

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky



**Patofyziologie slunečnice:
interakce s *Plasmopara halstedii***

**Pathological physiology of sunflower:
interaction with *Plasmopara halstedii***

Diplomová práce

Zuzana Trojanová

Studijní obor: Botanika

Forma studia: prezenční

Vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.

Olomouc

2010

Copyright © 2010 Z. Trojanová a Katedra botaniky PřF UP v Olomouci

Publikování, kopírování a šíření obsahu této diplomové práce (včetně elektronických příloh) je v jakékoliv podobě bez písemného souhlasu zakázáno.

Prohlášení

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod odborným vedením pracovníků KB PřF UP. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, v práci řádně cituji a uvádím v seznamu použité literatury. Nemám námitek proti zapůjčení práce se souhlasem KB PřF UP.

V Olomouci, srpen 2010

.....
Bc. Zuzana Trojanová

Práce vznikla v rámci projektů

QH 71254 „Inovace metod ochrany slunečnice“ (MZe ČR, NAZV)

MSM 6198959215 „Variabilita složek a interakcí v rostlinném patosystému a vliv faktorů prostředí na jejich projev“ (MŠMT ČR)

Poděkování

Děkuji Doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za odborné vedení, hodnotné rady a konzultace během mé práce; RNDr. Martině Špundové, Ph.D. a Mgr. Jitce Prokopové Ph.D. za pomoc při měření a odborné konzultace týkající se zpracování experimentálních dat, vedení oddělení biofyziky Katedry experimentální fyziky PřF UP v Olomouci, které mi umožnilo použít jejich prostory a přístrojovou techniku; Prof. Ing. Aleši Lebedovi, DrSc. za poskytnutí studijních materiálů a dalším pracovním fytopatologické laboratoře Katedry botaniky PřF UP v Olomouci paní Drahomíře Vondrákové a Věře Zoubkové za pomoc při přemnožování kultur *P. halstedii* a pěstování pokusných rostlin a Michaele Jandové za pomoc se statistickým zpracováním výsledků. Poděkování v neposlední řadě patří také rodičům a nejbližším za podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu mého studia.

Bibliografická identifikace:**Jméno a příjmení autora:** Bc. Zuzana Trojanová**Název práce:** Patofyziologie slunečnice: interakce s *Plasmopara halstedii***Typ práce:** Diplomová práce**Pracoviště:** Katedra botaniky PřF UP v Olomouci, <http://botany.upol.cz/>**Vedoucí práce:** Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D. (michaela.sedlarova@upol.cz)**Oponent:** RNDr. Barbora Mieslerová, Ph.D. (barbora.mieslerova@upol.cz)**Rok obhajoby práce:** 2010**Abstrakt:**

Tato práce je zaměřena na studium změn v primárním metabolismu slunečnice (*Helianthus annuus* L.), konkrétně fotosyntézy a metabolismu cukrů, které jsou způsobeny interakcí s biotrofní peronosporou *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. a De Toni. Pro porovnání reakcí rostlin v laboratorních a polních podmínkách byly studovány listové disky inokulované suspenzí spor v laboratorních podmínkách, u nichž byly jednotlivé parametry měřeny 9. 12. a 15. den po inokulaci kvůli zachycení změn v průběhu patogeneze, a listové disky pořízené z přirozeně infikovaných rostlin měřené jednorázově. Měřením změn fluorescence chlorofylu a byly stanoveny následující fotosyntetické parametry: maximální kvantový výtěžek fotosyntézy (F_v/F_m), kvantový výtěžek elektronového transportu fotosystému II (Φ_{PSII}), nefotochemické zhášení (NPQ). V extraktech z pletiv byla stanovena aktivita extracelulární invertasy.

Získaná data prokázala, že infekce *P. halstedii* způsobuje signifikantní pokles F_v/F_m , který s postupující infekcí dále mírně klesá. Stejný pokles byl zaznamenán i u disků z polního experimentu. Další změny parametrů fotosyntetického aparátu u laboratorního pokusu již nebyly signifikantní. V polním pokusu signifikantní rozdíly existují. Byl však prokázán značný nárůst aktivity extracelulární invertasy v laboratorních i polních podmínkách, který v pozdějších fázích *in vitro* infekce ještě mírně stoupal.

Klíčová slova: *Plasmopara halstedii*, plísnovitost slunečnice, *Helianthus annuus*, patogen, interakce, patofyziologie, fluorescence, invertasa**Počet stran:** 66**Počet příloh:** 1**Jazyk:** český

Bibliographic identification:**Author's first name and surname:** Bc. Zuzana Trojanová**Title:** Pathological physiology of sunflower - interaction with *Plasmopara halstedii***Type of thesis:** Diploma work**Workplace:** Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc,
Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc – Holicice, Czech Republic**Supervisor:** Dr. Michaela Sedlářová (michaela.sedlarova@upol.cz)**Reviewer:** Dr. Barbora Mieslerová (barbora.mieslerova@upol.cz)**The year of presentation:** 2010**Abstract:**

Changes in primary metabolism of sunflower (*Helianthus annuus* L.) including photosynthesis and carbohydrate metabolism induced by compatible interaction with biotrophic downy mildew *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. a De Toni were studied by chlorophyll a fluorescence imaging and measuring cell wall invertases activity. Both laboratory and field experiments were carried out to compare reactions *in vitro* and in field. Leaf disc from naturally infected plants and leaf disc infected *in vitro* by *P. halstedii* were studied 9, 12 and 15 day post inoculation to determine changes in primary metabolism during the course of pathogenesis. Following photosynthetic parameters were determined: maximum quantum yield of photosystem II photochemistry (F_v/F_m), quantum yield of electron transport of photosystem II (Φ_{PSII}), non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching (NPQ). Moreover, the activity of acidic cell wall-bound invertase was determined in extracts from leaf tissues.

Obtained data showed a significant decrease in F_v/F_m caused by pathogenesis, even intensified in later phases of infection both *in vitro* and in field conditions. However, changes in other photosynthetic parameters *in vitro* were insignificant. On the contrary field experiment shows significant changes. Our research suggests that the pathogen induces considerable increase of cell wall invertase activity that slightly grows over time both *in vitro* and in field conditions.

Keywords: *Plasmopara halstedii*, sunflower downy mildew, *Helianthus annuus*, pathogen, interaction, pathological physiology, fluorescence, invertase**Numer of pages:** 66**Number of appendices:** 1**Language:** Czech

Seznam zkratek

- ABA – abscisová kyselina
BABA – DL-a-aminomáslená kyselina
BL – brassinosteroidy
BTH – benzo-1,2,3-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester
CK – cytokininy
dpi – dny po infekci
 F_0 – minimální výtěžek fluorescence rostliny adaptované na tmu
 F_m – maximální výtěžek fluorescence rostliny adaptované na tmu
 F_m' – maximální výtěžek fluorescence ve světelně adaptovaném stavu
Fru – fruktosa
 F_t – stálá hodnota fluorescence ve světelně adaptovaném stavu
 F_v/F_m – maximální kvantový výtěžek fotosyntézy
GA – gibbereliny
GFP – green fluorescent protein (zelený fluorescenční protein)
Glu – glukosa
GPX – glutathion peroxidasa
GSNO – S-nitrosoglutathion
hpi – hodiny po infekci
INA – 2,6-dichloroisoinikotinová kyselina
ISR – induced systemic resistance (indukovaná systémová rezistence)
ITS – internal transcribed spacer (vmezežené nekódující oblasti)
JA – jasmonová kyselina
 n_a – počet všech absorbovaných fotonů
 n_f – počet všech vyzářených fotonů
NPQ – nefotochemické zhášení
PR – pathogenesis related (spojený s patogenezí)
PSI – fotosystém I
PSII – fotosystém II
RNS – reactive nitrogen species (reaktivní formy dusíku)
 Q_A – chinon A
ROS – reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
RSNO – S-nitrosothiol
RSS – reactive sulphur species (reaktivní formy síry)
SA – salicylová kyselina
SAR – systemic acquired resistance (získaná systémová rezistence)
SIR – systemic induced resistance (systémová indukovaná rezistence)
SOD – superoxid dismutasa
 Φ_{PSII} – kvantový výtěžek elektronového transportu fotosystému II
 Φ_F – kvantový výtěžek fotosyntézy

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Cíle práce.....	6
3. Patosystém <i>Helianthus annuus</i> – <i>Plasmopara halstedii</i>	7
3.1 <i>Helianthus annuus</i>	7
3.1.1 Choroby slunečnice.....	7
3.1.2 Symptomy plísnovitosti slunečnice.....	8
3.1.3 Ochrana proti plísnovitosti slunečnice.....	10
3.2 <i>Plasmopara halstedii</i>	11
3.2.1 Taxonomie <i>P. halstedii</i>	11
3.2.2 Morfologie <i>P. halstedii</i>	13
3.2.3 Biologie <i>P. halstedii</i>	15
3.2.4 Hostitelský okruh a rozšíření <i>P. halstedii</i>	16
3.2.5 Rasy <i>P. halstedii</i>	18
3.3 Anatomicko – fyziologické změny rostlin vyvolané infekcí.....	19
3.3.1 Fotosyntéza rostlin a infekce.....	20
3.3.2 Metabolismus cukrů u infikovaných rostlin.....	23
3.3.3 Fytormony.....	24
3.3.4 Reaktivní formy kyslíku a dusíku.....	28
3.3.5 Hypersenzitivní reakce.....	30
3.3.6 Sekundární metabolismus.....	30
4. Studium změn primárního metabolismu.....	31
4.1 Fluorescence chlorofylu a.....	31
4.1.1 Charakteristika metody.....	31
4.1.2 Princip měření fluorescence chlorofylu.....	32
4.1.3 Fotosyntetické parametry.....	33
4.2 Extracelulární invertasa.....	34
4.2.1 Typy rostlinných invertas.....	34
4.2.2 Charakteristika enzymu, funkce v metabolismu rostlin.....	35
5. Materiál a metody.....	36
5.1 Rostlinný materiál.....	36
5.2 Zdroj inokula, udržování a množení kultury.....	36
5.3 Příprava a inokulace listových disků v laboratorních podmínkách.....	38
5.4 Příprava listových disků z polního pokusu.....	39
5.5 Příprava vzorků pro experimenty.....	39
5.6 Měření fluorescence chlorofylu a.....	40
5.7 Stanovení aktivity extracelulární invertasy.....	41
5.8 Statistické zpracování dat.....	42
6. Výsledky.....	43
6.1 Laboratorní pokus.....	43
6.1.1 Účinnost fotosyntetického aparátu hostitele v průběhu infekce.....	43
6.1.1.1 Maximální kvantový výtěžek fotosyntézy F_v/F_m	43
6.1.1.2 Kvantový výtěžek elektronového transportu fotosystému II Φ_{PSII}	44
6.1.1.3 Nefotochemické zhášení NPQ.....	47
6.1.2 Změny aktivity extracelulární invertasy v infikovaném pletivu.....	49
6.2 Polní pokus.....	50
6.2.1 Účinnost fotosyntetického aparátu hostitele v průběhu infekce.....	50
6.2.1.1 Maximální kvantový výtěžek fotosyntézy F_v/F_m	50
6.2.1.2 Kvantový výtěžek elektronového transportu fotosystému II Φ_{PSII}	50
6.2.1.3 Nefotochemické zhášení NPQ.....	52
6.2.2 Změny aktivity extracelulární invertasy v infikovaném pletivu.....	53
7. Diskuse.....	55
8. Závěr.....	59
9. Seznam literatury.....	60

1. Úvod

Plasmopara halstedii (Farl.) Berl. a De Toni (1988), česky vřetenatka slunečnicová, je biotrofní parazit původem ze Severní Ameriky, který způsobuje ekonomicky významnou karanténní chorobu. Plísňovitost slunečnice se v současné době vyskytuje prakticky ve všech pěstitelských oblastech světa.

Ochrana slunečnice proti plísňovitosti byla v minulosti založena zejména na moření osiva fungicidy na bázi metalaxylu. Podobně jako u jiných peronospor však intenzivní používání této skupiny přípravků vyvinulo selekční tlak s negativními důsledky v zemědělské praxi. Kvůli dramatickým změnám ve virulenci, ke kterým v populaci patogenu došlo, je tento způsob ochrany nadále neúčinný. Nejspolehlivější je proto šlechtění rezistentních kultivarů slunečnice a používání certifikovaného osiva.

P. halstedii vyvolává u slunečnice řadu anatomicko-morfologických a fyziologických změn. Tento patogen je charakteristický tím, že je schopen za vhodných podmínek vyvolávat systémovou infekci rostlin s následujícími symptomy: zakrslost, omezení kvetení a tvorby životaschopných semen, chlorózy listů, apod. Viditelné změny jsou však pouze důsledkem rozsáhlých změn ve fyziologii napadených rostlin.

Právě studium fyziologických změn, ke kterým dochází při napadení rostlin patogenem, je nutné pro pochopení mechanismů interakce a může v budoucnu vést k vytvoření nových přístupů v ochraně proti této chorobě.

Má diplomová práce se zabývá změnami v primárním metabolismu slunečnice, konkrétně ovlivněním fotosyntézy a metabolismu cukrů napadených rostlin v laboratorních i polních podmínkách.

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo: 1/ zpracování literární rešerše zabývající se patofyziologií slunečnice v interakci s *P. halstedii* zaměřenou zejména na změny v primárním metabolismu slunečnice a 2/ experimentální stanovení rozsahu ovlivnění fotosyntetického aparátu hostitele a změn aktivity extracelulární invertasy způsobené infekcí vyvolanou jak uměle v laboratorních podmínkách, tak přirozeně v polních podmínkách.

V rámci celé práce bylo rovněž cílem osvojit si dovednosti nezbytné pro pěstování a přemnožování hostitele i patogenu, optimalizovat metody používané při měření změn fluorescence chlorofylu a aktivity extracelulární invertasy a v neposlední řadě pochopit princip a možnosti využití obou metod.

3. Patosystém *Helianthus annuus* – *Plasmopara halstedii*

3.1 *Helianthus annuus*

Slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) z čeledi Asteraceae je významnou olejninou pěstovanou pro nažky poskytující chutný a lehce stravitelný olej. Původní oblastí výskytu této dnes celosvětově rozšířené plodiny jsou Mexiko a USA (Kirschner a Šída, 2004). Kulturní slunečnice pravděpodobně vznikla ještě před příchodem člověka do Severní Ameriky, a to zkřížením planých druhů *Helianthus annuus* a *H. petiolaris* (Schwaintz, 1969). Slunečnice je pěstována po celém světě, v Evropě nejčastěji v Rumunsku, Maďarsku, Itálii a Francii (Kudlíková a Veverka, 1999), na našem území se ve větší míře začala pěstovat až ve 20. století (Kirschner a Šída, 2004).

Z botanického hlediska se jedná o světlomilné a teplomilné jednoleté byliny s křovitým kořenem, drsně chlupatou lodyhou, střídavými srdčitě vejčitými dlouze řapíkatými listy a mohutnými koncovými úbory složenými ze žlutých jazykovitých a černých trubkovitých květů. Od ostatních druhů slunečnic, vyskytujících se na našem území, se liší vejčitými v úzku špičku zúženými zákrovními listy širšími než 4 mm (Kirschner a Šída, 2004).

3.1.1 Choroby slunečnice

Vzhledem k tomu, že na našem území je slunečnice pěstována mimo své optimální klimatické podmínky, je spektrum houbových chorob a rozsah jejich výskytu odlišné od zemí jižní Evropy zejména Severní Ameriky. V důsledku malého rozsahu pěstování slunečnice u nás je obecně výskyt chorob a jejich dopady na sklizeň a ekonomiku nižší (Kudlíková a Veverka, 1999).

Nejvýznamnějšími chorobami na území České republiky jsou bílá hniloba slunečnice (původce *Sclerotinia sclerotiorum*), plísňovitost slunečnice (*Plasmopara halstedii*), rzivost slunečnice (*Puccinia helianthi*) (Čača et al., 1981) a červenohnědá skvrnitost (*Phomopsis helianthi*) (Kudlíková a Veverka, 1999). Za deštivého počasí v době dozrávání jsou slunečnice v našich klimatických a půdních podmínkách ohroženy také plísní šedou (*Botrytis cinerea*), která napadá úbory, znehodnocuje nažky a někdy dokonce znemožňuje sklizeň (Kudlíková a Veverka, 1999).

Slunečnice pěstované v Severní Americe ohrožuje zejména napadení úborů houbou *Rhizopus oryzae*, což vede ke znehodnocení nažek. Na listech a stoncích se často vyskytuje padlí čekankové (*Golovinomyces cichoracearum*) a rez slunečnicová (*Puccinia helianthi*), které však neovlivňují výnos. Významné jsou také vadnutí a hniloba stonků způsobená houbou

Sclerotinia sclerotiorum a v neposlední řadě plíseňovitost slunečnice vyvolaná *Plasmopara halstedii* (Gulya et al., 1991).

3.1.2 Symptomy plíseňovitosti slunečnice

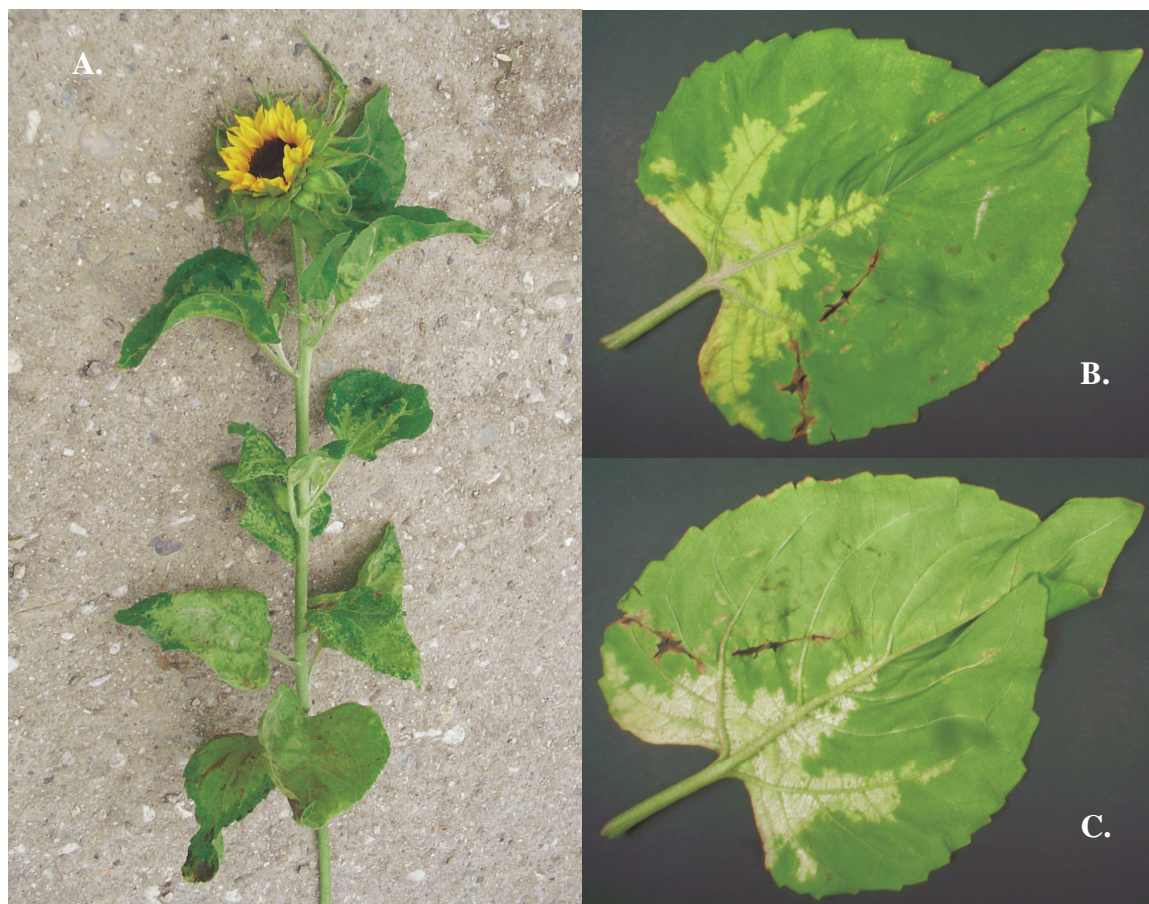
P. halstedii způsobuje u rostlin celou řadu symptomů, které se mohou lišit v závislosti na stáří rostlin a podmínkách prostředí. u rostlin primárně infikovaných oosporami z půdy při silném napadení semenáčků dochází k padání klíčících rostlin (www.eppo.org), případně se na spodní i svrchní straně děložních lístků objeví povlak sporangioforů (Spring et al., 1991), viz. obr. 1.



Obr. 1. Sporulace *P. halstedii* na semenáčku slunečnice.

U starších rostlin se při primárním napadení přes kořenový systém z půdy vyskytuje systémová infekce ovlivňující vývoj stonků, listů a květenství. Projevuje se zakrslým rosetovitým vzrůstem v důsledku zkrácení internodií, nahloučení a zvýšení počtu listů (Spring et al., 1991), viz obr. 2. Listy na stonku jsou téměř ve vstřícném postavení, plocha čepele je redukována a zkadeřena, řapíky ztlustlé (Šedivý et al., 1977). Část listové čepele, kterou prorůstá mycelium patogenu, je ztloustlá a chlorotická, nachází se zpočátku na bázi, u starších listů podél listové žilnatiny. Za příznivých podmínek se může na povrchu vytvořit bělavá vrstva

sporangioforů, která odpovídá chlorotické části listu (Čača et al., 1981). Systémově infikované rostliny většinou nekvetou a pouze asi 30 % z nich vytvoří květenství (Spring et al., 1991). Úbory jsou v tomto případě drobné, deformované a počet semen v úboru je snížen o cca 75 % (Čača et al., 1981). Semena ze systémově infikovaných rostlin mají výrazně sníženou hmotnost a jsou většinou sterilní nebo obsahují hyfy *P. halstedii*, které po vyklíčení rostlin opět působí systémovou infekci (Spring et al., 1991)



Obr. 2. Slunečnice systémově infikovaná *P. halstedii*. A. celkový pohled, B. detail svrchní strany infikovaného listu, C. detail sporulace na spodní straně infikovaného listu

K dalším typům infekce patří ještě systémová infekce omezená pouze na děložní lístky či infekce lokalizovaná pouze v podzemních orgánech, kořenech a hypokotylu. Při sekundární infekci prostřednictvím nepohlavně vzniklých sporangií během vegetace v porostu jsou charakteristickými symptomy ohraničené chlorotické léze na listové čepeli, provázené sporulací opět na spodní straně listu (www.eppo.org).

3.1.3 Ochrana proti plísnovitosti slunečnice

Ochrana proti houbovým chorobám obvykle spočívá v aplikaci fungicidů (moření osiva nebo postřik rostlin), v pěstování rezistentních odrůd rostlin a v dodržování standardních agrotechnických a fytokaranténních postupů. V případě *P. halstedii* je to dlouhodobé omezení pěstování slunečnic na pozemcích zamořených oosporami a likvidace rostlin z výdrolu v následných plodinách (Kudlíková a Veverka, 1999).

V současnosti je nejrozšířenějším způsobem ochrany ve světě i u nás pěstování rezistentních odrůd slunečnice. První hybrid rezistentní proti evropským rasám *P. halstedii* jménem Alliance RM byl v České republice zaregistrován v roce 2000, rok poté co byly na našem území poprvé pozorovány rostliny s příznaky plísnovitosti. V roce 2002 byla *P. halstedii* zařazena mezi karanténní choroby v České republice a povoleno je proto používání pouze certifikovaného osiva rezistentních hybridů (Špurný, 2005).

Přestože je pěstování rezistentních odrůd poměrně účinnou metodou ochrany, není konečným řešením v boji proti plísni slunečnicové, protože se neustále objevují nové rasy patogenu schopné překonávat geny rezistence, což vyžaduje stálou produkci nových rezistentních odrůd (Molinero-Ruiz et al., 2003)

Do roku 1995 bylo účinné i používání fungicidů na bázi metalaxylu a jeho aktivního stereoisomeru mefenoximu (Gulya, 2000). V roce 1995 byla zaznamenána první rasa rezistentní k metalaxylu ve Francii a o tři roky později i v USA. V centrální oblasti USA bylo pak v roce 1999 zaznamenáno téměř 200 izolátů *P. halstedii* tolerantních k metalaxylu (Gulya, 2000). Další rasy patogenu rezistentní vůči metalaxylu se v průběhu času objevily i v Maďarsku, Turecku, Španělsku (Molinero-Ruiz et al., 2003) a v roce 2005 i v Německu (Spring et al., 2006).

Chemická ochrana proti peronosporám je stále méně účinná, protože podporuje mikroevoluci v přírodních podmínkách, kde fungicidy působí jako selekční faktor. Zkracuje se i doba účinnosti používaných látek. Fungicid mefenoxim, alternativa k metalaxylu, nebude řešením problému po dlouhou dobu, v přírodních populacích *Phytophthora capsici* již byly nalezeny rezistentní rasy (Molinero-Ruiz et al., 2003). Navíc je problém s nalézáním nových účinných látek. Např. při testování nových 30 neregistrovaných fungicidů v roce 2000 nebyl nalezen žádný, který by stoprocentně potlačoval *P. halstedii*, pouze čtyři z nich (ethaboxam, fluazinam, mancozeb a zoximide) měly fungistatické účinky (Gulya, 2000).

V současné době bohužel neexistuje spolehlivá fungicidní ochrana proti *P. halstedii* a kvůli schopnosti patogenu rychle se přizpůsobovat rezistentním odrůdám slunečnice je nutné inovovat i další způsoby ochrany plodiny proti této chorobě.

3.2 *Plasmopara halstedii*

Vřetenatka slunečnicová *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. a De Toni (1888), známá také pod názvy *Peronospora halstedii* Farl. (1882) nebo *Plasmopara helianthi* Novot. (1962), je původcem jedné z nejdestruktivnějších chorob, tzv. plísňovitosti slunečnice (Lebeda et al., 2006).

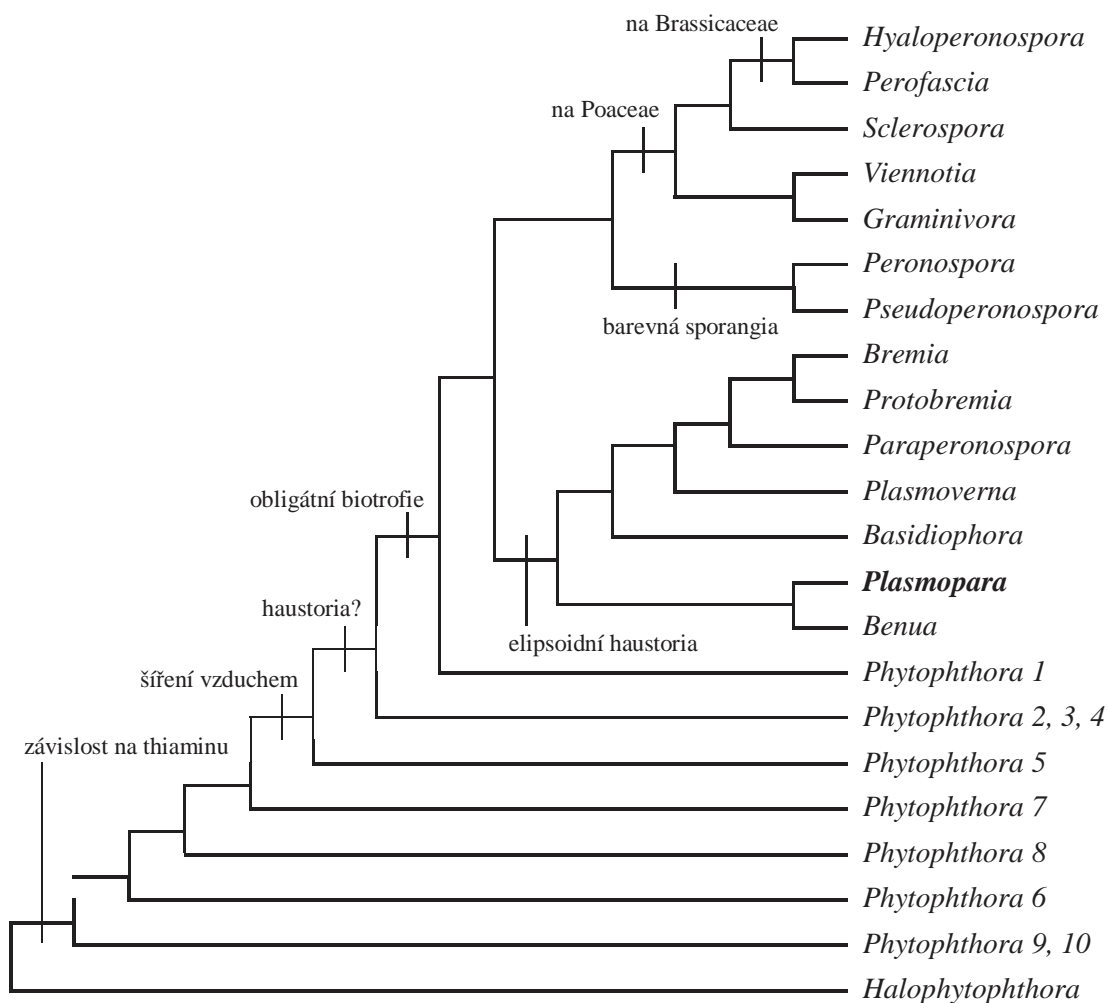
Jedná se o biotrofní parazit ze skupiny tzv. „downy mildews“ (Dick, 2001). Český odborný název v současnosti není ustálený, používá se označení peronospory, plísně nebo „nepravá padlí“. Studium peronospor se tradičně zabývá mykologie, protože jejich fyziologie a ekologie je velmi podobná houbám *sensu stricto* řazených do říše Fungi. Molekulárně fylogenetická, morfologicko-anatomická a biochemická data ale potvrzují, že peronospory jsou v současnosti právem vyděleny do samostatné říše Straminipila, kam spadají spolu s heterokontními řasami (Voglmayr, 2008). Systematické zařazení peronospor nebylo dlouho jednoznačné a prošlo složitým vývojem. Linné (v polovině 18. stol.) řadil tyto organismy do říše Plantae, Haeckel (1878) je přemístil do nově zavedené říše Protista, Wittaker (1969) umístil downy mildews do říše Fungi a nakonec podle Cavalier-Smitha (1998) spadají do říše Chromista a tento názor je v současnosti víceméně uznáván (Lebeda et al. 2006).

Nejnovější systémy však na základě molekulárních dat a několika dalších znaků (chlorofyl c, tripartitní mastigonemy, ruducha společným donorem chloroplastů) nepovažují Straminipila (syn. Chromista) za samostatnou říši a začleňují tyto organismy spolu s obrněnkami, nálevníky a zástupci oddělení Apikomplexa do říše Chromalveolata (Cavalier-Smith, 2003; Baldaufová, 2004; Simpson a Rogers, 2004; Keeling, 2004 in Kalina a Váňa, 2005).

3.2.1 Taxonomie *P. halstedii*

Podrobnější klasifikace v rámci říše Straminipila (syn. Chromista) je doposud neustálená a mění se v závislosti na nových informacích, které poskytují zejména molekulárně biologické metody taxonomie. Na základě morfologických a anatomických znaků je třída Peronosporomycetes (syn. Oomycetes) rozdělena do tří podtříd: Saproleginomycetidae, Rhipidiomycetidae a Peronosporomycetidae, což bylo potvrzeno i molekulárně fylogenetickými daty (Hudspeth et al., 2000). Klasifikace na nižších taxonomických úrovních je doposud neustálená, potvrzuje se však, že čeleď Albuginaceae, která byla tradičně považována za blízce příbuznou čeledi Peronosporaceae, je ve skutečnosti starou odvozenou linií a mohla by být dokonce povýšena na samostatný řád (Voglmayr, 2008). DNA data naopak ukazují na blízkou příbuznost rodu *Phytophthora* k peronosporám (Voglmayr, 2008).

Tab. 1. Fylogenetické vztahy peronospor a blízce příbuzných rodů. Kladogram je vytvořen na základě úseků D1, D2, D3 a D7/D8 jaderné rDNA velké podjednotky, genů pro COX2, β -tubulin a NADH 1 a jedná se o shrnutí fylogramu na základě maximální pravděpodobnosti; větve se signifikantní podporou označeny silněji. V kladogramu jsou vyznačeny možné synapomorfie, první čtyři (závislost na thiaminu, adaptace k šíření propagulí vzduchem, haustoria a obligátní biotrofie) jsou hlavní adaptivní kroky k parazitismu na rostlinách. Překresleno podle Göker et al.(2006).



Doposud není možné s určitostí tvrdit, že skupina „downy mildews“ je monofyletického původu. Práce Göker et al. (2006) ukazuje na monofyletický původ peronospor, zatímco Göker a Stamatakis (2006) (in Voglmayr, 2008) monofyletický původ vyvrací. Monofyletické jsou ovšem tři vývojové větve peronospor, které jsou dobře definované i morfologickými a ekologickými synapomorfii (tab. 1): větev sdružující peronospory s barevnými sporangii (rody *Peronospora* a *Pseudoperonospora*); s měchýřkovitými a elipsoidními haustorii (rody *Basidiophora*, *Bremia*, *Benua*, *Paraperonospora*, *Plasmopara*, *Plasmoverna* a *Protobremia*)

a větev peronospor parazitujících na zástupcích čeledi Brassicaceae (rody *Hyaloperonospora* a *Perofascia*) (Göker et al., 2006).

Třída Peronosporomycetes (Oomycetes) sdružuje cca 1000 druhů (Voglmayr, 2008), podle šířky pojetí druhu jich může být i 1500 v 75 rodech (Lebeda et al., 2006) a 19 čeledích (Kalina a Váňa, 2005). Řád Peronosporales je považován za polyfyletickou skupinu zahrnující obligátní parazity zejména dvouděložných rostlin s intrasporangiální zoosporogenezí a tenkostěnnými oogonií (Lebeda et al., 2006). Do čeledi Peronosporaceae je zařazeno cca 600 druhů v 9 rodech (Lebeda et al., 2006). Mimo rod *Plasmopara* jsou významné patogeny rostlin zastoupeny i v příbuzných rodech *Peronospora*, *Pseudoperonospora* či *Bremia* (Dick, 2001), které se od sebe odlišují především tvarem a stylem větvení sporangioforů (Sedlář et al., 2009). Rod *Plasmopara* čítající 109 druhů patří spolu s rodem *Peronospora* mezi největší v rámci čeledi (Lebeda et al., 2006).

Tab. 2. Taxonomické zařazení *P. halstedii* podle dvou současných pohledů.

	Cavalier-Smith (1986)	Dick (2001)
říše	Chromista	Straminipila
podříše	-	Chromobiotae
kmen	-	Heterokonta
oddělení	Oomycota	Bigyra (= Pseudofungi)
pododdělení	-	Peronosporomycotina
třída	Oomycetes	Peronosporomycetes
podtřída	-	Peronosporomycetidae
řád	Peronosporales	Peronosporales
čeleď	Peronosporaceae	Peronosporaceae
rod	<i>Plasmopara</i>	<i>Plasmopara</i>

3.2.2 Morfologie *P. halstedii*

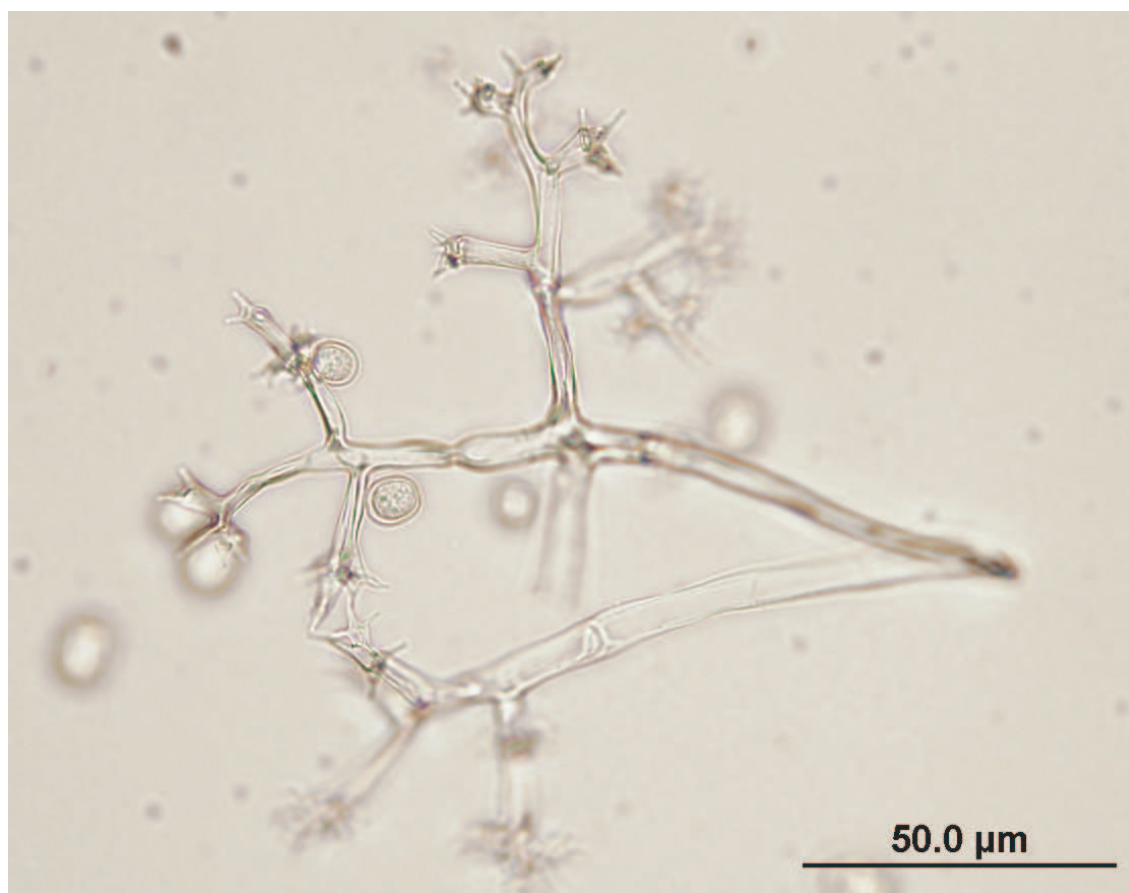
Hyalinní coenocytické mycelium s nepravidelně zduřelými hyfami o průměru 6-20 µm roste intercelulárně, nepravidelně se větví a do buněk hostitele vysílá malá kulovitá vezikulární haustoria o průměru 5-10 µm (Baudyš et al., 1958).

Stromečkovité sporangiofory (obr. 3) jsou laterálně větvené (Kalina et Váňa, 2005) dlouhé 300-700 µm (Šedivý et al., 1977), široké 7-14 µm s oblou nebo špičatou bází (Stojaspal, 2009) vystupují po 5 – 6 z průduchů (Baudyš et al., 1958), větví se v horní polovině a vybíhají ve 3-4 dlouhá tenká a špičatá sterigmata (Šedivý et al., 1977).

Hyalinní zoosporangia nasedající ke sporangioforům sterigmaty jsou eliptická až vejčitá s rozměry 18–30 × 14–20 μm (Hall, 1989), uvnitř kterých se tvoří až 20 dvoubičkatých pohyblivých zoospor (Stojaspal, 2009).

Hyalinní kulovitá či oválná oogonia o průměru 30-40 μm obsahují po 1 oosféře (Kalina et Váňa, 2005). K oogoniím jsou hormonálně přitahována kyjovitá anteridia o délce 12-13 μm vyrůstající na anteridiálních větvích hyf.

P. halstedii je homothalický druh (Spring, 2001) a rozmnožuje se pomocí oogametangiogamie; samičí jádra putují z anteridia, které je v kontaktu s oogoniem, kopulačními kanálky k oosféře, která se po oplození mění v zygotu a následně v tlustostěnnou vytrvalou oosporu. Kulovité oospory s průměrem 23-30 μm se vyznačují tenkým žlutohnědým zřaseným exosporem (Šedivý et al., 1977) a mohou se tvořit ve všech vegetativních orgánech hostitele, nejčastěji pod listovou epidermis nebo v pletivech kořene hostitelské rostliny (Hall, 1989).



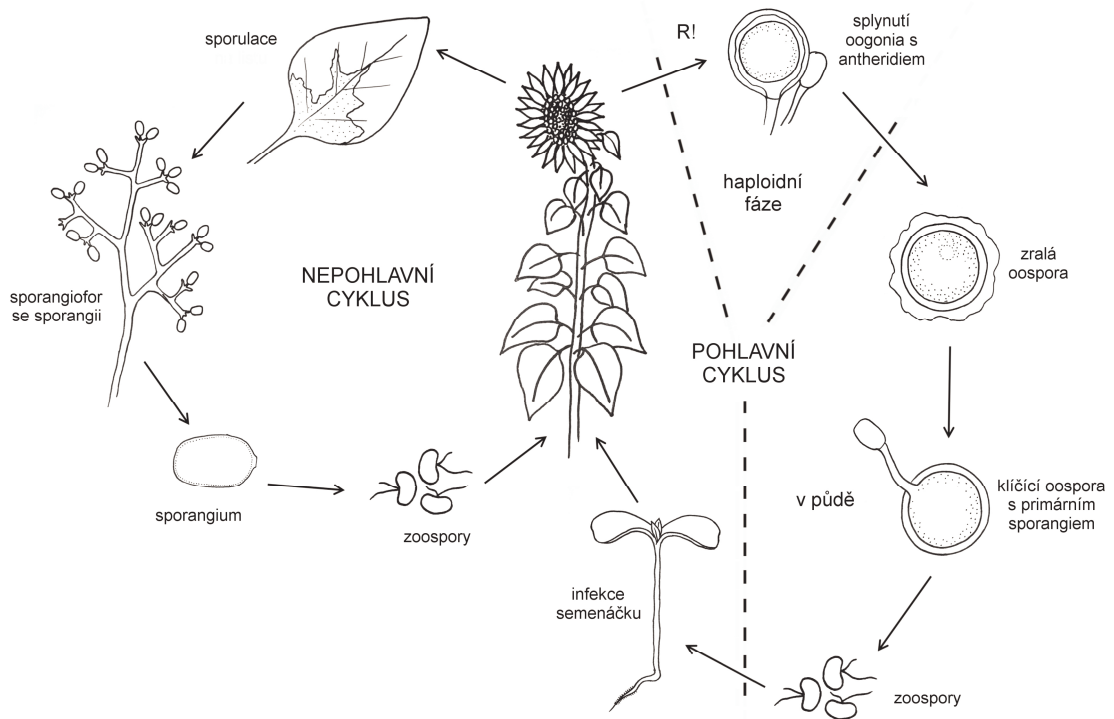
Obr. 3. Sporangiofor *P. halstedii*

3.2.3 Biologie *P. halstedii*

P. halstedii je obligátní biotrofní patogen, tj. k životu a rozmnožování nutně vyžaduje živé pletivo a není schopen existence nezávisle na svém hostiteli. Jedinou výjimku tvoří odpočívající tlustostěnné oospory, produkty pohlavního rozmnožování, které jsou schopné přežít v půdě po dobu 5-10 let (Sedlářová et al., 2010).

Životní cyklus vřetenatky slunečnicové (obr. 4) začíná oosporou, která je zdrojem primární infekce a klíčí za tvorby jediného sporangia, v němž se diferencují jednotlivé dvoubičíkaté zoospory. Ty jsou po uvolnění schopné se pohybovat ve vodním prostředí; pokud se dostanou do blízkosti kořenů, kořenových vlásků, stonku nebo listů hostitele, tak zoospory encystují a následně penetrují do hostitele skrz rhizodermis, resp. epidermis (Virányi, 1988).

Intercelulární mycelium patogenu prorůstá orgány hostitele, do buněk hypokotylu později epikotylu a stonku vysílá haustoria, a pokud je interakce hostitel – patogen kompatibilní, postupně kolonizuje rostlinu směrem k vrcholu, což může za vhodných podmínek vést až k systémové infekci (www.eppo.org).



Obr. 4. Životní cyklus *P. halstedii*. Překresleno podle Springa (2001).

Za příznivých podmínek (teplota 10-25 °C a dostatečně vysoká vzdušná vlhkost) dochází ke sporulaci. Průduchy listů hostitele prorůstají sporangiofory nesoucí zoosporangia, která jsou

roznášena větrem a mohou sloužit jako zdroj sekundární infekce. Ze zoosporangií dopadajících na povrch listů hostitelských rostlin za vlhka klíčí zoospory, které opět encystují, penetrují do pletiv hostitele a prorůstají je intercelulárním myceliem. Na listech se tvoří lokalizované léze, v kompatibilní interakci provázené na spodní straně sporulací jako další zdroj sekundárního inokula (Spring, 2001). Nepohlavní cyklus trvá za ideálních podmínek 1-2 týdny, což napomáhá rychlému šíření infekce v homogenním porostu (Bouterige et al., 2003).

Ke konci vegetační sezóny hostitele v průběhu 5-6 týdnů dochází v infikovaných pletivech k oogametangiogamii a produkci silnostěnných vytrvalých oospor, které v půdě přežívají 5-10 let. Díky nim patogen přečkává ve zbytcích hostitelských pletiv nepříznivé období. Na jaře začíná klíčením oospor nový infekční cyklus (www.eppo.org).

P. halstedii může infikovat hostitele třemi způsoby: 1/ **primární infekci** semenáčků slunečnic působí pohlavní oospory klíčící v půdě; vede k padání klíčících rostlin nebo systémové infekci s poruchami růstu a kvetení; 2/ **sekundární infekci** způsobují nepohlavní zoosporangia vyvíjející se v průběhu sezóny na vegetativních orgánech hostitele šířená vzduchem; sporangia infikují další rostliny v porostu a symptomem jsou lokalizované léze na listech (vznik tohoto typu infekce je značně ovlivněn klimatickými podmínkami, protože sporogeneze, encystace zoospor a penetrace hostitelské epidermis vyžaduje období několika hodin s vysokou vzdušnou vlhkostí); 3/ **latentní infekce** je bez symptomů, přesto je patogen stále schopen dokončit životní cyklus; mycelium je přítomno v blízkosti cévních svazků květů, prorůstá pod osemením a je schopné infikovat klíčící rostlinu. Z ekonomického hlediska tato infekce nemá velký význam, působí jen mírné snížení hmotnosti semen, ale významná je z hlediska epidemiologického (Spring, 2001).

3.2.4 Hostitelský okruh a rozšíření *P. halstedii*

P. halstedii může růst na pěstovaných i planě rostoucích druzích slunečnic, které jsou typickými hostiteli, ale také na řadě dalších hvězdicovitých rostlin (www.eppo.org). Do hostitelského okruhu *P. halstedii* patří cca 100 zástupců z čeledi Asteraceae, např. z rodů *Ambrosia* (Vajna, 2007), *Artemisia*, *Bidens*, *Centaurea*, *Cineraria*, *Coreopsis*, *Dimorphotheca*, *Erigeron*, *Rudbeckia*, *Solidago*, *Verbena* (Stojaspal, 2008) a *Xanthium* (Virányi, 2002). Planě rostoucí hostitelské rostliny jsou významné pro šíření infekce a vývoj patogenu, a mohou sloužit jako zdroj inokula či jako médium pro vznik nových ras patogenu (Agrios, 2005).

Jak již bylo řečeno, *P. halstedii* se vyskytuje celosvětově v oblastech, kde se pěstují slunečnice. Primárním centrem rozšíření je Severní Amerika, konkrétně oblast na pomezí Mexika a USA, odkud se patogen šířil zejména do Evropy a Jižní Ameriky. Sekundárním centrem je oblast jižní Ukrajiny severně od Černého Moře, odkud se *P. halstedii* šířila dále do

Evropy, zpět do Severní Ameriky a poté do Afriky a Asie (Virányi, 2002), viz obr. 5.



Obr. 5. Mapa center a rozšíření *P. halstedii* ve světě podle Virányiho (2002). Přerušovaný kroužek značí předpokládané genové centrum pěstované slunečnice, plné kroužky představují (1) místo původu a (2) centrum sekundárního rozšíření *P. halstedii*. Tečky představují země s potvrzeným výskytem *P. halstedii* na kulturních slunečnicích.

Tab. 3. Přehled výskytu *P. halstedii* (www.eppo.org).

Světadíl	Stát
Evropa	Albánie, Bulharsko, Česká republika, Egypt, Estonsko, Francie, Itálie, Maďarsko, Moldavsko, Německo, Polsko, Rakousko, Rumunsko, Rusko, Slovensko, Španělsko, Švýcarsko, Turecko, Ukrajina
Severní Amerika	Kanada, USA (Kalifornie, Kansas, Minnesota, Severní Dakota, Jižní Dakota)
Asie	Ázerbájdžán, Čína, Gruzie, Indie, Irán, Irák, Izrael, Japonsko, Kazachstán, Pákistán, Rusko, Turecko
Afrika	Egypt, Etiopie, Keňa, Maroko, Zimbabwe, Uganda
Střední Amerika	Dominikánská republika
Jižní Amerika	Argentina, Brazílie, Chile, Paraguay, Uruguay
Austrálie a Oceánie	Austrálie (výskyt pouze na <i>Arctotheca calendula</i>), Nový Zéland (nepotvrzeno)

3.2.5 Rasy *P. halstedii*

Komplex druhu *P. halstedii* tvoří několik fyziologických ras se značnou diverzitou, které se liší schopností překonávat určité geny rezistence hostitelských rostlin. Pro určení rasy patogenu je v současné době používáno testování na mezinárodně standardizovaném souboru devíti diferenciačních linií slunečnic (tab. 4). Podle kombinací typu odezvy jednotlivých genotypů slunečnic k infekci (náchylné nebo rezistentní) je stanovena rasa patogenu a označena tříčíselným kódem (Gulya, 2007).

Tab. 4. Přehled uspořádání standardního diferenciačního souboru genotypů slunečnice a jejich reakce na infekci jednotlivými rasami *P. halstedii*. R = rezistentní, s = náchylné (Gulya, 2007).

Současné označení ras	100	300	700	730	770	310	330	710	330	703	731
Soubor 1											
HA-300	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
RHA-265	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
RHA-274	R	R	s	s	s	R	R	s	R	s	s
Soubor 2											
DM-2	R	R	R	s	s	s	s	s	s	R	s
PM-17	R	R	R	s	s	R	s	R	s	R	R
803-1	R	R	R	R	s	R	R	R	R	R	R
Soubor 3											
HAR-4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	s	s
HAR-5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	s	R
HA-335	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Původní označení ras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Existence fyziologických ras byla zaznamenána v 70. letech 20. století, kdy se začaly v Evropě a v Severní Americe intenzivně pěstovat hybridní odrůdy slunečnic. Byly zaznamenány dvě rasy: americká rasa 100 a evropská rasa 300; jejich rozlišení bylo založeno na schopnosti překonávat gen rezistence *Pl₁*. V průběhu 80. let bylo v Severní Americe rozlišeno několik dalších ras a od 90. let se nové rasy začaly objevovat a šířit i v Evropě (Rashid, 1993).

Např. V roce 1996 se objevila americká rasa 100 v Maroku (Achbani et al., 1996), ve Francii byly v roce 1988 a 1989 objeveny rasy 710 a 703, v roce 1995 pak zaznamenány další rasy 300 a 700 (Gulya, 2007).

Do roku 2006 bylo po celém světě zaznamenáno nejméně 36 fyziologických ras patogenu. Největší počet ras se vyskytuje v Severní Americe a Evropě, což je do jisté míry způsobeno intenzivním studiem *P. halstedii*, které přispívá k objevování nových fyziologických ras (Gulya, 2007).

Tab. 5. Počet fyziologických ras v jednotlivých oblastech (Gulya, 2007).

Kontinent	Počet ras
Severní Amerika	24
Evropa	21
Afrika	10
Asie	5
Jižní Amerika	5

V České Republice byly od roku 2007, kdy začal intenzivní výzkum *P. halstedii*, identifikovány rasy 700 a 770. Díky správné fyto karanténní praxi pochází infikované rostliny na našem území převážně z provokačních polí výzkumných ústavů (Sedlářová et al., 2010).

3.3 Anatomicko – fyziologické změny rostlin vyvolané infekcí

Přítomnost patogenu je pro rostlinu stresující, proto je nejen při inkompatibilní interakci spouštěna celá řada obranných mechanismů (Šutic a Sinclair 1991), což s sebou přináší změny nejen v zásadních metabolických procesech (Clark a Spencer-Phillips, 2004). Biotrofní parazité jsou zcela závislí na živém hostitelském pletivu kvůli zajištění výživy pro růst a rozmnožování. Tvoří haustoria v živých buňkách a ovlivňují metabolismus hostitele tak, aby vyhovoval jejich nárokům (Panstruga, 2003), tj. předcházejí nebo dlouhodobě potlačují obranné reakce hostitele, zejména smrt invadovaných buněk (Mendgen a Hahn, 2002).

Veškeré abnormality v hostitelském pletivu mají původ buď v reakci hostitele na patogen, nebo jsou způsobeny přímým působením patogenu či jeho metabolitů (Šutic a Sinclair 1991). Změny jako je hypertrofie a hypotrofie, hyperplazie a hypoplazie, meristemizace, sklerifikace a virescence pletiv, změny zbarvení a drobné nekrózy vznikající při hypersenzitivní reakci, jsou způsobeny reakcí hostitele na infekci (Agrios, 2005). Přímé působení patogenu způsobuje rozsáhlé nekrózy (jako hlavní symptom), poškození struktury buněk (penetrace, růst primárních, sekundárních vezikulů a haustorií) a pletiv (prorůstání intercelulárních hyf, vylučování lytických enzymů) či protržení epidermis (uvolnění spor nebo obnažení rozmnožovacích struktur), ke kterým dochází při růstu infekčních struktur patogenu (Trojanová, 2008).

Při vývoji haustoria uvnitř hostitelské buňky vyvolává patogen přímo lokální destrukci buněčné stěny a invaginaci plazmatické membrány, která se mění na extrahaustoriální membránu

(Hardham, 2007), zatímco rostlina reaguje změnou struktury, velikosti a polohy organel (Takemoto, 2003), tvorbou kalózy okolo haustoriálního krčku (O`Connell a Panstruga, 2006) a podřizuje se změnám v metabolismu, které souvisí s čerpáním živin patogenem (Šutić a Sinclair, 1991). Interakce rostliny a patogenu je však komplexní proces, liší se podle patosystému, a proto je obtížné stanovit jasnou hranici mezi patologickými změnami způsobenými přímo patogenem a změnami vyvolanými odezvou na přítomnost a působení patogenu.

Patogeny jsou schopny svými metabolity a signály aktivně zasahovat do metabolických procesů hostitele (Panstruga, 2003). Mellersh a Heath (2001) prokázali, že k tomu, aby byly u napadené rostliny spuštěny nespecifické obranné mechanismy (produkce reaktivních forem kyslíku a zesílení buněčné stěny v místě penetrace), je nutná komunikace cytoplazmatické membrány s buněčnou stěnou hostitelských buněk prostřednictvím tzv. „Hechtian strands“. Přerušením této komunikace specifickými enzymy patogenu vyřazuje obranné mechanismy vigny čínské (*Vigna unguiculata*) rez *Uromyces vignae* (Mellersh a Heath, 2001).

Jiným příkladem může být umlčení produkce „patogenesis-related“ (PR) genů, které jsou aktivovány jako reakce na infekci. Greensen et al. (1997) (in Panstruga, 2003) prokázal, že PR-geny jsou umlčovány RNA pocházející z buněk hostitele, kde došlo k tvorbě haustorií.

Obecně lze rozlišit dva typy interakce hostitel – „parazitický“ patogen:

1/ při **inkompatibilní interakci** patogen proniká do pletiv hostitele, nedochází však ke kolonizaci, protože infekce je zastavena v samém počátku jeho vývoje např. hypersenzitivní reakcí. I přesto ale může přítomnost patogenu vést k řadě dalekosáhlých fyziologických změn, které mohou u hostitele vyústit např. v získanou systémovou rezistenci (SAR);

2/ při **kompatibilní interakci** není infekce zastavena, probíhá kolonizace hostitelských pletiv a orgánů, dochází k rozvoji onemocnění a obvykle i symptomů (Agrios, 2005). Změnami vyvolanými v průběhu infekce patogenem se podrobně zabývá následující text.

3.3.1 Fotosyntéza rostlin a infekce

Fotosyntéza je jedním z fyziologických procesů, který bývá pravidelně ovlivňován patogeny buď přímou infekcí fotosyntetizujících buněk nebo jako nepřímý důsledek napadení jiných buněk nebo celých pletiv (Šutić a Sinclair 1991). Biotrofní parazité v počátku infekce fotosyntézu rostliny ovlivňují pouze nepatrně; podle Kupreviche (in Šutić a Sinclair 1991) např. rzi obvykle nesnižují intenzitu fotosyntézy do doby sporulace. V některých případech mohou patogeny dočasně intenzitu fotosyntézy zvyšovat, jak např. zaznamenala Dorohova (in Šutić a Sinclair 1991) v průběhu prvního dne infekce u *Phytophthora infestans*.

U některých interakcí rostlin s biotrofními parazity se u rostlin mohou vyskytovat tzv. „green islands“ - ostrůvky zeleného pletiva obklopující rozmnožovací orgány hostitele, což je typické např. u rzí (Walters et al., 2008) či černé skvrnitosti javorů (*Rhytisma acerinum*). V oblasti „green islands“ je fotosyntetická aktivita buněk vyšší než v okolním pletivu, ale zároveň nižší než v pletivu neinfikovaném. Účinnost fotosyntetického aparátu byla zkoumána u ječmene infikovaného *Blumeria graminis* a ta v oblasti „green islands“ klesla o 47 % oproti zdravému pletivu (Coghlan a Walters, 1992 in Walter et al., 2008). Přestože je fotosyntetická aktivita v oblasti „green islands“ výrazně snižena oproti kontrole, v okolním pletivu fotosyntetická aktivita není téměř detekovatelná a ostrůvek zeleného pletiva představuje pro patogen značnou výhodu (Walter et al., 2008).

Patogeny mohou snižovat intenzitu fotosyntézy v první řadě tím, že zabraňují průniku světla k fotosyntetizujícím buňkám. Takto ovlivňují hostitele zástupci padlí (Erysiphales), kteří tvoří mycelium téměř výlučně na povrchu listů. Vrstva hustého povrchového mycelia může dopadající světlo buď odrážet nebo pohlcovat (Rubin a Artsikhovska in Šutić a Sinclair 1991).

Fotosyntetická aktivita rostliny bývá ovlivněna také změnami v absorpci světla, kterou zajišťuje chlorofyl. Účinnost absorpce je částečně založena na optických vlastnostech listu, jako je reflexe či transmise, které patogen mění svou přítomností v pletivu, sporulací a vyvoláním senescence (Prokopová et al., 2006), a na množství chlorofylu v buňkách. Např. Tang et al. (1996) zjistili, že infekce *Arabidopsis thaliana* plísní bělostnou (*Albugo candida*) výrazně snižuje obsah chlorofylu. Snižování množství chlorofylu v pletivech hostitele vyvolané patogenezí může být příčinou nižší fotosyntetické aktivity (Scholes, 1992 in Tang et al., 1996), ale nebyla prokázána lineární závislost mezi těmito dvěma parametry (Šutić a Sinclair 1991). Obecně, nižší obsah chlorofylu v pletivu může být způsoben hned několika faktory: 1/ nedostatečnou syntézou chlorofylu, kterou způsobují zejména systémové infekce; 2/ degradací chloroplastů či chlorofylu a 3/ nekrózou fotosyntetizujících buněk a pletiv.

Patogeny mohou rovněž ovlivňovat proces fosforylace, biotrofní parazité obvykle částečně blokují necyklickou fosforylaci tím, že zabraňují transportu elektronů z vody na NADP (Šutić a Sinclair, 1991).

Na intenzitu fotosyntézy má vliv také množství CO₂ přiváděného k chloroplastům (Šutić a Sinclair, 1991). Řada biotrofních parazitů proniká do hostitele skrz průduchy (Uredinales), nebo průduchy prorůstají jejich rozmnožovací orgány, jak je tomu právě u peronospor (Trojanová, 2008). Dalším případem může být povrchové mycelium padlí, které přerůstá přes stomata. V každém případě je funkce průduchů narušena a do rostlinného pletiva není přiváděn dostatek CO₂ (Šutić a Sinclair, 1991). Patogeny působící histopatologické změny obvykle narušují funkci a permeabilitu membrán (Trojanová, 2008), což vede k omezené difuzi plynů

v rámci pletiva a nedostatečnému zásobování chloroplastů CO_2 (Šutić a Sinclair 1991). Moriondo et al. (2005) studovali a porovnávali vliv padlí (*Uncinula necator*) a vřetenatky révové (*Plasmopara viticola*) na výměnu plynů v listech révy vinné. Bylo prokázáno, že oba patogeny tvorbou lézí snižují intenzitu fotosyntézy nejen zmenšením fotosynteticky aktivní plochy listů, ale i ovlivněním výměny plynů ve zdravých částech listů. Přítomnost padlí však výrazně snižovala asimilaci listů, zatímco peronospora tento parametr téměř neovlivnila. Přítomnost padlí navíc vedla k uzavírání průduchů a zvýšené transpiraci. Dále bylo prokázáno, že ani jeden z patogenů významně neovlivňuje fluorescenci u napadených listů a tudíž ani účinnost fotosyntetického aparátu. Patogeny mohou mít také přímý vliv na uzavírání průduchů; bylo zjištěno, že během šesti hodin po inokulaci dochází v místě infekce k rozsáhlému uzavírání průduchů, které se opět otevírají až v pozdějších fázích infekce (Scharte et al., 2005).

Snížení intenzity fotosyntézy může dále vyvolávat inhibice světelných reakcí (Montalbini a Buchman, 1974 in Tang et al., 1996), redukce součástí elektron-transportního řetězce (Montalbini et al., 1981 in Tang et al., 1996), a snížení aktivity či porušení funkce Calvinova cyklu a enzymů, zvláště RUBISCO (Manner a Scott, 1985 in Tang et al., 1996). Např. infekce *Albugo candida* snižuje u *Arabidopsis thaliana* aktivitu enzymu RUBISCO (cca na 50%) a podstatně zvyšuje koncentraci sacharosy v infikovaném pletivu (měřeno 8 dpi). Interakce s *Phytophthora nicotianae* vyvolává u *Nicotina tabacum* (Scharte et al., 2005) zastavení elektron-transportního řetězce.

Jedním z nejnápadnějších symptomů, které vyvolává *P. halstedii* je chloróza vegetativních částí hostitelské rostliny, prorostlých intercelulárním myceliem (Čača et al., 1981). Chlorózy jsou vyvolány snížením obsahu chlorofylů v infikovaném pletivu, čímž ovlivňují účinnost fotosyntézy a průběh souvisejících metabolických drah (Šutić a Sinclair 1991). Dosud neexistovala práce o vlivu *P. halstedii* na fotosyntézu *Helianthus annuus*. Byly však studovány interakce rostlin a dalšími peronosporami. Např. Prokopová et al. (2010) studovali ovlivnění fotosyntetických parametrů salátu (*Lactuca sativa*) plísňí salátovou (*Bremia lactucae*) a došli k závěru, že u infikovaných rostlin dochází ke snížení obsahu fotosyntetických pigmentů v infikovaném pletivu, snížení účinnosti fotochemických reakcí fotosystému II (F_v/F_m), inhibici elektronového transportu (Φ_{PSII}) a zvýšení nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (NPQ). Podobně Mandal et al. (2009) zaznamenal u interakce *Plantago ovata* – *Peronospora plantaginis* snížení obsahu chlorofylů a snížení účinnosti fotosystému II. Díky výsledkům těchto příbuzných interakcí můžeme předpokládat, že *P. halstedii* bude fotosyntetický aparát slunečnice ovlivňovat obdobně.

3.3.2 Metabolismus cukrů u infikovaných rostlin

Biotrofní parazité, kteří čerpají metabolity hostitele (cukry, aminokyseliny, nukleotidy), způsobují zásadní změny v metabolismu a transportu těchto látek v rostlinném těle (Götz a Boyle, 1998). Na interakci *Phaseolus vulgaris* subsp. *nanus* - *Uromyces appendiculatus* subsp. *appendiculatus* Götz a Boyle (1998) studovali změny metabolických poolů cukrů v průběhu infekce. Bylo zjištěno, že sacharosa se vyskytuje v nejvyšší koncentraci ve zdravém pletivu nenapadených listů a její koncentrace klesala v napadených listech během sporulace patogenu. Koncentrace glukosy byla v počátku infekce stejná v celé rostlině (12 mg/g sušiny), na počátku vývoje uredí se koncentrace v místě infekce zvýšila na 29 mg/g sušiny a zároveň klesla v okolním pletivu na 7 mg/g. V průběhu dalšího vývoje patogenu koncentrace glukosy v místě infekce postupně klesala na 14-15 mg/g sušiny a v okolním pletivu se mírně zvyšovala. Naopak koncentrace fruktosy byla v rámci rostliny po celou dobu infekce přibližně stejná.

Biotrofní parazité často zvyšují aktivitu kyselých invertas v těle hostitele, díky čemuž se v infikovaném pletivu zvyšuje koncentrace hexóz (fruktosy a glukosy) (Tang et al., 1996), což může vyvolat potlačení transkripce genů souvisejících s fotosyntézou (Scholes et al., 1994 in Tang et al., 1996). Hromadění hexóz v místech infekce způsobené především zvýšenou aktivitou invertas navíc může vyvolat zpětnovazebnou inhibici Calvinova cyklu a fotosyntézy vůbec (Prokopová et al., 2010)

Tang et al. (1996) prokázali, že změny vyvolané biotrofní oomycetou v kompatibilní interakci (*Arabidopsis thaliana* – *Albugo candida*) jsou vyvolány zvýšením aktivity extracelulárních invertas stejně jako změny způsobené hemibiotrofní oomycetou při inkompatibilní interakci (*Nicotina tabacum* - *Phytophthora nicotianae*) (Scharte et al., 2005). Navíc v případě tabáku (*Nicotina tabacum*) napadeném plísní tabákovou (*Phytophthora nicotianae*) došlo ke stejnému nárůstu aktivity enzymu při inokulaci rostliny zoosporami nebo pouze bezbuněčným filtrátem ze zoospor (Scharte et al., 2005). Nárůst aktivity extracelulární invertasy zaznamenali i další autoři (Prokopová et al., 2010; Berger et al., 2004), proto jej lze považovat za poměrně pravidelný jev provázející infekci.

Na příkladu interakce pšenice – *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* byl studován vliv patogenu a následného použití fungicidu na metabolismus cukrů. V inokulovaném pletivu neošetřeném fungicidy, stejně jako v inokulovaném pletivu ošetřeného fungicidy 2 a 3 dpi, byla zaznamenána koncentrace glukosy, fruktosy i sacharosy vyšší než v kontrolních zdravých listech. Aplikace fungicidů vedla k dočasnému snížení aktivity invertasy v těchto listech, neovlivnila ale výrazně zvýšenou koncentraci sacharidů. V dalších sedmi dnech po aplikaci fungicidů se aktivita invertasy ve fungicidy ošetřených listech opět vrátila na stejnou hladinu jako před ošetřením i bez přítomnosti patogenu. To znamená, že aktivita invertasy byla přechodně zvýšena díky

signálu z počátku patogeneze, ale nebyla přímo ovlivněna velikostí sinku, tj. intenzitou napadení (Wright et al., 1995)

Zvýšení koncentrace hexóz v místě infekce nemusí souviset pouze s aktivitou invertasy; patogen se stává výrazným sinkem a v jeho blízkosti se hromadí cukry v důsledku transportu hexos směrem k sinku, ale i omezení transportu metabolitů vytvořených poblíž místa sinku do jiných částí rostliny (Gottlieb a Garner, 1946 in Walters et al. 2008).

P. halstedii, stejně jako další biotrofní parazité, čerpá metabolity hostitele. Místo infekce se proto stává výrazným sinkem, kde je shromažďována sacharosa a další živiny z okolního pletiva (Ayres et al., 1996; in Clark a Spencer-Phillips, 2004). Metabolismus cukrů u slunečnice infikované *P. halstedii* dosud nebyl studován, ale bylo prokázáno, že při infekci biotrofními houbovými organismy se v napadených částech infikované rostliny výrazně zvyšuje aktivita extracelulárních invertas (Prokopová et al., 2010; Mandal et al., 2009; Scharte et al., 2005; Tang et al., 1996; Wright et al., 1995), v pletivu stoupá koncentrace glukosy (Fotopoulos et al., 2003; Clark a Spencer-Phillips, 2004) na úkor sacharosy, která by byla za normálních okolností floémem transportována k jiným sinkům rostliny (Clark a Spencer-Phillips, 2004).

Výměnu metabolitů v interakci slunečnice s nekrotrofní hlízenkou (*Sclerotinia sclerotiorum*) studovali Jobic et al. (2007). V jejich pokusech koncentrace sacharosy, která byla lokalizována téměř výlučně v děložních lístcích slunečnice, poklesla během 48 h po inokulaci na nedetekovatelnou úroveň. Zároveň byly v napadeném pletivu identifikovány dvě isoformy kyselých invertas; první z nich pocházela z hostitele a byla aktivní prvních 24 hpi, dokud nedošlo k maceraci hostitelského pletiva. Druhá isoforma pocházela z patogenu a právě ona je zodpovědná za rozklad většiny dostupného substrátu. Aktivace extracelulární invertasy se zdá být obecnou reakcí rostlin na biotický stres (Fotopoulos et al., 2003 in Jobic, 2007); otázkou však zůstává, zda biotrofní parazité dále stimulují její aktivitu pro zajištění výživy nebo se jedná o invertasy produkované přímo patogeny, jako se ukázalo v případě *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.3.3 Fytohormony

Fytohormony, zvané též růstové regulátory, jsou látky ovlivňující růst a vývoj rostlin (Bari a Jones, 2009). Hrají rovněž důležitou roli v signálních procesech spojených s reakcí rostlin na biotický i abiotický stres (Robert-Seilantantz et al., 2007). Role „stresových hormonů“ salicylové kyseliny (SA), jasmonové kyseliny (JA) a ethylenu je v současnosti dobře prozkoumána v souvislosti s chorobami rostlin a rezistencí vůči patogenům. Role ostatních hormonů jako je abscisová kyselina (ABA), auxin, gibbereliny (GA), cytokininy (CK)

a brassinosteroidy (BL) doposud není zmapována tak podrobně (Robert-Seilaniantz et al., 2007).

Patogeny mohou na rostlinu působit **1/ přímo** vylučováním vlastních hormonů, které ovlivňují metabolismus hostitele (Robert-Seilaniantz et al., 2007), nebo **2/ nepřímo** produkty metabolismu, které u rostlin blokují tvorbu fytohormonů nebo receptory fytohormonů podílejících se na signalizaci vazbou fytohormonů transportovaných z jiných částí rostliny (Šutić a Sinclair 1991). K patogenům, které přímo vylučují do těla hostitele hormony, patří např. tumorogenní bakterie tvořící auxiny a cytokininy (*Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *Erwinia herbicola*), nebo pouze cytokininy (*Rhodococcus fascians*); z houbových organismů *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* produkující auxin *in planta*, biotrofové jako *Blumeria graminis*, *Pyrenopeziza brassicae* a *Venturia inaequalis* či nekrotrof *Cladosporium fulvum* produkující cytokininy; či saproparazité jako *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* produkující kyselinu abscisovou (Šutić a Sinclair 1991).

Nápadnými symptomy, které souvisí s výkyvy hladin auxinů a cytokininů, jsou změny velikosti a tvaru orgánů rostlin: zakrslost, gigantismus nebo tvorba nádorů (Robert-Seilaniantz et al., 2007; Šutić a Sinclair 1991). Velká skupina fytohormonů též zprostředkovává šíření signálu od buněk v bezprostředním kontaktu s patogenem do nenapadených částí a navození rezistence (Robert-Seilaniantz et al., 2007), především salicylová kyselina, jasmonová kyselina a ethylen (López et al., 2008).

Auxin je považován za jeden z nejdůležitějších fytohormonů v životě rostliny. Je produkován mladými pletivy – listy, apikálními či kořenovými meristémy a vajíčky. Auxiny podporují buněčné dělení, zvětšování orgánů, růst buněk a jejich diferenciaci. Jejich přítomnost také hraje roli při vývoji semen a plodů, v normální koncentraci brání senescenci a nízká hladina vyvolává opad listů (Buchanan et al., 2000). Biotrofní patogeny u rostlin většinou vyvolávají hyperauxinitu (nadbytek auxinu), jak je tomu např. u bramboru napadeném nádorovkou *Synchytrium endobioticum* (Reingard a Pashkar, 1958 in Šutić a Sinclair 1991) nebo kokošky pastuší tobolky infikované oomycetami *Albugo candida* a *Peronospora parasitica* (Kiermeyer, 1958 in Šutić a Sinclair 1991). Nevyrovnaná hladina auxinu pak vede k růstovým abnormalitám (Šutić a Sinclair 1991), jako jsou rakoviny, tumory a další nádory (Trojanová, 2008). Nadměrný prodlužovací růst vyvolaný hyperauxinismem se vyskytuje např. u *Euphorbia cyparissias* napadeného *Uromyces pisi*, nebo u kokošky pastuší tobolky napadené *Peronospora parasitica* (Daly a Inman, 1958 in Šutić a Sinclair 1991). Abnormální vývoj květů a semen *Brassica napus* v důsledku poklesu hladiny auxinů vyvolává *Albugo candida* (Šutić a Sinclair 1991).

Zakrslost, nejtypičtější symptom systémové infekce slunečnic, je způsoben nízkou hladinou auxinů odbourávaných IAA-oxidáso (řazena mezi PR-proteiny), která je produkována pouze

v infikovaných rostlinách v kyselém prostředí. Toto ukazuje na potenciál rostliny dorůst normální velikosti a podporuje hypotézu, že zakrslost slunečnic je způsobená degradací jednoho z fytohormonů (Benz a Spring, 1995). Aplikace auxinů např. postřikem vyvolává vznik výrazného sinku; bylo potvrzeno, že v místě výskytu biotrofních parazitů je skutečně zvýšená hladina auxinů, která jim napomáhá v získávání živin od hostitele (Walters et. al., 2008). Například Shaw a Hawkins (1958; in Walters et. al., 2008) detekovali zvýšenou koncentraci IAA v listech ječmene napadeném *Blumeria graminis* 5-10 dní po infekci.

Cytokinininy podporují buněčné dělení a syntézu chlorofylu, oddalují senescenci, opadávání listů a degradaci chlorofylu. Snížení nebo naopak zvýšení hladiny cytokininů, které jsou patogeny schopné vyvolat, vede k hyperplazii nebo hypoplazii buněk, případně k prorůstání bočních pupenů (Trojanová, 2008). Experimentální aplikace cytokininů může vyvolat prorůstání bočních pupenů a v důsledku symptom zvaný „witches broom“, tzv. „čarověňky“ (Buchanan et al., 2000). Právě cytokinininy jsou zodpovědně i za vznik „green islands“ v napadeném pletivu (Walters et al., 2008), protože oddalují senescenci patogenem kolonizované části pletiva. Zvýšená hladina cytokininů byla např. zjištěna i v listech fazolu napadených rzí (Király et al., 1966 in Walters et al., 2008). Na základě těchto údajů je předpokládána úzká souvislost mezi biotrofním parazitismem a produkcí cytokininů. Další podporu pro roli cytokininů ve výživě patogenů přineslo tvrzení o tom, že cytokinininy stimulují aktivitu extracelulární invertasy (Roitisch et al., 2003).

Gibereliny stimulují prodloužování buněk, ovlivňují vývoj apikálního meristému a pravděpodobně stimulují produkci auxinu. Tyto hormony mohou měnit fotoperiodismus rostlin; dlouhodobě rostliny přeprogramovat na krátkodenní a dvouleté rostliny na jednoleté. Gibereliny jsou jedním z faktorů zodpovědných za dormanci pupenů a u některých rostlin i semen (Buchanan et al., 2000). Wood (1967 in Šutić a Sinclair 1991) poukázal na to, že zvýšená hladina giberelinů může být zodpovědná spolu s auxiny za prodloužení internodií u *Euphorbia cyparissias* napadeného *Uromyces pisi*. Naopak nízká hladina giberelinů způsobuje zakrslost, jak je tomu např. u *Silene vulgaris* subsp. *maritima* napadené snětí *Ustilago violaceae* (Legy, 1976 in Šutić a Sinclair 1991).

Abcisová kyselina zastavuje nebo zpomaluje růst rostlin a indukuje dormanci semen (Buchanan et al., 2000). Předpokládá se, že v některých případech se v infikovaném pletivu může zvyšovat hladina abscisové kyseliny, která hraje klíčovou roli v adaptaci na abiotický stres a zdá se, že je negativním regulátorem signalizačního řetězce SA (Robert-Seilaniantz et al., 2007). Mohr a Chail (2007 in Robert-Seilaniantz et al., 2007) zjistili, že ABA potlačuje tvorbu SA a ukládání ligninu v buněčných stěnách.

Ethylen je syntetizován rostlinami zejména v dozrávajících plodech. Jeho produkce bývá spouštěna mnoha faktory, např. auxiny, ionizujícím zářením, mechanickým poraněním nebo patogeny. Tvorba ethylenu během infekce může způsobit předčasnou senescenci, opadávání listů a epinastii (Šutić a Sinclair 1991). Zvýšená hladina ethylenu byla zaznamenána např. u karafiátů infikovaných *Botrytis* sp. (Smith et al., 1964 in Šutić a Sinclair 1991).

Salicylová kyselina (SA) je obvykle spojována s reakcí na biotrofní parazity, ustavením SAR a její exogenní aplikace vyvolává syntézu PR-proteinů (Bari a Jones, 2009). Jasmonová kyselina (JA) a ethylen (ET) byly ve zvýšené míře zaznamenány u rostlin infikovaných nektrófy. Obecně se hladina jasmonové kyseliny zvyšuje i v místě infekce (Bari a Jones., 2009) a zároveň hraje signální roli při mechanickém poškození rostliny např. herbivory (Browse a Howe, 2008 in Bari a Jones, 2009).

Signální dráhy spouštěné SA nebo JA a ET se ale často navzájem vylučují, čehož mohou využít patogeny k překonání obrany hostitele. Syntetizují látky podobné např. jasmonové kyselině u *Pseudomonas syringae* (Brooks et al., 2005 in López et al., 2008) nebo přímo vylučují např. ethylen jako u *Botrytis cinerea* (Chague et al., 2002 in López et al., 2008), spustí signální dráhu vedoucí k navození rezistence vůči jinému stresoru, kterou jsou schopni překonat, a tím si otevírají cestu k infekci (López et al., 2008).

Dráha salicylové kyseliny vede k SAR (systemic acquired resistance) tj. systémové získané rezistenci (Mauch-Mani a Métraux, 1998). Jedná se o stav, kdy po lokální infekci avirulentním nebo virulentním patogenem tvořícím nekrotické léze nebo po aplikaci určitých chemických látek rostlina získává dlouhodobou (týdny až měsíce (Serrano et al., 2007)) lokální nebo systémovou rezistenci proti celé škále dalších patogenů (Buchanan et al., 2000). Kyselina salicylová může (Shulaev et al., 1995 in Métraux, 2001) nebo nemusí (Rasmussen et al., 1991 in Métraux et al., 2002) být primárním signálem, který šíří informaci v rostlině. SAR obecně funguje tak, že v místě infekce je produkován signál (SA je syntetizována lokálně), který se šíří do dalších částí rostliny kde indukuje obranné reakce (Métraux et al., 2002). SA reaguje s enzymy (katalázou nebo askorbát peroxidázou) za vzniku fenolového radikálu, který se účastní peroxidace lipidů hlavně v membránách buněk. Produkty peroxidace potom aktivují expresi obranných genů a PR-proteinů (Métraux et al., 2002). Biochemické markery typické pro SAR jsou PR-proteiny: chitinasy, peroxidasy a β -1,3- glukanasasy (Siegrist et al., 1997 in Serrano et al., 2007).

Dráhy jasmonové kyseliny a ethylenu vedou k ISR (induced systemic resistance) tj. indukované systémové rezistenci, která se vyvíjí po kolonizaci kořenového systému rostliny určitým typem hlízkových bakterií („plant growth promoting rhizobacteria“) a nezahrnuje tvorbu PR-proteinů (Hammerschmidt, 1999). Jasmonová kyselina a ethylen jsou spjaty ještě

s jiným typem obranné reakce rostlin zvané SIR (systemic induced resistance nebo systemic proteinase inhibitor), která je odpovědí na mechanické poranění nebo okus herbivorem. Při poranění vzrůstá množství ethylenu a jasmonové kyseliny v rostlině, methyl jasmonáty šíří signál cévními svazky v rámci rostliny nebo v plynné podobě mezi rostlinami v porostu. V reakci jsou pak hromaděny systémové inhibitory a další proteiny související s odpovědí na poranění (Krischik et al., 1991). Signální dráha jasmonové kyseliny a ethylenu a dráha salicylové kyseliny mohou spolupracovat, ale i vzájemně se vylučovat (shrnuto např. V Bari a Jones, 2009).

U slunečnic je dlouhodobě studována možnost zvýšení rezistence vůči širokému spektru patogenních hub prostřednictvím SAR (např. laboratoř prof. Virányiho, Univerzita v Godöllö, Maďarsko). Mezi testované spouštěče SAR patřil např. BTH (benzo-1,2,3-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester), po jehož aplikaci byla studována aktivita chitinasy a peroxidasy; PR-proteinů, u kterých byl předpokládán podíl na obraně rostliny vůči *P. halstedii*. Inokulace *P. halstedii* zvýšila aktivitu obou enzymů u náchylných genotypů neošetřených BTH a u náchylných i rezistentních genotypů ošetřených BTH; pouze u neošetřených rezistentních genotypů slunečnice zůstala aktivita enzymů nízká. Z toho se dá vyvodit, že zvýšení aktivity chitinasy a peroxidasy není obrannou reakcí, ale spíše symptomem. Ošetření rostlin BTH však vedlo ke snížené sporulaci *P. halstedii* (Serrano et al., 2007). Körösi et al. (2009) studovali účinky chemických látek aktivujících obranné mechanismy rostlin, jako je INA (2,6-dichloroisoinikotinová kyselina) a BABA (DL-a-aminomáslená kyselina). Prokázali, že INA v koncentraci 100 nebo 200 mg · l⁻¹ signifikantně snižuje sporulaci *P. halstedii* a podobně BABA v koncentraci 500 mg · l⁻¹ a vyšší. Proto mohou být tyto látky považovány potenciální součástí budoucí ochrany proti plísňovitosti slunečnice.

Závěrem lze říci, že rozmanitost účinků endo- i exogenních fytohormonů souvisí s koncentrací, poměrem jejich aktivních a neaktivních forem, ale i poměrem mezi hladinami jednotlivých skupin fytohormonů. Např. cytokininy ve vysoké koncentraci mohou ovlivňovat i vývoj a schopnost reprodukce patogenů (Prokopová et al., 2010).

3.3.4 Reaktivní formy dusíku a kyslíku

Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), dusíku (RNS) a síry (RSS) spolu s transportem fytohormonů jsou jedny z prvních signálů v počáteční interakce rostlina – patogen. Slouží buď jako iniciátory hypersenzitivní reakce, nebo jako signální molekuly, které mohou spouštět další obranné mechanismy (Lebeda et al., 2008).

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou částečně redukované formy atmosférického kyslíku O₂, které typicky vznikají excitací O₂ kdy vzniká singletový kyslík ¹O₂. Dalšími reaktivními

formami kyslíku jsou např. superoxidový anion O_2^- , peroxid vodíku H_2O_2 nebo hydroxylový anion OH^- , hydroxylový radikál OH^\cdot , perhydroxylový radikál O_2H^\cdot (Piterková et al., 2005). Tyto sloučeniny jsou schopné nekontrolovaně reagovat s biomolekulami, což vede k jejich degradaci a tzv. oxidativnímu poškození buněk (Herbette et al., 2003). Přestože jsou účinky těchto látek pro rostlinný organismus nebezpečné, mohou v kontrolovaných koncentracích sloužit jako signální molekuly v počátečních reakcích na biotický i abiotický stres (Dat et al., 2000 in Herbette et al., 2003). Zejména H_2O_2 a OH^- hrají zásadní roli ve vztahu rostlina – patogen, např. při hypersenzitivní reakci (Mittler et al., 1999 in Herbette et al., 2003).

Reaktivní formy dusíku jsou různé formy radikálů s dusíkem, jako je např. NO^\cdot , N_2O_3 , NO_2^\cdot , peroxyinitrit ($ONOO^-$), S-nitrosothioly (RSNO), S-nitrosoglutathion (GSNO) a další (Piterková et al., 2009). Stejně jako reaktivní formy kyslíku v rostlině z části slouží jako signály (Chaki et al., 2009) a podílí se na lokálních i systémových obranných reakcích (Piterková et al., 2009).

Koncentraci ROS a RNS v rostlinách kontroluje řada enzymů (Herbette et al., 2003) i neenzymových systémů (Pitkerová et al., 2008). Anjana et al. (2007) studovali isoformy enzymu peroxidasy, který se mimo jiné podílí na detoxikaci ROS u slunečnice infikované původcem černě *Alternaria helianthi*. Izoforma POX1 se běžně vyskytuje ve zdravých rostlinách, u infikovaných náchylných i neinfikovaných rezistentních rostlin se vyskytovaly další 2 isoformy POX2 a POX3, které byly aktivovány v různých časových intervalech. Díky tomu je zřejmé, že peroxidasy se v rostlinném těle podílí na řadě procesů jako je hypersenzitivní reakce, lignifikace, suberinizace, produkce fytoalexinů nebo slučování glykoproteinů a fenolů (Baysal et al., 2003 in Anjana et al., 2007). Zjištění přesného načasování změn hladin a aktivity jednotlivých izoform peroxidasy v budoucnu může pomoci odhalit jejich role.

U slunečnice byly studovány další enzymy deaktivující ROS a RNS. Prvním z nich je superoxid dismutasa (SOD), odbourávající O_2^- na H_2O_2 , druhým glutathion peroxidasa (GPX). Z infikovaných rostlin byla izolována veškerá RNA, reverzně transkribována a pomocí primerů specifických pro rostlinné SOD byly detekovány 2 řetězce označené jako SODha-1 a SODha-2, dále byly použity dva dříve detekované a klonované řetězce GPXha-1 a GPXha-2. Bylo prokázáno, že exprese genů GPXha-1 a GPXha-2 byla regulována u rostlin infikovaných jak virulentním tak avirulentní rasou *P. halstedii*, ale regulace byla odlišná. Intenzita exprese genů GPX je tedy důležitá pro zahájení hypersenzitivní reakce a je regulována stresovými fytohormony, ROS a NO. Vzhledem k tomu, že každý ze čtyř genů byl regulován odlišně, dá se předpokládat, že v infikovaném organismu hostitele hrají různé role (Herbette et al., 2003).

Funkcí ROS a RNS v průběhu interakci slunečnice – *P. halstedii* se zabývali Chaki et al. (2009). u kultivaru slunečnice náchylného k infekci byl zaznamenán nárůst hladin proteinů,

kteře podléhají nitrataci spojenou se vznikem RSNO. Nárůst RSNO je pravděpodobně nezávislý na enzymatické produkci oxidu dusnatého, protože aktivita synthasy závislé na L-argininu, která produkuje oxid dusnatý, je v průběhu infekce snižena. Naopak u rezistentního kultivaru slunečnice nedošlo k žádnému navýšení hladiny RSNO nebo nitrataci proteinů. Z toho lze vyvodit, že nitratace proteinů je obecným biologickým ukazatelem stresu, který vyvolávají RNS.

3.3.5 Hypersenzitivní reakce

Hypersenzitivní reakce je lokalizovaný indukovaný obranný mechanismus, kterým se rostliny brání při kompatibilních i inkompatibilních interakcích s patogeny a může vést k systémové získané rezistenci (Hammerschmidt, 1999). Jedná se o mechanismus vedoucí k odumření buňky nebo pletiva části v místě infekce (Agrios, 2005). Objevuje se velmi rychle po kontaktu patogenu s hostitelem, obvykle po 6-24 h, v závislosti na dané interakci hostitel – patogen (Hutcheson, 1998). Zpočátku napadená buňka produkuje antimikrobiální látky, zvyšuje se koncentrace radikálů kyslíku, jádro se přesouvá k místu penetrace patogenu do buňky a rozpadá se. Současně probíhá řada strukturních změn cytoplazmy (kondenzace, vakuolizace) a cytoplazmatické membrány (depolarizace vlivem volného toku iontů). Celý proces vede ke smrti buňky, která přestává poskytovat výživu a prostředí pro růst patogenu, který je tímto způsobem eliminován (Hutcheson, 1998).

3.3.6 Sekundární metabolismus

Napadené rostliny produkují řadu sloučenin, které mohou být toxické nebo mají negativní vliv na patogen. Jsou to obvykle fenolové metabolity. Mezi ně můžeme řadit anthokyany, flavonoidy, produkty kumarinu, heteroglukosidy, lignin a jiné (Šutić a Sinclair 1991). Dalším typem látek jsou tzv. fytoalexiny, které obvykle souvisí s mechanickým poškozením rostliny. Jedná se o chemické látky různého složení, které jsou druhově specifické; nejznámějšími jsou např. phaseolin charakteristický pro *Phaseolus vulgaris* a *Glycine max*, případně pisatin vyskytující se u *Pisum sativum* (Šutić a Sinclair 1991).

Spring et al. (1991), který studoval produkci sekundárních metabolitů u slunečnice napadené *P. halstedii* zjistil, že některé sekundární metabolické dráhy zůstávají neovlivněny, např. koncentrace laktonů se nemění. Přítomnost patogenu však podpořila biosyntézy v rámci fenylypropanoidové dráhy, což mělo za následek nárůst koncentrace kumarinu a skopoleninu.

4. Studium změn primárního metabolismu

4.1 Fluorescence chlorofylu a

Proces fotosyntézy začíná zachycením kvanta světelné energie fotoreceptory, což jsou v případě zelených rostlin chlorofyly a + b. Chlorofyl a je nejdůležitější fotosynteticky aktivní pigment zodpovědný za vlastní přeměnu energie, ostatní pigmenty jako je chlorofyl b a karotenoidy jsou spolu s chlorofylem a sdruženy do světlosběrných komplexů a mají zejména pomocnou a ochrannou funkci. Světlosběrné komplexy slouží zejména k zachycení kvant záření a přenosu získané energie do reakčního centra fotosystému I (PSI) a fotosystému II (PSII) (Buchanan et al., 2000).

Světelné kvantum pohlcené molekulou chlorofylu v ní vyvolá přechod elektronu ze základního do excitovaného stavu. Kvantum červeného světla s nižší energií vyvolává přechod do prvního excitovaného stavu, zatímco modré světlo s větší energií způsobí přechod do druhého excitovaného stavu (Buchanan et al., 2000). Excitovaná molekula je poměrně nestabilní, a proto má tendenci vrátit se do původního neexcitovaného stavu, což může probíhat následujícími způsoby (Oxborough, 2004). Energie elektronu je **1/ využita pro fotochemické reakce** a elektron je přenášen přes řadu přenašečů (feofytin, chinon A, chinon B) a energie je spotřebována při redukci NADP^+ na $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Buchanan et al., 2000); **2/ vyzářena v podobě fluorescence**, tj. červené záření s maximem kolem 700 nm (www.archiv.otevrenaveda.cz) nebo **3/ vyzářena jako teplo** (Oxborough, 2004).

Vzhledem k tomu, že počet dopadajících kvant záření je přibližně stejný a množství energie, kterou je nutné deexcitovat, je konstatní, soupeří mezi sebou tyto tři deexcitační procesy. Fakt, že zvýšení intenzity jednoho zákonitě vede ke snížení intenzity jednoho nebo obou dalších deexcitačních procesů (Buchanan et al., 2000) je využíván pro distanční měření změn fotosyntetických parametrů založených právě na intenzitě fluorescence chlorofylu a (Oxborough, 2004).

4.1.1 Charakteristika metody

Měření fluorescence chlorofylu a je považováno za víceméně jednoduchou neinvazivní techniku vhodnou pro studium fotosyntézy v rostlinné fyziologii a ekofyziologii (Maxwell a Johnson, 2000). Tato technika umožňuje lépe porozumět fotochemickým a nefotochemickým procesům probíhajících na tylakoidních membránách chloroplastů (Roháček, 2002). Vzhledem k tomu, že byly vyvinuty jednoduché komerční přístroje a dokonce přenosné systémy pro měření, stala se poměrně oblíbenou a rozšířenou metodou (Oxborough, 2004). Výhodou této

metody je, že dokáže detekovat změny ve fotosyntetickém aparátu dlouho před viditelnými příznaky (chlorózy, apod.) (Rodríguez-Moreno et al., 2008).

Fluorescence chlorofylu může být v zásadě použita ve dvou oblastech; měření v nízkém rozlišení se používá pro studium heterogenit ve fotosyntéze celých listů např. po dlouhodobém zatemnění, po napadení patogeny, po působení abiotických stresových faktorů nebo při studiu transportu cukrů v systému source – sink. Měření ve vysokém rozlišení se používá pro studium zejména buněk; velkých populací mutantních řas a při studiu změn ve fotosyntéze u *Arabidopsis* sp. aj. (Oxborough, 2004).

4.1.2 Princip měření fluorescence chlorofylu

Kvantový výtěžek fotosyntézy (Φ_F , $\Phi_F = n_F/n_A$; n_F = počet všech vyzářených fotonů, n_A = počet všech absorbovaných fotonů) závisí na schopnosti PSII rozdělit náboj (získaný excitací) na primární donor (2 specializované molekuly chlorofylu a) a sekundární donor chinon a (Q_A). Pokud je Q_A oxidován, je PSII schopen využít maximum zachycené světelné energie pro fotochemické reakce a energie vyzářená fluorescencí je velmi malá. V tomto stavu, který nastává u rostliny adaptované na tmu, je reakční centrum „otevřené“ a výtěžek fluorescence je minimální (označený hodnotou F_0). Naopak pokud je Q_A redukován (obdržel elektron), PSII není schopen rozdělit náboj, energii není možné využít pro fotochemické reakce a proto je vyzářena ve formě fluorescence. V tomto stavu, který nastává u rostliny ve vysokém saturačním světle, je reakční centrum „uzavřené“ a výtěžek fluorescence je maximální (označený hodnotou F_m) (www.archiv.otevrena-veda.cz).

Souvislost mezi fluorescencí a fotochemií je nejsilnější u fotosystému II, z něhož pochází za normálních podmínek asi 90% fluorescenční emise. Zároveň rozdělení náboje na Q_A probíhá u PSII mnohem déle než u PSI, kde je reakční centrum prakticky stále „otevřené“. Z výše uvedených důvodů se měřené parametry vztahují právě k PSII (www.archiv.otevrena-veda.cz). Ačkoli je intenzita fluorescence poměrně nízká (1-2 % z celkové energie získané pohlcením záření), měření není složité. Protože fluorescence (emitované záření) má vyšší vlnovou délku než absorbované záření, stačí studovaný objekt (list) vystavit světlu o známé vlnové délce a potom měřit záření o delší vlnové délce (Maxwell a Johnson, 2000).

Fluorescence chlorofylu je dynamická veličina a mění se v čase. Tyto změny byly poprvé pozorovány Kautskym et al. (1960 in Maxwell a Johnson, 2000), který si povšiml, že výtěžek fluorescence se u rostlin přenesených ze tmy do světla prudce zvýší a s postupem času začne klesat. Tento prudký nárůst byl vysvětlen jako důsledek redukce elektronového akceptoru Q_A ve fotosystému II. Jakmile Q_A přijme elektron, není schopen přijmout další, dokud jej nepředá dalšímu elektronovému akceptoru v pořadí. Reakční centrum je tedy „zavřené“ do té doby, než

Q_A předá elektron. Rostlina adaptovaná na tmu má všechna reakční centra „otevřená“ (bez přítomnosti světla nelze excitovat molekuly chlorofylu a předávat elektrony), při přesunutí rostliny na světlo obdrží všechna reakční centra svoje kvanta ve stejnou dobu a tím také ve stejnou dobu „uzavřou“, což má za následek prudký nárůst výtěžku fluorescence (www.ab.ipw.agrl.ethz.ch). Postupný pokles fluorescence, tzv. **fotochemické zhášení**, způsobuje zvýšení intenzity odběru elektronů z PSII, s čímž souvisí světlem indukovaná aktivace enzymů v temnostní fázi fotosyntézy a otevření průduchů. Ve stejné době dochází ke zvyšování efektivity přeměny absorbované energie v teplo, což je označeno jako **nefotochemické zhášení** (Maxwell a Johnson, 2000).

Pro správnou interpretaci výsledků měření fluorescence je nutné rozlišit mezi fotochemickým a nefotochemickým příspěvkem zhášení. Pro účely této práce byla použita následující metoda: po změření minimální fluorescence u rostliny adaptované na tmu (F_0), byla rostlina vystavena saturačnímu (krátkému a silnému) světelnému pulsu. Při použití dostatečně intenzivního a krátkého pulsu nedojde vůbec k aktivaci nefotochemického zhášení a je možné změřit hodnotu maximálního výtěžku fluorescence (F_m) (Maxwell a Johnson, 2000; www.ab.ipw.agrl.ethz.ch). Poté byla rostlina vystavena fotosynteticky aktivnímu záření (aktinickému světlu) během kterého výtěžek fluorescence opět rostl a po čase klesal do dosažení stálé, tzv. „steady state“, hodnoty (F_t). Pak byly v pravidelných intervalech aplikovány další saturační pulsy a během nich měřena hodnota maximálního výtěžku fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu (F_m'). Z naměřených hodnot (F_0 , F_m , F_t , F_m') lze následně stanovit fotosyntetické parametry, které vypovídají o stavu fotosyntetického aparátu měřené rostliny (Maxwell a Johnson, 2000; www.ab.ipw.agrl.ethz.ch).

4.1.3 Fotosyntetické parametry

Měření fluorescence chlorofylu a je metodou zachycující řadu fotosyntetických parametrů. V dalším textu jsou uvedeny pouze ty, které byly použity v rámci mé diplomové práce.

Maximální kvantový výtěžek fotosyntézy (F_v/F_m) lze stanovit podle vztahu:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

kde F_m = maximální výtěžek fluorescence a F_0 = minimální výtěžek fluorescence, vypovídající o stavu reakčních center. u zdravých rostlin dosahuje parametr F_v/F_m hodnot kolem 0,8. Nižší hodnoty naznačují, že část z celkového počtu reakčních center PSII je nefunkční (www.ab.ipw.agrl.ethz.ch).

Kvantový výtěžek elektronového transportu fotosystému II (Φ_{PSII}), který se vypočítá podle vztahu:

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_t) / F_m'$$

kde F_m' = maximální výtěžek fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu; F_t = stálá hodnota fluorescence ve světelně adaptovaném stavu, měří proporcí světelného záření absorbovaného PSII využitého k fotochemickým reakcím. Pokud by se hodnota parametru Φ_{PSII} rovnala jedné, znamenalo by to, že 100 % absorbované energie bylo využito k fotochemickým reakcím, což ovšem není reálně možné.

Nefotochemické zhášení (NPQ) vyplývá ze vztahu:

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m'$$

kde F_m = maximální výtěžek fluorescence a F_m' = maximální výtěžek fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu, je lineárně závislé na výdeji tepla, leží na škále od nuly do nekonečna (Maxwell a Johnson, 2000) a vyjadřuje výdej tepelné energie světlosběrným komplexem PSII (Prokopová et al., 2010).

4.2 Extracelulární invertasa

4.2.1 Typy rostlinných invertas

Rostlinné invertasy patří do skupiny enzymů, které katalyzují hydrolyzu sacharosy na glukosu a fruktosu. u vyšších rostlin se vyskytuje celá řada isoform, které jsou rozlišitelné např. podle umístění v buňce (v buněčné stěně, vakuole, cytosolu) či optimálního pH (kyselé a neutrální nebo alkalické) (Strum a Chrispeels, 1990 in Fotopoulos, 2005).

Většina rostlin obsahuje alespoň 2 isoformy vakuolárních invertas, které se vyskytují v lumen vakuol s nízkým pH. Podobně se u rostlin vyskytuje několik isoform extracelulárních kyselých invertas vázaných iontově na buněčnou stěnu. Tyto dva typy invertas mají podobné biochemické vlastnosti, při štěpení sacharosy je pro ně optimální pH 4,5-5 a vážou se na fruktosovou podjednotku, proto jsou nazývány také β -fruktofuranosidasy. Kromě sacharosy jsou schopny odštěpovat fruktosovou podjednotku i z jiných oligosacharidů. V cytosolu rostlinných buněk se ještě vyskytují alespoň 2 další isoformy cytoplasmatické invertasy, které štěpí sacharosu v neutrálním až mírně alkalickém prostředí. Oproti kyselým invertasám jsou hůře specifikovatelné a zdá se, že štěpí pouze sacharosu (Sturm, 1999).

Role invertas v rostlinném organismu je rozmanitá a závisí na typu pletiva a umístění konkrétní isoformy v rámci buňky (Fotopoulos, 2005). Vakuolární kyselé invertasy kontrolují a upravují zastoupení cukrů ve vakuolách a zároveň se podílí v utváření sinku v zásobních orgánech nebo zrajících plodech (Klann et al., 2003 in Fotopoulos, 2005). Alkalické cytosolické invertasy jsou pravděpodobně zodpovědné za regulaci hladiny intercelulární fruktosy a glukosy,

kteře jsou zdrojem energie pro metabolické procesy buněk (Fotopoulos, 2005). Invertasy mají také komplexní role v rostlinném organismu, např. kyselé invertasy jsou důležité pro udržování optimálních hladin cukrů ve vyvíjejících se mladých rostlinách (Tang et al., 1990 in (Fotopoulos, 2005).

4.2.2 Charakteristika enzymu, funkce v metabolismu rostlin

Extracelulární invertasa (EC 3.2.1.26) jejíž aktivita byla stanovována v rámci této diplomové práce, patří mezi kyselé invertasy vázané na buněčnou stěnu. Hraje klíčovou roli v udržení rovnováhy v systému source – sink, podílí se na dálkovém transportu sacharidů v rostlině a podílí se na štěpení sacharosy transportované buňkami do apoplastu (Roitsch, 2003).

Roitsch et al. (1995) prokázal zvýšení aktivity tohoto enzymu v závislosti na glukose u merlíku červeného (*Chenopodium rubrum*). Exprese genu pro extracelulární invertasu indukovaná glukosou byla prokázána u tabáku (Krausgill et al., 1996 in Fotopoulos, 2005), *Arabidopsis thaliana* (Kreis, 1998b in Fotopoulos, 2005) a rajčete (Sinha et al., 2002 in Fotopoulos, 2005). Aktivita extracelulární invertasy je ovlivňována auxiny (Weil a Rausch, 1990 in Fotopoulos, 2005), ale i cytokininy v rychle rostoucích částech rostlin, které vyžadují dostatek sacharidů pro vývoj (Godt a Roitsch, 1997 in Fotopoulos, 2005) a dalšími fytohormony.

V rámci této práce je nejdůležitější fakt, že extracelulární aktivita extracelulární invertasy je stimulována stresovými faktory jako je poranění (Roitsch et al., 1995) nebo přítomnost patogenů, jak prokázali např. Sinha et al. (2002 in Roitsch, 2003) v případě suspenze buněk rajčete infikovaných *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Zvýšení aktivity invertasy v napadeném pletivu hraje zřejmě roli v přísunu dostatečného množství energie pro spuštění kaskády obranných mechanismů (Roitsch, 1999).

5. Materiál a metody

5.1 Rostlinný materiál

Pro množení a udržování patogenu i všechny experimenty byl zvolen *Helianthus annuus* cv. Peredovik. Tento kultivar slunečnice roční nese geny rezistence vůči *P. halstedii*. Část osiva pocházela z VÚRV Praha-Ruzyně (Prof. Ing. K. Veverka, DrSc.) a část z přemnožování osiva na Katedře botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v letech 2008-9 (D. Vondráková).

Rostliny pro experimenty byly pěstovány ze semen dezinfikovaných 10% roztokem Sava a naklíčených stejně jako při množení *P. halstedii* (podrobně popsáno níže). Semenáčky byly vysazeny do zvlhčeného perlitu (Agroperlit, Nový Jičín, ČR) a pěstovány ve fytotronu nebo růstové komoře při teplotě 15/20 °C (tma/světlo) s fotoperiodou 12/12 h cca 18 dní do vytvoření dostatečně velkých prvních pravých listů. Rostliny byly cca 9. den pěstování přihnojeny.

5.2 Zdroj inokula, udržování a množení kultury

Jako inokulum byl použit izolát P1/09, identifikovaný jako *P. halstedii* rasa 700 (Stojaspal, 2009) pocházející ze sběrové expedice uskutečněné 22.5.2009 v oblasti Jižní Moravy Prof. Ing. A. Lebedou, DrSc. a Doc. RNDr. M. Sedlářovou, Ph.D. V rámci projektu QH71254 „Inovace metod ochrany slunečnice“ (MZe ČR, NAZV). Použitý vzorek P1/09 pochází z cca jednohektarového podmáčeného pole u silnice z Podivína směrem do Lednice, kde byly v tom roce slunečnice pěstovány ve směsi spolu s kukuřicí. Vzorek *P. halstedii* byl uchováván při teplotě -20°C a před začátkem experimentu třikrát kontinuálně přemnožen na semenáčcích cv. Peredovik v laboratorních podmínkách (Stojaspal, 2009), aby se zabránilo případné kontaminaci.

Při přemnožování kultury jsem se řídila pokyny, které původně sestavil Gulya (1996) a v upravené formě používal Stojaspal (2009). Semena slunečnice cv. Peredovik byla dezinfikována v 10 % roztoku SAVA po dobu 10 minut a poté byla dalších 10 minut proplachována proudem čisté vody. Koncentrace dezinfekčního roztoku byla z původně používaných 5 % (Stojaspal, 2009) zvýšena proto, že klíčící semena byla napadána dalšími houbovými organismy (nejčastěji *Rhizopus* sp.) či bakteriemi, a tak byla často nepoužitelná. Povrchově dezinfikovaná semena byla vyseta mezi dvě vrstvy navlhčeného filtračního papíru; klíčení probíhalo v uzavřeném igelitovém sáčku ve fytotronu 2-4 dny. Pro inokulaci byla vybrána semena s cca 2 cm dlouhým kořínkem a dobře vyvinutým kořenovým vlášením, která nenesla známky kontaminace, nebyla deformovaná ani atypická.

Po 5-7 dnech, v závislosti na dostatečném rozvinutí děložních lístků, byly rostliny zvlhčeny destilovanou vodou pomocí rozprašovače (obr. 5) a uzavřeny do igelitových sáčků. Další pěstování probíhalo ve shodných podmínkách jaké byly uvedeny výše další 3-4 dny, kdy byla patrná sporulace a zoosporangia již byla dobře vyvinutá. Zoosporangia pak byla buď ihned využita pro inokulaci, nebo byla na oddělených děložních lístcích uchovávána v alobalu při -20 °C pro další použití.

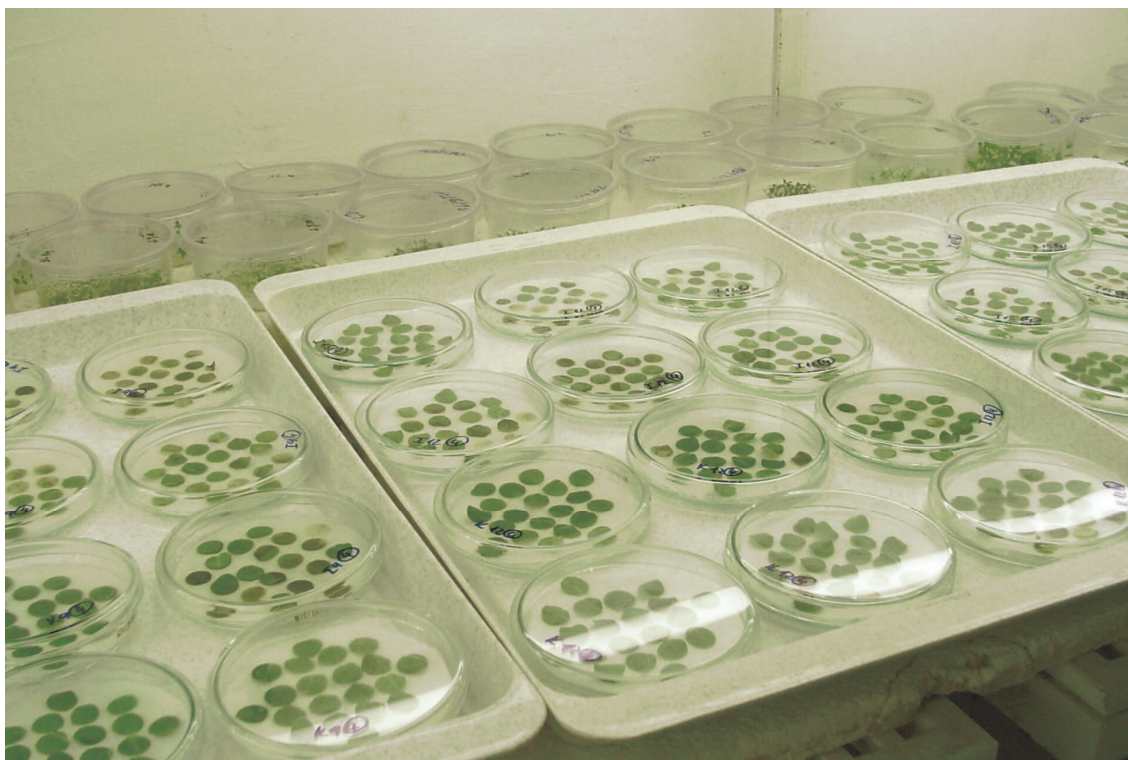


Obr. 5. Semenáčky slunečnice zvlhčené destilovanou vodou a připravené pro sporulaci.

Zoosporangia *P. halstedii*, uchovávaná na děložních lístcích slunečnice cv. Peredovik v mrazničce nebo čerstvě sporulující na semenáčcích, byla ve zkumavce převedena do destilované vody pomocí třepačky. Vzniklá suspenze byla upravena tak, aby koncentrace odpovídala přibližně 2×10^4 životaschopných zoosporangií v 1 ml (kontrolováno pod mikroskopem). Inokulace probíhala ponořením naklíčených semen bez osemení do suspenze ve tmě po dobu 3-5 h při teplotě 10-15 °C. V průběhu inokulace byla mikroskopicky kontrolována přítomnost živých zoospor. Semenáčky byly následně vysazeny do zvlhčeného perlitu a pěstovány při teplotě 15/20 °C (tma/světlo) s fotoperiodou 12/12 nebo 10/14 h.

5.3 Příprava a inokulace listových disků v laboratorních podmínkách

Listové disky o průměru 10 mm byly korkovrtem vyseknuty z prvních pravých listů cca 3 týdny starých rostlin cv. Peredovik a inokulovány suspenzí zoosporangií (2×10^4 životaschopných zoosporangií v 1 ml) ve tmě po dobu 3 h při teplotě 10-15 °C. Disky pro simulovanou inokulaci byly inkubovány ve stejných podmínkách, ale pouze s destilovanou vodou. Listové disky byly poté vrchní (adaxiální) stranou nahoru uspořádány na zvlhčený filtrační papír v Petriho misce do čtverce (4 x 4 disky), přibližně uprostřed pro standardní měření fluorescence chlorofylu. Několik dalších disků bylo umístěno po okraji jako náhrada těch, které v průběhu inkubace zvodnatěly. Inokulované a simulovaně inokulované disky byly pak uchovávány ve fytotronu při teplotě 10-15 °C do konce měření (obr. 6) a vlhkost v miskách byla pravidelně kontrolována.



Obr. 6. Kultivace listových disků ve fytotronu

Kontrolu představovaly rostliny pěstované stejným způsobem jako ty, ze kterých byly pořizovány listové disky pro inokulaci a simulovanou inokulaci. Listové disky ale byly vysekávány vždy těsně před samotným měřením. Kontrolní rostliny pěstovány ve stejných podmínkách, ve kterých byly uchovávány inokulované a simulovaně inokulované listové disky.

5.4 Příprava listových disků z polního pokusu

K přípravě disků byly použity listy infikovaných rostlin *Helianthus annuus* cv. Peredovik, které byly vysety v dubnu 2010 na provokačním poli v Olomouci-Holici (Katedra botaniky PřF UP v Olomouci). Polovina disků byla těsně před měřením odvozena z chlorotických částí 5.-7. pravého listu, kde prokazatelně probíhala sporulace, druhá polovina ze stejných listů, ale z částí bez symptomů (změn pletiva a sporulace). Disky byly uspořádány na Petriho misky a inkubovány stejně jako u experimentu v laboratorních podmínkách.

Jako kontrola sloužily disky z listů neinfikovaných slunečnic cv. Peredovik rostoucí v bezprostředním okolí infikovaných rostlin. Byly vybírány rostliny stejného stáří a vzrůstu, ze kterých byly odebrány listy rostoucí ve stejné výšce nad zemí jako infikované listy použité pro měření.

5.5 Příprava vzorků pro experimenty

Měření fluorescence chlorofylu bylo provedeno celkem u pěti sérií listových disků z nezávisle vypěstovaných rostlin (tab. 6), stanovení aktivity extracelulární invertasy bylo provedeno u třech z nich (tab. 6). Samotné měření fluorescence a odběr vzorků pro stanovení aktivity invertasy probíhalo vždy 9., 12. a 15. den po inokulaci.

Tab. 6. Přehled sérií disků a měření.

série číslo	datum výsevu	fluorescence	invertasa	poznámka
1	13.4.2010	ano	ano	
2	27.4.2010	ano	ano	
3	6.5.2010	ano	ne	nestandardní podmínky, v průběhu pokusu porucha fytotoronu
4	27.5.2010	ano	ne	nestandardní podmínky, v průběhu pokusu porucha fytotoronu
5	1.6.2010	ano	ano	

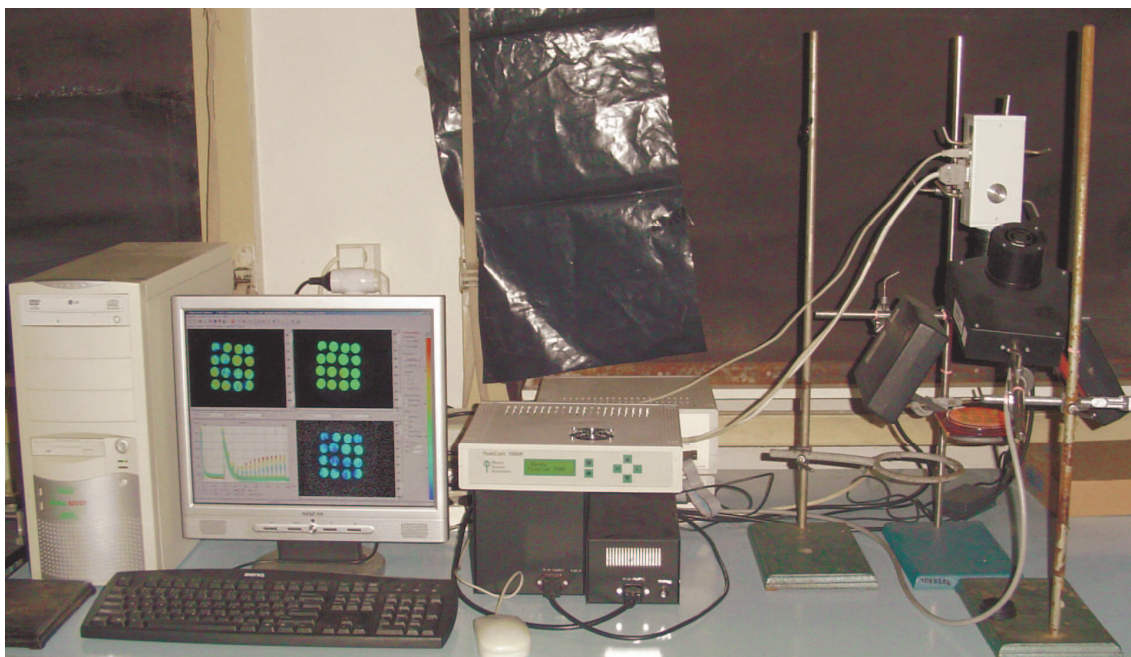
Pro měření fluorescence bylo v každé sérii využito celkem 288 disků (9. den po inokulaci bylo změřeno 2 x 16 inokulovaných, 2 x 16 simulovaně inokulovaných a 2 x 16 kontrolních disků, 12. a 15. den po inokulaci vždy stejné množství jako v předchozím případě).

Jednotlivé vzorky pro stanovení aktivity invertasy představující 0,5 g pletiva (což odpovídá cca dvaceti simulovaně inokulovaným diskům a cca třiceti inokulovaným či kontrolním diskům) byly, v alobalu zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v -80 °C do doby měření. Aktivita enzymu byla v každé sérii stanovena vždy pro 27 vzorků (9. den po inokulaci bylo pro měření

odebráno 3 x 0,5 g inokulovaného pletiva, 3 x 0,5 g simulovaně inokulovaného pletiva a 3 x 0,5 g pletiva z prvních pravých listů kontrolních rostlin, stejně tak 12. a 15. den po inokulaci). Pro odběr pletiva byly přednostně použity disky, u kterých byla těsně před zamražením měřena fluorescence.

5.6 Měření fluorescence chlorofylu a

Fluorescence chlorofylu a byla stanovena v zatemněné místnosti a pokojové teplotě pomocí FluorCam 700MF imaging system (Proton System Instruments, Brno, Česká Republika) (obr.7). Petriho misky s listovými disky byly před měřením zatemněny na cca 30 minut. Filtrační papír s listovými disky byl poté vyňat z misky a umístěn na černou plastovou podložku pod kamerou přístroje.



Obr. 7. FluorCam 700MF s příslušenstvím

Princip měření (podrobně popsáno v kapitole 4.1.2) spočívá v zachycení a zaznamenání intenzity emitované fluorescence, která je jedním z deexcitačních mechanismů (využití energie na fotochemické reakce, přeměna energie v teplo a vyzáření energie v podobě fluorescence), které se uplatňují při přechodu molekuly chlorofylu z excitovaného do normálního stavu. Vzhledem k tomu, že tři výše zmíněné deexcitační mechanismy mezi sebou soupeří, dá se

z poklesu či nárůstu fluorescence odhadnout, jakým způsobem je ovlivněn a jak funguje fotosyntetický aparát studované rostliny (Oxborough, 2004).

Na začátku měření byla zaznamenána hodnota F_0 (absolutní minimální fluorescence) na discích adaptovaných na tmu pomocí měřicích záblesků ($0,2 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; červené světlo). Při saturačním pulsu ($4000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; bílé světlo; 1,6 s) byla zaznamenána F_m (absolutní maximální fluorescence) u disků adaptovaných na tmu. Po dvou minutách relaxace bylo zapnuto aktivační světlo ($80 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; červené světlo), a v intervalu 20 s byly disky vystavovány saturačním pulsem ($4000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; bílé světlo; 1,6 s), kdy byla změřena hodnota F_m' (maximální fluorescence při probíhající fotosyntéze). Poslední saturační puls proběhl 282 s po zapnutí aktivačního světla a hodnoty naměřené v tento okamžik byly použity pro výpočet steady state parametrů NPQ a Φ_{PSII} . Podobně grafické znázornění parametrů NPQ a Φ_{PSII} pochází z času 282 s po zapnutí aktivačního světla a ukazují steady state. Získané hodnoty byly využity softwarem FluorCam for Windows k výpočtu parametrů F_v/F_m (maximální možná účinnost fotosystému II), Φ_{PSII} (účinnost fotosystému II) v průběhu celého měření a steady state a NPQ (nefotochemické zhášení) taktéž v průběhu celého měření a steady state.

V případě potřeby (chyba v průběhu měření, narušení zatemnění) byly disky opět uzavřeny v Petriho misce, znovu zatemněny a změřeny.

5.7 Stanovení aktivity extracelulární invertasy

Extrakce enzymu byla provedena postupem, který popisují Fotopoulos et al. (2003). Inokulované, simulovaně inokulované nebo kontrolní listové disky (0,5 g) byly v třecí misce rozdrčeny s tekutým dusíkem a dále homogenizovány ve 2 ml chlazeného extrakčního pufru (50 mM HEPES-KOH (pH 8,0) s přísávkem 5 mM MgCl_2 , 2 mM EDTA a 1 mM fenylmethylsulfonyl fluoridu). Homogenát byl centrifugován při $13000 \times g$, 4 °C, 15min. Pelet bylo nutno promýt; po centrifugaci byl odebrán supernatant, pelet resuspendován ve 2 ml ledového extrakčního pufru a znovu centrifugován při $13000 \times g$, 4 °C, 5min. Promývání bylo opakováno třikrát.

Po poslední centrifugaci byl supernatant odstraněn a pelet resuspendován ve 2 ml ledového extrakčního pufru. Jako kontrola pro spektrofotometrické měření (k odfiltrování šumu způsobeného puftrem) sloužilo 25 μl této suspenze se 175 μl 50 mM fosfát-citrátového pufru (pH 4,5). Vzorek byl připraven smícháním 25 μl vzorku se 175 μl fosfát-citrátového pufru s přísávkem sacharosy (50 mM fosfát-citrátový pufr (pH 4,5) a 100 mM sacharosa), ve třech opakováních pro minimalizaci chyby způsobené nerovnoměrnou homogenizací vzorku. Po hodinové inkubaci ve vodní lázni při 30°C bylo ke všem vzorkům přidáno 250 μl roztoku

Na₂HPO₄, který zastavil reakci. Směs byla poté promíchána s 500 µl DNS-reagentu, vzorky inkubovány 15 min při 100 °C, zchlazeny na pokojovou teplotu a smíchány se 500µl 40 % vinanem sodnodraselným.

Absorbance byla měřena na spektrofotometru Unicam UV550 Thermo Spectronic, (Cambridge, UK) při $\lambda=540$ nm, každý jednotlivý vzorek vždy ve třech opakováních. Získané hodnoty byly odečteny od příslušné kontrolní hodnoty (vzorek bez sacharosy) a pro každou variantu byl stanoven aritmetický průměr a směrodatná odchylka.

5.8 Statistické zpracování dat

Reálná hodnota absorbance, která je nutná k odfiltrování případného šumu způsobeného pufrem, částmi rostlinného pletiva a dalšími reagensy, byla stanovena odečtením aritmetického průměru kontrolní hodnoty (získané ze 3 měření vzorku bez sacharosy) od aritmetického průměru hodnoty daného vzorku (z trojího měření absorbance). S těmito hodnotami bylo dále nakládáno jako se základními daty, z nich byly za pomoci rovnice získané z kalibrační křivky vypočítány hodnoty aktivity invertasy vztažené na nkat/g Fw (nkat na gram čerstvého pletiva), které byly podrobeny další statistické analýze.

K porovnání rozdílů mezi fotosyntetickými parametry u kontroly, inokulovaných a simulovaně inokulovaných listů u laboratorního pokusu v rámci jedné série (tzn. 1 soubor rostlin měřený 9., 12. a 15 den po inokulaci), stejně jako pro porovnání aktivity invertasy u kontroly, inokulovaných a simulovaně inokulovaných rostlin v rámci všech měření, byla použita jednocestná analýza variance (ANOVA, $\alpha = 0,005$) následovaná porovnáním průměrů pomocí Bonferoniho testu. Nested ANOVA ($\alpha = 0,005$) následovaná Bonferoniho testem byla použita pro testování hypotézy, zda se fotosyntetické parametry a aktivita invertasy u kontrolních, inokulovaných a simulovaně inokulovaných disků mění v závislosti na čase uplynulém od inokulace.

U polního pokusu byla aktivita invertasy stanovena obdobně jako v předchozím případě a pro porovnání rozdílů mezi aktivitou invertasy u kontroly, části listu s příznaky a části listu bez příznaků byla použita jednocestná analýza variance (ANOVA, $\alpha = 0,005$) následovaná porovnáním průměrů pomocí Bonferoniho testu. Stejně bylo přistupováno k porovnání rozdílů mezi fotosyntetickými faktory v polním pokusu.

Statistické analýzy byly provedeny softwarem Statistica 9.0 (StatSoft, USA). Grafy ukazující průběh fotosyntetických parametrů v průběhu měření fluorescence byly vytvořeny v aplikaci Microsoft Excel 2003.

6. Výsledky

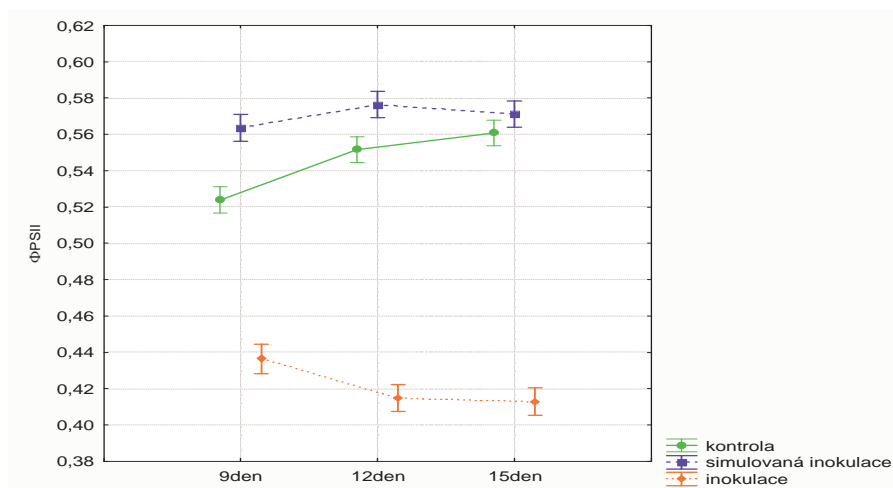
6.1 Laboratorní pokus

6.1.1 Účinnost fotosyntetického aparátu hostitele v průběhu infekce

Vzhledem k tomu, heterogenita vzorků může do značné míry zkreslovat informace, které poskytují fotosyntetické parametry vypočítané na základě měření fluorescence (Maxwell a Johnson, 2000), rozhodla jsem se porovnat tyto parametry vždy pouze v rámci jednoho souboru (série) rostlin, které byly vypěstovány za stejných podmínek, i když ani zde nelze zaručit stoprocentní homogenitu. Z tohoto důvodu jsou u fotosyntetických parametrů prezentovány výsledky měření ze série č. 3 (není-li uvedeno jinak), která byla vybrána jako nejtypičtější a ukazuje trendy ne mnohdy jasně viditelné u ostatních sérií.

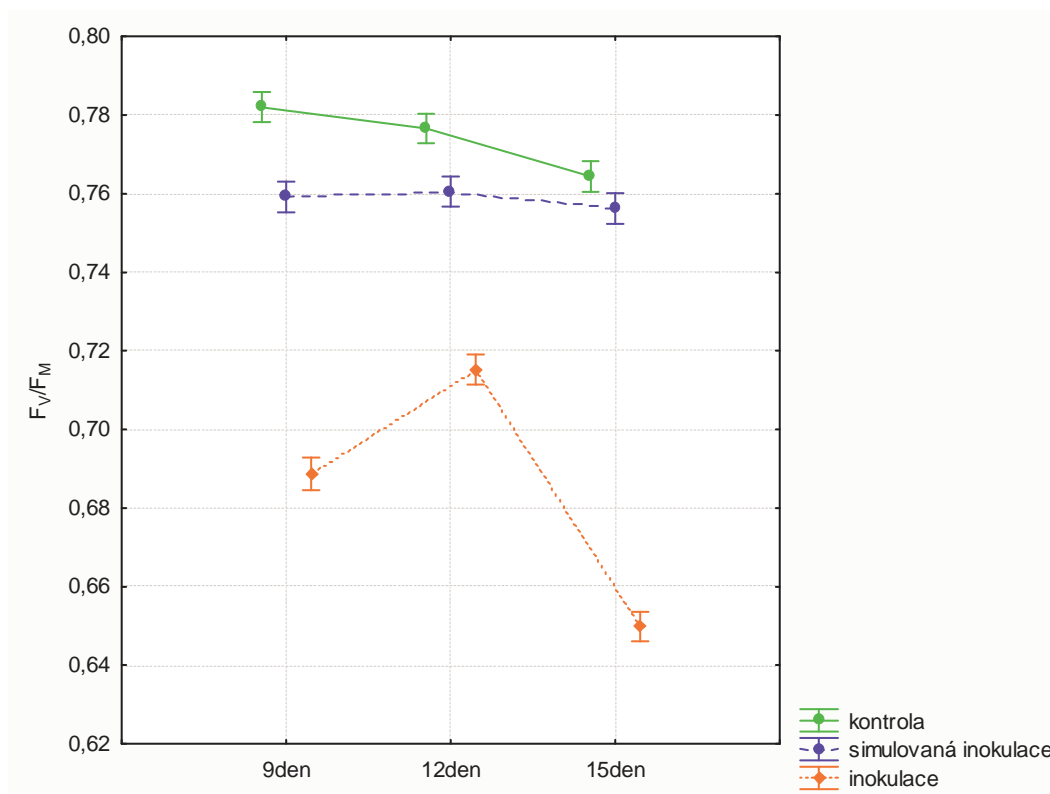
6.1.1.1 Maximální kvantový výtěžek fotosyntézy (F_v/F_m)

Pomocí série jednocestných analýz variance u výsledků z jednotlivých sérií rostlin bylo zjištěno, že existují signifikantní rozdíly mezi průměrnými hodnotami (průměr z 9., 12. a 15. dne) maximálního kvantového výtěžku F_v/F_m mezi inokulovanými disky (0,684) a oběma kontrolami (kontrolní neinokulované rostliny (0,775), rostliny simulovaně inokulované (0,759) (obr. 8). Pouze u 2. a 5. série nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi oběma typy kontrol. V rámci jednotlivých sérií tedy infekce průkazně snižuje hodnotu parametru F_v/F_m u inokulovaných disků ve srovnání s kontrolami.



Obr. 8. F_v/F_m – porovnání steady state stavu, srovnání v rámci série. $P = 0,00000$; průměr \pm SE (n = 96).

V dalším stupni byl testován vliv doby infekce, resp. inkubace u kontrol, na rozdíly mezi jednotlivými ošetřeními. Mezi 9. a 15. dnem se hodnota parametru F_v/F_m snížila u inokulovaných disků. Na základě nested ANOVY byly testovány rozdíly mezi hodnotami v průběhu infekce (9., 12. a 15. den) (obr. 9), rozdíly mezi ošetřeními sice byly v některých časech signifikantní, ale přesto je ovlivnění maximálního kvantového výtěžku fotosyntézy délkou inkubace neprůkazné.



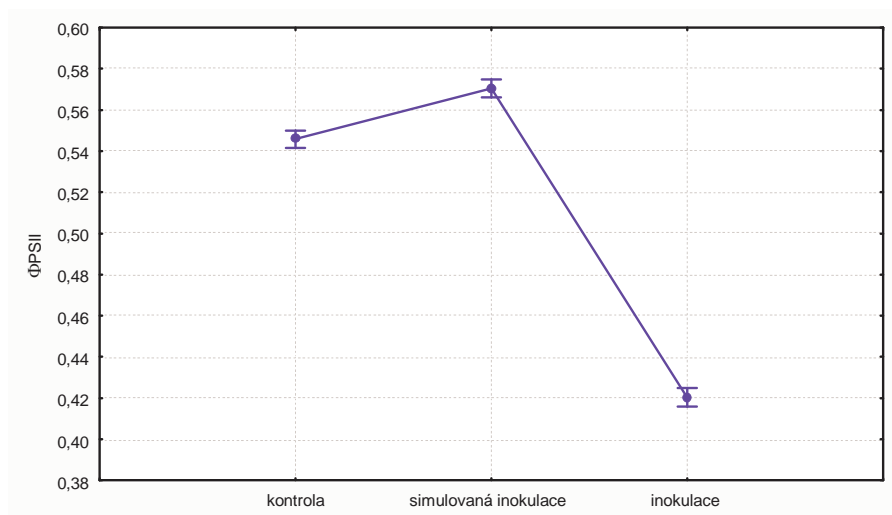
Obr.9. F_v/F_m – porovnání steady state stavu, srovnání mezi 9., 12., a 15. dnem měření.

$P = 0,00000$; průměr \pm SE (n = 32)

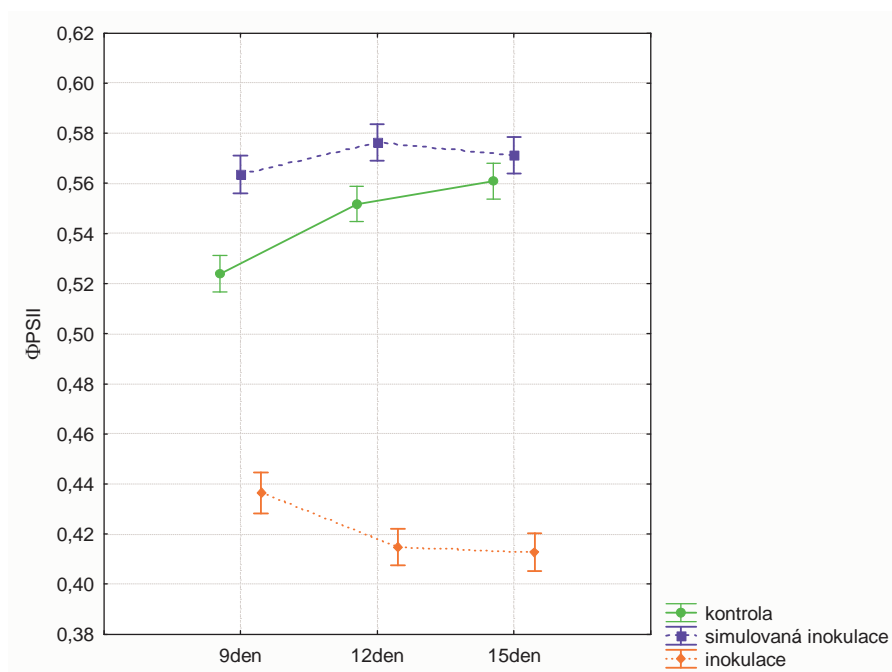
6.1.1.2 Kvantový výtěžek elektronového transportu fotosystému II (Φ_{PSII})

Kvantový výtěžek elektronového transportu fotosystému II vykazuje také signifikantní pokles v důsledku infekce, pokud opět srovnáváme průměrné hodnoty ze všech časových úseků v rámci série (obr. 10). Kontrola (0,546), simulovaná inokulace (0,571) i inokulace (0,420) se od sebe signifikantně liší. Pouze 5. série se řídí jiným trendem; hodnota Φ_{PSII} u kontroly (0,508) je dokonce nižší než u inokulovaných disků (0,598). S postupující dobou infekce byla pozorována klesající tendence i u Φ_{PSII} . Vzhledem k tomu, že se pokles neobjevuje ve všech sériích a data mají velmi velký rozptyl, nemůžeme výstupy nested ANOVY považovat za průkazné (obr. 11).

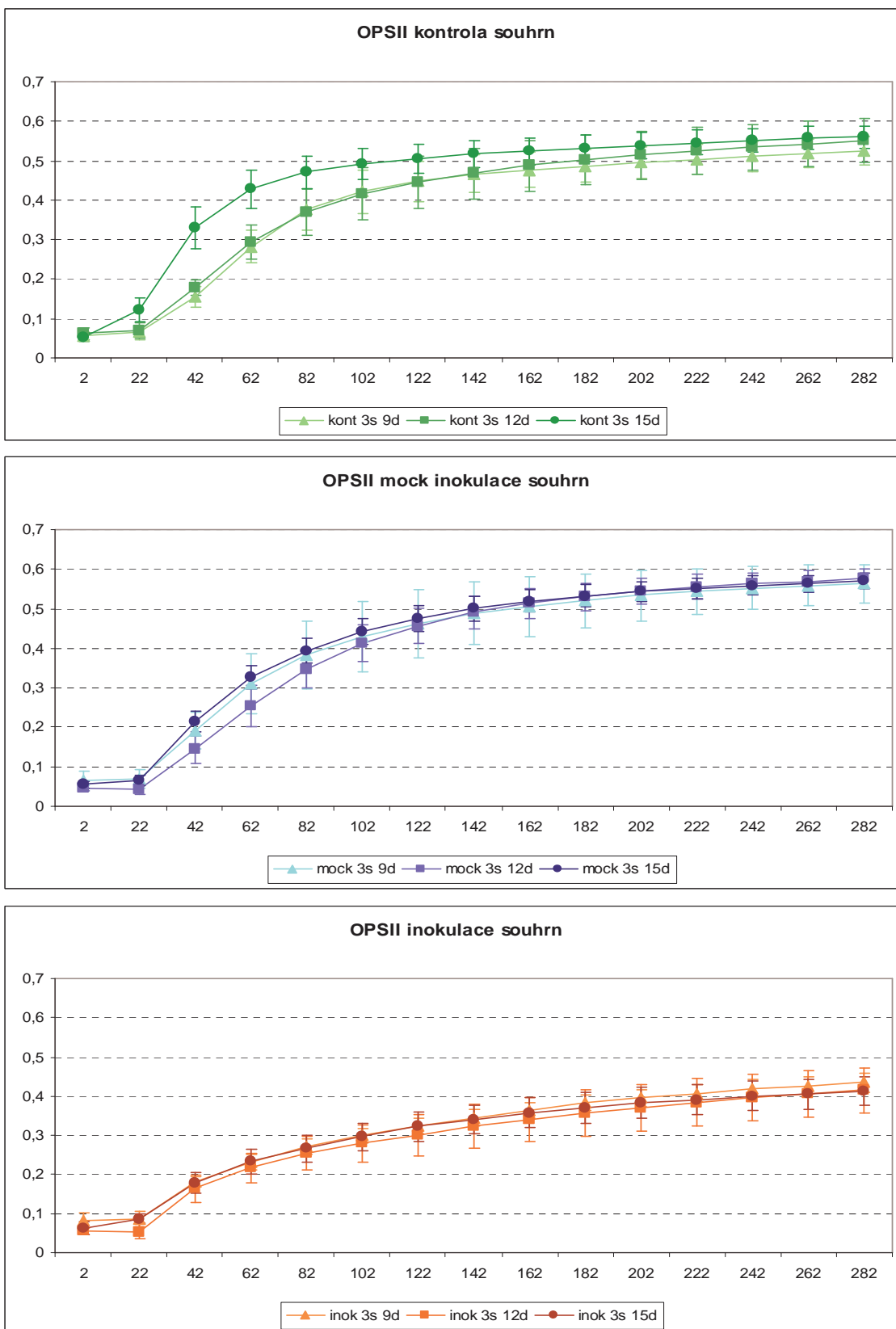
Z průběhu křivky parametru Φ_{PSII} v průběhu měření můžeme vyčíst, že kontrolní i simulovaně inokulované rostliny reagují normálně; hodnota parametru je poměrně vysoká a nárůst hodnot rychlý. Inokulované disky mají křivku plošší a dosahují nižších hodnot, tj. nejsou schopny v krátké době dosáhnout potřebné účinnosti fotosyntézy, protože nejsou schopny efektivně využívat dopadající světelná kvanta (obr. 12).



Obr. 10. Φ_{PSII} – porovnání steady state stavu, srovnání v rámci série. $P = 0,00000$; průměr \pm SE (n = 96)



Obr.11. Φ_{PSII} – porovnání steady state stavu, srovnání mezi 9., 12., a 15. dnem měření. $P = 0,00191$; průměr \pm SE (n = 32)

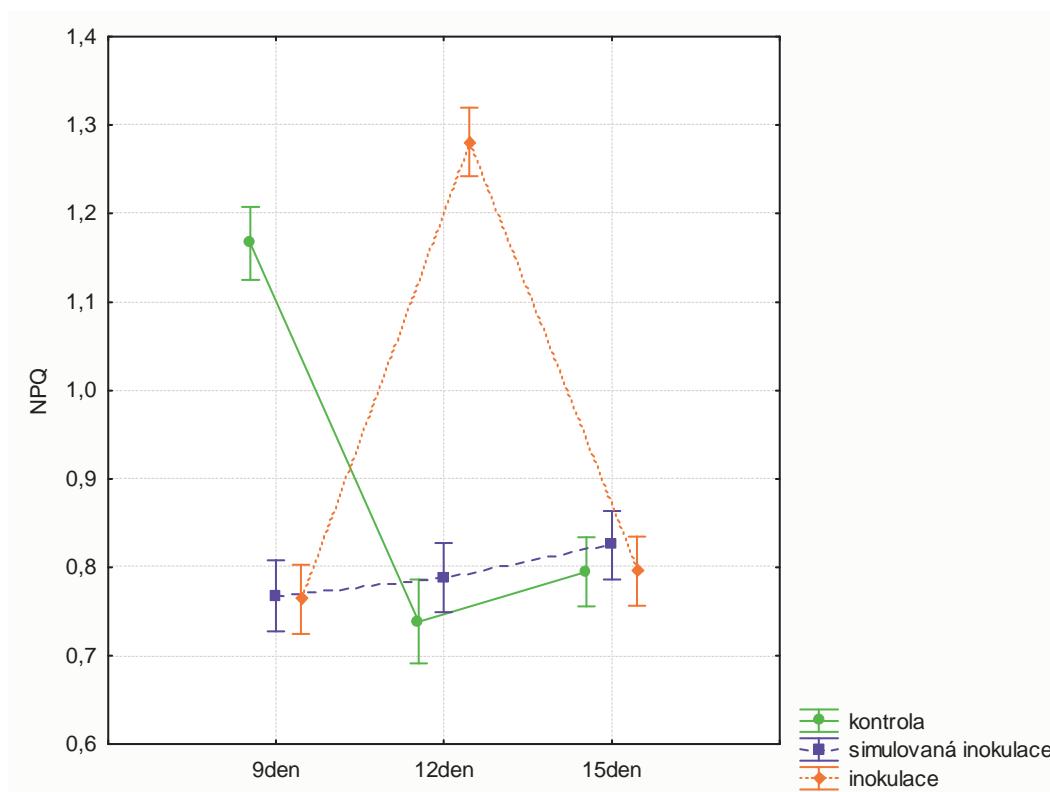


Obr. 12. Φ_{PSII} – srovnání křivek získaných v průběhu 287 sekund analýzy. Průměr \pm SD (n = 32), kont = kontrola, mock = simulovaná inokulace, inok = inokulace, s = série, d = den.

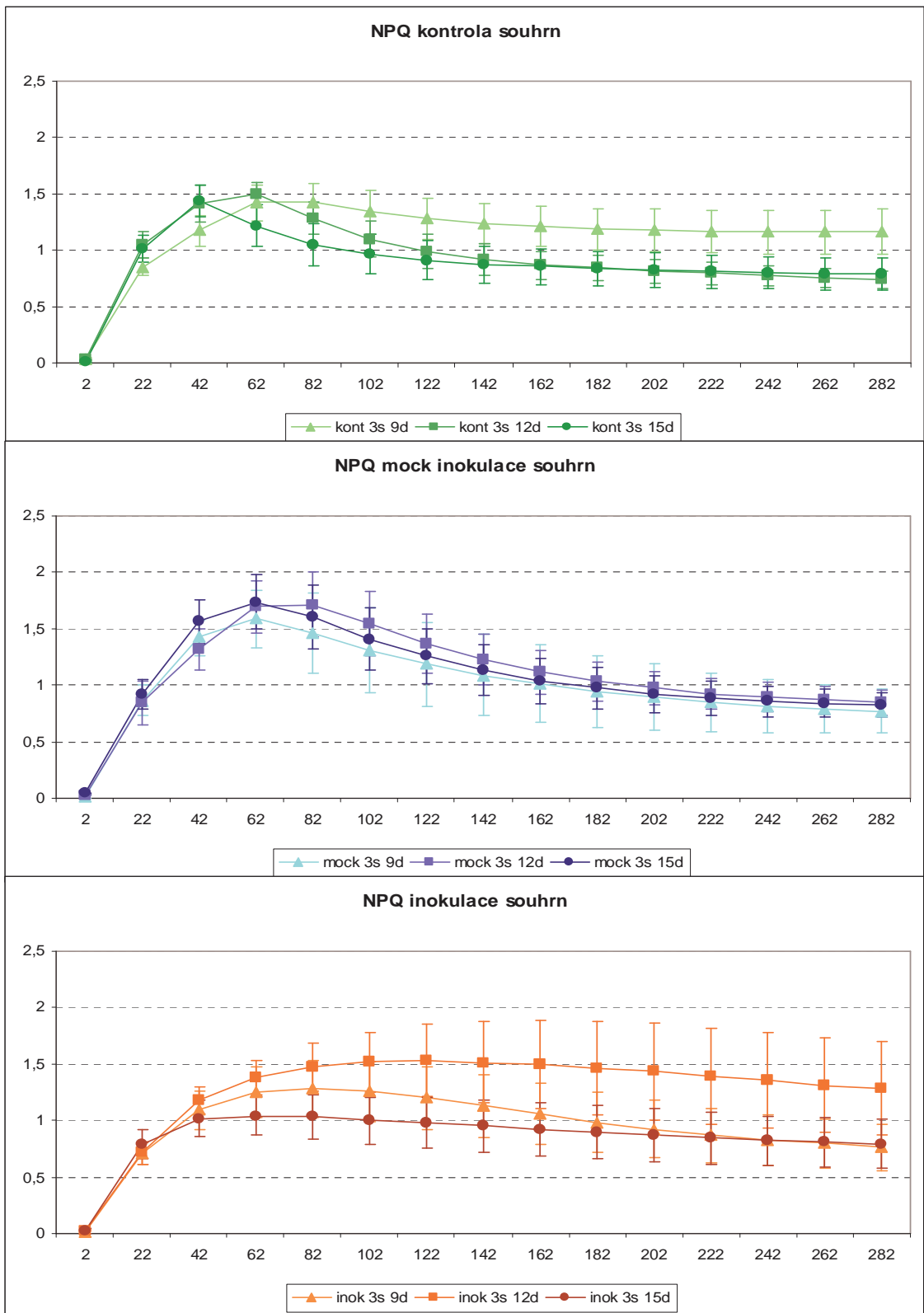
6.1.1.3 Nefotochemické zhášení (NPQ)

Analýza parametru NPQ nepřinesla žádné průkazné výsledky; data jsou velmi variabilní a nelze vysledovat žádný trend jak při porovnání inokulovaných, simulovaně inokulovaných a kontrolních disků, tak ani v průběhu času (obr. 13).

Průběh křivky (obr. 14) u kontrolních a simulovaně inokulovaných disků je normální, rychlý nárůst hodnoty odpovídá nárůstu gradientu H^+ , který po dosažení vyhovující hodnoty začne opět klesat v důsledku využití gradientu ke tvorbě ATP. V ideálním případě se už průběh křivky nemění. Zde ale vidíme velmi pomalý nárůst počátečního gradientu, který klesá velmi pozvolně, což značí, že rostlina vytváří metabolity spotřebovávané v Calvinově cyklu pouze v omezeném množství.



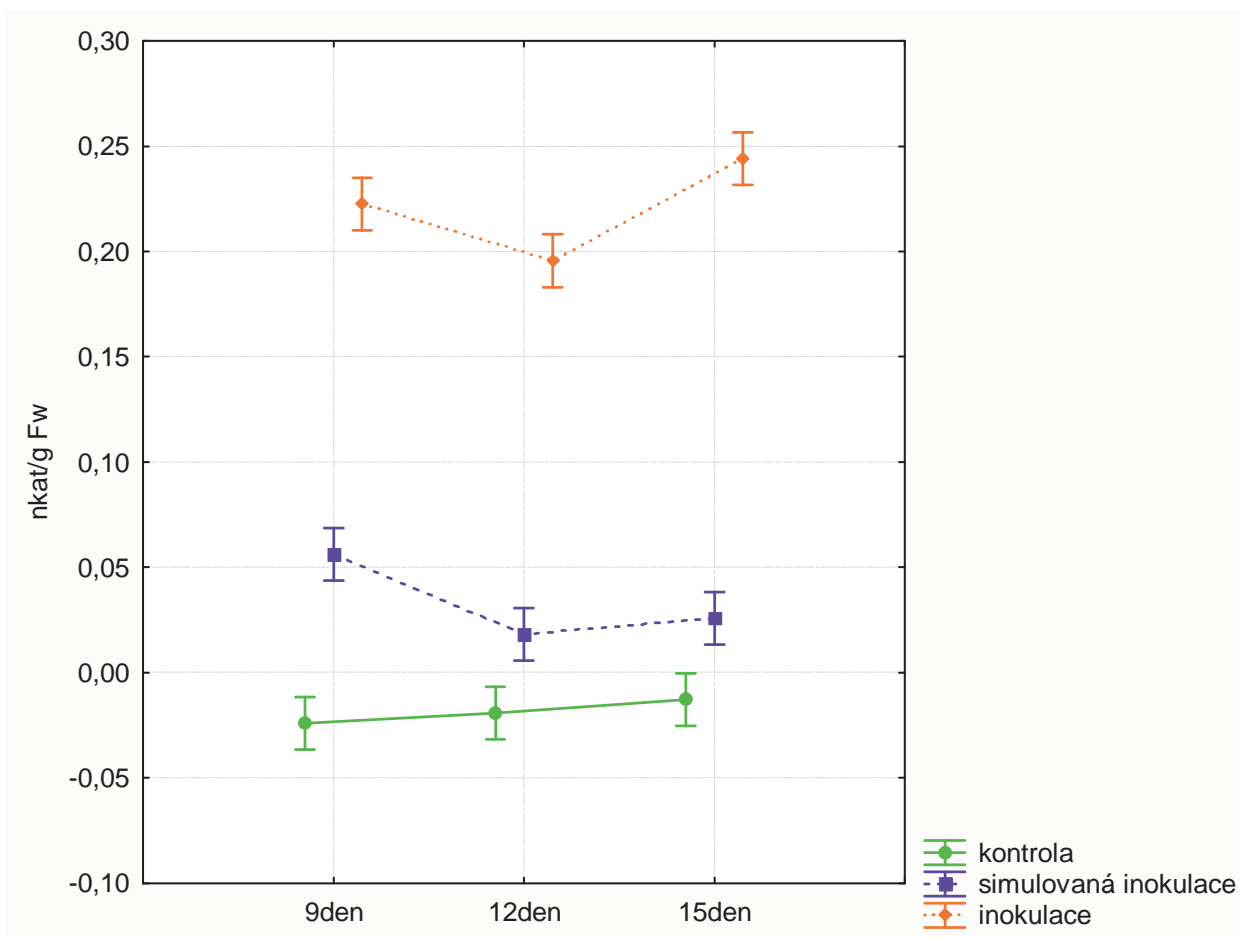
Obr.13. NPQ – porovnání steady state stavu, srovnání mezi 9., 12., a 15. dnem měření. $P = 0,00000$; průměr \pm SE (n = 32)



Obr. 14. NPQ – srovnání křivek získaných v průběhu 287 sekund analýzy. Průměr \pm SD (n = 32), kont = kontrola, mock = simulovaná inokulace, inok = inokulace, s = série, d = den.

6.1.2 Změny aktivity extracelulární invertasy v infikovaném pletivu

Na základě jednocestné analýzy variance byl prokázán signifikantní nárůst aktivity extracelulární invertasy u inokulovaných disků, která se pohybovala okolo 0,22 nkat/g Fw, což je přibližně trojnásobný nárůst oproti kontrolám (0,03 nkat/g Fw simulovaná inokulace, -0,02 kontrola) Nested ANOVA rovněž prokázala signifikantní rozdíly aktivity invertasy v průběhu času. Z obr. 15 můžeme vyčíst slabou vzrůstající tendenci aktivity invertasy s prodlužující se dobou infekce, resp. inkubace.



Obr. 15. Aktivita extracelulární invertasy v rámci laboratorního pokusu u inokulovaných, simulovaně inokulovaných a kontrolních listových disků v průběhu 9.-15. Dne po inokulaci. $P = 0,04607$; průměr \pm SE ($n = 27$)

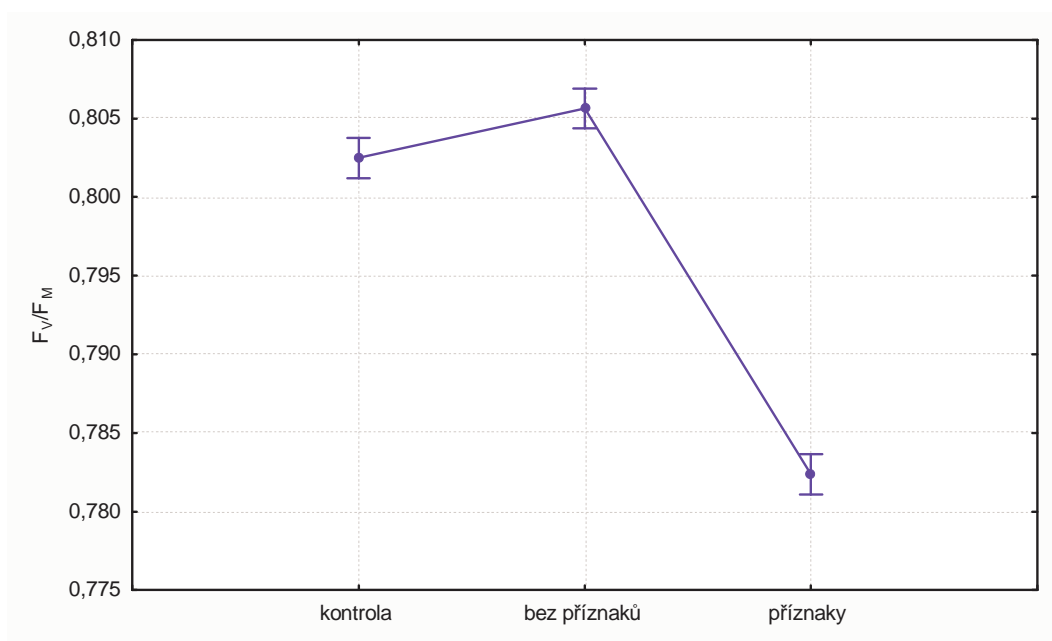
6.2 Polní pokus

6.2.1 Účinnost fotosyntetického aparátu hostitele v průběhu infekce

Vzhledem k tomu, že měření proběhlo jednorázově a na homogenním materiálu, bylo zde možné zprůměrnovat jednotlivá ošetření (kontrola, bez příznaků a příznaky). Výsledné grafy v této kapitole tedy ukazují porovnání průměrů jednotlivých variant ze čtyř nezávislých měření.

6.2.1.1 Maximální kvantový výtěžek fotosyntézy (F_v/F_m)

Jednocestná analýza variance ukázala signifikantní pokles parametru F_v/F_m (obr. 16) u pletiva s příznaky (0,782) ve srovnání s pletivem bez příznaků (ať už pocházelo z kontrolní (0,802) nebo infikované rostliny (0,806)). To svědčí o nefunkčnosti části reakčních center v pletivu kolonizovaném patogenem, ale nejedná se o vážné poškození.

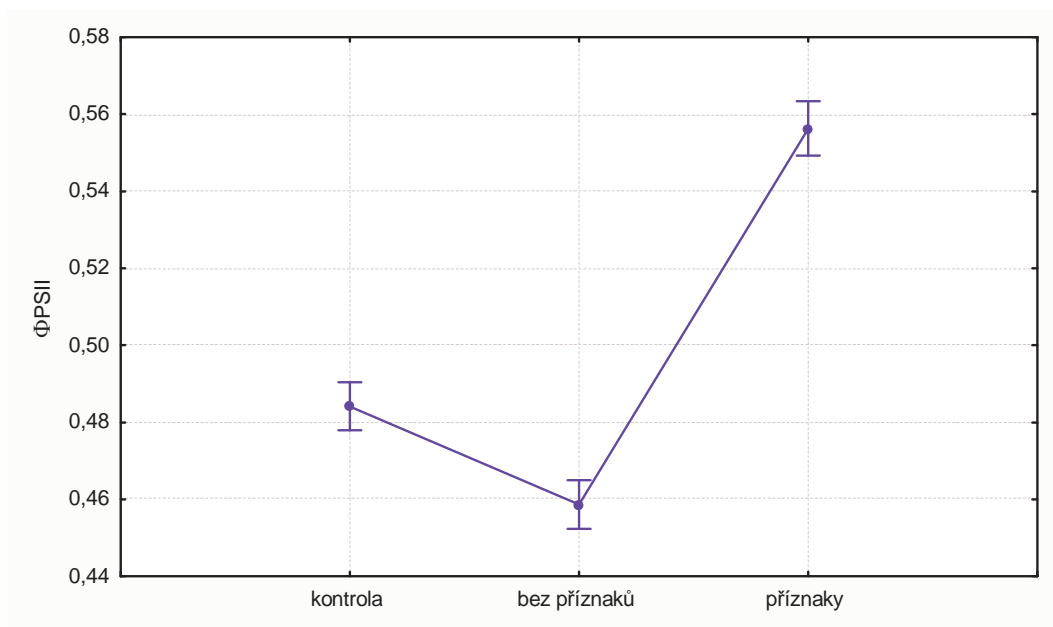


Obr. 16. F_v/F_m – porovnání steady state stavu, polní pokus. $P = 0,00000$; průměr \pm SE ($n = 64$)

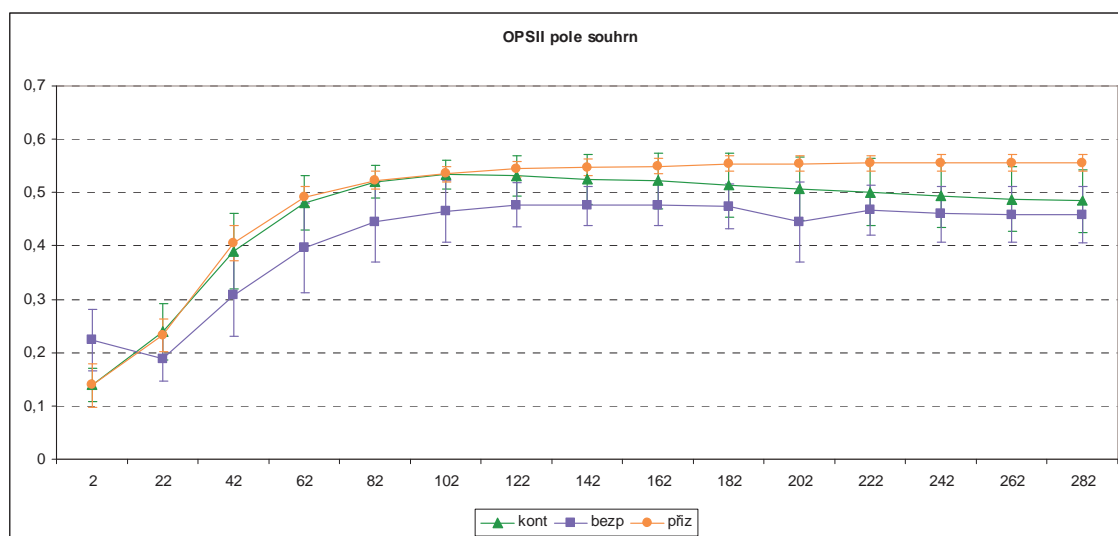
6.2.1.2 Kvantový výtěžek elektronového transportu fotosystému II (Φ_{PSII})

Mezi steady state hodnotami kontroly (0,484), pletiva bez příznaků (0,459) a pletiva s příznaky (0,556) existují průkazné rozdíly. Jednocestná ANOVA prokázala signifikantní nárůst kvantového výtěžku elektronového transportu PSII u pletiva s příznaky infekce (obr. 15). Tento nárůst se odráží v účinnosti fotosystému II, který je schopen velmi efektivně zpracovávat energii světelných kvant a předávat ji elektron-transportnímu řetězci.

Z průběhu křivky parametru (obr. 18) můžeme vyčíst, že zpočátku jak kontrola, tak pleťivo s příznaky vykazuje rychlý nárůst, ale pouze u kontroly dochází s postupem času k mírnému poklesu, což značí velmi mírné ovlivnění transportu elektronů. Pleťivo z infikované rostliny bez příznaků vykazuje pokles parametru po celou dobu měření, to znamená, že patogen nepřímo ovlivňuje tento fotosyntetický parametr.



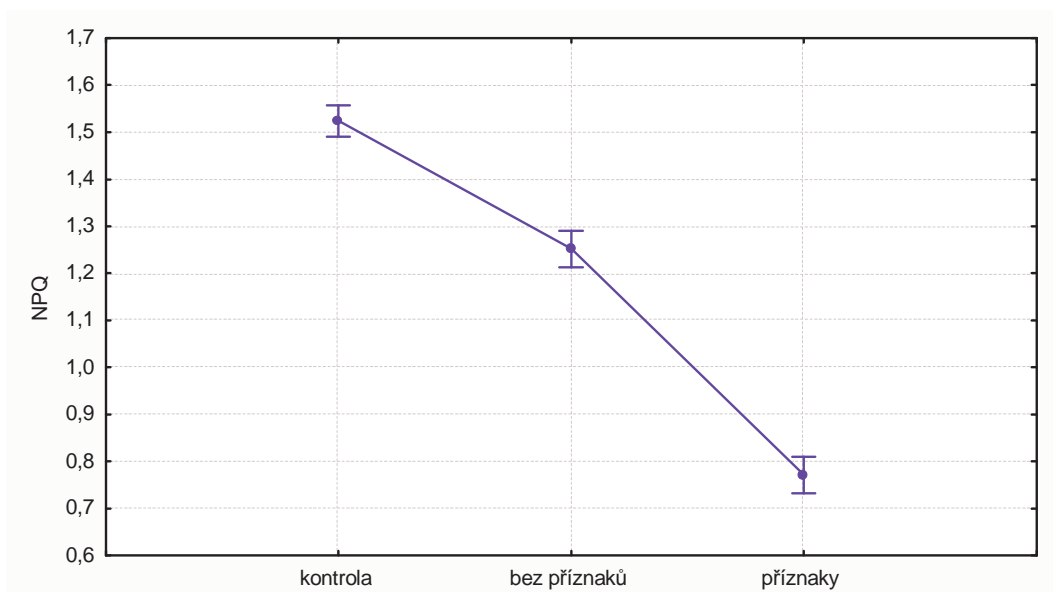
Obr. 17. Φ_{PSII} – porovnání steady state stavu, polní pokus. $P = 0,00000$, průměr \pm SE (n = 64)



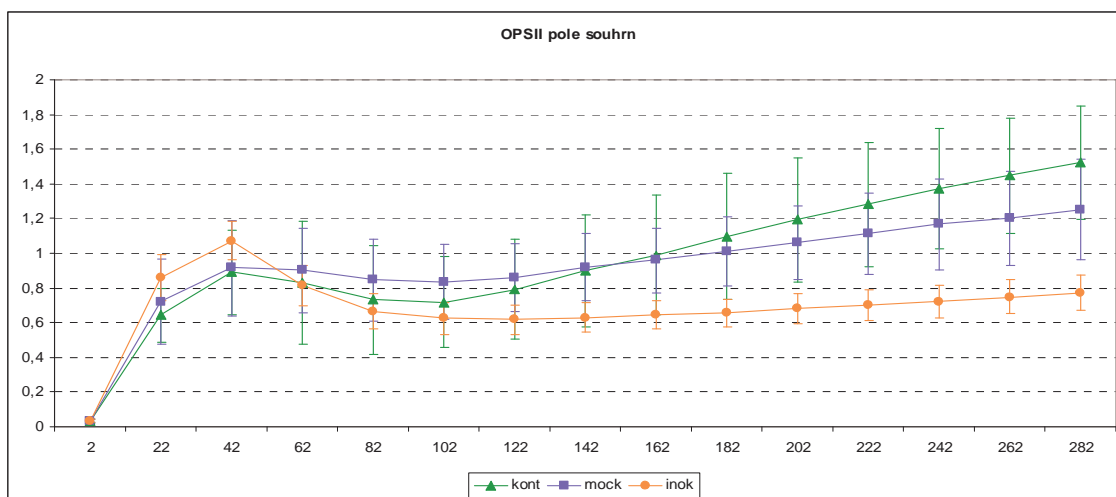
Obr. 18. Φ_{PSII} , polní pokus, srovnání křivek získaných v průběhu 287 sekund analýzy. Průměr \pm SD (n = 64), kont = kontrola, mock = simulovaná inokulace, inok = inokulace, s = série, d = den

6.2.1.3 Nefotochemické zhášení (NPQ)

Jednocestná ANOVA prokázala, že patogen způsobuje nižší hodnotu NPQ v infikované části listu (0,772) ve srovnání s oběma dalšími variantami (kontrola (1,524); pletivo bez příznaků (1,252)), obr. 19. V obr. 20 ukazujícím průběh křivky v průběhu analýzy si můžeme všimnout opětovného nárůstu parametru. u všech variant to může znamenat zpětnovazebnou inhibici Calvinova cyklu, ale pouze v případě infikovaného pletiva ji můžeme vysvětlit zvýšenou aktivitou extracelulární invertasy, a proto i zvýšenou hladinou cukrů, která inhibici způsobuje.



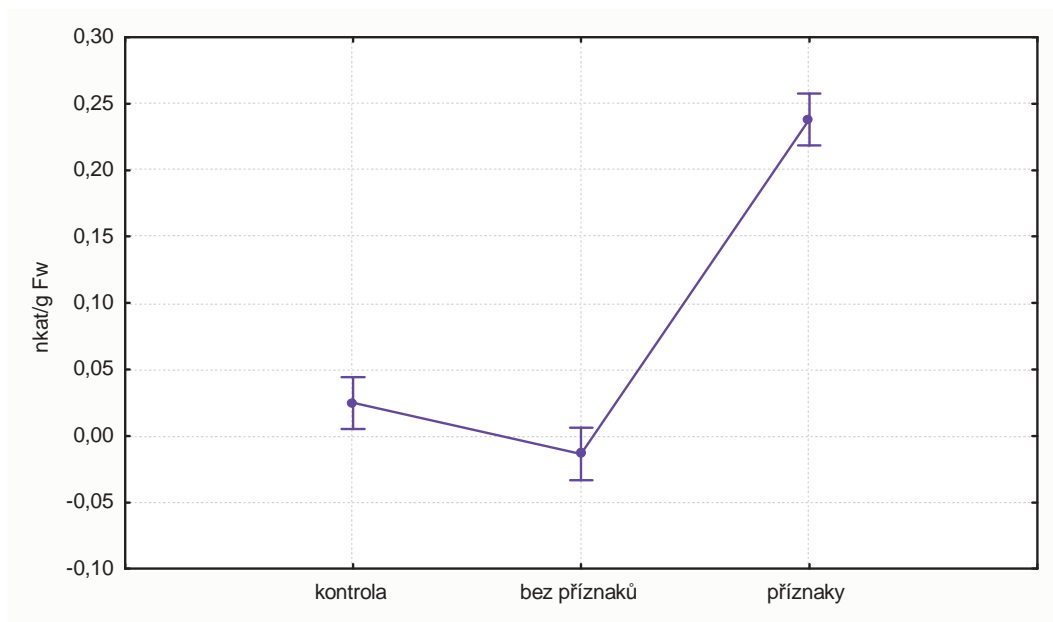
Obr. 19. NPQ – porovnání steady state stavu, polní pokus. $P=0,00000$, průměr \pm SE (n = 64)



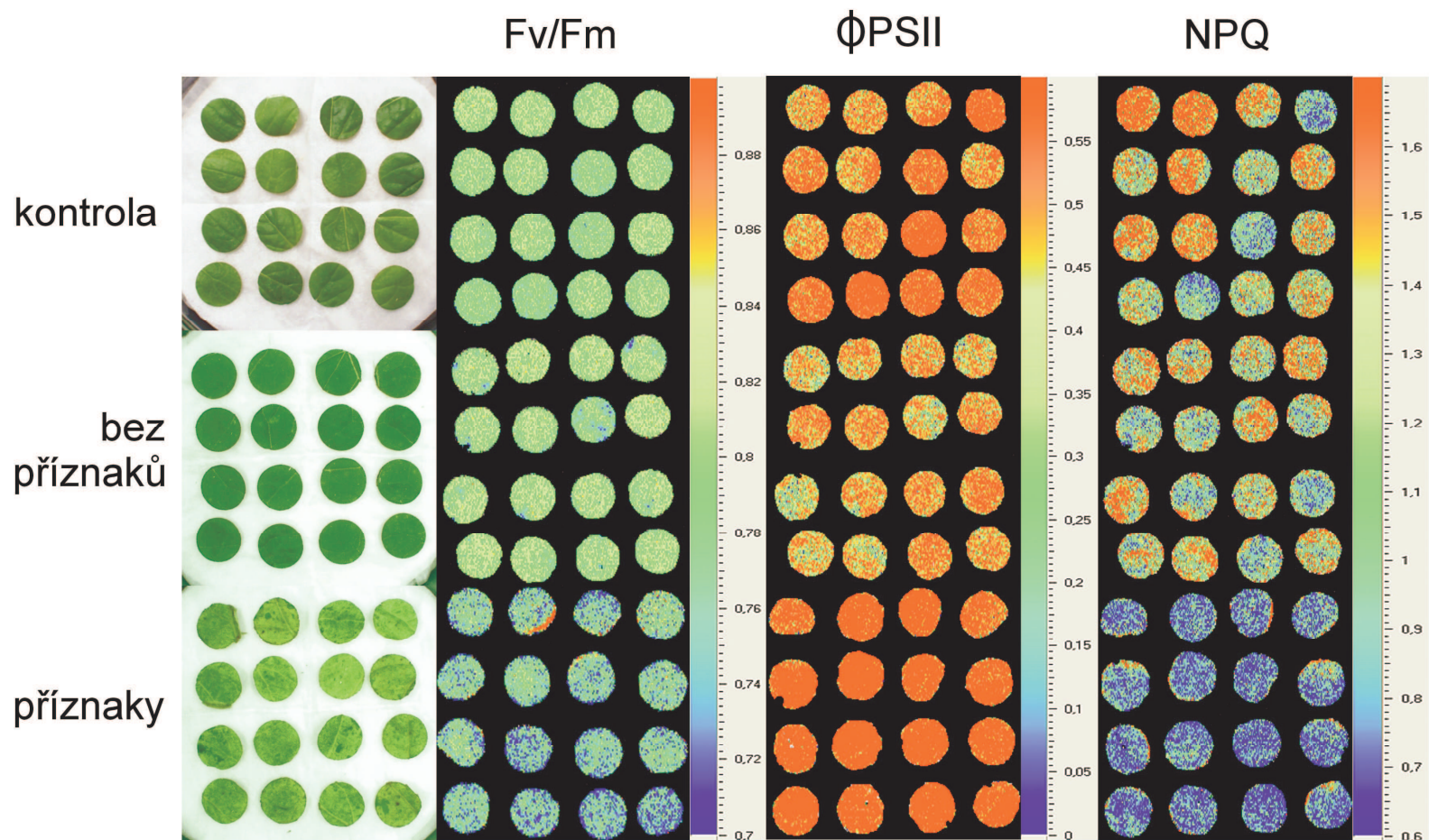
Obr. 20. NPQ, polní pokus, srovnání křivek získaných v průběhu 287 sekund analýzy Průměr \pm SD (n = 64), kont = kontrola, mock = simulovaná inokulace, inok = inokulace, s = série, d = den

6.2.2 Změny aktivity extracelulární invertasy v infikovaném pletivu

Zvýšení aktivity invertasy díky patogenezí bylo signifikantní (obr. 21), část listů s příznaky (0,238) se signifikantně liší od kontroly i disků bez příznaků napadení. Rozdíly jsou signifikantní i mezi kontrolou (0,025) (rostlinou bez příznaků) a disky z části listů bez příznaků (-0,014). Záporná hodnota aktivity enzymu u disků bez příznaků je způsobena chybou v měření absorbance.



Obr. 21. Aktivita extracelulární invertasy, polní pokus. $P=0,0000$; průměr \pm SE (n = 36)



Obr. 22. Obrazové shrnutí polního pokusu. První sloupec zprava: vzhled listových disků před měřením fotosyntetických parametrů, druhý sloupec zprava: obrazové znázornění F_v/F_m , třetí sloupec zprava: obrazové znázornění Φ_{PSII} , čtvrtý sloupec zprava: obrazové znázornění NPQ. U fotosyntetických parametrů jsou použity pseudobarvy vyjadřující hodnoty daného parametru, vedle trojice směrem vpravo se nachází příslušné měřítko.

7. Diskuse

Záměrem této práce bylo osvětlit změny v primárním metabolismu slunečnice, které jsou způsobeny systémovou infekcí *P. halstedii*. Po několika předběžných měřeních v r. 2009 bylo v průběhu roku 2010 vypěstováno a proměřeno celkem 5 sérií rostlin pěstovaných a inokulovaných v laboratorních podmínkách, u kterých byly ve třídních intervalech (9., 12. a 15. den) studovány změny fotosyntézy prostřednictvím fluorescence chlorofylu a. U tří z těchto sérií byla navíc stanovena aktivita extracelulární invertasy. Mimoto byl na jaře roku 2010 založen polní pokus s cílem srovnat u starších systémově infikovaných rostlin změny v pletivech, které byly invadovány patogenem s pletivou, která patogen nekolonizoval.

Po zkušenostech z předchozích měření byla pro umělou inokulaci a následné měření zvolena metoda listových disků z prvních pravých listů. Fluorescenci lze spolehlivě měřit pouze na rovném povrchu a tuhé děložní lístky, jejichž pletivo je vhodnější pro dlouhodobou inkubaci (Stojaspal, 2009), nelze bez poškození vyrovnat tak aby byla zachována přesnost. Navíc stanovení invertasy u děložních lístků by bylo zkresleno množstvím zásobních látek ze semen.

Aktivita invertasy byla stanovována podle metodiky, kterou popsal Fotopoulos et al. (2003) a přestože fungovala bez problémů, nebylo možné se vyhnout určitému zkreslení dat. To bylo způsobeno pro slunečnici nevhodným poměrem pufr/pletivo; i přes veškerou snahu nebylo možné zachovat konstantní množství vzorku, protože se objem nevešel ani do největších komerčně dodávaných mikrozkuvek. Přesto výsledky (signifikantní změny v aktivitě invertasy) ukazují, že patogenezé *P. halstedii* zvyšuje aktivitu extracelulární invertasy v pletivu. Vzhledem k tomu, že biotrofní patogeny upřednostňují příjem hexoz (Glu a Fru), které se za tímto účelem hromadí v místě spotřeby (Götz a Boyle, 1998, Wright et al., 1995), je logické navýšení aktivity invertasy, které štěpí sacharosu, v tomto místě. Zvýšená aktivita v místě spotřeby byla prokázána tím, že v kolonizovaném pletivu disků z polního experimentu došlo k rapidnímu zvýšení aktivity enzymu až na 0,24 nkat/g Fw zatímco v bezprostředně sousedícím pletivu pouze k velmi mírnému (a ve srovnání s kontrolou nesignifikantnímu) nárůstu aktivity na 0,025 nkat/g Fw. Takto nízká hodnota může být vysvětlena tím, že místo infekce se stává výrazným sinkem a sacharidy jsou translokovány směrem k němu. Extracelulární invertasa se podílí na vykládání floému a zde není aktivní, protože veškeré metabolity vyrobené ve zdravé části listu jsou ihned přesunuty do sinku, tj. místa infekce. U patosystému slunečnice – *P. halstedii* byl tedy potvrzen obecně přijímaný fakt, že přítomnost zvláště biotrofních patogenů zvyšuje aktivitu extracelulární invertasy v místě infekce (Götz a Boyle, 1998, Roitsch et al., 1995).

Na základě výsledků této diplomové práce bylo zjištěno, že přítomnost patogenu v pletivu hostitele zvyšuje aktivitu extracelulární invertasy. Neodpovídá ovšem na otázku, jaký

mechanismus způsobuje nárůst aktivity invertasy. Bylo prokázáno, že aktivita extracelulární invertasy může být ovlivněna fytohormony jako jsou auxiny a cytokininy (Proels a Roitsch, 2009). Cytokininy u rostlin obvykle zabraňují senescenci, jejich koncentrace může být zvýšená v bezprostřední blízkosti infekčních struktur patogenu (Walters et al., 2008) a mohou také zvyšovat aktivitu extracelulární invertasy (Walters a McRoberts, 2006). Z tohoto důvodu by v budoucnu bylo vhodné objasnit souvislost primárního metabolismu s hladinami fytohormonů, protože právě změny v hladině fytohormonů se silně podílejí na vzniku symptomů u rostlin infikovaných *P. halstedii* (Benz a Spring, 1995).

Měření fluorescence bylo prováděno na listových discích kultivovaných ve stejných podmínkách, odebíraných a měřených ve stejné denní době, ale přesto nebylo dosaženo stoprocentně homogenních podmínek a očekávaných výsledků. V případě maximálního kvantového výtěžku fotosyntézy (F_v/F_m) došlo podle očekávání k poklesu hodnoty parametru u inokulovaných respektive infikovaných disků z polního pokusu. Hodnotu 0,83, která odpovídá F_v/F_m zdravé rostliny (Maxwell a Johnson, 2000) lze jako orientační použít u většiny rostlin, nelze se jí však řídit striktně. Přestože nejnižší zaznamenaná hodnota tohoto parametru byla 0,65, nejedná se ještě o vážné poškození fotosyntetického aparátu, spíše o mírnou fotoinhibici PSII, kdy nefunguje menší část reakčních center. Mírný a nesignifikantní pokles F_v/F_m u simulovaně inokulovaných disků můžeme přičíst právě tomuto zásahu. Naopak mírný pokles F_v/F_m u kontroly z polního pokusu může být způsoben tím, že listy ze spodních pater zdravých slunečnic, které byly vybrány ve stejné výšce rostlin jako u zakrslých infikovaných rostlin kvůli zachování stejného zastínění v porostu, jsou starší a mohou tak podléhat mírné senescenci.

Pokles kvantového výtěžku elektronového transportu fotosystému II u infikovaných rostlin svědčí o snížené schopnosti fotosystému II efektivně využívat světelných kvant a přenášet získanou energii. Podle očekávání by měla být změna steady state tohoto parametru oproti kontrolám výraznější, přestože např. Berger et al. (2004) zaznamenali naprosto opačný efekt. V blízkosti lézí nekrotrofní plísně šedé (*Botrytis cinerea*) na rajčeti byla účinnost využití světelných kvant vyšší než v ostatním pletivu. U biotrofních parazitů je obvyklejší stav, kdy se kvantový výtěžek elektronového transportu v místě infekce snižuje, jak je tomu např. u interakce *Plantago ovata* – *Peronospora plantaginis* (Mandal et al., 2009), *Lactuca sativa* – *Bremia lactucae* (Prokopová et al., 2010), nebo *Vitis vinifera* – *Plasmopara viticola* (Cséfalvay et al., 2009). Hodnota Φ_{PSII} u disků z polního pokusu infikovaných *P. halstedii* se naopak proti očekávání mírně zvýšila, což znamená zefektivnění využívání energie světelných kvant a jejího přenosu. Jak je vidět, v přírodních podmínkách může někdy docházet k mírné stimulaci fotosyntetického aparátu patogenem. Potom nastává situace, kdy je určitá část reakčních center

vyřazena z provozu (pokles F_v/F_m), ale zbývající reakční centra jsou pořádku a fungují s vysokou efektivitou, což vede ke zvýšení parametru Φ_{PSII} a snížení NPQ.

Neprůkazné výsledky a absence trendů u Φ_{PSII} měřeného u rostlin pěstovaných v laboratorních podmínkách mohou být vysvětleny vysokou citlivostí Φ_{PSII} na intenzitu světla, protože stanovení tohoto parametru předpokládá konstantní intenzitu záření (Maxwell a Johnson, 2000). Pokud jsou rostliny pěstovány v odlišných světelných podmínkách, jsou naměřené hodnoty v podstatě neporovnatelné. Přestože bylo vyvinuto maximální úsilí pro vytvoření homogenních světelných podmínek v průběhu pěstování rostlin a inkubace listových disků, nebylo možné docílit toho v plném provozu fytotronů KB PřF UP. Zachování konstantních světelných podmínek bylo obtížné i v průběhu samotného měření fluorescence kvůli zvýšenému pohybu studentů a pracovníků v laboratoři biofyziky KEF PřF UP, kteří opakovaně porušovali zatemnění. Světlené podmínky byly zřejmě natolik heterogenní, že ovlivnily obě kontroly, které by za standardních okolností neměly reagovat vůbec. Takovému optimálnímu stavu se blíží situace zobrazená na obr. 11 (3.série).

Stejně tak jako Φ_{PSII} bylo nestandardními podmínkami ovlivněno i nefotochemické zhášení NPQ u laboratorního pokusu, ačkoli je to faktor, který v rámci fotosyntetických parametrů stanovovaných v této práci reaguje na stres nejlépe (Maxwell a Johnson, 2000). Ze získaných dat není možné vyčíst jakýkoli trend. Právě zde se dá u interakcí rostlin a biotrofních parazitů očekávat nárůst steady state hodnoty, která by vypovídala o zpětnovazebné inhibici Calvinova cyklu, jak zaznamenali Prokopová et al. (2010) či Mandal et al. (2009). Disky z polního pokusu ale tímto očekávaným způsobem reagují všechny. Nárůst NPQ u infikovaných rostlin lze vysvětlit zpětnovazebnou inhibicí Calvinova cyklu zvýšenou aktivitou invertasy, a tím i zvýšenou hladinou jednoduchých sacharidů v patogenem napadeném pletivu. Můžeme ale pouze odhadovat, co způsobilo inhibici Calvinova cyklu u kontrolních a neinfikovaných disků v experimentech *in vitro*; pravděpodobný je účinek senescence, protože k odběru vzorků došlo až začátkem léta 2010.

Měření aktivity invertasy podle metodiky, kterou popsal Fotopoulos et al. (2003) probíhalo poměrně spolehlivě bez větších problémů. Do budoucna by ale bylo vhodné upravit poměr pufr/pletivo tak, aby nedocházelo ke ztrátám vzorků a docílilo se větší přesnosti. Podle mých zkušeností by bylo vhodné používat čtyři pětiny doporučeného množství vzorku a pufru (tj. 0,4 g čerstvého pletiva na 1,6 ml extrakčního pufru místo 0,5 g čerstvého pletiva na 2 ml pufru). Fakt, že se ke stanovení aktivity invertasy používá několikrát promytý pelet může představovat nevýhodu v případě, že na začátku izolace enzymu nedojde k dostatečné homogenizaci rostlinného materiálu. Větší kousky rostlinného pletiva komplikují odebrání přesného množství vzorku a zkreslují měření na spektrofotometru (přítomnost sedimentu se při opakovaném měření

jednoho vzorku projeví poklesem hodnoty absorbance). Je proto vhodné věnovat homogenizaci vzorků maximální pozornost a zpočátku homogenizovat pouze v minimálním množství pufru, což je podle mých zkušeností optimální způsob homogenizace. Stanovení aktivity invertasy by bylo v budoucnu vhodné doplnit o stanovení obsahu sacharosy, fruktosy, glukosy a škrobu v pletivu (Tang et al., 1996; Scharte et al., 2005).

Vzhledem k tomu, že měření fotosyntetických parametrů jako je Φ_{PSII} a NPQ je velmi citlivé na podmínky prostředí, je v budoucnu nutné ještě více dbát na dodržení homogenních světelných podmínek při pěstování a měření vzorků. Dále by bylo vhodnější používat pro měření pletivo z rostlin pěstovaných v polních podmínkách, protože pěstování a inokulace vzorků *in vitro* ovlivňuje řada faktorů, které snižují kvalitu získaných výsledků. Pro dokonalejší popis změn ve fotosyntéze by v budoucnu bylo vhodné kromě fluorescence chlorofylu aplikovat i další metody jako jsou např. stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů (Prokopová et al., 2010; Mandal et al., 2009), sledování výměny plynů ve fotosyntetizujícím pletivu (Scharte et al., 2005; Mandal et al., 2009) či stanovení aktivity RUBISCa (Tang et al., 1996).

8. Závěr

V letech 2009-2010 probíhalo studium změn primárního metabolismu slunečnice vyvolaných interakcí s biotrofním parazitem *Plasmopara halstedii*. S využitím metod jako je měření fluorescence chlorofylu a a spektrofotometrické stanovení aktivity extracelulární invertasy byla získána řada cenných dat z laboratorních i polních experimentů, která byla statisticky zhodnocena a přispěla alespoň k částečnému porozumění interakce mezi oběma partnery.

Laboratorní experiment prokázal vysoký nárůst aktivity extracelulární invertasy v pletivu náchylné slunečnice napadeném *P. halstedii* a její další mírný vzrůst v průběhu postupující infekce, což souvisí s trofickou závislostí peronospory na hostiteli. Tato domněnka bohužel nebyla podpořena změnami v nefotochemickém zhášení fluorescence chlorofylu a, které bylo neprůkazné, což bylo pravděpodobně způsobeno nedokonalým zajištěným homogenních světelných podmínek. Další měřený parametr fotosyntézy Φ_{PSII} , byl rovněž neprůkazný, pokud byl vztahován k postupu patogeneze v čase. Signifikantní rozdíly kvantového výtěžku elektronového transportu fotosystému II byly zaznamenány pouze v případě, když byly porovnávány hodnoty infikovaných a kontrolních rostlin v rámci jednotlivých souborů. Mírný pokles parametru Φ_{PSII} u inokulovaných disků lze vysvětlit sníženou schopností $PSII$ využívat dopadající světelná kvanta. Stejně tak pokles maximálního kvantového výtěžku fotosyntézy (F_v/F_m) u inokulovaných disků porovnávaných opět pouze v rámci jednotlivých souborů svědčí o mírné inhibici reakčních center $PSII$ způsobené patogenem.

Polní experiment přinesl očekávané výsledky se signifikantními rozdíly u všech sledovaných fotosyntetických parametrů; data ukazují na situaci, kdy patogen velmi mírně stimuluje fotosyntetickou aktivitu rostliny (nebo jinými slovy fotosyntetickou aktivitu rostliny výrazně nesnižuje). Zároveň byl zaznamenán signifikantní nárůst aktivity extracelulární invertasy u infikovaného pletiva, což dobře koreluje s průběhem křivky NPQ během analýzy, obojí ukazuje na možnost zpětnovazebné inhibice Calvinova cyklu. Calvinův cyklus je pravděpodobně inhibován i u sousedního neinfikovaného pletiva a pletiva kontrolních zdravých rostlin, tento mechanismus ovšem bude s největší pravděpodobností odlišný.

Závěrem lze konstatovat, že inokulace a pěstování slunečnice *in vitro* ovlivňuje interakci a zejména fotosyntetické parametry natolik, že lze jen s obtížemi získat relevantní data. Rozdíly ve výsledcích mezi laboratorním a polním pokusem mohly být ovlivněny i stářím rostlin; zatímco v laboratorním pokusu byly měřeny rostliny staré cca 3 týdny, stáří rostlin na poli bylo 10 týdnů.

9. Seznam literatury

- Achbani, E.H., el Hani, M., Douria, A, Walser, P., de Labrouhe, D.T. (1996): *Plasmopara halstedii* race 2 of downy mildew is present on sunflower in Marocco. *Agronomie*, 16(4): 265-266.
- Agrios, G.N. (2005): *Plant Pathology*, 5th edition. Elsevier Academic Press, Burlington, 922 p.
- Anjana, G., Kini, K.R., Shetty, H.S., Parkash, H.S. (2007): Differential expression of sunflower peroxidase isoforms and transcripts during necrotrophic interaction with *Alternaria helianthi*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(4): 513-517.
- Bari, R., Jones, J.D.G. (2009): Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69: 473-488.
- Baudyš, E., Benda, J., Špaček, J. (1958): *Zemědělská fytopatologie II. – choroby polních plodin*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 775 p.
- Benz, A., Spring, O. (1995): Identification and characterization of auxin-degrading enzyme in downy mildew infected sunflower. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46: 163-175.
- Berger, S., Papadopoulos, M., Schreiber, U., Kaiser, W., Roitsch, T. (2004): Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* 122: 419–428.
- Bouterige, S., Tronchin, G., Lesourd, M., Marot-Leblond, A., Molinéro, V., Bouchara, J.P., Robert, R. (2003): Ultrastructural and immunochemical changes during the in vitro development of *Plasmopara halstedii*. *Phytopathology*, 93(8): 1023-1030.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R. (2000): *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, USA, 1367 p.
- Chaki, M., Fernandez-Ocana, A.M., Valderrama, R., Carreras, A., Esteban, F.J., Luque, F., Gomez-Rodriguez, M.V., Begard-Morales, J.C., Corpus, F.J., Barroso, J.B. (2009): Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower mildew interaction (vol 50, pg 265, 2009). *Plant and Cell Physiology*, 50(3): 665-679.
- Clark, J.S.C., Spencer-Phillips, P.T.N. (2004): The compatible interaction in downy mildew infections. In Spencer-Phillips P. T. N., Jeger M (eds.): *Advances in Downy Mildew Research*. Volume 2. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands, p. 1-34.
- Czéfaly, L., Di Gaspero, G., Matouš. K., Bellin, D., Ruperti, B., Olejníčková J. (2009): Pre-symptomatic detection of *Plasmopara viticola* infection in grapevine leaves using chlorophyll fluorescence imaging. *European Journal of Plant Pathology*, 125(2): 291-302.
- Čača, Z., Kolár, V., Novák, J.B., Závra, J. (1981): *Zemědělská fytopatologie*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 344 p.
- Dick, M.W. (2001). *Straminipilous fungi*. Kluwer Academic, Dordrecht Publisher, 670 p.

- Fotopoulos, V., Gilbert, M.J., Pittman, J.K., Marvier, A.C., Bouchanan, A.J., Sauer, N., Hall, J. L., Williams, L.E. (2003): The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, at beta fruct1, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology*, 132(2): 821-829.
- Fotopoulos, V. (2005): Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family. *Journal of Biological Research*, 4: 127-137.
- Göker, M., Voglmayr, H., Riethmüller, A., Oberwinkler, F. (2006). How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 105-122.
- Götz, M., Boyle, C. (1998): Changes in metabolite pools in host and pathogen during the uredinio and teliospore development of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Phytopathology*, 146: 599-607.
- Gulya, T.J., Woods, D.M., Bell, R., Mancl, M.K. (1991): Diseases of sunflower in California. *Plant Diseases*, 75: 572-574.
- Gulya, T.J. (1996). Everything you should know about downy mildew testing but were afraid to ask. Presented at the Sunflower downy mildew workshop, held in Fargo, ND, January 10 1996, in conjunction with the 17th sunflower research workshop, and published with the approval of the sunflower research workshop program committee, 9 p.
- Gulya, T.J. (2002): Efficacy of single and two way fungicide seed treatments for the control of metalaxyl resistant strains of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In The BCPC conference – pests and diseases 2002, 575-581.
- Gulya, T.J. (2007). Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Lebeda, A., Spencer-Phillips, P.T.N. (eds.): *Advances in Downy Mildew Research*, Vol. 3. Proceedings of The 2nd International Downy Mildews Symposium. UP in Olomouc and JOLA, Kostelec na Hane, Czech Republic, 121-134.
- Hall, G. (1989): Unusual or interesting records of plant pathogenic Oomycetes. *Plant Pathology*, 38: 604-611.
- Hammerschmidt, R. (1999): Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 77-84.
- Hardham, A.R. (2007): Cell biology of plant-oomycete interactions. *Cellular Microbiology*, 9(1): 31-39.
- Herbette, S., Lenne, C., de Labrouhe, D.T., Drevet, J.R., Roeckel-Drevet, P. (2003): Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. *Physiologia Plantarum*, 119(3):418-428.

- Hutcheson, S.W. (1998): Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36: 59-90.
- Hudspeth, D.S.S., Stenger, D., Hudspeth, M.E.S (2000): A *cox2* phylogenetic hypothesis for the downy mildews and white rusts. *Fungal Diversity*, 13: 47-57.
- Jobic, C., Boisson, A.M., Gout, E., Rasclé, C., Fevre, M., Cotton, P., Bligny, R. (2007): Metabolic processes and carbon nutrient exchanges between host and pathogen sustain the disease development during sunflower infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Planta*, 226(1): 251-265.
- Kalina, T., Váňa, J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova, Praha, 606 p.
- Körösi, K., Virányi, F. (2009): Induction of defense-related genes in downy-mildew infected sunflower plants treated with resistance inducer. In: Feldmann, F., Alford, D.V., Furk, C. (eds.): *Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors: Current Potential and Future Demands. Proceedings of the 3rd International Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe*, Julius Kühn-Institut, Berlin-Dahlem, Germany, 14-16 May 2009, 465-472.
- Krischik, V.A., Goth, R.W., Barbosa, P. (1991): Generalized plant defence: effect on multiple species. *Oecologia* 85:562-571
- Kirschner, J., Šída, O. (2004): *Helianthus* L. – slunečnice. In: Slavík, B., Štěpánková, J. (eds.): *Květena České Republiky 6*. Academia, Praha, 322-331.
- Kudlíková, I., Veverka, K. (1999): Výsledky šlechtění slunečnice na odolnost vůči chorobám. In: *Nové poznatky o vztahu hostitel – patogen*, 4.11. 1999, Česká fytopatologická společnost, Praha, (Sborník referátů), 37-41.
- Lebeda, A., Mazáková, J., Táborský, V. (2006): Protozoa a Chromista: taxonomie, biologie a hospodářský význam. Česká fytopatologická společnost, Praha, 92 p.
- Lebeda, A., Sedlářová, M., Petřivalský, M., Prokopová, J. (2008): Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: a case study of *Lactuca* ssp. and *Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology*, 122: 71-89.
- López, M.A., Bannenberg, G., Castresana, C. (2008): Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 420-427.
- Mandal, K., Saravanan, R., Maiti, S., Kothari, I.L. (2009): Effect of downy mildew disease on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Plantago ovata* Forsk. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116(4): 164-168.
- Mauch-Mani, B., Métraux, J.P. (1998): Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, 82:535-540.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000): Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345): 659-668.

- Mendgen, K., Hahn, M. (2002): Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*, 7(8):352-6.
- Mellersh, D.G., Heath, M.C. (2001): Plasma membrane cell – wall adhesion is required for expression of plant defence response during fungal penetration. *The Plant Cell*, 13: 413-424.
- Métraux, J.P. (2001): Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 13-18.
- Métraux, J.P., Nawrah, C., Genius, T. (2002): Systemic acquired resistance. *Euphytica*, 124: 237-243.
- Molinero-Ruiz, M.L., Melero-Vara, J.M., Gulya, T.J., Dominguez, J. (2003): First report to metalaxyl in downy mildew of sunflower caused by *Plasmopara halstedii* in Spain. *Plant Disease*, 87(6): 749-749.
- Moriondo M., Orlandini S., Giuntoli A., Bindi M. (2005): The effect of downy and powdery mildew on grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf gas exchange. *Journal of Phytopathology* 153: 350-357.
- O'Connell, R.J., Panstruga, R. (2006): Tête-a-tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytologist* 171: 699-718.
- Oxborough, K. (2004): Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1195-1205.
- Panstruga, R. (2003): Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*. 6(4): 320-326.
- Proels, R.K., Roitsch, T. (2009): Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany*, 60(6):1555-1567.
- Piterková, J., Luhová, L., Petřivalský, M. (2008): Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické listy*, 102: 410-416.
- Piterková, J., Petřivalský, M., Luhová, L., Mieslerová, B., Sedlářová, M., Lebeda, L. (2009): Local and systemic production of nitric oxide in tomato response to powdery mildew infection. *Molecular Plant Pathology*, 10(4): 501-513.
- Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P. (2005) Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy*, 99: 455-466.
- Prokopová, J., Mieslerová, B., Hlaváčková, V., Hlavinka, J., Lebeda, A., Nauš, J., Špundová, M. (2010): Changes in photosynthesis of *Lycopersicon* ssp. plants induced by tomato powdery mildew infection in combination with heat shock pre-treatment. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74 (3-4): 205-213.

- Prokopová, J., Špundová, M., Sedlářová, M., Husičková, A., Novotný, R., Doležal, K., Nauš, J., Lebeda, A. (2006): Photosynthetic response of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(8): 716-723.
- Rashid, K.Y. (1993): Incidence and virulence of *Plasmopara halstedii* on sunflower in western Canada during 1988-1991. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 15(3): 206-210.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., Jones, J.D.G. (2007): Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology*, 10:372–379.
- Rodríguez-Moreno, L., Pineda, M., Soukupová, J., Macho, A.P., Beuzón, C.R., Barón, M., Ramos, C. (2008): Early detection of bean infection by *Pseudomonas syringae* in asymptomatic leaf areas using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynthesis Research*, 96: 27-35.
- Roháček, K. (2002): Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*, 40(1): 13-29.
- Roitsch, T., Bittner, M., Godt, D.E. (1995): Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and glucose along and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology*, 108: 285-294.
- Roitsch, T. (1999): Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2(3): 198-206.
- Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R., Sinha, A.K. (2003): Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*, 54(382): 513-524.
- Scharte, J., Schön, H., Weis, E. (2005): Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant, Cell and Environment* (28): 1421–1435.
- Schwaintz, F. (1969): Vývoj kulturních rostlin. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 544 p.
- Sedlářová, M., Stojaspal, K., Lebeda, A. (2010): Rozšíření a patogenita *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnice, v České republice. *Rostlinolékař 1*: 17-20.
- Sedlár, J., Sedlářová, M., Flusser, J. (2009): Image processing methods for determination of downy mildews from light microscopy images. In: *Signal Processing Symposium*, 28.-30.5.2009, Warsaw, Poland, p. 4.
- Serrano, A.R., Castillo, J.L., Novo, J.J., Ocana, A.F., Rodríguez, M.V.G. (2007): Chitinase and peroxidase activities in sunflower hypocotyls: effects of BTH and inoculation with *Plasmopara halstedii*. *Biologia Plantarum*, 51(1):149-152.
- Spring, O., Benz, A., Causy, V. (1991). Impact of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) infection on development and metabolism of sunflower. *Journal of Plant Disease and Protection* 98, 597-604.
- Spring, O. (2001). Nonsystemic infection of sunflower with *Plasmopara halstedii* and their putative role in the distribution of the pathogen. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108, 329-336.

- Spring, O., Bachofer, M., Thines, M., Riethmüller, A., Göker, M., Oberwinkler, F. (2006): Intraspecific relationship of *Plasmopara halstedii* isolates differing in pathogenicity and geographic origin based on ITS sequence data, *European Journal of Plant Pathology*, 114:309–315.
- Špurný, M. (2005): Hybridy slunečnice *Rustica* úspěšné v boji proti plasmopaře. In: Řepka, mák, slunečnice a hořčice, 22.-23.2. 2005, Česká zemědělská společnost na ČZU v Praze a katedra rostlinné výroby, Praha, (Sborník referátů) 164-166.
- Sturm, A. (1999): Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology*, 121: 1-7.
- Šedivý, J., Chod, J., Kodys, F., Kůdela, V., Sychrová, E., Šebesta, J. (1977): Klíč k určování chorob a škůdců polních plodin. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 485 p.
- Šutić, D.D., Sinclair, J.B. (1991): *Anatomy and physiology of diseased plants*. RCR Press, Boca Raton, Florida, 232 p.
- Stojaspal, K. (2009): Studium interakcí slunečnice-*Plasmopara halstedii*. Diplomová práce, 58 p. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, vedoucí práce Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.
- Takemoto, D. (2003): GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular reorganization in response to infection of *Arabidopsis* by oomycete plants. *The Plant Journal* 33: 775-792.
- Tang, X., Rolfe, S.A., Scholes, J.D. (1996): The effect of *Albugo candida* (white blister rust) on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 19: 967-975.
- Trojanová, Z. (2008): Morfologické a anatomické změny rostlin vyvolané houbovými patogeny. Bakalářská práce, 62 p. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra zoologie, vedoucí práce Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.
- Vajna, L. (2002): Downy mildew epidemic on common ragweed in Hungary caused by *Plasmopara halstedii*. *New Disease Reports* 5: 16.
- Veverka, K., Křížková-Kudlíková, I. (2006): Problematika testování odolnosti hybridů slunečnice vůči houbovým chorobám na provokačním pozemku. In: XVII. česká a slovenská konference o ochraně rostlin, 12.-14. září 2006, ČZU Praha, (Sborník abstraktů), pp. 287-288
- Virányi, F. (1988): *Plasmopara halstedii*. In: Smith, I.M.; Dunez, J.; Phillips, D.H.; Lelliot, R.A.; Archer, S.A. (eds.): *European handbook of plant diseases*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. pp. 228-230.
- Virányi, F. (2002): The sunflower-*Plasmopara halstedii* pathosystem: natural and artificially induced coevolution. In: Spencer-Philips, P.T.N, Gisi, U., Lebeda, A., (eds.): *Advances in Downy Mildew Research*. Volume 1. Kluwer Academic Publisher, London, UK, p. 167-172.

Voglmayr, H. (2008): Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. *European Journal of Plant Pathology*. 122(1): 3-18.

Walters, D.R., Mc. Roberts, N. (2006): Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science*, 11(12):

Walters, D.R., McRoberts, N., Fitt, B.D.L., (2008): Are green islands red herrings? Significance of green islands in plant interactions with pathogens and pests. *Biological Review* 83: 79-102.

Wright, D.P., Baldwin, B.C., Shephard, M.C., Scholes J.D. (1995): Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildw. I. Alterations in carbohydrate metabolism. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47: 237-253.

Internetové zdroje:

CABI and EPPO. *Plasmopara halstedii*. Data Sheets on Quarantine Pests, 5 p.
[http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Plasmopara_halstedii/PLASHA_ds.pdf, přístup 18.7.2010]

Fracheboud, Y. Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. 17p.
[<http://www.ab.ipw.agrl.ethz.ch/~yfracheb/flex.htm>, přístup 26.7.2010]

Soukupová, J., Roháček, K. Fluorescence, fotosyntéza a stress: jak to spolu souvisí? 14 p.
[<http://www.archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/5soukupova.pdf>, přístup 26.7.2010]

Příloha 1. Srovnání F_v/F_m a steady state stavů Φ_{PSII} a NPQ u všech měřených sérií. Mock inokulace = simulovaná inokulace.

