

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium vlivu elicitorů na obrannou reakci u *Solanum*, spp.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Martina Železná
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Jana Piterková, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	7. 5. 2012

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne: 7. 5. 2012

Martina Železná

Ráda bych poděkovala paní Doc. RNDr. Lence Luhové, PhD. za odborné vedení, poskytnutí literárních podkladů a konzultací, cenné rady, trpělivost a pomoc při konečném zpracování mé bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala slečně Mgr. Janě Piterkové za všestrannou pomoc a ochotu při zpracování experimentální části a všem pracovníkům Katedry biochemie a Katedry botaniky za vstřícný přístup při experimentální práci.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Martina Železná
Název práce	Studium vlivu elicitorů na obrannou reakci u <i>Solanum</i> , spp.
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Jana Piterková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012

Abstrakt

Elicitory jsou látky vyvolávající u rostlin obrannou reakci. Mohou to být substance produkované přímo patogenem nebo vznikají v rostlině štěpením její buněčné stěny vlivem ataku enzymů patogenu. Aplikace elicitorů může vést ke zvýšené odolnosti rostlin vůči patogenům, tudíž by mohly být využity v praxi, a tím zvýšit výnosy v zemědělství. V této práci jsou shrnuty poznatky týkající se charakterizace, rozdělení a mechanismu působení elicitorů, proteinových elicitorů – elicitinů a konkrétních zástupců těchto kategorií kryptogeinu a oligandrinu.

V experimentální části byl studován vliv aplikace kryptogeinu, jeho mutantů a oligandrinu na indukci obranné reakce tří genotypů *Solanum* spp. s rozdílnou rezistencí (*S. lycopersicum* cv. Amateur – citlivý, *S. chmielewskii* – středně rezistentní, největší hypersenzitivní odpověď, *S. habrochaites* – vysoce rezistentní) vůči patogenu *Solanum* spp. *Oidium neolycopersici*. Byl testován vliv aplikace elicitinů na vývoj patogenu a rozvoj infekce u *Solanum* spp., na intenzitu buněčné smrti, aktivitu peroxidasy a intenzitu lipidické peroxidace

Klíčová slova	elicitor, elicitin, obranná reakce, kryptogein, oligandrin
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Martina Železná
Title	Studying of the influence of elicitors on defense response in <i>Solanum</i> , spp.
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Consultant	Mgr. Jana Piterková, Ph.D.
The year of presentation	2012

Abstract

Elicitors are substances that induce plant defense response. They could be produced by pathogen directly or they emerge by fission enzymes of plant cell walls in plant due to pathogen attack. Application of elicitors could lead to increases plant resistance to pathogens, and thus they could be used as a biocontrols, and thereby increase yields in agriculture. In this thesis are summarized the findings of characterization, classification and mechanism of action of elicitors, elicitors protein – elicitors and specific examples of these categories cryptogein and oligandrin.

In experimental part was studied the influence of cryptogein, its mutants and oligandrin application on the induction of defense reaction of three genotypes of *Solanum* spp. (*S. lycopersicum* cv. Amateur – sensitive, *S. chmielewskii* – medium resistant, the most hypersensitivity response, *S. habrochaites* – highly resistant) to the pathogen *Oidium neolycopersici*. Was tested the influence of elicitor application on development of the pathogen and infection growth in *Solanum* spp., on the intensity of cell death, peroxidase activity and lipid peroxidation intensity.

Keywords	elicitor, elicitor, defense response, kryptogein, oligandrin
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	8
I. TEORETICKÁ ČÁST	9
1. Rostliny a stres	10
1.1 Reakce na patogen	11
2. Elicitory	12
2.1 Základní charakterizace, definice	12
2.2 Rozdělení elicitorů	12
2.3 Mechanismus působení elicitorů v rostlinných buňkách	13
2.4 Praktické využití aplikace elicitorů	15
3. Elicitiny	16
3.1 Základní charakterizace, definice	16
3.2 Rozdělení elicitinů na základě primární struktury	16
3.3 Rozdělení elicitinů na základě hodnoty pI	18
3.3.1 Elicitiny – přenos sterolů a mastných kyselin	19
3.4 Mechanismus působení elicitinů	21
3.5 Rozdílná interakce <i>Phytophthora</i> a rostliny	22
3.6 Přehled známých – studovaných elicitinů	23
3.7 Charakterizace patogenů produkujících elicitiny	24
4. Kryptogein	26
4.1 Původ	26
4.2 Charakterizace	26
4.3 Mechanismus působení	27
4.4 Mutantní proteiny odvozené od kryptogeinu	28
5. Oligandrin	30
5.1 Původ	30
5.2 Charakterizace	31
5.3 Mechanismus působení	32
II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
1. Materiál a přístroje	35
1.1 Chemikálie	35
1.2 Přístroje a experimentální vybavení	35
1.3 Rostlinný materiál	36

1.4 Patogen	36
1.5 Příprava rostlinného materiálu	36
2. Metody	37
2.1 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení aktivity peroxidasy	37
2.2 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení intenzity lipidické peroxidace	37
2.3 Fytopatologické hodnocení vývoje patogenu <i>O. neolycopersici</i>	37
2.4 Stanovení intenzity buněčné smrti	37
2.5 Stanovení aktivity peroxidasy	37
2.6 Stanovení intenzity lipidické peroxidace	38
2.7 Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové	38
3. Výsledky a diskuse	38
3.1 Vliv aplikace elicitinů na vývoj patogenu a rozvoj infekce <i>O. neolycopersici</i> na <i>Solanum</i> spp.	38
3.2 Vliv aplikace elicitinů na intenzitu buněčné smrti, lipidické peroxidace a aktivitu peroxidasy	43
3.2.1 Vliv aplikace elicitinů na intenzitu buněčné smrti u genotypů <i>Solanum</i> spp.	43
3.2.2 Vliv aplikace elicitinů na aktivitu peroxidasy u genotypů <i>Solanum</i> spp.	45
3.2.3 Vliv aplikace elicitinů na intenzitu lipidické peroxidace u genotypů <i>Solanum</i> spp.	46
4. Závěr	47
Literatura	48
Seznam použitých zkratk	53

CÍLE PRÁCE

I. Teoretická část

Vypracování literární rešerše zaměřené na charakterizaci elicitorů podílejících se na iniciaci obranné reakce při napadení rostliny patogenem, tzn. shrnutí poznatků týkajících se základní charakteristiky, rozdělení, mechanismu působení apod.:

- a) elicitorů,
- b) elicitinů,
- c) kryptogeinu,
- d) oligandrinu.

II. Experimentální část

Porovnání vlivu aplikace vybraných elicitinů na obrannou reakci tří genotypů *Solanum* spp. inokulovaných biotrofním patogenem *Oidium neolycopersici*. Stanovení

- a) intenzity buněčné smrti,
- b) aktivity peroxidasy,
- c) intenzity lipidické peroxidace,
- d) schopnosti vývoje patogenu.

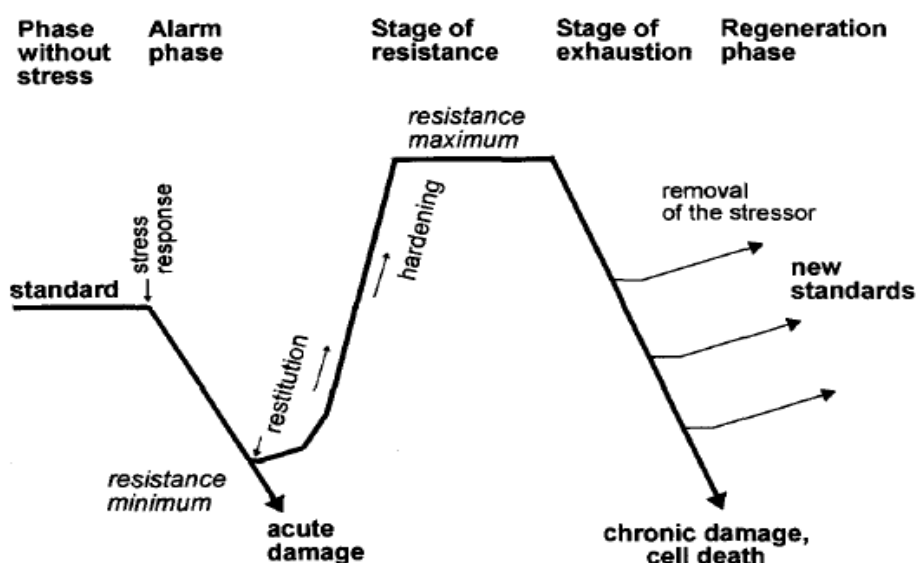
I. Teoretická část

1. Rostliny a stres

Rostlinný stres je jakýkoliv nepříznivý stav nebo substance, která ovlivňuje nebo blokuje metabolismus rostliny, její růst nebo vývoj. Faktory indukující stres mohou být biotické (jedná se o působení živých organismů, jako jsou např. viry, bakterie a houby) nebo abiotické povahy (vliv faktorů jako je sucho, extrémní teploty, salinita a znečišťující látky např. těžké kovy). Dále s ohledem na činnost člověka se může jednat o přirozené faktory běžně se vyskytující v přírodě (např. dlouhé dešťové periody, vysoká teplota, patogenní organismy) nebo antropogenní faktory, které jsou ovlivněny působením lidí (např. herbicidy, pesticidy, kyselé deště).

Rovnováha mezi tolerancí a citlivostí určuje, zda má stresový faktor pozitivní či negativní účinek na daný rostlinný organismus. Limitujícím faktorem může být také doba působení daného stresoru (Kranter et al., 2010).

Před vystavením stresu jsou rostliny ve fyziologické rovnováze, kdy rostou v optimálních podmínkách. Stresory nebo kompletní stresové události, pak vedou ke třem fázím stresové reakce, případně později k fázi regenerace po odstranění působení stresorů, pokud poškození rostliny nebylo příliš velké (Obr. 1). Fáze odezvy (alarmující fáze) je na počátku vystavení rostliny působení stresového faktoru. Dochází k odchýlení od normálního stavu rostliny a může být zaznamenán pokles vitality. Následuje fáze náhrady (fáze rezistence), kdy je rostlina stále vystavena působení stresu. V této fázi probíhá adaptace na stresové podmínky spojená s opravnými procesy. Třetí je koncová fáze (fáze vyčerpání). Při velkém stresu nebo dlouhodobém působení stresových faktorů může dojít vlivem přetížení adaptační kapacity rostliny k chronickému onemocnění či smrti. Čtvrtou finální fází je regenerační fáze, ke které dochází po odstranění působení stresových faktorů. V případě že nedošlo k příliš velkému poškození rostliny, může nastat částečná nebo úplná regenerace fyziologických funkcí (Lichtenthaler, 1996).



Obr. 1

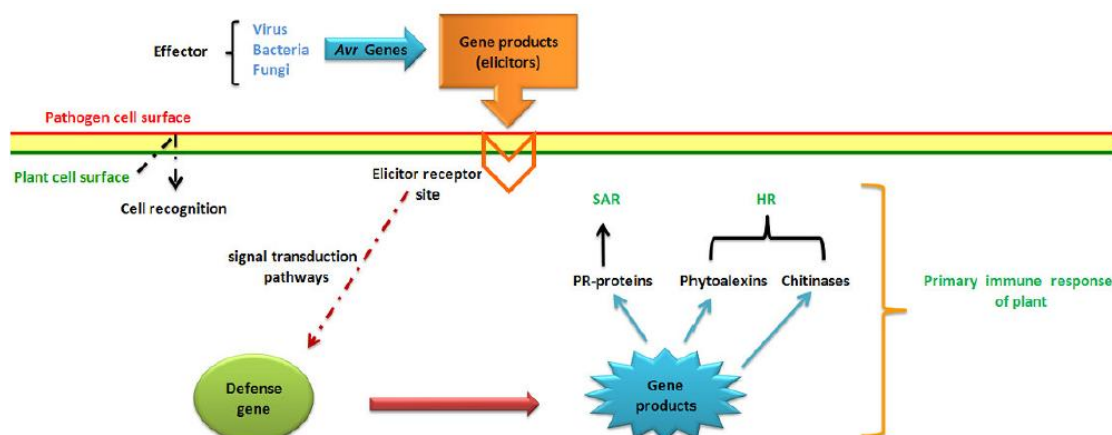
Fáze stresové reakce a odpovědi vyvolané u rostlin vlivem působení stresových faktorů (převzato z Lichtenthaler, 1996).

1.1 Reakce na patogen

Rostliny jsou složeny z imobilních buněk s pevnými buněčnými stěnami. Migrace specializovaných obranných buněk, jak je známo u živočichů, je tedy nemožná. Z tohoto důvodu se u rostlin vyvinuly specifické obranné mechanismy tak, že buňky získaly schopnost reagovat na pokus o infekci a případně aktivovat obrannou reakci.

Rostlinné reakce mohou být rozděleny do dvou kategorií. Nehostitelská rezistence (obecná, nespecifická či základní) je odpovědí na působení patogenu a vyskytuje se ve všech kultivarech hostitelských rostlin. Naproti tomu, hostitelsky-specifická rezistence (druhově-specifická) je charakteristická pro kombinaci určitého druhu patogenu a odrůdy hostitelské rostliny (Angelova et al., 2006).

Rezistence k patogenu často koreluje s hypersenzitivní reakcí, charakterizovanou buněčnou smrtí rostlinných buněk v místě infekce, která limituje rozvoj patogenu. V průběhu hypersenzitivní reakce je aktivováno mnoho obranných genů, včetně genů kódujících enzymy fenolické dráhy, genů s patogenezí souvisejících proteinů- tzv. pathogenesis related proteins – PR proteiny (např. glukonasy, chitinasy) a genů glykoproteinů bohatých na hydroxyprolin. V řadě interakcí rostlina-patogen rezistence vyžaduje přítomnost dvou genů: genu rostlinné rezistence (gen *R*) a odpovídajícího patogenního avirulentního genu (gen *Avr*). Specifické rozpoznání patogenu může být výsledkem interakce mezi produkty obou genů. Předpokládá se, že *R* produkty odpovídají receptorům *Avr*-kódovaným ligandům (Angelova et al., 2006). V případě, že rostlina disponuje genem rezistence (*R*) a patogen genem avirulence (*Avr*) jedná se o tzv., inkompatibilní reakci (Obr. 2) (Mejía-Teniente et al., 2010). Pokud naopak u patogenu nebo rostliny daný gen chybí, hovoříme o tzv. kompatibilní interakci (Buchanan et al, 2000). Po rozpoznávací fázi dochází k přenosu a zesílení signálu (např. fosforylace proteinů, změny v toku iontů přes membránu, produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku a transkripční aktivace rostlinných obranných genů (Angelova et al., 2006).



Obr. 2

Primární imunitní odpověď rostliny na rostlina-patogen interakci (převzato z Mejija-Teniente et al., 2010).

2. Elicitory

2.1 Základní charakterizace, definice

Elicitory lze obecně definovat jako látky stimulující u rostlin obrannou reakci. Původně byl termín elicitor používán pro molekuly, které mohou vyvolat tvorbu fytoalexinů, ale dnes se běžně používá pro látky aktivující jakýkoli druh rostlinné obrany (Angelova et al., 2006).

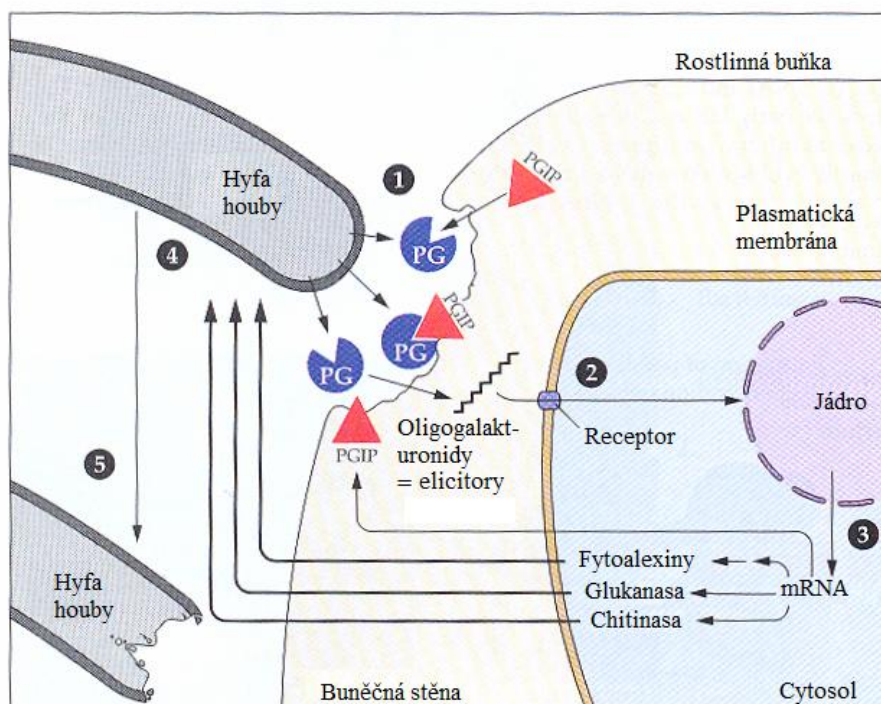
2.2 Rozdělení elicitorů

Elicitory mohou být buď patogenního, nebo hostitelského původu. Elicitory produkované a uvolňované patogenem jsou nazývány exogenními. Mezi ně patří jak molekuly produkované patogenem, tak i nízkomolekulární látky vznikající při rozkladu buněčné stěny patogenu, např. glukany nebo chitinové fragmenty, které jsou uvolňovány působením rostlinných enzymů. Producentem elicitorů může být také rostlina, takové elicitory pak nazýváme endogenní. Vznikají při napadení patogenem, kdy dochází působením lytických enzymů ke štěpení rostlinné buněčné stěny na fragmenty (Obr. 3) (Akimoto et al. 1999; Angelova et al., 2006).

Chemická povaha elicitorů je velmi rozmanitá. Elicitory mohou být látky monomerního, oligomerního i polymerního charakteru. Může se jednat o polysacharidy, proteiny, polypeptidy, glykoproteiny, lipidy aj. (Ozeretskovskaya & Vasyukova, 2002; Radman et al., 2003).

Elicitory lze dále dělit na obecné a specifické. Mezi obecné elicitory patří např. fragmenty buněčných stěn (glukany, oligomery chitinu) nebo nízkomolekulární látky (mastné kyseliny a steroly), které jsou typické pro řadu patogenů. Naopak v případě specifických

elicitorů se jedná o látky charakteristické pro daný typ patogenu (např. produkce elicitinů) (Slurascenko et al., 2001).



Obr. 3

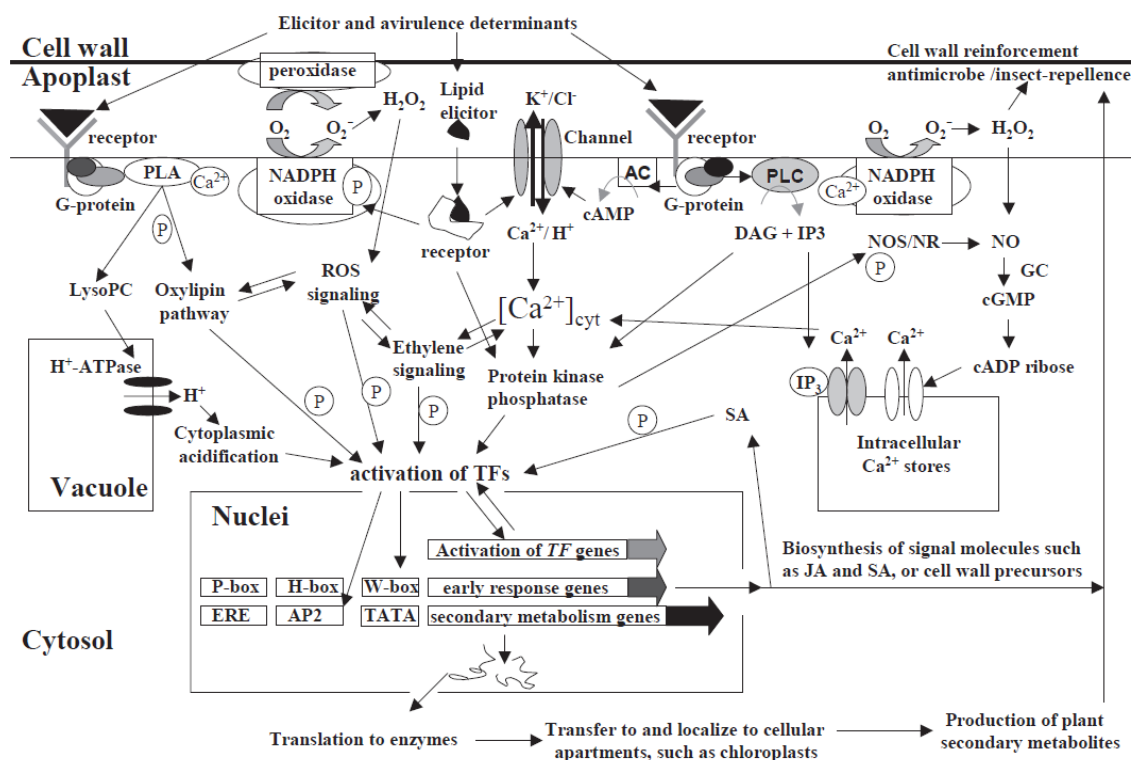
Endogenní elicitor interagující v PG-PGIP modelu. (1) Polygalakturonasy (PG) sekretované hyfou houby interagují s polygalakturonasa-inhibujícími proteiny (PGIP) přítomnými v buněčné stěně. (2) Polygalakturonasy uvolňují z rostlinné buněčné stěny různé oligogalakturonidy (endogenní elicitory), které interagují oligogalakturonidovým receptorem v rostlině. (3) Přenos oligogalakturonidového signálu ústí v expresi rostlinných obraných proteinů včetně polygalakturonasa-inhibujících proteinů. Chitinasy, glukanasy a fytoalexiny sekretované rostlinou vystavenou stresu (5) poškozují hyfu houby (převzato z Buchanan et al., 2000).

2.3 Mechanismus působení elicitorů v rostlinných buňkách

Obecný mechanismus biotické elicitace v rostlinách lze shrnout na základě elicitor-receptorové interakce. Rozpoznání elicitoru rostlinou je zprostředkováno specifickými receptory lokalizovanými v rostlinné buňce. Po navázání elicitoru na receptor dochází k přenosu signálu prostřednictvím např. G-proteinů, fosfatidylinositolového signálního systému, přes kaskádu MAPkinas apod. (Buchanan et al., 2000). Po vazbě elicitoru na receptor plasmatické membrány dochází tedy k řadě biochemických aktivit, jako jsou (Obr. 4) (Radman et al., 2003; Angelova et al., 2006):

- změna iontových toků (Cl^- , K^+ , Ca^{2+}), depolarizace plasmatické membrány

- zvýšená acidita buněk, rychlá alkalizace apoplastu nebo vnějšího media v případě experimentů s buněčnou suspenzí
- zvýšená aktivita rostlinných fosfolipas
- produkce sekundárních posílů, fosforylace proteinů, aktivace G-proteinů
- aktivace NADPH oxidasy odpovědné za produkci ROS
- zvýšená produkce ROS (superoxidový aniont a peroxid vodíku) může mít 1. přímý antimikrobiální účinek, 2. může přispět k tvorbě biologicky aktivních derivátů mastných kyselin, 3. H_2O_2 může působit jako sekundární posel a podílet se na transkripční aktivaci genů
- reorganizace cytoskeletu
- akumulace PR proteinů, jako jsou chitinasy, glukonasy, endopolygalaktouronasy, glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin, inhibitory proteasy aj.
- buněčná smrt v místě infekce (hypersenzitivní odpověď)
- strukturální změny buněčné stěny (lignifikace)
- transkripční aktivace odpovídajících obranných genů
- produkce obranných molekul fytoalexinů a taninů
- syntéza kyseliny jasmonové a salicylové



Obr. 4

Mechanismus působení elicitorů a spuštění obranné reakce v rostlinné buňce. Proteinové nebo sacharidové molekuly elicitorů jsou rozpoznávány specifickými receptory plasmatické

membrány. G-proteiny mohou být spojeny s receptory a zprostředkovávat elicitorem indukovanou aktivaci iontových kanálů. Iontové toky, především příliv Ca^{2+} , způsobují zvýšení volného cytosolárního Ca^{2+} , který způsobí aktivaci proteinkinas, peroxidas, NADPH oxidas a fosfolipas, které dále vytvářejí další sekundární posly jako ROS, DAG, IP3, cAMP, lysoPC, JA, ethylen, NO, cADP ribosu a SA. Všichni tyto poslové spojují paralelní nebo síť tvořící dráhy k začlenění těchto signálů do regulace transkripčních faktorů (TF). Různé transkripční faktory integrují tyto signalizace k aktivaci genové exprese transkripčním aparátem. Fenylypropanoidová cesta je jednou z dříve indukovaných drah ke zpevnění buněčné stěny. Mnoho genů pro syntézu sekundárních metabolitů je pozdější genovou odezvou. P v kroužku ukazuje regulaci závislou na fosforylaci a defosforylaci proteinů, zatímco Ca v kroužku znázorňuje regulaci závislou na Ca^{2+} . Lipidový elicitor jako je syringolid nebo cerebrosid mohou být vnímány receptory v cytoplasmě. Lipidové elicitory také vyvolávají signalizaci Ca^{2+} , oxidativní vzplanutí a eventuálně mohou stimulovat hromadění sekundárních metabolitů.

NOS: syntasa oxisu dusnatého, NR: nitrátreduktasa, AC: AMP cyklasa, GC: GMP cyklasa. (převzato z Zhao et al., 2005)

2.4 Praktické využití aplikace elicitorů

Ochrana rostlin aplikací chemických látek, jako jsou pesticidy, má svá rizika (může se jednat o mutageny, karcinogeny aj.). Z tohoto důvodu jsou intenzivně studovány alternativní cesty ochrany rostlin proti působení patogenů. Výsledky získané při studiu vlivu elicitorů poukazují na jejich možné praktické využití. V různých kulturách rostlinných buněk bylo prokázáno po aplikaci elicitorů zvýšení produkce isoflavonoidů, sesquiterpenoidů, fytoalexinů, kumarinu a zvýšená aktivita např. glutathion S-transferasy, fenylyalaninamoniaklyasy a dalších enzymů vedoucí ke zvýšené odolnosti proti patogenům (Radman et al., 2003).

Metoda elicitorem vyvolané rezistence k rostlinným onemocněním je charakterizována řadou podstatných výhod jako jsou: 1. ekologická bezpečnost, protože metoda je založena spíše na indukci nativního imunitního potenciálu hostitelské rostliny než na potlačení fytopatogenu; 2. systémový a déle trvající obranný efekt; 3. zapojení více obranných systémů k vyvolání rezistence, které činí přizpůsobení patogenů k chráněným rostlinám téměř nemožným; 4. indukce nespecifické rezistence k mnoha houbám, bakteriím, virům, nematodám atd. (Ozeretskovskaya & Vasyukova, 2002; Mejía-Teniente et al. 2010; Yin et al. 2010).

3. Elicitiny

3.1 Základní charakterizace, definice

Elicitory proteinové povahy jsou tzv. elicitiny. Jedná se o rodinu malých strukturně příbuzných proteinů sekretovaných fytopatogenními houbami rodu *Phytophthora* a *Pythium*, které vyvolávají hypersenzitivní reakci u specifických druhů rostlin např. u rostlin z rodu *Solanaceae* a *Cruciferae* (Kamoun et al., 1997).

Podobně jako jiné typy elicitorů i elicitiny mají schopnost vyvolat v hostitelské rostlině hypersenzitivní reakci, která zahrnuje expresi s patogenezi souvisejících proteinů, akumulaci fytoalexinů a nekrózu buněk. Působení elicitinů může vést ke vzniku systematické rezistence proti celé řadě mikrobiálních patogenů (Plešková et al., 2011).

Účinnost elicitinů závisí i na typu hostitelské rostliny. Např. v případě elicitinů z *Phytophthora* bylo prokázáno, že pro uskutečnění vazby na receptor je v případě rajčete jako hostitelské rostliny zapotřebí větší koncentrace než při aplikaci elicitinu na tabák. V tomto případě bylo prokázáno, že velké množství molekul elicitinu je zachyceno v buněčné stěně rajčete. Tudíž se dá říci, že buněčná stěna rajčete funguje jako filtr (Picard et al., 2000).

3.2 Rozdělení elicitinů na základě primární struktury

Elicitiny jsou obvykle tvořeny z 98 aminokyselin a mají molekulovou hmotnost cca 10 kDa. Jedná se o globulární proteiny tvořené z pěti α -helixů, jednoho antiparalelního β -skládaného listu a jedinečného ω -ohybu, s hydrofobní dutinou nacházející se v jádře proteinu tvořenou konzervativními aminokyselinovými zbytky (Met, Leu, Ile, Phe, Val, Tyr) a spojenou s povrchem proteinu tunelem. Dutina má schopnost vázat steroly a mastné kyseliny, a tak umožňovat jejich přenos.

Zastoupení jednotlivých aminokyselin v elicitinech není rovnoměrné (Obr. 5). Zcela chybí tryptofan, histidin a arginin. Serin a treonin tvoří 30% proteinu, alanin více než 10% a leucin 10%. Pro elicitiny je charakteristický výskyt šesti cysteinových zbytků umožňujících tvorbu tří disulfidových můstků zpevňujících strukturu elicitinů. Díky nedostatku tryptofanu tvoří elicitiny typická tyrosinová UV spektra, čímž je lze dobře rozeznat od jiných bílkovin (Ponchet et al., 1999).

	10	20	30	40	50
Cac	ATCTSSQQT	AYVALVSI	ILS DTSFNQC	STD SGYSMLT	ATS LPTTAQY
Cap	ATCTTTQQT	AYVALVSI	ILS DSSFNQCAT	D SGYSMLT	ATA LPTTAQY
Par	TTCTTTQQT	AYVALVSI	ILS DTSFNQC	STD SGYSMLT	ATS LPTTEQY
Mgm α	TTCTSTQQT	AYVTLVSI	ILS DSSFNQCAT	D SGYSMLT	ATA LPTTAQY
Dre α	TTCTSTQQT	AYVTLVSI	ILS DSSFNQCAT	D SGYSMLT	ATA LPTDAQY
Inf	TTCTTSQQT	AYVALVSI	ILS DTSFNQC	STD SGYSMLT	ATS LPTTEQY
Dre β	TACTSTQQT	AYTTLVSI	ILS DSSFNKCAS	D SGYSMLT	AKA LPTTAQY
Mgm β	TACTTTQQT	AYKTLVSI	ILS ESSFNQCSK	D SGYSMLT	ATA LPTNAQY
Cin	TACTATQQT	AYKTLVSI	ILS ESSFSQCSK	D SGYSMLT	ATA LPTNAQY
Cry	TACTATQQT	AYKTLVSI	ILS DASEFNQC	STD SGYSMLT	AKA LPTTAQY
	*+CT: *QQT*	AY++LVSILS	*+SF**C+*D	SGYSMLTA**	LPT**QY*LM
	60	70	80	90	100
Cac	CGSTACKTMI	NKIVSLNPPN	CELTVPPTSGL	VLNVVSYANG	FSTTCSSL
Cap	CASTACNTMI	TKIVSLNPPD	CELTVPPTSGL	VLNVVSYANG	FSATCASL
Par	CASTACKTMI	NKIVTLNPPD	CELTVPPTSGL	VLNVFTYANG	FSSTCASL
Mgm α	CASTACNTMI	NKIVTLNPPD	CELTVPPTSGL	VLNVVSYANG	FSATCASL
Dre α	CSSTACNTMI	KKIVSLNAPN	CDLTVPTSGL	VLNVYEYANG	FSTKCASL
Inf	CASTACKTMI	NKIVSLNAPD	CELTVPPTSGL	VLNVVSYANG	FSSKCASL
Dre β	CASTACNTMI	KKIVSLNPPN	CDLTVPTSGL	VLNVYEYANG	FSTKCASL
Mgm β	CASTACKSMI	NKIVVLNPPD	CDLTVPTSGL	VLNVVSYANG	FSTKCASL
Cin	CASTACNTMI	KKIVLNPPD	CDLTVPTSGL	VLNVVSYANG	FSSTCASL
Cry	CASTACNTMI	KKIVTLNPPN	CDLTVPTSGL	VLNVVSYANG	FSNKCSSL
	C*STAC+*MI	+KIV+LN*P+	C+LTVPTSGL	VL*V**YANG	FS: :C*SL

Obr. 5

Aminokyselinová sekvence některých elicitinu (α - kyselá, nad čarou; β - bazické, pod čarou)
 Symboly: Cac – cactorein z *P. catorum*, Cap – kapsicein z *P. capsici*; Par – parasitein z *P. parasitica*; Mgm α a Mgm β – megaspermin z *P. megasperma*; Dre α a Dre β – dreschlerin z *P. derschleri*; Inf – infestin z *P. infestans*; Cry – kryptogein z *P. cryptogea*; Cin – cinnamomin z *P. cinnamomi*. Souhrn (poslední řádek): tečka (.) výskyt $\geq 20\%$; dvojtečka (:) výskyt $\geq 0\%$; plus (+) výskyt $\geq 60\%$; hvězdička (*) výskyt $\geq 80\%$; symbol aminokyseliny je zachován. Aminokyseliny lemující dutinu kryptogeinu jsou označeny šedě. Tyto aminokyseliny jsou zachovány u všech elicitinů (převzato z Lascombe et al. 2002).

Všechny známé elicitiny sdílí zachovanou elicitinovou doménu a jsou rozděleny do pěti tříd dle jejich primární struktury (Tab. 1):

Třída I obsahuje elicitiny o molekulové hmotnosti 10 kDa. Elicitiny se dále dělí do třídy I α , tj. kyselá elicitiny, a třídy I β , tj. bazické elicitiny. Tyto elicitiny obsahují vždy 6 cysteinů, 3 methioniny, 2 fenylalaniny a 3 glyciny. Pozice pro leucin, isoleucin, prolin a threonin jsou vždy vysoce nebo striktně konzervované.

Do třídy I' se řadí většina elicitinů druhu *Pythium*. Tento typ elicitinů se mírně liší od elicitinů třídy I. Počet aminokyselin je flexibilní 98-101. Histidinový zbytek se může nacházet v poloze 99-101.

Třída II obsahuje tzv. hyperkyselé elicitory (HAE), které vlastní krátký hydrofilní C-konec. Tento typ elicitinů je tvořen 103-104 aminokyselinami.

Do třídy III se řadí elicitory např. z *P. infestans*. Tyto malé proteiny jsou složeny ze 165-170 aminokyselin, které obsahují 98 aminokyselinovou sekvenci charakteristickou pro elicitory a 70 aminokyselin dlouhou C-koncovou O-glykosylovanou doménu, kde serin, threonin a alanin tvoří 75% zastoupení (Ponchet et al., 1999; Kawamura et al., 2009).

Tab. 1

Strukturální charakteristika pěti elicitinových tříd (převzato z Ponchet et al., 1999).

Třída	Rozsah pI	Domény	Elicitiny
I α	4-5	myristyl helix-smyčka-helix	cactorein, cinnamomin, kryptogein, citrophthorin, INF1, megaspermin, parasiticein
I β	7,5-8,5	Proteinkinasa C fosfo-místo myristyl helix-smyčka-helix	kryptogein, dreschlerin, megaspermin
I'	4,6	N-glykosylace myristyl helix-smyčka-helix	oedochilin
II	3,5	kaseinkinasa fosfo-místo myristyl helix-smyčka-helix	cinnamomin-ha1, cinnamomin-ha2, kryptogein- ha1, kryptogein-ha2
III	3,5-4,0	N-glykosylace cAMP fosfo-místo Proteinkinasa C fosfo-místo kaseinkinasa fosfo-místo leucinový zip myristyl helix-smyčka-helix	infestin 2A, infestin 2B

3.3 Rozdělení elicitinů na základě hodnoty pI

Na základě hodnoty pI jsou elicitory klasifikovány buď jako kyselé α -elicitory (pI < 5) nebo bazické β -elicitory (pI > 7,5). α - a β -elicitory mohou být produkovány ve stejných druzích *Phytophthora*, ale zatímco α -elicitory jsou produkovány vždy, β -elicitory se vylučují jen u některých druhů (Ponchet et al. 1999).

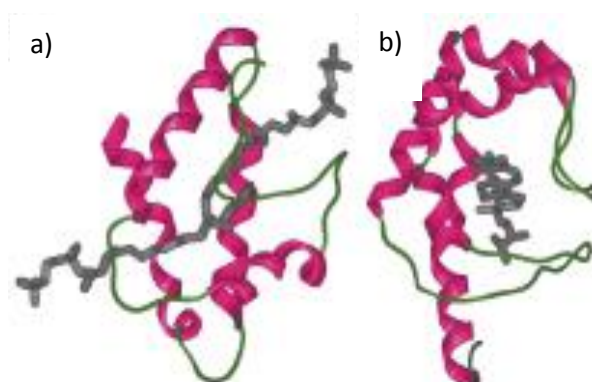
α - a β -elicitory vykazují různé úrovně nekrotické aktivity (tzn. β -elicitory vykazují větší nekrotizující aktivitu). Nekrotická aktivita může být v přímém vztahu k sekvencím elicitinů. Významnou roli má aminokyselinový zbytek na pozici 13. Lys v poloze 13 je klíčovým

determinantem nekrotické aktivity bazických elicitinů, zatímco kyselé elicitiny obsahují na této pozici hydrofobní valin. Kladný náboj je významný pro správné umístění během navázání lipidu, ale nemá vliv na vazbu sterolu do dutiny proteinu (Plešková et al., 2011). Evidentní rozdíl mezi α - a β -elicitiny vychází z celkového náboje vzhledem k rozdílnému složení nabitých aminokyselin. Kladný náboj je poskytován 6 lysiny v β -elicitinech a pouze 2-4 v α -elicitinech. Naproti tomu počet negativních aminokyselin aspartátu a glutamátu byl téměř konstantní a nekoreluje tedy s výsledným nábojem (Ponchet et al., 1999).

3.3.1 Elicitiny - přenos sterolů a mastných kyselin

Lipidy plní mnoho různých klíčových funkcí v oblasti fyziologie rostlin. Příkladem je tvorba povrchové vrstvy (kutin a suberin) tvořené z hydrofobních polyesterů mastných kyselin, které chrání rostlinné orgány před biotickým a abiotickým stresem. Lipidy ve formě triacylglyceridů jsou zdrojem uhlíku a energie (zásobní orgány jako jsou semena a plody). Fosfolipidy a glykolipidy ve spojení s proteiny a steroly tvoří membrány a podílí se také na mnoha důležitých signálních a metabolických drahách. Všechny tyto funkce jsou silně regulovány pomocí přenosů lipidů v buňce, v různých vrstvách buněčné membrány a v extracelulárním prostředí. Lipidy jsou hydrofobní molekuly, proto musí být na delší vzdálenosti přenášeny pomocí rozpustných makromolekul (lipidy-vázající proteiny a lipoproteinové váčky).

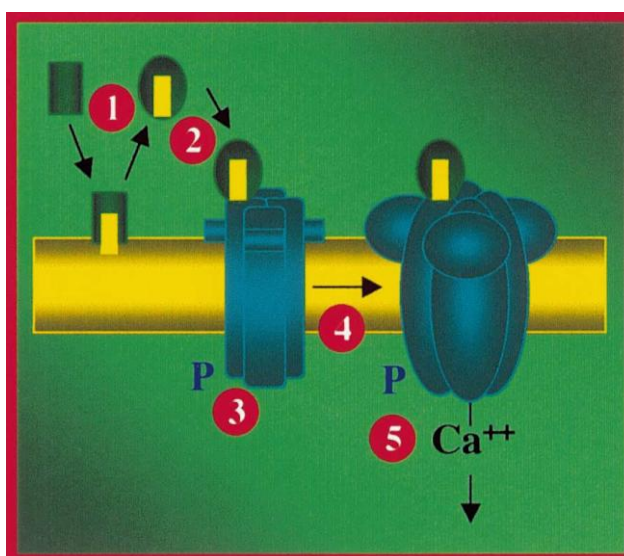
Elicitiny a proteiny přenášející lipidy (Obr. 6) jsou malé na cystein bohaté proteiny produkované oomycetami případně rostlinnými buňkami. Elicitiny pronikají lépe do vnější vrstvy membrány než lipidy-přenášející proteiny. Lipidy-přenášející protein se mohou chovat jako antagonisté elicitoru a tak potlačovat buněčnou odpověď na elicitin (Blein et al., 2002).



Obr. 6

3D struktury lipid-přenášejícího proteinu z pšenice s navázanými dvěma molekulami lyso-myristolyfosfatidylcholinu (a) a elicitinu kryptogeinu v komplexu a ergosterolem (b), kdy lipidy jsou zobrazeny šedě (Blein et al., 2002).

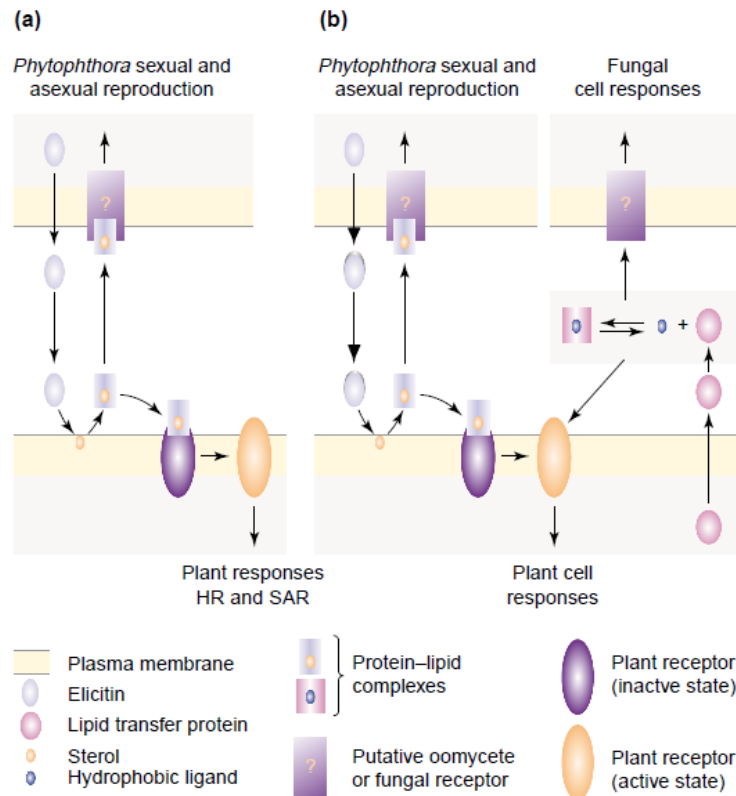
Pravděpodobně hlavní funkcí elicitinů ve vztahu k patogennímu organismu je přenos sterolů, protože *Phytophthora* a *Pythium* nesyntetizují steroly, které jsou nutné pro jejich reprodukci. Elicitiny mohou působit jako člunky vychytávající steroly rostlinné buňky, a následně spouštějí aktivní fázi pohlavního a nepohlavního rozmnožování patogenu. Tyto fyziologické a morfologické změny pravděpodobně potřebují komplexní signální systém zahrnující specifické receptory na povrchu oomycet. Schopnost elicitorů vázat steroly je zásadní, protože vznik sterol-elicitinového komplexu je vyžadován i ke spuštění biologických reakcí u tabákových buněk vyvolaných působením patogenem produkovaného elicitinu. Steroly z rostlinné plazmatické membrány umožňují po navázání elicitinu jeho interakci s receptorem a následnou aktivaci obranných mechanismů (Obr. 7) (Blein et al., 2002).



Obr. 7

Zahájení signalizace elicitinu. Elicitinový receptor, který se nachází na plazmatické membráně rostliny, se považuje za kanál vápníku. Skládá se ze čtyř bazálních podjednotek (160 kDa a 50 kDa proteinu) a každá z nich je schopná specificky vázat molekulu elicitinu. První interakce elicitinu a kanálu vyžaduje elicitin s navázaným sterolem pocházejícím z plazmatické membrány rostliny. Následně dochází ke spuštění konformační změny receptoru pro elicitin, pravděpodobně spojených s fosforylací podjednotky obsahující navázaný elicitin (převzato z Ponchet et al., 1999).

Elicitiny mají vyšší afinitu ke sterolům než k mastným kyselinám. Prokázaná dvojitá účast sterol-elicitinového komplexu v upozornění rostliny (avirulentní faktor) a rozvoje patogenu (virulentní faktor) dokonale ilustruje nejistou rovnováhu ustanovenou mezi patogenem a rostlinou. Slabý posun rovnováhy vede buď ke kompatibilní (choroba) nebo nekompatibilní interakci (Blein et al., 2002).

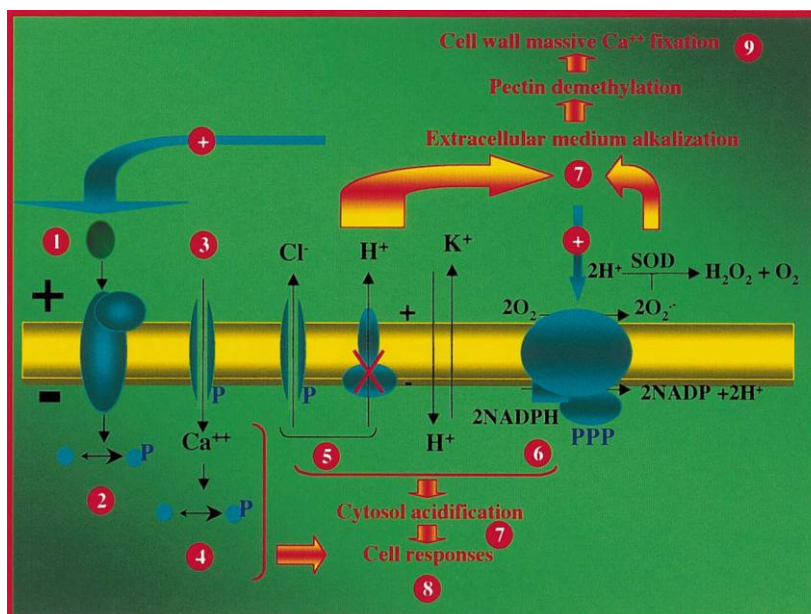


Obr. 8

Možné první reakce mezi rostlinou a oomycetou, rostlinou a houbou. První krok je tvorba komplexu lipid-protein. (a) Během interakce *Phytophthora* a rostliny funguje elicitin jako sterolový člunek. Elicitin-sterolový komplex je rozeznán oběma druhy buněk a pak spustí biologické reakce. (b) Zapojení elicitinů a lipidy-přenášejících proteinů (Blein et al., 2002).

3.4 Mechanismus působení elicitinů

Potřebná koncentrace elicitinů aktivující mechanismy spouštějící reakce rostliny na přítomnost patogenu je různá. V případě kryptogeinu je letální dávkou 100-200 nM koncentrace. Subletální koncentrace kryptogeinu v průběhu několika minut vyvolá významné změny v hostitelských buňkách, tj. vzrůst pH a vodivosti vně buňky, naopak acidifikace cytosolu, ovlivnění integrity cytoplazmatické membrány (Obr. 9). Tyto změny jsou doprovázeny produkcí ROS. V případě např. kapsiceinu je zapotřebí 10 násobně vyšší koncentrace v porovnání s kryptogeinem, aby došlo k indukci ROS na stejné úrovni (Ponchet, et al. 1999).

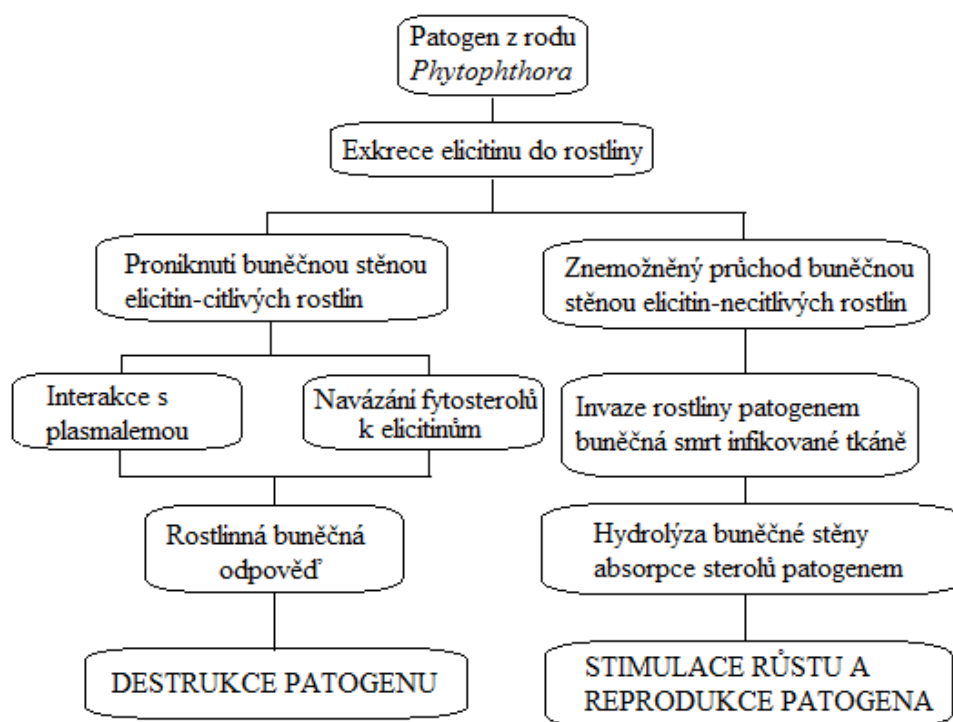


Obr. 9

Signalizační dráhy aktivované působením elicitinů. Elicitin, který představuje na obrázku zelená elipsa, interaguje s membránovým receptorem složeným ze dvou podjednotek proteinu - 160 kDa a 50kDa. Dochází k aktivaci kanálu pro vápník, chloridového kanálu, aktivaci NADPH oxidasy a inhibici H^+ ATPasy). Znaky + a - uvádějí transmembránový potenciál. Proces proteinové fosforylace je značeny modrým P. Oranžové šipky znázorňují systémy, které se podílí na změnách pH. Modré šipky ukazují pozitivní zpětnovazebné účinky stření extracelulární alkalizace a čísla 1-9 indikují události v jejich chronologickém pořadí (převzato z Ponchet et al., 1999).

3.5 Rozdílná interakce *Phytophthora* a rostliny

Existují dvě možné interakce mezi rostlinou a patogenem z rodu *Phytophthora*: elicitin-senzitivní a elicitin-nesenzitivní interakce. V prvním případě elicitin může interagovat s receptorem v plasmatické membráně. Tato interakce vede k aktivaci rostlinných buněčných reakcí (např. hypersenzitivní reakce) a následně k destrukci patogenu. U elicitin-nesenzitivních interakcí je elicitin např. neschopný projít buněčnými stěnami nebo rostlina nemá vhodný receptor, a proto nedochází k aktivaci obranných mechanismů rostlinné buňky. V takovém případě patogen může napadnout rostlinu, vyprovokovat hydrolýzu buněčné stěny zpřístupnit steroly elicitinům a umožnit rozvoj patogenu (Obr. 10) (Mikeš et al., 1998).



Obr. 10

Elicin-senzitivní (vlevo) a elicin-nesenzitivní (vpravo) reakce rostlina – *Phytophthora* (převzato z Mikeš et al., 1998)

3.6 Přehled známých – studovaných elicitinů

V Tabulce 2 jsou přehledně uvedeny příklady již studovaných a charakterizovaných elicitorů typu elicitinů.

Tab. 2

Přehled známých – studovaných elicitinu (Ponchet et al., 1999; Kawamura et al., 2009).

Elicitin	Zdroj	Hostitel
cinnamomin	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	dřeviny
citrophthorin	<i>Phytophthora citrophthora</i>	zlatý déšť
dreschlerin	<i>Phytophthora dreschleri</i>	okurky
infestatin	<i>Phytophthora infestans</i>	brambory, rajčata
kaktorein	<i>Phytophthora cactorum</i>	rododendron
kapsicein	<i>Phytophthora capsici</i>	papriky, ovoce
kryptogein	<i>Phytophthora cryptogea</i>	rajčata, tabák, zlatý déšť
megaspermin	<i>Phytophthora megasperma</i>	brambory, rajčata
oedoehilin	<i>Pythium oedoehilum</i>	rajčata
oligandrin, POD-1, POD-2, POS-1	<i>Pythium oligandrum</i>	cukrová řepa, rajčata, <i>Arabidopsis thaliana</i>
parasiticein	<i>Phytophthora parasitica</i>	tabák, rajčata, brambory, ananas
sojein	<i>Phytophthora sojae</i>	sója
vexiny Vex1, Vex2	<i>Pythium vexans</i>	orchideje

3.7 Charakterizace patogenů produkujících elicitinu

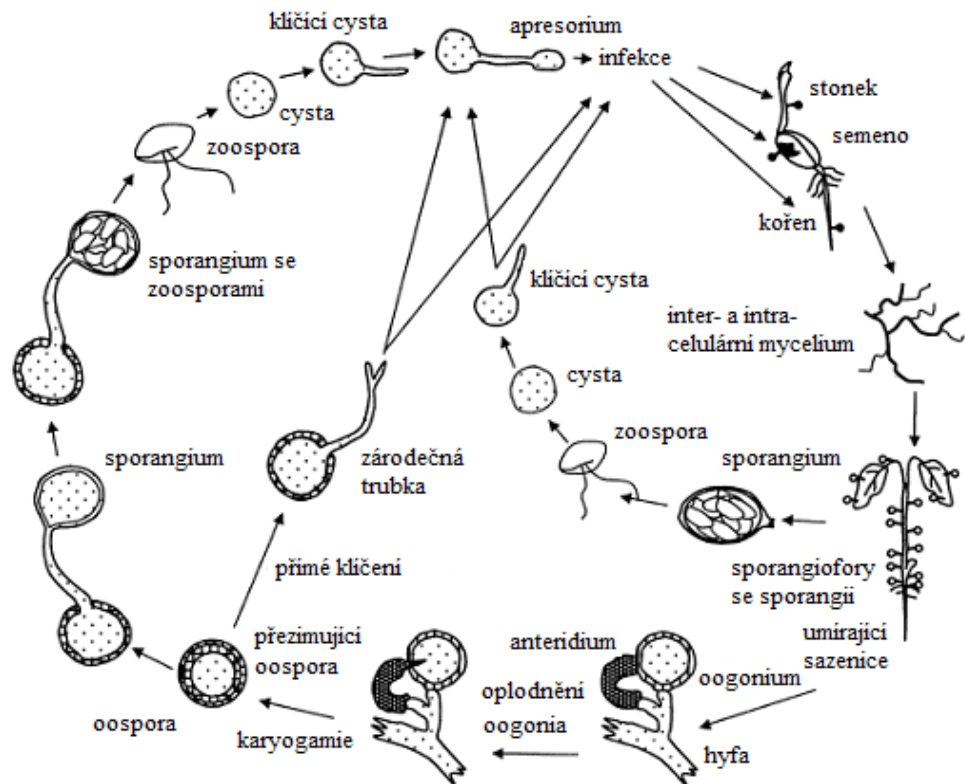
Rod *Phytophthora* a *Pythium*, produkující elicitiny, se řadí do řádu Pythiales spadající do oddělení Oomycety, též zvané řasovky či plísňě vaječné (Kalina & Váňa, 2005). Oomycety však již nejsou považovány za houby, ale byly fylogeneticky přiřazeny k heterokontním řasám (Ponchet et al., 1999).

Phytophthora je rod mikroskopických fytopatogenních oomycet, který nejčastěji parazituje na dvouděložných rostlinách a je relativně druhově specifický. Patří mezi nejvýznamnější parazity kulturních rostlin. Dnes je známo více než 40 druhů rodu *Phytophthora* (Krátká et al., 2001).

Patogeny rodu *Pythium* jsou parazité širokého spektra hostitelů a nejsou tak druhově specifické jako u rodu *Phytophthora*, hostiteli mohou být jak rostliny, tak i živočichové např. *Pythium insidiosum*. Studie rodu *Pythium* ukázala, že není pouze parazitem hospodářských plodin, ale u *Pythium oligandrum* též zvané „chytrá houba“ našlo své uplatnění i v medicíně, kde se používá např. k léčbě kožních onemocnění.

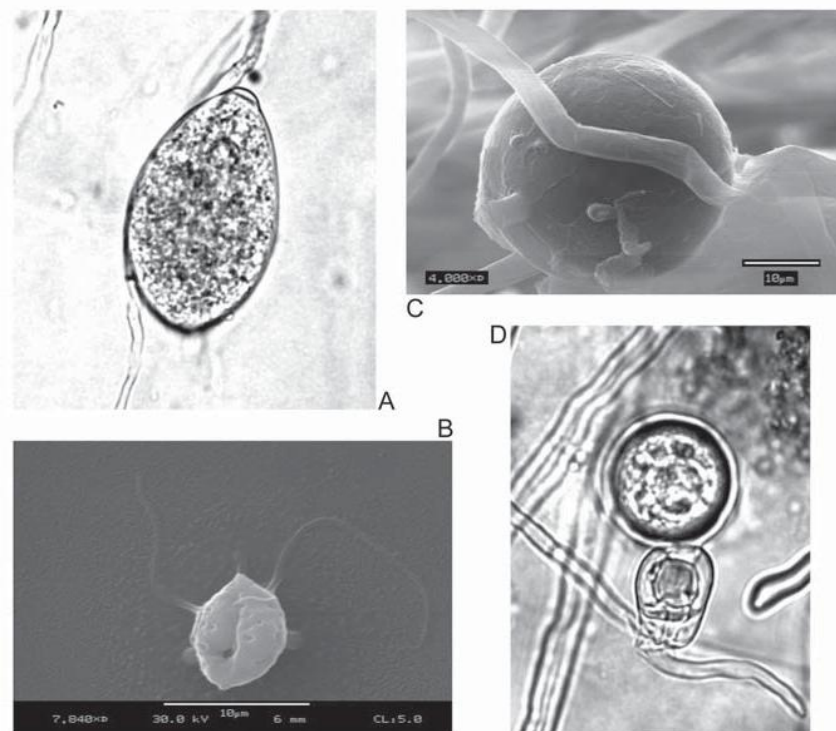
Patogeny obou rodů se vyznačují endobiotickou, intramatrikální a intracelulární stélkou, která může být redukována a měnit se ve sporangium, s jedním centrem či vláknitou formu. Hyfy převážně netvoří haustoria. Buněčná stěna je tvořena z 80-90% celulosou a vyplněna je β -1,3 a β -1,6-glukany. Zbytek tvoří látky, jako jsou bílkoviny, lipidy a anorganické látky. Buňka obsahuje velké množství malých jader, mitochondrie s trubicovitými přepážkami, diktyozomy a může obsahovat centrální vakuolu. Oomycety k heterokontním řasám přibližuje jejich zásobní látka mykolaminaran, což je β -1,3-glukan; syntéza lysinu a některých lipidů, absence acyklických alkoholů a metabolismus sterolů (Kalina & Váňa, 2005).

Tyto parazitující mikroorganismy patří mezi hemibiotrofní patogeny, u kterých po iniciační biotrofní fáze, následuje fáze nekrotrofní, tzn., že rostou a rozmnožují se na živém rostlinném pletivu a po odumření hostitelské rostliny čerpají živiny z mrtvých buněk (Krátká et al., 2001).



Obr. 11

Životní cyklus rodu *Pythium*, který se v hlavních bodech podobá i rodu *Phytophthora* (převzato z Van West et al., 2003)



Obr. 12

Formy *Phytophthora*: A) sporangium, B) zoospora, C) chlamydospora, D) Oospora (převzato z Nicholls, 2004)

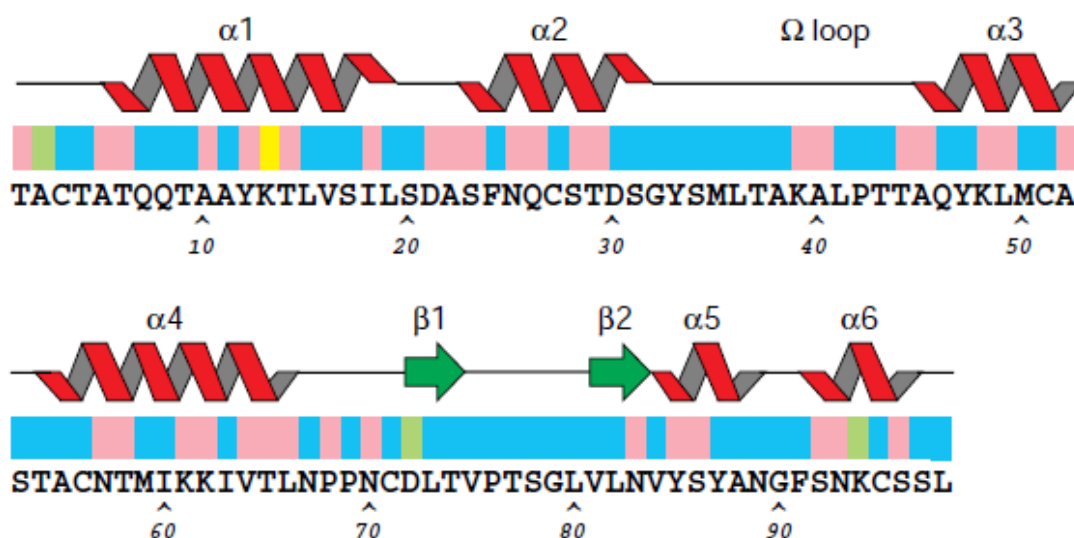
4. Kryptogein

4.1 Původ

Kryptogein je holoprotein, který je sekretován fytopatogenní houbou *Phytophthora cryptogea*. Indukuje hypersenzitivní odpověď a systematicky získanou rezistenci v rostlinách. (Lebrun-Garcia et al., 1999). Kryptogein je syntetizován v podhoubí jako pre-protein se signální peptidovou sekvencí, která je odstraněna před samotnou sekrecí do média bez jakýchkoliv post-translačních modifikací. Elicitiny poté vniknou kořenovým systémem do rostliny a migrují směrem k čepeli listu, kde elicitují nekrózu listů.

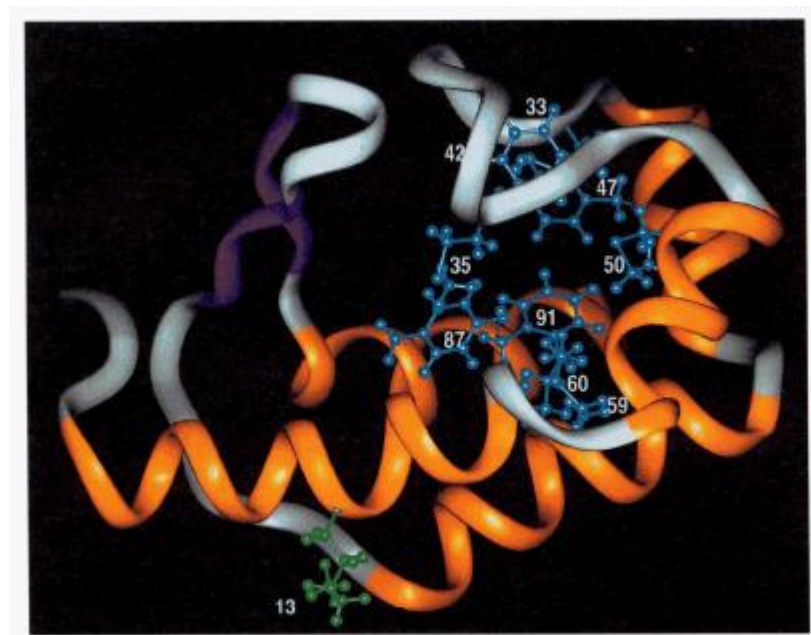
4.2 Charakterizace

Kryptogein je malý globulární protein s molekulovou hmotností 10 323 Da. Obsahuje 98 aminokyselin, patří mezi β -elicitiny a jeho izoelektrický bod je 8,5. Jeho třídimenzionální struktura ukazuje, že se skládá z pěti α -helixů, jednoho β skládaného listu a jedné ω -smyčky umístěné v unikátní proteinové dutině, do které se váží steroly jako je např. ergosterol (Obr. 13, 14) (Lebrun-Garcia et al., 1999). Terciální struktura je zpevněna 3 disulfidickými můstky (Cys3-Cys71, Cys27-Cys56, Cys51-Cys95) (Ponchet et al., 1999). Kryptogein nemá enzymovou aktivitu.



Obr 13

Sekundární struktura kryptogeinu. Barevné schéma je odvozeno z 12 sekvencí. Invariantní aminokyseliny jsou značeny modře a variabilní růžově. Dvě Invariantní aminokyseliny se nacházejí v ω -smyčce a antiparalelním dvouvláknovém β -listu (převzato z Boissy et al.).

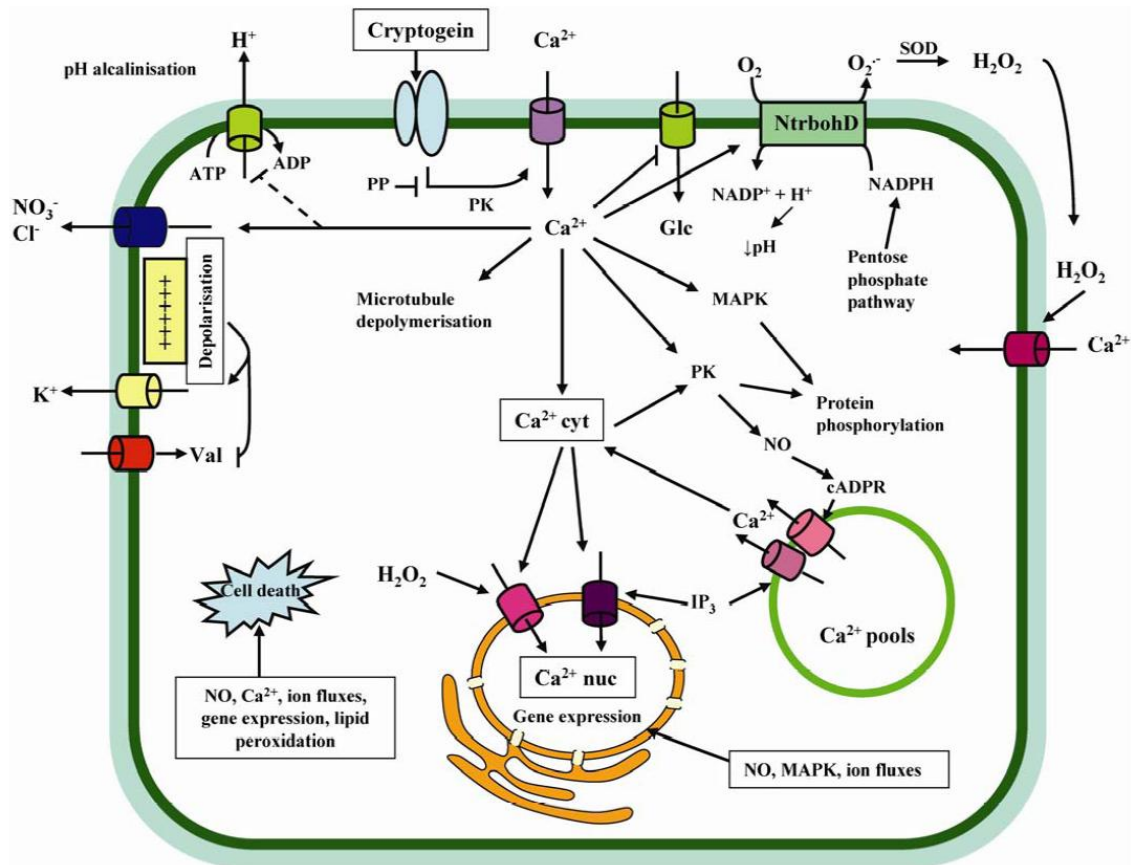


Obr. 14

Terciární struktura kryptogeinu. Postranní řetězce 33, 42, 47, 91, 60, 87 a Met 35, 50, 59 hydrofobního jádra jsou značeny modře (převzato Fefeu et al., 1997)

4.3 Mechanismus působení

Vytvoření komplexu elicitin-sterol je první krok před navázáním na receptor na plazmatické membráně rostlin. Způsob působení kryptogeinu byl studován použitím tabákových buněčných suspenzí. Rozpoznání elicitoru receptory plasmatické membrány vede ke kaskádě reakcí včetně fosforylace proteinů, vtékání Ca^{2+} , vytékání K^+ a Cl^- , depolarizaci plasmatické membrány, aktivaci NADPH oxidasy zodpovědné za produkci ROS, cytosolární acidifikaci, aktivaci pentosafosfátového cyklu a aktivaci dvou mitogen-aktivujících protein kinasových homologů (MAPK). Prvními kroky přenosu signálu je aktivace řady membránových proteinů s následnou tvorbou sítě sekundárních posílů, které spouští specifické fyziologické odpovědi (Obr. 15) (Lebrun-Garcia et al., 1999). Kryptogein vyvolává řadu metabolických změn, např. akumulace fytoalexinů, produkce ethylenu.

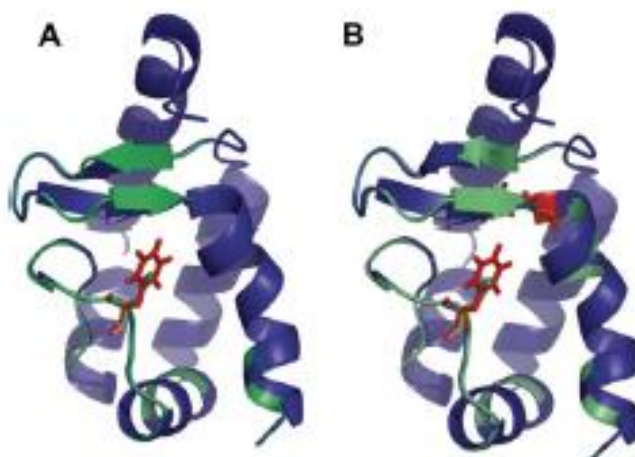


Obr. 15

Schéma kryptoginem vyvolaného přenosu signálu (převzato z Garcia-Brugger et al., 2006).

4.4 Mutantní proteiny odvozené od kryptogeinu

Na základě předchozích experimentů počítačového modelování a podle místa řízené mutagenese byla připravena řada mutantů kryptogeinu se změněnou schopností vázat steroly, fosfolipidy nebo obojí (Tab. 3, Obr. 16).



Obr. 16

Porovnání struktur „wild type“ kryptogeinu (zelený) a L41F mutantu (A, modrý) a L41F/V84F mutantu (B, modrý). Postranní řetězce mutovaných residuí jsou značeny červeně (převzato z Dokládál et al., 2012).

Protein X24 byl připraven heterologní expresí genu pro kryptogein v kvasince *Pichia pastoris*. X24 se od kryptogeinu izolovaného z *Phytophthora cryptogea* liší přítomností sekvence EAEA na N-konci molekuly. Tato sekvence má signální funkci a při sekreci proteinu nedošlo k jejímu odštěpení.

Mutantní protein L41F vznikl záměnou malého nepolárního leucinu v pozici 41 za objemnější hydrofobní aminokyselinu, fenylalanin. Tato mutace výrazně snižuje schopnost vázat mastné kyseliny, ale schopnost vazby sterolu se nemění.

U mutantu V84F byl v pozici 84 valin nahrazen objemnějším fenylalaninem. Tento protein má sníženou schopnost vázat steroly do hydrofobní dutiny kryptogeinu. Preferuje tedy vazbu mastné kyseliny před sterolem.

Mutant označovaný V84F/L41F byl vytvořen záměnou valinu v pozici 84 a leucinu v pozici 41 za objemnější fenylalaniny. Tento mutant je kombinací obou předchozích mutantů. A neměl by tedy vázat ani steroly, ani mastné kyseliny.

U L41F mutace bylo pozorováno jen mírné snížení rychlosti v přenosu sterolů a u V84F došlo ke snížení schopnosti vázání a přenosové rychlosti sterolů mezi membránami oproti divokému typu (WT), dvojitý mutant neměl téměř žádnou schopnost přenášet a vázat steroly.

Při převodu fosfolipidů mutant V84F a dvojitý mutant vykazovaly vyšší míru přenosu než kryptogein (WT). Vyšší míru výměny fosfolipidů v mutantech V84F lze vysvětlit tím, že mutace malého valinového residua za velký fenylalaninový zbytek může vést k uvolnění drážky v dutině, což usnadňuje vázání vysoce flexibilních řetězců mastných kyselin fosfolipidů (Dokládál et al., 2012).

Připravené mutanty se liší ve schopnosti stimulovat produkci ROS. V84F mutant sice není schopný vázat steroly, ale je skoro stejně efektivní jako kryptogein (WT) ve stimulaci produkce ROS. Zatímco produkce ROS stimulovaná L41F mutantem, který vykazuje nižší schopnost vázat fosfolipidy, byla poloviční než u kryptogein (WT). Dvojitý mutant L41F/V84F nestimuluje téměř žádnou syntézu ROS (Dokládál et al., 2012).

Se schopností stimulovat produkci ROS je spojena hypersenzitivní reakce a tvorba nektróz. L41F mutant a dvojitý mutant L41F/V84F nevyvolaly téměř žádné nekrotické symptomy a v případě mutantu V84F došlo k indukci nektróz v menším rozsahu než v případě působení kryptogeinu (WT).

Jak se dalo očekávat, u rostlin ošetřených L41F mutantem nebo L41F/V84F dvojitým mutantem nebyla vyvolána rezistence. Odolnost vyvolaná V84F mutantem byla srovnatelná s kryptogeinem (WT) (Dokládál et al., 2012).

Kapsidiol je terpenoidní sloučenina patřící mezi fytoalexiny, která se v rostlině akumuluje extracelulárně a byla izolována z mnoha druhů *Solanaceae*. Je to primární antimikrobiální látka tvořená během působení elicitorů (Maldonado-Bonilla et al., 2008). L41F mutant a L41F/V84F dvojitý mutant vykazují velmi nízkou schopnost produkce kapsidiolu, která dobře koreluje s pozorovaným sníženým hromaděním ROS a nekrotickými účinky (Dokládál et al., 2012).

Tab. 3

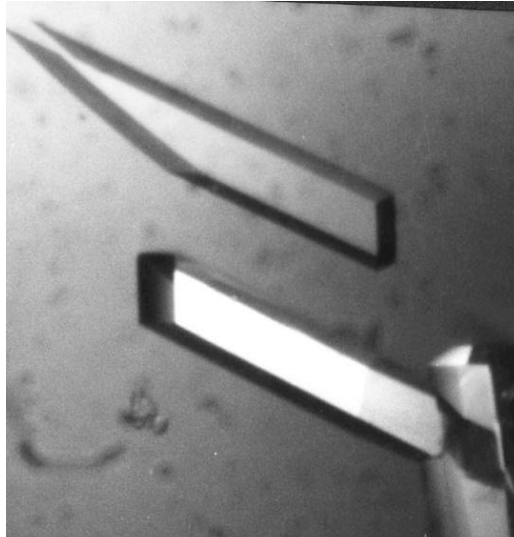
Přehled vlastností vybraných mutantů v porovnání s kryptogeinem (WT) (Dokládál et al., 2012).

Mutace	Přenos sterolů	Přenos fosfolipidů	Vázání k PM	Syntéza ROS	Akumulace kapsidiolu	% společných vlastností s WT	Indukce rezistence
WT	+++	+++	+++	+++	+++	100	+++
V84F	+	+++	+++	+++	++	65	+++
L41F	+++	++	+	+	-	31	+
L41F/V84F	+	+++	+	-	-	19	-

5. Oligandrin

5.1 Původ

Pythium oligandrum produkuje čtyři elicitory bílkovinné povahy POD-1, POD-2, POS-1, které jsou proteiny buněčné stěny a extracelulární elicitin oligandrin. Tato oomyceta mají řadu vlastností, které lze využít v procesu biokontroly včetně agresivního mykoparazitismu proti mnoha houbovým a k oomycetám patřícím rostlinným patogenům, jako je produkce antibiotik a konkurenceschopnost v kolonizaci rhizosféry. Izoláty *P. Oligandrum* byly rozděleny do dvou skupin: D-typu a S-typu. D-typ izoláty mají dva hlavní proteiny POD-1 a POD-2, zatímco izoláty S-typu mají pouze jeden hlavní protein POS-1, který je podobný POD-1 velikostí molekuly a má stejnou sekvenci prvních 20 aminokyselin. Sekvence aminokyselin POD-1 a POD-2 jsou z 82,9% identické, a POD-1 a oligandrinu jsou z 51,6% identické. Z fylogenetického hlediska jsou oligandrin, POD-1 a POD-2 odlišné od dříve definovaných elicitinů, nicméně oligandrin je strukturálně podobný elicitinové třídě I a POD-1 a POD-2 jsou strukturálně podobné elicitinové třídě II (Masunaka et al., 2010).



Obr. 17

Krystal oligandrinu (převzato z Lascombe et al., 2000).

5.2 Charakterizace

Oligandrin , je malý protein složený ze 100 aminokyselin. Má charakteristickou N-koncovou sekvenci. Na základě izoelektrického bodu pI-4,5 řadíme oligandrin mezi α -elicitiny. Oligandrin má charakteristické ultrafialové spektrum a typický migrační profil (jž po třech hodinách byl zjištěn oligandrin i v jiných částech rostliny než v místě aplikace) (Picard et al. 2000).

Sekvence aminokyselin oligandrinu vykazovala vysokou podobnost s třinácti elicitiny vylučovanými *Phytophthora* spp. a *Pythium* spp. Procento shody bylo téměř 50% včetně identických a silně podobných reziduí. Threonin a serin představovali přibližně 30% z aminokyselin, zatímco tryptofan, histidin a arginin v oligandrinu chybí.

	10	20	30	40
Cry	TACTATQQTAAAYKTLVSI	ILSDASFNQCSTDSGYSMLTAKAL		
Cin-b	TACTATQQTAAAYKTLVSI	ILSESSFSQCSKDSGYSMLTATAL		
Dre-b	TACTSTQQTAAAYTTLVSI	ILSDSSFNKCSGYSMLTAKAL		
Meg-b	TACTTTQQTAAAYKTLVSI	ILSESSFNQCSTDSGYSMLTATAL		
Cap	ATCTTTQQTAAAYVALVSI	ILSDSSFNQCSTDSGYSMLTATAL		
Par	TTCTTTQQTAAAYVALVSI	ILSDTSFNQCSTDSGYSMLTATSL		
Cac	ATCTSSQQTAAAYVALVSI	ILSDTSFNQCSTDSGYSMLTATSL		
Cin-a	TTCTSTQQTAAAYVALVSI	ILSDSSFSQCATDSGYSMLTATSL		
Dre-a	TTCTSTQQTAAAYVTLVSI	ILSDSSFNQCSTDSGYSMLTATAL		
Meg-a	TTCTSTQQTAAAYVTLVSI	ILSDSSFNQCSTDSGYSMLTATAL		
Inf	TTCTTSQQTVAAYVALVSI	ILSDTSFNQCSTDSGYSMLTATSL		
Vex1	TACTTTQQTAAAYVALVSI	ILSDDNFSQCSSTDSGYSMLTATAL		
Vex2	TACTTTQQTAAAFVALVSI	VLSTDNFNQCSTDSGYSMLTATAL		
Olig	ATCTDEQFSDSIIKLT	PAIG--SVSGCTADSGFTMIPPTGL		
Align	::** * : :	*.. *: **::*:.....*	

Obr. 18

Srovnání N-koncové sekvence oligandrinu s typickými elicitory z rodů *phytophthora* a *Pythium*. Souhrn (poslední řádek): hvězdička (*) indentita (10 aminokyselin, 24,4%); dvojtečka (:) velká podobnost (9 aminokyselin; 21,9%); tečka (.) malá podobnost (10 aminokyselin, 24,4%). Symboly: Cry – kryptogein z *P. cryptogea*; Cin-a, Cin-b – cinnamomin z *P. cinnamomi*; Dre-a, Dre-b – dreschlerin z *P. derschleri*; Meg-a, Meg-b – megaspermin z *P. megasperma*; Cap – kapsicein z *P. capsici*; Par – parasiticein z *P. parasitica*; Cac – cactorein z *P. catorum*; Inf – infestin z *P. infestans*; Vex1, Vex2 z *P. vexans*; Olig z *P. oligandrum* (převzato z Picard et al., 2000).

5.3 Mechanismus působení

Oligandrin patří mezi tzv. α -elicitory na rozdíl od jiných elicitorů nevyvolává u hostitelské rostliny hypersenzitivní reakci spojenou s nekrotickou aktivitou.

Oligandrin má schopnost indukovat rezistenci a tak zvyšovat obranyschopnost rostliny. Byla prokázána indukce obranné reakce a zvýšená rezistence na *Phytophthora parasitica* a *Fusarium oxysporum* u rajčete a na *Botrytis cinerea* u vinné révy (Picard et al. 2000; Benhamou et al. 2001; Mohamed et al. 2007; Masunaka et al., 2010). *P. oligandrinum* působí jak prostřednictvím přímých účinků (mykoparazitismus, antibiosa a konkurent živin a prostoru), tak nepřímých účinků (stimulace obranných reakcí rostliny a podpora růstu rostliny (Vallance et al., 2009).

U rostlin rajčat dochází po aplikaci oligandrinu k poklesu buněčné kolonizace a rozvoje patogenů. Wang et al. (2011) poukazují na schopnost oligandrinu indukovat rezistenci na *Botrytis cinerea* a aktivovat ethylenovou signalizační dráhu. Lou et al. (2011) prokázali

zvýšenou aktivitu antioxidantních enzymů, zvýšenou produkci PR proteinů a indukci salicylové i jasmonát/etylenové signální dráhy.

Byl prokázán fungitoxický účinek fytoalexinů a preformovaných fenolických látek. Dochází k jejich interakci s membránovými lipidy a fosfolipidy, což vede ke zvýšení propustnosti membrány hub a pórů a úniku obsahu buňky. Takto vyvolané odchylky v propustnosti plasmatické membrány buněk *P. parasitica* podporují vnitřní osmotické rozdíly, což vede k pozorovaným poruchám, jako je zatahování plasmalemy a agregace cytoplasmy, kondenzace a v některých případech úplná ztráta protoplasmy. V oligandrinem ošetřených rostlinách rajčete jsou fenolické látky zapojeny v nejméně dvou klíčových metabolických funkcích. Zaprvé hromadění fenolických látek v místě průniku patogenu způsobí inhibici růstu hub. Za druhé, impregnace fenolických sloučenin ve stěnách hostitelských buněk (vyšší elektronová hustota buněčná stěna než normálně) a jejich hromadění v nenapadených xylemových cévách jako povlak stěn podél sekundárních stěn může přispět ke zvýšení mechanické pevnosti těchto obranných bariér, s čím souvisí i omezení růstu hub. Posílení hostitelských buněk impregnací hydrofobních látek nebo ukládání nových polymerů do stěn je základním předpokladem pro prevenci enzymatické degradace hostitelských buněčných stěn. Mezibuněčné prostory jsou strategická místa pro šíření patogenů, čemuž se rostlina brání naplněním těchto prostor amorfním materiálem, který hyfy uvězní, tudíž slouží k zastavení průniku patogenu (Picard et al., 2000).

II. Experimentální část

1. Materiál a přístroje

1.1 Chemikálie

Butylovaný hydroxytoluen (Sigma, USA)

Coomassie Brilliant Blue G-250(Bio-Rad, USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR)

Ethanol (Lach-Ner, ČR)

Evansova modř (Fluka, Švýcarsko)

Fosforečnan draselný (Lachema, ČR)

Glycerol (Sigma, USA)

Guajakol (Sigma, USA)

Kumenhydroperoxid (Acros Organics, Belgie)

Kyselina sírová (Lach-Ner, ČR)

Kyselina octová (Lach-Ner, ČR)

Kyselina fosforečná (Lach-Ner, ČR)

Methanol (Sigma, USA)

Peroxid vodíku (Lach-Ner, ČR)

SDS (Sigma, USA)

Síran amono-železnatý (Sigma, USA)

Standard BSA (Sigma, USA)

Tris HCl (MP Biomedicals, Francie)

TRITON X-100 (Sigma, USA)

Xylenová oranž (Acros Organics, Belgie)

1.2 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy, Sartorius, Německo

Automatické pipety, Eppendorf, Německo

Digitální pH metr WTW 526, InoLab, Německo

Digitální předvážky, KERN, Německo

Elektromagnetická míchačka IKA, Labortechnik, Německo

Chlazená centrifuga 5415R, Eppendorf, Německo

Inkubátor Granet, England

Inkubátor INCUBAT, Melag, Německo

Kulový mlýnek MM301, Retsch, Německo

Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT, BioTek Instruments, USA

pH metr, Practitronic, Německo

Světelný mikroskop Olympus BX50, Olympus Optical, hranol U-MWB2, Japonsko

1.3 Rostlinný materiál

Vliv elicitorů byl testován na třech genotypech *Solanum* spp., které se liší rezistencí vůči fytopatogenu *Oidium neolycopersici*:

- *Solanum lycopersicum* cv. Amateur- vysoká citlivost
- *Solanum chmielewskii* - střední rezistence, největší hypersenzitivní odpověď
- *Solanum habrochaites* - vysoká rezistence

Semena byla vyseta do perlitu a ve stádiu zcela vyvinutých děložních listů byly semenáčky přesazeny do květináčů obsahujících zahradnický substrát. K následujícím experimentům byly použity rostliny ve stáří 6-7 týdnů.

1.4 Patogen

Pro experimenty bylo použito padlí rajčatové *Oidium neolycopersici*. Izolát pochází z rostliny *Solanum lycopersicum* cv. Lucy pěstované ve skleníku Státní rostlinolékařské zprávy v Olomouci. Patogen byl pěstován na citlivém genotypu rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur ve fytotronu za teploty 20 °C a světelného režimu 12/12 h (den/noc).

1.5 Příprava rostlinného materiálu

Testování vlivu elicitorů bylo prováděno na listových discích o průměru 12 mm. Na rostlině byly vybrány plně vyvinuté zdravě vyhlížející listy ze středové části rostliny, poté se z nich pomocí korkovrtu vyřízly disky, které se po 16 vkládaly do předem připravených Petriho misek o průměru 9 cm. Každá Petriho miska obsahovala 3 vrstvy buničiny, 1 vrstvu filtračního papíru a 7,5 ml destilované vody či 7,5 ml roztoku daného elicitoru o koncentracích 10, 100 nebo 1000 nM. Každá varianta (miska s vodou nebo příslušnou koncentrací elicitoru) byla připravena ve dvojím opakování. Disky v jedné misce byly kontrolní, tedy neinfikované a disky v misce druhé byly nainokulovány padlím.

Listové disky byly inokulovány patogenem metodou otisku listu citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur, jehož povrch byl pokryt z 80-100 % sporulujícím myceliem. Petriho misky s neinokulovanými i inokulovanými disky byly uloženy po dobu 48 h ve fytotronu při teplotě 20 °C a za světelného režimu 12/12 h (den/noc).

2. Metody

2.1 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení aktivity

peroxidasy

Rostlinný materiál byl homogenizován v kulovém mlýnku. Extrakce byla provedena s 0,1 M Tris HCl pufrem v poměru 1:2 (w/v) (rostlinný materiál:pufre). Extrakty byly centrifugovány 10 min při 13 200 otáčkách za minutu a teplotě 4 °C.

2.2 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení intenzity

lipidické peroxidace

Rostlinný materiál byl homogenizován v kulovém mlýnku. Extrakce byla provedena v poměru 1:2 (w/v) (rostlinný materiál:pufre) s 0,1M K-fosfátovým pufrem o pH 7, který dále obsahoval 1% (v/v) TRITON X-100 a 0,01% (w/v) butylhydroxytoluen.. Extrakty byly centrifugovány 20 min při 13 200 otáčkách za minutu a teplotě 4 °C.

2.3 Fytopatologické hodnocení vývoje patogenu

O. neolycopersici

Listové disky byly 48 h po inokulaci ponořeny na dva dny do koncentrované kyseliny octové, poté přemístěny do glycerolu a před mikroskopováním nabarveny 1% Evansovou modří. Z každé varianty byly vyhodnoceny 4 disky. Na discích byla stanovena klíčivost konidií, délky jednotlivých klíčících vláken a počet klíčících vláken konidií (tedy množství konidií s jedním, dvěma nebo třemi klíčovými vlákny). U každé varianty bylo vyhodnoceno minimálně 120 náhodně vybraných konidií.

2.4 Stanovení intenzity buněčné smrti

Čerstvě odebrané listové disky byly inkubovány 15 minut v 0,05% Evansově modři. Disky byly následně důkladně promyty destilovanou vodou a inkubovány 30 minut v 50% methanolu s 1% SDS při 50 °C. Byla proměřena absorbance vzorků při vlnové délce 600 nm.

2.5 Stanovení aktivity peroxidasy

Aktivita peroxidasy byla měřena spektrofotometrickou metodou s využitím mikrodestičkového readeru. Aktivita byla stanovena modifikovanou metodou s guajakolem (Angelini et al., 1990). Reakční směs obsahovala 100 µl 0,1 M K-fosfátového pufru o pH 6, 40

μl 50 mM guajakolu a 100 μl extraktu. Reakce se startovala přidavkem 50 μl 10 mM peroxidu vodíku. Změna absorbance byla zaznamenávána po 1 minutě při vlnové délce 436 nm.

2.6 Stanovení intenzity lipidické peroxidace

Stanovení primárních produktů lipidické peroxidace bylo provedeno spektrofotometrickou metodou FOX 2, jejímž principem je reakce železnatých iontů s xylenovou oranží, která při nízkém pH váže tyto ionty za vzniku modře zbarveného komplexu (Griffiths et al. 2000).

20 μl extraktu nebo standardu kumenhydroperoxidu (1-100 μM) bylo inkubováno s 5 μl methanolu ve tmě. Po 30 minutové inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 200 μl činidla FOX2 (činidlo A (250 mM kyseliny sírová, 1 mM xylenolová oranž a 2,5 mM (NH₄)₂Fe(SO₄)₂) a činidlo B (4,4 mM butylhydroxytoluen v HPLC methanolu) smíchané v poměru 1:9). Vzorky byly inkubovány dalších 30 minut a poté 5 minut centrifugovány při 13 200 otáčkách za minutu. Absorbance byla měřena na mikrodestičkovém readeru při vlnové délce 560 nm.

2.7 Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové

Stanovení proteinů bylo provedeno na mikrodestičkovém readeru. Do jamek mikrotitrační destičky bylo postupně pipetováno 45 μl destilované vody, 5 μl extraktu a 200 μl roztoku činidla Bradfordové, připraveného naředěním zásobního roztoku Coomassie Brilliant Blue (50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 ml methanolu, 50 ml 85% kyseliny fosforečné) destilovanou vodou v poměru 1:4 (barvivo : destilovaná voda). Zbarvení se nechalo vyvíjet 5 minut a poté byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Kalibrační křivka byla vytvořena pomocí BSA jako standardu v rozsahu koncentrací 0,2 - 1,2 mg/ml.

3. Výsledky a diskuse

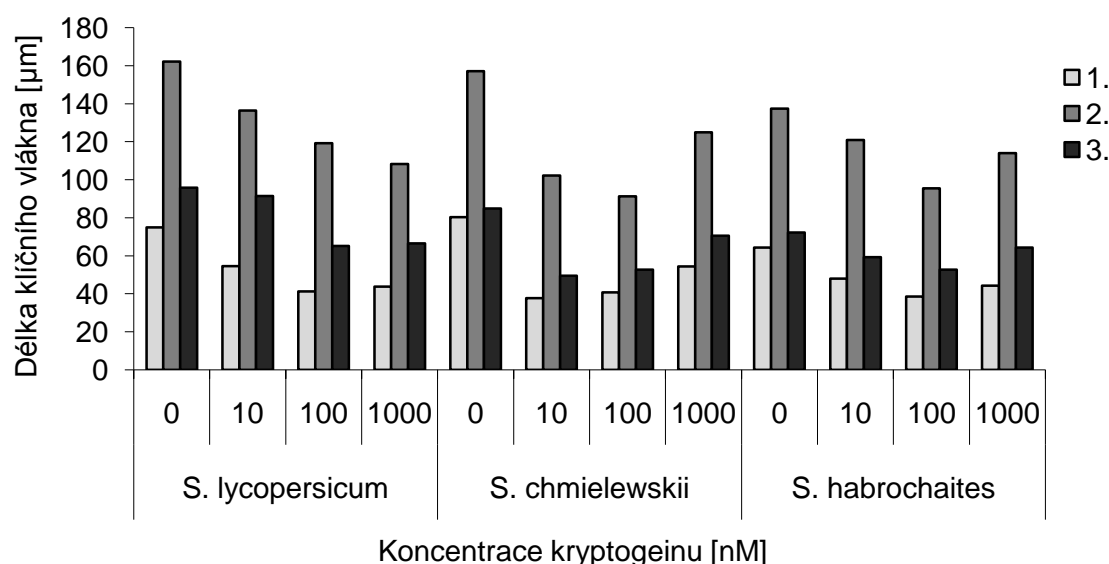
3.1 Vliv aplikace elicitinů na vývoj patogenu a rozvoj infekce

O. neolycopersici na *Solanum* spp.

Hlavním cílem experimentální části bakalářské práce bylo studium vlivu oligandrinu, kryptogeinu a jeho mutantů na rezistenci tří genotypů *Solanum* spp. na patogen *O. neolycopersici*. Experimenty byly realizovány na listových discích. Mikroskopické vyhodnocení vývoje patogenu bylo provedeno 48 h po inokulaci listových disků patogenem. Použité koncentrace elicitinů byly 10-1000 nM.

Pro vyhodnocení vývoje patogenu byla hodnocena klíčivost spor, délka jednotlivých klíčnicích vláken a množství konidií s jedním, dvěma nebo třemi klíčnicími vláčky po aplikaci elicitinů v koncentraci 10-1000 nM. V bakalářské práci jsou z důvodů přehlednosti uvedeny výsledky (grafy) týkající se pouze vyhodnocení délky jednotlivých klíčnicích vláken. Výsledky stanovení zastoupení konidií s jedním, dvěma nebo třemi vláčky korespondují s výsledky získanými při vyhodnocení vlivu elicitinů na délku vlákna. Konidie patogenu *O. neolycopersici* klíčí již 3 až 9 h po inokulaci. K intenzivnímu vývoji a větvení patogenu *O. neolycopersici* dochází 48 až 72 h po inokulaci (Mlíčková et al., 2004).

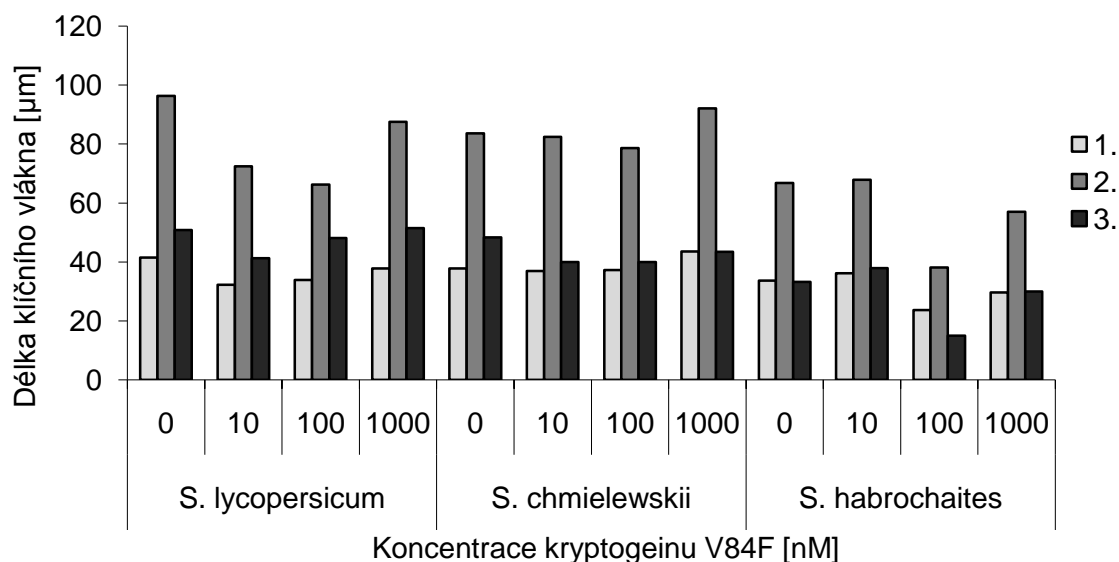
Průkazná inhibice vývoje patogenu byla detekována po aplikaci kryptogeinu v koncentračním rozsahu 10-1000 nM u všech tří studovaných genotypů *Solanum* spp. (Obr. 19). V případě *S. lycopersicum* se intenzita inhibice zvyšovala s růstem aplikované koncentrace kryptogeinu. U genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* byl vývoj patogenu nejvíce potlačen v přítomnosti 100 nM kryptogeinu.



Obr. 19

Srovnání délek jednotlivých klíčnicích vláken patogenu v přítomnosti kryptogeinu o koncentracích 0-1000 nM u vybraných genotypů hostitele *Solanum* spp. (1) první klíčnicí vlákno, (2) druhé klíčnicí vlákno, (3) třetí klíčnicí vlákno.

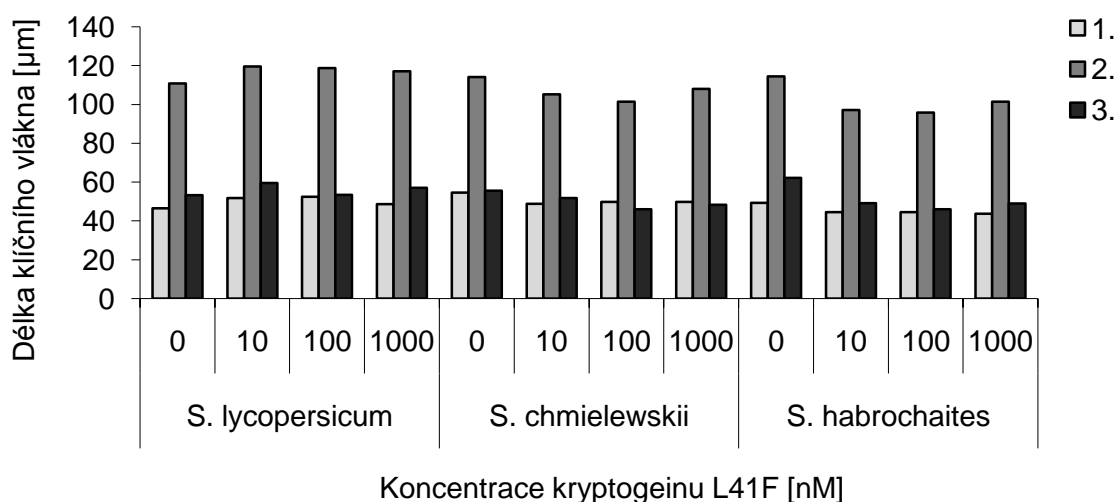
V případě mutantu V84F byl největší inhibiční efekt pozorován u silně rezistentního *S. habrochaites* po aplikaci elicitinu v koncentraci 100 nM (Obr. 20). Koncentrace 1000 nM elicitinu vykazovala velmi malý nebo žádný efekt na vývoj patogenu. Nejmenší vliv byl pozorován na vývoj patogenu byl pozorován u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii*.



Obr. 20

Srovnání délek jednotlivých klíčících vláken patogenu v přítomnosti mutantního kryptogeynu V84F o koncentracích 0-1000 nM u vybraných genotypů hostitele *Solanum* spp. (1) první klíčící vlákno, (2) druhé klíčící vlákno, (3) třetí klíčící vlákno.

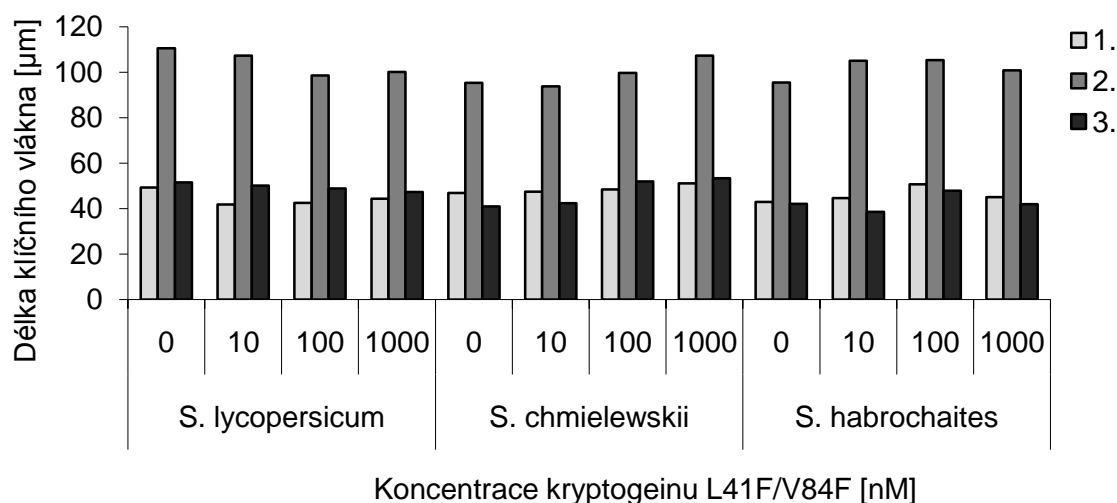
V přítomnosti mutantního kryptogeynu L41F, vytvořeného záměnou leucinu za fenylalanin v poloze 41, byl pozorován v případě *S. lycopersicum* spíše mírně stimulační efekt. V případě genotypů s rezistentními vlastnostmi tj. *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* vzhledem k *O. neolycopersici*, byl detekován slabý inhibiční vliv na vývoj patogenu (Obr. 21).



Obr. 21

Srovnání délek jednotlivých klíčících vláken patogenu v přítomnosti mutantního kryptogeynu L41F o koncentracích 0-1000 nM u vybraných genotypů hostitele *Solanum* spp. (1) první klíčící vlákno, (2) druhé klíčící vlákno, (3) třetí klíčící vlákno.

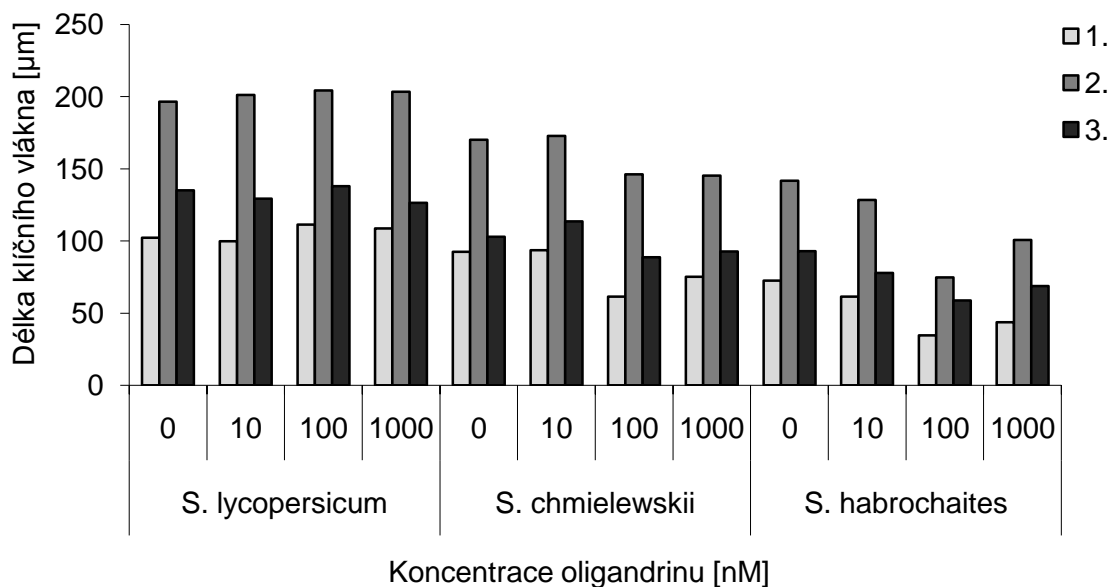
Dvojitý mutant kryptogeinu L41F/V84F pouze velmi slabě zpomalil vývoj patogenu u *S. lycopersicum*. V případě genotypů s rezistentními vlastnostmi tj. *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* byl naopak zaznamenán slabý stimulační efekt na růst klíčnicích vláken. Tento mutant má totiž díky přítomnosti dvou objemných molekuly fenylalaninů menší schopnost spouštět obranou reakci v rostlině, protože dochází ke ztížení vazby sterolů do dutiny elicitinu, tudíž k horšímu navázání elicitinu k receptoru rostliny (Dokládál et al., 2012) (Obr. 22).



Obr. 22

Srovnání délek jednotlivých klíčnicích vláken patogenu v přítomnosti mutantního kryptogeinu L41F/V84F o koncentracích 0-1000 nM u vybraných genotypů hostitele *Solanum* spp. (1) první klíčnicí vlákno, (2) druhé klíčnicí vlákno, (3) třetí klíčnicí vlákno.

V případě oligandrinu byla pozorována koncentrační závislost efektu elicitinu na vývoj patogenu a rozdílný účinek na genotypy lišící se rezistencí k patogenu *O. neolyopersicum*. V případě citlivého genotypu *S. lycopersicum* aplikace oligandrinu neměla žádný efekt na vývoj patogenu, na rozdíl od genotypů s rezistentními vlastnostmi tj. *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*. Nejintenzivnější potlačení vývoje patogenu v přítomnosti oligandrinu bylo detekováno u silně rezistentního genotypu *S. habrochaites* (Obr. 23).



Obr. 23

Srovnání délek jednotlivých klíčných vláken patogenu v přítomnosti oligandrinu o koncentracích 0-1000 nM u vybraných genotypů hostitele *Solanum* spp. (1) první klíčící vlákno, (2) druhé klíčící vlákno, (3) třetí klíčící vlákno

Výsledky uvedené v grafech (Obr. 19-23) jsou přehledně shrnuty v tabulce 4., ze které jednoznačně vyplývá, že z testovaných koncentrací největší vliv na rezistenci hostitelských rostlin vykazovala koncentrace elicitinů 100 nM. V případě kryptogeinu lze předpokládat významnou roli schopnosti elicitinu aktivovat produkci ROS, která se projeví zvýšením rezistentních vlastností rostliny (Dokládál et al., 2012). β -elicitiny, jako je kryptogein a jeho mutant V84F, u kterých byl potvrzen potenciál stimulovat produkci ROS u rostlin, měly významný inhibiční efekt na vývoj patogenu *O. neolycopersici* u všech genotypů *Solanum* spp. Naopak mutanti L41F a L41F/V84F, kteří neaktivují produkci ROS, vykazovaly minimální nebo žádný efekt na vývoj patogenu *O. neolycopersici*. Při testování kryptogeinu a jeho mutantů byl pozorován jejich srovnatelný vliv na zvýšení rezistence u *Solanum* spp. na *O. neolycopersici* jako u *N. tabacum* na *P. parasitica* (Dokládál et al., 2012).

Je zajímavé, že v případě α -elicitinu oligandrinu byl prokázán vliv na rezistenci rostlin u genotypů, které již vykazují středně nebo silně rezistentní vlastnosti na daný patogen tj. genotypy *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* (Mieslerová et al., 2000).

Tab. 4

Vliv elicitinů na délku vlákna *O. neolycopersici* 48 h po inokulaci listových disků *S. lycopersicum* (A), *S. chmielewskii* (CH) a *S. habrochaites* (H). Inhibice růstu vláken patogen je vyjádřena semikvantitativně: 1-15 % (+), 16-30 % (++) , 31-45 (+++), 46- 60 % (++++).

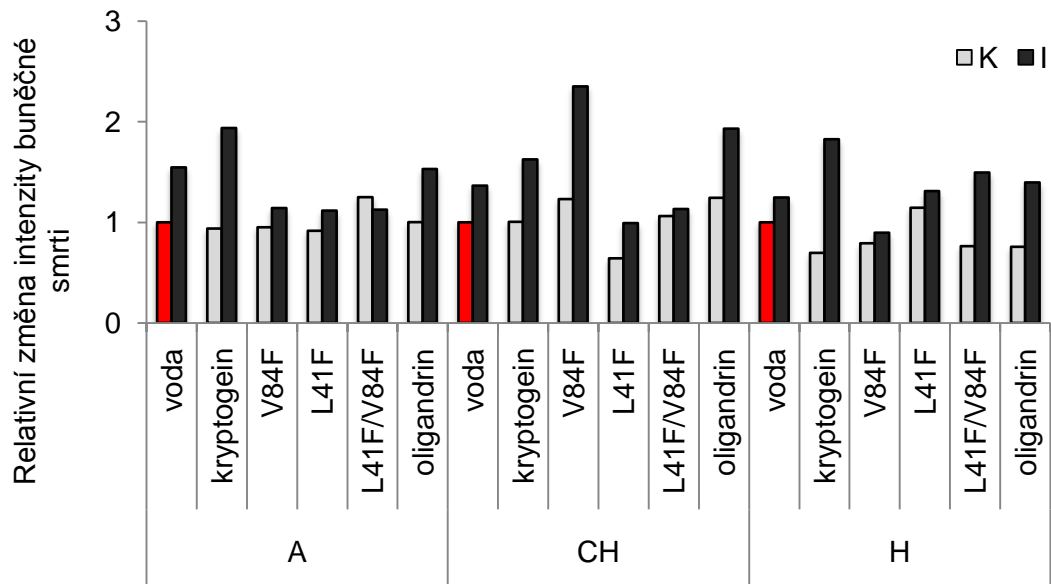
Elicitin	10 nM			100 nM			1000 nM		
	A	CH	H	A	CH	H	A	CH	H
Kryptogein	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++
V84F	++	+	0	++	+	+++	+	0	+
L41F	0	+	++	0	+	++	0	+	+
L41F/V84F	+	0	0	+	0	0	+	0	0
Oligandrin	0	0	+	0	++	++++	0	+	+++

3.2 Vliv aplikace elicitinů na intenzitu buněčné smrti, lipidické peroxidace a aktivitu peroxidasy

Byly zrealizovány pilotní experimenty zaměřené na stanovení reakce rostliny na aplikaci vybraných elicitinů. Cílem experimentů byl výběr vhodného základního parametru, který by charakterizoval odpověď rostliny na působení elicitinů. Vlivu aplikace elicitinů na kontrolní a infikovanou rostlinu byl detekován na základě stanovení intenzity buněčné smrti, aktivity jednoho z antioxidantních enzymů peroxidasy a množství primárních produktů lipidické peroxidace.

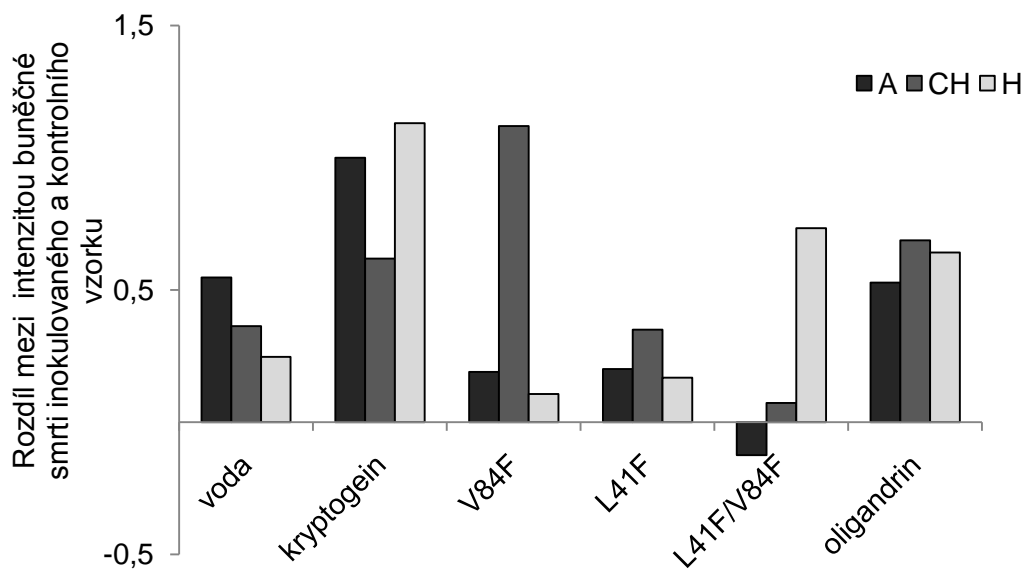
3.2.1 Vliv aplikace elicitinů na intenzitu buněčné smrti u genotypů *Solanum* spp.

Nejvýraznější nárůst buněčné smrti po infekci patogenem *O. neolyopersici* byl detekován u vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. V případě rezistentního genotypu byly detekovány pouze malé změny v porovnání s kontrolními neinfikovanými disky (Obr. 25). Aplikace kryptogeinu u všech genotypů *Solanum* spp. zvýšila intenzitu buněčné smrti. Významně zvýšená buněčná smrt byla dále pozorována po aplikaci mutantu V84F a oligandrinu *S. chmielewskii*, u kterého byla prokázána poměrně vysoká schopnost hypersenzitivní reakce, která je spojená s intenzivní buněčnou smrtí v místě infekce patogenem (Tománková et al., 2006). Po aplikaci kryptogeinu i oligandrinu byl pozorován nárůst buněčné smrti v porovnání s kontrolními infikovanými vzorky a to zejména u rezistentního genotypu *S. habrochaites*.



Obr. 24

Relativní změna intenzity buněčné smrti. *S. lycopersicum* (A), *S. chmielewskii* (CH) a *S. habrochaites* (H). Změny jsou vždy vztaženy u každého genotypu na kontrolní vzorek neinfikovaný a neovlivněný působením elicitinů.

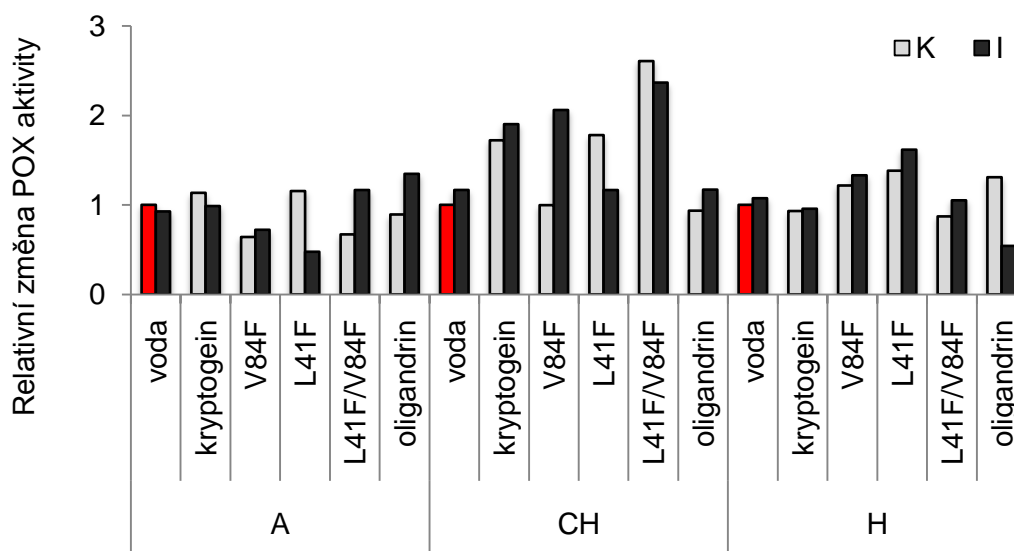


Obr. 25

Rozdíl intenzity buněčné smrti inokulovaného a kontrolního vzorku *Solanum* spp. *S. lycopersicum* (A), *S. chmielewskii* (CH) a *S. habrochaites* (H).

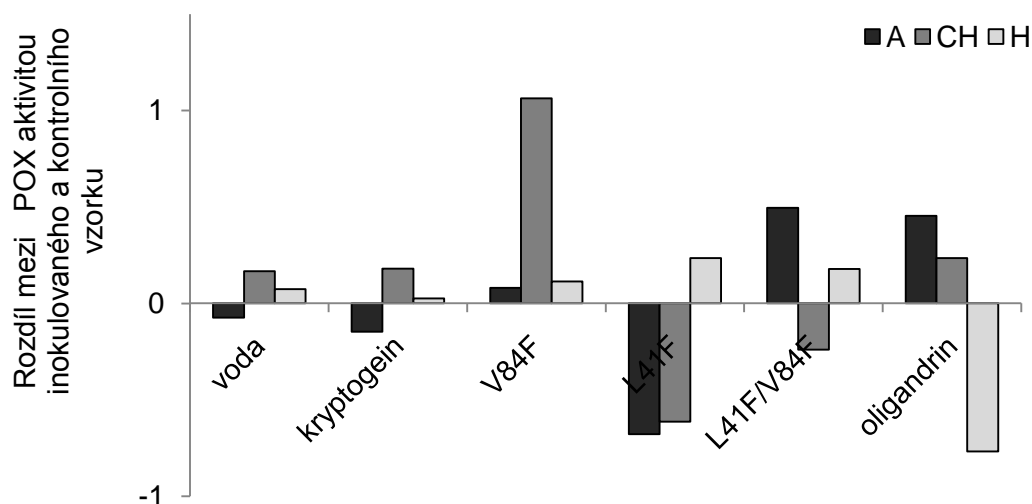
3.2.2 Vliv aplikace elicitinů na aktivitu peroxidasy u genotypů *Solanum* spp.

Ze změn v peroxidasové aktivitě po inokulaci patogenem v přítomnosti testovaných elicitinů není zřejmá jednoznačná závislost na typu aplikovaného elicitinu (Obr. 26, 27). Změny v přítomnosti kryptogeinu jsou minimální v porovnání se změnami po infekci u kontrolních disků v prostředí bez elicitinů. Větší změny byly detekované v přítomnosti mutantů L41F a L41F/V84F. Zajímavé je, že v případě aplikace oligandrinu, kdy byla pozorována zvýšená rezistence u *S. habrochaites*, spolu se zvýšenou buněčnou smrtí, tak v případě peroxidasy, byl po aplikaci oligandrinu detekován významný pokles POX aktivity u infikovaného listového disku.



Obr. 26

Relativní změna aktivity peroxidasy. *S. lycopersicum* (A), *S. chmielewskii* (CH) a *S. habrochaites* (H). Změny jsou vždy vztaženy u každého genotypu na kontrolní vzorek neinfikovaný a neovlivněný působením elicitinů.

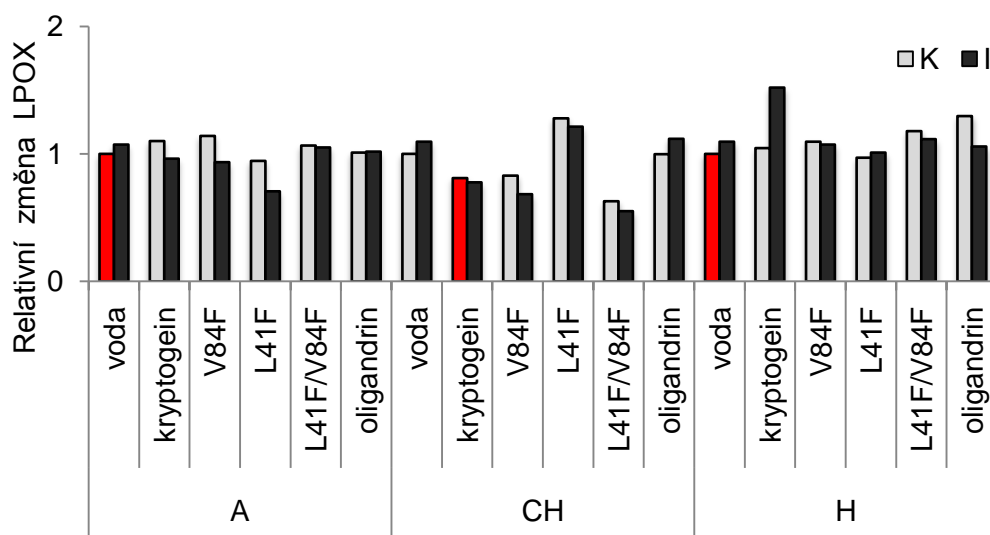


Obr. 27

Rozdíl aktivity inokulovaného a kontrolního vzorků. *S. lycopersicum* (A), *S. chmielewskii* (CH) a *S. habrochaites* (H).

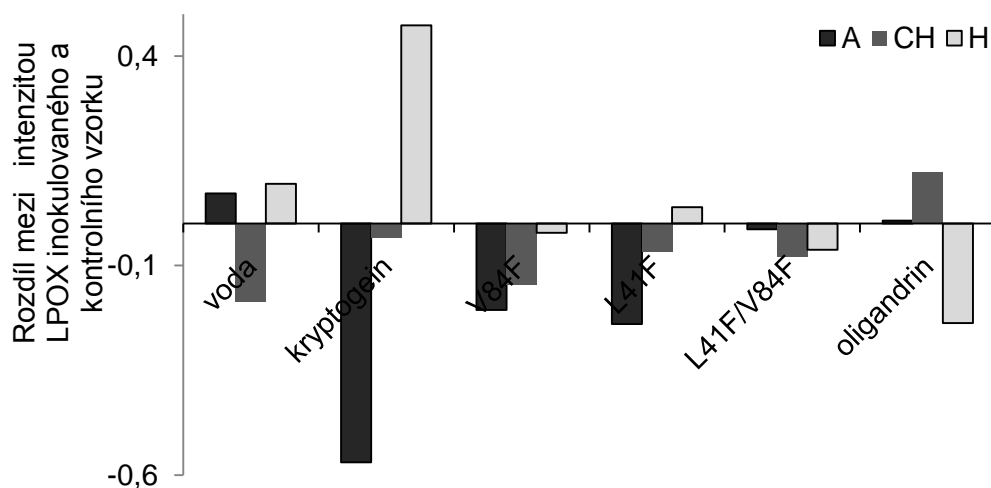
3.2.3 Vliv aplikace elicitinů na intenzitu lipidické peroxidace u genotypů *Solanum* spp.

Aplikace elicitinů minimálně ovlivnila intenzitu lipidické peroxidace. Ve většině případů byl zaznamenán pokles intenzity lipidické peroxidace (Obr. 28, 29).



Obr. 28

Relativní změna produkce primárních produktu lipidické peroxidace. *S. lycopersicum* (A), *S. chmielewskii* (CH) a *S. habrochaites* (H). Změny jsou vždy vztaženy u každého genotypu na kontrolní vzorek neinfikovaný a neovlivněný působením elicitinů.



Obr. 29

Rozdíl intenzity lipidické peroxidace inokulovaného a kontrolního vzorku. *S. lycopersicum* (A), *S. chmielewskii* (CH) a *S. habrochaites* (H).

4. Závěr

- Byl pozorován srovnatelný účinek kryptogeinu a jeho mutantů na zvýšení rezistence u *Solanum* spp. na *O. neolyopersici* jako u *N. tabacum* na *P. parasitica*.
- Po aplikaci oligandrinu byla detekována výrazně zvýšená rezistence u *S. habrochaites*.
- Pro následující experimenty lze na základě dosažených výsledků doporučit aplikaci elicitinů ve 100 nM koncentraci.
- Po aplikaci oligandrinu a kryptogeinu byla detekována zvýšená buněčná smrt. Intenzita změn byla v závislosti na rezistentních vlastnostech rostliny. Nejintenzivnější změny byly u rezistentního genotypu *S. habrochaites*.
- Nebyl pozorován významný vliv aplikace elicitinů na lipidickou peroxidaci u *Solanum* spp.
- V následných experimentech bude vhodné testovat vliv 24 h předinkubace listových disků s elicitiny před inokulací patogenem.

Literatura

Akimoto C., Aoyagi H., Tanaka H. (1999) Endogenous elicitor-like effect of alginate on physiological activities of plant cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 429–436

Angelini R., Manes F., Federico R. (1990) Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta* **182**, 89-96

Angelova Z., Georgiev S., Roos W. (2006) Elicitation of plants. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **20**, 72-83

Benhamou N., Bélanger R. R., Rey P., Tirilly Y. (2001) Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant. Physiol. Biochem.* **39**, 681–696

Blein J.-P., Coutos - Thévenot P., Marion D., Ponchet M. (2002) From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant. Sci.* **7**, 293-296

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

Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. (2000) *Biochemistry and molecular biology of plants*, pp. 1102-1156, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA

Dokládál L., Obořil M., Stejskal K., Zdráhal Z., Ptáčková N., Chaloupková R., Damborský J., Kašparovský T., Jeandroz S., Žďárská M., Lochman J. (2012) Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *J. Exp. Bot.* **63**, 1-13

Fefe S., Bouaziz S., Huet J.-C., Pernollet J.-C., Guittet E. (1997) Three-dimensional solution structure of β kryptogein, a β elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Sci.* **6**, 2279-2284

Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**,711–724

Griffiths G., Leverentz M., Silkowski H., Gill N., Sanches-Serrano J. J. (2000) Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *J. Exp. Bot.* **51**, 1363-1370.

Heath M. C. (1998) Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 117-124

Kalina T., Váňa J. (2005) Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii, pp. 139-154, Karolinum, Praha, ČR

Kamoun S., Lindqvist H., Govers F. (1997) A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 1028-1030

Kawamura Y., Hase S., Takenaka S., Kanayama Y., Yoshioka H., Kamoun S., Takahashi H. (2009) INF1 elicitor activates jasmonic acid- and ethylene- mediated signalling pathways and induces resistance to bacterial wilt disease in tomato. *J. Phytopathol.* **157**, 287-297

Koduri R.S., Tien M. (1995) Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* **270**, 22254–22258.

Kranner I., Minibayeva F. V., Beckett R. P., Seal C. E. (2010) What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol.* **188**, 655-73

Krátká J. Slováček J., Pekárová B. *Phytophthora fragariae* a *Colletotrichum acutatum* – karanténní houbové patogeny jahodníku (identifikace a diagnostika). ÚZPI, Praha **ISBN: 9788072710775**

Lascombe M.-B., Milat M.-L., Blein J.-P., Panabières F., Ponchet M., Prangéa T. (2000) Crystallization and preliminary X-ray studies of oligandrin, a sterol-carrier elicitor from *Pythium oligandrum*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56**, 1498-1500

Lascombe M. B., Ponchet M., Venard P., Milat M. L., Blein J.-P. Prange T. (2002) The 1.45 angstrom resolution structure of the cryptogein-cholesterol complex: a close-up view of a sterol carrier protein (SCP) active site. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **58**, 1442-1447

Lebrun-Garcia A., Bourque S., Binet M.-N., Ouaked F., Wendehenne D., Chiltz A., Schäffner A., Pugin A. (1999) Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses. Analysis of the cryptogein signal transduction in tobacco. *Biochimie* **81**, 663-668

Lichtenthaler H. K. (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant. Physiol.* **148**, 4-14

Lou B.-G., Wang A.-Y., Lin CH., Xu T., Zheng X.-D. (2011) Enhancement of defense responses by oligandrin against *Botrytis cinerea* in tomatoes. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 11442-11449

Maldonado-Bonilla L. D., Betancourt-Jiménez M., and Lozoya-Gloria E. (2008). Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *Eur. J. Plant Pathol.*, **4**, 439-449

Masunaka A., Sekiguchi, H., Takahashi H., Takenaka S. (2010) Distribution and expression of elicitin-like protein genes of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. *J. Phytopathol.* **158**, 417-426

Mejía-Teniente L., Torres-Pacheco I., González-Chavira M. M., Ocampo-Velazquez R. V., Herrera-Ruiz G., Chapa-Oliver A. M., Guevara-González R. G. (2010) Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *Afr. J. Biotechnol.* **9**, 9155-9162

Mieslerová B., Lebeda A., Chetelat R.T. (2000) Variation in response of wild *Lycopersicon* and *Solanum* spp. against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). *J. Phytopathol.* **148**, 303 – 311.

Mikeš V., Milat M.-L., Ponchet M., Panabières F., Ricci P., Blein J.-P. (1998) Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 133-139

Mikeš V., Milat M.-L., Ponchet M., Ricci P., Blein J.-P. (1997) The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett.* **416**, 190-192.

Mlíčková K., Luhová L., Lebeda A., Mieslerová B., Pec P. (2004) Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 753-761.

Mohamed N., Lherminier J., Farmer M. J., Fromentin J., Béno N., Houot V., Milat M. L., Blein J. P. (2007) Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitin, oligandrin, to roots. *Phytopathology* **97**, 611–620

Nicholls H. (2004) Stopping the rot. *PLoS. Biol.* **2**, 891-895

Ozeretskoykaya O. L., Vasyukova N. I. (2002) The use of elicitors for protection of cultured plants demands caution. *Appl. Biochem. Microbiol.* **38**, 277-279

Picard K., Ponchet M., Blein J.-P., Rey P., Tirilly Y., Benhamou N. (2000) Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiol.* **124**, 379–395

Plešková V., Kašparovský T., Obořil M., Ptáčková N., Chaloupková R., Dokládál L., Damborský J., Lochman J. (2011) Elicitin - membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: Role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. *Plant Physiol. Biochem.* **49**, 321-328

Ponchet M., Panabie`res F., Milat M.-L., Mikes V., Montillet J.-L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y., Blein J.-P. (1999) Are elicitins cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 1020-1047

Radman R., Saez T., Bucke Ch., Keshavarz T. (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**, 91-102

Slurascenko A. J., Fraser R. S. S., Van Loon L. C. (2002): *Mechanisms of resistance to plant diseases*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 628 str., ISBN: 1402003994

Tománková K., Luhová L., Petrivalský M., Pec P., Lebeda A. (2006) Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **68**, 22–32.

Vallance J., Le Floch G., Deniel F., Barbier G., Levesque C.A., Rey P. (2009) Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and oomycete population dynamics in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4790-4800

Van West P., Appiah A. A. Gow N. A. R. (2003) Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **62**, 99-113

Wang A.-Y., Lou B.-G., Xu T., Lin Ch. (2011) Defense responses in tomato fruit induced by oligandrin against *Botrytis cinerea*. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 4596-4601

Yin H., Zhao X., Du Y. (2010) Oligochitosan: a plant diseases vaccine - a review. *Carbohydr. Polym.* **82**, 1-8

Yu L. M., (1995) Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4088-4094

Zhao J., Davis J. C., Verpoorte R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **23**, 283-333

Seznam použitých zkratek

AC	AMP cyklasa
Cac	cactorein
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
Cap	kapsicein
Cin	cinnamomin
Cry	kryptogein
DAG	diacylglycerol
Dre	dreschlerin
GC	GMP cyklasa
GMP	guanosinmonofosfát
Ile	isoleucin
Inf/INF	infestin
IP3	inositol-1,4,5-trisfosfát
JA	kyselina jasmonová
Leu	leucin
Lys	lysin
LysoPC	lysophosphatidylcholin
MAPK	mitogen-aktivující proteinkinasy
Met	methionin
Mgm	megaspermi
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NO	oxid dusnatý
NOS	syntasa oxisu dusnatého
NR	nitrátreduktasa
Olig	oligandrin
Par	parasiticein
Phe	fenylalanin
ROS	reaktivní formy kyslíku
SA	kyselina salicylová
TF	transkripční faktory
Tyr	tyrosin
UV	ultrafialové
Val	valin
WT	divoký typ