontinuální elektroforézy, používanou především k separaci proteinů. Dodecylsulfát sodný (SDS) je detergent s velkým záporným nábojem, který při vazbě na protein (1,4 g SDS/1 g proteinu) mění jejich konformaci

a vyrovnává rozdíly náboje proteinů, které se poté pohybují v gelu směrem k anodě na základě rozdílné velikosti molekul.

Separace proteinů připravených vzorků probíhala v 10% dělicím polyakrylamidovém gelu o pH 8,8 a ve 4% zaostřovacím gelu o pH 6,8 s přidavkem 10% SDS. V Tab. 6 jsou uvedeny roztoky pro přípravu dělicího a zaostřovacího gelu. Byly použity 1,5 mm spacery. Polymerace každého gelu byla zahájena přidavkem čerstvého roztoku 10% APS. Dělicí gel tuhnul 45 minut a zaostřovací gel 30 minut. Do první jamky gelu bylo aplikováno 5 μ l standardu pro Hsp70 případně GSNOR a do ostatních jamek bylo nanášeno 15 μ l připravených vzorků. Elektroforéza probíhala 20-30 minut při napětí 120 V a poté až do při napětí 180 V.

Tab. 6: Složení dělicího a zaostřovacího gelu (objemy jsou uvedeny v ml):

	AA/BIS	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	0,5 M Tris HCl pH 6,8	Voda	10% SDS	TEMED	APS
10% dělicí gel, pH 8,8	3,29	2,5	-	4,11	0,1	0,02	0,12
4% zaostřovací gel pH 6,8	0,65	-	1,25	3,05	0,05	0,02	0,1

Extrakční pufr: 0,05 M Tris/HCl, pH 7; 0,2% Triton X-100; 2 mM DTT; 1 mM PMSF

Laemliho vzorkovací pufr: 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8; 10% SDS; 20% glycerol; 5% β -merkaptoethanol; 0,02% bromfenolová modř; DTT

Elektrodový pufr: 0,025 M Tris/HCl; 0,192 M glycin; 0,1% SDS

3.5.9 Imunodetekce

Analytická metoda Western Blot slouží především pro kvalitativní detekci proteinů nebo k jejich semikvantitativnímu stanovení. Po separaci proteinů SDS-PAGE elektroforézou dojde k jejich přenesení („přeblotování“) na nitrocelulosoovou či polyvinylou membránu působením elektrického proudu, který prochází blotovacím zařízením. Záporně nabitě komplex proteinů s SDS jsou díky proudu přenášeny z gelu na membránu. Bylo použito zařízení Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA). Do kazety blotovacího zařízení byly vloženy filtrační papíry, membrána, gel po SDS-PAGE elektroforéze a další filtrační papíry předem namočené v blotovacím pufru. Přenos probíhal 10 minut při elektrickém proudu 1,3 A. Poté se provedla kontrolní vizualizace přeblovaných proteinů pomocí barviva Ponceau S, které bylo následně odstraněno

promytím membrány destilovanou vodou. Membrána byla ponořena na 2 hodiny do blokovacího roztoku (5% sušené mléko v TTBS), poté byla přidána primární protilátka (Tab. 7) ředěná 5% mlékem v TTBS. Inkubace probíhala přes noc. Následující den po promytí membrány TTBS (3x po 20 min.) byla membrána inkubována 90 minut se sekundární protilátkou ředěnou 5% mlékem v TTBS. Po promytí v TTBS (3x po 20 min) byl použit pro konečnou vizualizaci komerční roztok NBT/BCIP. Po 10 min inkubace v barvicím roztoku byla membrána promyta destilovanou vodou. Dokumentace byla provedena pomocí BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP,USA) a programu ImageLab.

Tab.7. Použité primární a sekundární protilátky a jejich ředění

Detekce	Primární Ab	Ředění	Sekundární Ab	Ředění
Hsp70	Monoklonální Ab Anti-Hsp70 (myší)	500 x	Anti-myší IgG značená alkalickou fosfatasou (kozí)	5000 x
	Polyklonální Ab SIGSNOR1 (králičí)		Anti-králičí IgG značená alkalickou fosfatasou (kozí)	
GSNOR		500 x		5000 x

Blotovací pufr: 0,025 M Tris/HCl, pH 8,3; 0,192 M glycin, 20% (v/v) methanol

TBS, pH 7,5: 20 mM Tris/HCl, 500 nM NaCl

TTBS: 400 ml TBS, 200 µl Tween-20

Blokovací roztok: 5% sušené mléko v TTBS

3.5.10 Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR

3.5.10.1 Příprava extraktů z listů rajčete *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom pro spektrofotometrické měření aktivity GSNOR

Extrakty byly připraveny čerstvé. Elicitinované a inokulované listy byly zváženy a následně homogenizované na ledu ve třecí misce s přísadkou mořského písku spolu s Tris HCl pufrem v poměru 1:2 (w/v). Do extrakčního pufru byl přidán inhibitor proteas PMSF, 0,2% detergent Triton X-100 a stabilizátor DTT. Vzorky byly následně centrifugovány při 16 000 g po dobu 20 minut při teplotě 4°C. Supernatant byl poté přečištěný na kolonce NAP-5. Kolonka byla nejprve ekvilibrována 7,5 ml 20 mM Tris-HCl pufrem o pH 8. Poté bylo na kolonku nanášeno 0,5 ml vzorku a po vsáknutí a eluci 1 ml 20mM Tris-HCl pufrem pH 8 bylo zachyceno 0,75 ml eluátu, který byl dále používán pro měření enzymové aktivity.

3.5.10.2 Měření enzymové aktivity GSNOR

Aktivita GSNOR byla měřena spektrofotometricky sledováním absorbance NADH při vlnové délce 340 nm ($\epsilon = 6,220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) po dobu 10 minut pomocí mikrodestičkového zařízení Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA) a programu Gen5. Purifikované extrakty z rajčatových listů byly inkubované v reakční směsi s 20mM Tris-HCl pufrém, pH 8 a 2 mM NADH. Reakce byla odstartována přidávkem čerstvě připraveného 4 mM GSNO.

3.5.11 Izolace a purifikace RNA z rostlinného materiálu

RNA byla izolována ze zamražených listů viz. kapitola 8.2.. Před samotnou izolací byly listy nejprve rozdrceny na prášek ve třecí misce za pomoci tekutého dusíku. Poté bylo na analytických vahách naváženo 100 mg prášku. Izolace byla prováděná pomocí kitu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx) dle stanoveného purifikačního protokolu. Komerční LG pufr byl smíchán s β -merkaptoethanolem (10 μl β -merkaptoethanolu/1 ml LG pufru). K rostlinnému materiálu ve formě prášku bylo přidáno 200 μl LG pufru a 100 μl RL pufru (obsahuje guanidinium thiokyanát pro denaturaci proteinů, poté byla směs zvortexována a centrifugována po dobu 4 minut, při 16 000 g, za pokojové teploty. Díky této guanidinium thiokyanát-chloroformové extrakci došlo k separaci nukleové kyseliny a proteinů. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkuhavky a k němu bylo přidáno 200 μl RL pufru. Po promíchání byl obsah mikrozkuhavky přenesen na speciální kolonku a centrifugován 2 min při 16 000 g. Po přidání 300 μl 96% ethanolu došlo ke vzniku sraženiny. Rozpustná část byla přenesena na RNA-vazebnou kolonku, která byla centrifugována 1 min. při 11 000 g. Po odstranění eluátu byl na kolonku aplikován Wash DN1 pufr. Po centrifugaci 1 min při 11 000 g byl odstraněn eluát a na kolonku bylo aplikováno 50 μl DNR pufru s 1 μl DNasou. Po 10 min inkubaci byla kolonka promyta 400 μl Wash RB1 pufru. Po centrifugaci 1 min při 11 000 g a odstranění eluátu bylo na kolonu aplikováno 650 μl Wash RBW pufru a následovala centrifugace 1 min. při 11 000 g. Eluát byl opět odstraněn. Po aplikaci 350 μl Wash RBW pufru a 2 min centrifugaci při 11 000 g byla kolonka umístěna do nové mikrozkuhavky a na kolonku bylo aplikováno 50 μl RNase-free sterilní vody. Po centrifugaci 1 minutu při 11000 g byla eluována z kolonky RNA. Takto připravené roztoky RNA byly uchovávány při teplotě -80°C .

3.5.12 Měření koncentrace RNA po izolaci

Koncentrace vyizolované RNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí zařízení Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA) a programu Gen5 a Také 3 aplikace při vlnových délkách 260, 280 a 320 nm. Do jamek mikroleštičky se aplikovaly vždy 2 μl RNA, jako blank byla použita sterilní RNasa free voda.

3.5.13 Reverzní transkripce

Pro přepis genů z mRNA do cDNA byl použitý Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Do mikrozkušavek byl aplikován 1 μl Anchored-oligo (dT)₁₈ primeru a objem vyizolované RNA obsahující 1 μg RNA a takový objem RNase-free vody, aby celkový objem byl 13 μl . Po 10 min inkubaci při 65 °C byla směs zchlazena v ledové lázni. Dále byly do reakční směsi napipetovány 4 μl reakčního pufru, pak 0,5 μl protector RNase inhibitoru (40 U/ μl), 2 μl deoxyribonukleotidového mixu (každý deoxyribonukleotid o koncentraci 10 mM) a 0,5 μl reverzní transkriptázy (20 U/ μl). Výsledný objem směsi v mikrozkušavce byl nakonec 20 μl . Celá reakční směs se byla inkubována 30 minut při 55 °C a následně 5 minut při 85 °C. Získaná cDNA byla uchovávána při -20 °C.

3.5.14 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Principem molekulárně-biologické metody PCR je cyklická syntéza nových řetězců daných úseků DNA ve směru 5'→3' pomocí DNA- polymerasy. Specifický úsek DNA je vymezen navázáním dvou primerů. Tepelně odolná DNA polymerasa zajišťuje protisměrnou syntézu nových vláken v pravidelných cyklech s různou teplotou.

PCR byla provedena za použití kitu EURx Color Taq DNA Polymerasa (EURx, Polsko). Pro jednu reakci bylo napipetováno do stripu 10 μl pufru B, 2 μl deoxyribonukleotidového mixu (0,2 mM každý deoxyribonukleotid), 1,5 μl „forward primeru a 1,5 μl reverse primeru (0,1-0,5 μM), 33 μl sterilní vody, 1 μl Color Taq DNA polymerasy a 1 μl cDNA získané v předchozím kroku při reverzní transkripci. Reakce probíhala v Termocycleru T-100 (Biorad) podle programu uvedeném v Tab. 8. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab.8: Teplotní program a počet cyklů PCR reakce

Krok	Teplota	Doba	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	2-5 min.	1
Denaturace	95 °C	30 s	
Připojení primerů	60 °C	30 s	25-35
Elongace	72 °C	1 min./1 kb	
Finální elongace	72 °C	7 min.	1
Ochlazení	4 °C	nedefinováno	1

Tab. 9: Sekvence forward a reverse primerů použitých při reakci

Sledovaný gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
SI-GSNOR	CTGGAGTGGGAGTTATGATGAA	CCTCCGCCACAGCAAGACCAACT
SI-EF-1 α	GGTCATCATCATGAACCATCC	CATACCAGCATCACCGTTCTT

Na 2% agarosový gel (2 g agarosy/100 ml TBE pufru) s přídavkem 6 μ l interkalačního barviva GelRed bylo do jednotlivých jamek nanášeno 20 μ l každého vzorku amplifikované DNA. Do jedné z jamek bylo nanášeno 5 μ l markeru molekulových hmotností Hyperladder 50 bp. Jako elektrodový pufr byl použitý TBE pufr. Elektroforéza probíhala cca 35-45 minut při napětí 90 V, dokud linie vzorků nedoputovaly přibližně 2 cm od konce gelu. Poté se gel vyjmul z elektroforetické komůrky a byl zdokumentován pomocí zařízení BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP,USA) a programu ImageLab.

Elektrodový pufr TBE: 45 mM Tris báze, 45 mM kyselina boritá, 12,5 mM EDTA

4. Výsledky a diskuse

4.1 Fytopatologická studie stanovení citlivosti/rezistence *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom na *Oidium neolycopersici*

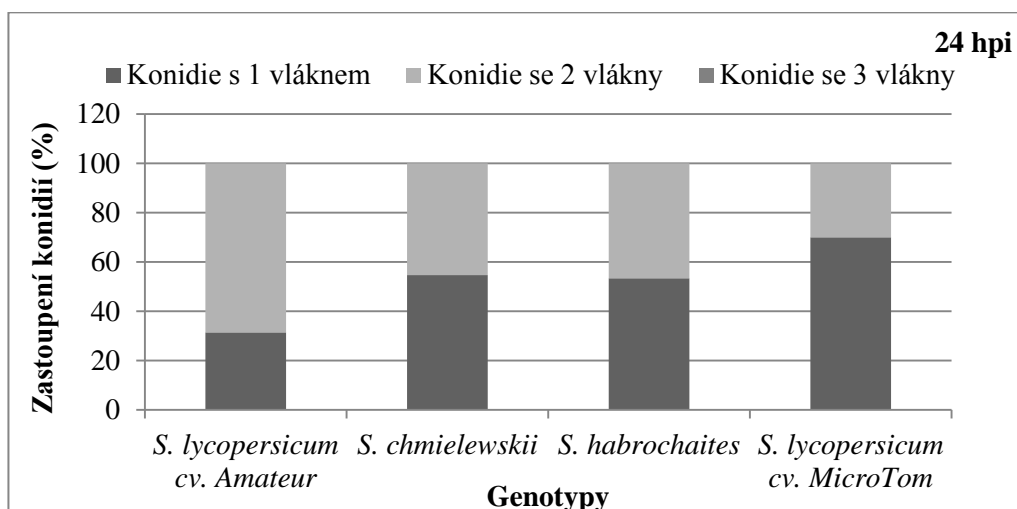
Pro studium vlivu elicitinů na aktivaci obranných mechanismů byla zvolena jako modelová rostlina *S. esulentum* cv. MicroTom. Prvním úkolem bakalářské práce bylo stanovení citlivosti/rezistence na patogen *O. neolycopersici* genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom porovnáním s vlastnostmi dříve studovaných genotypů *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*. Vývoj patogenu, tj. počet konidií s jedním, dvěma či třemi vlákny a délka vláken konidií byla vyhodnocena ve zvolených časových intervalech 24 a 48 h po inokulaci disků připravených ze čtvrtého pravého listu čtyř genotypů *Solanum* spp.. Na základě stanovení výše uvedených parametrů lze porovnat citlivost/rezistenci vybraných genotypů *Solanum* spp.. Grafické vyhodnocení stanovených parametrů je doplněno reprezentativní fotodokumentací konidií patogenu na listových discích jednotlivých genotypů (Obr. 24).

Nejčtenější zastoupení konidií pouze s 1 vláknem, v porovnání s vývojem patogenu na ostatních *Solanum* spp., bylo detekováno 24 h po inokulaci (hpi) na listových discích *S. lycopersicum* cv. MicroTom (Obr. 24 A). Po 48 h od inokulace bylo zaznamenáno nejnižší zastoupení konidií se 3 vlákny (cca 25 %) u rezistentního genotypu *S. habrochaites* (Obr. 24 B). U tohoto genotypu téměř 30 % konidii má vyvinuté pouze 1 klíčící vlákno. V případě genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom bylo detekováno cca 10 % konidií obsahujících pouze 1 vlákno, ale až 60 % konidií s vyvinutými 3 vlákny.

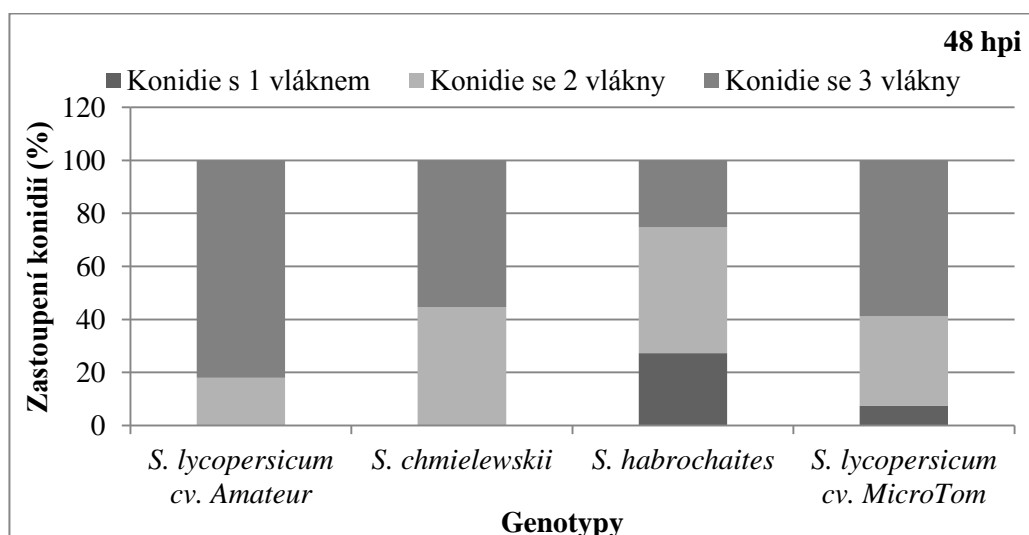
U genotypů *S. chmielewskii* a *S. lycopersicum* cv. Amateur konidie pouze s 1 vláknem nebyly pozorovány. Zastoupení konidií s 3 vlákny bylo nejvyšší u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur (cca 80 %). Na základě vyhodnocení tohoto parametru lze konstatovat, že vývoj patogenu je zpočátku (24 hpi) nejpomalejší u genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom (Obr. 24 B). Později (48 hpi) byl detekován nejpomalejší vývoj patogenu u genotypu *S. habrochaites* a naopak nejrychlejší u genotypu

S. lycopersicum cv. Amateur. Vývoj patogenu na *S. lycopersicum* cv. MicroTom je o něco pomalejší v porovnání s vývojem patogenu na středně rezistentním genotypu *S. chmielewskii*.

A)



B)

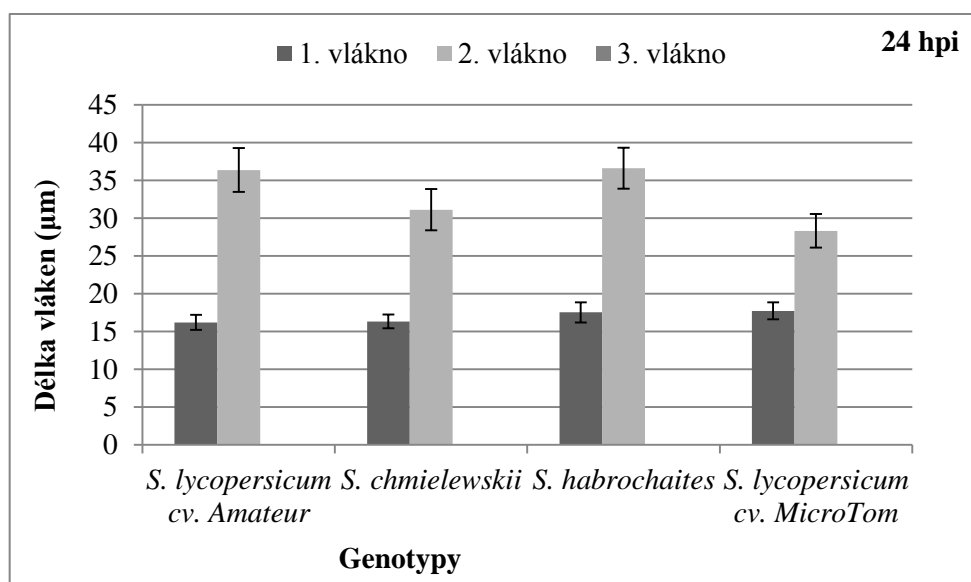


Obr. 24: Zastoupení konidií s jedním, dvěma a třemi klíčovými vlákny patogenu po inokulaci listových disků jednotlivých genotypů *Solanum* spp. A) 24 hpi, B) 48 hpi.

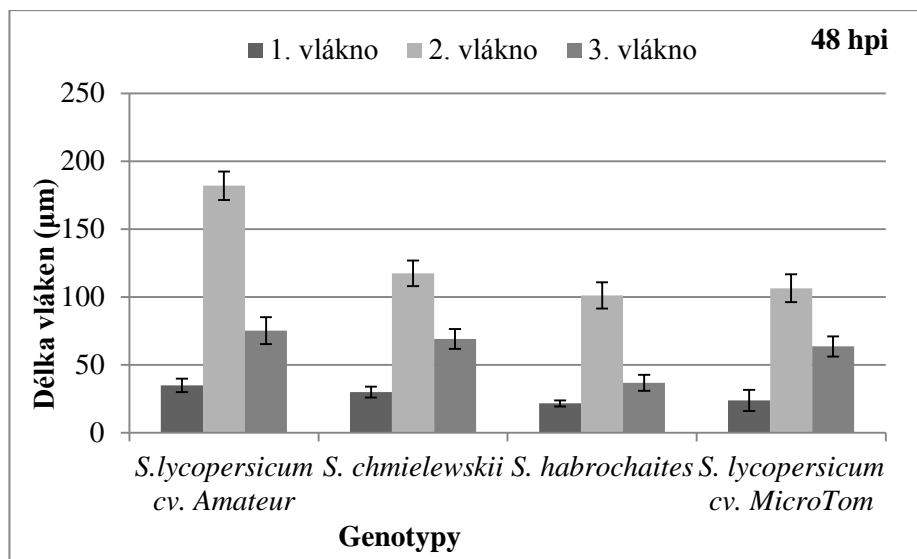
Průměrná délka prvního klíčného vlákna patogenu se v rámci všech čtyř genotypů 24 hpi příliš nelišila (16-18 μm). V případě druhého klíčného vlákna byla v tomto časovém intervalu průměrná délka největší u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. *Amateur* (36 μm) a také paradoxně u rezistentního genotypu *S. habrochaites* (37 μm). V případě kultivaru *S. chmielewskii* dosahovala průměrná délka druhého vlákna 31 μm a u genotypu *S. lycopersicum* cv. *MicroTom* pouze 28 μm (Obr. 25).

Po 48 hodinách od inokulace byly patrné významné rozdíly v délce jednotlivých klíčných vláken patogenu u studovaných genotypů *Solanum* spp. (Obr. 26). Průměrná délka prvního klíčného vlákna byla v rozsahu 21-35 μm , druhého vlákna 101-182 μm a třetího vlákna 38-75 μm . Nejdelší klíčící vlákna patogenu byla detekována na

listových discích genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur, což poukazuje na vysokou citlivost tohoto genotypu vůči biotrofnímu patogenu *O. neolycopersici*. U rajčete *S. habrochaites* byla průměrná délka všech vláken nejnižší: délka prvního vlákna patogenu byla pouze 21 μm , druhého vlákna 101 μm a třetího vlákna 38 μm . Tento výsledek potvrzuje zvýšené rezistentní vlastnosti tohoto genotypu vůči patogenu. U genotypu *S. chmielewskii* byla průměrná délka druhého vlákna oproti *S. lycopersicum* cv. Amateur výrazně nižší (117 μm). Průměrná délka třetího klíčného vlákna se významně nelišila u jednotlivých genotypů (63-75 μm) s výjimkou *S. habrochaites* (38 μm). U *S. lycopersicum* cv. MicroTom byla délka prvního i druhého vlákna patogenu v podstatě srovnatelná s průměrnou délkou vlákna patogenu vyvíjejícího se na listových discích *S. habrochaites*. Délka třetího vlákna byla naopak srovnatelná s délkou třetího vlákna patogenu vyvíjejícího se na genotypu *S. chmielewskii*.

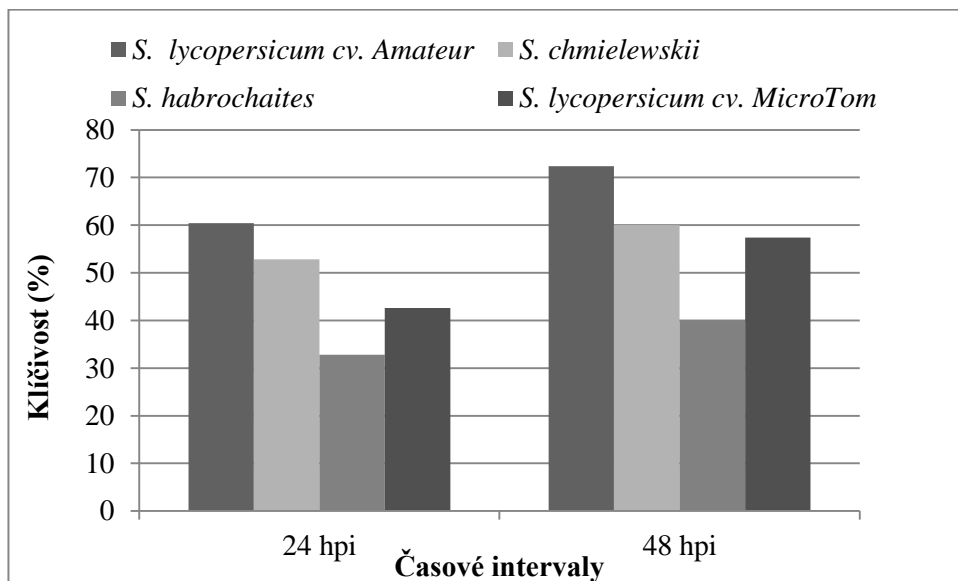


Obr. 25: Průměrná délka klíčných vláken patogenu po inokulaci listových disků jednotlivých genotypů *Solanum* spp. 24 hpi.



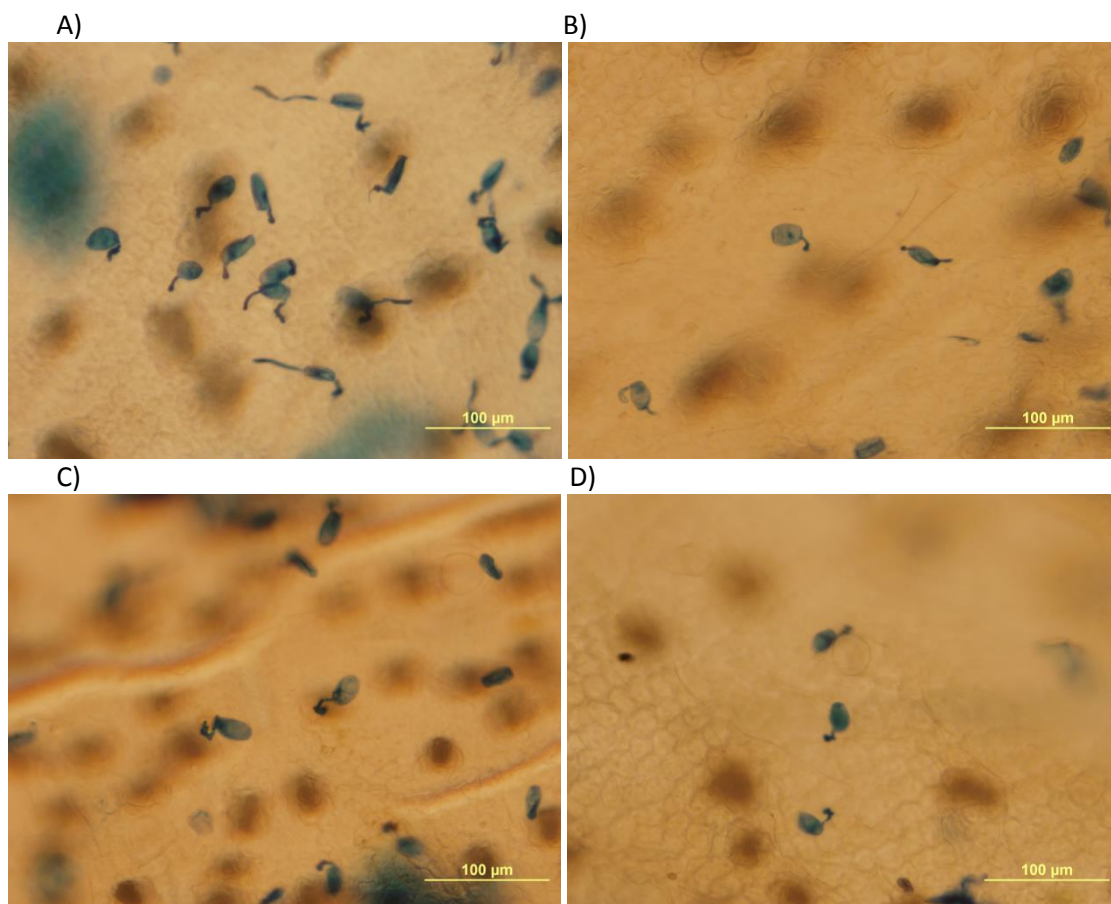
Obr. 26 : Průměrná délka klíčících vláken patogenu po inokulaci listových disků jednotlivých genotypů *Solanum* spp. 48 hpi.

Při procentuálním srovnání klíčivosti konidií bylo podle očekávání stanoveno, že nejvíce naklíčených konidií patogenu bylo detekováno na listových discích citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. *Amateur*, méně u *S. chmielewskii* a nejméně u rezistentního kultivaru *S. habrochaites* (Obr. 27). Úroveň rezistence genotypu *S. lycopersicum* cv. *MicroTom* na základě tohoto sledovaného parametru 24 hpi je mezi genotypy *S. habrochaites* a *S. chmielewskii*. 48 hpi byl počet naklíčených konidií na listech genotypu *S. lycopersicum* cv. *MicroTom* srovnatelný s počtem na genotypu *S. chmielewskii*.

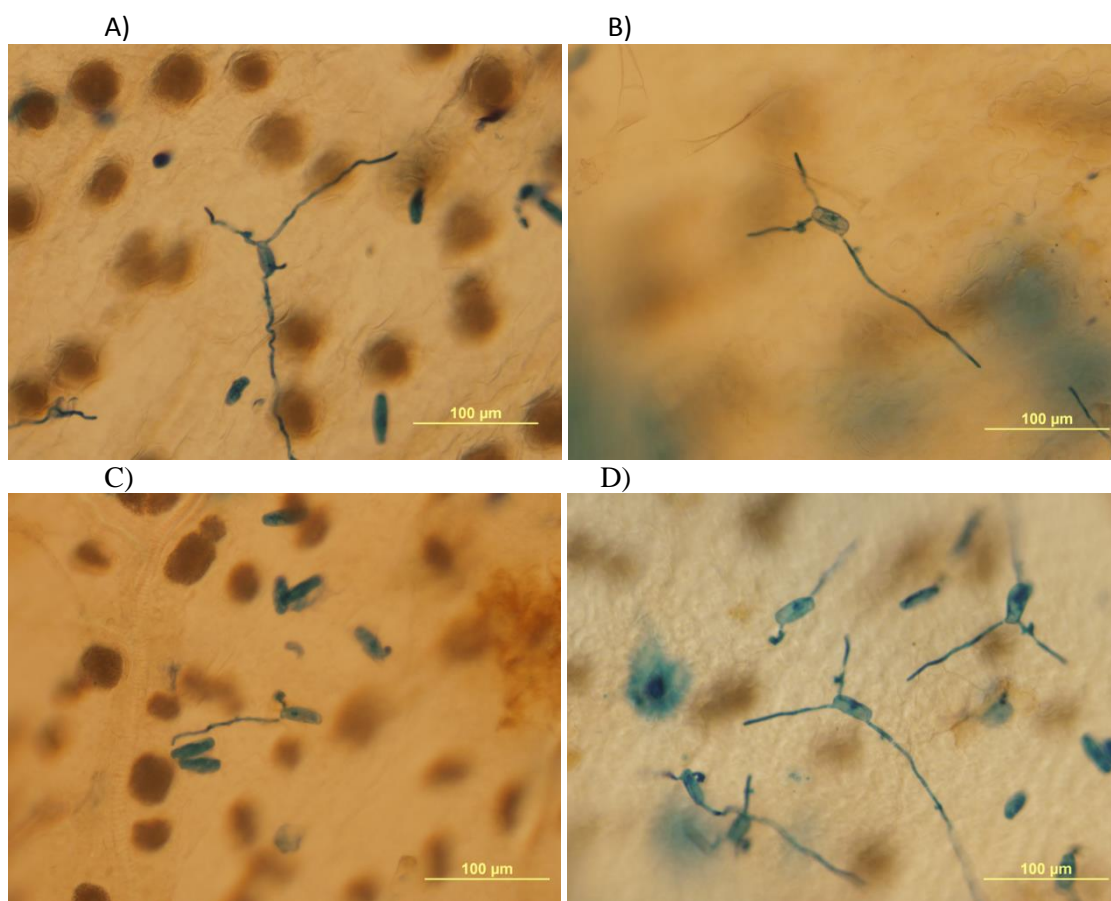


Obr. 27: Srovnání klíčivosti konidií na listových discích jednotlivých genotypů *Solanum* spp. 24 hpi a 48 hpi.

Všechny tři sledované parametry, které byly stanovené 24 a 48 h po inokulaci listových disků tří standardně studovaných rajčatových genotypů patogenem *O. neolycopersici*, tj. klíčivost konidií, počet vytvořených klíčících vláken patogenu a jejich délka, odpovídají výsledkům publikovaným ve studii Mlíčková *et al.* 2004 a Piterková *et al.* z roku 2011. Výsledky fytopatologické studie realizované v rámci řešení předložené bakalářské práce tedy potvrdily charakterizaci vybraných genotypů *Solanum* spp. na základě jejich rezistentních vlastností k patogenu *O. neolycopersici*. Genotyp *S. lycopersicum* cv. Amateur je citlivý, *S. chmielewskii* středně rezistentní a *S. habrochaites* rezistentní genotyp (Obr. 28 A-D, 29 A-D). Na základě porovnání hodnot výše uvedených parametrů je možné zařadit genotyp *S. lycopersicum* cv. MicroTom jako středně rezistentní, podobně jako *S. chmielewskii*. Zajímavé je, že vývoj patogenu v časných hodinách po inokulaci (24 hpi) je nejvýrazněji zpomalen právě u nově charakterizovaného genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom, který vykazuje rezistentnější vlastnosti v porovnání s genotypem *S. habrochaites* krátce po inokulaci. 48 hpi se výrazněji projevují obranné schopnosti genotypu *S. habrochaites* a genotyp *S. lycopersicum* cv. MicroTom vykazuje pouze středně rezistentní vlastnosti.



Obr. 28: Konidie patogenu 24 hpi na listových discích genotypu. A) *S. lycopersicum* cv. Amateur, B) *S. chmielewskii*, C) *S. habrochaites*, D) *S. lycopersicum* cv. MicroTom.



Obr. 29: Konidie patogenu 48 hpi na listových discích genotypu. A) *S. lycopersicum* cv. Amateur, B) *S. chmielewskii*, C) *S. habrochaites*, D) *S. lycopersicum* cv. MicroTom.

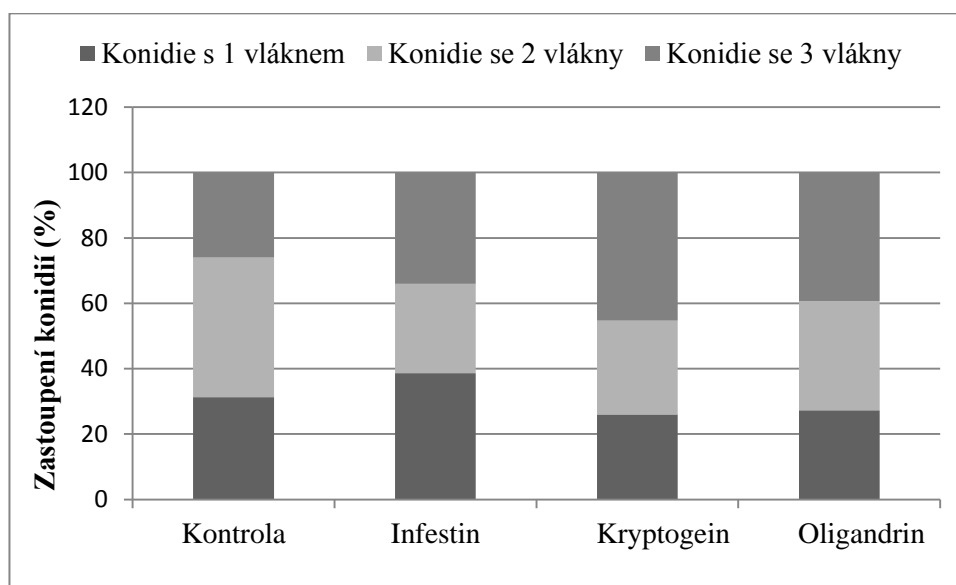
4.2. Vliv elicitinů na vývoj patogenu *Oidium neolycopersici* na listech *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom

Dalším cílem experimentální části práce bylo sledovat vliv aplikace vybraných elicitinů (infestinu, kryptogeinu a oligandrinu) na vývoj patogenu *O. neolycopersici* na listových discích genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom. Do listů byly vpraveny, metodou nasávání řapíkem listu, elicitiny o koncentraci 100 nM, v případě kontrolního vzorku se jednalo pouze o destilovanou vodu. 48 hodin po aplikaci elicitinů byly listy inokulovány patogenem. Po dalších 48 h byly z listů připraveny disky a po zviditelnění patogenních struktur bylo provedeno fytopatologické vyhodnocení. Vliv elicitinů na vývoj patogenu by vyhodnocen na základě srovnání zastoupení konidií s jedním, dvěma a třemi vlákny, srovnáním průměrné délky klíčících vláken a klíčivosti konidií. Interval 48 hodin po inokulaci patogenem byl zvolen z důvodu lépe patrných, větších rozdílů ve vývoji patogenních struktur, jak popisuje studie Mlíčkové *et al.*, z roku 2004 a je zřejmé z výsledků výše uvedené fytopatologické studie. Grafické vyhodnocení stanovených

parametrů je doplněno reprezentativní fotodokumentací konidií patogenu na listech ošetřených jednotlivými elicitiny.

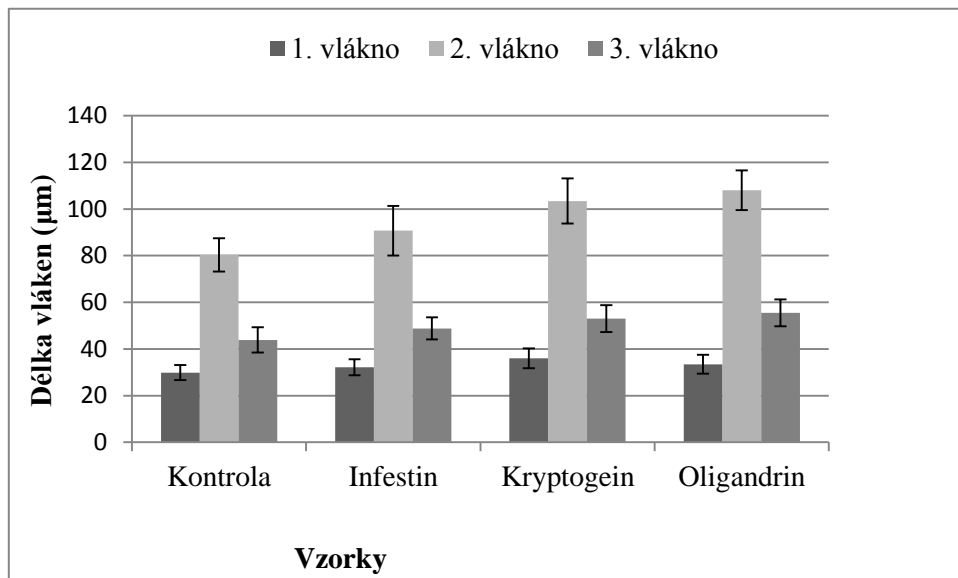
Po aplikaci elicitinů nebyla prokázána inhibice vývoje patogenu u genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom (Obr. 30). U elicitovaných vzorků bylo oproti kontrolnímu vzorku pozorováno zvýšení procentuálního zastoupení konidií se třemi vlákny,

a zároveň snížení počtu konidií pouze s jedním klíčícím vláknem. Nejmenší efekt na urychlení vývoje patogenu měl elicitin infestin. V případě aplikace infestinu byl počet stanovených konidií s jedním a třemi naklíčenými vlákny vyšší v porovnání s kontrolním vzorkem. Působení kryptogeinu a oligandrinu na vývoj patogenu bylo téměř srovnatelné.



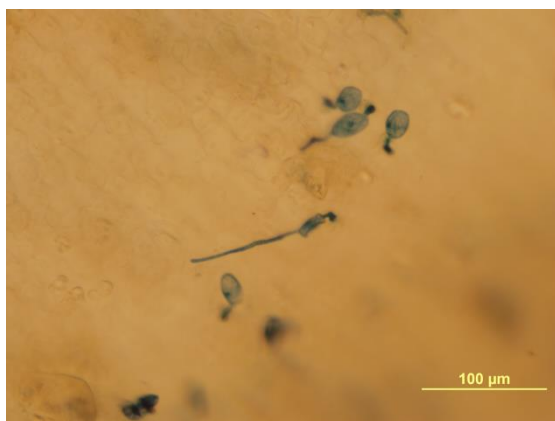
Obr. 30: Zastoupení konidií s jedním, dvěma a třemi vlákny u genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom po aplikaci elicitinů a následné inokulaci patogenem.

Při sledování průměrné délky jednotlivých vláken v závislosti na vlivu aplikace elicitinů byla zaznamenána ve všech případech větší průměrná délka klíčících vláken patogenu vyvíjejícího se na listech ošetřených elicitiny v porovnání s kontrolními vzorky. Nejmenší efekt byl pozorován v případě aplikace infestinu. Nejdelší klíčící vlákna byla detekována na listech ošetřených oligandrinem. Na rozdíl od předpokládaného efektu aplikace elicitinů na inhibici patogenese lze konstatovat, že za daného uspořádání experimentu nebyl vývoj patogenu v důsledku elicitace rostliny potlačen (Obr. 31, 32 A-D).

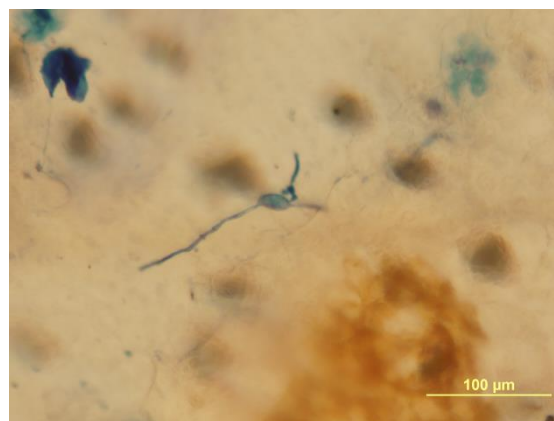


Obr.31: Průměrná délka klíčících vláken patogenu *O. neolycopersici* u genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom po aplikaci elicitinů a následné inokulaci patogenem.

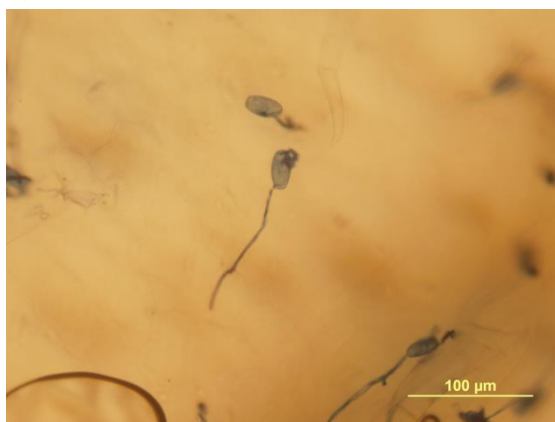
A)



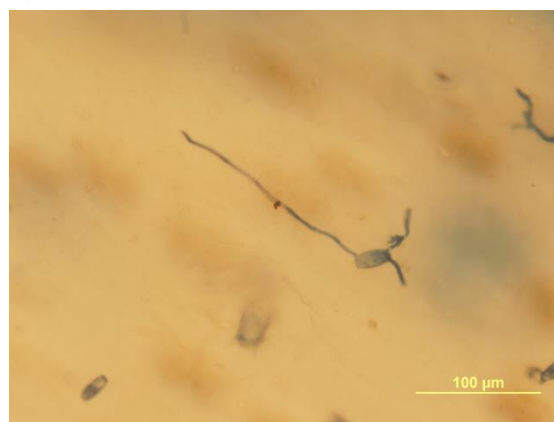
B)



C)



D)



Obr. 32: Konidie patogenu 48 hpi na listových discích genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom s aplikací A) Destilovaná voda, B) infestin, C) kryptogein, D) oligandrin.

Ve studii (Sátková 2016a, připravený manuskript) při aplikaci 1 µg elicitinu metodou tlakové infiltrace přímo do listového pletiva byl prokázán inhibiční efekt oligandrinu pouze v případě genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur na vývoj patogenu *Phytophthora parasitica* a *O. neolycopersici*. V případě genotypu *S. habrochaites* nebyl zaznamenán vliv aplikace elicitinu na vývoj patogenese. V práci Sátková *et al.* (2016b, připravený manuskript) byl prokázán inhibiční vliv oligandrinu i kryptogeinu, aplikovaných formou inkubace listových disků ve 100 nM roztoku elicitinů na vývoj patogenu

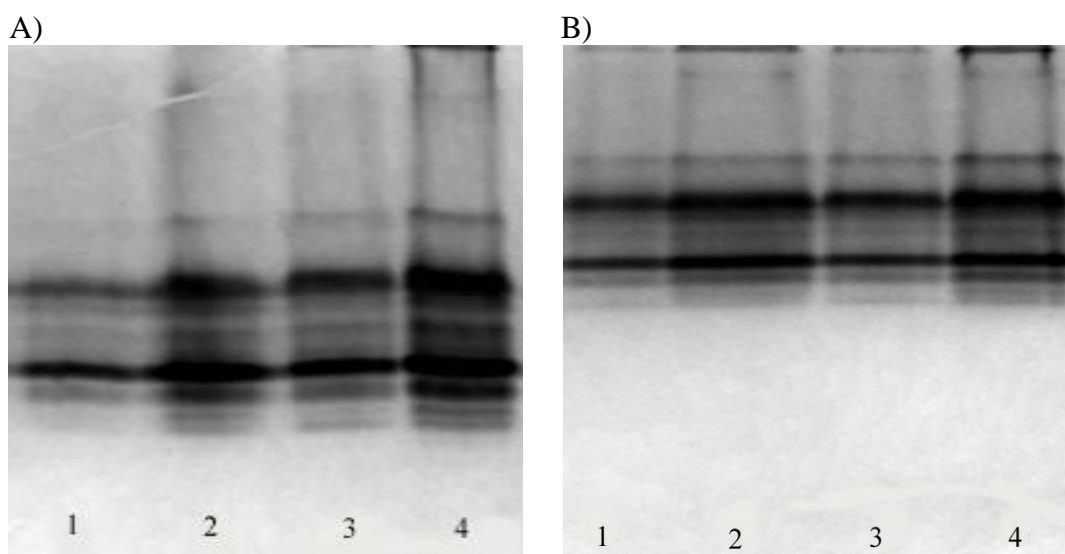
O. neolycopersici u studovaných genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*. Největší efekt byl detekován u rezistentního genotypu *S. habrochaites*. Kryptogein dokáže vyvolat lokální či systémovou rezistenci u rostlin a aktivovat obranné mechanismy vůči řadě patogenů jako je *P. parasitica* var. *nicotianae*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* a *Erysiphe cichoracearum* (Bonnet *et al.*, 1996; Blancard *et al.*, 1998). Bylo prokázáno omezení vývoje patogenu *P. parasitica* u tabáku po aplikaci tohoto elicitinu. (Dokládál *et al.*, 2012). Oligandrin, podle studií Picard *et al.* z roku 2000 a Benhamou *et al.* z roku 2001, vyvolal u rajčete obrannou reakci včetně zvýšení rezistence vůči *P. parasitica* a *Fusarium oxysporum* při aplikaci elicitinu metodou nasávání řápkem. Z výše uvedených studií je zřejmý vliv způsobu elicítace rostliny na následný efekt. Významnou roli bude mít reálná koncentrace elicitinu v listovém pletivu po aplikaci metodou tlakové infiltrace, nasávání řápkem, případně nasávání pletivem listových disků. Svou roli bude mít také schopnost jednotlivých genotypů v našem případě genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom aktivovat obranné mechanismy. Pro potvrzení vlivu způsobu elicítace, by v následujících experimentech měl být porovnán vliv rozdílné aplikace elicitinů na vybraném genotypu *Solanum* spp. a efekt elicítace u rostlin lišících se citlivostí na zvolený patogen, případně porovnat vliv různé koncentrace elicitinů.

4.3 Vliv elicitinů na produkci a aktivitu peroxidas

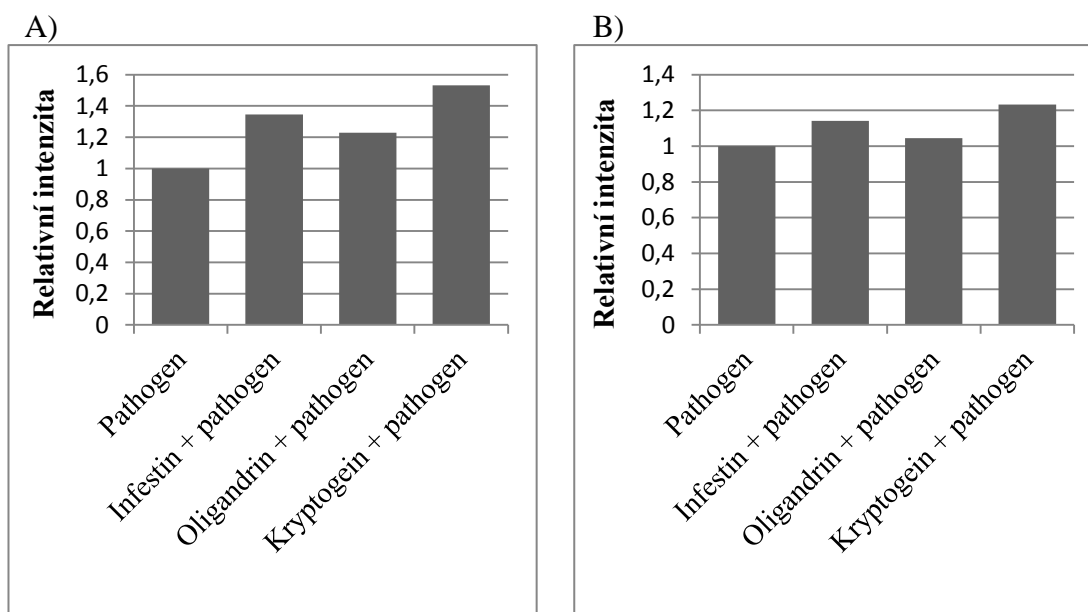
Askorbátperoxidasové izoenzymy tvoří důležitou antioxidační bariéru vyšších rostlin, řas a některých druhů sinic. Konkrétně při sekvenaci genomu *A. thaliana* bylo zaznamenáno 9 genů kódující APX (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). U rostlin jsou peroxidasy produkovány v cytosolu, peroxisomech, chloroplastech a mitochondriích (Ishikawa *et al.* 1998, De Leonardis *et al.*, 2000). Nejvýznamnější je cytosolická APX, protože jako první získává signál o působení stresoru a je schopná na

něj adekvátně reagovat (odbourávat ROS) a tím chránit buňku, popřípadě celé pletivo (Mittler a Zilinskas, 1992). Pro rostliny je velmi důležité udržovat vysoké hladiny askorbátu, aby byla zachována dostatečná antioxidační aktivita, která se dále zvyšuje při reakci na působení abiotických a biotických stresových faktorů, jako je např. sucho, teplo, působení patogenů či těžkých kovů (Mittler a Zilinskas, 1992; Shigeoka *et al.*, 2002).

Metodou nativní elektroforézy na polyakrylamidovém gelu byly detekovány izoenzymy peroxidasy u kontrolních a elicitovaných vzorků *S. lycopersicum* cv. MicroTom 48 hpi patogenem *O. neolyopersici* (Obr. 33 A, B). Byl testován 10 a 12% polyakrylamidový gel. Pro následující experimenty byl použit 10% gel. Získané výsledky vyhodnocení relativní intenzity bandů naznačují, že nejvíce stimulační vliv na produkci peroxidasy má aplikace kryptogeinu případně infestinu (Obr. 34 A, B). Z prvních pilotních experimentů je zřejmé, že po elicitaci a následné inokulaci patogenem byla detekována vyšší POX aktivita.

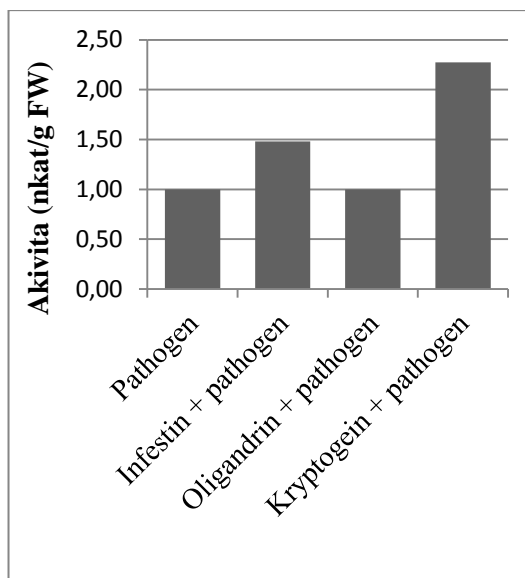


Obr. 33: Detekce izoenzymů s peroxidasovou aktivitou metodou nativní elektroforézy. Polyakrylamidový gel: A) 10%, B) 12%. *S. lycopersicum* cv. MicroTom po inokulaci patogenem *O. neolyopersici*: 1) kontrolní list, 2) list po elicitaci infestinem, 3) list po elicitaci oligandrinem, 4) list po elicitaci kryptogeinem.



Obr. 34: Vyhodnocení intenzity signálu (relativní jednotky vztaženy na vzorek 1): A) 10% gel, B) 12% gel. *S. lycopersicum* cv. MicroTom po inokulaci patogenem *O. neolyopersici*: 1) kontrolní list, 2) list po elicitaci infestinem, 3) list po elicitaci oligandrinem, 4) list po elicitaci kryptogeinem.

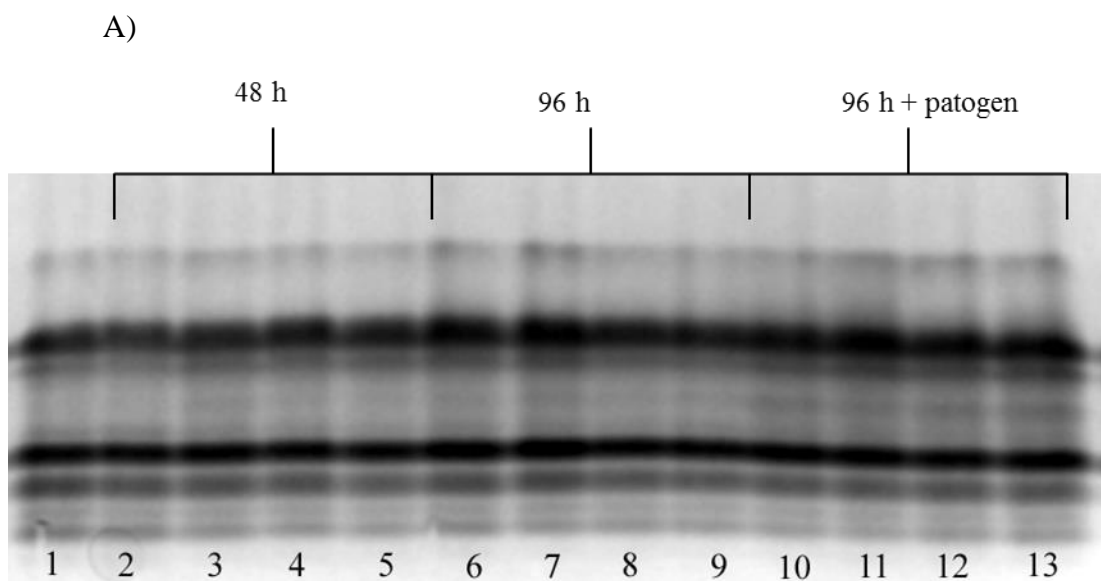
Výsledky detekce POX metodou nativní elektroforézy byly potvrzeny měřením POX aktivity spektrofotometricky guajakolovou metodou (Obr. 35). Rozdíly v aktivitě peroxidas u infikovaných vzorků v závislosti na aplikovaném elicitinu odpovídají výsledkům získaných při elektroforéze. Největší peroxidasová aktivita byla zaznamenána ve vzorcích po aplikaci kryptogeinu a infestinu. Infestin způsobil zvýšení peroxidasové aktivity téměř o 50%, po aplikaci kryptogeinu se produkce peroxidas zvýšila více než o 100% oproti kontrolnímu vzorku. Zvýšení peroxidasové aktivity po aplikaci elicitinů a v důsledku patogenese způsobuje snížení produkce ROS (Jiang a Miles, 1993). Zajímavé je, že aktivita peroxidas v případě působení oligandrinu byla srovnatelná s kontrolním vzorkem.



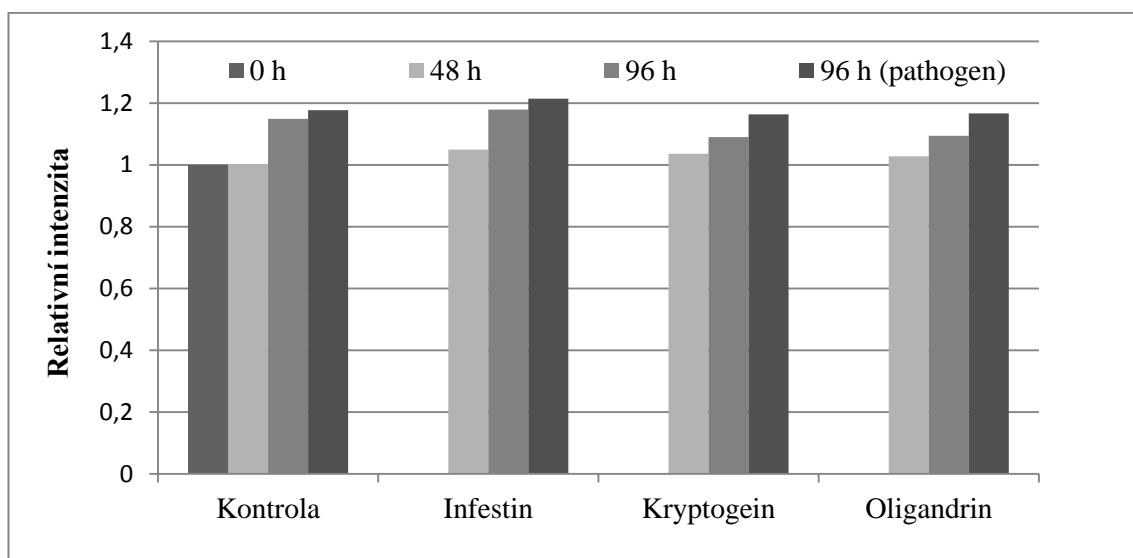
Obr. 35: Stanovení peroxidase aktivity v listových extraktech *S. lycopersicum* cv. MicroTom po aplikaci elicitinů. 48 hpi patogenem *O. neolycoopersici* listů 48 h po ošetření elicitinu (kontrolní vzorek aplikace destilované vody místo elicitinů).

Pro stanovení změn POX aktivity po elicitaci a následné infekci patogenem byly metodou nativní elektroforézy stanoveny změny v zastoupení izoenzymů a relativní POX aktivity u vzorků na začátku experimentu, 48 h po elicitaci a dále 48 h po následné inokulaci patogenem. Do kontrolních listů byla aplikována namísto elicitinu destilovaná voda. Po vyhodnocení relativní intenzity bandů nebyly patrné u jednotlivých vzorků výrazné změny v produkci peroxidase (obr 36 A-B). Na základě vyhodnocení gelů lze předpokládat možnou kontaminaci jednotlivých vzorků při aplikaci sousedních vzorků (použit hřebínek pro přípravu 15 jamek), což mohlo vést k eliminaci rozdílů intenzity bandů po nativní elektroforéze a vizualizaci POX aktivity. Tento předpoklad potvrzují jednak výsledky pilotních experimentů, kdy bylo na gel nanášeno menší množství vzorků (použit hřebínek pro přípravu 10 jamek) a také výsledky stanovení POX aktivity guajakolovou metodou.

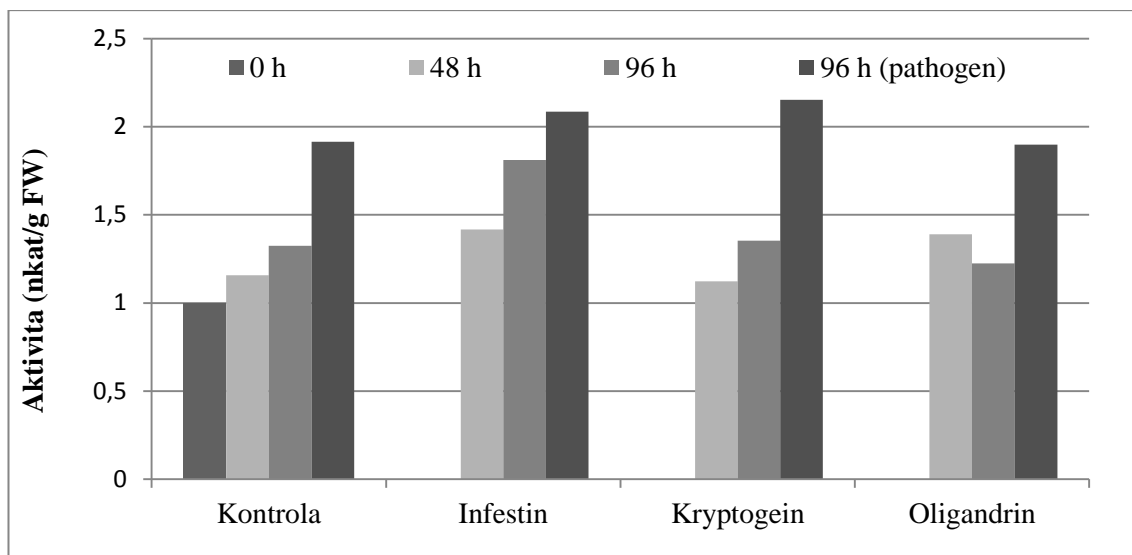
Při stanovení peroxidase aktivity (Obr. 37) byly pozorovány významnější rozdíly mezi jednotlivými testovanými vzorky v porovnání s výsledky získanými po vyhodnocení POX aktivity detekované metodou nativní elektroforézy. Největší vliv na stimulaci aktivity peroxidase měla aplikace kryptogeinu a infestinu po inokulaci patogenem. Je zajímavé, že aplikace kryptogeinu po 48 h ani po 96 h neměla vliv na aktivaci POX aktivity, ta byla pozorovaná až v případě inokulace listů ošetřených kryptogeinem. Naopak výrazné změny v POX aktivitě byla patrné po aplikaci infestinu, kdy došlo ke stimulaci POX aktivity.



B)



Obr. 36: Stanovení peroxidasové aktivity v listových extraktech *S. lycopersicum* cv. MicroTom 48 a 96 h po aplikaci elicitinů a 48 hpi patogenem *O. neolycopersici* listů 48 h po ošetření elicitiny (kontrolní vzorek -aplikace destilované vody místo elicitinů). A) Nativní elektroforéza s detekcí peroxidasové aktivity, B) vyhodnocení intenzity signálu bandů po nativní elektroforéze (relativní jednotky – vztaženo na vzorek 1). Vzorek 1) Kontrola - 0 h; 48 h po aplikaci: 2) vody – kontrola, 3) infestinu, 4) kryptogeinu, 5) oligandrinu; 96 h po aplikaci: 6) vody – kontrola, 7) infestinu, 8) kryptogeinu, 9) oligandrinu; 48 hpi patogenem *O. neolycopersici* listů 48 h po aplikaci (tj. 96 h po zahájení experimentu) 10) vody – kontrola, 11) infestinu, 12) kryptogeinu, 13) oligandrinu.



Obr. 37: Stanovení peroxidase aktivity guajakolovou metodou. Vzorek 1) Kontrola - 0 h; 48 h po aplikaci; 2) vody – kontrola, 3) infestinu, 4) kryptogeinu, 5) oligandrinu; 96 h po aplikaci; 6) vody – kontrola, 7) infestinu, 8) kryptogeinu, 9) oligandrinu; 48 hpi patogenem *O. neolyopersici* listů 48 h po aplikaci (tj. 96 h po zahájení experimentu) 10) vody – kontrola, 11) infestinu, 12) kryptogeinu, 13) oligandrinu.

Podobně jako v případě našich pilotních experimentů ve studii Bariya *et al.* (2011) bylo detekováno zvýšení aktivity antioxidantních enzymů (POX, ale také SOD a CAT) v průběhu prvních tří dnů po elicitaci purifikovaným infestinem, případně filtrátem houbové kultury *P. infestans* s infestinem do listů *Solanum tuberosum*. Rychlost zvýšení enzymové aktivity byla nejvyšší v případě aplikace purifikovaného infestinu oproti filtrátům. Vyšší peroxidase, polyfenoloxidase a fenylalaninamonniaklyasová aktivita byla naměřena po elicitaci oligandrinem v průběhu infekce patogenem *Botrytis cinerea* u rajčete *Solanum lycopersicum* HeZuo903 p (Lou *et al.*, 2011) Edreva *et al.* (2002) se zaměřil na studium peroxidase, β -1,3-glukanasové a β -glukosidasové aktivity u tabáku cv. Xanthi po aplikaci β -kryptogeinu. V průběhu prvních tří dnů byla zaznamenána významně zvýšená aktivita peroxidase (asi o 630% vyšší) oproti kontrolním rostlinám.

4.4. Vliv aplikace elicitinů na produkci Hsp 70

Hsp70 (heat shock protein 70) představují skupinu vysoce homologních proteinů, které se vyskytují v určité podobě v buňkách všech organismů. Fungují jako molekulární chaperony, které ovlivňují proteinové konformace tím, že napomáhají opětovnému sbalení polypeptidů a to především při působení stresorů jako je teplo anebo chemické látky (Hartl *et al.*, 1992). Hsp70 se po vazbě ATP dostává do otevřené konformace, v níž je schopen vázat hydrofobní části špatně složených proteinů.

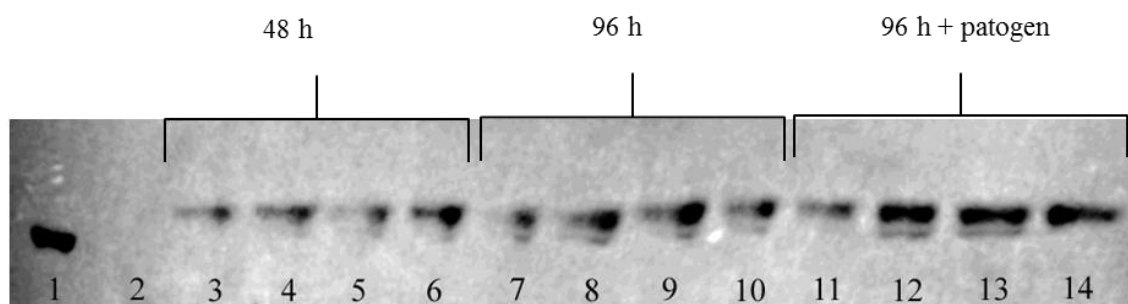
Následně dochází k hydrolyze ATP a uzavření chaperonového komplexu, tak dostává protein možnost sbalit se do správného prostorového uspořádání (Lodish *et al.*, 2004). Hsp70 se dále podílí na transportu bílkovin do plastidů a mitochondrií, kde dochází ke správnému prostorovému uspořádání proteinů s využitím zde lokalizovaných Hsp70 (Vierling, 1991).

Hsp70 jsou produkovány i za fyziologických podmínek, kdy v případě vystavení organismu působení stresových faktorů (např. teplotnímu šoku, suchu, vysoké koncentraci soli) dochází ke zvýšené akumulaci Hsp70 v buňce (Vierling, 1991). Kromě toho se Hsp70 účastní také ABA-dependentních reakcí nebo vývoje chloroplastů (Clement *et al.*, 2011). Tyto proteiny navíc hrají významnou roli v případě zvyšování rezistence rostlin vůči patogenům, jak bylo prokázáno např. u tabáku při patogenesi *Pseudomonas chicorii*, nebo v případě *A. thaliana* bakteriální či oomycetové infekce (Kanzaki *et al.*, 2003; Noel *et al.*, 2007).

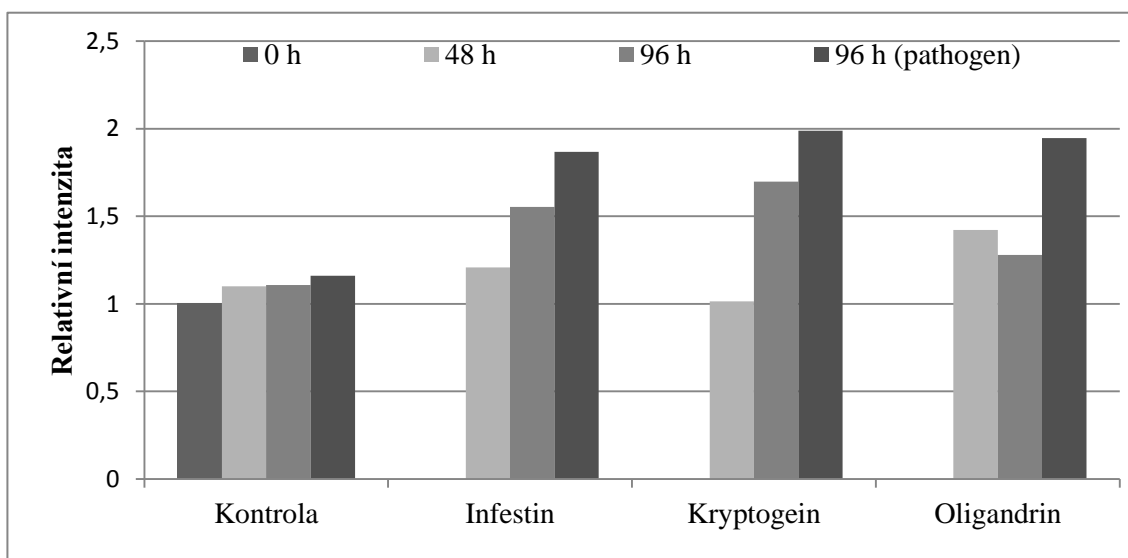
Pro detekci změn v produkci Hsp70 vlivem elicitace a inokulace patogenem *O. neolycopersici* byly použity vzorky odebrané v časových intervalech 48 a 96 h po aplikaci elicitinů a 48 h po následné inokulaci patogenem listů (inokulace 48 h po elicitaci). Na základě vyhodnocení relativní intenzity bandů (vztaženo na kontrolní vzorek č. 2) byla prokázána zvýšená produkce Hsp70 po elicitaci a po následné inokulaci patogenem. 48 h po elicitaci byla detekována zvýšená produkce zejména po elicitaci oligandrinem a infestinem. 96 h po elicitaci byla hladina Hsp70 nejvyšší u listů ošetřených infestinem a kryptogeinem. Významně zvýšená produkce Hsp70 byla detekována po inokulaci *O. neolycopersici* listů 48 h po elicitaci všemi testovanými elicitiny, v porovnání s kontrolním vzorkem, kdy místo elicitinů byla aplikována do listu pouze voda (Obr. 38 A-B).

Produkcí Hsp70 v závislosti na různých stresových faktorech (bez působení elicitinů) studovala Piterková *et al.* (2013) na listových discích genotypů *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. chmielewskii*, kdy produkce Hsp70 po samotné inokulaci patogenem nebyla příliš výrazná, což koresponduje s našimi výsledky (viz kontrolní vzorek), ale působením kombinace teplotního stresu a současné inokulace patogenem došlo k intenzivnější akumulaci HSP70.

A)



B)



Obr. 38: Stanovení Hsp70 metodou Western blot v listových extraktech *S. lycopersicum* cv. MicroTom 48 a 96 h po aplikaci elicitinů a 48 hpi patogenem *O. neolyopersici* listů 48 h po ošetření elicitinů (kontrolní vzorek - aplikace destilované vody místo elicitinů). A) Imunodetekce Hsp70, B) vyhodnocení intenzity signálu bandů po imunodetekci Hsp70 (relativní jednotky – vztaženo na vzorek 2). Vzorek 1) Standard Hsp70 (0,2 µg/ml), 2) Kontrola - 0 h; 48 h po aplikaci: 3) vody – kontrola, 4) infestinu, 5) kryptogeinu, 6) oligandrinu; 96 h po aplikaci: 7) vody – kontrola, 8) infestinu, 9) kryptogeinu, 10) oligandrinu; 48 hpi patogenem *O. neolyopersici* listů 48 h po aplikaci (tj. 96 h po zahájení experimentu) 11) vody – kontrola, 12) infestinu, 13) kryptogeinu, 14) oligandrinu.

4.5. Vliv aplikace elicitinů na expresi genu pro S-nitrosoglutathionreduktasu a na aktivitu tohoto enzymu

GSNOR patří do skupiny alkoholdehydrogenas třídy III, pro které je charakteristická vysoká afinita vůči alkoholům s delším řetězcem (Staab *et al.*, 2008). Tento enzym se uplatňuje zejména v regulaci hladiny S-nitrosothiolů a při katabolismu S-nitrosoglutathionu, čímž se aktivně zapojuje do metabolismu NO a RNS (Benhar *et al.*, 2009). Kromě toho se GSNOR účastní obranných mechanismů vůči abiotickým stresovým faktorům a mechanismu termotolerance a adaptace rostlin na vysoké teploty

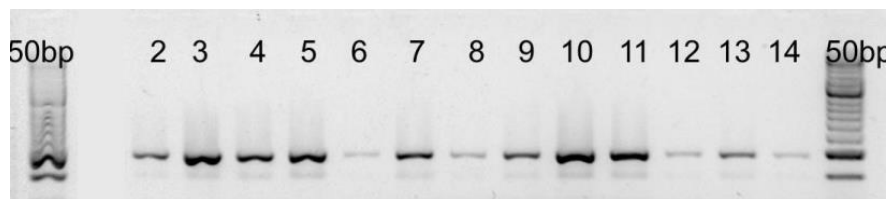
(Lee *et al.*, 2008). GSNOR je zapojena i v obranných mechanismech vůči patogenům, jak prokázala např. studie Rusterucci *et al.* (2007), kdy transgenní izolát *A. thaliana* se sníženou hladinou GSNOR vykazoval vyšší odolnost vůči *Peronospora parasitica*, což zároveň koreluje s vyšší hladinou intracelulárních S-nitrosothiolů a aktivací *PR-I* genů. Bylo prokázáno, že GSNOR hraje důležitou roli při dalších bakteriálních či houbových infekcích (Leterrier *et al.* 2011).

Součástí experimentální části práce byla realizace orientačních – pilotních experimentů zaměřených na detekci aktivity GSNOR a expresi genu kódujícího enzym GSNOR, který se podílí na regulaci homeostázy NO a dalších RNS, ve vztahu k reakci rostliny na elicitaci a následnou inokulaci patogenem. Při detekci genové exprese GSNOR pomocí PCR metody a agarosové elektroforézy (jako housekeepingový (provozní) gen byl použit elongační faktor EF-1 α) v případě kontrolních experimentů u *S. lycopersicum* cv. MicroTom byl detekován cca 20% pokles genové exprese, což může být spojeno s mechanickým poškozením rostliny (uříznutí listů) (Obr. 39). Podobně v práci Achkor *et al.* (2003) při studiu GSNOR zjistili, že dochází ke snížení exprese genu pro GSNOR v případě mechanického poškození rostliny. 48 h po elicitaci jsme pozorovali významný pokles exprese genu pro GSNOR. Při elicitaci kryptogeinem se jednalo až o až 60% snížení exprese. Následně, 96 h po elicitaci, bylo zaznamenáno zvýšení exprese *GSNOR* v porovnání s hodnotami stanovenými 48 h po elicitaci. V případě aplikace oligandrinu byla exprese genu pro GSNOR 96 h po elicitaci srovnatelná s kontrolním vzorkem při zahájení experimentu. V případě inokulace patogenem 96 h po zahájení experimentu jsme detekovali u kontrolních vzorků zvýšení exprese *GSNOR*. Infekce patogenem se v případě elicitovaných listů naopak projevila poklesem genové exprese, který byl nejvýraznější v případě elicitinů infestinu a kryptogeinu (Obr. 40).

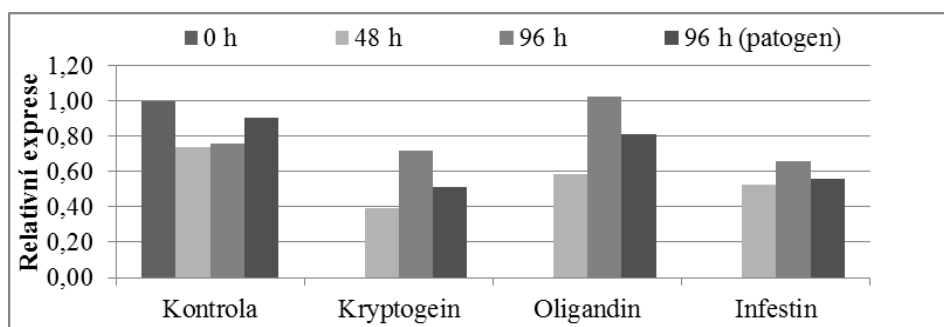
Posledním ze serie pilotních experimentů v rámci experimentální části bakalářské práce bylo stanovení aktivity enzymu GSNOR po inokulaci patogenem *O. neolycopersici* listů rajčete 48 h po elicitaci. Změny v expresi genu pro GSNOR 96 h po zahájení experimentu korespondují se změnami GSNOR aktivity v listech *S. lycopersicum* cv. MicroTom po elicitaci infestinem a kryptogeinem a následné inokulaci patogenem. V případě vzorku ošetřeného oligandrinem byla detekována vyšší aktivita GSNOR v porovnání s kontrolním experimentem. Studium vlivu kryptogeinu na aktivitu GSNOR u *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi se zabývala ve své diplomové práci

Jendrišáková (2015), kdy po aplikaci kryptogeinu u neinokulovaného vzorku zaznamenala pokles enzymové aktivity.

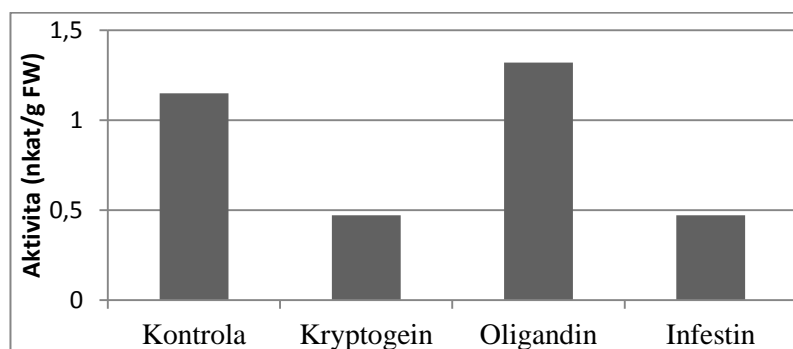
A)



B)



Obr. 39: Stanovení změn v expresi genu pro GSNOR v listech *S. lycopersicum* cv. MicroTom 48 a 96 h po aplikaci elicitinů a 48 hpi patogenem *O. neolyopersici* listů 48 h po ošetření elicitiny (kontrolní vzorek - aplikace destilované vody místo elicitinů). A) Agarosová elektroforesa po PCR. B) Vyhodnocení relativní exprese po vztažení na housekeepingový (provozní) gen - elongační faktor EF-1 α . Vzorek 2) kontrola - 0 h, 3) 48 h po aplikaci vody, 4) 96 h po aplikaci vody, 5) 96 h po aplikaci kryptogeinu a 48 h po inokulaci *O. neolyopersici* 6) 48 h po aplikaci kryptogeinu, 7) 96 h po aplikaci kryptogeinu, 8) 96 h po aplikaci kryptogeinu a 48 h po inokulaci *O. neolyopersici*, 9) 48 h po aplikaci oligandrinu, 10) 96 h po aplikaci oligandrinu, 11) 96 h po aplikaci oligandrinu a 48 h po inokulaci *O. neolyopersici*, 12) 48 h po aplikaci infestinu, 13) 96 h po aplikaci infestinu 96 h, 14) 96 h po aplikaci infestinu a 48 h po inokulaci *O. neolyopersici*.



Obr. 40: Stanovení aktivity GSNOR. 48 h po inokulaci patogenem *O. neolyopersici* listů *S. lycopersicum* cv. MicroTom 48 h po elicitaci kryptogeinem, oligandrinem a infestinem. (Uvedeny relativní hodnoty po vztažení na aktivitu v kontrolním listu v čas 0, tj. zahájení experimentu).

5. Závěr

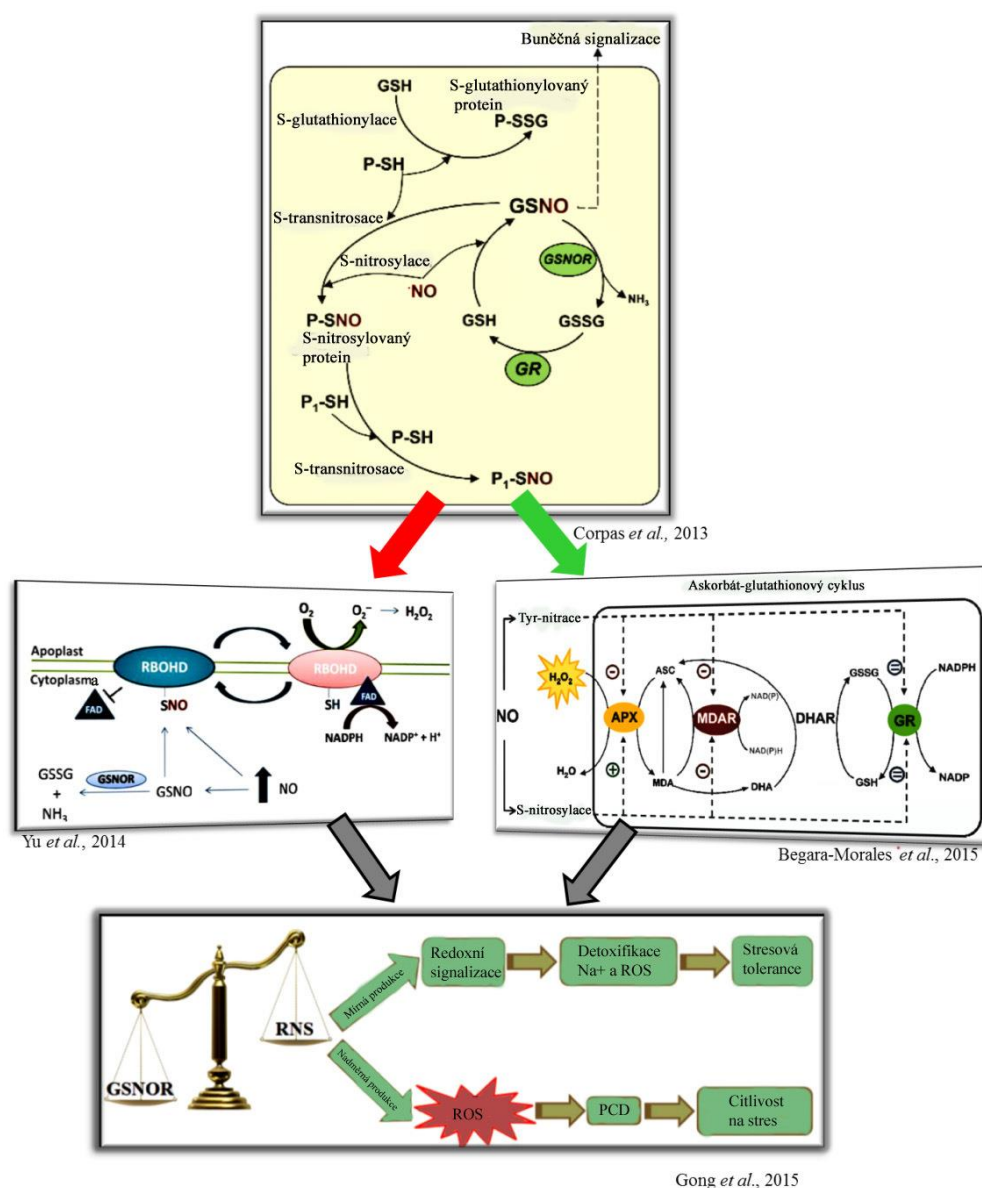
Předložená bakalářská práce byla zejména zaměřena na fytopatologickou studii s cílem stanovit citlivost/rezistenci genotypu *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom na patogen *Oidium neolycopersici* a vliv elicitace kryptogeinem, oligandrinem a infestinem na vývoj patogenních struktur *Oidium neolycopersici*. Tato studie byla doplněna pilotními experimenty zaměřenými na detekci peroxidásové aktivity, stanovení produkce Hsp70 a detekci exprese a aktivity GSNOR. Cílem této části bylo získat orientační výsledky vlivu elicitace na dané parametry a seznámit se s širokou škálou experimentálních metod, které budou využívány v rámci řešení následné diplomové práce.

Z výsledků a diskuse práce vyplývají následující závěry:

- Genotyp *S. lycopersicum* cv. MicroTom lze zařadit mezi středně rezistentní genotypy vůči patogenu *Oidium neolycopersici*.
- Aplikace elicitinů podpořila růst patogenu v případě genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom.
- Byl pozorován výrazný vliv infestinu na zvýšení peroxidásové aktivity. Po inokulaci patogenem byla vyšší peroxidásová aktivita detekována u vzorků po elicitaci infestinem a kryptogeinem ve srovnání s oligandrinem a kontrolním vzorkem.
- Aplikace elicitinů výrazně aktivovala produkci Hsp70, která byla dále zesílena vlivem infekce *O. neolycopersici*.
- Vlivem mechanického poškození byla potlačena exprese GSNOR.
- Po elicitaci kryptogeinem, infestinem i oligandrinem byl zaznamenán pokles exprese genu pro GSNOR.
- Po inokulaci patogenem *O. neolycopersici* po elicitaci kryptogeinem a infestinem byl pozorován pokles aktivity GSNOR. Naopak v případě kontrolních vzorků a po elicitaci oligandrinem byla aktivita GSNOR zvýšena.

V rámci následující studie bude porovnán vliv způsobu elicitace (nasávání, tlaková infiltrace) rostliny a vliv koncentrace použitého elicitinu na rezistenci u vybraných genotypů *Solanum* spp. Pro potvrzení vlivu elicitace v následujících experimentech bude porovnán efekt elicitace u rostlin lišících se citlivostí na zvolený patogen.

V práci se zaměříme na studium úlohy a zapojení GSNOR v regulaci obranných mechanismů po elicitaci a případně i následné infekci patogenem. S cílem sledovat vzájemné vazby mezi regulací hladiny ROS a RNS na úrovni S-nitrosylace klíčových enzymů regulujících aktivitu enzymů podílejících se na produkci ROS, případně RNS. Vycházet budeme z prací (Corpas *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014; Begara-Morales *et al.*, 2015; Gong *et al.*, 2015).



Obr. 41. Úloha S-nitrosylace v regulaci hladiny reaktivních forem kyslíku (převzato z Corpas *et al.*, 2013; Yu *et al.* 2014; Begara-Morales *et al.*, 2015; Gong *et al.*, 2015).

6. Literatura

- Abdeen A., Virgós A., Olivella E., Villanueva J., Avilés X., Gabarra R., Prat S. (2005): Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology* **57**, 189-202.
- Achkor H., Díaz M., Fernández M. R., Biosca J. A., Parés X., Martínez M. C. (2003): Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant physiology* **132**, 2248-2255.
- Albersheim P., Ayers A. R., Valent B. S., Ebel J., Hahn M., Wolpert J., Carlson R. (1977): Plants interact with microbial polysaccharides. *Journal of supramolecular structure* **6**, 599-616.
- Angelova Z., Georgiev S., Roos W. (2006): Elicitation of plants. *Biotechnology and Biotechnological equipment* **20**, 72-83.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J. (2011). Understanding the fate of peroxyntrite in plant cells from physiology to pathophysiology. *Phytochemistry* **72**, 681–688.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Gwozdz E. A. (2011): The message of nitric oxide in cadmium challenged plants. *Plant Science: an international journal of experimental plant biology* **181**, 612–620.
- Arredondo C. R., Davis R. M., Rizzo D. M., Stahmer R. (1996): First report of powdery mildew of tomato in California caused by an *Oidium* sp. *Plant Disease* **80**, 1303.
- Asai S., Ohta K., Yoshioka H. (2008): MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **20**, 1390-1406.
- Bai, Y., van der Hulst, R., Bonnema, G., Marcel, T. C., Meijer-Deckens, F., Niks, R. E., & Lindhout, P. (2005): Tomato defense to *Oidium neolycopersici*: Dominant *Ol* genes confer isolate-dependent resistance via a different mechanism than recessive *ol-2*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **18**, 354–362.
- Bailey-Serres J, Mittler R. (2006): Special issue on reactive oxygen species. *Plant Physiology* **141**, 311–508.
- Bariya H. S., Thakkar V. R., Thakkar A. N., Subramanian R. B. (2011): Induction of systemic resistance in different varieties of *Solanum tuberosum* by pure and crude elicitor treatment. *Indian Journal of Experimental Biology* **49**, 151-162.
- Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Mata-Pérez C., Valderrama R., Padilla M. N., López-Jaramillo J., Luque F., Corpas F. J., Barroso J. B. (2015): Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathion reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1-14.
- Bendel, C. M., Hostetter, M. K. (1993): Distinct mechanism of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Clinical Investigation* **92**, 1840–1849.
- Benhamou N., Bélanger R. R., Rey P., Tirilly Y. (2001): Oligandrin, the elicitor like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium crown and root rot* in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 681–698.
- Bent A. F. (1996): Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* **8**, 1757–1771.
- Berridge M. J. (1993): Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* **361**, 315-325.
- Bestwick C. S., Bennett M. H., Mansfield J. W. (1995): Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the HR in lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Physiology* **108**, 503–516.
- Bhattacharjee S. (2012): The language of reactive oxygen species signalling in plants. *Journal of Botany* **2012**, 1-22.
- Blancard D., Coubard C., Bonnet P., Lenoir M., Ricci P. (1998): Mise en évidence d'une protection non spécifique induite par la cryptogéine sur la tige et les feuilles de tabac vis-à-vis de 5 champignons phytopathogènes. *Ann. du Tabac* **30**, 11–20.
- Blein J.P., Thévenot P.C., Marion D., Ponchet M. (2002): From elicitors to lipid transfer proteins: a new insight in cell signaling involved in plant defense mechanisms. *Trends in plant science* **7**, 293- 294.

- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003): Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**, 179-194.
- Blumwald E., Aharon G.S., Lam C.H.B. (2015): Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends in plant science* **3**, 342-346.
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J. P., Ricci P. (1996): Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 181.
- Boudsocq M., Willmann M. R., McCormack M., Lee H., Shan L., He P., Bush J., Cheng S. H., Sheen J. (2010): Differential innate immune signalling via Ca²⁺-sensor protein kinases. *Nature* **464**, 418-422.
- Bowler C., Neuhaus G., Yamagata H., Chua N. H. (1994): Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**, 73 – 81.
- Braun U., Cook R. T. A., (2012): Taxonomic manual of the *Erysiphales* (Powdery Mildews). *CBS Biodiversity Series* **11**, 1-707.
- Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. (2000): Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (Gruissem W., Buchanan B., Jones R.), American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1158–1249.
- Broniowska K. A., Diers A. R., Hogg N. (2013): S-nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3173–3181.
- Chaki M., Fernández-Ocaña A. M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F. J., Luque F., Gómez-Rodríguez M. V., Begara-Morales M. C., Corpas M. J., Barroso J. B. (2009) Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant Cell Physiology* **50**, 265–279.
- Choudhury S., Panda P., Sahoo L., Panda S. K. (2013): Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signalling & Behavior* **8**, e23681-e23681-6.
- Chung I. M., Park M. R., Rehman S., Yun S. J. (2001): Tissue specific and inducible expression of resveratrol synthase gene in peanut plants. *Molecules and Cells* **12**, 353–359.
- Clement M., Leonhardt N., Droillard M.J., Reiter I., Montillet J.L., Genty B., Lauriere C., Nussaume L., Noel L.D. (2011): The cytosolic/nuclear HSC70 and HSP90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid-dependent physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **156**, 1481–1492.
- Cohen, Y., Eyal, H., & Harania, J. (1990): Ultrastructure, autofluorescence, callose deposition and lignification in susceptible and resistant muskmelon leaves infected with the powdery mildew fungus *Sphaerotheca fuliginea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **36**, 191–204.
- Collinge D. B., Bryngelsson T., Gregersen P. L., Thordal-Christensen H., Tronsmo A. M. (1993): The molecular and biochemical basis of plant disease resistance. *Växtskyddsnotiser* **57**, 102-107.
- Cooke, M. C., Masee, G. (1888): Australasian fungi. *Grevillea* **16**, 114.
- Corbaz R. (1993): Spread of a powdery mildew of the *Cucurbitaceae* (*Erysiphe cichoracearum*) to tomatoes. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* **25**, 389–391.
- Corpas F. J., Barroso J. B., Carreras A., Valderrama R., Palma J. M., Leon A. M., Sandalio L. M., del Río L. A. (2006): Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**, 246–254.
- Corpas F. J., Palma J. M., del Río L.A., Barroso J.B. (2013): Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**, 29.
- Corrêa, A., Staples, R. C. and Hoch, H. C. (1996): Inhibition of most stimulated cell differentiation with RGD-peptides in *Uromyces* germlings. *Protoplasma* **194**, 91–102.
- Dat, J.; Vandenabeele, S.; Vranová, E.; van Montagu, M.; Inzé, D.; van Breusegem, F. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 779–795.
- Dean J. V., Harper J. E. (1988): The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant physiology* **88**, 389-395.
- De Jong C. F., Laxalt A. M., Bargmann B. O., De Wit P. J., Joosten M. H., Munnik T. (2004): Phosphatidic acid accumulation is an early response in the Cf-4/Avr4 interaction. *Plant Journal* **39**, 1-12.

- De Leonardis S., Dipierro N., Dipierro S. (2000): Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 773-779.
- De Wit P. J. G. M. (1995) Fungal avirulence genes and plant resistance genes: unravelling the molecular basis of gene for gene interactions. *Advances in Botanical Research* **21**, 148–177.
- Dixon M. S., Golstein C., Thomas C. M., van der Biezen E. A., Jones J. D. G. (2000): Genetic complexity of pathogen perception by plants: the example of *Rcr3*, a tomato gene required specifically by *Cf-2*. *Proceedings of the national academy of sciences of United States of America* **97**, 8807-8814.
- Dokládál L., Obořil M., Stejskal K., Zdráhal Z., Ptáčková N., Chaloupková R., Damborský J., Kašparovský T., Jeandroz S., Žďárská M., Lochman J. (2012): Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2203–2215.
- Ebel J., Scheel D. (1997): Signals in host–parasite interactions. In: *The Mycota; Vol. V, Plant Relationships, Part A*. (Carroll G. C., Tudzynski P.), Berlin, Springer-Verlag, 85-105.
- Edreva A., Blancard D., Delon R., Bonnet P., Ricci P. (2002): Biochemical changes in β -cryptogein-elicited tobacco: A possible basis of acquired resistance. *Contributions to Tobacco Research* **20**, 53-59.
- Espunya M. C., Díaz M., Moreno-Romero J., Martínez M. C. (2006): Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell and Environment* **29**, 1002–1011.
- Falk S. P., Gadoury D. M., Pearson R. C., Seem R. C. (1995): Partial control of grape powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Plant Disease* **79**, 483–490.
- Farmer E. E., Almeras E., Krishnamurthy V. (2003): Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 372-378.
- Fefeu S., Bouaziz S., Guittet E., Huet J. C., Pernollet J. C. (1997): Three dimensional solution structure of beta cryptogein, a beta elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Science: a publication of the Protein Society* **6**, 2279-2284.
- Ferrari S., Sella L., Janni M., Favaron F., D'Ovidio R. (2012): Transgenic expression of polygalacturonase-inhibiting proteins in *Arabidopsis* and wheat increases resistance to the flower pathogen *Fusarium graminearum*. *Plant Biology* **14**, 31–38.
- Fletcher, J. T., Smewin B. J., Cook, R.T.A. (1988): Tomato powdery mildew. *Plant Pathology*. **37**, 594–598.
- Foyer C. H., Noctor G. (2009): Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**, 861–905.
- Freschi L. (2013): Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **4**, 398
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006): Review: Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 711-724.
- Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J. F., Dommes J. (2002): Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* **37**, 263–285.
- Gaupels F., Kuruthukulangarakoola G. T., Durner J. (2011): Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 707–714.
- Godber B. L., Doel J. J., Sapkota G. P., Blake D. R., Stevens C. R., Eisenthal R., Harrison R. (2000): Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7757–7763.
- Gong B., Wen D., Wang X., Wei M., Yang F., Li Y., Shi Q. (2015): S-nitroglutathione reductase-modulated redox signaling controls sodic alkaline stress responses in *Solanum lycopersicum* L. *Plant and cell physiology* **56**, 790-802.
- Gorjanovic' S. (2009): A review: biological and technological functions of barley seed pathogenesis-related proteins (PRs). *Journal of the Institute Brewing* **115**, 334-360.

- Groß F., Durner J., Gaupels F. (2013): Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defense responses. *Frontiers in plant science* **4**, 1-15.
- Gupta K. J., Hinch D. K., Mur L. A. J. (2011): NO way to treat a cold. *New Phytologist* **189**, 360–363.
- Haenen G. R., Paquay J. B., Korthouwer R. E., Bast A. (1997): Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **236**, 591–593.
- Hahn, M. G., (1996):** Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 387–412.
- Halliwell B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology in fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* **141**, 312-322 .
- Hartl F. U., Martin J., Neupert W. 1992. Protein folding in the cell: The role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **21**, 293-322.
- Heath, M. C. (2000): Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 315-319.
- Hebelstrup K. H., Van Zanten M., Mandon J., Voeselek L. A., Harren F. J., Cristescu S. M., Moller I. M., Mur L. A. J. (2012): Haemoglobin modulates NO emission and hyponasty under hypoxia-related stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 5581–5591.
- Henry G., Thonart P., Ongena M. (2012): PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnologie, Agronomie, Société et environnement* **16**, 257-268.
- Hill B. G., Dranka B. P., Bailey S. M., Lancaster J. R. Jr., Darley-Usmar V. M. (2010): What part of NO don't you understand. Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 19699–19704.
- Huang, C. C., Biesheuvel, J., Lindhout, P., & Niks, R. E. (2000): Host range of *Oidium lycopersici* occurring in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, **106**, 465–473.
- Huang, C., Groot, T., Meijer-Dekens, F., Niks, R., & Lindhout, P. (1998): Hypersensitivity is the major mechanism of resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon* species. *European Journal of Plant Pathology*, **104**, 399–407.
- Huet J. C., Nespoulous C., Permollet J. C. (1992): Structure of elicitors isoforms secreted by *Phytophthora drechsleri*. *Phytochemistry*, **31**, 1471-1476.
- Hückelhoven R. (2014): The effective papilla hypothesis. *New phytologist* **3**, 438-440.
- Ishikawa T., Yoshimura K., Sakai K., Tamoi M., Takeda T., Shigeoka S. (1998): Molecular characterization and physiological role of a glyoxisome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant Cell Physiology* **30**, 23-34.
- Jabs T., Tschöpe M., Colling C., Hahlbrock K., Scheel D. (1997): Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of National. Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4800-4805.
- Jajic I., Sarna T., Strzalka K. (2015): Senescence, stress and reactive oxygen species. *Plants* **4**, 393-411.
- Jankovics, T., Bai, Y., Kovacs, G. M., Bardin, M., Nicot, P. C., Toyoda, H., Matsuda, Y., Niks, R. E., & Kiss, L. (2008): *Oidium neolycopersici*: Intra-specific variability inferred from AFLP analysis and relationship with closely related powdery mildew fungi infecting various plant species. *Phytopathology* **98**, 529–540.
- Jeandroz S., Lamotte O., Astier J., Rasul S., Trapet P., Besson-Bard A., Bourque S., Nicolas-Francès V., Ma W., Berkowitz G. A., Wendehenne D. (2013): There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca²⁺ signalling. *Plant Physiology* **163**, 459-470.
- Jendrišáková T. (2015): Reaktivní formy dusíku v obranném mechanismu rostlin. Diplomová práce, UPOL Olomouc, Česká republika.

- Jiang R. H., Tyler B. M., Whisson S. C., Hardham A. R., Govers F. (2006): Ancient origin of elicitor gene clusters in *Phytophthora* genomes. *Molecular Biology and Evolution* **23**, 338–351.
- Jiang Y., Miles P. W. (1993): Generation of H₂O₂ during enzymic oxidation of catechin. *Phytochemistry* **33**, 29–34.
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006): The plant immune system. *Nature*. **444**, 323–329.
- Jones, H. E., Whipps, J. M., Thomas, B. J., Carver, T. L. W., & Gurr, S. J. (2001): Initial events in the colonisation of tomatoes by *Oidium lycopersici*, a distinct powdery mildew fungus of *Lycopersicon* species. *Canadian Journal of Botany*, **78**, 1361–1366.
- Joudoi T., Shichiri Y., Kamizono N., Akaike T., Sawa T., Yoshitake J., Naotaka I., Sumio I. (2013): Nitrated cyclic GMP modulates guard cell signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **25**, 558–571.
- Kamoun S., Young M., Glascock C. B., Tyler B. (1993): Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: Host specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogen. *Molecular plant-microbe interactions* **6**, 15–25.
- Kanzaki H., Saitoh H., Ito A., Fujisawa S., Kamoun S., Katou S., Yoshioka H., Terauchi R. (2003): Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* **4**, 383–391.
- Kazan K., Gardiner D. M., Manners J. M. (2012): On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Molecular plant pathology* **13**, 399–413.
- Kolařík J. a kol. (2010): *Péče o dřeviny rostoucí mimo les*. 1. vydání, ČSOP Vlašim, Vlašim, Česká republika, 696 stran.
- Khan A. U., Kovacic D., Kolbanovskiy A., Desai M., Frenkel K., Geacintov N. E. (2000): The decomposition of peroxy nitrite to nitroxyl anion (NO⁻) and singlet oxygen in aqueous solution. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, **97**, 2984–2989.
- Kincl M., Krpeš V. (1999): *Základy fyziologie rostlin*. 2. vydání, Montanex a.s., Ostrava, Česká republika, 221.
- Kiss L., Cook R. T. A., Saenz G. S., Cunnington J. H., Takamatsu S., Pascoe I., Berdin M., Nicot P. C., Sato Y., Rossman A. Y. (2001): Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. *Mycological Research*. **105**, 684–697.
- Klepper L.A. (1975): Evolution of nitrogen oxide gases from herbicide treated plant tissues. *WSSA Abstracts* **184**, 70.
- Koornneef A., Verhage A., Leon-Reyes A., Snetselaar R., van Loon L., Pieterse C. M. (2008): Towards a reporter system to identify regulators of cross-talk between salicylate and jasmonate signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* **3**, 543–546.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tache R., Luhová L., Barroso J. B., Petřivalský M. (2013): Structural and functional characterization of a plant S-nitroglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889–902.
- Kulik A., Noirot E., Grandperret V., Bourque S., Fromentin J., Salloignon P., Truntzer C., Dobrowolska G., Simon-Plas F., Wendehenne D. (2015): Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogam signalling. *Plant Cell & Environment* **38**, 331–348.
- Kuzniak E., Patykowski J., Urbanek H. (1999): Involvement of the antioxidative system in tomato response to fusaric acid treatment. *Journal of Phytopathology* **147**, 385–390.
- Leberre J. Y., Panabieres F., Ponchet M., Denoroy L., Bonnet P., Marais A., Ricci P. (1994): Occurrence of multiple forms of elicitors in *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**, 251–258.
- Lebeda A., Luhová L., Sedlářová M., Jančová D. (2001): The role of enzymes in plant—fungal pathogens interactions. *Journal of Plant Disease and Protection* **108**, 89–111.

- Lebeda A., Mieslerová B. (1999): Identification, occurrence and host range of tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*) in the Czech Republic. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **34**, 13–25.
- Lebeda A., Mieslerová B. (2002): Variability in pathogenicity of *Oidium neolyopersici* on *Lycopersicon* species. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **109**, 129–141.
- Lebeda A., Meislerová B., Jankovics T., Kiss L., Van der Linde E. J. (2015): First detection of tomato powdery mildew caused by *Oidium neolyopersici* in South Africa. *South African Journal of Botany* **99**, 153-157.
- Lebeda A., Mieslerová B., Luhová L., Mlíčková K. (2002): Resistance mechanisms in *Lycopersicon* spp. to tomato powdery mildew (*Oidium neolyopersici*). *Plant Protection Science* **38** (Special Issue 1), 141–144.
- Lebeda A., Mieslerová B., Petřivalský M., Luhová L., Špundová M., Sedlářová M., Nožková-Hlaváčková V., Pink D. A. C. (2013): Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolyopersici*. *European Journal of Plant pathology* **138**, 569-596.
- Lee U., Wie C., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**, 786-802.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J. M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2011): Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behaviour* **6**, 789–793.
- Levine A., Pennell R. I., Alvarez M. E., Palmer R., Lamb C. (1996): Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology* **6**, 427-437.
- Li Ch., Bonnema G., Che D., Dong L., Lindhout P., Visser R., Bai Y. (2007): Biochemical and molecular mechanisms involved in monogenic resistance responses to tomato powdery mildew. *Molecular plant-microbe interactions* **20**, 1161-1172.
- Li Q. Y., Niu H. B., Yin, J., Wang M. B., Shao H. B., Deng D. Z. (2008): Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces* **65**, 220–225.
- Lindhout, P., Beek, H., & Pet, G. (1994): Wild *Lycopersicon* species as sources for resistance to powdery mildew: mapping of resistance gene *Ol-1* on chromosome 6 of *Lycopersicon hirsutum*. *Acta Horticulturae* **376**, 387–394.
- Linden, J. C., Phisalaphong, M. (2000): Oligosaccharides potentiate methyljasmonate-induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis*. *Plant Science* **158**, 41-51.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., Stamler, J. S. (2001): A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490–494.
- Liu X., Miller M. J., Joshi M. S., Thomas D. D., Lancaster J. R., Jr. (1998). Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, **95**, 2175–2179.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2004): *Molecular Cell Biology*. 4th ed., W. H. Freeman and Company, New York, USA, 1184 stran.
- Lou B., Wang A., Lin Ch., Xu T., Zheng X. (2011): Enhancement of defense responses by oligandrin against *Botrytis cinerea* in tomatoes. *African Journal of Biotechnology* **10**, 11442-11449.
- Luan S. (2009): The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in Plant Science* **14**, 37-42.
- Luna E., Pastor V., Robert J., Flors V., Mauch-Mani B., Ton J. (2011): Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 183–193.
- Luo J., Liu L., Wu C. D. (2001): Enhancement of paclitaxel production by abscisic acid in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters* **23**, 1345–1348.
- Lutts S., Kinet J. M. (1998): The effects of stress on [plant] growth and development: a synoptical view. *Bulletin de la Société royale des sciences de Liège* **67**, 117-136.
- Ma W., Qi Z., Smigel A., Walker R. K., Verma R., Berkowitz G. A. (2009): Ca²⁺, cAMP, and transduction of non-self perception during plant immune responses. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20995-21000.

- Marek M. V., Urban O., Marková I. (2008): 3. Rostlinná anatomie. In: *Fyziologie rostlin pro lesní inženýry*. 1. vydání, (Košovcová M.), Mendelova lesnická a zemědělská univerzita v Brně, Brno, Česká republika, 22-25.
- Meenakshi T., Baldev S. S. (2013): Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection. *ISRN Biochemistry* **2013**, 1-10.
- Meyer Ch., Stöhr C. (2002): Nitrate reductase and nitrite reductase. In: *Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon metabolism. Advances in the Photosynthesis*. (Foyer Ch., Noctor G.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 49-62.
- Mieslerová B., Lebeda, A. (1999): Taxonomy, distribution and biology of tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). *Journal of Plant Diseases and Protection* **106**, 140–157.
- Mieslerová B., Lebeda A., Chetelat R. T. (2000): Variation in response of wild *Lycopersicon* and *Solanum* sp. against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). *Journal of phytopathology* **148**, 303-311.
- Mieslerová B., Lebeda A. (2010): Influence of temperature and light conditions on germination, growth and conidiation of *Oidium neolyopersici*. *Journal of Phytopathology*, **158**, 616–627.
- Mieslerová, B., Lebeda, A., Kennedy R. (2004): Variation in *Oidium neolyopersici* development on host and non-host plant species and their tissue defence response. *Annals of Applied Biology*, **144**, 237–248.
- Mikes V., Milat M. L., Ponchet M., Panabières F., Ricci P., Blein J. P. (1998): Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **245**, 133-139.
- Mishra A. K., Sharma K., Misra R. S. (2011): Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of Plant Interactions*. **7**, 95-120.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405–410.
- Mittler R., Zilinskas B. A. (1992): Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 21802-21807.
- Mlíčková K., Luhová L., Lebeda A., Mieslerová B., Peč P. (2004): Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolyopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant physiology and biochemistry* **42**, 753-761.
- Moreau M., Lindermayr C., Durner J., Klessig D. F. (2010): NO synthesis and signalling in plants – where do we stand? *Physiologia Plantarum* **138**, 372-383.
- Mur L. A. J., Sivakumaran A., Mandon J., Cristescu S. M., Harren F. J., Hebelstrup K. H. (2012): Haemoglobin modulates salicylate and jasmonate/ethylene-mediated resistance mechanisms against pathogens. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4375–4387.
- Mysore K. S., Ryu C. M. (2004): Non-host resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* **9**, 97–104.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1237–1247.
- Nespoulous C., Huet J. C., Pernollet J. C. (1992): Structure-function relationships of α and β elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. *Planta* **186**, 551-557.
- Nishihama R., Banno H., Shibata W., Hirano K., Nakashima M., Usami S., Machida Y. (1995): Plant homologues of components of MAPK (Mitogen Activated Proteins Kinase) signal pathways in yeast and animal cells. *Plant and cell physiology* **5**, 749-757.
- Noel L.D., Cagna G., Stuttmann J., Wirthmuller L., Betsuyaku S., Witte C.P., Bhat R., Pochon N., Colby T., Parker J.E. (2007): Interaction between SGT1 and cytosolic/nuclear HSC70 chaperones regulates *Arabidopsis* immune responses. *Plant Cell* **19**, 4061–4076.
- Nonomura T., Xu L., Wada M., Kawamura S., Miyajima T., Nishitomi A., Kakutani K., Takikawa Y., Matsuda Y., Toyoda H. (2009): Trichome exudates of *Lycopersicon pennellii* form a chemical barrier to suppress leaf-surface germination of *Oidium neolyopersici* conidia. *Plant Science* **176**, 31–37.
- Nonomura T., Nishitomi A., Matsuda Y., Soma C., Xu L., Kakutani K., Takikawa Y., Toyoda H. (2010): Polymorphic change of appressoria by the tomato powdery mildew *Oidium*

- neolycopersici* on host tomato leaves reflects multiple unsuccessful penetration attempts. *Fungal Biology* **114**, 917–928.
- Noordeloos M. E., Loerakker W. M. (1989): Studies in plant pathogenic fungi. II. On some powdery mildews (*Erysiphales*) recently recorded from The Netherlands. *Persoonia* **14**, 51–60.
- Odjakova M., Hadjiivanova C. (2001): The complexity of pathogen defense in plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* **27**, 101–110.
- Ogura Y., Ishihara A., Iwamura H. (2001): Induction of hydroxycinnamic acid amides and tryptophan by jasmonic acid, abscisic acid and osmotic stress in barley leaves. *Z Naturforsch* **56**, 193–202.
- Oswald W., Fleischmann F., Rigling D., Coelho A. C., Cravador A., Diez J., Dalio R. J., Jung H. M., Pfanz H., Robin C., Sipos G., Solla A., Cech T., Chanbery A., Diamandis S., Hansen E., Jung T., Orlikowski L. B., Parke J., Prospero S., Werres S. (2014): Strategies of attack and defence in woody plant–*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology* **44**, 169–190.
- Ozeretskoykaya O. L., Vasyukova N. I. (2002): The use of elicitors for protection of cultured plants demands caution. *Applied biochemistry and mikrobiology* **38**, 277–279.
- Ozeretskoykaya O. L., Il'inskaya L. I., Vasyukova N. I. (1994): Mechanisms of induction of the plant systemic resistance to diseases by elicitors. *The Plant Physiology (Physiologia rastenii)* **41**, 626–633.
- Panabières F., Marais A., Le Berre J., Penot I., Fournier D., Ricci P. (1996): Characterization of a gene cluster of *Phytophthora cryptogea* which codes for elicitors, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco. *Molecular Plant-microbe Interactions* **8**, 996–1003.
- Panabières F., Ponchet M., Allasia V., Cardin L., Ricci P. (1997): Characterization of border species among *Pythiaceae*: several *Pythium* isolates produce elicitors, typical proteins from *Phytophthora* spp. *Mycological Research* **101**, 1459–1468.
- Park Y. W., Baba K., Furuta Y., Iida I., Sameshima K., Arai M., Hayashi T. (2004): Enhancement of growth and cellulose accumulation by overexpression of xyloglucanase in poplar. *FEBS Letters* **564**, 183–187.
- Pavlová L. (2006): *Fyziologie rostlin*. vydání 1., nakladatelství Karolinum, Praha, Česká republika, 254 stran.
- Perazzolli M., Romero-Puertas M. C., Delledonne M. (2006): Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *Journal of Experimental Botany* **57**, 479–488.
- Picard K., Ponchet M., Blein J. P., Rey P., Tirilly Y., Benhamou N. (2000): Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant physiology* **124**, 379–395.
- Pieterse C. M. J., Schaller A., Mauch-Mani B., Conrath U. (2006): 8. Signaling in plant resistance responses: divergence and cross-talk of defense pathways., In: *Multigenic and induced systemic resistance in plants.* (Tuzun S., Bent E.), Springer, New York, U. S. A. 166–196.
- Piterková J., Hofman J., Mieslerová B., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A., Petřivalský M. (2011): Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp. – *Oidium neolycopersici* interactions. *Environmental and Experimental Botany* **74**, 37–44.
- Piterková J., Petřivalský M., Luhová L., Mieslerová B., Sedlářová M., Lebeda A. (2009): Local and systemic production of nitric oxide and tomato responses to powdery mildew infection. *Molecular plant pathology* **10**(4), 501–513.
- Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005): Oxidační stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy* **99**, 455–466.
- Planchet E., Jagadis Gupta K., Sonoda M., Kaiser W. M. (2005): Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant Journal* **41**, 732–743.
- Platonova T. A., Aken'shina G. V., Ozeretskoykaya O. L. (1982): Ultrastructure of normal potato tuber parenchymal cells and during healing. *Prikladnaya Biokhimiya I Mikrobiologiya* **18**, 120–124.

- Ponchet M., Panabieres F., Milat M. L., Mikes V., Montillet J. L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y., Blein J. P. (1999): Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**, 1020-1047.
- Procházka S a kol. (1998): *Fyziologie rostlin*. vydání 1., nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha, Česká republika, 484.
- Pryce-Jones, E., Carver, T. and Gurr, S. J. (1999): The role of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis f.sp. hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 175–182.
- Qi Z., Verma R., Gehring C., Yamaguchi Y., Zhao Y. C., Ryan C. A., Berkowitz G. A. (2010): Ca²⁺ signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on AtPepR1, a receptor with guanylylcyclase activity, and cGMP-activated Ca²⁺ channels. *Proceeds of National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21193-21198.
- Quan L. J., Zhang B., Shi W. W., Li H. Y. (2008): Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 2–18.
- Quiroga M., Guerrero C., Botella M. A., Barcelo' A., Amaya I., Medina M. I., Alonso F. J., de Forchetti S. M., Tigier H., Valpuesta V. (2000): A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* **122**, 1119-1127.
- Raymond P., Farmer E. E. (1998): Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 404-411.
- Reilly K., Gomez-Vasquez R.; Buschmann H., Beeching J. R. (2004). Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Molecular Biology* **56**, 625-641.
- Renelt A., Colling C., Hahlbrock K., Nurnberger T., Parker J., Sacks W. R., Scheel D. (1993): Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defense. *Journal of Experimental Botany* **44**, 257-268.
- Reumann S., Babujee L., Ma C., Wienkoop S., Siemsen T., Antonicelli G. E., Rasche N., Lüder F., Weckwerth W., Jahn O. (2007): Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms, *Plant Cell* **19**, 3170-3193.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B. (1995): The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* **22**, 375–383.
- Ridout, C. J. (2009): 3. Profiles in pathogenesis and mutualism: powdery mildews. In: *Plant Relationships*, (K. Esser, H. B. Deising) Vol. 5, Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, 50-67.
- Rivas S, Thomas C. M. (2005): Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 395-436.
- Rose J. K. C., Saladie' M., Catala' C. (2004): The plot thickens: new perspectives of primary cell wall modification. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 296-301.
- Rusterucci C., Espunya M. C., Diaz M., Chabannes M., Martinez M. C. (2007): S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143**, 1282-1292.
- Ryplová R. (2014): *Fyziologie rostlin. Skriptum pro studující Učitelství přírodopisu pro 2. Stupeň ZŠ*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, Česká republika, 113 stran.
- Sakamoto A., Tsukamoto S., Yamamoto H., Ueda-Hashimoto M., Takahashi M., Suzuki H., Morikawa H. (2003): Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cysperoxidase against reactive nitrogen species. *The Plant Journal* **33**, 841–851.
- Sanghani P. C., Robinson H., Bosron W. F., Hurley T. D. (2002): Human glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry* **41**, 10778-10786.
- Satková P., Starý T., Pečínková M., Kašparovský T., Lochman J., Luhová L., Petřivalský M. (2016a): Diverse response of wild and cultivated tomato species to priming, MAMP elicitor

- and pathogen represented by BABA, oligandrin and *Oidium neolycopersici* treatment. (připravený manuskript).
- Satková P., Starý T., Piterková J., Mieslerová B., Luhová L., Lochman J., Kašparovský T., Petřivalský M. (2016b): Effect of elicitation on defence response of *Solanum spp.* to powdery mildew *Oidium neolycopersici*. (připravený manuskript).
- Sattler S. E., Funnell-Harris D. L. (2013): Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens? *Frontiers in Plant Science* **4**, 1-8.
- Savitha B. C., Tjimmaraaju R., Bhagyalakshmi N., Ravishankar G. A. (2006): Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry* **41**,50-60.
- Scandalios J. G. (1990): Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics* **28**, 1-41.
- Scorza G., Pietraforte D., Minetti M. (1997): Role of ascorbate and proteinthiols in the release of nitric oxide from S-nitroso- albumin and S-nitroso-glutathione in human plasma. *Free Radical Biology and Medicine* **22**, 633–642.
- Schwessinger B., Zipfel C. (2008): News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current opinion in plant biology* **11**, 389-395.
- Seigrist J., Muhlenbeck S., Buchenauer H. (1998): Physiology molecules. *The Plant Pathology* **58**, 189-198.
- Shailasree S., Kini K. R., Deepak S., Kumudini B. S., Shetty H. S. (2004): Accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in pearl millet seedlings in response to *Sclerospora graminicola* infection. *Plant Science* **167**,1227-1234.
- Sharp J.K., Valent B., Albersheim P.(1984): Purification and partial characterization of a beta-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *The Journal of biological chemistry* **259**, 11312–11320.
- Shibli R. A., Smith M. A. L., Kushad M. (1997): Headspace ethylene accumulation effects on secondary metabolite production in *Vaccinium pahalae* cell culture. *Plant Growth Regulation* **23**, 201–205.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yoshimura K. (2002): Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1305-1319.
- Sinha A. K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**,196-203.
- Smaghe B. J., Hoy J. A., Percifield R., Kundu S., Hargrove M. S., Sarath G., Hilbert J.L., Watts R.A., Dennis E.S., Peacock W.J., Dewilde S., Moens L., Blouin G.C., Olson J.S., Appleby C.A. (2009): Correlations between oxygen affinity and sequence classifications of planthemoglobins. *Biopolymers* **91**, 1083–1096.
- Sreedhar R. V., Roohie K., Maya P., Venkatachalam M., Bhagyalakshmi N. (2009): Biotic elicitors enhance flavour compounds during accelerated curing of vanilla beans. *Food chemistry* **112**, 461-468.
- Staab C., Hellgren M., Höög J. O. (2008): Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3950-3960.
- Stintzi A., Weber H., Reymond P., Browse J., Farmer E. E. (2001): Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **98**, 12837-12842.
- Stohr C., Strube F., Marx G., Ullrich W. R., Rockel P. (2001): A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**, 835–841.
- Stotz H. U., Mitrousis G. K., de Witt P. J. G. M., Fitt B. D. L. (2014): Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends in plant science* **19**, 491-500.
- Taguchi G., Yazawa T., Hayashida N., Okazaki M. (2001): Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad

- substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *European Journal of Biochemistry* **268**,4086-4094.
- Tang L., Kwon S. Y., Kim S. H., Kim J. S., Choi J. S., Cho K. Y., Sung C. K., Kwak S. S., Lee H. S. (2006). Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Report* **25**,1380-1386.
- Thakur M., Sohal B. S. (2013): Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *Biochemistry* **2013**, 1-10.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000): Analysis of the genome of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Thomas D. D., Ridnour L. A., Isenberg J.S., Flores-Santana W., Switzer C.H., Donzelli S., Hussain P., Vecoli C., Paolocci N., Ambs S., Colton C.A., Harris C.C., Roberts D.D., Wink D.A. (2008): The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 18–31.
- Thomma B.P.H.J., Penninckx I.A., Broekaert W.F., Cammue B.P. (2001): The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* **13**, 63-68.
- Threlfall D. R., Whithead I. M. (1988): Co-ordinated inhibition of squalene synthetase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **27**, 2567-2580.
- Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P., Lebeda A. (2006): Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon spp.* and *Oidium neolycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**, 22-32.
- Van Loon L. C. (1997): Induced resistance in plants and role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* **103**,753-765.
- Van Loon L. C., Geraats B. P., Linthorst H. J. (2006): Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Sciences* **11**,184-191.
- Vera-Estrella R., Barkla B. J., Higgins V. J., Blumwald E.(1994): Plant defense response to fungal pathogens. Activation of host plasma membrane H⁺-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiology* **104**, 209–215.
- Věchet L. (2012): VI. Rezistence rostlin. In: *Mechanismy interakcí hostitel-patogen a základy šlechtění na odolnost*, vydání 1., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v. i., Praha, Česká republika,12-18.
- Vierling E. (1991): The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 579-620.
- Vránová E., Inzé D., Van Breusegem F. (2002): Signal transduction during oxidative stress. *Journal of experimental botany* **53**, 1227-1236.
- Wang Y., Loake G. J., Chu Ch. (2013): Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. *Frontiers in plant science* **4**, 2-7.
- Wang Y., Ries A., Wu K., Yang A., Crawford N. M. (2010): The *Arabidopsis* prohibitin gene *PHB3* functions in nitric oxide-mediated responses and in hydrogenperoxide-induced nitric oxide accumulation. *Plant Cell* **22**, 249–259.
- Ward J. M., Pei Z. M., Schroeder J. I. (1995): Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* **7**,833-844.
- Whipps J. M., Budge S. P., Fenlon J. S. (1998): Characteristics and host range of tomato powdery mildew. *Plant Pathology* **47**, 36–48.
- White P. J., Broadley M., (2003): Calcium in plants. *Annals of Botany* **92**,487-511.
- Wright C. A., Beattie G. A. (2004): *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* cells encounter inhibitory levels of water stress during the hypersensitive response of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* **101**, 3269-3274.
- Wu J., Wang C., Mei X. (2001): Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus spp.* cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *Journal of Biotechnology* **85**, 67-73.
- Xiao S., Ellwood S., Calis O., Patrick E., Li T., Coleman M., Turner J. G. (2001): Broad spectrum powdery mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. *Science* **291**, 118-120.

- Xing T., Higgins V. J., Blumwald E. (1997): Identification of G proteins mediating fungal elicitor-induced dephosphorylation of host plasma membrane H⁺-ATPase, *Journal of Experimental Botany* **48**, 229–237.
- Xu Y., Chang P., Liu D., Narasimhan M. L., Raghothama K. G., Hasegawa P. M., Bressan R. A. (1994): Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**, 1077–1085.
- Yamamoto-Katou A., Katou S., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. (2006): Nitrate reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana benthamiana*. *Plant and cell physiology* **47**, 726–735.
- Yang T., Poovaiah B. W. (2002): A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 45049–45058.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S. H., Loake G. J. (2014): Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist* **202**, 1142–1156.
- Zimmermann S., Frachisse J. M., Thomine S., Barbier-Brygoo H., Guern J. (1998): Elicitor-induced chloride efflux and anion channels in tobacco cell suspensions. *Plant physiology and biochemistry* **36**, 665–674.
- Zhang S., Klessig D. F. (2001): MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**, 520–527.
- Zhao J., Davis L. C., Verpoorte R. (2005): Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances* **23**, 283–333.
- Zhao J., Zhu W. H., Hu Q., He X. W. (2000): Improved indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnology Letters* **22**, 1221–1226.
- Zhou J., Tang X., Martin G. B. (1997): The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *The EMBO Journal* **16**, 3207–3218.
- Zipfel, C., Felix, G. (2005): Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 353–360.

7. Seznam použitých zkratek

AA/BIS	akrylamid- <i>N,N</i> -bisakrylamid
Ab	protilátka

ADH3	alkoholdehydrogenasy třídy III
AgNO ₃	dusičnan stříbrný
APS	adenosin-5-fosfosulfát
APX	askorbátperoxidasa
AsA	askorbát
BSA	hovězí sérový albumin
BTH	S-methylester kyseliny benzol [1,2,3]-thiadiazol-7-karbothioové
CAT	katalasa
CdCl ₂	chlorid kademnatý
CDPK	calcium-dependent protein kinase (vápníkově-dependentní proteinkinasa)
DAG	1,2-diacylglacerol
DAMPs	damage-associated molecular patterns (s poškozením spojené molekulární struktury)
DHA	dehydroaskorbát
DTT	dithiothreitol
ECM	extracelulární matrix
EF1 α	transkripční faktor
ETC	elektronový transportní řetězec
ETI	effector - triggered immunity (efektorově vyvolaná imunita)
ETS	effector-triggered susceptibility (efektorově vyvolaná citlivost)
GSH	glutathion (redukovaná forma)
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSSG	glutathion (oxidovaná forma)
GTP proteiny	proteiny vázající guanosintrifosfát
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HA	hydroxylamin
HMGSH	S-(hydroxymethyl)glutathion
HR	hypersenzitivní reakce
HRGPs	glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin
HSP70	heat shock protein 70, protein teplotního šoku
INF	infestin
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát
JA	jasmonic acid (kyselina jasmonová)
LRR	leucin-rich repeat (opakující sekvence bohatá na leucin)
LTP	lipid transfer proteins (proteiny přenášející lipidy)
MAMPs	microbe-associated molecular patterns (mikrobiálně-asociované molekulární struktury)
MAPK	mitogenově-aktivovaná proteinkinasa
MDHA	monodehydroaskorbát
NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH oxidasa	NADPH oxidasa
NBS	nucleotide-binding site (vazebné místo pro nukleotidy)
NBS-LRR proteins	nucleotide-binding site leucine-rich repeat (proteiny s opakující se sekvencí bohatou na leucin, která tvoří vazebné místo pro nukleotidy)

NBT-BCIP	nitroterazolium Blue chlorid ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-fosfátem
NiNOR	nitrit-NOreduktasa
NO	oxid dusnatý
NO ⁺	nitrosoniový ion
NO ²⁻	radikál oxidu dusičitého
NO ₂ ⁻	dusitanový anion, nitrit
N ₂ O ₃ ⁻	dusičnanový anion, nitrát
NOS	syntasy oxidu dusnatého
NOA1	protein 1 asociovaný s NO
cNR	cytosolická nitrátoreduktasa
NR	nitrátoreduktasa
nsHbs	non-symbiotic hemoglobins (nesymbiotické hemoglobiny)
O ²⁻	superoxidový radikál
¹ O ₂	singletový kyslík
OH	hydroxylový radikál
ONOOH	kyselina dusičná
ONOO ⁻	peroxynitritový anion
PA	polyamin
PAL	phenylalanine ammonia lyasa
PAMPs	pathogen -associated molecular patterns (patogenově-asociované molekulární struktury)
PGIP proteins	polygalacturonase-inhibiting proteins (proteiny inhibující polygalaktouronasu)
pI	isoelektrický bod
PKC	proteinkinasa C
PM NO reduktasa	NO reduktasa vázaná na plasmatickou membránu
PMSF	phenylmethylsulfonylfluorid 3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfo-fenylazo)fenylazo]-2,7-naftalen-disulfonová kyselina
PR protein	pathogenesis related protein (s patogenesí související protein)
PRRS	pathogen recognition receptor structures (struktury receptoru rozpoznávající patogen)
Prx II E	peroxyredoxin II E
PTI	pathogen-triggered immunity (imunita vyvolaná patogenem)
RBOHD	respiratory burst oxidase homologues; NADPHoxidasa
RNS	reactive nitrogen species (reaktivní formy dusíku)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
SA	salicylic acid, kyselina salicylová
SAR	systémově získaná rezistence
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SOD	superoxiddismutasa
SPOX	syringaldazinperoxidasa
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
TPX1	thioredoxinperoxidasa
TTBS	tween s TBS
UP	Univerzita Palackého

UV	ultrafialové záření
w/v	hmotnost na objem
XOR	xanthionoxidoreduktasa