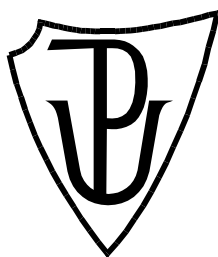


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium obranných mechanismů rostlin
aktivovaných elicitinou**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Pavla Satková

Školitel: doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.

Konzultant: doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.

Konzultant: doc. Mgr. Jan Lochman, Ph.D.

Olomouc

2020

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

V Olomouci dne

Velmi ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za odborné a milé vedení, cenné rady a připomínky při experimentální činnosti, za poskytnutí literatury a podporu a pomoc při konečném zpracování této práce.

Dále bych ráda poděkovala svým konzultantům doc. Mgr. Marku Petřivalskému, Dr. a doc. Mgr. Janu Lochmanovi, Ph.D. za rady a připomínky k experimentům, za zprostředkování vědecko-výzkumných zahraničních stáží a zejména za pomoc při publikační činnosti.

Za všestrannou pomoc při vykonávání experimentální části práce, za vytvoření příjemné pracovní atmosféry a pomoc při práci v laboratoři bych ráda poděkovala kolektivům Katedry biochemie a Katedry botaniky Univerzity Palackého v Olomouci a kolektivu z Ústavu biochemie Masarykovy univerzity v Brně.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu a trpělivost.

Bibliografická identifikace

| | |
|--------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora: | Mgr. Pavla Satková |
| Název práce: | Studium obranných mechanismů rostlin aktivovaných elicitinů |
| Typ práce: | Disertační |
| Pracoviště: | Katedra biochemie |
| Vedoucí práce: | Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce: | 2020 |
| Abstrakt: | |

Předkládaná disertační práce je zaměřena na studium aktivace obranných mechanismů u modelových rostlin *Solanum* spp. prostřednictvím elicitinů sekretovaných oomycetami *Phytophthora cryptogea* (bazický β -elicitin kryptogein) a *Pythium oligandrum* (kyselý α -elicitin oligandrin) a tzv. chemického elicitoru β -aminomáselné kyseliny (BABA). Prezentovaná práce je zaměřena na porovnání aktivace rezistence působením výše uvedených elicitorů na biotrofní patogen *Pseudooidium neolycopersici* (padlí rajčatové) u tří genotypů *Solanum* spp. lišící se stupněm rezistence na infekci zmíněným patogenem. U studovaných genotypů *Solanum* spp. byly sledovány změny v expresi PR (s patogenezi souvisejících) proteinů a zapojení signálních drah hormonů ethylenu, kyseliny salicylové a kyseliny jasmonové. Pro studium mechanismu aktivace obranných reakcí a rezistence na patogen *P. neolycopersici* byly použity kromě kryptogeinu i dvě jeho mutantní formy, u nichž došlo k záměně aminokyseliny v pozici 41 (L41F) a pozici 84 (V84F). Mutantní forma V84F se vyznačuje nižší schopností vázat a transportovat steroly než kryptogein, přičemž schopnost aktivace produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) je srovnatelná. Mutantní forma L41F je charakteristická nízkou schopností vázat a transportovat steroly a má významně sníženou schopnost aktivace produkce ROS. U modelových genotypů *Solanum* spp. bylo prokázáno zapojení obranných proteinů patřících do skupiny PR v reakci na elicitaci zástupci α - i β -elicitinů. Transkripční studií zaměřenou na sledování genů kódující enzymy důležitých pro biosyntézu ethylenu a stanovením jeho produkce bylo prokázáno, že rezistence indukovaná BABA a oligandrinem u rajčete je závislá na signální dráze ethylenu. Kryptogein u rajčete pravděpodobně aktivuje signální dráhy ethylenu a kyseliny jasmonové. Byl prokázán nárůst rezistence jednotlivých genotypů *Solanum* spp. k patogenu *P. neolycopersici* v závislosti na typu použitého elicitinu a genotypu rajčete. V případě oligandrinu byla zvýšená rezistence u náchylného genotypu (*S. lycopersicum* cv. Amateur), v případě kryptogeinu naopak u genotypů vykazujících určitý stupeň rezistence (*S. chmielewskii*, *S. habrochaites*).

Součástí disertační práce jsou výsledky získané v rámci řešení projektu zaměřeného na změny v subcelulární distribuci enzymu NADPHoxidasy (RBOH), který hraje významnou roli v obranných reakcích rostlin v průběhu patogeneze a podílí se na produkci ROS po aplikaci elicitinu kryptogeinu k buněčné suspenzi *Nicotiana tabacum*. Získané výsledky prokazují přítomnost enzymu RBOH v plazmatické membráně a v Golgiho komplexu. V rámci interakce rostlina-patogen je pro rostlinu charakteristické dvoufázové navýšení produkce ROS. Výsledky naznačují, že po elicitaci kryptogeinem se na zvýšené produkci ROS v první fázi podílí společně RBOHD plazmatické membrány s RBOHD původně lokalizovanou v Golgiho aparátu. Nově syntetizovaná RBOH je zapojena do produkce ROS až v druhé fázi.

| | |
|----------------|--|
| Klíčová slova: | biotický stres, elicitin, ethylen, kyselina β -aminomáselná, kyselina jasmonová, kyselina salicylová, kryptogein, NADPHoxidasa, obranná reakce, oligandrin, <i>Phytophthora</i> , PR proteiny, <i>Pseudooidium neolycopersici</i> , <i>Pythium</i> , rajče, reaktivní formy kyslíku, rezistence, tabák |
| Počet stran: | 173 |
| Počet příloh: | 5 |
| Jazyk: | český |

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Mgr. Pavla Satková
Title: The study of plants defense mechanisms activated by elicitors
Type of thesis: Ph.D.
Department: Department of biochemistry
Supervisor: Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation: 2020
Abstract:

The present thesis is focused on the study of activation of defence mechanisms in model plants of *Solanum* spp. by elicitors secreted by *Phytophthora cryptogea* (a basic β -elicitin cryptogein) and *Pythium oligandrum* (an acidic α -elicitin oligandrin) and a chemical elicitor β -aminobutyric acid (BABA). Presented work is focused on a comparison of activation of resistance by the elicitors mentioned above to pathogen *Pseudooidium neolycopersici* (powdery mildew) in three genotypes of *Solanum* spp. with different degree of resistance to infection by a biotrophic pathogen. We also studied changes in the expression of the PR (pathogenesis-related) proteins and involvement of signalling pathways of hormones ethylene, salicylic acid and jasmonic acid. In addition to cryptogein, two mutant forms of cryptogein with an amino acid replaced in position 41 (L41F) or position 84 (V84F) were used to specify the mechanism of defence response and resistance to *P. neolycopersici* pathogen. The V84F mutant is characterized by a lower ability to bind and transport sterols than cryptogein, whereas its ability to activate reactive oxygen species (ROS) production is comparable. The L41F mutant is characterized by a low ability to bind and transport sterols and has a significantly reduced ability to activate ROS production. The involvement of defence proteins belonging to the PR group in responses elicited by both α - and β -elicitors in the model plant *Solanum* spp. was demonstrated. We quantified the gene expression of key enzymes involved in ethylene biosynthesis and determined ethylene production, which showed that resistance induced by BABA and oligandrin in tomato is dependent on the ethylene signalling pathway. Cryptogein probably activates ethylene as well as jasmonic acid signalling pathways. The increase in resistance to the pathogen *P. neolycopersici* in three genotypes of *Solanum* spp. was individual and dependent on the type of used elicitor and the tomato genotype. Treatment with oligandrin induced resistance in the susceptible genotype of tomato (*S. lycopersicum* cv. Amateur), whereas cryptogein treatment induced resistance in the genotypes showing a certain degree of resistance (*S. chmielewskii*, *S. habrochaites*).

Another part of this thesis presents results obtained in the framework of the study on changes in subcellular distribution of the enzyme NADPH oxidase (RBOH), which play an important role in plant defence reactions during pathogenesis and participate in the production of ROS after application of elicitor cryptogein to cell suspension of *Nicotiana tabacum*. The obtained results demonstrate the presence of RBOH in the plasma membrane and in the Golgi complex. Within the plant-pathogen interactions, the plant is characterized by a two-phase increase in ROS production. The results indicate that RBOHD located in the plasma membrane together with the RBOHD originally located in the Golgi apparatus are involved in increased ROS production in the first phase after cryptogein elicitation are involved. The newly synthesized RBOH is involved only in the second phase of increased ROS production.

Keywords: β -aminobutyric acid, biotic stress, cryptogein, defence reaction, elicitor, ethylene, jasmonic acid, NADPH oxidase, oligandrin, *Phytophthora*, PR proteins, *Pseudooidium neolycopersici*, *Pythium*, reactive oxygen species, resistance, salicylic acid, tobacco, tomato
Number of pages: 173
Number of appendices: 5
Language: Czech

OBSAH

| | |
|--|----|
| CÍLE PRÁCE | 8 |
| 1. TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 1.1 Stresové faktory a základní obranné reakce u rostlin | 10 |
| 1.2 Indukovaná rezistence | 12 |
| 1.3 Proteiny spojené s patogenezí | 15 |
| 1.4 Reaktivní formy kyslíku v rostlinách | 19 |
| 1.4.1 Přehled reaktivních forem kyslíku a jejich funkce v rostlinách | 19 |
| 1.4.2 Zdroje reaktivních forem kyslíku v rostlinách | 20 |
| 1.4.3 NADPHoxidasa | 21 |
| 1.4.3.1 Produkce reaktivních forem kyslíku závislá na NADPHoxidase při biotickém a abiotickém stresu u <i>Arabidopsis thaliana</i> | 23 |
| 1.4.3.2 Regulace rostlinné NADPHoxidasy | 23 |
| 1.4.3.3 Charakterizace tabákové NADPHoxidasy | 26 |
| 1.4.4 Signální funkce reaktivních forem kyslíku | 28 |
| 1.4.5 Antioxidační systém u rostlin | 29 |
| 1.5 Rostlinné hormony a jejich úloha v obranných mechanismech | 33 |
| 1.5.1 Kyselina salicylová | 34 |
| 1.5.2 Kyselina jasmonová | 36 |
| 1.5.3 Ethylen | 39 |
| 1.5.4 Vzájemné působení signálních drah kyseliny salicylové, kyseliny jasmonové a ethylenu | 42 |
| 1.5.4.1 Reaktivní formy kyslíku a signální dráhy hormonů | 43 |
| 1.5.4.2 Oxid dusnatý a signální dráhy rostlinných hormonů | 46 |
| 1.6 Elicitiny | 47 |
| PŘÍLOHA 1: Elicitiny: Klíčové molekuly interakcí rostlin a patogenů | 52 |
| 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 60 |
| 2.1 Přehled experimentálních metod | 61 |
| 2.1.1 Rostlinný materiál | 61 |
| 2.1.1.1 Rajče - rod <i>Solanum</i> | 61 |
| 2.1.1.2 Tabák - rod <i>Nicotiana</i> | 62 |
| 2.1.2 Patogenní organismy a elicitory | 63 |
| 2.1.2.1 Padlí rajčatové (<i>Pseudoomidium neolycopersici</i>) | 63 |
| 2.1.2.2 Plísňe – rod <i>Phytophthora</i> | 64 |
| 2.1.2.3 Elicitin kryptogein | 67 |
| 2.1.2.4 Elicitin oligandrin | 68 |
| 2.1.2.5 β -aminomáselná kyselina | 68 |
| 2.1.3 Experimentální metody | 70 |
| 2.1.3.1 Příprava rostlinného materiálu | 70 |
| 2.1.3.2 Příprava buněčné linie <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bright yellow-2 | 70 |

| | | |
|--|---|-----|
| 2.1.3.3 | Použité patogeny a inokulace rostlin a tabákových disků | 70 |
| 2.1.3.4 | Charakterizace elicitinů | 70 |
| 2.1.3.5 | Aplikace elicitinů | 70 |
| 2.1.3.6 | Stanovení klíčivosti patogena a vývoje jeho konidií | 70 |
| 2.1.3.7 | Semikvantitativní stanovení peroxidu vodíku a superoxidového anionradikálu | 71 |
| 2.1.3.8 | Stanovení hladiny reaktivních forem kyslíku | 71 |
| 2.1.3.9 | Stanovení aktivit enzymů askorbátperoxidasy a guajakolperoxidasy | 71 |
| 2.1.3.10 | Analýza obsahu kyseliny salicylové, kyseliny jasmonové a konjugátu kyseliny jasmonové s isoleucinem | 71 |
| 2.1.3.11 | Analýza produkce ethylenu | 71 |
| 2.1.3.12 | Detekce proteinů metodou Western blot | 71 |
| 2.1.3.13 | Stanovení exprese genů | 72 |
| 2.1.3.14 | Statistické vyhodnocení dat | 72 |
| 2.2 | Výsledky a diskuze | 73 |
| 2.2.1 | Studium vlivu elicitinu oligandrinu a β -aminomáselné kyseliny na rezistenci rostlin <i>Solanum</i> spp. | 73 |
| PŘÍLOHA 2: Diverse responses of wild and cultivated tomato to BABA, oligandrin and <i>Oidium neolycopersici</i> infection | | 77 |
| 2.2.2 | Studium vlivu elicitinu β -kryptogeinu a jeho mutantních forem na signální dráhy rostlin <i>Solanum</i> spp. | 90 |
| PŘÍLOHA 3: The elicitin β -cryptogein's activity in tomato is mediated by jasmonic acid and ethylene signalling pathways independently of elicitin-sterol interactions | | 94 |
| 2.2.3 | Studium vlivu elicitinu β -kryptogeinu na dynamické změny v subcelulární distribuci enzymu NADPHoxidasy | 106 |
| PŘÍLOHA 4: Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein | | 109 |
| 2.3 | Závěr | 122 |
| 2.4 | Seznam použité literatury | 124 |
| 2.5 | Seznam použitých zkratk | 146 |
| PŘÍLOHA 5: Supplementary material | | 153 |
| Seznam autorských prací | | 169 |
| Prezentace výsledků na konferencích | | 170 |
| Curriculum vitae | | 172 |

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Cílem teoretické části disertační práce bylo shrnutí aktuálních poznatků o elicitech, skupině strukturně podobných proteinových elicitorů produkovaných patogenními organismy rodu *Phytophthora* a *Pythium*, a mechanismech obranných reakcí, které souvisí se zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku a proteinů spojených s patogenezí (tzv. PR proteinů).

Experimentální část

1. Studium vlivu elicitinu oligandrinu a β -aminomáselné kyseliny na rezistenci rostlin *Solanum* spp. a aktivaci obranných mechanismů rostlin.
2. Porovnání aktivace rezistence a obranných mechanismů vyvolané elicitem kryptogeinem a jeho mutantními formami u tří genotypů *Solanum* spp. na patogen *Pseudooidium neolycopersici*.
3. Studium vlivu elicitinu kryptogeinu na dynamické změny v subcelulární distribuci enzymu NADPHoxidasy zodpovědného za produkci reaktivních forem kyslíku u tabáku *Nicotiana tabacum*.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Stresové faktory a základní obranné reakce u rostlin

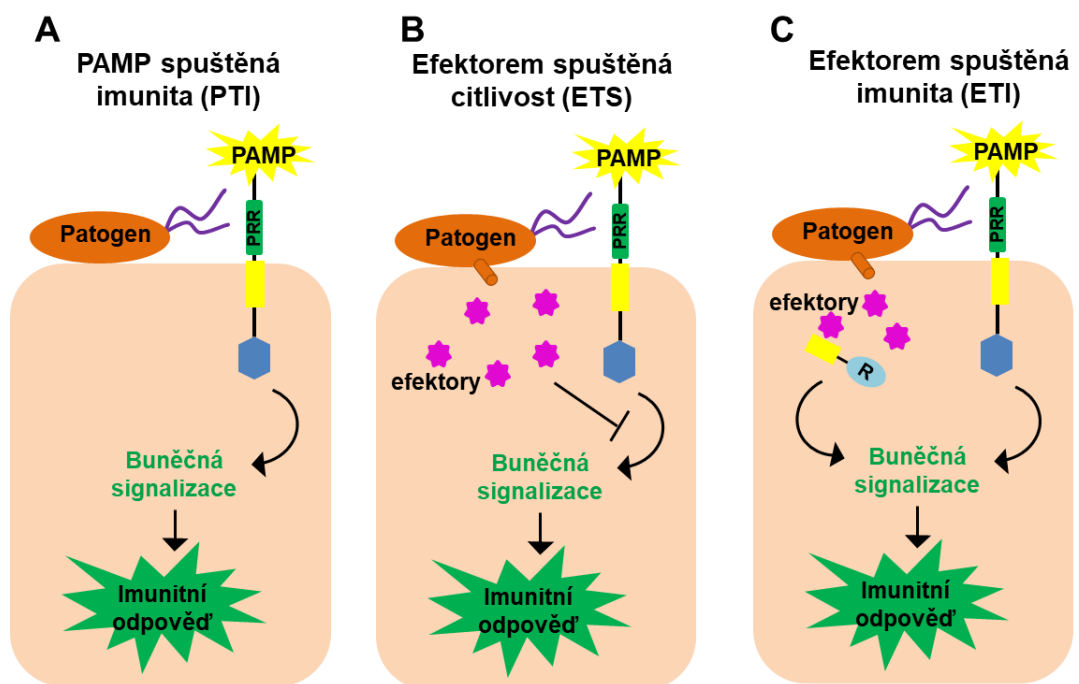
Rostliny jsou v průběhu svého života nepřetržitě vystaveny působení širokého spektra environmentálních stresů biotického a abiotického charakteru. Jedná se o abiotické stresové faktory, jako je vysoká a nízká teplota, UV záření, zasolení, sucho, přítomnost těžkých kovů nebo pesticidů, mechanické poškození atd. Mezi biotické stresové faktory se řadí např. infekce viry, bakteriemi, houbami a oomycetami. Všechny tyto stresové faktory vedou k významným ekonomickým ztrátám v zemědělství po celém světě. Z tohoto důvodu je výzkumu zaměřenému na studium obranných mechanismů věnována značná pozornost.

Rostliny vzhledem ke svému nepohyblivému způsobu života disponují četnými obrannými mechanismy, které se různým způsobem překrývají a doplňují. V případě konstitutivních obranných mechanismů má rostlina předem vytvořené fyzické bariéry (kutikula, buněčná stěna, trichomy, aj.) a chemické bariéry (sekundární metabolity, antimikrobiální sloučeniny, aj.), které jsou přítomné i bez působení stresového faktoru, a které omezují průnik patogenů do rostlinných buněk, jejich pomnožení a šíření rostlinným pletivem (Kliebenstein, 2012; Lazniewska *et al.*, 2012). Indukované obranné mechanismy vyžadují ke své aktivaci indukční signál. V rámci indukovaných obranných reakcí dochází např. k zesílení buněčné stěny, ke zvýšené produkci antimikrobiálních látek a obranných proteinů, ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) vedoucí k oxidativnímu nebo nitrosativnímu stresu. Následně může docházet k tzv. programované buněčné smrti (PCD, Programmed cell death) zabraňující šíření biotrofních patogenů v rámci příslušného hostitele (Van Loon *et al.*, 2006).

Obečně rostlinná obranná reakce zahrnuje rozpoznání extracelulárního signálu pomocí buněčných receptorů rostlin, které spouští komplexní signální dráhy vedoucí k odpovědi. Významnou signální roli v obranné reakci rostlin vůči různým formám stresu zastávají ROS, RNS a rostlinné hormony (Glazebrook, 2001; Knight a Knight, 2001). Přírozená obrana rostlin při interakci patogen-rostlina je nejčastěji popisována tzv. "cik-cak" modelem (Obr. 1), který poprvé uvedli Jones a Dangl (2006). Jedná se o vnitřní imunitní systém rostlin, který představuje dva typy interakcí mikrobiálních patogenů a rostlinných buněk. Jde o imunitu aktivovanou molekulárními vzory (sloučeninami) typickými pro mikroorganismy, tzv. MAMPs (Microbe-associated molecular patterns) nebo pro patogeny, tzv. PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns). Tyto konzervované molekuly jsou rozpoznávány prostřednictvím receptorů rozpoznávajících patogenní struktury (PRR, Pathogen recognition receptor) a po jejich vazbě na PRR dochází ke spuštění imunity (PTI, PRR-triggered immunity) (Mazzotta a Kemmerling, 2011).

Některé patogeny vylučují do cytoplazmy rostlinné buňky efektorové molekuly, které přispívají k virulenci patogenu potlačením PTI, což vede k efektorům spuštěné citlivosti (ETS, Effector-triggered susceptibility) (Jones a Dangl, 2006). Rostlina může na tyto efekторы reagovat

pomocí R-proteinů (receptorů) a spouští druhý stupeň obrany, tzv. efektem spuštěnou imunitu (ETI, Effector-triggered immunity). ETI je více specifická a účinnější než PTI, většinou indukuje hypersenzitivní reakci (HR) a PCD, která se projevuje odumřením buněk v místě napadení patogenem. HR a s ní spojená PCD představuje velmi efektivní obranný mechanismus proti biotrofním patogenům, které z odumřelého pletiva nemohou odebírat živiny (Speth *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2008; Boller a He, 2009; Spoel a Dong, 2012). HR je výsledkem interakce receptor – ligand na základě specifického spárování produktů genu rostlinné rezistence (*R*) a genu patogenní avirulence (*Avr*). Tento typ interakce patogen – rostlina nazýváme jako nekompatibilní, to znamená, že rostlina je schopna patogena rozpoznat a po proniknutí do hostitele je infekce potlačena.



Obr. 1 Schéma imunitního systému rostlin. A) Po infekci molekulárními vzory (sloučeninami) typickými pro buňky patogenů (PAMP) dochází k aktivaci povrchových receptorů (PRR) a následuje spuštění signální kaskády vedoucí k imunitě vyvolané PAMP (PTI). B) Virulentní patogeny produkují a uvolňují efekty (hvězdičky), které potlačují PTI a výsledkem je efektem spuštěná citlivost (ETS). C) Rostliny vybavené proteiny rezistence (*R*) rozpoznávají tyto specifické efekty a dochází k imunitní odpovědi zvané efektem spuštěná imunita (ETI) (přepřeváno dle Pieterse *et al.*, 2009).

1.2 Indukovaná rezistence

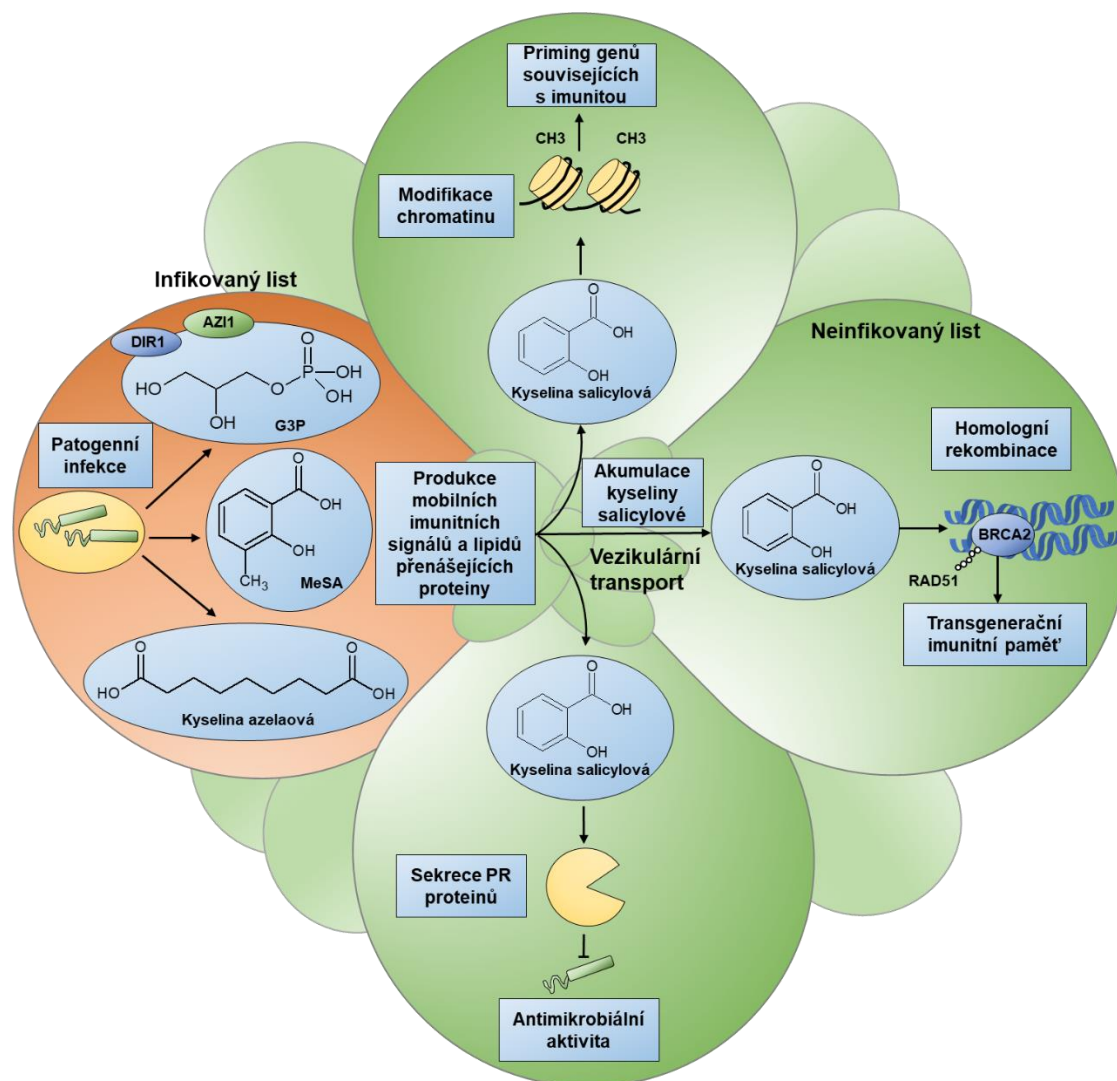
Na ochraně rostliny vůči patogenům se vedle konstitutivních obranných mechanismů, zahrnujících fyzické bariéry nebo přítomnost antimikrobiálních látek, podílí i tzv. indukované obranné mechanismy. Rostliny vnímají patogeny prostřednictvím elicitorů aktivujících různé obranné mechanismy vedoucí k indukované rezistenci (Ton et al., 2002; Wiesel et al., 2014). Vedle MAMPs/PAMPs existuje skupina molekul zvaná DAMPs (Damage-associated molecular patterns), což znamená molekulární vzory spojené s poškozením rostlin. Jedná se o molekuly uvolněné mechanickým nebo chemickým poškozením rostlinných endogenních struktur, které spouštějí imunitní odpovědi podobným PTI (Boller a Felix 2009; Liu a He, 2016).

Indukovaná rezistence je stav zvýšené obranyschopnosti rostliny vyvolaný vnějšími specifickými stimuly (Van Loon *et al.*, 1998). Tento stav zvýšené rezistence je účinný proti široké škále patogenů, hub, bakterií, virů, nematod, parazitických rostlin a býložravému hmyzu (Benhamou a Nicole, 1999; McDowell a Dangl, 2000; Walling, 2000; Kesler a Baldwin, 2002). Indukovaná rezistence může být výsledkem úspěšně překonané infekce, která již aktivovala obranný systém rostliny.

Podle místa, kde k indukované obranné reakci dochází, se rozlišuje lokální a systémová rezistence. Pokud se zvýšená odolnost proti napadení projevuje v místě infekce, označuje se tento typ rezistence jako lokálně získaná rezistence (LAR, Local acquired resistance) (Agrios, 2005). Je většinou aktivní pouze po krátkou dobu. Nejčastějším projevem je HR (Kombrink a Schmelzer, 2000), při které dochází k tvorbě lézí, vysychání odumřelého pletiva a tak ke zpomalení nebo zastavení šíření infekce. Kromě lokální reakce mohou rostliny aktivovat systémovou odezvu, v rámci které se vytvoří zvýšená obranná kapacita v částech rostliny vzdálených od místa primární infekce. Bylo charakterizováno několik forem biologicky indukovaných systémových obranných odpovědí, jako je systémová získaná rezistence (SAR, Systemic Acquired Resistance), která je vyvolána patogeny (Durrant a Dong, 2004), indukovaná systémová rezistence (ISR, Induced Systemic Resistance), která je aktivována např. při kolonizaci kořenů vybranými kmeny nepatogenních rhizobakterií (Van Loon *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 2003; Walters a Daniell, 2007) a indukovaná rezistence vyvolaná zraněním (WIR, Wound Induced Resistance), která je obvyklá po mechanickém poškození rostliny býložravým hmyzem (Sticher *et al.*, 1997; Van Loon *et al.*, 1998; Kessler a Baldwin, 2002). Jev, který může být spojen s různými typy indukované rezistence se označuje jako „priming“ (Conrath *et al.*, 2002). Poskytuje rostlině zvýšenou kapacitu pro rychlou a účinnou aktivaci buněčných obranných reakcí a umožňuje rostlině účinněji reagovat na působení následného stresového faktoru.

Klíčovou signální molekulou pro aktivaci SAR je kyselina salicylová (SA), jeden z rostlinných hormonů. Aktivace obranných mechanismů i v neinfikovaných částech rostliny zvyšuje celkovou rezistenci rostliny (Obr. 2). Pro SAR je charakteristický nárůst hladiny tzv. kyselých forem

proteinů souvisejících s patogenezí (stresové proteiny, tzv. PR proteiny, zkratka PR pochází z anglického označení „pathogenesis-related proteins“, viz kapitola 1.3) (Sticher *et al.*, 1997; Hammerschmidt a Nicholson, 1999; Pieterse a Van Loon, 2004).



Obr. 2 Translokace mobilních imunitních signálů vyvolávajících systémovou imunitu a imunitní paměť. Lokální infekce patogenem vede k produkci mobilních imunitních signálů: methylsalicylátu (MeSA), kyseliny azelaové, glycerol-3-fosfátu (G3P) a proteinů přenášejících lipidy DIR1 (Defective induced resistance 1) a AZI1 (Azelaic acid induced 1). Tyto mobilní signály jsou transportovány vaskulárním systémem do neinfikovaných částí rostliny, kde indukují akumulaci kyseliny salicylové (SA), která je signální molekulou pro systémovou získanou rezistenci. Akumulace SA indukuje: 1) syntézu proteinů souvisejících s patogenezí (PR) s antimikrobiálními účinky, 2) metylaci histonů a další modifikace chromatinu, které zvyšují expresi genů souvisejících s imunitou a navozují imunitní paměť a 3) somatickou homologní rekombinací prostřednictvím působení *BRCA2* (Breast cancer susceptibility 2) a *RAD51* (protein účastní se oprav dvouvláknových zlomů DNA) pro potenciální vytvoření transgenerační imunitní paměti (přepřacováno dle Spoel a Dong, 2012).

Na rozdíl od SAR není ISR asociována s lokální tvorbou nekrotických lézí. ISR se také liší tím, že je regulována signálními drahami fytohormonů kyseliny jasmonové (JA) a ethylenu (ET), a je často spojována s expresí bazických forem PR proteinů (Pieterse *et al.*, 2003). Napadení

herbivory spojené s následným mechanickým poškozením rostliny vede k uvolňování kyseliny linolenové z membrán a syntéze JA, která se podílí na aktivaci exprese obranných genů, jejichž produkty jsou zapojeny v obranných mechanismech rostlinného organismu (jedná se např. o aktivaci produkce inhibitorů proteinas, které inhibují aktivitu trávicích enzymů herbivorů) (Sticher *et al.*, 1997; Glawe *et al.*, 2003).

1.3 Proteiny spojené s patogenezí

S patogenezí související proteiny (PR proteiny) jsou základní složkou inducibilních obranných mechanismů rostlin. Poprvé byly identifikovány u rostlin tabáku po infekci virem tabákové mozaiky a následně detekovány u řady dalších rostlinných druhů (Van Loon a Van Kammen, 1970; Ali *et al.*, 2018a). PR proteiny jsou malé proteiny molekulových hmotností v rozsahu 6 až 43 kDa. Tyto proteiny jsou stabilní při nízkém pH a jsou rezistentní k proteasám. V závislosti na jejich izoelektrickém bodě (pI) je lze rozdělit na kyselé a bazické PR. Kyselé PR proteiny jsou většinou sekretovány do extracelulárního prostoru, zatímco bazické jsou transportovány do vakuoly prostřednictvím signální sekvence na C-konci. PR proteiny se nachází téměř ve všech rostlinných orgánech, přičemž největší množství bylo detekováno v listech. Některé z PR proteinů jsou exprimovány konstitutivně v některých orgánech nebo v průběhu určitých vývojových fází, jiné pouze v odpovědi na chemické faktory nebo je jejich exprese indukována po infekci patogeny, jako jsou viry, bakterie, houby a oomycety. Dále mohou být exprimovány po napadení nematodami, hmyzem nebo býložravci (Sudisha *et al.*, 2012; Sinha *et al.*, 2014). Velmi rychlá a systémová akumulace kyselých PR proteinů je jedním z hlavních fyziologických rysů SAR. Většina PR proteinů vykazuje antifungální, antibakteriální, antivirální, insekticidní nebo nematocidní aktivitu. Některé z nich vykazují enzymovou aktivitu jako β -1,3-glukanasy (EC 3.2.1.6), chitinasy (EC 3.2.1.14) nebo peroxidasy (EC 1.11.1.-). Mezi PR proteiny patří rovněž antimikrobiální proteiny defensiny nebo proteiny přenášející lipidy. Aplikace chemikálií jako je např. kyselina β -aminomáselná (BABA), acibenzolar-S-methyl nebo probenazol (napodobující účinek patogenní infekce), vede k expresi PR genů a následné SAR (Oostendorp *et al.*, 2001). Některé kmeny saprofytických a endofytických bakterií a hub rovněž indukují produkci PR proteinů a mohou se tak podílet na zvyšování odolnosti rostlin vůči chorobám (Sudisha *et al.*, 2012). Řada molekul odvozených od patogenů, stejně jako fragmenty chitinu, glukany, glykoproteiny, proteiny, peptidy, oligosacharidy z bakterií a hub mohou působit jako elicitory exprese PR genů. Přítomnost těžkých kovů a toxických chemikálií, exogenní aplikace mikromolárních koncentrací různých abiotických induktorů, jako je SA, methylsalicylát (MeSA), JA, methyljasmonát (MeJA), oligosacharidy, auxiny, cytokininy, peroxid vodíku, chitosan, oligogalakturonidy se rovněž mohou podílet na indukci exprese PR genů u rostlin. Po infekci patogeny nebo kontaktu s molekulami odvozenými od patogenů rostliny zvyšují produkci ROS a tvorbu SA, JA a ET. Během patogeneze je obvykle zvýšená exprese PR genů indukována signálními molekulami, jako je SA a ROS, které aktivují expresi kyselých PR proteinů. Na indukci bazických proteinů se podílí ET a MeJA (Sinha *et al.*, 2014).

V současné době jsou PR proteiny děleny do 17 tříd na základě podobnosti v aminokyselinové sekvenci, enzymové aktivitě a dalších biologických vlastností (Tab. 1) (Golshani *et al.*, 2015). Tyto proteiny nicméně disponují velkou rozmanitostí ve specifitě a mechanismu působení.

Tab. 1 Shrnutí všech známých tříd PR proteinů a jejich základních vlastností (přepřacováno podle Sels *et al.*, 2008; Sinha *et al.*, 2014)

| Třída | Typ proteinu | Vlastnost | Velikost (kDa) | Cíl v buňce |
|-------|--------------------------------------|--|----------------|---------------------|
| PR-1 | PR-1a, PR-1b, PR-1c | Antifungální | 15 | Neznámý |
| PR-2 | β -1,3-glukanasy | Glukanasy | 30 | β -1,3-glukan |
| PR-3 | Chitinasy typu I, II, IV, V, VI, VII | Chitinasy | 25-30 | Chitin |
| PR-4 | Chitinasy typu I a II | Antifungální, chitinasy | 15-20 | Chitin |
| PR-5 | Thaumatín-like proteiny | Antifungální | 25 | Membrána |
| PR-6 | Proteasový inhibitor I (rajče) | Inhibitory proteas | 8 | ----- ^a |
| PR-7 | Endoproteinasa P (rajče) | Endoproteasy | 75 | ----- ^a |
| PR-8 | Chitinasa (okurka) | Chitinasy | 28 | Chitin |
| PR-9 | Lignin-tvořící peroxidasa (tabák) | Peroxidasy | 35 | ----- ^a |
| PR-10 | PR-1, MLP, CSBP, NCS (petržel) | Podobná ribonukleasam | 17 | ----- ^a |
| PR-11 | Chitinasa typu V (tabák) | Chitinasy | 40 | Chitin |
| PR-12 | Rs-AFP3 (ředkvička) | Antimikrobiální, defensiny | 5 | Membrána |
| PR-13 | THI2.1 (<i>Arabidopsis</i>) | Thioniny | 5 | Membrána |
| PR-14 | Lipidy-přenašející proteiny | Přenašeče fosfolipidů a mastných kyselin | 9 | Membrána |
| PR-15 | OxOa germin (ječmen) | Oxalát oxidasy | 20 | ----- ^a |
| PR-16 | OxOLP (ječmen) | Podobná oxalát oxidasam | 20 | ----- ^a |
| PR-17 | PRp27 (tabák) | Neznámá | 27 | ----- ^a |

MLP = hlavní latexové proteiny; CSBP = proteiny specificky vážící cytokinin; NC = (S)-norcochlorinsynthasa;

^a *In vitro* nebyla zaznamenána antimikrobiální aktivita

PR-1 třída je nejvíce zastoupenou skupinou PR proteinů a můžeme ji rozdělit na proteiny kyselá a bazické. Kyselá PR-1 proteiny byly detekovány v tabáku, rajčeti, ječmeni, kukuřici, petrželi, *Arabidopsis* a v mnoha dalších rostlinách patřících do čeledi lipnicovité, lilkovité, merlíkovité a laskavcovité. Jsou rozpustné v kyselých pufrách a mají nízké molekulové hmotnosti (14–16 kDa) (Gordon-Weeks *et al.*, 1997). PR-1 jsou vysoce rezistentní k proteolýze a jsou dobře přizpůsobeny na extracelulární prostředí. Geny kódující kyselá PR-1 proteiny neobsahují žádnou sekvenci pro cílení do vakuoly. Bazické proteiny PR-1 obsahují hydrofobní N-koncovou oblast 30 aminokyselin, která funguje jako signální peptid pro translokaci do endoplazmatického retikula a C-konec obsahuje signál pro přesun do vakuoly (Sudisha *et al.*, 2012). Bazické isoformy PR-1 proteinu byly identifikovány např. v *Arabidopsis*, celeru, kukuřici a dalších obilovinách (Buchel *et al.*, 1999).

Proteiny třídy PR-2 vykazují β -1,3-glukanasovou aktivitu. Tyto proteiny katalyzují hydrolytické štěpení 1,3- β -D-glukosidických vazeb v β -1,3-glukanech (Leubner-Metzger a Meins, 1999). Jsou lokalizovány v epidermis starších listů a kořenů zdravých rostlin.

β -1,3-glukanasa byla popsána v kulturách buněčné suspenze ječmene a rajčat. Většina β -1,3-glukanas reaguje na vývojové a patogenní signály.

Rostlinné chitinasy jsou klasifikovány na základě sekvenční homologie a přítomnosti nebo nepřítomnosti chitin-vazebné domény (CBD) do čtyř tříd PR proteinů (PR-3, 4, 8 a 11). Chitinasy jsou endo- β -1-4-glukosaminidasy, které hydrolyzují vazby β -1-4 mezi N-acetylglukosaminovými zbytky chitinu (Sudisha *et al.*, 2012).

Do třídy PR-5 patří proteiny bohaté na cystein, které jsou nazývány jako proteiny podobné thaumatinu (TLP - Thaumatin-like proteins), na základě podobnosti se sekvencí thaumatinu. PR-5 jsou proteiny s antimykotickou aktivitou a byly identifikovány v mladých listech tabáku. Tyto proteiny se rychle akumulují ve vyšších koncentracích při biotickém a abiotickém stresu. Kromě thaumatinu řadíme do této skupiny osmotin. Osmotin je cytotoxický protein, který zvyšuje odolnost rostlin proti různým biotickým a abiotickým stresům (Hakim *et al.*, 2018).

Inhibitory proteinas jsou řazeny do třídy PR-6. Jsou to velmi stabilní defenzivní proteiny, které jsou indukovány pouze v reakci na napadení rostliny hmyzem a patogeny. Jsou klasifikovány na základě typu proteinasy, kterou inhibují: 1) inhibitory serinové proteinasy, 2) inhibitory cysteinové proteinasy a 3) inhibitory aspartát/metaloproteinasy (Sudisha *et al.*, 2012).

Třída PR-7 zahrnuje proteiny s endoproteinovou aktivitou. Aminokyselinová sekvence vykazuje homologii s proteinasou podobnou subtilisinu a hraje roli v rezistenci u rostlin rajčete v reakci na napadení patogeny (Torenero *et al.*, 1997).

Proteiny třídy PR-9 vykazují peroxidasovou aktivitu. Jedná se o glykoproteiny obsahující skupinu hem, které katalyzují reakci peroxidu vodíku s širokým spektrem organických a anorganických substrátů. Vyskytují se v několika isoformách. Jsou zapojeny do celé řady fyziologických procesů a také do obranné reakce proti patogenům (Sudisha *et al.*, 2012). Peroxidasy jsou klíčovými enzymy v biosyntéze ligninu a suberinu. Jsou spojovány s mnoha mechanismy, které mohou přispět k rezistenci rostliny, jako je HR, zesíťování polysacharidů a depozice fenolických komponent v rostlinné buněčné stěně během obranných reakcí (Thakker *et al.*, 2013).

Třída PR-10 obsahuje obranné proteiny podobné ribonukleasám. Tyto proteiny se vyskytují např. v bramborách, chřestu, fazoli a rýži (Shivakumar *et al.*, 2000) a jsou zapojeny ve fyziologicky významných procesech a rovněž v obranné reakci rostlin na patogeny (Hwang *et al.*, 2003).

Defensiny představují třídu PR-12. Na základě rozdílů v aminokyselinové sekvenci byly defensiny rozděleny do čtyř skupin (Sudisha *et al.*, 2012). Jsou přítomny v listech, hlízách, květech, luscích a semenech. Jsou přítomny ve zdravých neinfikovaných pletivech a po plísňové nebo bakteriální infekci dochází k jejich akumulaci v rostlině (Pennecks *et al.*, 1996; Olendo *et al.*, 1999; Thomma *et al.*, 2002).

Proteiny třídy PR-13 jsou thioniny. Jedná se o malé 5 kDa proteiny bohaté na cystein izolované nejdříve z ječmene a poté z kořenů a listů ovsa, žita, kukuřice, rajčete a papáji. Thioniny jsou exprimovány konstitutivně a také v reakci na infekci patogenem (Sudisha *et al.*, 2012).

Proteiny přenášející lipidy (LTP) byly klasifikovány jako třída PR-14. LTP obsahují 90–95 aminokyselin a byly identifikovány v různých pletivech u rostlin, jako je např. kukuřice, ječmen, špenát a bavlna. LTP jsou vylučovány do extracelulárního prostoru, kde se zřejmě podílí na modifikacích v rámci buněčné stěny (Sudisha *et al.*, 2012).

Oxalát oxidasa (EC 1.2.3.4) a proteiny podobné oxalát oxidase (OLP, Oxalate oxidase-like proteins) jsou označovány jako PR-15 a PR-16. Oxalát oxidasa a OLP sdílí sekvenční podobnost s pšeničnými germiny. Germin-like proteiny (GLP) jsou rozmanité a všudypřítomné glykoproteiny, běžně se vyskytující v různých rostlinách. GLP jsou řazeny do třídy PR-16. GLP mohou vykazovat enzymovou aktivitu, jako má např. superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), oxalát oxidasa a polyfenoloxidasa (EC 1.14.18.1). GLP jsou lokalizovány v buněčné stěně a mohou se podílet na zesílení buněčné stěny v procesu zesíťování komponent rostlinné buněčné stěny během tvorby papír, což způsobuje jejich zvýšenou odolnost vůči infekci (Pei *et al.*, 2019).

Proteiny třídy PR-17 jsou sekvenčně podobné s aminopeptidasami eukaryot a termolysinů z bakterií, což poukazuje na jejich proteolytické vlastnosti (Christensen *et al.*, 2002).

Zvýšená exprese PR proteinů a jejich významná role v obranném mechanismu rostlin by mohla být využita při zvyšování rezistence zemědělských plodin k patogenům. Na druhou stranu praktické využití poznatků o úloze PR proteinů může být ovlivněno skutečností zjištěných v posledních letech, a to že PR proteiny mohou působit jako lidské alergeny. Díky svým vlastnostem, jako je velikost, stabilita a odolnost k proteasám jsou tyto proteiny vhodnými kandidáty pro vyvolání alergických reakcí (Hoffmann-Sommergruber, 2000; Sinha *et al.*, 2014).

1.4 Reaktivní formy kyslíku v rostlinách

Při nerovnováze mezi produkcí a degradací ROS může dojít ke zvýšení hladiny ROS vedoucí k tzv. oxidačnímu stresu. Nadprodukce ROS je pro buněčné prostředí nežádoucí a způsobuje oxidační poškození biomolekul, zejména DNA, lipidů a proteinů vedoucí k narušení jejich funkcí a případně až k buněčné smrti (Neil *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2018b). Oxidace proteinů působením ROS je dobře popsána např. pro enzymy Calvinova cyklu, transkripční faktory, signální kinasy, fosfatasy, proteasy a proteiny vázající RNA. Proteiny s oxidačním poškozením jsou rychle označeny pro degradaci v proteasomu a autofagii. Oxidované a denaturované proteiny mohou ještě před degradací sloužit jako signály oxidačního stresu. Účinek ROS na proteiny může být také nepřímý a vyvolaný konjugací s reaktivními produkty peroxidace mastných kyselin, která zvyšuje citlivost proteinů na proteolytickou degradaci. Všechny tyto modifikace proteinů vyvolané ROS byly popsány v rostlinách vystavených působení různých stresových faktorů (Czarnocka a Karpiński, 2018).

1.4.1 Přehled reaktivních forem kyslíku a jejich funkce v rostlinách

Přehled ROS vyskytující se v rostlinách je shrnut v tabulce (Tab. 2).

Tab. 2 Přehled reaktivních forem kyslíku vyskytujících se v rostlinné buňce (přepřacováno dle Piterková *et al.*, 2005)

| Sloučenina | Značení |
|----------------------------|----------------------------|
| hydroxylový radikál | OH^\cdot |
| perhydroxylový radikál | O_2H^\cdot |
| peroxid vodíku | H_2O_2 |
| singletový kyslík | $^1\text{O}_2$ |
| superoxidový anion-radikál | $\text{O}_2^{\cdot-}$ |

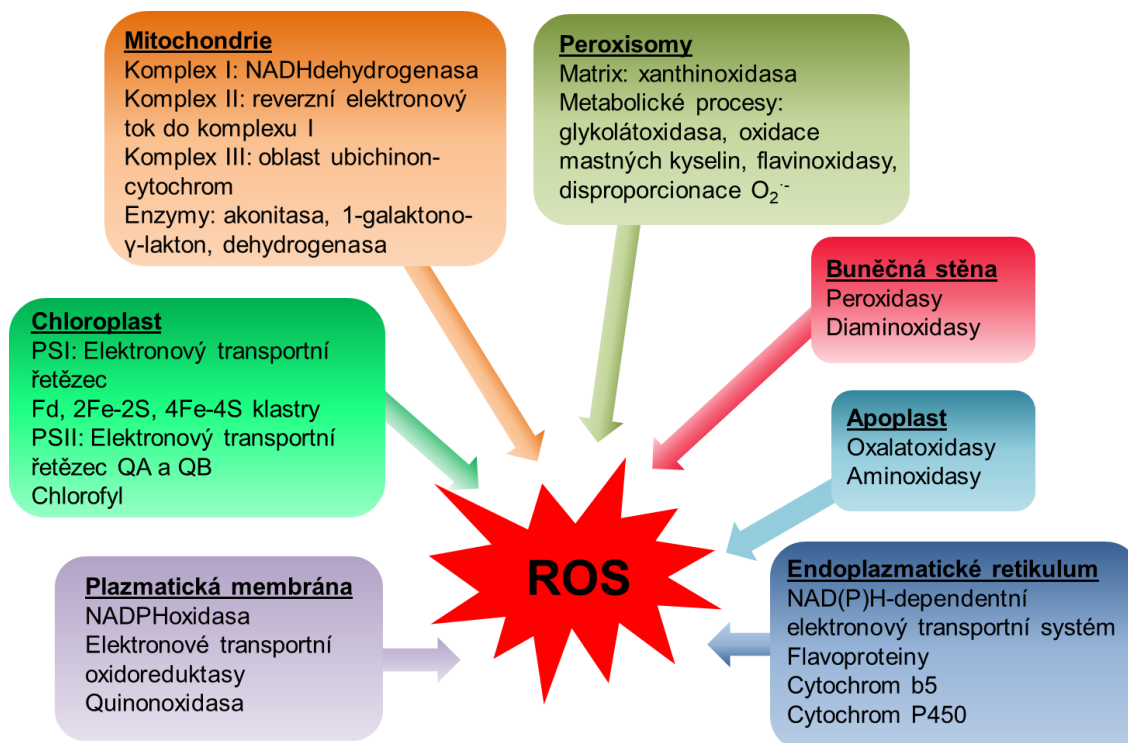
Peroxid vodíku (H_2O_2) je reaktivní molekula se střední dobou života asi 1 ms. Je schopný procházet membránami prostřednictvím aquaporinů a oproti jiným ROS tak difunduje na delší vzdálenosti v řádu μm (Czarnocka a Karpiński, 2018). Jako signální molekula je H_2O_2 zapojen v řadě regulačních procesů v rámci fyziologického vývoje rostliny a dále v obranné reakci vyvolané působením abiotických a biotických stresových faktorů. H_2O_2 je klíčovým regulátorem mnoha fyziologických procesů, jako je klíčivost a růst semenáčků, fotosyntéza, stomatální pohyb, buněčný růst, aktivace antioxidantního systému, senescence, gravitropismus a vývoj kořenového systému, tvorba adventivních kořenů, vývoj buněčné stěny a PCD. PCD je aktivní proces vyvolaný zvýšenou produkcí ROS důležitý v obranném mechanismu rostliny proti biotrofním patogenům a vyžaduje zapojení SA (Khan *et al.*, 2018).

Hydroxylový radikál (OH^\cdot) se podílí na lipidické peroxidaci. Oxidované mastné kyseliny, nazývané oxylipiny, jsou důležitými signálními molekulami v odezvě rostlin na stres (Eckardt, 2008). Peroxidace lipidů má za následek změnu fluidity membrány, ztrátu její integrity a inaktivaci membránových proteinů a iontových kanálů. Zvýšená hladina peroxidace lipidů byla prokázána v mnoha studiích zaměřených na abiotický stres (salinita, sucho, chladno a stres těžkými kovy) (Sharma *et al.*, 2012; Hossain *et al.*, 2015). Produkty lipidové peroxidace mohou způsobit další poškození buněk např. reakcí s proteiny a nukleovými kyselinami, které jsou vzdálené od místa vzniku ROS (Ayala *et al.*, 2014).

Superoxidový anion-radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$) je středně reaktivní molekula a má relativně krátkou dobu života 2-4 μs . V Haber-Weissově reakci dochází k vzniku reaktivnějšího a toxičtějšího OH^\cdot reakcí $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Czarnocka a Karpínski, 2018).

1.4.2 Zdroje reaktivních forem kyslíku v rostlinách

V rostlinách existuje celá řada zdrojů ROS nacházejících se v různých částech buňky. ROS jsou produkovány jak v rámci metabolismu za fyziologických podmínek (např. v průběhu fotosyntézy a respirace), tak také v reakci na působení stresových faktorů, a to enzymovými i neenzymovými reakcemi (Apel a Hirt, 2004). Jejich přehled je zobrazen na Obr. 3. Zatímco u živočichů jsou hlavním zdrojem ROS mitochondrie, primárními producenty ROS v zelených pletivech rostlin jsou chloroplasty a peroxisomy (Czarnocka a Karpínski, 2018).



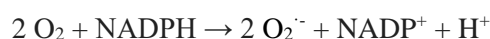
Obr. 3 Místa produkce reaktivních forem kyslíku u rostlin (přepřacováno dle Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

V rostlinných buňkách je velké množství zdrojů ROS lišící se místem produkce a typem ROS. V chloroplastech vzniká při fotosyntéze $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , zatímco fotorespirační H_2O_2 je dominantní ROS v peroxisomech. V mitochondriích tvorba $\text{O}_2^{\cdot-}$ probíhá částečnou redukcí kyslíku na komplexech dýchacího řetězce během oxidativní fosforylace, kdy vznikající $\text{O}_2^{\cdot-}$ je dále dismutován na H_2O_2 katalýzou SOD. Apoplastický $\text{O}_2^{\cdot-}$ je produkován zejména aktivitou NADPHoxidasy (EC 1.6.3.1). Na produkci H_2O_2 se v apoplastu podílí aminosy (EC 1.4.3.6) a peroxidasy buněčné stěny (Dat *et al.*, 2000; He *et al.*, 2018).

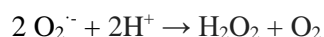
1.4.3 NADPHoxidasa

Apoplastické ROS jsou produkovány zejména NADPHoxidasami, které se nachází na plazmatické membráně (Savatin *et al.*, 2014; Rahikainen *et al.*, 2016). Kontrolovaná produkce ROS patří mezi nejdůležitější obranné reakce na patogenní invazi v rostlinných buňkách (Torres *et al.*, 2006; Ellinger *et al.*, 2013). NADPHoxidasy rostlin jsou homology savčích enzymů nazývaných jako „Respiratory burst oxidase homologs“ (RBOH). ROS produkované RBOH hrají důležitou roli ve fyziologických procesech, jako je např. buněčná proliferace při tvorbě kořenového vlášení nebo růst pylové láčky, dále jsou zapojeny do rostlinné obrany proti patogenům aktivací HR a regulací vrozené imunity, důležitou roli hrají ROS při reakci na abiotický stres, jako je např. nefyziologické světelné podmínky, poranění, salinita, teplo, chlad, hypoxie a přítomnost těžkých kovů (Czarnocka a Karpiński, 2018).

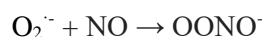
RBOH je enzym lokalizovaný v plazmatické membráně (Sagi a Fluhr, 2006) a ukazuje se, že může být přítomný i na endomembránách rostlinné buňky (Noirot *et al.*, 2014) podobně, jako je tomu u živočichů (Ushio-Fukai, 2009). RBOH mají vazebná místa pro NADPH (Suzuki *et al.*, 2011; Kadota *et al.*, 2015), které přenášejí elektrony z cytosolického NADPH na apoplastický kyslík za vzniku $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Mittler *et al.*, 2004):



V dalším kroku se radikál superoxidového aniontu redukuje na peroxid vodíku a kyslík v reakci katalyzované SOD (Garg a Manchanda, 2009).



Kromě toho může superoxidový radikál reagovat s NO za tvorby peroxynitritu (Drzeżdżon *et al.*, 2018).

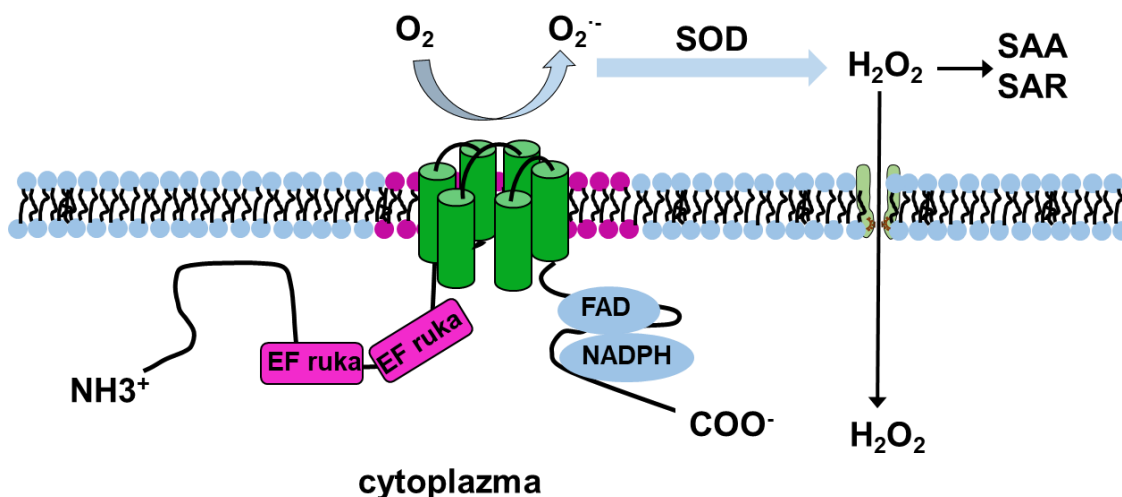


V případě přítomnosti volných iontů železa následně peroxid vodíku může procházet Fentonovou reakcí (Garg a Manchanda, 2009). Během této reakce je produkován hydroxylový radikál.



Hydroxylové radikály jsou vysoce reaktivní vůči širokému spektru biomolekul.

RBOH je membránový protein složený z 6 transmembránových domén spojených s 2 molekulami hemu. Na N-konci RBOH se nachází regulační místo se dvěma navázanými vápnatými ionty (Ca^{2+}) a fosforylační doména, na C-konci jsou vazebná místa pro koenzymy NADPH a FAD. N-konec obsahuje motivy EF-ruky (EF-ruka je proteinový motiv tvořený dvěma α helixy E a F, které v určité poloze připomínají lidskou ruku) (Suzuki *et al.*, 2011), jak můžeme vidět na Obr. 4.



Obr. 4 Model struktury rostlinných NADPHoxidas (RBOH). Zelené válce představují šest transmembránových helixů. N-koncové domény obsahují dvě domény EF-ruka zodpovědné za vazbu vápnatých iontů. C-koncová doména obsahuje vazebná místa pro FAD a NADPH. Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) je generován z extracelulárního kyslíku (O_2). $\text{O}_2^{\cdot-}$ je dismutován na peroxid vodíku (H_2O_2), který může působit jako signální molekula. Zkratky: SAA - systémová získaná aklimatizace, SAR - systémová získaná rezistence, SOD - superoxidodismutasa (přepracováno dle Liu a He, 2016).

RBOH byly studovány u řady rostlinných druhů jako např. *Arabidopsis*, ječmen, okurka, kukuřice, rýže, tabák a rajče (Zhang *et al.*, 2010; Marino *et al.*, 2012; Adachi *et al.*, 2015). Jedná se o vysoce konzervované proteiny. Genom *Arabidopsis thaliana* (At) kóduje celkem 10 RBOH s označením AtRBOHA - AtRBOHJ (Liu a He, 2016; Noctor *et al.*, 2018). Např. AtRBOHC se podílí na růstu kořenového vlákna (Foreman *et al.*, 2003) nebo AtRBOHE/H/J na vývoji a funkci pylu (Lassig *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2014). Mezi deseti AtRBOH je AtRBOHD konstitutivně a všudypřítomně exprimována. AtRBOHD vykazuje vysoký stupeň citlivosti na stres (Suzuki *et al.*, 2011).

Obecně rostlinné RBOHD/E/F jsou klíčové pro tvorbu ROS v listech, RBOHB v semenech a RBOHC v kořenech (Marino *et al.*, 2012). RBOHD/F se účastní stresových odpovědí souvisejících s patogenezí a signalizací spojenou se stresovou odpovědí např. na poranění, sucho a zasolení (Noctor *et al.*, 2018). RBOHD/F jsou zodpovědné za produkci ROS v rámci fyziologických procesů jako je např. zavírání průduchů indukované kyselinou abscisovou (ABA) (Qi *et al.*, 2018).

1.4.3.1 Produkce reaktivních forem kyslíku závislá na NADPHoxidase při biotickém a abiotickém stresu u *Arabidopsis thaliana*

Rostliny reagují na útok patogenů tím, že využívají ROS k vyvolání HR, SAR, aklimatizaci a produkci stresových hormonů a s tím související indukcí obranných mechanismů (Apel a Hirt 2004; Vellosillo *et al.*, 2010; Karuppanapandian *et al.*, 2011; Tripathy a Oelmüller, 2012). Zvýšená produkce ROS se objevuje v místě napadení rostliny patogenem v buněčné stěně, plazmatické membráně, okolo mitochondrií a chloroplastů a v průběhu pozdních infekčních stádií se účastní PCD infikovaných pletiv tak, aby bylo omezeno šíření infekce. Bylo prokázáno, že produkce ROS závislá na AtRBOHD je obecně přítomným mechanismem v reakci např. na napadení patogeny, mechanické poškození, na ošetření rostlin BABA, rostlinnými hormony SA a MeJA (Liu a He, 2016).

Analýza mutantu *atrbohD* ukazuje, že v různých interakcích rostlina-patogen jsou pozorovány rozdílné odpovědi. Například mutant *atrbohD* je odolnější než „divoký genotyp“ na infekci biotrofní oomycetou *Peronospora parasitica* (Torres *et al.*, 2002) nebo nekrotrofní houbou *Alternaria brassicicola* (Pogany *et al.*, 2009), naopak stejný mutant je citlivější než „divoký genotyp“ k infekci biotrofní houbou *Golovinomyces cichoracearum* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2010) nebo nekrotrofní bakterií *Dickeya dadantii* (Fagard *et al.*, 2007). Funkcí AtRBOHD v reakci na MAMP nebo DAMP je produkce ROS pro biosyntézu ligninu a ukládání kalosy (Liu a He, 2016). Indukce stomatální imunity, což znamená rychlé uzavření průduchů při napadení patogeny s cílem omezit vstup patogenů do rostlinného pletiva (tzv. stomatální uzavření), je jednou z imunitních odpovědí spouštěných MAMP, kde hraje AtRBOHD spolu s AtRBOHF klíčovou roli (Mersmann *et al.*, 2010; Macho *et al.*, 2012). Ukázalo se také, že AtRBOHD je zapojena v odpovědi na různé abiotické stresy, např. teplotní šok, hypoxie, ozón a salinita (Liu a He, 2016).

Další funkcí AtRBOHD/F je indukce akumulace prolinu (AtRBOHD má v tomto mechanismu výraznější roli) (Ben Rejeb *et al.*, 2015a; Ben Rejeb *et al.*, 2015b). Takto indukovaná akumulace prolinu může být aktivována při odpovědi rostliny např. na zvýšenou koncentraci chloridu sodného a mannitolu v prostředí (Ben Rejeb *et al.*, 2015b).

1.4.3.2 Regulace rostlinné NADPHoxidasy

RBOH jsou aktivovány vazbou Ca^{2+} na motiv EF-ruky v N-koncových oblastech daného enzymu (Kadota *et al.*, 2015). Mutační studie proteinů RBOH prokázala, že vazba Ca^{2+} na tyto motivy EF-ruky je pro produkci ROS důležitá (Ogasawara *et al.*, 2008; Kadota *et al.*, 2015). K regulaci proteinů RBOH může dojít prostřednictvím Ca^{2+} -dependentních proteinkinás (CPK). Heterologní exprese AtRBOHD v savčí buněčné linii HEK293T ukázala, že přímá fosforylace a Ca^{2+} ionty vázané na motivy EF-ruky synergicky aktivují AtRBOHD (Ogasawara *et al.*, 2008).

AtRBOHD může být substrátem serin/threonin proteinkinasy BIK1 (EC 2.7.11.1, Botrytis-induced kinase 1) (Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Funkční analýza odhalila, že fosforylace AtRBOHD zprostředkovaná BIK1 je nutná pro produkci ROS indukovanou MAMP a pro stomatální imunitu (Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Monaghan *et al.*, 2014). Regulace AtRBOHD působením BIK1 poskytuje mechanismus pro rychlou regulaci stresem-indukované produkce ROS na plazmatické membráně. Kromě toho bylo prokázáno, že fosforylace BIK1 zprostředkovaná AtCPK28 negativně reguluje AtRBOHD-dependentní produkci ROS. Fosforylace zprostředkovaná AtCPK28 by mohla usnadňovat degradaci BIK1 (Liu a He, 2016).

Nově byly popsány další typy kinas, jako jsou proteiny Open Stomata1 (OST1-serin/threonin proteinkinasa) nebo kalcineurin B-like (CBL)-interagující proteinkinasy (CIPK), které se podílejí na fosforylaci RBOH (Czarnocka a Karpiński, 2018).

Signalizace prostřednictvím mitogenem aktivovaných proteinkinás (MAPK, EC 2.7.11.24) se podílí jak na růstu a vývoji rostlin, tak i na reakcích rostlin na biotický a abiotický stres (Rodriguez *et al.*, 2010; Liu, 2012; Hettenhausen *et al.*, 2015). MAPK signalizace může být regulována hladinou ROS a rovněž se může podílet na indukci nebo regulaci produkce ROS (Pitzschke a Hirt, 2006). Apoplastický H₂O₂, produkovaný aktivací RBOH, může být odpovědný za aktivaci signální dráhy MAPK, která vede k expresi genů kódující enzymy regulující hladinu ROS v rostlině ve stresových podmínkách (Liu a He, 2016; Locato *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2018). Např. u *Solanum lycopersicum*, MAPK1/2 řídí expresi cytosolické askorbátperoxidasy (APX, EC 1.11.1.11), glutathionreduktasy 1 (GR1, EC 1.8.1.7), katalasy 1 (CAT1, EC 1.11.1.6), zatímco MAPK5 a MAPK 6 řídí expresi Cu/Zn-SOD u rostlin vystavených nadměrnému ozáření a expresi FeSOD v důsledku salinitního stresu u *Arabidopsis* (Liu a He, 2016).

RBOH proteiny mohou být dále regulovány prostřednictvím kyseliny fosfatidové (PA) produkované činností enzymu fosfolipasy D (PLD, EC 3.1.4.4), která je spojená s plazmatickou membránou a může hydrolyzovat fosfolipidy (Zhang *et al.*, 2009a). V eukaryotických buňkách syntéza PA jako signální molekuly závisí na dvou odlišných enzymových systémech. PLD mohou hydrolyzovat strukturální fosfolipidy uvnitř membrán, které uvolňují přímo PA (Wang *et al.*, 2012), zatímco diacylglycerolkinasy (DGK, EC 2.7.1.107) mohou katalyzovat fosforylaci diacylglycerolu (DAG) za tvorby PA (Arisz *et al.*, 2009). V rostlinách *A. thaliana* jsou AtPLD α 1 a PA zapojeny do regulace aktivity AtRBOHD. PA se váže a aktivuje AtRBOHD přes aminokyseliny arginin nacházející se v pozicích 149, 150, 156 a 157 na N-koncové části proteinu. Aktivace AtRBOHD vlivem PA je důležitá pro produkci ROS a v procesech uzavírání průduchů indukovaných ABA (Zhang *et al.*, 2009a). DAG může vznikat buď pomocí enzymu fosfoinositid-fosfolipasy C (PI-PLC, EC 3.1.4.11), která působí na fosforylované fosfoinositidy nebo nespecifickými PLC, které využívají strukturální fosfolipidy (Pokotylo *et al.*, 2013; Pokotylo *et al.*, 2014). Jak inhibitory PI-PLC, tak inhibitory DGK redukovaly produkci PA po elicitaci β -kryptogeinem (β -CRY, elicitin vylučovaný oomycetou *Phytophthora cryptogea*) a snížily tak

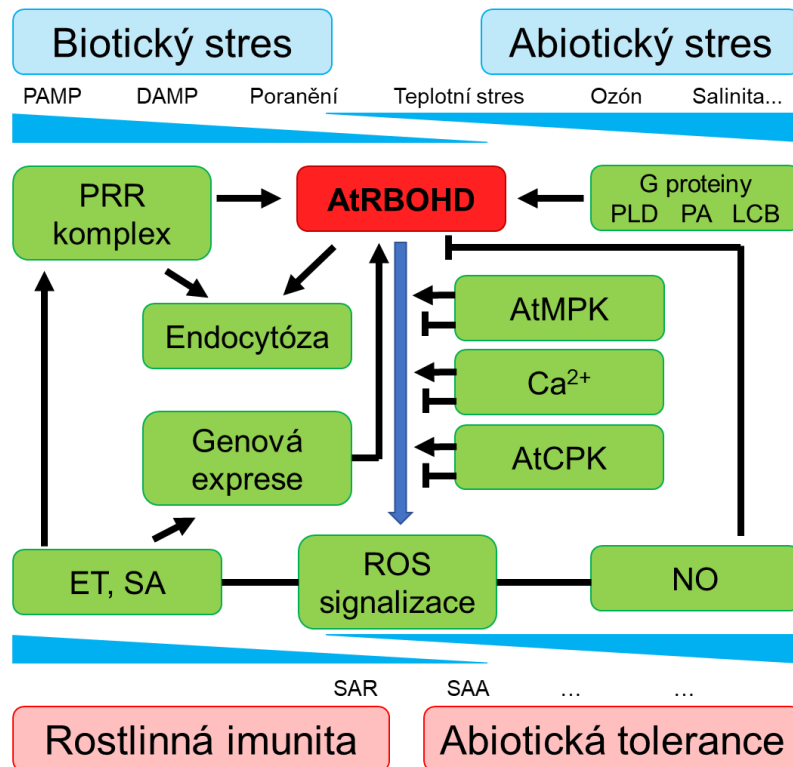
produkci ROS závislou na RBOHD u tabákové buněčné suspenze *Nicotiana tabacum* cv. Bright yellow-2 (BY-2). U tabákové transgenní linie deficientní pro DGK fylogenetického kladu III došlo k signifikantnímu snížení oxidačního stresu po přidání β -CRY. Umlčením DGK kladu III nedochází k indukovanému zvýšení PA pomocí β -CRY, což jednoznačně demonstruje zapojení těchto enzymů v reakci na β -CRY. Zdá se, že PA vznikající katalýzou DGK kontroluje aktivitu RBOH. Tato zjištění poukazují na přímou regulaci RBOHD vznikající PA produkovanou v dráze PI-PLC/DGK (Cacas *et al.*, 2017).

G proteiny mohou také regulovat aktivitu AtRBOHD. Heterotrimerní G protein, složený z α , β a γ podjednotky tvoří komplexy kotvené na membránu, které zprostředkují přenos signálu. Genom *Arabidopsis* kóduje jednu $G\alpha$, jednu $G\beta$ a tři $G\gamma$ podjednotky (Nitta *et al.*, 2015). Např. u průduchů se ukazuje, že důležitou roli v regulaci produkce ROS závislé na AtRBOHD/F hraje podjednotka $G\gamma$ (Hao *et al.*, 2012).

Výsledky získané ve studii Hao *et al.* (2014) poukazují na možnost regulace AtRBOHD prostřednictvím klatrinem zprostředkované endocytózy a endocytózy spojené s membránovými mikrodomény. Zdá se, že takto zprostředkovaná endocytóza AtRBOHD je významná u rostlinných odpovědí na biotický i abiotický stres (Leshem *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2014). U mutantů *atrbohD* exprimujících *GFP-AtRBOHD* pod kontrolou nativního AtRBOHD promotoru byla potvrzena přítomnost GFP-AtRBOHD ve většině pletiv, a to ve směsi monomerů a dimerů v plazmatické membráně (Suzuki *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2014).

Báze s dlouhým řetězcem (LCB, long chain bases) jsou meziprodukty sfingolipidů a jejich charakteristickou strukturní jednotkou. V listových discích ošetřených sfingolipidy sfinganinem či 4-hydroxysfinganinem byla indukována vyšší produkce ROS oproti kontrolním vzorkům. Tato produkce ROS je závislá na AtRBOHD, u mutantů *atrbohD* nedošlo k produkci ROS indukované pomocí zmíněných sfingolipidů (Peer *et al.*, 2011). Kromě toho, že hrají strukturální roli v membránách, sfingolipidy jsou spolu se steroly v membránových mikrodoménách. Je možné, že změny ve složení sfingolipidů v membránových mikrodoménách mohou ovlivňovat molekulární složky interagující s AtRBOHD.

Na regulaci produkce ROS činností RBOH se současně podílí inhibiční efekt S-nitrosylace RBOH (Yun *et al.*, 2011). S-nitrosylace je jedním z mechanismů reverzibilních posttranslačních modifikací proteinů. Během tohoto procesu je oxid dusnatý (NO) kovalentně a reverzibilně vázán na sulfhydrylovou skupinu cysteinu za vzniku S-nitrosothiolu (Astier *et al.*, 2012). *In vitro* analýza ukázala, že AtRBOHD může být specificky S-nitrosylována na Cys890 C-koncové části (Liu a He, 2016). Nitrosylace AtRBOHD na Cys890 byla prokázána u rostlin *A. thaliana* po infekci *Pseudomonas syringae* (Yun *et al.*, 2011). Schématické znázornění funkce a navrhovaná regulace enzymu AtRBOHD jsou znázorněny na Obr. 5.



Obr. 5 Schématické znázornění funkce AtRBOHD a její regulace. MAMP a DAMP vnímané PRR mohou spouštět produkci ROS závislou na AtRBOHD. Abiotický stres (např. teplotní šok, ozón, zranění a slanost) iniciují AtRBOHD k produkci ROS neznámými mechanismy. ET a SA mohou regulovat produkci ROS závislou na AtRBOHD ovlivněním genové exprese PRR a AtRBOHD. AtRBOHD je regulována endocytózou. AtMPK, AtCPKs a Ca^{2+} mohou pozitivně a negativně regulovat produkci ROS závislou na AtRBOHD. Důležitá je vzájemná kooperace působení ROS, hormonů (ET, SA) a NO. Šipky označují aktivaci, tupé zakončení představuje inhibici. Zkratky: AtCPK - vápník-dependentní proteinkinasa *Arabidopsis thaliana*, AtMPK - mitogenem aktivovaná proteinkinasa *A. thaliana*, DAMP – molekulární vzory spojené s poškozením, ET - ethylen, LCB - báze s dlouhým řetězcem, NO - oxid dusnatý, PA - fosfatidová kyselina, PAMP molekulární vzory typické pro povrch buněk patogenních mikroorganismů, PLD - fosfolipasa D, PRR – receptory rozpoznávající patogenní struktury, ROS – reaktivní formy kyslíku, SA - kyselina salicylová, SAA - systémová získaná aklimatizace, SAR - systémová získaná rezistence (přepřacováno dle Liu a He, 2016).

1.4.3.3 Charakterizace tabákové NADPHoxidasy

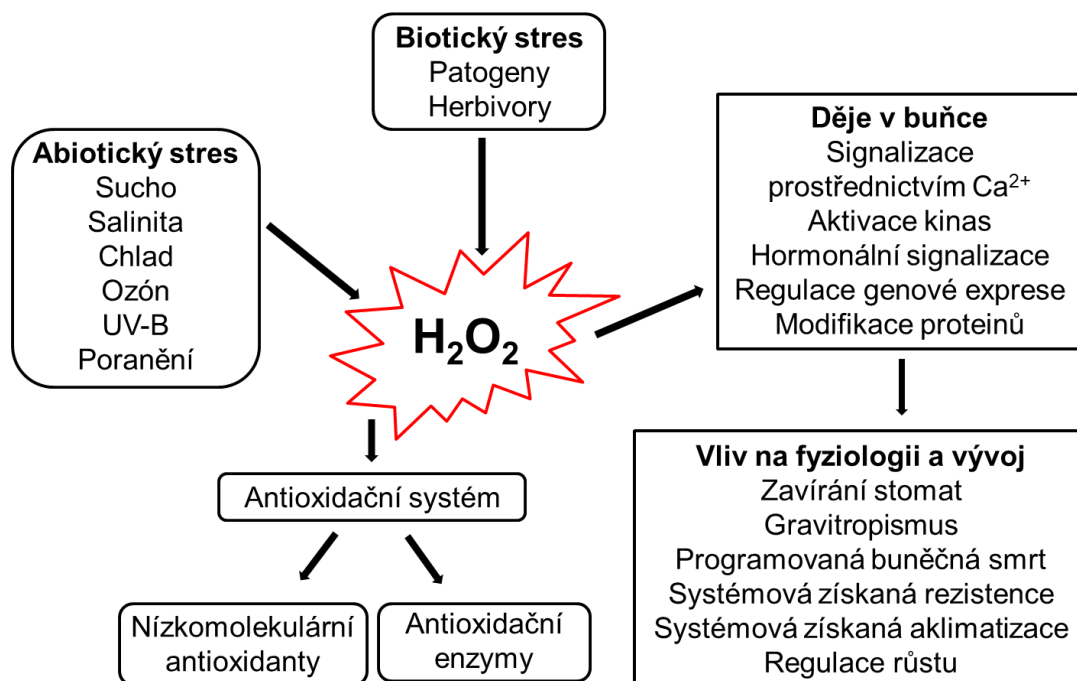
V cDNA knihovně získané z tabákových listů byl nalezen gen pouze pro jedinou isoformu RBOH, který byl pro svou vysokou homologii s *AtRBOHD* označen jako *NtRBOHD* (Simon-Plas *et al.*, 2002). U tabáku *N. tabacum* (Nt) je *NtRBOHD* jedinou isoformou podílející se na produkci ROS v reakci na β -CRY, proteinový elicitor vylučovaný oomycetou *Phytophthora cryptogea* indukující u tabáku HR a SAR (Ricci *et al.*, 1989; Keller *et al.*, 1996a; Simon-Plas *et al.*, 2002; Lherminier *et al.*, 2009). Byly identifikovány dvě kopie *NtRBOHD* genu, které byly pojmenovány *NtRBOHD1* a *NtRBOHD2*. *N. tabacum* je allotetraploidní druh vzniklý hybridizací diploidních druhů *N. tomentosiformis* a *N. sylvestris* před méně než 200 000 roky (Leitch *et al.*, 2008). V databázi byl identifikován jediný gen *RBOHD* v genomu *N. tomentosiformis* (*NtoRBOHD*) a genomu *N. sylvestris* (*NsRBOHD*). Introny byly identické ve všech čtyřech tabákových *RBOHD* genech. Délka intronu byla rozdílná pro *NtRBOHD1* a *NtRBOHD2*, ale téměř identická

pro *NtRBOHD1* a *NsRBOHD* a pro *NtRBOHD2* a *NtoRBOHD*. Obě sekvence sdílely 98,4% identity v aminokyselinové sekvenci a 96,7% identity na nukleotidové úrovni v jejich kódujících regionech. Porovnání sekvencí s *N. tomentosiformis* a *N. sylvestris* *RBOHD* kódujících oblastí ukázaly, že *NtRBOHD2* vykazuje 100% identitu na nukleotidové úrovni s *NtoRBOHD* a *NtRBOHD1* vykazoval jedinou neshodu s *NsRBOHD*. *NtRBOHD1* a *NtRBOHD2* jsou pravděpodobně dva homologní geny pocházející z *N. sylvestris* a *N. tomentosiformis* (Noirot *et al.*, 2014).

Studie s využitím konfokální a elektronové mikroskopie odhalily lokalizaci NtRBOHD v buňkách BY-2 v plazmatické membráně a endomembránách tvořících klastry (Noirot *et al.*, 2014). Po ošetření elicitem β -CRY dochází v buněčné suspenzi tabáku BY-2 k produkci ROS, která je zprostředkována NtRBOHD, přičemž nejvýraznější produkce ROS nastává okolo 10 min po elicitaci. Zajímavým aspektem regulace NtRBOHD je nesoulad mezi kinetikou produkce ROS a akumulací *NtRBOHD* transkriptů po ošetření β -CRY. Nárůst hladiny transkriptů *NtRBOHD1* a *NtRBOHD2* byl zaznamenán až 60 min po elicitaci β -CRY. β -CRY pravděpodobně spouští uvolnění intracelulárních zásob NtRBOHD, které jsou transportovány do plazmatické membrány. Subcelulární transport se zdá být jednou z dalších možných regulací aktivity RBOHD (Noirot *et al.*, 2014).

1.4.4 Signální funkce reaktivních forem kyslíku

ROS mají nepostradatelnou roli jako signální molekuly při regulaci řady fyziologických procesů, nezastupitelnou roli mají v obranných reakcích, jsou zapojeny v odpovědi na různé formy biotického a abiotického stresu. ROS v reakci na stresové podmínky mohou v rostlinném organismu ovlivňovat řadu signálních molekul, jako jsou např. MAPK, G-proteiny nebo transkripční faktory (Obr. 6) (Ali *et al.*, 2018b).



Obr. 6 Schéma centrální úlohy peroxidu vodíku v odpovědi rostlin na stresové podmínky. Hladina H_2O_2 je ovlivněna typem a intenzitou působení stresových faktorů a účinností antioxidačního systému. Změny v hladině H_2O_2 vedou následně k různým změnám na úrovni buňky a organismu (přepřacováno dle Slesak *et al.*, 2007).

Produkce ROS vede ke změnám v transportu iontů (např. Ca^{2+}) a k fosforylaci proteinů (Ali *et al.*, 2018b). Signální dráhy ROS interagují s dalšími signálními molekulami, jako jsou např. SA a NO (Fu a Dong, 2013). V nedávné době byl potvrzen významný vztah mezi cirkadiálními hodinami a metabolismem a signalizací ROS (Karapetyan a Dong, 2018). V současné době se objevují nové informace o procesu "ROS indukující uvolňování ROS" (RIRR, ROS-induced ROS release), ve kterém buňka/organela produkuje nebo uvolňuje ROS, čímž vyvolá zvýšenou produkci nebo uvolňování ROS další buňkou/organelou. V rostlinách proces RIRR zprostředkovává systémovou signalizaci na delší vzdálenosti v reakci na biotický a abiotický stres a je spojený s funkcí proteinu RBOHD (Zandalinas a Mittler, 2018). Např. ROS produkované enzymem RBOH u excitované buňky jsou uvolňovány do apoplastu, spouští produkci ROS u sousední buňky a signál se tak přenáší z buňky do buňky. Tento proces byl původně popsán v rostlinách *A. thaliana* a ukazuje se, že zprostředkovává rychlou systémovou signalizaci (Dubiella *et al.*, 2013).

1.4.5 Antioxidační systém u rostlin

V průběhu vývoje rostliny vyvinuly řadu obranných systémů podílejících se na degradaci ROS. Jedná se o tzv. antioxidanty enzymové a neenzymové povahy. Pokud dochází k nekontrolované produkci ROS (tzv. oxidativnímu vzplanutí) a současně nedochází k jejich dostatečnému odbourávání, mohou ROS způsobit poškození lipidů v důsledku tzv. lipidové peroxidace, oxidaci proteinů (např. oxidační inaktivace enzymů) a nukleových kyselin (oxidační modifikace bází) (Czarnocka a Karpiński, 2018).

Mezi enzymy katalyzující reakce vedoucí k odstranění ROS u rostlin patří např. APX, CAT, dehydroaskorbátoreduktasa (DHAR, EC 1.8.5.1), glutathionperoxidasa (GPX, EC 1.11.1.9), GR, glutathion-S-transferasa (EC 2.5.1.18), monodehydroaskorbátoreduktasa (MDHAR, EC 1.6.5.4), SOD. Jednotlivé enzymy se liší svou lokalizací v buňce (Dat *et al.*, 2000; Del Rio *et al.*, 2002; Mittler, 2002; Czarnocka a Karpiński, 2018).

SOD patří do rodiny metaloenzymů. Katalyzují odstranění O_2^- dismutací na O_2 a H_2O_2 . Rostlinné SOD obsahují Fe, Mn nebo Cu/Zn jako prostetickou skupinu. Počet, typ a distribuce isoenzymů SOD se mění v závislosti na rostlinném druhu, vývojovém stadiu a podmínkách prostředí (Zafra *et al.*, 2018). Fe-SOD byly nalezeny hlavně v chloroplastech, dále v mitochondriích a peroxisomech, Mn-SOD jsou přítomny v mitochondriích a peroxisomech a Cu/Zn-SOD jsou lokalizovány v cytosolu, chloroplastech, peroxisomech a apoplastu (Zafra *et al.*, 2018). Zvýšená exprese a aktivita SOD je důležitá při reakci rostliny na biotický (Lu *et al.*, 2017) i abiotický stres (Gill *et al.*, 2015).

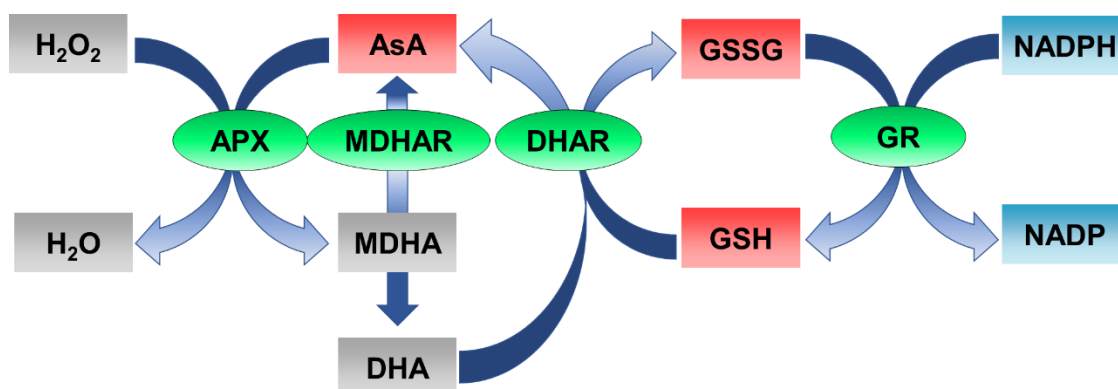
CAT jsou enzymy obsahující hem a katalyzují dismutaci dvou molekul H_2O_2 na H_2O a O_2 . Přestože peroxisomy jsou hlavními producenty H_2O_2 , CAT byly nalezeny také v chloroplastech, mitochondriích a cytosolu. Informace ze sekvenování genomu *Arabidopsis* potvrdily přítomnost tří genů CAT, dva z nich jsou lokalizované na chromozomu 1 (*CAT1*, *CAT3*) a jeden lokalizovaný na chromozomu 4 (*CAT2*) (Frugoli *et al.*, 1996). Gen *CAT1* je exprimován hlavně v pylu a semenech, *CAT2* ve fotosyntetických pletivech, v kořenech a semenech, zatímco *CAT3* je spojován s vodivými pletivy a listy (Mhamdi *et al.*, 2010). Exprese a aktivita CAT je obecně indukována v obranné reakci rostliny na stresové faktory jako je sucho, salinita, chlad, teplo, UV záření a bakteriální infekce (Czarnocka a Karpiński, 2018).

Další skupinu antioxidačních enzymů, které redukují širokou škálu substrátů odvozených od ROS, představují peroxiredoxiny (EC 1.11.1.15). Jsou to malé proteiny obsahující v aktivním místě rezidua cysteinu. Během reakce s oxidovaným substrátem se peroxiredoxiny oxidují a dochází k vzniku disulfidových vazeb. Následně jsou peroxiredoxiny regenerovány thioredoxinem a ten dále thioredoxinreduktasou (EC 1.8.1.9) využívající NADPH (Tovar-Méndez *et al.*, 2011).

Další skupinou enzymových antioxidantů jsou GPX, které využívají glutathion (GSH) k redukci H_2O_2 , organických a lipidových peroxidů. Jednotlivé isoformy GPX se liší v celulórní

lokalizaci (cytosol, chloroplasty, mitochondrie a endoplazmatické retikulum) stejně jako v substrátové specifitě.

Askorbát-glutathionový cyklus (AsA-GSH cyklus, Foyer-Halliwell-Asada cyklus) představuje řadu enzymových reakcí vedoucích k degradaci H_2O_2 (Obr. 7). Enzymy AsA-GSH cyklu se nachází v cytosolu, chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech (Jimenez *et al.*, 1997; Chew *et al.*, 2003). Jsou v něm zapojeny čtyři enzymy: APX, GR, MDHAR a DHAR a také nízkomolekulární antioxidanty AsA, GSH a NADPH jako redukční činidlo. Reakce katalyzovaná APX představuje přenos elektronů z AsA na H_2O_2 , produkující monodehydroaskorbát (MDHA) a H_2O . Různé isoformy APX jsou přítomny v subcelulárních kompartmentech, jako jsou chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy a cytosol. Exprese těchto enzymů je závislá na vývojovém stádiu rostliny a rovněž je regulována v odpovědi na různé formy stresu (Caverzan *et al.*, 2012). MDHAR katalyzuje regeneraci AsA z MDHA za použití NADPH jako redukčního činidla. MDHAR má několik isoform, které se společně s APX vyskytují v chloroplastech, mitochondriích, peroxisomech a cytosolu (Czarnocka a Karpiński, 2018). MDHA je nestabilní radikál, který rychle disproportionuje na AsA a dehydroaskorbát (DHA). DHA je redukován na AsA enzymem DHAR. Při této reakci je GSH oxidován na glutathion disulfid (GSSG) a GR následně katalyzuje redukci GSSG na GSH.



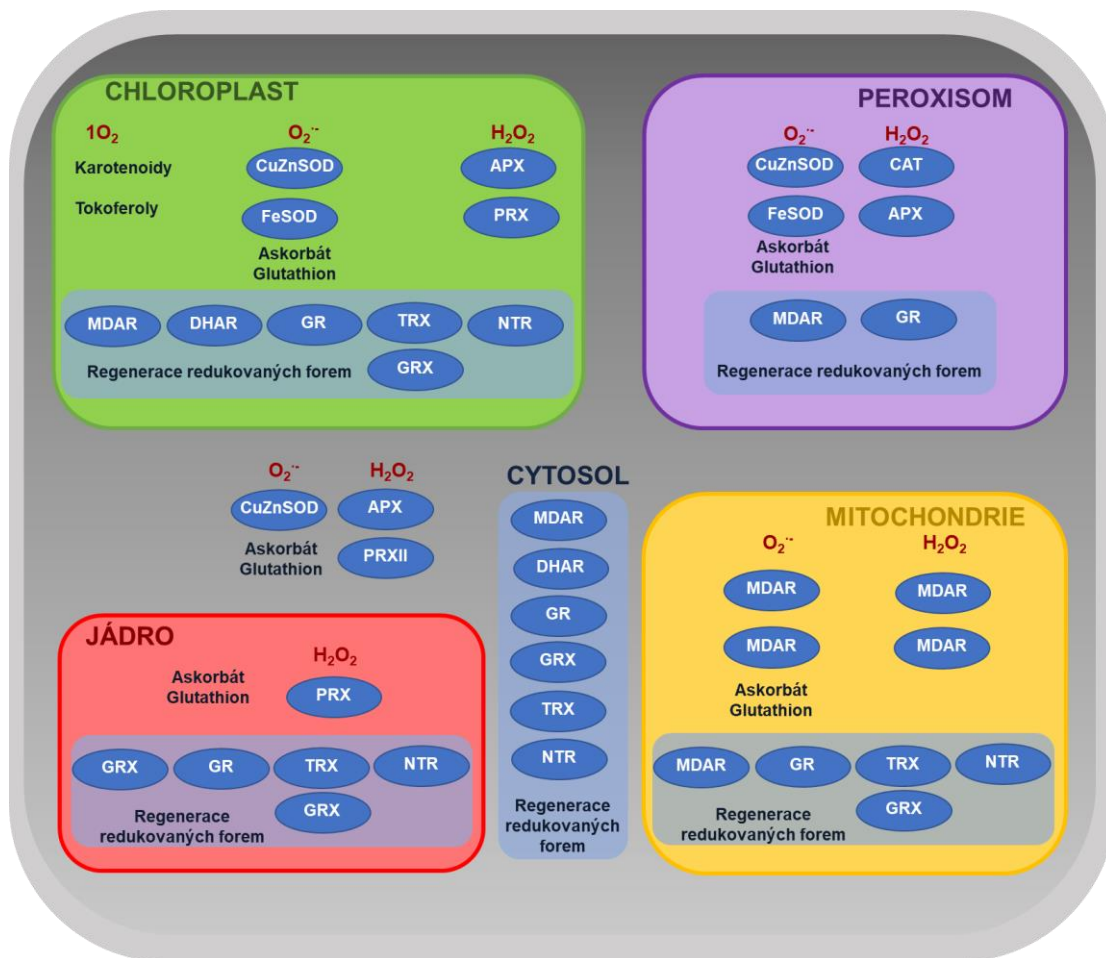
Obr. 7 Schématické znázornění askorbát-glutathionového (AsA-GSH) cyklu. Prvním krokem je redukce peroxidu vodíku působením askorbátperoxidasy (APX) katalyzující peroxidaci askorbátu (AsA) za vzniku monodehydroaskorbátu (MDHA). Ten je buď redukován zpět na AsA prostřednictvím enzymu monodehydroaskorbátreduktasy (MDHAR) nebo neenzymově disproportionován na dehydroaskorbát (DHA) a AsA. DHA je redukován na AsA působením dehydroaskorbátreduktasy (DHAR) s využitím glutathionu (GSH) jako reductantu. GSH je tvořen z oxidovaného glutathionu (glutathion disulfid - GSSG) glutathionreduktasou (GR) závislou na NADPH (přpracováno dle Pandey *et al.*, 2015).

Rostliny jsou bohaté na nízkomolekulární sloučeniny, které mají významnou antioxidační aktivitu (Noctor *et al.*, 2018). Mezi hlavní antioxidační molekuly v rostlinách patří AsA a GSH. Hrají zde klíčovou roli, protože specifické enzymové systémy (peroxidasy) katalyzují jejich rychlou reakci s H_2O_2 a jejich oxidované formy se regenerují působením vysokokapacitních reduktas a reduktantů (Foyer a Noctor, 2011).

AsA je nejvíce zastoupenou antioxidační sloučeninou v rostlinách. Detoxikuje ROS buď přímo, nebo prostřednictvím AsA-GSH cyklu. Podílí se také na regeneraci oxidovaných tokoferolů a v redukovaném stavu je AsA využíván jako kofaktor enzymu violaxantin-deepoxidasy (EC 1.10.99.3) (Noctor *et al.*, 2018). AsA je lokalizován v chloroplastech, mitochondriích, jádře, peroxisomech, cytosolu, vakuole a endoplazmatickém retukulu. Celkový obsah AsA v rostlinách se mění v důsledku působení biotických i abiotických stresových faktorů. Zvýšená koncentrace AsA byla pozorována např. u rostlin vystavených nadměrnému ozáření, vysoké hladině ozónu, v přítomnosti těžkých kovů a při působení UV záření (Zechmann, 2011).

Podobně jako u živočichů hraje GSH i v rostlinách důležitou antioxidační roli. V redukovaném stavu je thiolová skupina cysteinu donorem redukujícího ekvivalentu na jiné molekuly, např. ROS, za vzniku disulfidové vazby v GSSG (oxidovaná forma GSH). GSH je lokalizovaný v téměř všech buněčných kompartmentech: chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy, jádro, cytosol, endoplazmatické retikulum, vakuoly a apoplast (Koffler *et al.*, 2013). Vyšší hladina GSH zvyšuje toleranci k suchu, salinitě, vysoké/nízké teplotě a k přítomnosti těžkých kovů (Cheng *et al.*, 2015; Hasanuzzaman *et al.*, 2017).

Dalšími neenzymovými antioxidanty jsou α -tokoferol, karotenoidy, flavonoidy a prolin. Tokoferoly jsou lipofilní antioxidanty, které účinně odstraňují ROS a lipidové radikály a chrání biologické membrány před oxidačním poškozením. Vitamin E (α -tokoferol) má nejvyšší antioxidační kapacitu ze čtyř isomerů nalezených v rostlinách. Množství buněčného α -tokoferolu se významně mění v reakci na stres. Jeho zvýšená koncentrace koreluje s tolerancí vůči vysokému světlu a osmotickému stresu (Czarnocka a Karpiński, 2018). Karotenoidy jsou další skupinou antioxidantů lokalizovaných v plastidech fotosyntetických i nefotosyntetických rostlinných pletiv. Karotenoidy svou antioxidační aktivitou chrání komponenty fotosyntézy. Jejich zvýšená buněčná koncentrace zvyšuje toleranci vůči abiotickému stresu (Nisar *et al.*, 2015). Flavonoidy v rostlinné ríši poskytují červené, modré a fialové pigmentace v květech nebo ovoci. Mají ochrannou roli proti abiotickým stresům, jako je např. nadměrné ozáření, UV záření, vysoká teplota, nedostatek vody, nedostatek živin a poranění. Osmoprotektivní prolin je také považován za silný antioxidant a potenciální inhibitor buněčné smrti. Má schopnost zachycovat volné radikály a inhibovat peroxidaci lipidů. Vyšší koncentrace prolinu poskytuje toleranci k různým abiotickým stresům jako je sucho, salinita a nízké teploty (Czarnocka a Karpiński, 2018). Antioxidační systémy rostlin a jejich lokalizace jsou znázorněny na Obr. 8.

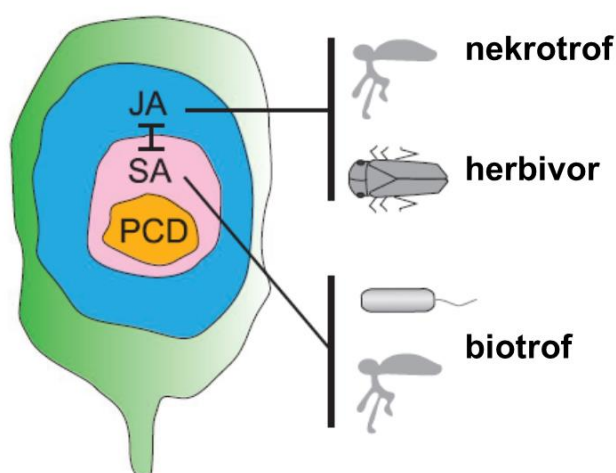


Obr. 8 Antioxidační systém rostlin a lokalizace jeho jednotlivých částí v buňce. Obrázek shrnuje dostupné informace pro *Arabidopsis thaliana*. Zkratky: APX - askorbátperoxidasa, CAT - katalasa, DHAR - dehydroaskorbátreduktasa, GR - glutathionreduktasa, GRX - glutaredoxin, MDAR - monodehydroaskorbátreduktasa, NTR - NADPHthioredoxinreduktasa, PRX - peroxiredoxin, SOD - superoxiddismutasa, TRX - thioredoxin (přepřevládáno dle Noctor *et al.*, 2018).

Na regulaci hladiny ROS během stresové odpovědi se podílí i malá molekula NO (Beligni *et al.*, 2002; Xue *et al.*, 2007; Keyster *et al.*, 2011; Begara-Morales *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). Regulace prostřednictvím NO probíhá na úrovni posttranslačních modifikací enzymů metabolismu ROS nitrací nebo S-nitrosylací. Jedním z dobře popsáných mechanismů regulace vnitrobuněčné hladiny ROS v průběhu stresové odpovědi prostřednictvím NO je S-nitrosylace Cys-32 u APX1. U *Arabidopsis* S-nitrosylace vedla ke zvýšení aktivity APX (Yang *et al.*, 2015). Opačný efekt má S-nitrosylace u tabákové suspenze *N. tabacum* cv. BY-2, kdy aktivita cytosolické APX byla S-nitrosylací inhibována (De Pinto *et al.*, 2013).

1.5 Rostlinné hormony a jejich úloha v obranných mechanismech

Rostliny produkují široké spektrum hormonů, jako je SA, JA, ET, auxiny, gibereliny, ABA, cytokininy, brasinosteroidy a peptidové hormony, které mají svou úlohu během růstu a vývoje rostliny stejně jako v obranných odpovědích na abiotické a biotické stresy (Adie *et al.*, 2007; Robert-Seilantiz *et al.*, 2007). Je známo, že rostlinné hormony působí prostřednictvím vzájemných komplexních antagonistických nebo synergických interakcí jejich signálních drah, které také utváří signální dráhy zapojené v aktivaci složek imunity rostlin (Shigenaga a Argueso, 2016). SA a JA jsou hlavními obrannými fytohormony (Berens *et al.*, 2017). U *A. thaliana* se SA podílí na obraně proti biotrofním patogenům, zatímco JA řídí obranu proti nekrotrofním patogenům a herbivornímu hmyzu (Glazebrook, 2005; Berens *et al.*, 2017). Signální dráhy SA a JA se navzájem inhibují a v důsledku toho jedna z nich může získat převahu v závislosti na dané situaci. Proto se nepředpokládá, že budou současně vysoce aktivní obě dvě. Za určitých podmínek mohou být signální dráhy SA i JA současně aktivovány uvnitř stejného listu během imunitní odpovědi rostliny. Betsuyaku *et al.* (2018) zjistili, že signální dráhy SA a JA jsou aktivní v různých buňkách, čímž je dosaženo simultánní aktivity v rámci stejného listu (Obr. 9). Překvapivě byla aktivita SA pozorována pouze v několika buněčných vrstvách obklopující zónu PCD. Signální aktivita SA je tedy přísně omezena na okolí zóny PCD a nešíří se. Na druhou stranu signalizace JA byla výlučně aktivována v buněčných vrstvách mimo aktivní zónu SA (Tsuda, 2018). Signální cesty SA a JA jsou tedy aktivovány v prostorově oddělených částech v infikovaném listu.

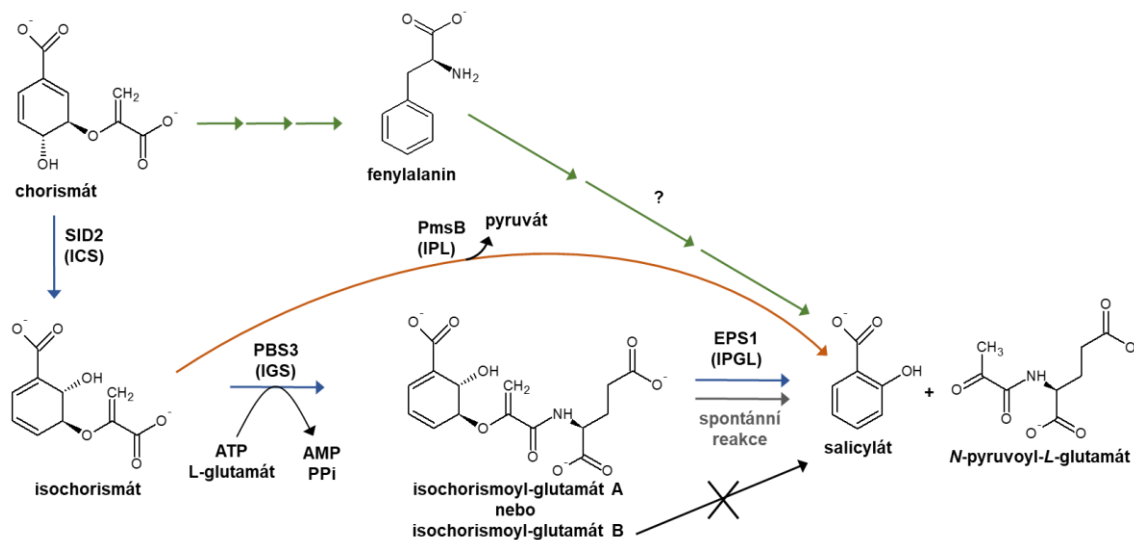


Obr. 9 Prostorové oddělení antagonistických hormonálních aktivit v obraně rostlin. Signalizace kyseliny salicylové (SA) je aktivována v růžové zóně okolo zóny, kde probíhá programovaná buněčná smrt (PCD, oranžová barva) listových buněk. Signalizace kyseliny jasmonové (JA) je aktivována v modré zóně mimo aktivní zónu SA. Toto prostorové oddělení umožňuje listu bránit se proti působení více stresových faktorů (např. nekrotrofní a biotrofní patogen...), což může zvýšit šanci na přežití listů v přírodě (přepřacováno dle Tsuda, 2018).

1.5.1 Kyselina salicylová

SA je významnou endogenní signální molekulou v rostlinné imunitě. SA je zapojena do procesů klíčení, kvetení a rezistence v reakci na abiotické stresové faktory. Aplikace SA na rostliny tabáku zvyšuje akumulaci PR proteinů a následně zvyšuje rezistenci rostlin např. proti viru tabákové mozaiky (Zhu *et al.*, 2014). Tento protektivní vliv SA nebyl pozorován pouze u tabáku, ale i u dalších jednoděložných i dvouděložných rostlin zejména v reakci na řadu biotrofních patogenů. SA je důležitá pro vrozenou imunitní odpověď, lokální rezistenci zahrnující expresi PR genů, aktivaci PCD a SAR (Shigenaga a Argueso, 2016).

Biosyntéza SA vychází z chorismátu (Obr. 10) - meziprojektu fenylpropanoidové dráhy (metabolická dráha vedoucí například k ligninu, flavonoidům nebo antokyanům) cestou dvou enzymových drah. První zahrnuje dráhu enzymu fenylalaninamoniaklyasy (PAL, EC 4.3.1.24) a ta druhá představuje proces přeměny chorismátu na isochorismát prostřednictvím enzymu isochorismátsynthasy (ICS, EC 5.4.4.2). Isochorismát je dále exportován z plastidu do cytosolu prostřednictvím isochorismátového exportéru EDS5 (Enhanced disease susceptibility), kde dochází ke konjugaci glutamátu s isochorismátem za vzniku isochorismoyl-glutamátu katalýzou enzymu amidotransferasy PBS3 (Amido-transferase AvrPphB susceptible 3). Isochorismoyl-glutamát se spontánně rozkládá na SA a N-pyruvoyl-L-glutamát. Tento dříve neznámý reakční mechanismus se zdá být konzervovaný v celé rostlinné říši. Protein z rodiny BAHD acyltransferas (acyltransferasy nalezené u vyšších rostlin z čeledi *Brassicaceae*) zvaný EPS1 s dříve potvrzenou rolí v akumulaci SA po napadení rostliny patogeny pravděpodobně produkuje specificky SA z isochorismoyl-glutamátu A (Rekhter *et al.*, 2019; Torrens-Spence *et al.*, 2019).

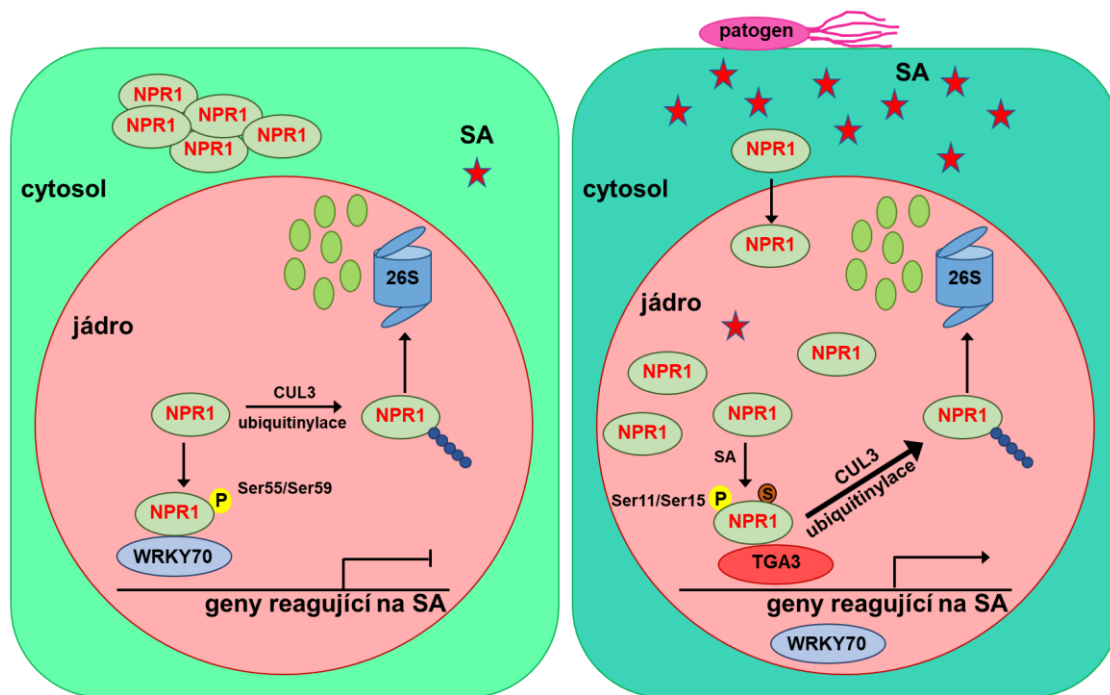


Obr. 10 Dráhy biosyntézy salicylátu. Dráha odvozená od metabolismu fenylpropanoidů je znázorněna zelenými šipkami. Cesta odvozená od isochorismátu je znázorněna modrými šipkami. Některé bakterie produkující salicylát využívají enzym isochorismátpyruvátlyasu, která přímo převádí isochorismát na salicylát, což je zobrazeno hnědou šipkou. Zkratky: SID2 - protein (Salicylic acid induction deficient 2), ICS - isochorismátsynthasa, PBS3 - amidotransferasa, IGS - isochorismoyl-glutamátsynthasa, PmsB - protein pro biosyntézu salicylátu (Salicylic acid biosynthesis protein), IPL - isochorismátpyruvátlyasa,

EPS1 - transferasa (Protein enhanced *Pseudomonas* susceptibility 1), IPGL - isochorismoyl-glutamát A pyruvoyl-glutamátlyasa (přepřacováno dle Torres-Spence *et al.*, 2019).

Většina SA je přeměněna do biologicky inaktivní formy, kterou je SA- β -glukosid (SAG) a to pomocí enzymu SAGlukosyltransferasy (EC 2.4.1.35). Biosyntéza a skladování SAG probíhá ve vakuole, dokud není přeměněn zpět na biologicky aktivní SA (Hennig *et al.*, 1993; Dean *et al.*, 2003; Dean a Mills, 2004; Dean *et al.*, 2005). Malé množství SA je přeměněno na glukosový ester SA a/nebo může být SA methylována na nestabilní MeSA (Chen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010). MeSA hraje roli ve vzdálenějších signálech při přenosu SAR např. u tabáku a *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2018).

Hlavním regulátorem v obranné odpovědi zprostředkované SA je regulační protein NPR1 (Non-expressor of pathogenesis-related genes 1) (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1997). V buňkách neinfikovaných rostlin se NPR1 nachází v cytoplazmě v oligomerní formě a jednotlivé NPR1 jsou spojené přes intermolekulární disulfidické vazby. Po infekci patogenem vede biosyntéza SA k aktivaci thiooxidinů, které redukuji disulfidické vazby mezi cysteinovými rezidui NPR1, čímž mění jeho oligomerní stav na monomerní (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2008; Shigenaga a Argueso, 2016). Serin/threonin kinasa (SnRK2-8) interaguje a fosforyluje NPR1. Fosforylace NPR1 na serinu 589 je nezbytná pro změnu lokalizace NPR1 z cytosolu do jádra přes jaderné póry. V jádře mohou NPR1 interagovat s transkripčními faktory ze třídy TGA, které mají funkci v obranné aktivaci. Dochází k indukci transkripce genů, jako jsou např. geny kódující PR proteiny. Po jaderné translokaci monomerů NPR1 jsou indukovány také transkripční faktory WRKY. Skupina transkripčních faktorů WRKY70, WRKY50 a WRKY51 pozitivně reguluje signální dráhu SA, zatímco WRKY33 má negativní vliv (Zhang *et al.*, 2018). Nadprodukce WRKY70 zvyšuje expresi genů závislých na signální dráze SA (PR-1, PR-2, PR-5) a potlačuje expresi obranných genů závislých na signální dráze JA (Obr. 11) (Mur *et al.*, 2013).



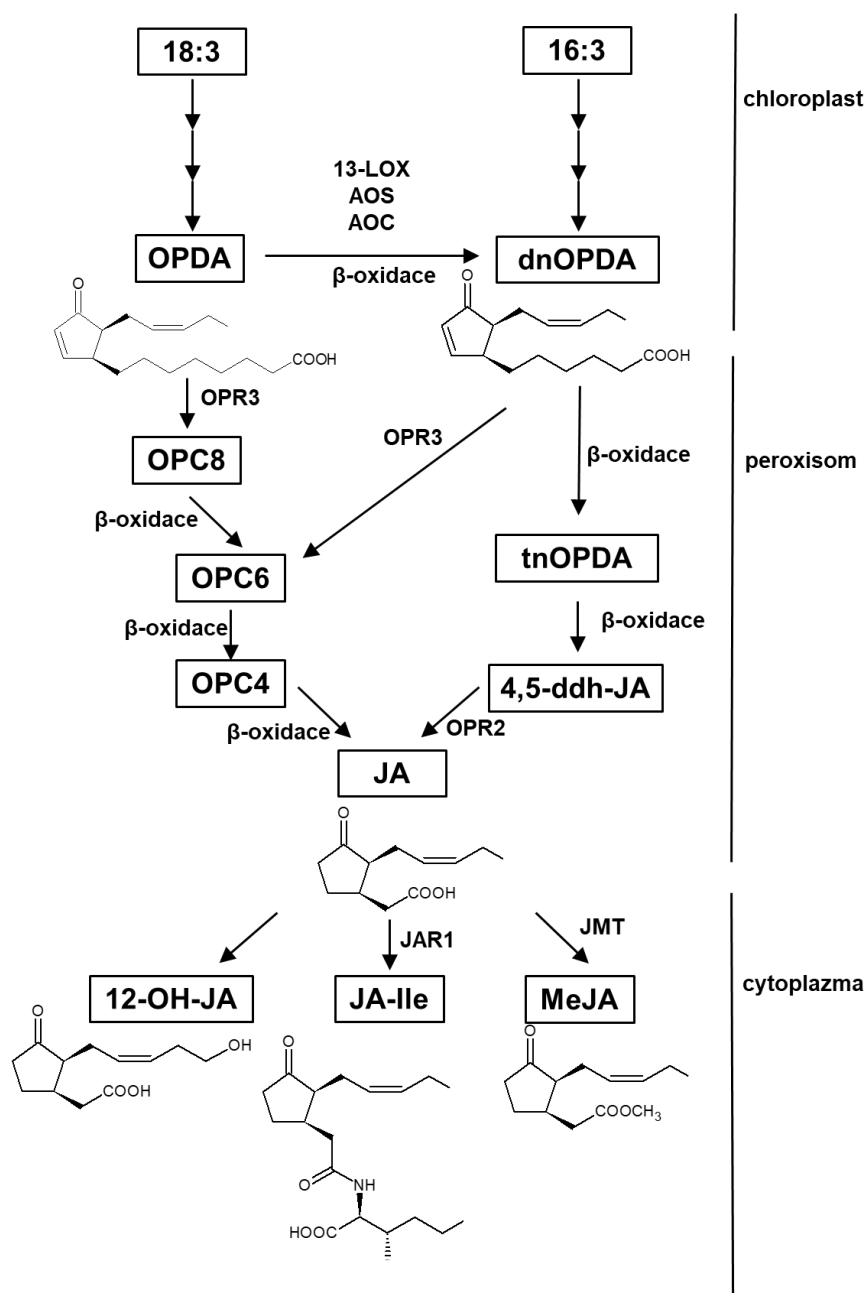
Obr. 11 Signalizace kyseliny salicylové (SA) závislá na regulačním proteinu NPR1 (Non-expressor of pathogenesis related genes 1). V neinfekčním stavu je většina NPR1 lokalizována v cytoplasmě jako redox-senzitivní oligomerní komplex. Po napadení patogenem dochází k akumulaci SA, což způsobí redukci buněčného prostředí a oligomerní komplex NPR1 je působením thioredoxinů přeměněn na monomery katalyzované thioredoxiny. NPR1 se poté translokuje do jádra prostřednictvím bipartitního jaderného lokalizačního signálu NPR1. V jádře monomery NPR1 interagují s transkripčními faktory, jako jsou TGACG sekvencně specifické vazebné proteiny (TGA) za účelem aktivace exprese genů. Kromě toho je NPR1 fosforylován na Ser55 a Ser59, což zabráňuje proteinu SUMO3 (Small Ubiquitin Like Modifier 3) modifikaci NPR1. Nesumoylovaný NPR1 interaguje s transkripčním represorem WRKY70 a snižuje expresi obranných genů. Po infekci patogeny akumulace SA podporuje defosforylaci Ser55 a Ser59 a dochází k modifikaci NPR1 pomocí SUMO3, což způsobuje disociaci NPR1 z WRKY70. Konjugace NPR1 se SUMO3 navíc indukuje fosforylaci NPR1 na Ser11 a Ser15 a podporuje interakci mezi NPR1 a transkripčním faktorem TGA3 pro aktivaci exprese obranných genů. Konjugace se SUMO3 a fosforylace NPR1 na Ser11 a Ser15 usnadňují degradaci NPR1 závislou na ubikvitin ligase Cullin3 (CUL3) (přepřacováno dle Li *et al.*, 2017).

1.5.2 Kyselina jasmonová

JA je signální molekula zapojená v řadě vývojových a obranných rostlinných procesech. Dřívější studie odhalily, že exogenní aplikací JA dochází k nadprodukcii obranných proteinů, jako jsou defensiny a thioniny, které jsou běžně indukovány po infekci nekrotrofními patogeny. JA je pozitivní regulátor imunity v odpovědi na nekrotrofní patogeny a negativní regulátor v odpovědi na patogeny biotrofní (Shigenaga a Argueso, 2016).

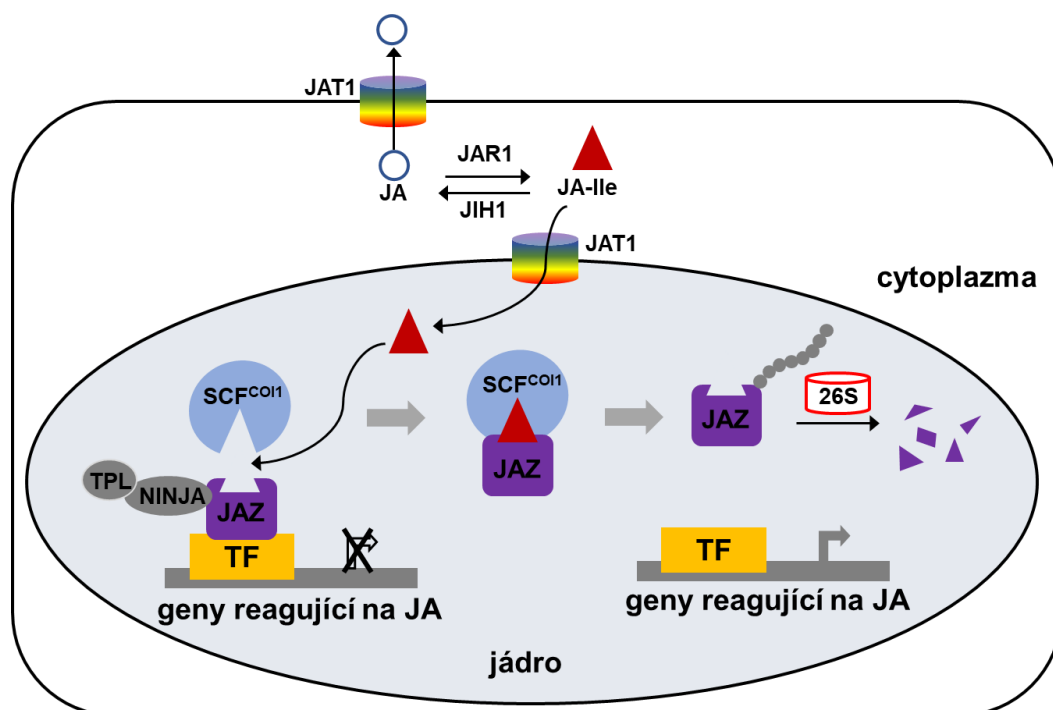
Prvním krokem biosyntézy JA je uvolnění α -linolenové kyseliny z membrány chloroplastů (Obr. 12), po které následuje její oxidace lipoxygenasou (LOX, EC 1.13.11.-). Poranění nebo infekce patogeny je následována signifikantně zvýšenou regulací JA-odpovědných genů, včetně genů *LOX*. Po oxygenaci je kyselina α -linolenová konvertována na JA, která je modifikována na deriváty JA (Wasternack a Hause, 2013; Ranjan *et al.*, 2015). Jedním z těchto derivátů je (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucin (JA-Ile) syntetizovaný působením enzymu JA-amidosynthetasy (JAR1, EC 6.3.2.52). Ja-Ile působí jako endogenní biologicky aktivní JA uvnitř buněk. JA může

být také přeměněna na těkavý MeJA reakcí katalyzovanou enzymem jasmonát-O-methyltransferasou (JMT, EC 2.1.1.141) (Shigenaga a Argueso, 2016).



Obr. 12 Schéma biosyntézy kyseliny jasmonové (JA) v *Arabidopsis thaliana*. Biosyntéza JA zahrnuje oktadekanovou dráhu od kyseliny α -linolenové (18:3) a hexadekanovou dráhu vycházející z kyseliny hexadekatrienové (16:3). Tyto cesty biosyntézy JA probíhají v chloroplastech, peroxisomech a cytoplasmě. Syntéza kyseliny 12-oxo-fytodienové (OPDA) nebo dinor kyseliny 12-oxo-fytodienové (dn-OPDA) z nenasycené mastné kyseliny probíhá v chloroplastech, tyto meziprodukty jsou následně přeměněny na JA v peroxisomech. V cytoplasmě je JA metabolizována na různé sloučeniny jako jsou methyljasmonát (MeJA), jasmonoyl-L-isoleucin (JA-Ile) a kyselina 12-hydroxyjasmonová (12-OH-JA). Zkratky: LOX - lipoxygenasa; AOS - allenoxidsynthasa; AOC - allenoxidcyklasa; OPR3 - 12-oxofytodienoátreduktasa 3; OPR2 - 12-oxofytodienoátreduktasa 2; JAR1 - JA-amidosynthetasa; JMT - jasmonát-O-methyltransferasa; OPDA - kyselina 12-oxo-fytodienová; dnOPDA - kyselina dinor-12-oxo-fytodienová; OPC8 - kyselina 8-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyclopentyl)oktanová; OPC6 - kyselina 6-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyclopentyl)hexanová; OPC4 - kyselina 4-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyclopentyl)butanová; tnOPDA - tetranor-kyselina 12-oxo-fytodienová; 4,5-ddh-JA - 4,5-didehydrojasmonát (přepřacováno dle Ruan *et al.*, 2019).

Subcelulární distribuci JA reguluje ABC transportér JAT1 (Jasmonic acid transfer protein1) (Obr. 13). JAT1 je lokalizovaný v jádře a v plazmatické membráně rostlinných buněk a zprostředkovává transport JA přes plazmatickou membránu a bioaktivního JA-Ile do jádra (Ruan *et al.*, 2019). Signální dráha JA je v dalších buňkách aktivována transportem JA do apoplastu. Biotický a abiotický stres vyvolávají syntézu JA, která může být převedena na biologicky aktivní JA-Ile působením JAR1. Vnímání JA-Ile receptorem COI1 (Coronatine insensitive protein 1) spouští degradaci JAZ (Jasmonate ZIM domain) represorů, což vede k uvolnění transkripčních faktorů a k regulaci genů v odpovědi na JA v různých procesech (Shigenaga a Argueso, 2016; Ruan *et al.*, 2019). V nepřítomnosti JA se JAZ asociuje s transkripčním represorem Topless (TPL) a je inicializována modifikace chromatinu prostřednictvím enzymů modifikujících histony – histondeacetylas (HDAC, EC 3.5.1.98), HDAC6 a HDAC9 a histonmethyltransferasy (EC 2.1.1.43), aby došlo k potlačení exprese genů závislých na JA (Shigenaga a Argueso, 2016).



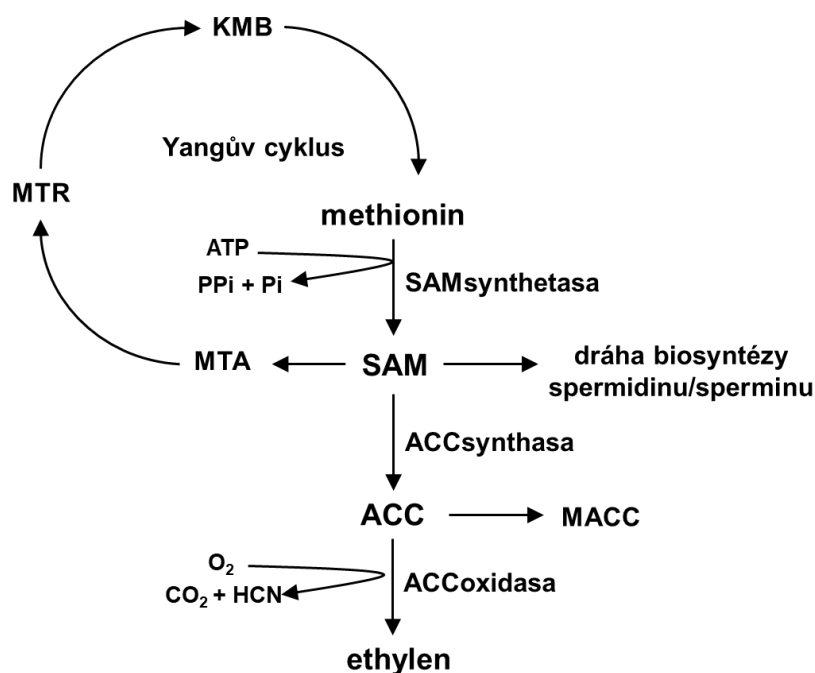
Obr. 13 Přehled transportu kyseliny jasmonové (JA) a její signální dráhy. ABC transportér JAT1 (Jasmonic acid transfer protein1) reguluje subcelulární distribuci JA. Označení JIH1 představuje protein jasmonoyl-L-isoleucinhydrolasu 1. Vnímání JA je zprostředkováno E3-ligasou SCF^{COI1}. SCF komplex patří mezi multi-podjednotkové ubiquitin-ligasy a SCF název je odvozen od tří jeho podjednotek (Skp/Cullin1/F-box protein), který obsahuje COI1 (Coronatine insensitive protein 1), který funguje jako receptor JA spolu s transkripčními represory JAZ (Jasmonate ZIM-domain). V nepřítomnosti JA fungují JAZ jako transkripční represory s adaptorovými proteiny NINJA (Novel interactor of JAZ) a obecným transkripčním represorem Topless (TPL). Biologicky aktivní JA-Ile vzniká katalýzou enzymu JAR1 (JA-amidosynthetasa), který se v jádře váže na F-box proteinu COI1, což vede ke změně jeho konformace. Jedná se o protein, který určuje substrátovou specifitu ubiquitinligasy SCF^{COI1}, zprostředkuje ubiquitylaci a následnou degradaci proteinů. Po útoku patogenů vazba JA k COI1 odvádí JAZ proteiny do SCF^{COI1} komplexu, čímž dochází k degradaci JAZ v 26S proteasomu. Tato degradace umožňuje transkripci genů v odpovědi na signalizaci JA (přepřacováno dle Shigenaga a Argueso, 2016; Ruan *et al.*, 2019).

Během infekce rostliny biotrofními patogeny jsou signální dráhy JA a SA antagonistické. Interakce těchto dvou hormonů hraje klíčovou roli při rostlinných imunitních odpovědích na patogeny (Shigenaga a Argueso, 2016). Dobře zkoumaným příkladem je fytotoxin koronatin (COR), produkovaný několika patovary *P. syringae*, který je základním prvkem patogenity a virulence *P. syringae* (Brooks *et al.*, 2005; Uppalapati *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2012). COR je také strukturní napodobenina JA-Ile a proto může soutěžit s JA o vazbu k receptoru COI1. Vazba COR na COI1 zahajuje degradaci JAZ proteinu, aktivuje se signalizace JA a dochází k potlačení SA dráhy (Katsir *et al.*, 2008). Podobně mohou některé efekторы působit na JA signalizaci nezávisle na COR. HopZI, efektor z *P. syringae* s předpokládanou aktivitou acetyltransferasy, může interagovat se ZIM doménou (Zinc-finger protein expressed in inflorescence meristem) proteinů JAZ, což vede k jejich acylaci a proteasomové degradaci, aktivaci JA signalizace a zvýšení patogenní virulence (Jiang *et al.*, 2013).

1.5.3 Ethylen

Plynný hormon ET má významné funkce v regulaci růstu a senescence rostlin a je považován za důležitou součást imunitního systému rostlin v odpovědi na infekci patogeny (Lin *et al.*, 2009).

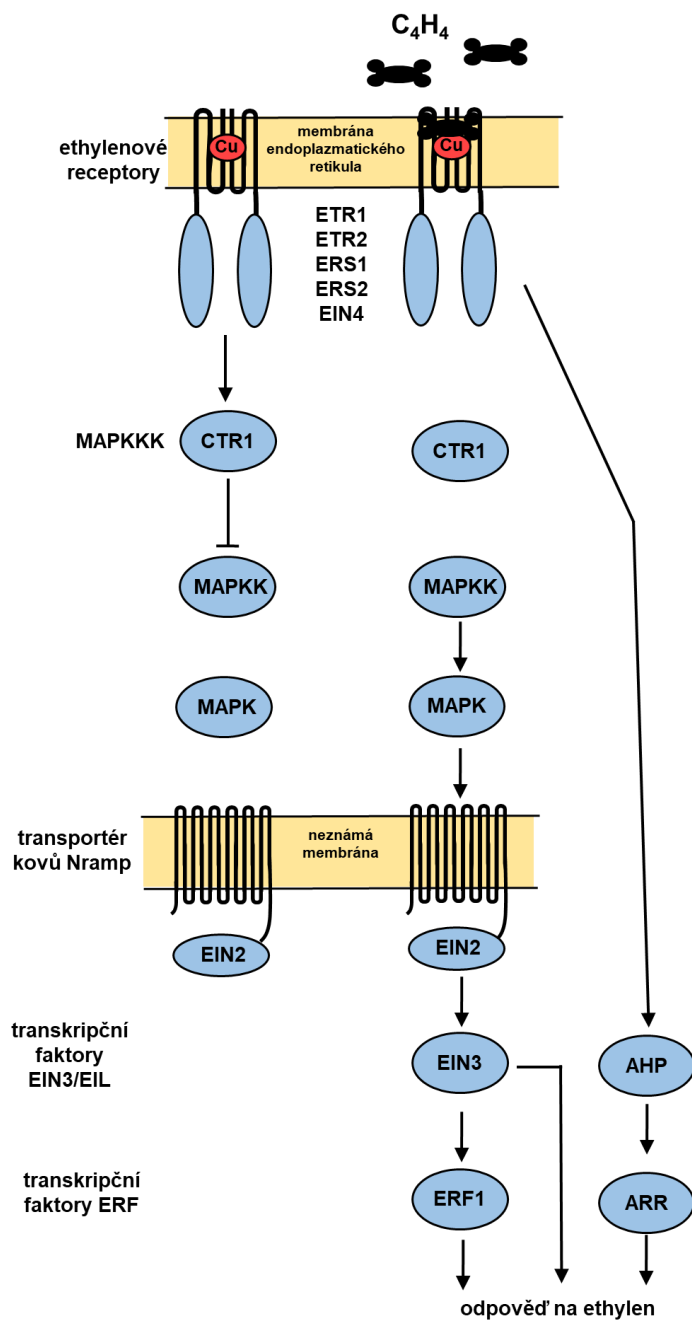
ET je syntetizován z aminokyseliny methioninu, která je přeměněna na S-adenosylmethionin (SAM) enzymem SAMsynthetasou (EC 2.5.1.6). SAM je převeden na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC) v reakci katalyzované enzymem ACCsynthasou (ACS, EC 4.4.1.14). Z ACC v reakci katalyzované ACCoxidasou (ACO, EC 1.14.17.4) vzniká ET (Obr. 14) (Argueso *et al.*, 2007).



Obr. 14 Dráha biosyntézy ethylenu (ET). S-adenosylmethionin (SAM) je syntetizován z methioninu za katalýzy enzymu SAMsynthetasy za spotřeby jedné molekuly ATP. SAM je přeměněn

na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC) působením ACCsynthasy za vzniku 5-methyltioadenosinu (MTA) jako vedlejšího produktu. MTA se recykluje na methionin postupnými enzymovými reakcemi zahrnující různé meziprodukty (MTR - 5-methylthioribosa, KMB - 2-keto-4-methylthiobutyát), které tvoří methioninový (Yangův) cyklus. SAM je také prekurzorem pro biosyntézu spermidinu a sperminu. Produkce ET z ACC je katalyzována ACCoxidase. V reakci dále vzniká oxid uhličitý a kyanovodík. Malonylace ACC na malonyl-ACC (MACC) snižuje obsah ACC a následně produkci ET (Arc *et al.*, 2013).

Signalizace ET u rostlin je zahájena vazbou ET na jeden nebo více receptorů, tzv. ETR1 (Ethylene reponse 1), ETR2 (Ethylene reponse 2), ERS1 (Ethylene reponse sensor 1), ERS2 (Ethylene reponse sensor 2) a EIN4 (Ethylene insensitive 4) - mající jednotné EC 2.7.13.3, což jsou hybridní histidinkiny lokalizované na membránách endoplazmatického retikula (Obr. 15). ET receptory jsou kinasy působící jako signální represory, pokud na ně není navázán ET. Vazba ET na receptory inhibuje Ser/Thr proteinkinasy CTR1 (EC 2.7.11.1), která působí jako negativní regulátor signalizace ET. Inhibice CTR1 vede k potlačení jeho schopnosti fosforylovat protein EIN2 (Ethylene insensitive 2), což je klíčový pozitivní regulátor v signalizaci dráhy ET, který je ve fosforylované formě lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu. Pokud nedojde k fosforylaci EIN2, přechází jeho C-koncová část do jádra, což vede ke stabilizaci transkripčních faktorů, které jsou zodpovědné za transkripci genů regulovaných ET (Merchante *et al.*, 2013). V jádře pak dochází k aktivaci klíčových transkripčních faktorů ORA59 (Octadecanoid-responsive Arabidopsis 59) a ERF1 (Ethylene-responsive factor 1). V nepřítomnosti ET je transkripční faktor EIN3 (Ethylene insensitive 3) cílem SCF ligasy a dochází k jeho degradaci v proteasomu (Mur *et al.*, 2013).



Obr. 15 Model signální dráhy ethylenu (ET - C_4H_4). Ethylenové receptory udržují CTR1 (Constitutive triple response 1, serin/threonin proteinkinasa) v aktivním stavu, což umožňuje potlačení reakce na ET. Vazba ET na receptory je inaktivuje, čímž dochází k inaktivaci i CTR1. Transkripční faktor EIN2 (Ethylene-insensitive protein 2) je pak aktivován a spouští se dráha zahrnující transkripční faktory EIN3/EIL (Ethylene insensitive EIN3/EIL-like transcription regulator) a ERF1 (Ethylene-responsive factor 1), které se účastní regulace odpovědi na ET. Hladina proteinu EIN3 (Ethylene-insensitive protein 3) je v nepřítomnosti ET nižší než v přítomnosti ET v důsledku degradace v proteasomu. Signální dráha ET zahrnuje dráhu složenou z CTR1 a kaskádu mitogenem aktivované proteinkinasy kinasy (MAPKK) a mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK). Jiná signální dráha ET zahrnuje proteinový přenašeč AHP (*Arabidopsis thaliana* histidine phosphotransfer proteins) a regulační protein ARR (*Arabidopsis thaliana* Response Regulator protein) a je funkčně nezávislá na CTR1 (přepřacováno dle Chen *et al.*, 2005; Binder *et al.*, 2018).

Hlavní role ET v odpovědi na biotrofní patogeny je primárně spojena se synergickou interakcí se signální dráhou JA a antagonickou interakcí s dráhou SA. První důkazy o synergickém působení JA a ET pocházejí z analýzy exprese defensinu PDF1.2., která je aktivována nekrotrófními patogeny jako je *Alternaria brassicicola*, stejně jako exogenní aplikací ET nebo JA. Indukce genové exprese byla nicméně snížena nebo zrušena v případě, že experimenty byly provedeny s mutanty receptorů ET. Současná aplikace JA a ET indukuje expresi genů regulovaných JA a ET na mnohem vyšší úrovni než při aplikaci hormonů samotných. Předpokládá se, že při synergickém působení ET a JA jsou JAZ proteiny negativními regulátory transkripčních faktorů EIN3/EIL v mechanismu zahrnujícím HDAC6. JA způsobuje degradaci JAZ, což vede k aktivaci transkripčních faktorů regulovaných JA, jako jsou ERF1 a ORA59, a synergické aktivaci genů regulovaných ET a JA, včetně defensinu PDF1.2 (Shigenaga a Argueso, 2016).

V některých případech byla popsána nezávislá aktivace signálních drah ET a JA. Zvýšení hladiny proteinu VSP2 (Vegetative storage protein 2) regulovaného JA při infekci nekrotrófním patogenem *Pectobacterium carotovorum* (dříve *Erwinia carotovora*) je u *Arabidopsis* nezávislé na signalizaci ET (Norman-Setterblad *et al.*, 2000), ale závislé na dráze MYC2, což je transkripční faktor JA dráhy.

1.5.4 Vzájemné působení signálních drah kyseliny salicylové, kyseliny jasmonové a ethylenu

Signální dráhy hormonů SA, JA a ET hrají nejvýznamnější roli v regulaci obranné reakce proti biotickému a abiotickému stresu. Zatímco SA, jak již bylo uvedeno, je důležitá při interakcích rostlin s biotrofními a hemibiotrofními patogeny, JA a ET hrají roli v obranných reakcích proti nekrotrófním patogenům a herbivorům. Signální dráhy SA a JA/ET jsou vzájemně antagonické, ale objevují se i publikace naznačující synergické působení (Mur *et al.*, 2005; Mur *et al.*, 2008). Vztah mezi signalizací SA a JA dráhy závisí na relativních koncentracích každého hormonu. Nízké koncentrace SA mohou působit synergicky s JA v regulované indukci obranných proteinů jako jsou PR-1 a PDF1.2 (Mur *et al.*, 2006). Antagonický vztah mezi signalizací SA a JA je pozorován, pokud jsou tyto hormony přítomny ve vysokých koncentracích, a to často vede k vytvoření oxidativního stresu a buněčné smrti (Mur *et al.*, 2006). Vzájemné antagonické působení mezi drahami SA a JA je dobře známo. NPR1 hraje klíčovou roli při potlačení signalizace JA prostřednictvím signální dráhy SA. Bylo zjištěno, že jaderná lokalizace NPR1 je vyžadována pro aktivaci odpovědí závislých na SA, ale ne pro potlačení JA odpovědi zprostředkované SA (Zhang *et al.*, 2018). Transkripční faktory ze třídy TGA (TGA2/5/6) jsou pozitivními regulátory exprese PDF1.2 (Zander *et al.*, 2010), zatímco transkripční faktor MYC2, který je hlavním regulátorem signalizace JA, má negativní vliv na expresi PDF1.2 (Lorenzo *et al.*, 2004).

Je známo, že po indukci biosyntézy ET v průběhu reakce na abiotické stresy může SA potlačit signalizaci JA v nepřítomnosti NPR1 (Leon-Reyes *et al.*, 2009). Toto zjištění je poněkud překvapující a ukazuje, že ET a JA mohou synergicky regulovat expresi PDF1.2.

1.5.4.1 Reaktivní formy kyslíku a signální dráhy hormonů

Signální dráhy hormonů jsou propojeny s celou řadou dalších regulačních drah zahrnující různé obranné signální cesty a vývojové procesy. Regulace produkce a akumulace ROS je pravděpodobně zapojena do vzájemného působení signálních drah ET, SA a JA. Regulace hladiny ROS v různých buněčných kompartmentech je jedním z mechanismů, kterým signální dráhy rostlinných hormonů regulují rostlinný růst a vývoj (Vivancos *et al.*, 2010; Janků *et al.*, 2019). Signální dráha SA vyvolává změny v produkci a odbourávání ROS v chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech (Khokon *et al.*, 2011). Funkce JA indukující ROS zůstává kontroverzní. Velmi vysoké hladiny JA pravděpodobně způsobují akumulaci ROS a buněčnou smrt, nízké koncentrace JA naopak aktivují produkci NO (Orozco-Cárdenas a Ryan, 2002).

Během poranění dochází u rostlin k produkci oligogalakturonidů, které zvyšují biosyntézu JA (Doares *et al.*, 1995). Extracelulární ATP zprostředkovává signál z poraněných buněk vedoucí k indukci ROS prostřednictvím aktivace RBOH a expresi genů pro biosyntézu JA (Song *et al.*, 2006). Zvýšení hladiny Ca^{2+} a ROS spolu s aktivací kaskády MAPK v časně fázi obranné reakce na poranění jsou důležité v regulaci biosyntézy JA. Inhibice produkce ROS (Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001) nebo potlačení aktivity MAPK (Kandoth *et al.*, 2007) snižuje expresi genů indukovanou v pozdní fázi poranění, ale nedochází k ovlivnění exprese genů biosyntézy JA u rajčat. Cytoplazmatická alkalizace a produkce ROS jsou nutné pro zavření průduchů indukované JA (Suhita *et al.*, 2004).

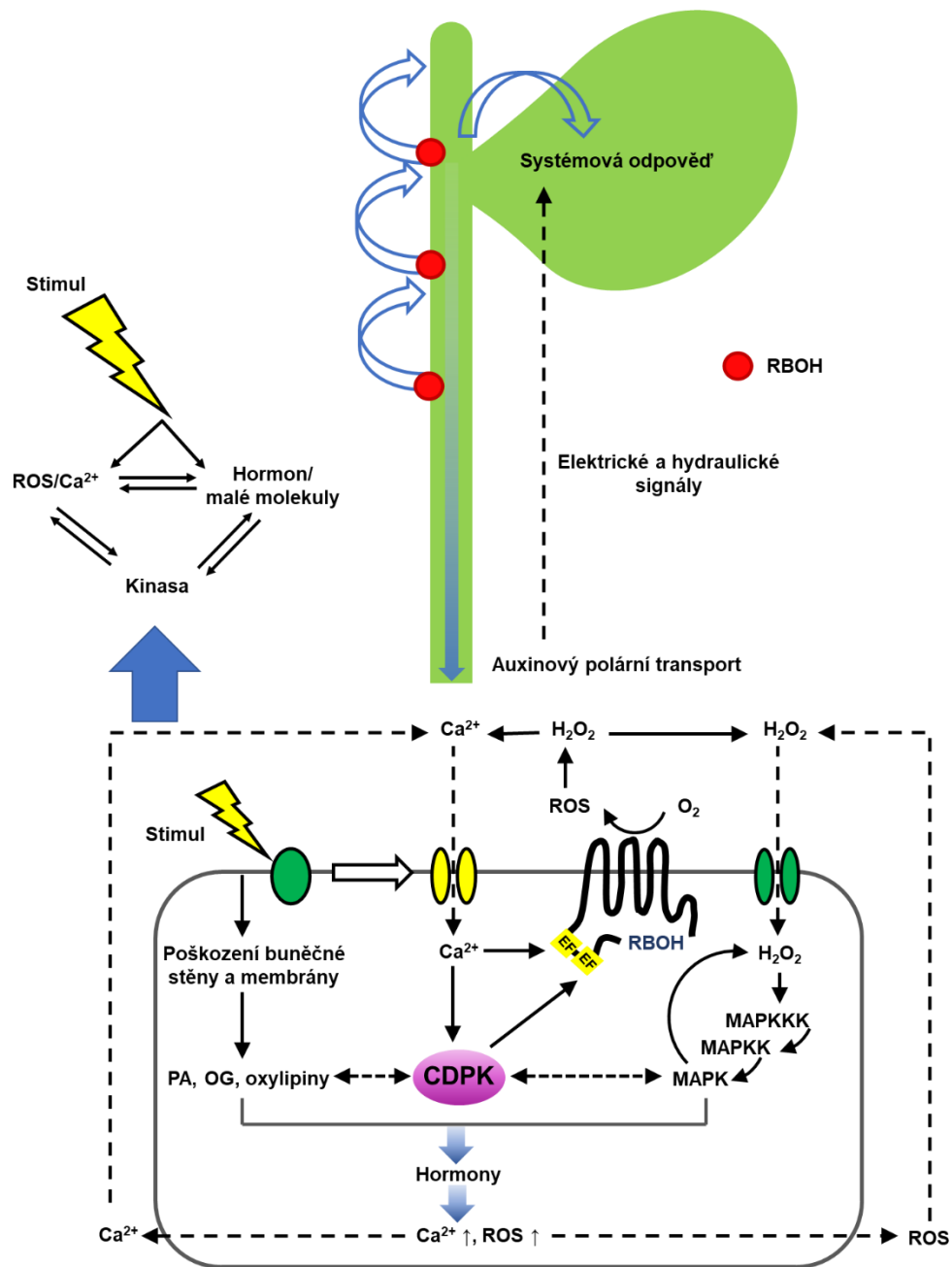
ROS zprostředkovávají různé odpovědi, které ET vyvolává v rostlinách, např. aktivaci uzavření průduchů v *Arabidopsis* prostřednictvím peroxidu vodíku produkovaného enzymem SOD ze superoxidového anion-radikálu vznikajícího katalýzou RBOH (Desikan *et al.*, 2006). Navíc ET zprostředkovává uzavření průduchů indukované UV-B u *Vicia faba* prostřednictvím zvýšené hladiny peroxidu vodíku závislé na peroxidasach (Xia *et al.*, 2015).

ROS jsou stejně jako SA kromě lokální obrany proti biotrofním a hemibiotrofním patogenům zapojeny také do zprostředkování SAR (Alvarez *et al.*, 1998). Rozpoznání virulentních patogenů spouští lokalizovaný oxidativní stres, který může vést k HR spojené s buněčnou smrtí. Pro SAR jsou charakteristické změny v hladinách ROS v lokálním pletivu i v místech vzdálenějších od místa infekce (Xia *et al.*, 2015).

Podobně jako u SAR může lokální mechanické poškození vyvolávat systémovou obrannou odezvu v nepoškozeném pletivu (Li *et al.*, 2002). Pro tuto obrannou odpověď je nutná signalizace JA. Poranění rychle aktivuje akumulaci ROS v lokálním i vzdálenějším pletivu (Orozco-Cardenas a Ryan, 1999). ROS produkované RBOH jsou důležité pro rychlou systémovou signalizaci

spouštěnou různými stresy včetně poranění (Miller *et al.*, 2008). Inhibitory RBOH blokují elicitem aktivovanou biosyntézu JA v buněčné kultuře zázvoru (Hu *et al.*, 2003). Zatímco produkce ROS v odpovědi na poranění je spojována s biosyntézou JA a ROS působí jako druhý posel (Orozco-Cardenas a Ryan, 1999; Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001), vztah mezi akumulací ROS a aktivací syntézy JA ve vzdálenějších pletivech zůstává nejasný. Signalizace JA může pravděpodobně zvýšit hladinu ROS a aktivovat obrannou odpověď na poranění.

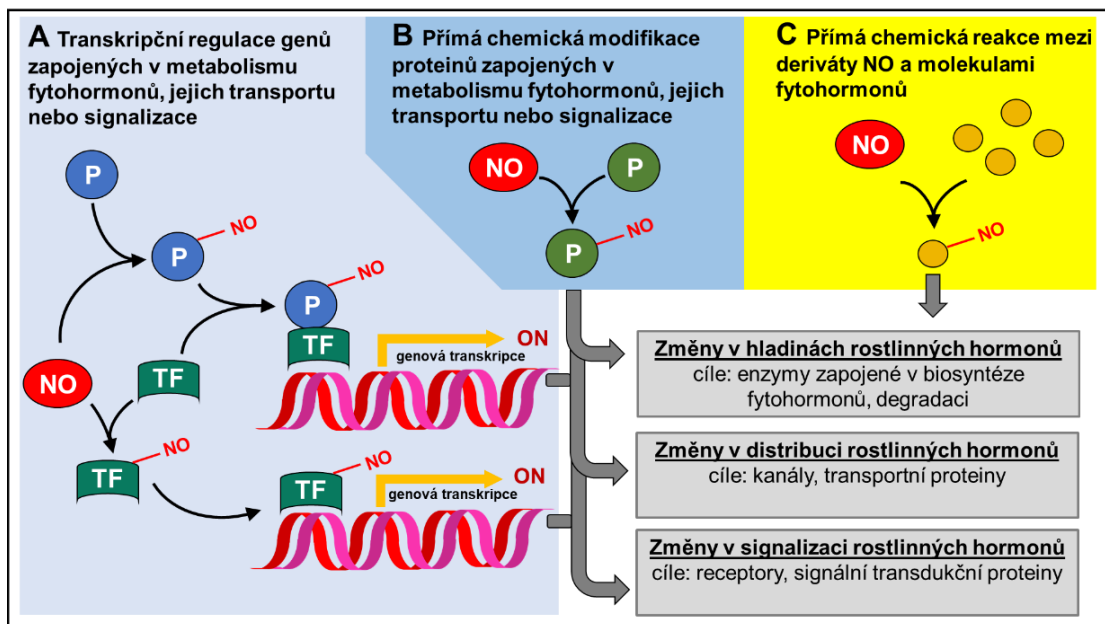
Analogicky k SAR se signální odpověď po abiotickém stresu ve vzdálenějších pletivech nazývá systémová získaná aklimatizace (SAA, Systemic acquired acclimatization). V současné době jsou hormony ABA a ET považovány za zprostředkovatele signalizace v reakci na sucho nebo nedostatek živin (Xia *et al.*, 2015). Znázornění signálních drah v systémové odpovědi rostlin ukazuje Obr. 16.



Obr. 16 Přehled signálních drah v systémové odpovědi rostlin. V lokálních částech rostliny vystavené specifickým podnětům, např. napadení patogeny, zranění nebo působení intenzivního ozáření, jsou aktivovány kanály pro Ca^{2+} ionty, což vede ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě. Působení stresových faktorů způsobuje poškození buněčné stěny nebo membrány a tvorbu malých molekul, jako je kyselina fosfatidová (PA), oligogalakturonidy (OG) a oxylipiny. Ca^{2+} spolu s Ca^{2+} -dependentní proteinkinásou (CDPK) aktivují NADPHoxidasu (RBOH) a zvýšení extracelulárních ROS aktivuje další Ca^{2+} kanály. ROS produkované RBOH aktivují fosforylační kaskádu tvořenou mitogenem aktivovaných proteinkinás (MAPKKK, MAPKK, MAPK), která může tvořit s ROS pozitivní amplifikační smyčku. CDPK, MAPK a malé molekuly synergicky regulují biosyntézu hormonů, které mohou iniciovat další fáze produkce Ca^{2+} a ROS. Signál přenášený Ca^{2+} a ROS může vyvolat podobný proces a aktivaci signálních drah v sousedních buňkách. ROS/ Ca^{2+} , hormony/malé molekuly a kinasa se vzájemně regulují a tvoří pozitivní amplifikační smyčku. Tímto způsobem se signál specifický pro stimuly šíří v rostlinách. Meristém výhonku může vnímat změny v rostlině a regulovat růst rostlin prostřednictvím polárního transportu auxinu. Interakce ROS/ Ca^{2+} a hormonů/malých molekul zprostředkují systémovou signalizaci, zatímco RBOH hraje důležitou roli v zesílení signalizace. Signální smyčka indukuje tok Ca^{2+} přes membránu a hyperpolarizaci nebo depolarizaci membrány, která působí jako elektrický signál. Fyzikální signály, např. elektrické nebo hydraulické, produkované po lokálních stimulech nezávisle nebo závisle na signální smyčce, jsou potenciálně zapojeny do systémové signalizace (přepřacováno dle Xia *et al.*, 2015).

1.5.4.2 Oxid dusnatý a signální dráhy rostlinných hormonů

NO je společně se sulfanem a oxidem uhelnatým řazen mezi plynné hormony, které regulují řadu pochodů během vývoje a růstu rostlin a jejich odpovědi na stresové podmínky (Astier *et al.*, 2018). NO je společně s ROS významně zapojen v signálních drahách dalších rostlinných hormonů. Po infekci biotrofními a hemibiotrofními patogeny NO přispívá k aktivaci biosyntézy SA prostřednictvím ICS (Mur *et al.*, 2013). Zároveň ovlivňuje signální dráhu SA regulací oligomerizace aktivátoru NPR1 prostřednictvím jeho S-nitrosylace (Mur *et al.*, 2013). V jasmonátové dráze NO aktivuje expresi LOX3 (EC 1.13.11.12) a 12-oxofytodienoát reduktasy 1, 2, 3 (OPR1, 2, 3; EC 1.3.1.42), naopak expresi allenoxidcykasy (AOC, EC 5.3.99.6) potlačuje. U ethylenové dráhy NO aktivuje expresi genů podílejících se na biosyntéze ET, tedy ACS a ACO (Mur *et al.*, 2013). Přehled interakcí NO a rostlinných hormonů znázorňuje Obr. 17.



Obr. 17 Přehled potenciálních mechanismů interakce oxidu dusnatého (NO) s fytohormony. (A) Chemicky modifikované transkripční faktory (TF) a jiné proteiny (P) prostřednictvím NO mohou ovlivnit expresi genů zapojených do metabolismu, transportu nebo signalizace u rostlin. (B) NO může posttranslačně modifikovat proteiny (P) přímo zapojené do produkce, distribuce nebo signalizace rostlinných hormonů. (C) NO nebo reaktivní sloučeniny odvozené od NO mohou reagovat s určitými rostlinnými hormony a vznikají produkty se změněnou biologickou aktivitou. Chemické modifikace závislé na NO jsou reprezentovány jako „-NO“ (přepřacováno dle Freschi, 2013).

1.6 Elicitiny

Elicitory jsou sloučeniny pocházející z velmi různorodých zdrojů, které se uplatňují při interakcích rostlin a mikrobiálních organismů. Pod pojmem elicitor se v biologii rozumí sloučenina, která je schopna stimulovat tvorbu (biosyntézu) jiné sloučeniny uvnitř buněčného (rostlinného) organismu. Elicitory lze obecně klasifikovat z různých hledisek (Hahn, 1996) jako endogenní a exogenní (primární a sekundární), specifické a obecné (nespecifické), biotické a abiotické (fyzikální a chemické) a elicitory proteinové a neproteinové povahy (Tab. 3).

Tab. 3 Přehled fyzikálních a chemických elicitorů vyvolávající obranné reakce u rostlin (přepřacováno dle Radman *et al.*, 2003)

| ELICITORY | | | | | |
|---------------------|-----------|--------------------|---------------------------------------|----------------|---|
| Fyzikální elicitory | Poranění | | | | |
| Chemické elicitory | Abiotické | | Kovové ionty (stříbro, kadmium), NaCl | | |
| | Biotické | Komplexní složení | Buněčná stěna kvasinek, houbové spory | | |
| | | Definované složení | Sacharidy | Polysacharidy | Alginát, pektin, chitosan |
| | | | | Oligosacharidy | Mannuronát, guluronát, mannan, |
| | | | Peptidy | | Glutathion |
| | | | Proteiny | | Celulosa, elicitory |
| | | | Glykoproteiny | | |
| | | | Lipidy | | Lipopolysacharidy |
| | | | Těkavé látky | | Organické sloučeniny C ₆ – C ₁₀ |

Elicitiny jsou malé proteiny o velikosti cca 10 kDa produkované jako extracelulární proteiny patogenními oomycetami rodu *Phytophthora* a *Pythium* (Bonnet *et al.*, 1996; Kamoun *et al.*, 1997; Ponchet *et al.*, 1999). Společným strukturálním znakem elicitinů je vysoce konzervovaná doména aminokyselin 1 až 98, obsahující 6 cysteinových reziduí, které vytvářejí 3 disulfidické můstky (Fefeu *et al.*, 1997). Elicitiny stejně jako jiné sekreční proteiny jsou syntetizovány ve formě preproteinů, u kterých je následně odstraněn signální peptid. Ten je obvykle 18 - 20 aminokyselin dlouhý a mezi elicitory vysoce konzervovaný (Ponchet *et al.*, 1999). Geny kódující elicitory z rodu *Phytophthora* jsou rovněž vysoce konzervované. Elicitiny jsou konstitutivně exprimovány ve velkém množství i v nepřítomnosti interakce patogenu s rostlinou. U všech elicitinů byly identifikovány mnohonásobné kopie homologních sekvencí genů. Elicitiny nemají enzymovou aktivitu a díky své schopnosti přenášet mastné kyseliny a steroly pomocí hydrofobní dutiny ve své struktuře jsou řazeny do skupiny tzv. proteinů přenášejících lipidy (LTP, Lipid transfer proteins) (Mikeš *et al.*, 1998). Zapojení elicitinů v indukci HR a SAR byla poprvé popsána při interakci oomycet rodu *Phytophthora* s rostlinami tabáku (Bonnet, 1988). Všechny druhy tabáku jsou citlivé na elicitory produkované různými druhy *Phytophthora* spp. Kromě tabáku byly následně popsány další druhy rostlin citlivé k elicitinům, jako je rajče, brambora,

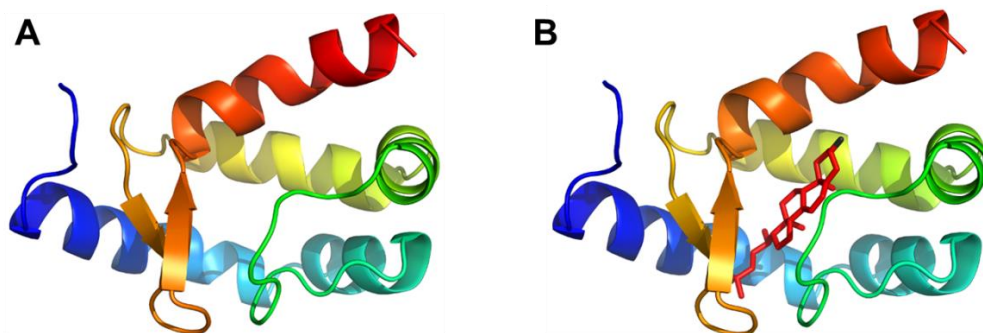
paprika (*Solanaceae*), hrách (*Fabaceae*), vinná réva (*Vitaceae*), citrus (*Rutaceae*), dub (*Fagaceae*) a některé kultivary ředkve a tuřínu (*Brassicaceae*) (Derevnina *et al.*, 2016). Zda bude aktivována HR závisí na typu elicitinu a interagujícím rostlinném druhu. Např. elicitin infestin (INF1) produkovaný *Phytophthora infestans* aktivuje obrannou odpověď zprostředkovanou drahami JA a ET u rajčete a zesiluje rezistenci k bakteriálnímu patogenu *Ralstonia solanacearum* bez aktivace HR (Glazebrook, 2005; Kawamura *et al.*, 2009).

Podle primární struktury se elicitiny dělí do pěti tříd. Třída I obsahuje proteiny složené z 98 aminokyselin a dělí se na kyselé (I- α) a bazické (I- β). Většinu elicitinů produkovaných rodem *Pythium* řadíme do třídy I'. Ty jsou tvořeny 98-101 aminokyselinami a elicitiny této třídy jsou charakteristické obsahem glykosylačních míst. Třída II je tvořena silně kyselými elicitiny s délkou řetězce 103-104 aminokyselin s krátkým hydrofilním C-koncem. Elicitiny patřící do třídy III jsou proteiny tvořené 165-170 aminokyselinami, z nichž 98 je typických pro elicitiny a následující aminokyseliny na C-konci představují O-glykosylovanou doménu (Ponchet *et al.*, 1999).

Elicitiny třídy I dělíme na základě jejich hodnoty pI na kyselé (α -elicitiny, pI < 5) a bazické (β -elicitiny, pI > 7,5) (Le Berre *et al.*, 1994). Ačkoliv se α - i β -elicitiny vážou k vysokoafinitnímu vazebnému místu na plazmatické membráně se stejnou afinitou (Bourque *et al.*, 1998), jsou β -elicitiny po aplikaci na dekapitovanou tabákovou rostlinu 50 - 100-násobně aktivnější v navození HR a SAR než α -elicitiny. Navíc Bourque *et al.* (1998) ukázali, že β -elicitiny jsou v tabákové buněčné suspenzi nejméně 10-násobně více účinné v aktivaci změny extracelulárního pH, produkci ROS nebo změny koncentrace Ca^{2+} v porovnání s α -elicitiny. Obecně se β -elicitiny vyznačují vyšší biologickou aktivitou než α -elicitiny. Typickým zástupcem elicitinů třídy I- β je β -kryptogein (β -CRY). Schopnost mutantní formy β -CRY K13V, kdy je aminokyselina lysin v poloze 13 nahrazena aminokyselinou valinem, vázat volné steroly a mastné kyseliny je v porovnání s nativní formou β -CRY snížena. Schopnost mutantní formy K13V přenášet steroly mezi micelami byla 5-násobně snížena a přenos mastných kyselin nebyl vůbec pozorován. Tento rozdíl je podobný jako v případě porovnání β -elicitinů s α -elicitiny, které mají na pozici 13 valin (Vauthrin *et al.*, 1999). Snížená schopnost přenášet steroly, ačkoli vazba je stále možná, naznačuje zásadní roli kladně nabitého zbytku v poloze 13 v interakcích elicitinů s biologickými membránami (Plešková *et al.*, 2011).

P. cryptogea produkuje několik isoform CRY lišících se v hodnotách pI. Nejvíce zastoupený je bazický β -CRY (Le Berre *et al.*, 1994). Je složen z 5 α -helixů, 1 dvouvláknového antiparalelního β -skládaného listu a ω -smyčky, která je důležitá pro vazbu sterolů (Obr. 18 A). Kromě samotného β -CRY je zobrazen komplex β -CRY s ergosterolem jako zástupcem přenášených sterolů (Obr. 18 B). Tato vazba je nezbytná pro sexuální a asexuální reprodukci patogenu, který postrádá schopnost syntetizovat steroly a přijímá je od hostitelské rostliny. Elicitiny jako β -CRY se obecně skládají z 98 či více aminokyselin a jednotlivé proteiny se shodují

více než v 60 % aminokyselinové sekvence. Molekulová hmotnost β -CRY stanovená MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií byla určena jako 10 386 Da (Dokládál *et al.*, 2012). U *P. cryptogea* byly charakterizovány 4 geny kódující elicitinu, které se dělí na 2 skupiny: 2 geny kódují elicitinu o velikosti 98 aminokyselin a 2 geny kódují elicitinu o velikosti 103 aminokyselin. Tyto 4 geny jsou součástí genového klastru o velikosti okolo 6 kb (Panabieres *et al.*, 1995).



Obr. 18 Terciární struktura A) β -kryptogeinu a B) komplexu mutantu β -kryptogeinu K13H (lysin je v pozici 13 nahrazen aminokyselinou histidin) s ergosterolem (převzato z databáze SCOPe, <http://scop.berkeley.edu/sunid=48649>, Boissy *et al.*, 1999).

Interakci β -CRY s vysokoafinitním vazebným místem na plazmatické membráně se spouští řada významných reakcí uvnitř rostlinné buňky, např. dochází ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} v buňce (Tavernier *et al.*, 1995; Pugin *et al.*, 1997), naopak chloridové a draselné ionty jsou transportovány vně buňky, což vede k alkalizaci apoplastu (Blein *et al.*, 1991), dochází k aktivaci RBOH (Simon-Plas *et al.*, 2002), změně uspořádání plazmatické membrány (Gerbeau-Pissot *et al.*, 2014), aktivaci kaskády MAPK (Dahan *et al.*, 2009) a endocytózy závislé na klatrinech (Leborgne-Castel *et al.*, 2008). Další studie ukázala, že po aplikaci β -CRY se u tabákových buněk BY-2 rapidně zvyšuje hladina PA (Cacas *et al.*, 2017), která je základním fosfoglycerolipidem a meziproductem syntézy fosfolipidů (Petroustos *et al.*, 2014). U tabákových buněk dochází vlivem β -CRY k S-nitrosylaci molekulárních chaperonů Cdc48 (NtCdc48) (Astier *et al.*, 2012). S-nitrosylace NtCdc48 nastává během prvních 2 h po aplikaci β -CRY současně s produkcí NO a dalšími signály zahrnující např. produkci ROS (Kulik *et al.*, 2015). β -CRY spouští zvýšenou akumulaci transkriptu i proteinu NtCdc48 a tato nadprodukce vede ke zvýšené buněčné smrti (Rosnoble *et al.*, 2017).

Publikované studie ukazují, že aktivita elicitinů závisí na přítomnosti specifických lysinů v jejich molekule (Pernollet *et al.*, 1993; Plešková *et al.*, 2011; Dokládál *et al.*, 2012). Je známo, že β -CRY na svém povrchu obsahuje 6 lysinových residuů v porovnání se 3 lysiny u α -elicitinů. Lysinová residua se zdají být nezbytná pro interakci β -CRY s vysokoafinitním vazebným místem v rostlinné membráně (Dokládál *et al.*, 2012). Struktura a distribuce náboje u těchto proteinů může být klíčem k jejich biologické aktivitě (Plešková *et al.*, 2011).

V současné době je pozornost výzkumu soustředěna na studium biologických vlastností elicitinů s využitím mutantů odvozených např. od β -CRY připravených řízenou mutagenézí,

při které dochází k záměně jedné nebo více aminokyselin. Výsledky s mutantními formami β -CRY podporují hypotézu, že vazba a přenos sterolů neovlivňují prvotní obranné reakce rostlin, jako je syntéza ROS nebo acidifikace cytosolu, ani pozdní reakce jako je nekróza listů. Zdá se, že odebrání sterolů z buněčné membrány vede k usnadnění šíření patogena v napadeném rostlinném pletivu (Lochman *et al.*, 2005; Plešková *et al.*, 2011). I další výsledky spíše naznačují, že vazba sterolů není pro biologickou aktivitu β -CRY klíčová (Dokládal *et al.*, 2012; Uhlíková *et al.*, 2016).

Rozložení náboje a celková struktura proteinů ovlivňuje biologickou aktivitu elicitinů více než schopnost vázat a přenášet steroly. Jedná se o mechanismy, které se podílejí na buněčné smrti, jako je zvýšená produkce NO, stimulace lipidové peroxidace zvýšením aktivity enzymu 9-lipoxygenasy (9-LOX, EC 1.13.11.58), autooxidace (Rusterucci *et al.*, 1999; Cacas *et al.*, 2005) nebo akumulace transkriptu 9-LOX. Vložení negativně nabitě aminokyseliny do struktury elicitinů ovlivňuje většinu procesů zapojených do rané fáze obranné reakce, zatímco pozitivně nabitá rezidua ovlivňují specificky nekrotickou aktivitu β -CRY, což ovšem závisí i na pozici změněné aminokyseliny. Příkladem je mutantní forma β -CRY L19R, u které došlo k záměně leucinu za arginin v pozici 19. Zatímco u formy L19R byla nekrotická aktivita v porovnání s β -CRY snížena jen nepatrně, pozitivní argininový zbytek u dvojitého mutantu L15W/L36F + R, který je lokalizován na povrchu proteinu, potlačuje nekrotickou aktivitu β -CRY úplně (argininový zbytek u tohoto mutantu byl spontánně přidán kvasinkou *Pichia pastoris* na N-konec dvojitého mutantu L15W/L36F). Negativně nabitá sekvence EAEA na konci řetězce u mutantu L19R naopak inhibuje procesy aktivované v rané fázi obranné reakce (Ptáčková *et al.*, 2015).

Tvorba NO aktivovaná β -CRY u tabákových buněk je částečně ovlivněna produkcí ROS prostřednictvím RBOH (Kulik *et al.*, 2015). Jak již bylo zmíněno, posttranslační modifikace způsobené NO byly potvrzeny u enzymů spojených s produkcí ROS jako je RBOH (Yun *et al.*, 2011) a také enzymů zapojených do katabolismu ROS jako je např. CAT (Clark *et al.*, 2000), APX (Clark *et al.*, 2000; De Pinto *et al.*, 2013) a MDHAR (Begara-Morales *et al.*, 2014).

Produkce elicitinů není pouze výsadou patogenů rodu *Phytophthora*, rovněž zástupci rodu *Pythium* mají schopnost produkovat tyto malé proteiny. Jeden z elicitinů sekretovaný druhem *P. oligandrum* je oligandrin. Oligandrin je kyselý 10 kDa protein řadící se mezi α -elicitiny. Oligandrin může aktivovat obranné mechanismy, které hrají důležitou roli v obraně při napadení rostlin patogenními organismy (Lascombe *et al.*, 2000). Po ošetření oligandrinem byla prokázána vyšší rezistence rajčete např. na *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* a *Botrytis cinerea* (Picard *et al.*, 2000; Benhamou *et al.*, 2001; Lherminier *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011). Přesný mechanismus obranných reakcí vyvolaných oligandrinem u rostlin zůstává nejasný. Pravděpodobně dochází ke stimulaci aktivity řady enzymů zapojených v obranných mechanismech, jako jsou např. PAL, polyfenoloxidas, peroxidasy a k expresi PR genů spojených s produkcí příslušných proteinů (Bezier *et al.*, 2002; Robert *et al.*, 2002). Zatímco

některé výsledky prokazují po elicitaci oligandrinem aktivaci signálních drah SA, JA a ET (Lou *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011), jiné práce naopak poukazují na spuštění obranné reakce pouze prostřednictvím drah JA a ET (Hase *et al.*, 2006; Hase *et al.*, 2008). U rajčat po ošetření oligandrinem nedochází k významným strukturálním obranným mechanismům (Picard *et al.*, 2000). U tabáku oligandrin spouští aktivaci obranných reakcí, jako je impregnace buněčné stěny fenolickými látkami a akumulace nově syntetizovaných proteinů ve floémových svazcích (Lhermenier *et al.*, 2003). Podobné reakce byly sledovány u rostlin vinné révy ošetřených oligandrinem a infikovaných *B. cinerea* (Mohamed *et al.*, 2007). Při interakci rajčete a patogena *P. parasitica* oligandrin stimuluje fenylypropanoidní a terpenoidní dráhu vedoucí k akumulaci fenolických komponent, které napadají buněčnou stěnu patogena (Benhamou *et al.*, 2012). Je zřejmé, že obranné mechanismy vyvolané oligandrinem se liší u jednotlivých rostlin a je potřebné další studium této problematiky.

Poznátky týkající se elicitinů se zaměřením na β -CRY jako modelový elicitin jsou shrnuty v přehledném článku „Elicitiny: Klíčové molekuly interakcí rostlin a patogenů“ publikovaném v časopise *Chemické listy* v roce 2014 (*Příloha 1*).

PŘÍLOHA 1

Elicitiny: Klíčové molekuly interakcí rostlin a patogenů

Pavla Moricová, Lenka Luhová, Jan Lochman, Tomáš Kašparovský, Marek Petřivalský

Chemické listy 108, 1133-1139 (2014)

ELICITINY: KLÍČOVÉ MOLEKULY INTERAKCÍ ROSTLIN A PATOGENŮ

PAVLA MORICOVÁ^a, LENKA LUHOVÁ^a, JAN LOCHMAN^b, TOMÁŠ KAŠPAROVSKÝ^b
a MAREK PETŘIVALSKÝ^a

^aKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ^bÚstav biochemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno
marek.petrivalsky@upol.cz

Došlo 17.7.14, přijato 26.9.14.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: elicitory, elicitiny, kryptogein, nekroza, obranné mechanismy rostliny, steroly

Obsah

1. Úvod
2. Elicitory
3. Elicitiny – proteinové elicitory rostlinných patogenů
4. Elicitiny jako přenašeče sterolů a mastných kyselin
5. Signální dráhy v rostlinných buňkách iniciované elicitiny
6. Kryptogein
7. Závěr

1. Úvod

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny působení proměnlivého vnějšího prostředí a musí často čelit působení stresových faktorů abiotické i biotické povahy. Působením biotických stresových faktorů, jako jsou infekce viry, bakteriemi a houbami, vedlo v průběhu evolučního procesu u rostlin k vývoji účinného obranného systému, zahrnujícího různorodé specifické i nespecifické obranné mechanismy. Mezi nespecifické reakce patří tvorba a zesílení mechanických bariér, produkce sekundárních metabolitů nebo antimikrobiálních proteinů, které brání průniku patogenu do organismu, popřípadě zabraňují jeho dalšímu šíření¹. Specifická obrana aktivuje mechanismy vedoucí přímo k eliminaci daného patogenu, např. zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku vyvolává tzv. hypersenzitivní reakci (HR), při které rostlina reaguje na infekci patogenu poškozením vlastních buněk v místě průniku patogenu do rostlinných pletiv. HR ve formě kontrolované buněčné smrti v místě infekce zbavuje patogen výživového základu a tím limituje jeho růst a vývoj^{2,3}.

V rámci komplexního imunitního systému rostlin byly identifikovány dvě hlavní složky: imunita aktivovaná tzv. molekulárními vzory asociovanými s patogeny (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) a imunita vyvolaná efektor (ETI, effector-triggered immunity)⁴⁻⁶. Jako PAMPs se označují evolučně staré struktury, které jsou v rámci vrozené imunity rozeznávány transmembránovými rekogničními receptory. Patogeny ovšem vyvinuly schopnost překonat imunitní složky aktivované PAMPs pomocí vnesení svých efektorů virulence dovnitř hostitelských buněk. K obraně rostliny využívají specifické proteiny s vazebnými místy pro polymorfni nukleotidy, které jsou kódovány geny rezistence (*R* geny) a specificky přímo nebo nepřímo rozeznávají většinu patogenních faktorů avirulence (*Avr*)⁴. Tato složka rostlinné imunity aktivovaná efektor je na rozdíl od imunity aktivované PAMPs velmi specifická a je často spojena s HR v místě infekce, kterou lze považovat za jeden z nejdůležitějších znaků pro zabránění růstu biotrofního patogena⁵.

Ačkoli zmíněné dvě složky imunitního systému rostlin zapojují odlišné receptory, sdílejí aktivaci řady společných obranných mechanismů⁷. Ve fázi časně (vteřiny až minuty) po rozeznání patogenních struktur se jedná např. o změny v koncentracích a tocích iontů a tvorbu reaktivních forem kyslíku, ve fázi střední (minuty až hodiny) o aktivaci proteinkinas, transkripce genů a produkci hormonu ethylenu, a ve fázi pozdní (hodiny až dny) např. akumulaci hormonu kyseliny salicylové (SA) a tvorbu kalosy. Změny v hladinách fytohormonů po napadení rostliny patogenem způsobují další změny v expresi obranných genů a aktivaci obranných reakcí⁶⁻⁹.

Jedním z mechanismů, kterým rostliny reagují na útok patogenu, je systémová získaná rezistence (SAR). Vede k odolnosti rostliny a chrání ji proti širokému spektru patogenů. SA je dlouhodobě známa jako klíčová látka pro aktivaci SAR a důležitou součástí signálních mechanismů vedoucích k rozvoji SAR jsou kyselina jasmonová (JA) a auxiny. SAR je asociována s aktivací velkého počtu genů kódujících různé typy stresových proteinů včetně tzv. s patogenezi souvisejících proteinů (PR proteiny, pathogenesis-related proteins). Tyto proteiny produkované hostitelskou rostlinou jsou exprimovány specificky jednak lokálně v místech infekce patogenem a jejich exprese je rovněž indukována jakou součástí SAR i v dalších částech rostliny⁶.

2. Elicitory

Látky spouštějící obranné reakce v interakci rostlina-patogen, jako součást výše popsaných mechanismů imunity PAMP a PTI, označujeme jako elicitory. Z chemického hlediska se jedná o celé spektrum látek zahrnující proteiny,

peptidy, oligosacharidy i nízkomolekulární sloučeniny. Elicitory se váží na specifické receptory nebo vysokoafinitní místa lokalizovaná obvykle na povrchu buněčných membrán a následně dochází k aktivaci signálních drah spouštějící vlastní obranné reakce rostlinných buněk^{6,8}.

Primární elicitory pocházejí z patogenů, zatímco jako elicitory sekundární jsou označovány látky uvolněné rostlinou po napadení patogenem⁹. Elicitory lze také dělit na nespecifické a specifické: mezi nespecifické elicitory patří látky, které se vyskytují u celé řady patogenů (např. polysacharidy buněčných stěn nebo některé nízkomolekulární látky jako mastné kyseliny, steroly apod.), specifické elicitory jsou tvořeny konkrétním patogenem – ve většině případů jde o produkty *Avr* genů, které zpravidla bývají rozpoznávány jen určitou skupinou hostitelů. Reakce na specifické elicitory bývá také zpravidla mnohem komplexnější než je tomu u nespecifických elicatorů^{4,8,9}.

3. Elicitiny – proteinové elicitory

Zvláštní skupinou specifických elicatorů představují elicitiny. Jedná se o malé extracelulární proteiny vylučované zástupci oomycet, zejména rodů *Phytophthora* a *Pythium*, jejichž struktura je vysoce konzervovaná^{10,11}. Elicitiny nemají enzymovou aktivitu, nicméně patří do skupiny tzv. proteinů přenášející lipidy (lipid transfer proteins, LTP), které jsou schopny přenášet mastné kyseliny a steroly¹². Rozpoznávání elicitinů hostitelskými rostlinami je vysoce citlivé, např. u tabáku je pro vyvolání obranné reakce dostatečná již nanomolární koncentrace.

Elicitiny byly poprvé popsány jako monomerní hydrofilní proteiny o velikosti cca 10 kDa, složeny obvykle z 98 aminokyselin¹³. Struktura elicitinů je obecně tvořena jedním antiparalelním β -listem a pěti α -helixy, které jsou stabilizovány každý třemi intramolekulárními disulfidovými můstky mezi šesti cysteiny lokalizovanými v konzervovaných pozicích. Ve struktuře zcela chybí aminokyseliny tryptofan, histidin a arginin, naopak serin a threonin představují přibližně 30 % proteinu. Nepřítomnost tryptofanu způsobuje, že elicitiny vykazují typická tyrosinová UV spektra¹⁰. Struktura elicitinů obsahuje hydrofobní dutinu, která umožňuje specifickou vazbu sterolů a mastných kyselin^{14–16}.

Elicitiny se podle primární struktury dělí do pěti tříd^{10,17,18}. Třída I zahrnuje proteiny tvořené 98 aminokyselinami obsahující vždy 6 cysteinů, 3 methioniny, 2 fenylalaniny, 3 glycinu. Pozice pro leucin, isoleucin, prolin a threonin jsou vysoce konzervované. Třída I se dělí na elicitiny kyselé (α -elicitiny, třída I-A) a bazické (β -elicitiny, třída I-B)¹⁹.

Většina elicitinů produkovaných patogeny rodu *Pythium* se řadí do třídy Py označované také jako I' (cit.¹⁷). Jedná se o skupinu kyselých elicitinů tvořených 98–101 aminokyselinami, která se mírně liší od třídy I, a je pro ni charakteristická přítomnost asparaginových glykosylačních míst. Třída II obsahuje silně kyselé elicitiny o velikosti

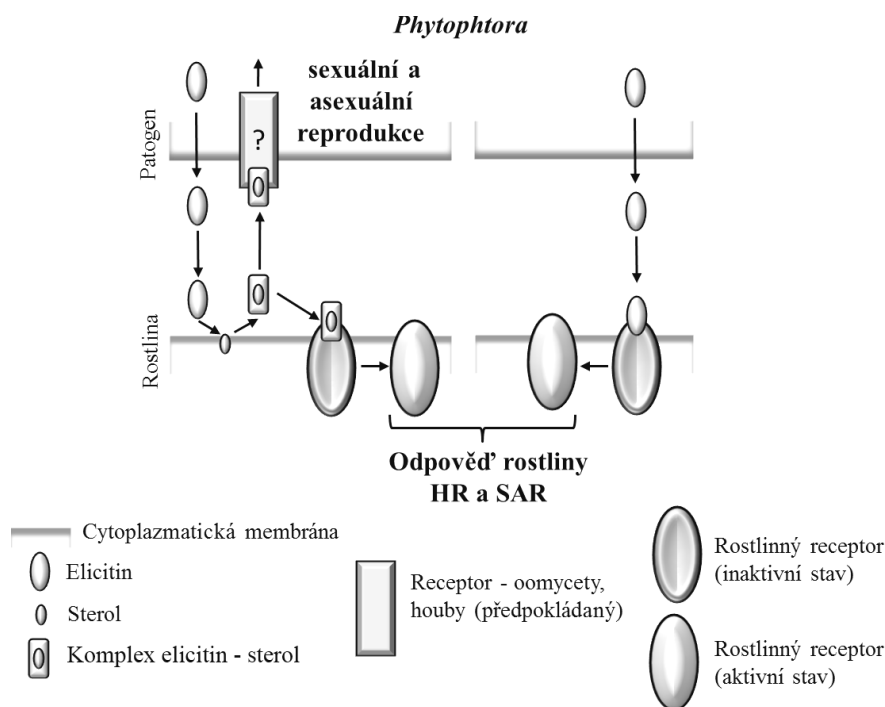
103–104 aminokyselin, které mají krátký hydrofilní C-terminální konec a jsou produkovány např. patogenem *Phytophthora cryptogea*²⁰. Elicitiny třídy III mají řetězec s délkou 165–170 aminokyselin, z nichž 98 je charakteristických pro elicitiny a následujících asi 70 aminokyselin na C-terminálním konci polypeptidického řetězce, tvořeném ze 75 % aminokyselinami serinem, threoninem a alaninem, představuje *O*-glykosylovanou doménu. Elicitiny třídy III jsou produkovány např. patogenem *Phytophthora infestans*¹⁷.

Elicitiny dělíme na základě jejich hodnoty pI na kyselé (α -elicitiny, pI < 5) a bazické (β -elicitiny, pI > 7,5)²¹. Obecně platí, že zatímco α -elicitiny jsou produkovány vždy, β -elicitiny pouze některými druhy patogenu. Počet negativně nabitých aminokyselin, jako jsou kyseliny asparagová a glutamová, je téměř konstantní a pohybuje se v rozmezí od 3 do 5. U β -elicitinů je pozitivní náboj dán přítomností 6 lysinů ve struktuře, u kyselých α -elicitinů jsou přítomny jen 2–4 lysiny. U vysoce bazických β -elicitinů byly identifikovány fosforylační místa na karboxylovém konci proteinu (rezidua 92–94), které u většiny α -elicitinů chybí. β -Kryptogein a β -drechslerin mají další fosforylační místa lokalizovaná uvnitř tzv. ω -smyčky (rezidua 37–39)¹⁰.

Strukturní rozdíly mezi oběma skupinami elicitinů se odráží i v rozdílných schopnostech aktivace HR rostlin a v hodnotách koncentrací potřebných pro vznik nekrózy rostlinných pletiv. Zvýšený nekrotický účinek u bazických elicitinů je zřejmě způsoben vysokým množstvím lysinů na povrchu proteinu. Bazické β -elicitiny mají v pozici 13 velký hydrofilní aminokyselinový zbytek (obvykle lysin), kdežto u kyselých α -elicitinů se na stejném místě nachází malý nepolární valin²². Kyselé α -elicitiny, jako např. kapsicein z *P. capsici*, vykazují o cca 2 řády nižší schopnost vyvolat nekrózu rostlinných buněk než bazické β -elicitiny jako kryptogein. Navíc např. u tabáku byla prokázána 10 až 50násobně vyšší aktivace systémové získané rezistence (SAR) bazickými elicitiny ve srovnání s kyselými¹⁰.

4. Elicitiny jako přenašeče sterolů a mastných kyselin

Patogenní organismy rodu *Phytophthora* a *Pythium* postrádají schopnost syntetizovat steroly, které jsou nezbytné pro jejich reprodukci. Elicitiny produkované těmito organismy působí jako látky vyčytávající steroly z hostitelského organismu a následně spouští aktivní fázi sexuální a asexuální reprodukce patogenu^{14–16}. Tyto fyziologické a morfologické změny vyžadují komplexní signální systém zahrnující specifické receptory i na straně oomycet (obr. 1). Na druhé straně po vazbě elicitinů ve formě komplexu sterol-elicitin na příslušný receptor hostitelského organismu, dochází k aktivaci obranného systému rostlin¹⁶. Dvojí role komplexu sterol-elicitin v reprodukci patogenu (virulentní faktor) a současně v mechanismech obrany rostliny (avirulentní faktor) tvoří základ dynamických in-



Obr. 1. Úloha elicitinů při transportu sterolů a aktivaci obranných reakcí rostlin (upraveno podle cit.^{12,23})

terakcí mezi patogenem a rostlinou. Elicitiny pronikají lépe do vnější vrstvy membrány než proteiny přenášející lipidy, které se však mohou chovat jako antagonisté elicitinů a potlačovat tak buněčné odpovědi na elicitin¹².

5. Signální dráhy rostlin aktivované elicitiny

Rozpoznání elicitinů rostlinnými buňkami je obecně zajištěno prostřednictvím receptorů, případně vysokoafinitních vazebných míst lokalizovaných v plazmatické membráně^{24,25}. Signální dráhy vyvolané elicitiny jsou znázorněny na obr. 2 (upraveno podle cit.¹⁰). Vazba elicitinu (1) na receptor vyvolává řadu změn v buňce na molekulární úrovni. Dochází k aktivaci efektorových proteinů fosforylací (2, 4), aktivaci vápníkových (3) a chloridových kanálků a současné inhibici H^+ -ATPasy (5) a aktivaci membránové NADPHoxidasy vedoucí k acidifikaci cytosolu a dalším buněčným odpovědím (8). Alkalizace extracelulárního média (7) vede k zesílení aktivace NADPHoxidasy, zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku a zvýšenému zabudování vápenatých iontů do buněčné stěny (9).

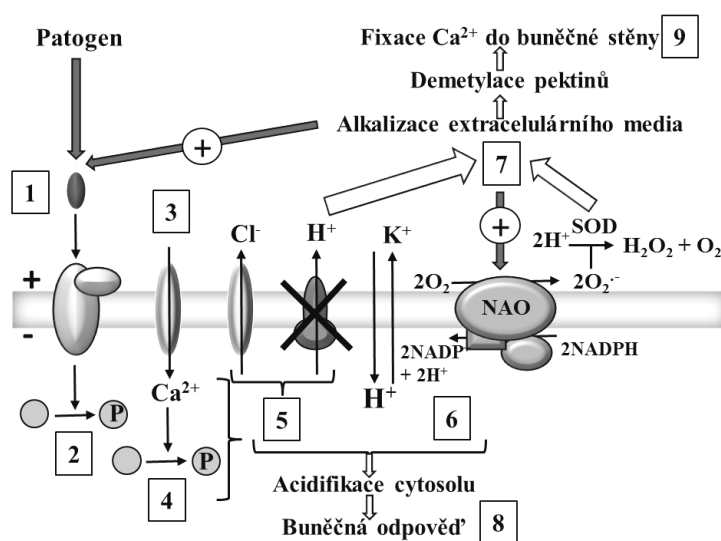
V důsledku vyplavení K^+ a Cl^- iontů z buňky dochází k depolarizaci membrány, která vede také k aktivaci signální dráhy vedoucí v první řadě k aktivaci NADPHoxidasy a blokaci H^+ -ATPasy. NADPHoxidasa produkuje superoxidový anion-radikál, který se dále přeměňuje na peroxid vodíku a další reaktivní formy kyslíku (ROS)^{26,27}. Inhibici plazmatické H^+ -ATPasy dochází ke snížení pH cytosolu, alkalizaci extracelulárního prostoru a zvýšení intracelulárního množství ATP^{12,27-29}. Tyto projevy rané fáze obranné

reakce lze pozorovat již několik minut po přidání elicitinu.

Na přenosu signálu v odpovědi rostliny na elicitin se podílí také změny ve fosforylačním stavu proteinů jako důsledek inhibice proteinfosfatasy a aktivace proteinkinas, mezi které patří např. skupiny proteinkinas aktivované mitogenem (MAPK), poškozením nebo zvýšenou hladinou kyseliny salicylové³⁰⁻³³. Působením elicitinů dochází dále ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů, které se vedle funkce druhých posílů uvnitř buňky podílí rovněž na zpevnění buněčné stěny^{30,34}.

Vedle ROS jsou do obranné reakce indukované elicitiny zapojeny i oxid dusnatý (NO) a reaktivní formy dusíku. Aplikace elicitinů vyvolává u rostlinných buněk zvýšenou produkci NO (cit.^{33,35,36}), která reguluje aktivity klíčových enzymů posttranslačními modifikacemi jako je *S*-nitrosylace cysteinových thiolů³⁷. Signální dráha NO indukovaná kryptogeinem je také propojena se signálními drahami cytosolického vápníku prostřednictvím *S*-nitrosylace kalmodulinu a regulace exprese genů regulujících hladinu Ca^{2+} iontů³⁸. Při aplikaci elicitinu INF1 z oomycety *Phytophthora infestans* bylo prokázáno propojení signálních drah NO a MAPKkinas v bazální obraně rostlin³³. Zapojení NO v indukcii buněčné smrti po elicitaci kryptogeinem zahrnuje reakci se superoxidem produkovaným NADPHoxidasou za tvorby peroxonitritu, který se účastní regulace exprese genů účastnících se procesu buněčné smrti³⁹.

V rámci pozdní fáze obranné reakce rostlin vyvolané elicitiny dochází k expresi obranných genů, mezi které se řadí patogeny indukované PR (pathogenesis related) pro-

Obr. 2. Signální dráhy aktivované elicitiny (upraveno podle cit.¹⁰)

teiny, fenylalaninamoniaklyasa jako klíčový enzym fenylpropanoidní dráhy a proteiny biosyntézy tříslovin a fitoalexinů^{40,41}. Interakce rostlinných buněk s elicitiny také zahrnuje aktivaci signálních drah rostlinných hormonů kyseliny salicylové, jasmonové a ethylenů⁴². Navíc byla prokázána schopnost migrace elicitinů vaskulárním systémem a s tím spojená aktivace systémové získané rezistence (SAR)^{13,25}.

6. Kryptogein

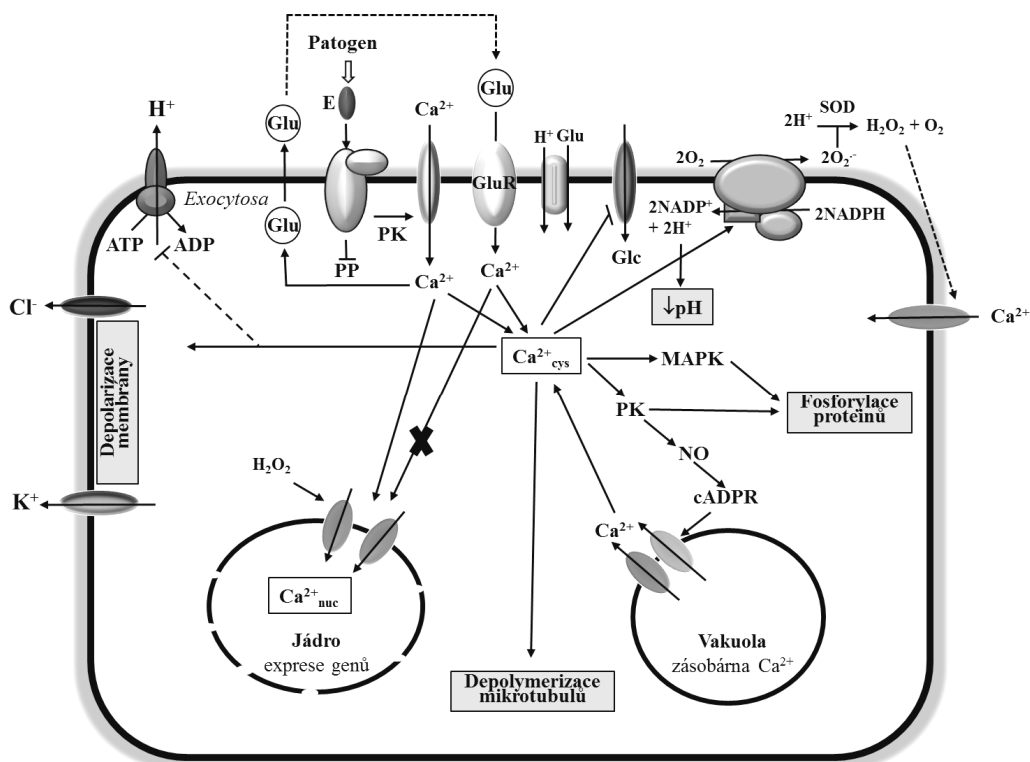
Nejčastěji studovaným elicitem je kryptogein produkovaný oomycetou *Phytophthora cryptogea*, který patří mezi bazické β -elicitiny (hodnota pI 8,5). Kryptogein je globulární hydrofilní protein o molekulové hmotnosti 10 323 Da obsahující 5 α -helixů a jeden dvouvláknový antiparalelní β -skládaný list⁴³. Aminokyseliny v pozici 33 až 42 spojující $\alpha 2$ a $\alpha 3$ helixy tvoří tzv. ω -smyčku, jejíž struktura je stabilizována interakcí mezi Tyr33 a Pro42. Tyto struktury jsou propojeny disulfidovými můstky (Cys3–Cys71, Cys27–Cys56 a Cys51–Cys95). Struktura ω -smyčky je zřejmě odpovědná za vazbu na receptor rostlinné buňky a aktivaci signální kaskády vedoucí k HR. Přenos mastných kyseliny a sterolů umožňuje hydrofobní dutina obsahující striktně konzervovaná hydrofobní rezidua, lokalizovaná mezi strukturou α -helixu s polárními aminokyselinami a strukturou tvořenou ω -smyčkou a β -listem⁴⁴.

Kryptogein vyvolává obrannou reakci u tabáku, která vede k nekróze, tj. odumření rostlinného pletiva v místě kontaktu s patogenem produkujícím elicitin, ale současně ke zvýšené rezistenci vůči patogenům v ostatních částech rostliny^{13,45}. Kryptogein se váže na specifický receptor v cytoplazmatické membráně a jeho funkce je pravděpo-

dobně spojena s aktivací vápníkových kanálků. Jedná se o glykoprotein složený ze dvou podjednotek o velikosti 162 kDa a 50 kDa, přičemž kryptogein se váže reverzibilně *N*-glykosidovou vazbou na cukernou složku 162 kDa podjednotky^{25,46,47}. Jako shrnutí řady studií interakce kryptogeinu s rostlinnými buňkami byl navržen model aktivace signálních drah rostlin v odpovědi na kryptogein (obr. 3)⁴⁸. Kaskáda signálních drah zahájená interakcí elicitinu kryptogeinu (E) s receptorem vede ke zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} , na kterém se podílí i ionotropní glutamový receptor (GluR). Produkce NO a ROS indukuje zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{2+} i z vnitřních zdrojů (vakuola), zvýšená koncentrace Ca^{2+} reguluje aktivitu Ca^{2+} -dependentních proteinů v jádře a je zapojena v regulaci genové exprese. Významnou roli v přenosu signálu má fosforylace/defosforylace proteinů, depolarizace membrány a depolymerizace mikrotubulů.

Po aplikaci kryptogeinu byla prokázána zvýšená biosyntéza lipidů a kvalitativní změny v zastoupení lipidů, které se podílí na stabilitě membrán rostlinných buněk⁵⁰. Prostřednictvím aktivace vápníkových kanálků a zvýšené koncentrace vápníku v cytosolu kryptogein indukuje exocytosu glutamátu do apoplastu a následnou aktivaci ionotropního glutamátového receptoru zapojeného v aktivaci obranných reakcí a mechanismu produkce NO (cit.⁴⁹). Po aplikaci kryptogeinu dochází ke zvýšené produkci NO a *S*-nitrosylaci proteinů, jako je např. protein účastnící se buněčného dělení cyklin-dependentní kinasa CDC48 (cit.³⁷). Zapojení NO v indukci buněčné smrti po aplikaci kryptogeinu bylo potvrzeno přidávkem lapače NO, které vedlo k poklesu rozsahu buněčné smrti vyvolané elicitem v buněčné suspenzi tabáku^{39,51}.

Bourque a spol. prokázali roli histondeacetylasy 2 jako negativního regulátoru buněčné smrti⁵² indukované elicitory. Lze předpokládat, že HR je kontrolována post-



Obr. 3. Schéma signálních drah indukovaných kryptoginem (upraveno podle cit.^{48,49})

translačními modifikacemi včetně acetylace jaderných proteinů. Aplikace kryptoginu indukovala zastavení buněčného cyklu v G-2 fázi. Byla pozorována inhibice histon H^+ kinasové aktivity cyklin-dependentních kinas. Proteasom-dependentní proteinová degradace má také klíčovou roli v HR indukované kryptoginem⁵³. V další studii bylo potvrzeno, že v rané fázi po aplikaci kryptoginu dochází k indukci endocytózy mechanismem závislým na produkci ROS enzymem NADPHoxidasou⁵⁴.

Reorganizace aktinových vláken indukovaná kryptoginem je zapojena v regulaci HR přes modifikaci struktury vakuoly vedoucí k desintegraci vakuolární membrány⁵⁵. Po aplikaci kryptoginu byla prokázána aktivace nejméně čtyř jaderných Ca^{2+} -dependentních proteinkinas⁵⁶. Působením kryptoginu dochází v rostlinách tabáku ke zvýšení specifické exprese genů souvisejících s obranou rostlin, zahrnující kyselé i bazické formy prakticky všech známých tabákových PR proteinů společně s geny pro NADPHoxidasu, lipoxygenasu a enzymy biosyntézy fenolických látek a isoprenoidů. Současně jsou pozorovány akumulace signálních látek jako je kyselina salicylová, jasmonová, ethylen a phytoalexiny^{57,58}.

Přes rozdílné biologické aktivity všechny elicitory sdílejí podobná vysokoafinitní vazebná místa na plazmatické membráně s podobnou hodnotou K_D (cit.⁵⁹). Pozorování, že vazba sterolu na kryptogin vyvolává změnu v konformaci ω -smyčky⁶⁰, vedlo k formulaci hypotézy, že

tato konformační změna vede k aktivaci kryptoginu a následně komplex sterol-kryptogin interaguje s vysokoafinitními místy plazmatické membrány¹⁵. Tato hypotéza byla testována s využitím několika mutantů navržených metodami molekulárního modelování, které by umožňovaly rozlišit vztahy mezi strukturou a biologickou funkcí spojenou s vazbou sterolů. Použití mutantů se sníženou schopností vázat steroly vedlo k závěru, že tento parametr nemá vztah se schopností vyvolávat obranné odpovědi rostlin, ale má význam pouze pro aktivaci signálních mechanismů v rané fázi⁶¹. To je ovšem v rozporu se závěry další studie, která ukázala, že schopnost vazby sterolů ovlivňuje pouze interakci kryptoginu s vysokoafinitním místem na membráně²³. Přestože mají takřka identickou strukturu a vazebné schopnosti, komplexy kryptogin-sterol a β -cinnamomin-sterol vyvolávají velmi odlišné odezvy v rané fázi. Schopnost kryptoginu vyvolávat obranné reakce je tedy zřejmě více závislá na přítomnosti specifických reziduí než na schopnosti vázat steroly. Jako nejlepšími kandidáty na tuto funkci se jeví lysinové zbytky, což bylo potvrzeno silným vlivem mutace K13V na schopnost indukce obranných reakcí rostlin tabáku⁶². Na základě těchto výsledků byl navržen model přenosu signálu založený na možné interakci specifických lysinových reziduí s předpokládanou proteinovou složkou vysokoafinitních vazebných míst²³.

7. Závěr

Elicitory jsou vnější aktivátory obranných systémů rostlin, jejichž biologické aktivity se projevují ve velmi nízkých koncentracích. Mezi časné reakce patří hypersenzitivní reakce vedoucí k lokální buněčné smrti, později může dojít k rozvoji SAR na úrovni celé rostliny. Výsledky studia účinku elicitinů, proteinových elicitorů z oomycet rodů *Phytophthora* a *Pythium*, přináší nové poznatky o molekulárních mechanismech rozpoznání elicitinů receptory rostlinných buněk, přenosu signálu a aktivaci obranných mechanismů hostitelské rostliny. Aplikace specifických elicitinů může vyvolat zvýšenou odolnost rostlin vůči řadě významných patogenů. Tyto poznatky vedou k potenciálnímu využití elicitinů při ochraně zemědělsky významných plodin proti mikrobiálním infekcím a zlepšení výtěžnosti v průběhu pěstování.

Tato práce byla podpořena grantem GAČR P501/12/0590.

Seznam zkratk

| | |
|-------|----------------------------------|
| cADPR | cyklická ADP ribosa |
| Glc | glukosa |
| Glu | kyselina glutamová |
| GluR | ionotropní glutamový receptor |
| HR | hypersenzitivní reakce |
| JA | kyselina jasmonová |
| MAPK | mitogen-aktivované proteinkinasy |
| NADPH | nikotinamidinnukleotidfosfát |
| NAO | NADPHoxidasa |
| PK | proteinkinasa |
| PP | proteinfosfataza |
| PR | pathogenesis related |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| SA | kyselina salicylová |
| SAR | systémově získaná rezistence |

LITERATURA

- Hammond-Kosack K. E., Jones J. D.: *Plant Cell* 8, 1773 (1996).
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C.: *Cell* 79, 583 (1994).
- Morel J.-B., Dangl J. L.: *Cell Death Differ.* 4, 671 (1997).
- Nurnberger T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L.: *Immunol. Rev.* 198, 249 (2004).
- Jones J. D. G., Dangl J. L.: *Nature* 444, 323 (2006).
- Boller T., Felix G.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379 (2009).
- Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E. J., Jones J. D. G., Felix G., Boller T.: *Nature* 428, 764 (2004).
- Montesano M., Brader G., Palva E. T.: *Mol. Plant Pathol.* 4, 73 (2003).
- Hahn M. G.: *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 387 (1996).
- Ponchet M., Panabieres F., Milat M. L., Mikes V., Montillet J. L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y., Blein J. P.: *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 1020 (1999).
- Panabieres F., Ponchet M., Allasia V., Cardin L., Ricci P.: *Mycol. Res.* 101, 1459 (1997).
- Blein J.-P., Coutos-Thévenot P., Marion D., Ponchet M.: *Trends Plant Sci.* 7, 293 (2002).
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J.-P., Ricci P.: *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 181 (1996).
- Mikes V., Milat M.-L., Ponchet M., Panabières F., Ricci P., Blein J.-P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 133 (1998).
- Osman H., Mikes V., Milat M. L., Ponchet M., Marion D., Prangé T., Maume B. F., Vauthrin S., Blein J. P.: *FEBS Lett.* 489, 55 (2001).
- Osman H., Vauthrin S., Mikes V., Milat M.-L., Panabières F., Marais A., Brunie S., Maume B., Ponchet M., Blein J.-P.: *Mol. Biol. Cell* 12, 2825 (2001).
- Kamoun S., Lindqvist H., Govers F.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 1028 (1997).
- Kamoun S., Young M., Glascock C. B., Tyler B. M.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 15 (1993).
- Nespoulous C., Huet J.-C., Pernollet J.-C.: *Planta* 186, 551 (1992).
- Panabières F., Marais A., Le Berre J., Penot I., Fournier D., Ricci P.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 996 (1996).
- Le Berre J. Y., Panabieres F., Ponchet M., Denoroy L., Bonnet P., Marais A., Ricci P.: *Plant Physiol. Biochem.* 32, 251 (1994).
- O'Donohue M., Gousseau H., Huet J.-C., Tepfer D., Pernollet J.-C.: *Plant Mol. Biol.* 27, 577 (1995).
- Dokládál L., Obořil M., Stejskal K., Zdráhal Z., Ptáčková N., Chaloupková R., Damborský J., Kašparovský T., Jeandroz S., Žďárská M., Lochman J.: *J. Exp. Bot.* 63, 2203 (2012).
- Cheong J. J., Hahn M. G.: *Plant Cell* 3, 137 (1991).
- Lebrun-Garcia A., Bourque S., Binet M.-N., Ouaked F., Wendehenne D., Chiltz A., Schäffner A., Pugin A.: *Biochimie* 81, 663 (1999).
- Zimmermann S., Frachisse J.-M., Thomine S., Barbier-Brygoo H., Guern J.: *Plant Physiol. Biochem.* 36, 665 (1998).
- Pugin A., Frachisse J. M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R., Guern J.: *Plant Cell* 9, 2077 (1997).
- Blein J.-P., Milat M.-L., Ricci P.: *Plant Physiol.* 95, 486 (1991).
- Bourque S., Ponchet M., Binet M.-N., Ricci P., Pugin A., Lebrun-Garcia A.: *Plant Physiol.* 118, 1317 (1998).
- Lebrun-Garcia A., Ouaked F., Chiltz A., Pugin A.: *Plant J.* 15, 773 (1998).
- Zhang S., Liu Y., Klessig D. F.: *Plant J.* 23, 339 (2000).
- Ren D., Yang K.-Y., Li G.-J., Liu Y., Zhang S.: *Plant Physiol.* 141, 1482 (2006).
- Asai S., Ohta K., Yoshioka H.: *Plant Cell* 20, 1390

- (2008).
34. Amelot N., Carrouche A., Danoun S., Bourque S., Haiech J., Pugin A., Ranjeva R., Grima-Pettenati J., Mazars C., Briere C.: *Plant Cell Environ.* 34, 149 (2011).
 35. Foissner I., Wendehenne D., Langebartels C., Durner J.: *Plant J.* 23, 817 (2000).
 36. Besson-Bard A., Griveau S., Bedioui F., Wendehenne D.: *J. Exp. Bot.* 59, 3407 (2008).
 37. Astier J., Besson-Bard A., Lamotte O., Bertoldo J., Bourque S., Terenzi H., Wendehenne D.: *Biochem. J.* 447, 249 (2012).
 38. Jeandroz S., Lamotte O., Astier J., Rasul S., Trapet P., Besson-Bard A., Bourque S., Nicolas-Francès V., Ma W., Berkowitz G. A., Wendehenne D.: *Plant Physiol.* 163, 459 (2013).
 39. Kulik A., Noirot E., Grandperret V., Bourque S., Fromentin J., Salloignon P., Truntzer C., Dobrowolska G., Simon-Plas F., Wendehenne D.: *Plant Cell Environ.* (2014), doi: 10.1111/pce.12295.
 40. Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R., Pugin A.: *Plant Cell* 14, 2327 (2002).
 41. Cormack R. S., Eulgem T., Rushton P. J., Köchner P., Hahlbrock K., Somssich I. E.: *Biochim. Biophys. Acta* 1576, 92 (2002).
 42. Kawamura Y., Hase S., Takenaka S., Kanayama Y., Yoshioka H., Kamoun S., Takahashi H.: *J. Phytopathol.* 157, 287 (2009).
 43. Fefe S., Bouaziz S., Guittet E., Huet J.-C., Pernollet J.-C.: *Protein Sci.* 6, 2279 (1997).
 44. Gooley P., Keniry M., Dimitrov R., Marsh D., Keizer D., Gayler K., Grant B.: *J. Biomol. NMR* 12, 523 (1998).
 45. Keller H., Blein J. P., Bonnet P., Ricci P.: *Plant Physiol.* 110, 365 (1996).
 46. Wendehenne D., Binet M.-N., Blein J.-P., Ricci P., Pugin A.: *FEBS Lett.* 374, 203 (1995).
 47. Bourque S., Binet M.-N., Ponchet M., Pugin A., Lebrun-Garcia A.: *J. Biol. Chem.* 274, 34699 (1999).
 48. Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 711 (2006).
 49. Vatsa P., Chiltz A., Bourque S., Wendehenne D., Garcia-Brugger A., Pugin A.: *Biochimie* 93, 2095 (2011).
 50. Medeira C., Quartin V., Maia I., Diniz I., Matos M. C., Semedo J., Scotti-Campos P., Ramalho J., Pais I., Ramos P., Melo E., Leitão A., Cravador A.: *Eur. J. Plant Pathol.* 134, 145 (2012).
 51. Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Sequeira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A., Wendehenne D.: *Plant Physiol.* 135, 516 (2004).
 52. Bourque S., Dutartre A., Hammoudi V., Blanc S., Dahan J., Jeandroz S., Pichereaux C., Rossignol M., Wendehenne D.: *New Phytol.* 192, 127 (2011).
 53. Ohno R., Kadota Y., Fujii S., Sekine M., Umeda M., Kuchitsu K.: *Plant Cell Physiol.* 52, 922 (2011).
 54. Leborgne-Castel N., Lherminier J., Der C., Fromentin J., Houot V., Simon-Plas F.: *Plant Physiol.* 146, 1255 (2008).
 55. Higaki T., Goh T., Hayashi T., Kutsuna N., Kadota Y., Hasezawa S., Sano T., Kuchitsu K.: *Plant Cell Physiol.* 48, 1414 (2007).
 56. Dahan J., Pichereaux C., Rossignol M., Blanc S., Wendehenne D., Pugin A., Bourque S.: *Biochem. J.* 418, 191 (2009).
 57. Suty L., Blein J. P., Ricci P., Pugin A.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 644 (1985).
 58. Keller H., Bonnet P., Galiana E., Pruvot L., Friedrich L., Ryals J., Ricci P.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 696 (1996).
 59. Buhot N., Douliez J. P., Jacquemard A., Marion D., Tran V., Maume B. F., Milat M. L., Ponchet M., Mikès V., Kader J. C., Blein J. P.: *FEBS Lett.* 509, 27 (2001).
 60. Boissy G., O'Donohue M., Gaudemer O., Perez V., Pernollet J.-C., Brunie S.: *Protein Sci.* 8, 1191 (1999).
 61. Lochman J., Kasparovsky T., Damborsky J., Osman H., Marais A., Chaloupkova R., Ponchet M., Blein J.-P., Mikes V.: *Biochemistry* 44, 6565 (2005).
 62. Plešková V., Kašparovský T., Obořil M., Ptáčková N., Chaloupková R., Ladislav D., Damborský J., Lochman J.: *Plant Physiol. Biochem.* 49, 321 (2011).

P. Moricová^a, L. Luhová^a, J. Lochman^b, T. Kašparovský^b, and M. Petřivalský^a (^a *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc;* ^b *Institute of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Elicitins: Key Molecules in Plant – Pathogen Interactions**

Elicitors, endogenous compounds produced by microbial pathogens, induce defence responses in plants. They rank among chemically nonuniform groups including proteins, glycoproteins, oligo- and polysaccharides and lipids. By multiple mechanisms, elicitors are capable of triggering various modes of plant defence like oxidative burst, hypersensitive response, increased expression of pathogenesis-related proteins and the production of antimicrobial compounds – phytoalexins. Elicitins, secreted by oomycetes from *Phytophthora* and *Pythium* spp., are small (10 kDa) protein elicitors structurally similar to lipid-transfer proteins of plant cells and behaving like sterol carrier proteins. In the host plant, elicitors induce a hypersensitive response and development of acquired systemic resistance to many microbial phytopathogens. The review summarizes the current knowledge of the molecular modes of elicitor interaction with plant cells, with a special emphasis on cryptogein as a model elicitor for potential application in the induction of systemic plant resistance.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Výsledky získané v rámci řešení disertační práce s názvem „Studium obranných mechanismů rostlin aktivovaných elicitory“ jsou v experimentální části prezentovány ve formě tří původních prací (Přílohy 2, 3, 4).

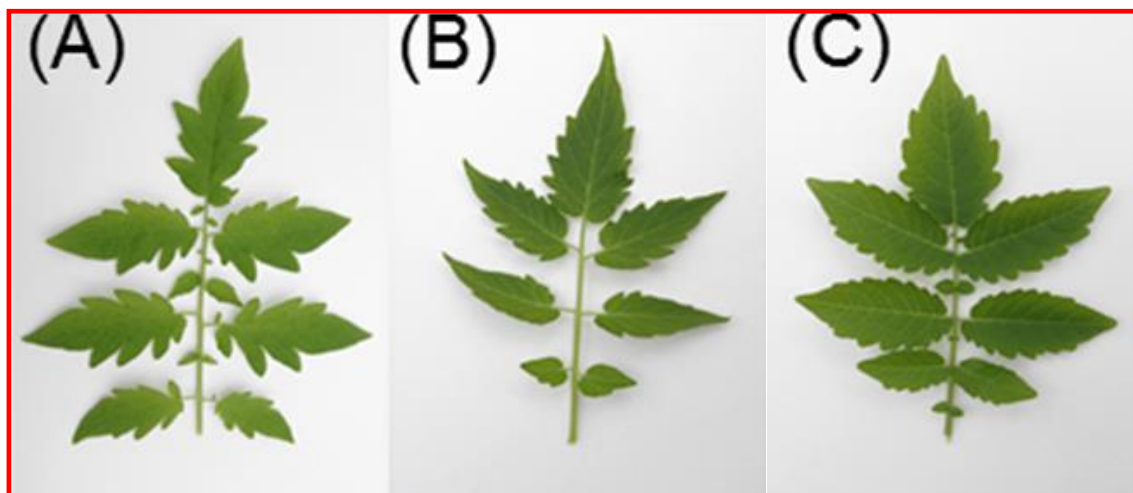
2.1 Přehled experimentálních metod

2.1.1 Rostlinný materiál

Pro řešení vytyčených cílů disertační práce byly zvoleny dvě modelové rostliny: rajče (*Solanum lycopersicum*) a tabák (*Nicotiana tabacum*) patřící do čeledi lilkovité (*Solanaceae*).

2.1.1.1 Rajče - rod *Solanum*

Čeď *Solanaceae* zahrnuje více než 3000 druhů včetně mnoha ekonomicky důležitých plodin, kromě již zmíněného rajčete a tabáku jsou to brambory, lilek, paprika, mochně a další. Rod *Solanum* je nejpočetnějším rodem v této čeledi zahrnující 1250 až 1700 druhů (Bergougnoux, 2014), některé z nich jsou zemědělsky a ekonomicky velmi významné. Těmto rostlinám byla věnována značná pozornost šlechtitelů. Jedním z nejzásadnějších problémů při šlechtění rajčat se stala jejich odolnost proti biotickému stresu, tedy proti škůdcům způsobujícím choroby, které mohou být příčinou významných ekonomických ztrát (Bai a Lindhout, 2007). Rajče je cílem více než 200 škůdců a chorob, k potlačení nebo zabránění negativního působení patogenních organismů se v současnosti v zemědělství běžně využívá řada chemických látek (Bergougnoux, 2014). Cílem studia obranných mechanismů je možnost využití přírodních látek pro zvýšení odolnosti rajčete vůči biotrofním patogenům. V rámci realizovaných studií byly použity osmitýdenní rostliny tří genotypů *Solanum* spp., lišící se svou rezistencí k patogenu *Pseudooidium neolyopersici* (padlí rajčatové): náchylný genotyp *S. lycopersicum* cv. Amateur, středně rezistentní *S. chmielewskii* a vysoce rezistentní genotyp *S. habrochaites* (Obr. 19) (Mieslerová *et al.*, 2004). *S. lycopersicum* cv. Amateur patří mezi vyšlechtěné genotypy s malou odolností vůči patogenům na rozdíl od divokých genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*. Experimentální část disertační práce navazuje na výsledky získané v předešlých letech, prokazující úlohu ROS (Mlíčková *et al.*, 2004; Tománková *et al.*, 2006) a NO (Piterková *et al.*, 2009; Piterková *et al.*, 2011) v obranné reakci rajčat.



Obr. 19 Listy osmitýdenních rostlin tří genotypů *Solanum* spp. lišící se rezistencí k patogenu *Pseudooidium neolycopersici*. A) náchylný genotyp *S. lycopersicum* cv. Amateur, B) středně rezistentní genotyp *S. chmielewskii*, C) rezistentní genotyp *S. habrochaites*.

2.1.1.2 Tabák - rod *Nicotiana*

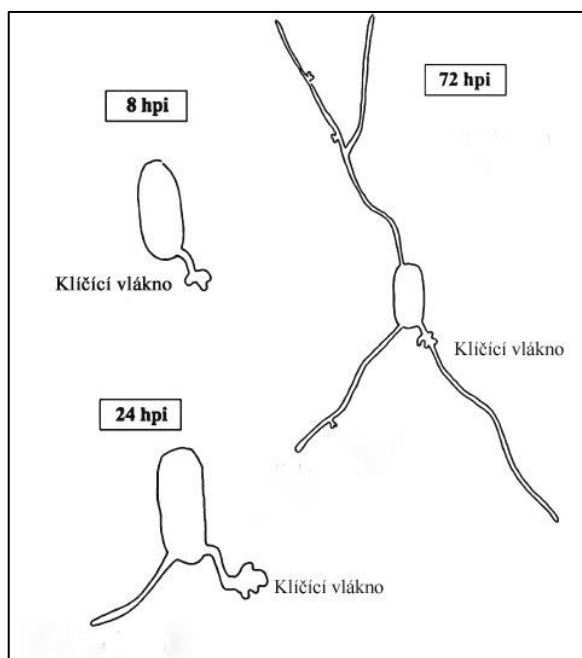
Rod *Nicotiana* zahrnuje přibližně 70 druhů rostlin. Výskyt alkaloidu nikotinu v rostlinách souvisí s jejich využíváním v tabákovém průmyslu k výrobě cigaret a doutníků a pro použití v dýmkách. Z velké řady druhů tabáků se k těmto účelům hodí jen dva druhy, tabák virginský (*N. tabacum*) a tabák selský (*N. rustica*). Tabák je zároveň důležitý pro chemický průmysl, kde slouží jako výchozí surovina pro výrobu nikotinu, chlorofylu a dalších látek. Neméně důležitý je ve výzkumné oblasti, kde je tabák často používanou modelovou rostlinou. Existuje několik druhů tabáku, které mohou mít různé kultivary, během studijního pobytu ve Francii jsem se seznámila a pracovala s buněčnou linií *N. tabacum* cv. BY-2. Buněčná linie BY-2 představuje unikátní, dobře charakterizovanou, vysoce homogenní linii vykazující exponenciální růst, kdy dochází k 80 až 100-násobnému zmnožení buněk za 1 týden. BY-2 buňky jsou suspenzní a nefotosyntetizující a představují výborný model např. pro studium buněčného cyklu. Tyto buňky mohou být snadno transformovány a slouží tak k přípravě stabilních transgenních linií. Díky těmto vlastnostem se buněčná linie BY-2 používá jako vhodný model pro výzkum buněčných a molekulárních pochodů rostlinných buněk (David a Perrot-Rechenmann, 2001). Svým využitím a základními vlastnostmi se dají BY-2 buňky přirovnat k HeLa buněčné linii hrající důležitou roli ve výzkumu savčích buněk. Naproti tomu buněčná suspenze odvozená přímo z listových buněk lépe modeluje interakce s elicitinem v listu než buněčná suspenze BY-2.

2.1.2 Patogenní organismy a elicitory

V rámci experimentální části disertační práce byl jako patogenní mikroorganismus použit biotrofní houbový patogen *Pseudooidium neolycopersici*. Dále jsme se zaměřili na studium vlivu proteinových elicitorů tzv. elicitinů přirozeně se vyskytujících v rodech *Pythium* a *Phytophthora*. Byl studován vliv elicitinu oligandrinu z *Pythium oligandrum* a elicitinu β -CRY z *Phytophthora cryptogea*.

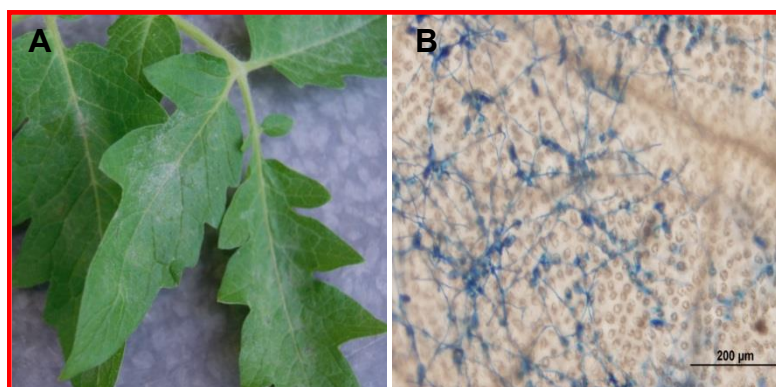
2.1.2.1 Padlí rajčatové (*Pseudooidium neolycopersici*)

P. neolycopersici je obligátní biotrofní patogen patřící do říše *Fungi* (houby), kmene *Ascomycota* (vřeckovýtrusné houby), podkmene *Pezizomycotina*, třídy *Leotiomycetes* (voskovičkoplodé), podtřídy *Leotiomycetidae*, řádu *Erysiphales* (padlí), čeledě *Erysiphaceae* (padlí) (<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=467775>). Jedná se o houbu, která způsobuje rozsáhlé epidemie na široké škále rostlinných druhů, přičemž nejčastěji parazituje právě na rajčeti (*Solanum* spp.) a způsobuje infekci zvanou padlí rajčatové (Ridout, 2009). Pro tento patogen je typické, že vytváří na povrchu listů, stonků, řapíků a v některých případech i plodin bílé povlaky mycelia (Whipps *et al.*, 1998). *P. neolycopersici* tvoří charakteristické elipsoidní spory o průměrných rozměrech 30x15 μ m. Při klíčení se objeví klíční vlákno, které se postupně prodlužuje až do lalokovitého uspořádání (Obr. 20, 21 B). Sekundární apresorium vzniká buď samostatně, nebo párově z hyfy, která se postupně větví na povrchu napadené rostliny (Jones *et al.*, 2001).



Obr. 20 Schématický vývoj patogena *Pseudooidium neolycopersici* v průběhu 8, 24 a 72 hodin po infekci (hpi) na listech citlivého genotypu *Solanum lycopersicum* (převzato z Mieslerová a Lebeda, 2010).

Jednotlivé genotypy rajčat mohou být k patogenu různě rezistentní (Mieslerová *et al.*, 2004). Rezistence je charakterizovaná silně omezeným růstem mycelia a chybějící sporulací a HR, která se zdá být důležitým a efektivním obranným mechanismem. U vysoce náchylných genotypů patogen rapidně kolonizuje a nespouští nekrotickou odezvu (Obr. 21 A), zatímco u rezistentních vyvolává HR (Huang *et al.*, 1998; Mieslerová *et al.*, 2004). Rezistence je kontrolována různými mechanismy, které stále nejsou plně objasněny. Obranné mechanismy jsou závislé na genotypu rajčete. Dochází k vysoké produkci ROS, zvýšené aktivitě peroxidasy a CAT, zvýšené koncentraci spermidinu, lipidické peroxidaci a HR (Mlíčková *et al.*, 2004; Tománková *et al.*, 2006). Byla potvrzena esenciální role NO ve vztahu k HR na daný patogen v závislosti na rezistentních vlastnostech rostliny (Piterková *et al.*, 2011).



Obr. 21 Infekce *Solanum lycopersicum* cv. Amateur patogenem *Pseudooidium neolycopersici*. A) Listy rajčete 48 hodin po infekci (hpi) patogenem *P. neolycopersici*, B) mikrofotografie mycelia *P. neolycopersici* na listu *S. lycopersicum* cv. Amateur 48 hpi (barveno Evansovou modří).

2.1.2.2 Plísně - rod *Phytophthora*

Rod *Phytophthora* (plíseň) patří do říše *Chromista*, kmene *Oomycota* (řasovky), třídy *Peronosporae*, podtřídy *Peronosporidae*, řádu *Peronosporales* (vřetenatkovité), čeledě *Peronosporaceae* (vřetenatkovité) (<http://www.indexfungorum.org/Names/namesrecord.asp?RecordID=231743>). Tvoří více než 130 druhů a s využitím fylogenetické analýzy byly rozděleny do 10 tříd (Martin *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2014). Zatímco některé druhy jsou již velmi dobře známými a popsánymi patogeny (*P. cinnamomi*, *P. ramorum*), jiné druhy rodu *Phytophthora* nemají jasného hostitele. Jde zejména o nově popsané druhy jako např. *P. amnicola*, *P. hydrogena*, *P. striga*, *P. moyoottj* a další (Yang *et al.*, 2016). Většina druhů rodu *Phytophthora* jsou patogenní a způsobují jedny z nejvíce celosvětově devastujících onemocnění rostlin. Některé druhy jsou specifické a napadají pouze jednoho hostitele (*P. sojae*), zatímco jiné, *P. cryptogea* nebo *P. cinnamomi*, interagují s širokou škálou hostitelských organismů, což může činit i více než 900 rostlinných druhů (Panabieres a Le Berre, 1999). Mnohé druhy rodu *Phytophthora* jsou hemibiotrofní patogeny s počáteční biotrofní fází, která přechází v nekrotrofní kolonizaci hostitelských pletiv. Při napadení hostitelských buněk biotrofní patogeny často vyvíjejí haustoria,

intracelulární struktury pro resorpci živin, které jsou obklopeny tzv. extrahaustoriálním matrixem. Později vytváří specializované plazmatické membrány patogenu a hostitele společné prostředí, kde jsou vylučovány všechny potenciální efekторы (Dodds *et al.*, 2009; Leborgne-Castel *et al.*, 2010). Efekторы zahrnují širokou škálu molekul s různou biologickou funkcí (Tyler *et al.*, 2006; Kamoun, 2007). Mohou působit buď na povrchu hostitele (apoplastické efekторы) nebo uvnitř hostitelské buňky (cytoplazmatické efekторы) (Kamoun, 2006). Apoplastické efekторы patogenů rodu *Phytophthora* zahrnují enzymy degradující buněčnou stěnu, inhibitory enzymů, toxiny a elicitory (Tab. 4). Cytoplazmatické efekторы, kromě jejich sekrečních signálů, obsahují další sekvenci, která je nutná pro translokaci proteinů přes plazmatickou membránu hostitelských buněk (Oswald *et al.*, 2014).

Tab. 4 Přehled elicitinů produkovaných zástupci rodu *Phytophthora* (přepřacováno dle Oswald *et al.*, 2014)

| <i>Phytophthora</i> spp. | Elicitin | Třída | Izoelektrický bod |
|---|---|-------|-------------------|
| <i>P. alni</i> | AE1.1 | I-A | 4,99 |
| | AE1.2 | I-A | 4,99 |
| | AE2 | I-A | 4,99 |
| | BE1 | I-B | 8,22 |
| | BE2 | I-B | 8,22 |
| | HAE1 | II | 3,95 |
| <i>P. cambivora</i> | AE1. | I-A | 4,99 |
| | AE2 | I-A | 4,99 |
| <i>P. cactorum</i> | CAC-A (kaktorein) | I-A | 4 |
| <i>P. capsici</i> | Kapsicein (α) | I-A | 3,5 |
| | CAP-Pa28 | I-A | 4,23 |
| <i>P. cinnamomi</i> | α -CIN | I-A | 4,4 |
| | β -CIN | I-B | 8,9 |
| | HAE1-cin | II | 3,38 |
| | HAE2-cin | II | 3,54 |
| <i>P. citrophthora</i> | Citroftorin | I-A | 3,5 |
| <i>P. cryptogea</i> | CRY- α | I-A | 3,6 |
| | CRY- β | I-B | 9,8 |
| | HAE1-cry | II | 3,88 |
| | HAE2-cry | II | 3,34 |
| <i>P. drechsleri</i> | Dre- α | I-A | 4,6 |
| | Dre- β | I-B | 8,96 |
| <i>P. fragariae</i> | AE1.1 | I-A | 4,99 |
| | AE2 | I-A | 4,99 |
| <i>P. infestans</i> | INF1 | I-A | 4,22 |
| | INF2a | III | 3,37 |
| | INF2b | III | 3,73 |
| | INF4 | I-B | 9,97 |
| | INF5 | III | 4,09 |
| | INF6 | III | 3,34 |
| <i>P. hibernalis</i> | Hib1 = syringicin | I-A | |
| | Hib2 | I-A | |
| | Hib3 | I-A | |
| <i>P. megasperma</i> | α -megaspermin | I-A | 4 |
| | β -megaspermin | I-B | 8,36 |
| | γ -megaspermin | III | 3,8 |
| <i>P. nicotianae</i> | 172 = parasiticein | I-A | < 4 |
| <i>P. palmivora</i> | Palmivorein | I-A | 4,0 \pm 0,2 |
| <i>P. parasitica</i> | PARA1 (Parasiticein) | I-A | 4,22 |
| | 310 = Parasiticein | I-A | 4,7 |
| <i>P. plurivora</i> (dříve <i>P. citricola</i>) | Citrikolin = plurivorin | I-A | 4,2 |
| <i>P. quercina</i> | Quercinin | I-A | 3,6 |
| | | | 3,9 |
| | | I-B | 8,3 |
| <i>P. ramorum</i> | (ram-alpha 1, ram-alpha 2) + 3 elicitiny | I | |
| <i>P. syringae</i> | Syringicin | I-A | 4,31 |
| <i>P. sojae</i> | SOJA, SOJB = | I-A | ~ 3; ~ 5 |
| | Sojein1, Cojein2 | | |

Zkratky: AE - kyselý (acidic) elicitin, BE - bazický (basic) elicitin, CIN - cinnamomin, CRY - kryptogein, DRE - drechslerin, HAE - vysoce kyselý (highly acidic) elicitin, INF - infestinn

P. cryptogea je půdní nekrotrofní patogen (Panabieres *et al.*, 1998), který byl poprvé popsán v roce 1919 jako patogen způsobující hnilobu u rajčat („foot rot of tomato“) v Irsku (Pethybridge a Lafferty, 1919). Je to celosvětově rozšířený patogen napadající mnoho rostlinných druhů (Erwin a Ribeiro, 1996), včetně okrasných rostlin. Napadené rostliny vypadají zakrsle, mají hnilobné kořeny, což se projeví sníženým počtem listů. Patogen může přetrvávat v půdě dlouhou dobu na organické hmotě.

2.1.2.3 Elicitin kryptogein

P. cryptogea syntetizuje více isoform CRY lišících se v hodnotách pI. Nejvíce zastoupeným je bazický β -CRY (Le Berre *et al.*, 1994). V experimentální části byl použit rekombinantní protein β -CRY a jeho mutantní formy připravené řízenou mutagenézí v kvasinkovém expresním systému *P. pastoris*. Mutantní formy β -CRY byly připraveny a testovány s cílem přispět k porozumění mechanismu působení elicitinů a vztahům mezi jejich strukturou a schopností aktivovat obranné mechanismy rostlin. Rekombinantní protein β -CRY a jeho mutantní formy byly připraveny a poskytnuty skupinou doc. Lochmana z Ústavu biochemie Masarykovy Univerzity v Brně. V případě experimentů prováděných na stáži ve Francii byl k experimentům použit β -CRY izolovaný přímo z kultury *P. cryptogea*. Mutantní formy β -CRY se liší záměnou jedné aminokyseliny v klíčové pozici, které mají zásadní vliv na jejich biologické vlastnosti (Tab. 5). Mutantní formy se vyznačují zejména rozdílnou schopností vázat steroly a mastné kyseliny a aktivovat produkci ROS. Mutantní forma V84F (aminokyselina valin je v pozici 84 nahrazena fenylalaninem) se vyznačuje nižší schopností vázat a transportovat steroly než β -CRY, schopnost aktivace produkce ROS je ale srovnatelná. Mutantní forma L41F (leucin v pozici 41 je nahrazen aminokyselinou fenylalanin) se také vyznačuje nízkou schopností vázat a transportovat steroly a má významně sníženou schopnost aktivace produkce ROS. Připravené mutantní formy β -CRY se významně liší schopností aktivace obranné reakce. Jedním z ukazatelů aktivace obranné reakce je u tabáku produkce fytoalexinu kapsidiolu (Facchini a Chappell, 1992). Zvýšená akumulace kapsidiolu byla pozorována po aplikaci elicitinu β -CRY a jeho mutantní formy V84F.

Tab. 5 Základní vlastnosti elicitinu kryptogeinu a jeho mutantních forem (přepřacováno dle Dokládál *et al.*, 2012)

| Elicitin / mutace | Přenos DHE | Přenos NBD-PC | Vazba na PM | Produkce ROS | Akumulace kapsidiolu | Indukce rezistence |
|-------------------|------------|---------------|-------------|--------------|----------------------|--------------------|
| β -CRY | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| L41F | +++ | ++ | + | - | - | - |
| V84F | + | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ |

DHE = 7-dehydroergosterol, NBD-PC = fosfatidylcholin značený nitrobenzoxadiazolem, PM = plazmatická membrána

Vedle základních vlastností (Tab. 5) se β -CRY a jeho jednotlivé mutantní formy liší ve schopnosti aktivovat akumulaci transkriptů obranných genů β -1,3-glukanasy a chitinasy v tabáku. Elicitační vlastnosti, tj. schopnost aktivace akumulace transkriptů obranných genů, jsou charakteristické pro β -CRY, jeho mutantní formu V84F, naopak v případě mutace L41F je tato vlastnost potlačena (Dokládal *et al.*, 2012).

2.1.2.4 Elicitin oligandrin

V experimentální části jsem se dále zabývala studiem oligandrinu, elicitinu produkovaného druhem *Pythium oligandrum* patřící do říše *Chromista*, kmene *Oomycota* (řasovky), Incertae sedis, třídy *Peronosporae*, podtřídy *Peronosporidae*, řádu *Peronosporales* (vřetenatkovité), čeledě *Pythiaceae* (pytlovité) (<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=272830>). Rod *Pythium* zahrnuje okolo 130 druhů, z nichž někteří zástupci se řadí mezi saprofyty, další mezi patogeny jiných organismů, kterými mohou být řasy, ryby a hmyz (Van der Plaats-Niterink, 1981). Nejvýznamnější ekonomický dopad mají patogeny s širokým spektrem hostitelů napadající různé druhy rostlin (Thines a Kamoun, 2010). Kromě patogenních interakcí byly publikovány i prospěšné vztahy mezi rostlinami a některými druhy rodu *Pythium* (Picard *et al.*, 2000; Mohamed *et al.*, 2007; Takenaka *et al.*, 2008), mezi které se řadí např. *P. oligandrum*. Jedná se o půdní celosvětově rozšířený mykoparazit, který ke svému metabolismu potřebuje buňky jiných hub, kolonizuje rhizosféru mnoha druhů rostlin, snižuje onemocnění rostlin způsobené řadou půdních patogenů (Picard *et al.*, 2000; Benhamou *et al.*, 2012). *P. oligandrum* má tak možné uplatnění v zemědělství v boji proti houbovým chorobám (Rey *et al.*, 2008). *P. oligandrum* podporuje růst rostliny prostřednictvím produkce prekurzorů auxinů (Le Floch *et al.*, 2003) a indukované rezistence způsobené MAMP (Picard *et al.*, 2000; Takenaka *et al.*, 2003).

2.1.2.5 β -aminomáselná kyselina

Vedle výše zmíněných elicitinů byl v jedné z dílčích studií testován neproteinový elicitor β -aminomáselná kyselina (BABA), sloučenina známá jako chemický „priming agent“ či chemický elicitor (Ton *et al.*, 2005). „Priming“ je obranný mechanismus umožňující rostlinám, aby po vystavení biotickému a/nebo abiotickému stresu následně reagovaly rychleji a účinněji na nové stresové podmínky. Tento stav je spojen se zvýšenou aktivací obranné reakce a zesílenou rezistencí ke stresovým podmínkám (Conrath, 2009). Např. thiamin - vitamín B1 (Ahn *et al.*, 2007), riboflavin - vitamín B2 (Zhang *et al.*, 2009b) a kvercetin (Jia *et al.*, 2010) byly schopny u rostlin *A. thaliana* aktivovat odolnost k bakteriálnímu patogenu *P. syringae* pomocí mechanismů jako je HR, tvorba kalosy a aktivace akumulace transkriptů obranných genů. Látky patřící mezi „priming agents“ jsou chemicky různorodé, zahrnují např. oligosacharidy, glykosidy, amidy a karboxylové kyseliny (Iriti *et al.*, 2010; Noutoshi *et al.*, 2012). Mezi přirozeně

se vyskytující „priming agents“ se řadí např. chitosan a kyselina kapronová (hexanová) nebo SA. Jako „priming agents“ syntetického původu byly testovány např. analoga SA, BABA, kyselina 2,6-dichloroisoinikotinová a její methylester.

BABA je známá jako látka zvyšující rezistenci rostlin proti širokému spektru abiotických i biotických stresových faktorů. Z příkladů abiotických lze uvést chlad, vysokou teplotu, sucho, salinitní stres (Cohen *et al.*, 1999; Jakab *et al.*, 2001; Zimmerli *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2012). Dále BABA indukuje rezistenci proti virům, bakteriím, mnoha oomycetám a různým plísním (Jakab *et al.*, 2001; Slaughter *et al.*, 2012; Worrall *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2014; Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2015; Martínez-Aguilar *et al.*, 2016; Wilkinson *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Aplikace BABA aktivuje široké spektrum reakcí závislých na typu rostliny, patogenu, koncentraci BABA a způsobu její aplikace (Jakab *et al.*, 2001). Z nejvýznamnějších lze uvést tvorbu kalosy - *A. thaliana*, vinná réva (Zimmerli *et al.*, 2000; Zimmerli *et al.*, 2001; Ton a Mauch-Mani, 2004; Hamiduzzaman *et al.*, 2005), zapojení signální dráhy SA - *A. thaliana*, tabák (Siegrist, 2000; Zimmerli *et al.*, 2000), JA - *A. thaliana*, vinná réva (Zimmerli *et al.*, 2000; Hamiduzzaman *et al.*, 2005) a ET - *A. thaliana* (Zimmerli *et al.*, 2000). Jiné studie naopak ukazují, že rezistence indukovaná BABA je založena na aktivaci signální dráhy ABA a je nezávislá na produkci JA, SA a ET (Ton a Mauch-Mani, 2004; Pastor *et al.*, 2014). V semenáčcích sójových bobů napadených mšicemi bylo detekováno po aplikaci BABA signifikantní zvýšení aktivity enzymů PAL, peroxidasy, polyfenoloxidas, chitinasy a β -1,3-glukanasy (Zhong *et al.*, 2014). Spektrum možných reakcí následujících po ošetření rostlin BABA je velice rozmanité v závislosti na konkrétních podmínkách a rostlině. Další studium této problematiky může přispět k lepšímu porozumění a objasnění mechanismu aktivace rezistence u rostlin touto neproteinogenní aminokyselinou.

2.1.3 Experimentální metody

2.1.3.1 Příprava rostlinného materiálu

Modelové rostliny (*S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*) byly pěstovány ve skleníku za podmínek uvedených v publikacích Satková *et al.*, 2017 (Příloha 2); Starý *et al.*, 2019 (Příloha 3).

2.1.3.2 Příprava buněčné linie *Nicotiana tabacum* cv. Bright yellow-2

Tabáková buněčná suspenze BY-2 byla připravena dle metodiky uvedené v publikaci Noirot *et al.*, 2014 (Příloha 4).

2.1.3.3 Použité patogeny a inokulace rostlin a listových disků

Pro inokulaci rostlin *Solanum* spp. byly použity patogeny *Pseudooidium neolycopersici* Kiss (izolát C-2) ze sbírky UPOC (Národní program genetických zdrojů mikroorganismů ČR, Katedra botaniky PřF UP v Olomouci). Listy na rostlinách, případně připravené listové disky *Solanum* spp., byly infikovány patogenem *P. neolycopersici*. Metodický postup je uveden v článcích Satková *et al.*, 2017 (Příloha 2); Starý *et al.*, 2019 (Příloha 3).

2.1.3.4 Charakterizace elicitinů

Rekombinantní CRY byl připraven za použití vektoru pPIC9 obsahující gen *X24* z *P. cryptogea* s přidáním reziduum glycinu na N-konci. Místně řízenou mutagenezí byli připraveni mutanti CRY. Metodický postup přípravy je uveden v článku Starý *et al.*, 2019 (Příloha 3). CRY a jeho mutantní formy byly pro experimenty poskytnuty skupinou vedenou doc. Mgr. Janem Lochmanem, Ph.D. z Ústavu biochemie Masarykovy univerzity v Brně.

2.1.3.5 Aplikace elicitinů

Elicitiny byly aplikovány dvojím způsobem: 1) tlaková infiltrace do listů na rostlinách - metodický postup je uveden v článku Satková *et al.*, 2017 (Příloha 2); nebo 2) infiltrace vakuovým nasáváním do listových disků - metodický postup je uveden v článku Starý *et al.*, 2019 (Příloha 3).

2.1.3.6 Stanovení klíčivosti patogena a vývoje jeho konidií

Příprava vzorků, klíčivost konidií patogena a jeho vývoj (zastoupení konidií s jedním, dvěma a třemi klíčovými vlákny) a měření délek klíčivých vláken konidií byla provedena dle metodiky popsané v práci Piterková *et al.*, 2011. Detailní popis metodického postupu je uveden v článcích Satková *et al.*, 2017 (Příloha 2); Starý *et al.*, 2019 (Příloha 3).

2.1.3.7 Semikvantitativní stanovení peroxidu vodíku a superoxidového anionradikálu

Akumulace peroxidu vodíku v listech byla detekována histochemickou metodou s využitím 3,3'-diaminobenzidinu a superoxidového anionradikálu metodou s tetrazoliovou modří. Metodický postup je uveden v článku Starý *et al.*, 2019 (*Příloha 3*).

2.1.3.8 Stanovení hladiny reaktivních forem kyslíku

Hladina ROS byla stanovena chemiluminiscenční metodou s využitím luminolu. Metodický postup je uveden v článku Noirot *et al.*, 2014 (*Příloha 4*).

2.1.3.9 Stanovení aktivit enzymů askorbátperoxidasy a guajakolperoxidasy

Aktivity enzymů APX a guajakolperoxidasy (GPOX, EC 1.11.1.7) byly stanoveny spektrofotometricky dle metodiky popsané v práci Tománková *et al.*, 2006. Metodický postup je uveden v článku Starý *et al.*, 2019 (*Příloha 3*).

2.1.3.10 Analýza obsahu kyseliny salicylové, kyseliny jasmonové a konjugátu kyseliny jasmonové s isoleucinem

Analýza SA, JA a JA-Ile byla provedena podle metodiky popsané v práci Segarra *et al.*, 2006. Analýzy byly prováděny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) spojené s hmotnostním spektrometrem vybaveným průletovým analyzátozem (TOF-MS) a duálním elektrosprejem (ESI) jako zdrojem iontů pracujícím v negativním ionizačním módu, který byl použitý pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Metodický postup je uveden v článku Starý *et al.*, 2019 (*Příloha 3*).

2.1.3.11 Analýza produkce ethylenu

Analýza byla provedena plynovou chromatografií dle metodiky popsané v práci Malá *et al.*, 2009. Metodický postup je uveden v článku Starý *et al.*, 2019 (*Příloha 3*).

2.1.3.12 Detekce proteinů metodou Western blot

Proteiny ve vzorcích byly separovány metodou denaturující elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a následně byly přeneseny na PVDF membránu. Detekce MPK3 na blotech byla provedena s použitím primární a sekundární protilátky s chemiluminiscenční detekcí. Metodický postup je uveden v článku Starý *et al.*, 2019 (*Příloha 3*).

2.1.3.13 Stanovení exprese genů

Experimentální postupy pro izolaci RNA, její přečištění, reverzní transkripci a kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci (PCR) jsou uvedeny v článkách Satková *et al.*, 2017 (*Příloha 2*); Starý *et al.*, 2019 (*Příloha 3*); Noirot *et al.*, 2014 (*Příloha 4*).

Jako tzv. provozní geny (housekeeping genes) byly u vzorků rajčat zvoleny geny pro elongační faktor *EF-1 α* a gen *TIP41* kódující protein TIP41-like protein (Type 2A phosphatase activator) - Satková *et al.*, 2017 (*Příloha 2*); Starý *et al.*, 2019 (*Příloha 3*). U vzorků tabáku byly jako provozní geny použity geny pro elongační faktor *EF-1 α* , ribozomální protein *L25*, a proteinfosfatasu 2A (*PP2A*) - Noirot *et al.*, 2014 (*Příloha 4*). Použité primery byly navrženy v programu Primer3.

2.1.3.14 Statistické vyhodnocení dat

Signifikantní rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami vzorků byly vyhodnoceny použitím Studentova T-testu v publikacích Satková *et al.*, 2017 (*Příloha 2*); Starý *et al.*, 2019 (*Příloha 3*). Statistická významnost rozdílu experimentálních dat byla také hodnocena s využitím neparametrického Mann-Whitneyova testu v publikaci Noirot *et al.*, 2014 (*Příloha 4*).

2.2 Výsledky a diskuze

2.2.1 Studium vlivu elicitinu oligandrinu a β -aminomáselné kyseliny na rezistenci rostlin *Solanum* spp.

Rostliny jsou během svého života vystaveny mnoha různým stresovým podmínkám. Ošetření rostlin přírodními nebo syntetickými látkami může vést k silnější a rychlejší aktivaci obranné odpovědi s cílem zvýšit rezistenci rostlin ke stresu (Conrath, 2009). V rámci prvního řešeného projektu byl studován vliv aplikace látek potenciálně indukujících obranné mechanismy ve vztahu k aktivaci obranných reakcí po následné infekci biotrofním patogenem *P. neolycopersici* u dvou genotypů *Solanum* spp. lišících se rezistencí k tomuto patogenu. Dosažené výsledky byly publikovány v článku „Diverse responses of wild and cultivated tomato to BABA, oligandrin and *Oidium neolycopersici* infection“ v časopise *Annals of Botany* v roce 2017 (Příloha 2). (Pozn. v článku je použit starší název *Oidium neolycopersici* pro označení patogena *Pseudooidium nelycopersici*.)

Látky zvyšující odolnost k biotickým a abiotickým stresovým faktorům u rostlin se označují jako „priming agents“. V této studii byla z uvedené skupiny látek použita BABA. Její vodný roztok byl rozprášen na povrch listů, což představuje jednu z nejběžnějších aplikačních metod v laboratorních podmínkách. Další látkou, jejíž vliv byl v rámci studie sledován, byl oligandrin. Jedná se o proteinový elicitin sekretovaný oomycetou *P. oligandrum*, který indukuje HR a SAR u několika druhů rostlin a je známý vyvoláváním rezistence u řady rostlin proti různým patogenům (Picard *et al.*, 2000; Benhamou *et al.*, 2001). Oligandrin byl do listů rostlin aplikován tlakovou infiltrací. Rajče patří mezi významné potravinářské plodiny a je zároveň často využívanou modelovou rostlinou ve vědeckých studiích. V rámci řešeného projektu jsme se zaměřili na vysoce náchylný genotyp rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur reprezentující domestikovaný kultivar a genotyp vykazující nespecifickou rezistenci *S. habrochaites* (Mieslerová *et al.*, 2000; Tománková *et al.*, 2006; Piterková *et al.*, 2009; Piterková *et al.*, 2011; Lebeda *et al.*, 2014).

Byla potvrzena významně vyšší rezistence *S. habrochaites* k testovanému patogenu *P. neolycopersici* v porovnání s genotypem *S. lycopersicum* cv. Amateur. Významný rozdíl mezi genotypy byl zaznamenán při hodnocení vývoje patogena *P. neolycopersici* na základě zastoupení konidií s 1, 2 nebo 3 klíčními vlákny a délek 2. a 3. klíčního vlákna (Příloha 2 – Obr. 1). Je zajímavé, že v případě *S. habrochaites* nebyla rezistence vlivem testovaných induktorů (oligandrin, BABA) signifikantně změněna, v porovnání s vlivem pozorovaným u náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur, kdy bylo po aplikaci oligandrinu i BABA zaznamenáno zpomalení růstu 2. a 3. klíčního vlákna a v případě oligandrinu bylo detekováno navíc i nižší zastoupení konidií se 3 klíčními vlákny.

V této studii byl dále porovnán vliv elicitinu oligandrinu a BABA na hladiny transkriptů 45 zvolených obranných genů ze skupiny defensinů, germinů, glukanas, heveinů, chitinas, osmotinů, systemin a genů patřící do skupiny PR-1. Tyto geny byly vybrány na základě prokázaného zapojení v obranných procesech u jiných modelových rostlin, jako je např. *N. tabacum* nebo *A. thaliana*. Mapování těchto genů na referenčním genomu *S. lycopersicum* „Heinz 1706“ ukázalo, že velké množství sledovaných genů se nachází na chromosomech 1, 5, 8, 9 a 10 (Příloha 2 – Obr. 2A). Několik dalších publikovaných studií potvrdilo relevanci genů na těchto chromozomech k obranným procesům. Po infekci rajčete *P. infestans* bylo detekováno nadměrné zastoupení genových sad patřící chromosomu 10 a podobná tendence v jejich lokalizaci na konci chromosomů (Lopez-Kleine *et al.*, 2013). V souladu s našimi výsledky byly lokusy kvantitativních znaků (QTL, Quantitative trait loci) pro rezistenci k houbové chorobě alternariové skvrnitosti rajčete (Early blight of tomato) identifikovány na chromozomech 1, 2, 5, 8, 9, 10 a 12, zatímco QTL pro ranou rezistenci k *P. infestans* byly detekovány na chromozomech 3, 4, 5, 8, 10 a 11 (Foolad, 2007).

Při srovnání použitých genotypů rajčat polovina analyzovaných genů s očekávanou rolí v obranném mechanismu vykazovala rozdílnou hladinu bazální transkripce (Příloha 2 – Obr. 2B). U těchto obranných genů došlo ke zvýšení hladiny transkriptů po infekci patogenem *P. neolyopersici* u obou genotypů. Za fyziologických podmínek byla vyšší hladina detekována u 14 transkriptů u *S. habrochaites* v porovnání se *S. lycopersicum* cv. Amateur, zatímco u dalších 11 transkriptů byla hladina nižší. Celkem 12 ze 14 up-regulovaných transkriptů u rezistentního genotypu se nachází na chromozomech 1, 8 a 10 v QTL oblastech pro houbovou chorobu alternariovou skvrnitost rajčete a rezistenci k *P. infestans* (Foolad, 2007). Výsledky ukazují, že významnou roli v nespecifické rezistenci *S. habrochaites* může mít vysoká bazální hladina transkriptů s prokázanou rolí v obranných procesech. V souladu s již publikovanými studiemi byla pozorována souvislost nespecifické rezistence se zvýšenou hladinou transkriptů dvou chitinas, tří β -1,3-glukanas a čtyř osmotinů (Liu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1996; Oldach *et al.*, 2001; Anand *et al.*, 2004; Dana *et al.*, 2006).

Aplikace 10 mM BABA na listy náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur způsobila signifikantní zvýšení hladiny 10 transkriptů, přičemž nejvyšší nárůst byl detekovaný u PR-1 skupiny. Na druhou stranu nebylo pozorováno zvýšení hladiny transkripce defensinů, germin-like proteinů, β -1,4-glukanas nebo thaumatin-like proteinů. U *S. habrochaites* nebylo zaznamenáno signifikantní zvýšení hladin transkriptů s výjimkou proteinů P4 a P6 patřící do PR-1 třídy (Příloha 2 – Obr. 4, 5).

Infiltrace 100 nM oligandrinu do listů měla za následek zvýšení hladiny řady transkriptů u obou genotypů. Vyšší hladiny 18 transkriptů byly pozorovány u rezistentního genotypu. Ze 13 transkriptů, u kterých došlo k nárůstu hladiny u *S. lycopersicum* cv. Amateur, mělo 10 transkriptů zvýšenou hladinu i u *S. habrochaites*, což poukazuje na obdobný signální mechanismus podílející

se na aktivaci obranných reakcí rostlin vlivem oligandrinu u obou studovaných genotypů (*Příloha 2 – Obr. 4, 5*).

Infekce biotrofním patogenem *P. neolycopersici* prokázala jednoznačné rozdíly mezi rezistentním a náchylným genotypem rajčete. Zatímco u infikovaných rostlin vysoce rezistentního genotypu byla detekována silná aktivace exprese 24 genů, u náchylného genotypu bylo aktivováno pouze 14 genů a většina z nich byla stejná u obou genotypů. Nejvíce rozdílů mezi studovanými genotypy byly v PR-1 a germin-like proteinových třídách (*Příloha 2 – Obr. 4, 5*). Ve srovnání s nedávnou studií na rostlinách rajčat inokulovaných patogenem *Phytophthora capsici* (Jupe *et al.*, 2013) velmi dobře korespondoval pokles hladiny transkriptů genů *GERM2*, *GLUCO5* a *THAUM2* po infekci *P. neolycopersici*. Naše výsledky naznačují, že geny *GLUCO1*, *GLUCO2*, *DEF1*, *THAUM1* a *THAUM4*, u kterých nebyla pozorována zvýšená bazální hladina v rezistentním genotypu ani nárůst hladiny transkriptů po ošetření BABA nebo patogenem, nejsou zapojeny v mechanismech rezistence. I když počet rozdílně exprimovaných genů v bazální hladině u obou genotypů je podobný, geny, u kterých byla naměřena nižší hladina exprese v náchylném genotypu v porovnání s rezistentním genotypem, nebyly ovlivněny žádným z testovaných ošetření rostlin.

Dosažené výsledky v rámci transkripční studie (*Příloha 2 – Obr. 4*) po ošetření listů BABA naznačují rozdílný mechanismus rezistence zejména u *S. lycopersicum* cv. Amateur v porovnání s působením oligandrinu projevující se následně v inhibici vývoje patogena *P. neolycopersici* (*Příloha 2 – Obr. 1*). Otázkou je, zda velmi nízký překryv mezi geny indukovanými BABA a oligandrinem může být následkem rozdílné aktivace signálních drah rostlinných hormonů zapojených v obranných mechanismech. Ošetření listů rajčat elicitem infestinem INF1 indukovalo expresi genů závislých na JA a ET a akumulaci ET (Kawamura *et al.*, 2009). V případě rezistence indukované BABA u *Arabidopsis* byla prokázána aktivace obranných mechanismů závislých na SA a ABA (Zimmerli *et al.*, 2001; Ton *et al.*, 2005), zatímco u rajčete nebylo zapojení signální dráhy SA v BABA-indukované rezistenci zatím prokázáno.

V předložené studii byla u náchylného genotypu *S. lycopersicum* ošetřeného BABA nalezena korelace mezi akumulací obranných transkriptů po 24 h a produkcí ET. Tyto výsledky spolu s nárůstem hladiny transkriptů hlavních enzymů v dráze biosyntézy ET, jako je ACCsynthasa (*ACS2*) a ACCoxidasa (*ACO4-LIKE*), poukazují na zapojení signální dráhy ET v rezistenci aktivované působením BABA (*Příloha 2 – Obr. 6*). Klíčovým enzymem pro biosyntézu ET je právě ACS (Iqbal *et al.*, 2013). V případě infekce patogenem *P. neolycopersici* byla vyšší hladina transkriptu *ACS2* detekována u obou genotypů, zatímco vyšší hladiny transkriptů *ACO* byly především u *S. habrochaites*. Tento výsledek souvisí s intenzivnějším nárůstem hladiny obranných transkriptů u genotypu *S. habrochaites* po aplikaci *P. neolycopersici*. Vlivem oligandrinu nedošlo k nárůstu hladiny transkriptů *ACO*, ale byla detekována vyšší hladina transkriptu *ACS2* u *S. habrochaites*.

Výsledky dosažené v rámci řešení prvního projektu disertační práce rozšířily poznatky o zapojení a aktivaci řady obranných genů v odpovědích rostlin rodu *Solanum* spp. na infekci biotrofním patogenem, případně působení tzv. „priming agents“, jako je elicitin oligandrin nebo neproteinogenní aminokyselina BABA. Bylo prokázáno, že pro genotyp *S. habrochaites*, vykazující nespecifickou rezistenci, je charakteristická vysoká bazální hladina řady transkriptů s potvrzenou rolí v rezistenci proti širokému spektru patogenů (zejména dvou chitinas, tří β -1,3-glukanas a osmi osmotinů) a intenzivní aktivace transkripce obranných genů po infekci *P. neolycopersici*. Pouze v případě náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur bylo po ošetření rostlin oligandrinem a BABA detekováno zvýšení rezistence proti biotrofnímu patogenu *P. neolycopersici* spojené s akumulací transkriptů obranných genů. Rozdíly v aktivaci transkripce jednotlivých obranných genů poukazují na rozdílný mechanismus působení BABA a oligandrinu.

Na základě dosažených výsledků zahrnujících transkripční analýzu je zřejmé, že významnou roli v obranném mechanismu v reakci na BABA a infekci patogenem *P. neolycopersici* bude mít signální dráha ET. BABA v průběhu aktivace rezistence proti biotrofním a hemibiotrofním patogenům u rodu *Solanum* působí rozdílným mechanismem zahrnujícím signální dráhu ET v porovnání s výsledky publikovanými u rostlin *Arabidopsis* nebo tabáku (Ton *et al.*, 2005).

PŘÍLOHA 2

Diverse responses of wild and cultivated tomato to BABA, oligandrin and *Oidium neolyopersici* infection

Pavla Satková, Tomáš Starý, Veronika Plešková, Martina Zapletalová, Tomáš Kašparovský,
Lucie Činčalová-Kubienová, Lenka Luhová, Barbora Mieslerová, Jaromír Mikulík,
Jan Lochman, Marek Petřivalský

Annals of Botany 119 (5), 829-840 (2017)

PART OF A SPECIAL ISSUE ON PLANT IMMUNITY

Diverse responses of wild and cultivated tomato to BABA, oligandrin and *Oidium neolycopersici* infection

Pavla Satková^{1,*†}, Tomáš Starý^{2,*†}, Veronika Plešková², Martina Zapletalová², Tomáš Kašparovský²,
Lucie Činčalová-Kubienová¹, Lenka Luhová¹, Barbora Mieslerová³, Jaromír Mikulík⁴, Jan Lochman^{2,*} and
Marek Petřivalský¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic, ²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 61137 Brno, Czech Republic, ³Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic and ⁴Laboratory of Growth Regulators & Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University & Institute of Experimental Botany ASCR, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

*For correspondence. E-mail marek.petrivalsky@upol.cz or lochik@mail.muni.cz

†These authors contributed equally to this study.

Received: 1 June 2016 Returned for revision: 6 June 2016 Accepted: 5 August 2016 Published electronically: 22 September 2016

- **Background and Aims** Current strategies for increased crop protection of susceptible tomato plants against pathogen infections include treatment with synthetic chemicals, application of natural pathogen-derived compounds or transfer of resistance genes from wild tomato species within breeding programmes. In this study, a series of 45 genes potentially involved in defence mechanisms was retrieved from the genome sequence of inbred reference tomato cultivar *Solanum lycopersicum* 'Heinz 1706'. The aim of the study was to analyse expression of these selected genes in wild and cultivated tomato plants contrasting in resistance to the biotrophic pathogen *Oidium neolycopersici*, the causative agent of powdery mildew. Plants were treated either solely with potential resistance inducers or by inducers together with the pathogen.
- **Methods** The resistance against *O. neolycopersici* infection as well as RT-PCR-based analysis of gene expression in response to the oomycete elicitor oligandrin and chemical agent β -aminobutyric acid (BABA) were investigated in the highly susceptible domesticated inbred genotype *Solanum lycopersicum* 'Amateur' and resistant wild genotype *Solanum habrochaites*.
- **Key Results** Differences in basal expression levels of defensins, germins, β -1,3-glucanases, heveins, chitinases, osmotins and PR1 proteins in non-infected and non-elicited plants were observed between the highly resistant and susceptible genotypes. Moreover, these defence genes showed an extensive up-regulation following *O. neolycopersici* infection in both genotypes. Application of BABA and elicitor induced expression of multiple defence-related transcripts and, through different mechanisms, enhanced resistance against powdery mildew in the susceptible tomato genotype.
- **Conclusions** The results indicate that non-specific resistance in the resistant genotype *S. habrochaites* resulted from high basal levels of transcripts with proven roles in defence processes. In the susceptible genotype *S. lycopersicum* 'Amateur', oligandrin- and BABA-induced resistance involved different signalling pathways, with BABA-treated leaves displaying direct activation of the ethylene-dependent signalling pathway, in contrast to previously reported jasmonic acid-mediated signalling for elicitors.

Key words: BABA, defence genes, ethylene, *Oidium neolycopersici*, oligandrin, powdery mildew, resistance, *Solanum lycopersicum*, *Solanum habrochaites*, tomato.

INTRODUCTION

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most important food crops and is widely used as a model plant for scientific purposes. Through domestication, breeding and research activities of the ancestral wild *Solanum* species, originating from the Andean region, many morphologically different cultivars and forms have been created. During this process, the genomes of cultivated tomatoes have passed through a progressive genetic bottleneck, reducing the genetic diversity in cultivated varieties compared to their wild relatives (Sim *et al.*, 2011). Breeding selection has focused almost exclusively on traits related to

desirable agricultural characteristics such as fruit yield and quality, loss of germination inhibition or compact growth habit. However, disease resistance traits have been disregarded, resulting in cultivars highly susceptible to many pathogens (Foolad, 2007). Wild tomato species, in contrast, such as *S. chilense*, *S. peruvianum*, *S. habrochaites*, *S. parviflorum*, *S. pennellii* or *S. pimpinellifolium*, are considered a rich source of disease resistance genes and have been utilized in breeding programmes for the introgression of these genes into cultivated varieties to improve their resistance (Menda *et al.*, 2014).

In addition to inbreeding, the use of resistance inducers is another strategy for the protection of susceptible crop plants.

Treatment with natural or synthetic chemicals can establish a primed state of the plant that enables a stronger and faster activation of defence responses and enhanced resistance to challenging stresses (Conrath, 2009). The non-protein amino acid β -aminobutyric acid (BABA) belongs to well-known priming agents. Unlike its isomers α - and γ -aminobutyric acid, BABA induces resistance in many plants against various pathogens (Piękna-Grochala and Kępczyńska, 2013). For instance, BABA induces a strong resistance of tomato towards the tomato late blight *Phytophthora infestans* (Cohen et al., 1994; Cohen, 2002) and to root-knot nematodes (Oka and Cohen, 2001). However, it has been observed that BABA treatment can undesirably affect plant growth, thus hindering its use for field applications (Wu et al., 2010). Studies on *Arabidopsis*–*Botrytis cinerea* interactions have suggested that the protective effects of BABA are mediated through a salicylic acid (SA)-dependent pathway (Zimmerli et al., 2001). Furthermore, a recent study of an *Arabidopsis* mutant in BABA-induced resistance (BABA-IR) towards *Hyaloperonospora arabidopsidis* has revealed the *Impaired in BABA-induced Immunity 1* (IBI1) gene, which encodes an aspartyl-tRNA synthetase (Luna et al., 2014). Enantiomer-specific binding of the R-enantiomer of BABA to IBI1 disrupts its canonical activity and primes the protein for non-canonical defence activity. This results in tRNA^{asp} accumulation, inducing GCN2-dependent phosphorylation of translation initiation factor eIF2 α responsible for the consequent growth inhibition. Moreover, the *gcn2-1 Arabidopsis* mutant remains unaffected in BABA-IR, demonstrating that BABA-IR and BABA-induced stress are controlled via separate pathways (Luna et al., 2014).

With the development of multiple pesticide-resistant pathogen strains, current research efforts tend to focus on the replacement of chemical usage with alternative agents and substances for sustainable, economically profitable agriculture. A potential biological approach exploits the use of pathogen-derived molecules called elicitors for the activation of defence responses and subsequent systemic acquired resistance (SAR) in host plants. This group of chemically diverse compounds includes elicitors, a class of small proteinaceous molecules secreted by members of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in the family Pythiaceae. Elicitors are known for their capacity to induce the hypersensitive response and SAR against fungal and bacterial pathogens in some plant species such as tobacco (Kamoun et al., 1993) or radish (Bonnet et al., 1996). Oligandrin is an elicitor-like protein secreted by the oomycete *Pythium oligandrum*. Apart from its mycoparasitism activity, oligandrin adversely affects pathogen growth and development in the host plant and confers enhanced resistance in many plants against various pathogens, i.e. tomato to *Phytophthora parasitica* (Picard et al., 2000) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Benhamou et al., 2001) or tobacco to *P. parasitica* and to phytoplasma (Lherminier et al., 2003). However, the precise mechanism of the elicitation process remains poorly understood. A study of the effect of INF1 elicitor, secreted by *P. infestans*, on tomato plants has shown that INF1 establishes resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Kawamura et al., 2009). Moreover, treatment by INF1 induces in tomato leaves the expression of jasmonic acid (JA)-responsive *PR-6* encoding proteinase inhibitor II, *LeATL6* encoding ubiquitin ligase E3 and *LOX-E* encoding lipoxygenase. The accumulation of ethylene (ET) and expression of ET-responsive genes are

also induced in tomato leaves treated by INF1. Thus, the authors of this study suggest that elicitors induce plant resistance via JA- and ET-mediated signalling pathways (Kawamura et al., 2009).

In the present study, we characterized the defence responses of highly resistant wild tomato genotype *S. habrochaites* and susceptible domesticated inbred genotype *S. lycopersicum* ‘Amateur’. We quantified the expression of selected defence genes by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) in plants treated with two known inducers of resistance, namely the elicitor oligandrin and the non-protein amino acid BABA, alone or with the economically important biotrophic pathogen *Oidium neolycopersici*, the causative agent of tomato powdery mildew. We describe here the localization and differences in basal expression levels of selected genes between the resistant and susceptible genotypes. We also show that the oligandrin- and BABA-induced resistance against *O. neolycopersici* are not based on similar signalling defence pathways. Furthermore, we suggest that BABA-induced resistance in tomato is ET-dependent and not based on SA- or JA-dependent signalling pathways.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Two *Solanum* spp. genotypes, *S. lycopersicum* ‘Amateur’ and *S. habrochaites* f. *glabratum* (LA 2128), expressing differential phenotypes of resistance to *O. neolycopersici* (Mieslerová et al., 2000) were selected for the studies. Seeds were sown on moistened perlite (Agroperlite, Nový Jičín, Czech Republic) and seedlings were transferred to a garden soil–peat mixture (2:1, v/v) in plastic pots (7 cm in diameter). Plants were grown in a growth chamber with a 12-h photoperiod (light intensity of 100 $\mu\text{mol m}^{-2}$) and day/night temperature of 20/18 °C. Plants approx. 10 weeks old and with eight true leaves were employed in all experiments.

Plant inoculation

Oligandrin and BABA were dissolved in Milli-Q deionised water. A 10 mM solution of BABA was applied by spraying, whereas a 100 nM solution of oligandrin was directly infiltrated into 4th and 5th tomato leaves. Control plants were treated with an equal volume of Milli-Q water.

Freshly sporulating mycelium (8 d post-inoculation) of *O. neolycopersici* (isolate C-2) was used as the inoculum source. The 4th and 5th oldest true leaves per plant were inoculated by surface contact (dusting/tapping) with the conidia of *O. neolycopersici*. The leaves were frozen in liquid nitrogen 48 h after the treatment and stored at –80 °C. Identical plant growth conditions and inoculation procedures were employed in three independent experiments.

Oidium neolycopersici phytoprotection test

Plant resistance was induced by spraying of 5–7-week-old tomato plants with BABA or by direct infiltration of oligandrin into the leaflets as described. Two days after the

treatment, leaf discs 12 mm in diameter were cut from treated leaves using a cork borer and inoculated with *O. neolyopersici*. At 48 h post-inoculation, five leaf discs were transferred to glacial acetic acid for 48 h and then mounted in glycerol prior to observations under a light microscope (Olympus BX50) (Lebeda and Reinink, 1994). Pathogen structures were stained with 1 % Evans Blue. Germination of the conidia was expressed as the percentage of conidia producing germ tubes per 100 conidia counted for each leaf disc. Fungal development was assessed as the number of germ tubes per conidium at 48 h post-inoculation and as the length of germ tubes (1st tube with lobbed appressorium, and 2nd and 3rd tubes with nipple-shaped appressorium). At least 100 conidia were observed per each tomato genotype and experimental setting (Piterková et al., 2011).

Quantification of defence gene expression

Potentially interesting transcript sequences corresponding to known targeted functions involved in defence mechanisms were recovered from the genome sequence of the tomato inbred reference tomato cultivar *S. lycopersicum* ‘Heinz 1706’. These transcripts are generally considered as defence-responsive genes in other model plants such as *Nicotiana tabacum* or *Arabidopsis thaliana* (Sels et al., 2008; Spoel and Dong, 2012) and include defensins (*def*), germins (*germ*), β -1,3-glucanases (*glu*), β -1,4-glucanases (*gluco*), heveins (*hev*), chitinases (*chit*), osmotins (*osm*), thaumatins (*thaum*) and systemin (*syst*). The selection was performed using an assembly generated from the available tomato EST-cDNA at NCBI (nearly 300 000) annotated through BlastX against plant sequences and translated to proteins. Subsequently, the recovered transcripts were analysed by the BlastN tool using the available shotgun genome sequence of the wild tomato *S. habrochaites* to confirm their presence. The specific primers for individual genes were designed using the program Primer3 (Koressaar and Remm, 2007), with annealing temperatures of 60 °C and expected amplicons of 100–300 bp. Gene expression was analysed by RT-qPCR using the fluorescent intercalating dye SYBR-Green and Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Czech Republic). Total RNA was isolated from 100 mg of leaf tissue using TRI reagent (Ambion, Austin, TX, USA) and purified using the TURBO DNA-free kit (Ambion). Reverse transcriptase reactions were performed with the ImProm-II reverse transcription system (Promega, Madison, WI, USA) using 0.4 μ g of total RNA in a volume of 20 μ l according to the manufacturer’s instructions. Obtained cDNA was amplified by qPCR using gene-specific primers (Supplementary Data Table S1) and GoTaq qPCR Master Mix (Promega) according to the manufacturer’s instructions. PCR amplification was carried out as follows: 45 cycles of DNA denaturation at 95 °C for 20 s, annealing and extension at 60 °C for 40 s. Three biological and technical replicates were analysed for each sample. To evaluate gene expression relative to an endogenous control, the transcript level of each gene was normalized to that of elongation factor 1 α (EF-1 α) and TIP41-like family protein (TIP41) genes by the $\Delta\Delta C_T$ method. It has been shown previously that expression of the EF-1 α and TIP41 genes is not influenced by different stress conditions (Exposito-Rodriguez et al., 2008; Nicot et al., 2005).

Analysis of ethylene production

Analysis was performed using a gas chromatography-flame ionization detector as described previously (Malá et al., 2009). Briefly, 1 mL of air was removed from each test tube containing previously weighed whole tomato leaves and analysed using an Agilent GC 6890 equipped with a flame ionization detector and 50-m capillary column (HP-AL/S stationary phase, 15 μ m, i.d. = 0.535 mm). The injection temperature was set to 200 °C, oven temperature to 40 °C and detector temperature to 220 °C. The measurements were conducted four times from four different test tubes of each variant. The final concentrations were calculated from the calibration curve and adjusted to vial volume and 1 g of fresh weight.

RESULTS

Comparison of levels of induced resistance by BABA and oligandrin in tomato genotypes

In agreement with previous studies (Mieslerová et al., 2000), we observed a high level of resistance against *O. neolyopersici*, characterized by decreased lengths and numbers of pathogen 2nd and 3rd germ tubes, in control non-treated tomato plants of wild *S. habrochaites* compared to susceptible genotype *S. lycopersicum* ‘Amateur’ (Fig. 1). Treatment of 7-week-old tomato plants with BABA and oligandrin, using optimal concentrations reported in previous publications (Kawamura et al., 2009; Bengtsson et al., 2014a), resulted in significant changes in the plant resistance against the biotrophic pathogen *O. neolyopersici* (Fig. 1). Oligandrin at a concentration of 100 nM induced a significantly increased resistance of *S. lycopersicum* ‘Amateur’ against *O. neolyopersici* characterized by a decreased percentage of 3rd germ tubes and decreased lengths of 2nd and 3rd germ tubes (Fig. 1A). Similarly, the application of 10 mM BABA induced significant resistance against *O. neolyopersici* in *S. lycopersicum* ‘Amateur’ in agreement with previous studies (Worrall et al., 2012; Bengtsson et al., 2014a). However, in contrast to oligandrin, BABA application induced significant changes only in the length of the conidia and not their representation (Fig. 1B). On the other hand, both oligandrin and BABA application induced almost no observable changes in resistance in *S. habrochaites*, which may be a consequence of its considerably higher basal resistance (Fig. 1). The only observed changes related to the resistance response of *S. habrochaites* plants induced by BABA were slightly decreased lengths of pathogen 2nd germ tubes (Fig. 1B).

Selection of genes involved in tomato defence responses

To determine the molecular mechanisms involved in BABA and oligandrin-derived activation of defence in tomato, the expression levels of selected defence gene transcripts were measured by qPCR. Transcript changes were also monitored after plant infection with *O. neolyopersici*, in both compatible and incompatible interactions. In total, 55 genes generally considered as defence responsive in other model plants such as *N. tabacum* or *A. thaliana* were selected. These genes included defensins (*def*), germins (*germ*), β -1,3-glucanases (*glu*), β -1,4-glucanases (*gluco*), heveins (*hev*), chitinases (*chit*), osmotins

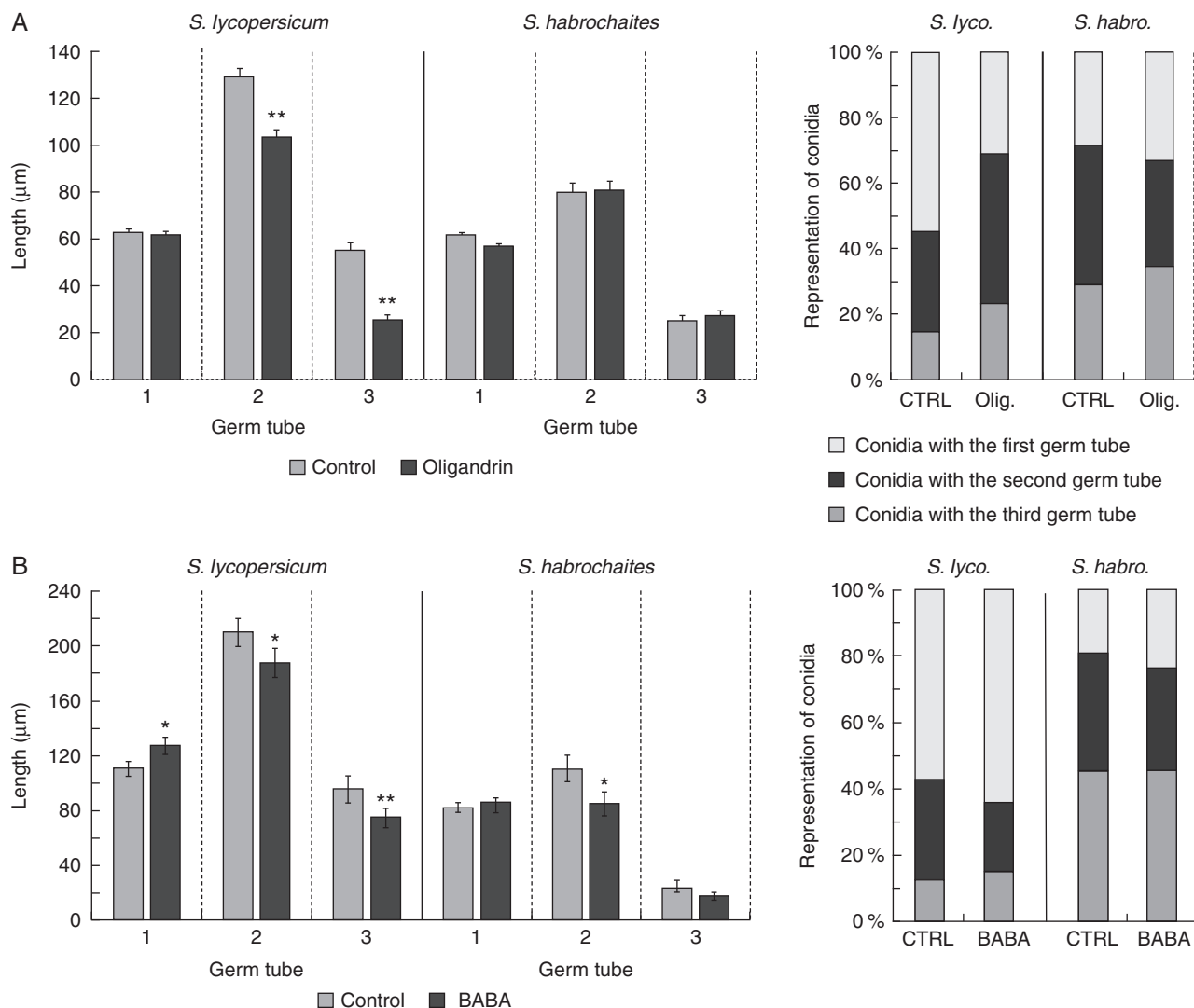


FIG. 1. Oligandrin- and BABA-induced resistance of tomato plants against *Oidium neolycopersici*. The relative representation of pathogen germ tube lengths and pathogen developmental structures was determined 24h after the inoculation with *O. neolycopersici* (isolate C-2) on leaf discs from 7-week-old tomato plants (*Solanum lycopersicum* 'Amateur' and *Solanum habrochaites*) treated with (A) the elicitor oligandrin (100 nM) and (B) BABA (10 mM). Data are presented as means \pm s.e. of three replicates from three independent experiments. Each replicate corresponds to eight inoculated areas on four leaves from one plant. Asterisks denote a significant difference of the mean values compared to the control group determined by Student's *t*-test at ** $P \leq 0.05$ or *** $P \leq 0.01$.

(*osm*), systemin (*syst*) and genes of PR1 proteins. During the optimization of reaction conditions, ten genes were excluded on the basis of very low basal transcript levels, non-specific amplification or primer dimer formation. Thus, only 45 of the 55 genes were finally selected for the ensuing experiments (Table S2). Mapping of these genes on the reference genome of *S. lycopersicum* 'Heinz 1706' showed that considering the number of genes on each chromosome there was a relatively higher concentration of these defence genes on chromosomes 1, 5, 8, 9 and 10. Intriguingly, there was no overlap with previously analysed genomic locations of domestication sweeps, but on chromosomes 1 (2), 2 (3) and 8 (4) there was an overlap with the genomic locations of improvement sweeps analysed and described in another recent study (Lin *et al.*, 2014) (Fig. 2A).

Comparison of basal levels of defence gene transcripts

Initial comparison of basal levels of defence gene transcripts between the highly resistant wild tomato *S. habrochaites* and the susceptible genotype *S. lycopersicum* 'Amateur' revealed that about half of the analysed genes with expected roles in tomato defence showed different basal expression levels (Fig. 2). However, only 14 transcripts showed an upregulation in *S. habrochaites* compared to *S. lycopersicum* 'Amateur', while the remaining 11 transcripts were downregulated (Fig. 2). Interestingly, 12 of the 14 transcripts (86%) upregulated in the highly resistant genotype were found to co-localize on chromosomes 1, 8 and 10 to quantitative trait loci (QTLs) for early blight and *P. infestans* resistance (Foolad, 2007). These observations provide additional support for the involvement of these genes in resistance mechanisms in the highly resistant

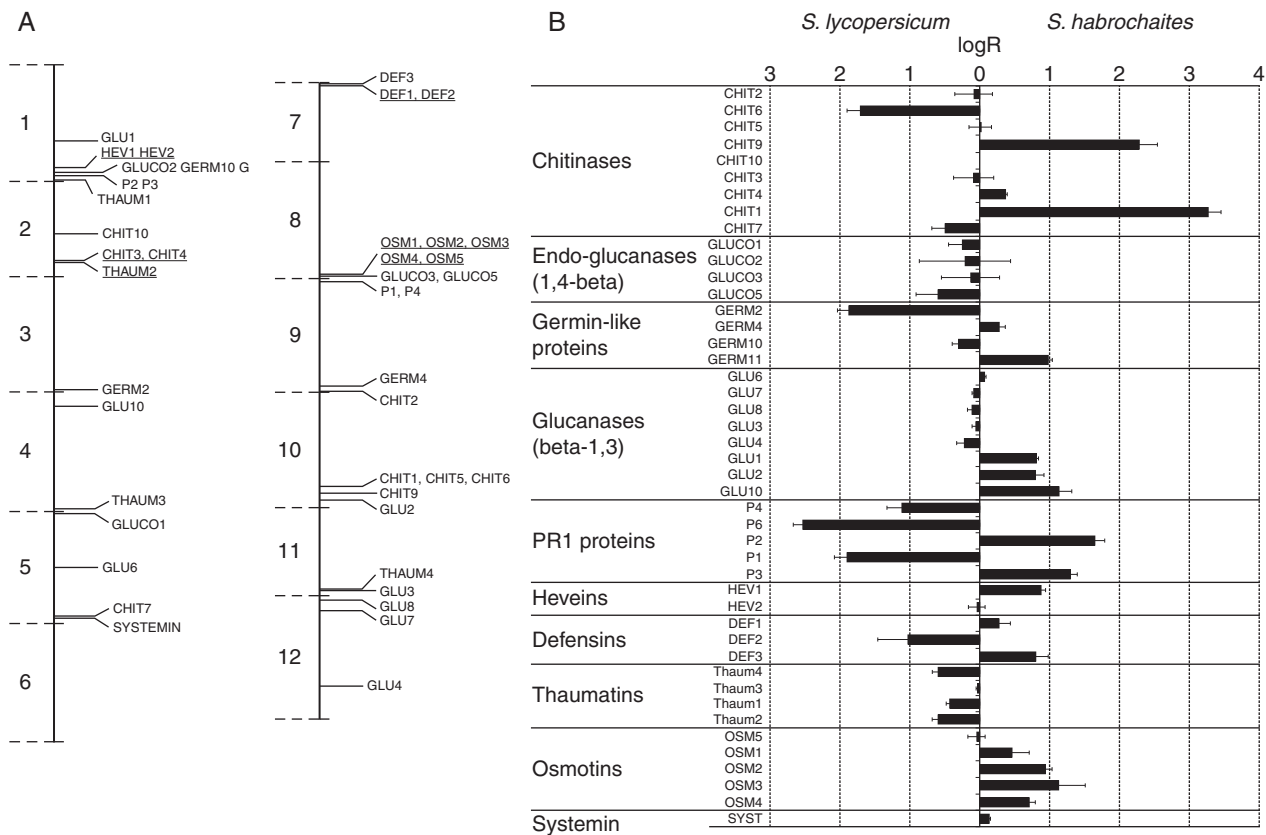


FIG. 2. *Solanum lycopersicum* ‘Amateur’ and *Solanum habrochaites* exhibit differences in the basal levels of defence-related gene transcripts. (A) Location of individual transcripts in the reference genome of *Solanum lycopersicum* ‘Heinz 1706’. Underlined transcripts overlapped with the genomic locations of improvement sweeps analysed in the study of Lin *et al.* (2014). (B) Overview of the differential accumulation of candidate defence-related transcripts identified by RT-qPCR in control non-infected leaf tissues of the respective tomato genotypes.

genotype, in contrast to upregulated transcripts observed in the susceptible genotype, which showed an almost homogeneous genomic distribution.

Comparison of induction of defence-related transcripts by BABA, oligandrin and pathogen infection

The non-protein amino acid BABA is a well-known priming agent that induces resistance in many plants against various pathogens. The manner by which BABA mediates resistance has recently been unmasked as the disruption of the canonical activity of an aspartyl-tRNA synthetase (Luna *et al.*, 2014). Application of BABA as a foliar spray is one of the most common application methods in laboratory and field conditions. The optimized concentration of 10 mM BABA used in this study was chosen to overcome possible side effects on treated plants manifested as hypersensitive response (HR)-like lesions with subsequent leaf wilting (Cohen *et al.*, 1994; Siegrist *et al.*, 2000; Bengtsson *et al.*, 2014a). During testing of the optimal BABA concentrations on the two tomato genotypes, an interesting phenomenon was observed. Treatment of susceptible *S. lycopersicum* ‘Amateur’ plants with 50 and 100 mM BABA caused severe side effects, as demonstrated by the formation of HR-like lesions 2 d after treatment, whereas no visible symptoms were observed in *S. habrochaites* plants even after the

application of 100 mM BABA (Fig. 3). In this respect, the behaviour of *S. habrochaites* plants is in accordance with the study of Cohen *et al.* (2010) that was conducted on lettuce, with formation of HR-like lesions as the result of plant-specific responses to BABA.

Application of 10 mM BABA solution onto leaves of *S. lycopersicum* ‘Amateur’ resulted in significant (more than three times) upregulation of ten measured transcripts, with the highest inductions being observed in the PR1 class (Fig. 4, Supplementary Data Table S2). On the other hand, no upregulation of defensins, germin-like proteins, β -1,4-glucanases or thaumatin-like proteins was observed. Surprisingly, the application of 10 mM BABA solution onto leaves of *S. habrochaites* resulted in almost no significant upregulation of any measured transcript, with the exception of P4 and P6 transcripts belonging to the PR1 family (Fig. 4). However, this finding is in agreement with the compromised response to BABA observed on the leaves.

Infiltration of plant leaves with 100 nM solution of oligandrin triggered the upregulation of multiple transcripts in both genotypes (Fig. 4, Table S2). A higher induction rate (18 transcripts) was observed in the highly resistant genotype *S. habrochaites*. Moreover, from 13 transcripts upregulated in *S. lycopersicum* ‘Amateur’, most of the ten transcripts were shared with those upregulated in *S. habrochaites*, pointing to a similar signalling mechanism involved in plant responses to

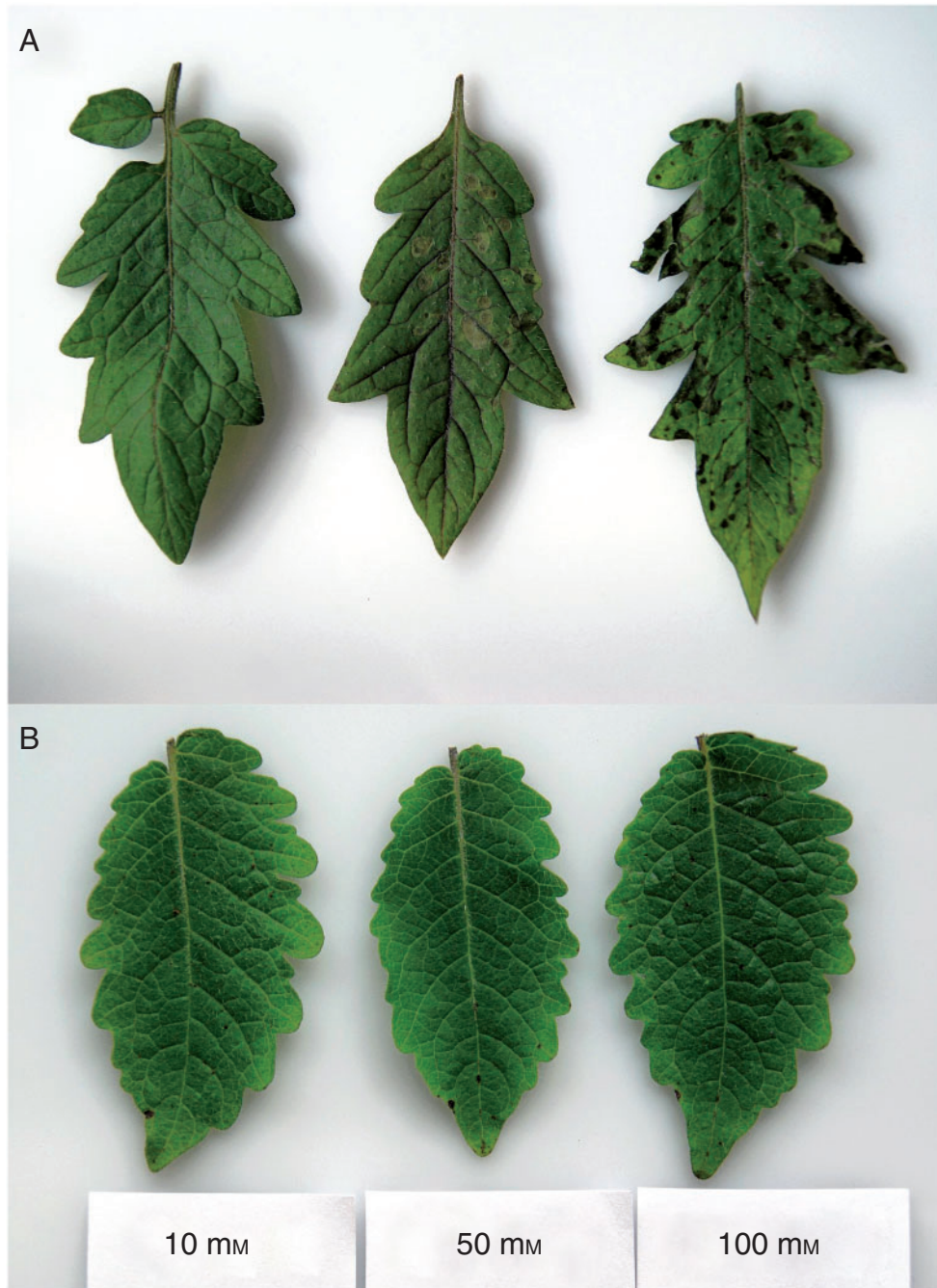


FIG. 3. Necrotic symptoms triggered by BABA application to tomato leaves. *Solanum lycopersicum* 'Amateur' (A) and *Solanum habrochaites* (B) plants were sprayed with 10, 50 and 100 mM BABA and the photographs of representative leaves were obtained 48 h later.

oligandrin in both studied genotypes. A notable finding was a strong downregulation of several chitinase and osmotin transcripts in both genotypes as well as an upregulation of the systemin transcript, probably due to the mechanical wounding caused by oligandrin infiltration through the leaf abaxial layer (Fig. 4, Table S2).

Infection of tomato plants with the biotrophic pathogen *O. neolyopersici* clearly demonstrated differences between the

resistant and susceptible genotype. While in the infected highly resistant genotype a strong induction of 24 transcripts could be observed, only 14 transcripts were found to be induced in the highly susceptible genotype, the majority of them common for both genotypes. This finding might be related to a generally different extent and timing of transcript induction in the susceptible and resistant tomato genotypes. In our previous studies on these tomato genotypes, we also found differences in the extent

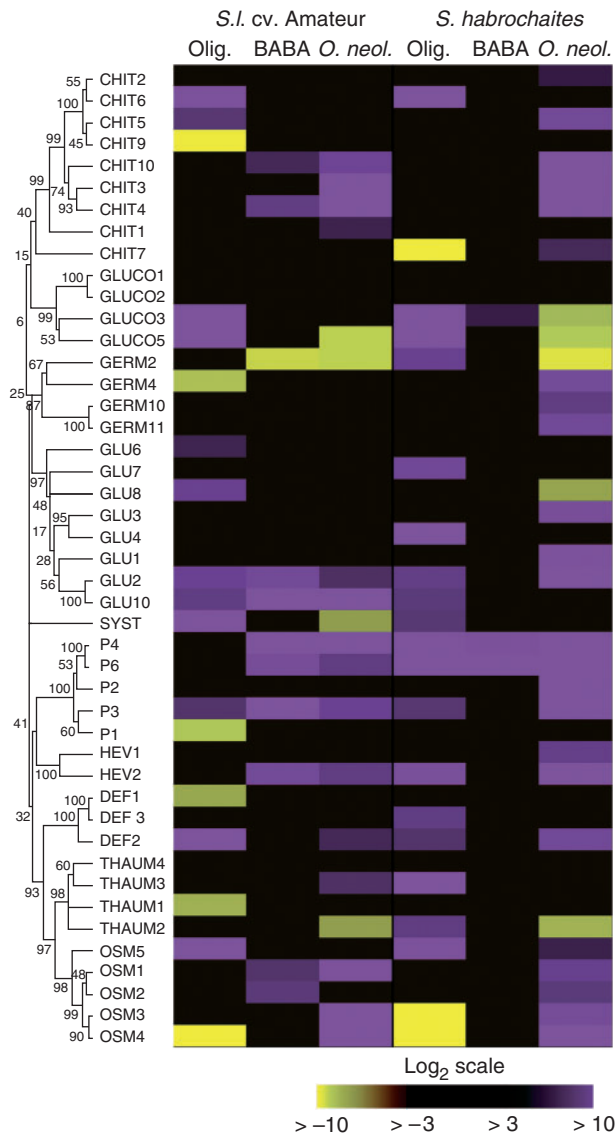


FIG. 4. Changes in the expression of tomato defence-related genes induced by oligandrin or BABA treatment and after infection by *Oidium neolyopersici*. Overview of the differential accumulation of candidate defence-related transcripts identified by RT-qPCR 48 h after treatment or inoculation. Yellow and purple colours represent upregulated and downregulated transcripts, respectively. The y-axis shows hierarchical clustering of the corresponding protein sequences by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) method in MEGA6 software. Water-sprayed leaves (BABA, *Oidium neolyopersici*) or leaflets infiltrated with water (oligandrin) were used as the control samples.

and timing of the increased production of defence signalling molecules NO and H₂O₂ during the time-course of powdery mildew invasion (Piterková et al., 2009; Lebeda et al., 2014). The most remarkable difference between the genotypes studied was in the PR1 and germin-like protein classes (Fig. 4). Moreover, in comparison with a recent study on tomato plants inoculated with *Phytophthora capsici* (Jupe et al., 2013), there was almost perfect correspondence regarding the downregulation of *germ2*, *gluco5* and *thaum2* transcripts caused by *O. neolyopersici* infection (Fig. 4, Table S2).

Overlap of upregulated genes among BABA-, oligandrin- and pathogen-treated plants

Initial comparison of the transcript profiles revealed a high similarity in the results obtained from BABA-treated and *O. neolyopersici*-infected *S. lycopersicum* ‘Amateur’ plants, as well as a very low overlap between oligandrin-treated and *O. neolyopersici*-infected plants of both studied genotypes (Fig. 5). Moreover, in both genotypes, transcripts of genes encoding GERM2, GLUCO5 or OSM4 demonstrated an opposing regulation between the oligandrin treatment and *O. neolyopersici* infection. These findings raise a question on the different regulation mechanisms involved in plant responses to oligandrin and BABA or *O. neolyopersici*. In the case of elicitors, activation of JA- and ET-mediated signalling pathways has been previously demonstrated (Kawamura et al., 2009). For BABA treatment, an SA-dependent pathway has been well described in *Arabidopsis* plants; however, to the best of our knowledge, no such study showing evidence for SA-dependent signalling in tomato has been published. Therefore, we analysed the promoter regions of BABA-upregulated transcripts spanning about 1000 bp before the start codon using the PlantPAN program (Chang et al., 2008) in the tomato transcription factor library. In the majority of BABA-upregulated transcripts, the sequence for the transcription factor ERELEE4 containing an ET-responsive element was identified (Table S2). Based on this result, the transcript levels of key enzymes involved in the ET synthesis pathway, namely ACC synthase and ACC oxidase, were determined along with quantification of the production of ET. On the basis of previous studies of different ACC synthase isoforms in *Arabidopsis* (Skottke et al., 2011; Li et al., 2012) and ACC synthase and oxidase in tomato (Lincoln et al., 1993; Kim et al., 1998; Cohn and Martin, 2005; Shi and Zhang, 2014; Yim et al., 2014), three candidate transcripts for each enzyme (ACS1a, ACS2, ACS6 for ACC synthase, and ACO1, ACO 1-like and ACO 4-like for ACC oxidase) with suspected roles in pathogenesis processes were selected.

In the BABA-treated plants, a good correlation between the accumulation of defence transcripts after 24 h and the ET production was observed (Fig. 6). In BABA-responsive *S. lycopersicum* plants, a significant upregulation of ACS2 transcript followed by an increased ET production was observed. In contrast, in BABA low-responsive *S. habrochaites* plants, there was no upregulation of any analysed ACS transcript nor any increase of ET production (Fig. 6). In both genotypes, an upregulation of ACO 4-like transcript was observed in BABA-treated plants. However, unlike ACC synthase, ACC oxidase is not considered as the key regulatory enzyme in ET synthesis (Iqbal et al., 2013).

Following *O. neolyopersici* infection, an upregulation of the ACS2 transcript was observed in both genotypes, while the ACO transcripts were upregulated predominantly in *S. habrochaites* (Fig. 6). This finding is clearly related to the more intense upregulation of defence-related transcripts in *S. habrochaites* after *O. neolyopersici* inoculation. Treatment with oligandrin did not trigger upregulation of any analysed ACO transcript. However, it did cause an upregulation of ACS2 transcript in the *S. habrochaites* genotype, corresponding to a more intense upregulation of defence-related transcripts in this genotype upon oligandrin treatment.

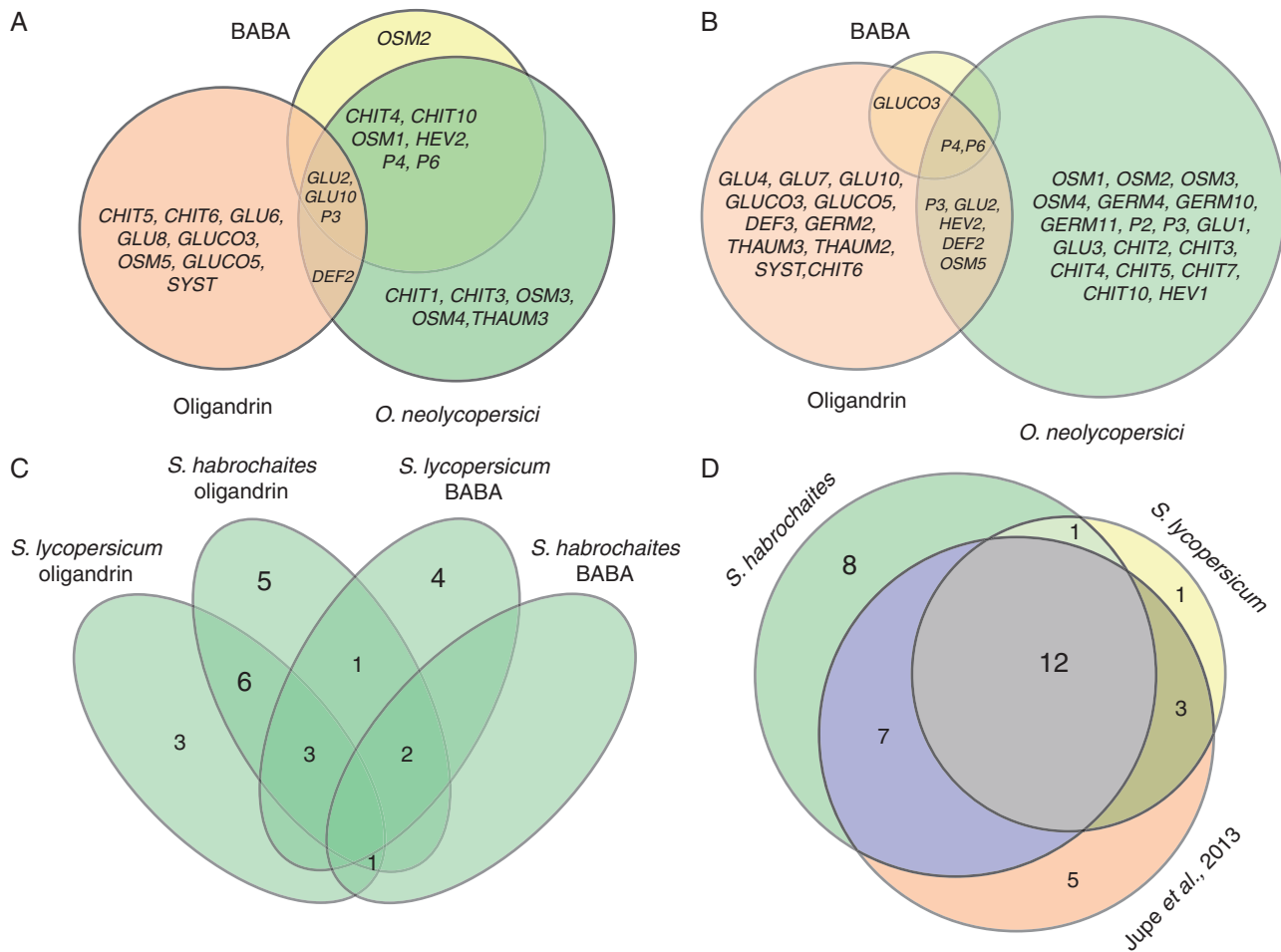


FIG. 5. Venn diagrams showing the relationship among treatments. (A, B) Venn diagrams showing the transcript induction overlap of two inducers, namely BABA and oligandrin, and *Oidium neolyopersici* infection in *Solanum lycopersicum* 'Amateur' (A) and *Solanum habrochaites* (B) plants measured by RT-qPCR. (C) Overlap of induced transcripts in BABA- and oligandrin-treated plants measured by RT-qPCR. (D) Overlap of *Phytophthora capsici*-induced transcripts from the study by Jupe *et al.* (2013) with our results of *O. neolyopersici* infection of *S. lycopersicum* 'Amateur' and *S. habrochaites* plants. Transcript levels were measured 48 h after infection by microarray (Jupe *et al.*, 2013) and RT-qPCR and compared to control represented by time zero.

DISCUSSION

In the present study, we attempted to analyse and compare the responses of susceptible and resistant tomato genotypes to resistance inducers oligandrin and BABA and to infection by the powdery mildew fungus *O. neolyopersici*, which represents a typical biotrophic pathogen of tomato. The proteinaceous elicitor oligandrin from *P. oligandrum*, representing elicitors as the best known oomycete pathogen-associated molecular pattern (M/PAMPs), induces the HR and SAR in several plants (Picard *et al.*, 2000; Benhamou *et al.*, 2001). BABA represents a non-protein amino acid generally accepted as a potent priming agent conferring increased resistance to biotic and abiotic stresses in many studied plants. As model tomato genotypes, we selected the previously well-characterized highly susceptible *S. lycopersicum* 'Amateur', representing a domesticated inbred cultivar, and *S. habrochaites* that exhibits a high non-specific resistance (Mieslerová *et al.*, 2000; Tománková *et al.*, 2006; Piterková *et al.*, 2009, 2011; Lebeda *et al.*, 2014). The defence responses were monitored as transcript-level changes of selected genes

with proven roles in non-specific resistance in tomato and model plants *N. tabacum* or *A. thaliana*.

Interestingly, the localization of the targeted genes to the chromosome map of the inbred reference tomato cultivar *S. lycopersicum* 'Heinz 1706' showed their clustering towards the ends of chromosomes 1, 5, 8, 9 and 10. The subsequent analysis of basal transcript levels in both tested genotypes suggested a role of genes located on chromosomes 1, 8 and 10 in plant disease resistance. Several other studies have confirmed the relevance of genes on these chromosomes to defence processes. Following an infection of tomato with *P. infestans*, an over-representation of gene sets belonging to chromosome 10 and a similar tendency in their localization towards the ends of chromosomes were recently detected by gene set enrichment analysis (Lopez-Kleine *et al.*, 2013). Moreover, in agreement with our results, QTLs for early blight resistance in tomato using backcross populations of an *S. lycopersicum* × *S. habrochaites* cross have been identified in chromosomes 1, 2, 5, 8, 9, 10 and 12 and QTLs for early resistance to *P. infestans* have also been

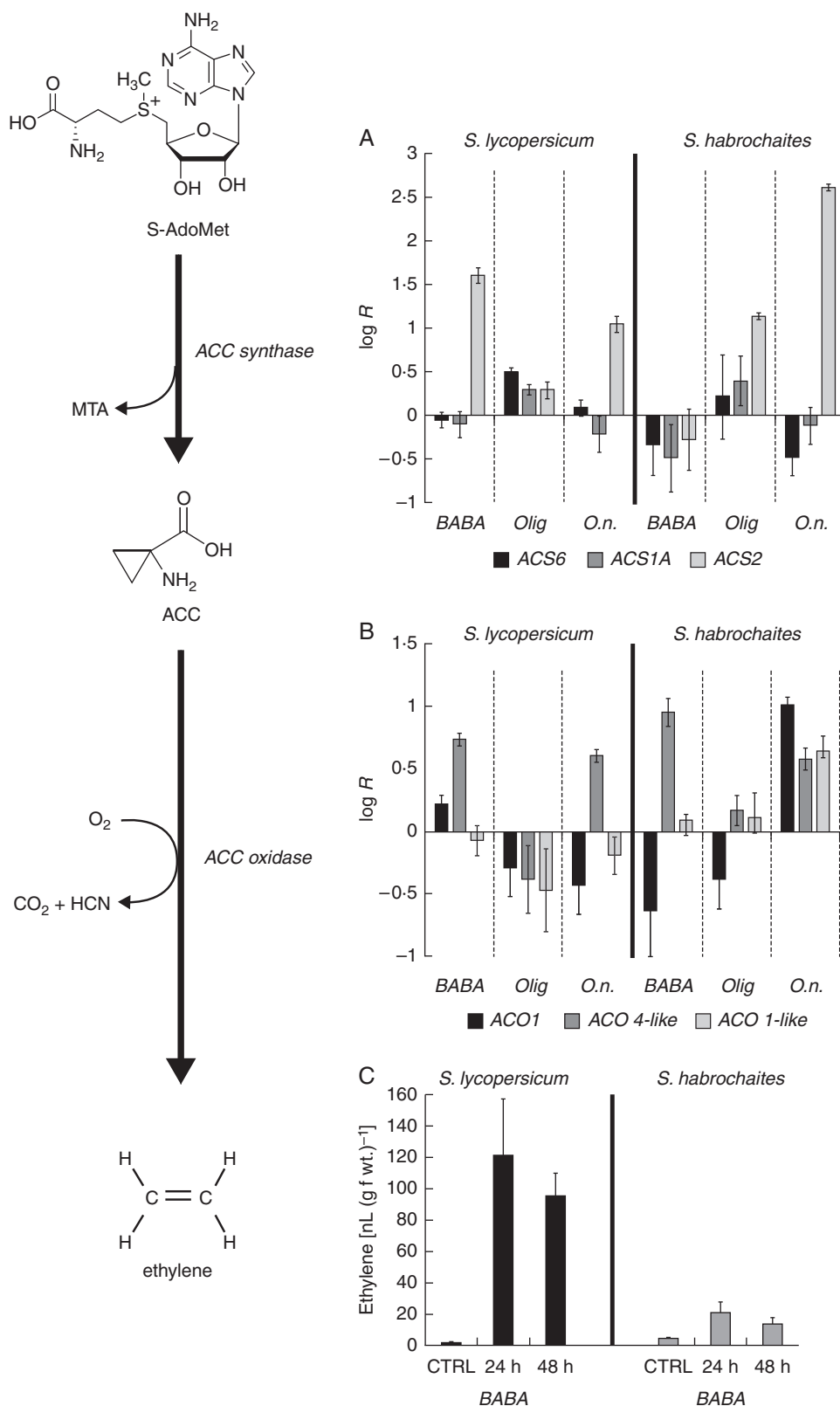


FIG. 6. BABA treatment or *Oidium neolyopersici* infection activates ET production and enzymes of the ET synthesis pathway in tomato plants. (A, B) Transcript accumulation of genes from the ET biosynthesis pathway was measured 24 h after treatment/inoculation by RT-qPCR. (C) ET accumulation was measured 24 and 48 h after BABA treatment by gas chromatography ($n = 4$). The control tissue was a water-treated control sample. Each bar represents the mean \pm s.e.

detected in chromosomes 3, 4, 5, 8, 10 and 11 (reviewed by Foolad, 2007).

Our results suggest an absence of involvement for five genes (*gluco1*, *gluco2*, *def1*, *thum1* and *thum4*) in the resistance process with no significant upregulation by any treatment or increased basal levels in the resistant genotype. Even though the numbers of differently expressed genes at basal levels of both genotypes were quite similar, we noticed that the expression of the majority of downregulated genes in the susceptible compared to the resistant genotype was not affected by any treatment.

Pathogenesis experiments in the resistant *S. habrochaites* plants clearly demonstrated the previously proven high level of basal non-specific resistance to *O. neolyopersici*, similar to that induced by BABA or oligandrin in the susceptible *S. lycopersicum* genotype (Mieslerová et al., 2000). This high level of basal non-specific resistance was found to be associated with the upregulation of two chitinases, three β -1,3-glucanases and four osmotins. Transgenic plants overexpressing chitinase alone or in combination with β -1,3-glucanase have been previously shown to display an enhanced resistance when challenged with a powdery mildew infection (Oldach et al., 2001) or bacterial pathogens (Dana et al., 2006). Delayed symptoms of *Fusarium* head blight have also been reported in these transgenic plants (Anand et al., 2004). Furthermore, overexpression of osmotins acting as antifungal cytotoxic compounds delayed the development of *P. infestans* and disease symptoms in infected potato plants (Liu et al., 1994; Zhu et al., 1996).

Oligandrin treatment of the susceptible *S. lycopersicum* plants demonstrated the effectiveness of elicitors in inducing resistance to *O. neolyopersici*. The observed resistance in BABA-treated *S. lycopersicum* plants against *O. neolyopersici* infection has previously been demonstrated for BABA-treated tomato seeds (Worrall et al., 2012). However, our data from BABA-treated leaves show a direct activation of the defence responses, characterized by an enhanced accumulation of pathogenesis-related genes, rather than the priming effect, as observed in the study on tomato seeds. Such activation of defence responses has been reported in *A. thaliana*, with BABA applied as a foliar spray, in contrast to soil drench, enhancing expression of the PR1 gene (Jakab et al., 2001). Similarly, a global effect on the transcriptome and an increased abundance of secreted proteins related to resistance was observed in tobacco and potato plants only after application of a BABA foliar spray (Siegriest et al., 2000; Bengtsson et al., 2014a, b). It therefore appears that the mode of action of BABA as a priming or resistance-inducing agent may depend upon the application method. A clear explanation of this phenomenon is a matter of debate and deserves further investigation.

Our data obtained from BABA-treated leaves indicate a different resistance mechanism to that observed with oligandrin, with the suppression of germ tube elongation occurring, rather than the inhibition of conidial germination. The very low overlap of BABA- and oligandrin-induced transcripts in *S. lycopersicum* and opposing trends in their expression support this suggestion of different modes of action. Even though the relationship between different signalling pathways is still a matter of debate (Glazebrook, 2005; Vleeshouwers and Oliver, 2014), the very low overlap between BABA- and oligandrin-induced

transcripts may be a result of the previously reported dependence of elicitor INFI-induced resistance on the activation of JA- and ET-mediated signalling but not on SA-mediated signalling (Kawamura et al., 2009). Perhaps the dependence of BABA-induced resistance on both SA- and abscisic acid (ABA)-dependent defence mechanisms might be involved (Ton et al., 2005). However, we found a low representation of ABA-responsive element (ABRE) and a high representation of ET-responsive elements in the promoter regions of BABA-responsive genes (Table S2). This result, together with an increased ET production and a clear upregulation of key enzymes (ACS2 and ACO4-like) of the ET synthesis pathway, supports suggested ET-dependent mechanisms in BABA-induced resistance in tomato. The participation of ET signalling in BABA-primed resistance in tomato is further promoted by the observation that BABA as well as ET increased disease severity caused by the necrotrophs (van Loon et al., 2006; Worrall et al., 2012). Moreover, we found an interesting overlap of transcripts upregulated by BABA and *O. neolyopersici* with those detected in *Phytophthora capsici*-tomato interaction and suggesting involvement of ET in the disease development during early and biotrophic infection stages (Jupe et al., 2013). All these findings indicate strongly the involvement of ET in BABA-induced resistance against biotrophic and hemi-biotrophic pathogens in tomato in contrast to *Arabidopsis* or tobacco plants (Ton et al., 2005).

Interestingly, the virtual absence of upregulation of the analysed genes in *S. habrochaites* plants upon BABA application is consistent with the lack of observable symptoms after BABA treatment; however, the primary cause of this effect is still unknown. This different response has already been demonstrated in potato cultivars exhibiting different levels of resistance (Bengtsson et al., 2014a). The partial response of resistant *S. habrochaites* plants to very high concentrations of BABA requires confirmation by screening a larger set of contrasting genotypes. Similarly, whether the tolerance of the resistant genotype to BABA treatment is a consequence of basal resistance requires further investigation.

In conclusion, the genotype *S. habrochaites*, exhibiting a high level of non-specific resistance in previous studies, showed considerably higher basal levels of transcripts with proven roles in the resistance process against a broad range of pathogens and a more extensive induction of defence-related transcripts following infection. For five genes (*gluco1*, *gluco2*, *def1*, *thum1* and *thum4*), the absence of any significant upregulation following any treatment or increased basal expression in the resistant genotype suggests no involvement in the resistance response. In the present study, BABA and oligandrin treatment of the susceptible tomato genotype resulted in induction of defence-related transcripts, accompanied by an enhancement of resistance against the biotrophic pathogen. Nevertheless, different regulation mechanisms for induced resistance were observed for each compound, with ET-dependent signalling, rather than SA- or JA-dependent pathways, appearing to be involved in BABA-induced resistance in tomato. In the context of previous studies on *Arabidopsis* and tobacco, our findings suggest that diverse signalling mechanisms occur in BABA-induced resistance in plants, dependent on the mode of application and model plant under study.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at www.aob.oxfordjournals.org and consist of the following. Table S1: sequences of the primers used for qPCR. Table S2: results of qPCR analysis of selected genes involved in tomato defence responses.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (P501/12/0590).

LITERATURE CITED

- Anand A, Lei ZT, Sumner LW, et al. 2004. Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1306–1317.
- Bengtsson T, Holefors A, Witzell J, Andreasson E, Liljeroth E. 2014a. Activation of defence responses to *Phytophthora infestans* in potato by BABA. *Journal of Experimental Botany* 63: 193–202.
- Bengtsson T, Weighill D, Proux-Wera E, et al. 2014b. Proteomics and transcriptomics of the BABA-induced resistance response in potato using a novel functional annotation approach. *BMC Genomics* 15.
- Benhamou N, Belanger RR, Rey P, Tirilly Y. 2001. Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 681–696.
- Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein JP, Ricci P. 1996. Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Experimental Botany* 102: 181–192.
- Chang WC, Lee TY, Huang HD, Huang HY, Pan RL. 2008. PlantPAN: plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics* 9.
- Cohen Y. 2002. β -Aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Disease* 86: 448–457.
- Cohen Y, Niderman T, Mosinger E, Fluhr R. 1994. Beta-aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 104: 59–66.
- Cohen Y, Rubin AE, Kilfin G. 2010. Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL- β -amino-butyric acid (BABA). *European Journal of Plant Pathology* 126: 553–573.
- Cohn JR, Martin GB. 2005. *Pseudomonas syringae* pv. tomato type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *The Plant Journal* 44: 139–154.
- Conrath U. 2009. Priming of induced plant defense responses. *Plant Innate Immunity* 51: 361–395.
- Dana MD, Pintor-Toro JA, Cubero B. 2006. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology* 142: 722–730.
- Exposito-Rodriguez M, Borges AA, Borges-Perez A, Perez JA. 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology* 8.
- Foolad MR. 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics* 2007: 1–52.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205–227.
- Iqbal N, Trivellini A, Masood A, Ferrante A, Khan NA. 2013. Current understanding on ethylene signalling in plants: the influence of nutrient availability. *Plant Physiology and Biochemistry* 73: 128–138.
- Jakab G, Cottier V, Toquin V, et al. 2001. β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Experimental Botany* 107: 29–37.
- Jupe J, Stam R, Howden AJM, et al. 2013. *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemibiotrophic lifestyle. *Genome Biology* 14.
- Kamoun S, Young M, Glascock CB, Tyler BM. 1993. Extracellular protein elicitors from *Phytophthora* - host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 15–25.
- Kawamura Y, Hase S, Takenaka S, et al. 2009. INF1 elicitor activates jasmonic acid- and ethylene-mediated signalling pathways and induces resistance to bacterial wilt disease in tomato. *Journal of Phytopathology* 157: 287–297.
- Kim YS, Choi D, Lee MM, Lee SH, Kim WT. 1998. Biotic and abiotic stress-related expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family in *Nicotiana glutinosa* L. *Plant and Cell Physiology* 39: 565–573.
- Koressaar T, Remm M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23: 1289–1291.
- Lebeda A, Reinink K. 1994. Histological characterization of resistance in *Lactuca-Saligna* to lettuce downy mildew (*Bremia-Lactucae*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44: 125–139.
- Lebeda A, Mieslerová B, Petrivalský M, et al. 2014. Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolyopersici*. *European Journal of Experimental Botany* 138: 569–596.
- Lherminier J, Benhamou N, Larrue J, et al. 2003. Cytological characterization of elicitor-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. *Phytopathology* 93: 1308–1319.
- Li GJ, Meng XZ, Wang RG, Mao GH, Han L, Liu YD, Zhang SQ. 2012. Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 8: e1002767.
- Lin T, Zhu GT, Zhang JH, et al. 2014. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics* 46: 1220–1226.
- Lincoln JE, Campbell AD, Oetiker J, et al. 1993. Le-Acs4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*) – Expression in *Escherichia coli*, structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis. *Journal of Biological Chemistry* 268: 19422–19430.
- Liu D, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA. 1994. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 1888–1892.
- Lopez-Kleine L, Pinzon A, Chaves D, Restrepo S, Riano-Pachon DM. 2013. Chromosome 10 in the tomato plant carries clusters of genes responsible for field resistance/defence to *Phytophthora infestans*. *Genomics* 101: 249–255.
- Luna E, van Hulten M, Zhang Y, et al. 2014. Plant perception of beta-aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase. *Nature Chemical Biology* 10: 450–456.
- Malá J, Machová P, Cvrčková H, et al. 2009. Micropropagation of wild service tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz): the regulative role of different aromatic cytokinins during organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 341–348.
- Menda N, Strickler SR, Edwards JD, et al. 2014. Analysis of wild-species introgressions in tomato inbreds uncovers ancestral origins. *BMC Plant Biology* 14.
- Mieslerová B, Lebeda A, Chetelat RT. 2000. Variation in response of wild *Lycopersicon* and *Solanum* spp. against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). *Journal of Phytopathology* 148: 303–311.
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56: 2907–2914.
- Oka Y, Cohen Y. 2001. Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL-beta-amino-N-butyric acid. *European Journal of Plant Pathology* 107: 219–227.
- Oldach KH, Becker D, Lorz H. 2001. Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 832–838.
- Picard K, Ponchet M, Blein JP, Rey P, Tirilly Y, Benhamou N. 2000. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiology* 124: 379–395.
- Piękna-Grochala J, Kępczyńska E. 2013. Induction of resistance against pathogens by beta-aminobutyric acid. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 1735–1748.
- Piterková J, Petrivalský M, Luhová L, Mieslerová B, Sedlářová M, Lebeda A. 2009. Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Molecular Plant Pathology* 10: 501–513.
- Piterková J, Hofman J, Mieslerová B, et al. 2011. Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp.–*Oidium neolyopersici* interactions. *Environmental and Experimental Botany* 74: 37–44.

- Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP, De Bolle MF. 2008.** Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 941–950.
- Shi HY, Zhang YX. 2014.** Expression and regulation of pear 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (PpACS1a) during fruit ripening, under salicylic acid and indole-3-acetic acid treatment, and in diseased fruit. *Molecular Biology Reports* **41**: 4147–4154.
- Siegrist J, Orober M, Buchenauer H. 2000.** β -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **56**: 95–106.
- Sim SC, Robbins MD, Van Deynze A, Michel AP, Francis DM. 2011.** Population structure and genetic differentiation associated with breeding history and selection in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Heredity* **106**: 927–935.
- Skottke KR, Yoon GM, Kieber JJ, DeLong A. 2011.** Protein phosphatase 2A controls ethylene biosynthesis by differentially regulating the turnover of ACC synthase isoforms. *PLoS Genetics* **7**: e1001370.
- Spoel SH, Dong X. 2012.** How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* **12**: 89–100.
- Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P, Lebeda A. 2006.** Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**: 22–32.
- Ton J, Jakab G, Toquin V, et al. 2005.** Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in arabidopsis. *The Plant Cell* **17**: 987–999.
- van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM. 2006.** Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* **11**: 184–191.
- Vleeshouwers VGA, Oliver RP. 2014.** Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 196–206.
- Worrall D, Holroyd GH, Moore JP, et al. 2012.** Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. *New Phytologist* **193**: 770–778.
- Wu CC, Singh P, Chen MC, Zimmerli L. 2010.** L-Glutamine inhibits beta-aminobutyric acid-induced stress resistance and priming in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **61**: 995–1002.
- Yim WJ, Kim KY, Lee YW, Sundaram SP, Lee Y, Sa TM. 2014.** Real time expression of ACC oxidase and PR-protein genes mediated by *Methylobacterium* spp. in tomato plants challenged with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Plant Physiology* **171**: 1064–1075.
- Zhu BL, Chen THH, Li PH. 1996.** Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and anti-sense genes for an osmotin-like protein. *Planta* **198**: 70–77.
- Zimmerli L, Metraux JP, Mauch-Mani B. 2001.** β -Aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **126**: 517–23.

2.2.2 Studium vlivu elicitinu β -kryptogeinu a jeho mutantních forem na signální dráhy rostlin *Solanum* spp.

Cílem druhého navazujícího dílčího projektu disertační práce bylo studium vlivu β -CRY a jeho mutantních forem na schopnost aktivace obranných mechanismů projevující se v následné reakci na infekci biotrofním patogenem *P. neolycopersici* u tří genotypů *Solanum* spp. lišících se rezistencí k tomuto patogenu: *S. lycopersicum* cv. Amateur (vysoce náchylný), *S. chmielewskii* (LA 2663, středně rezistentní) a *S. habrochaites* f. glabratum (LA 2128, vysoce rezistentní). Dosažené výsledky byly publikovány v článku „The elicitin β -cryptogein's activity in tomato is mediated by jasmonic acid and ethylene signalling pathways independently of elicitin-sterol interactions“ v časopise *Planta* v roce 2019, který tvoří *Přílohu 3*. Studie navázala na již publikované práce zaměřené jednak na charakterizaci vlivu kyselých α -elicitinů INF1 a oligandrinu sekretované *P. infestans* a *P. oligandrum* na rostliny rajčete (Picard *et al.*, 2000; Takenaka *et al.*, 2006; Kawamura *et al.*, 2009; Ouyang *et al.*, 2015; Satková *et al.*, 2017) a na výsledky studií na tabáku prokazující schopnost bazického β -CRY indukovat HR vedoucí k buněčné smrti a zvyšování rezistence rostlin na následující infekce silněji než kyselý elicitin INF1 (Ponchet *et al.*, 1999).

V rámci řešení disertační práce byly v experimentech použity mutantní formy β -CRY s mutací cílenou do hydrofobní kavity (Dokládál *et al.*, 2012). Jedná se o mutantní formu V84F, která není schopna vázat do své struktury steroly a mutantní formu L41F, u níž je znemožněna interakce s potenciálním receptorem na plazmatické membráně buněk tabáku.

Cílem práce bylo odhalit obranné mechanismy aktivované působením elicitinů, které se mohou podílet na zvýšení rezistence rajčat. Zaměřili jsme se na reakce na úrovni produkce ROS, aktivace obranných genů kódujících PR proteiny a zapojení signálních drah rostlinných hormonů.

V rámci studie byl jednoznačně prokázán pozitivní efekt β -CRY a jeho mutantní formy V84F na zvýšení rezistence proti biotrofnímu patogenu *P. neolycopersici* u genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* vykazujících určitý stupeň bazální rezistence na daný patogen. V případě vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur rezistenci aktivovala pouze mutantní forma elicitinu V84F (*Příloha 3 – Obr. 3*). Po aplikaci β -CRY a jeho mutantních forem V84F i L41F nebyly pozorovány signifikantní změny intenzity procesu vedoucího k buněčné smrti u žádného ze studovaných genotypů rajčete. Po aplikaci 100 nM β -CRY a jeho mutantní formy V84F nebyla pozorována HR spojená s nekrózou, která je charakteristickým znakem při aplikaci β -CRY na listy tabáku (Dokládál *et al.*, 2012) (*Příloha 3 – Obr. 1*). Na rozdíl od působení bazického elicitinu β -CRY na tabák a brambor, β -CRY, podobně jako kyselý elicitin INF1 (Kawamura *et al.*, 2009) nebo oligandrin (Satková *et al.*, 2017) u rajčat nespouští HR.

Se schopností β -CRY a jeho mutantní formy V84F zvýšit rezistenci na biotrofní patogen *P. neolycopersici* koreluje schopnost zvyšovat hladinu ROS (Příloha 3 – Obr. 2). V případě β -CRY s mutací L41F, který nevykazoval signifikantní vliv na vývoj patogena u žádného genotypu rajčete, nebyly nalezeny změny v hladině ROS. Významná role ROS v obranných mechanismech rajčat při infekci patogenem *P. neolycopersici* byla prokázána v rámci dříve publikované histochemické studie (Tománková *et al.*, 2006). U rezistentních genotypů *S. chmielewskii* a zejména *S. habrochaites* vlivem β -CRY a jeho mutantní formy V84F došlo k nárůstu hladiny peroxidu vodíku i superoxidového anionradikálu. U těchto genotypů produkce peroxidu vodíku korespondovala s vyšší aktivitou cytosolické guajakolperoxidasy (GPOX) a APX, které byly naměřeny 48 hod po infiltraci β -CRY a jeho mutantní formy V84F do listů, přičemž účinek mutantní formy V84F na zvýšení GPOX a APX byl významně vyšší oproti β -CRY. Variabilita schopnosti testovaných elicitinů spouštět produkci ROS a podílet se na zvýšení rezistence rostlin na biotrofní patogen *P. neolycopersici* je úzce spojena s rezistentními vlastnostmi jednotlivých studovaných genotypů *Solanum* spp. a je v souladu s již publikovanými výsledky (Tománková *et al.*, 2006).

Vedle změn v produkci ROS souvisí vliv elicitinů na úroveň rezistence i se změnami v hladinách transkriptů vybraných PR genů, u kterých se předpokládá zapojení v odpovědi na biotické stresové faktory u rajčete. V naší studii byly u středně a vysoce rezistentního genotypu v bazálním stavu rostlin, tedy bez vystavení stresovým faktorům, zjištěny vyšší hladiny transkriptů *GLU2* a *HEV2* v porovnání s náchylným genotypem *S. lycopersicum* cv. Amateur a naopak nižší hladiny transkriptů *DEF2*, *P1* a *P6*. β -CRY a zejména mutantní forma V84F zvýšily hladiny většiny měřených transkriptů (Příloha 3 – Obr. 4). Největší efekt byl pozorovaný u genotypu *S. chmielewskii*. Diametrálně odlišný vliv byl pozorován po aplikaci mutantní formy L41F, která naopak významně snížila hladinu pouze transkriptu *P3* u všech genotypů a *P6* u *S. habrochaites*. Z výsledků je patrné, že v mechanismu rezistence u rajčete můžeme považovat za důležité geny *GLU2*, *GLU3*, *GLUCO5*, *HEV2*, *OSM4*, *P3*, z nichž většina je lokalizována na chromozomech 1 a 8 v oblastech QTL pro rezistenci na infekci *P. infestans* (Foolad, 2007). Významné zvýšení hladiny transkriptů obranných genů po aplikaci mutantní formy V84F a naopak snížení hladiny transkriptů některých genů při působení formy L41F se zdá být spojeno se schopností elicitinu zachycovat steroly z plazmatické membrány, což souvisí se změnami její fluidity (Sandor *et al.*, 2016), jak bylo pozorováno dříve také v rostlinách tabáku (Dokládál *et al.*, 2012). Významně snížená aktivita mutantní formy L41F odpovídá předchozím výsledkům realizovaných na rostlinách tabáku, kdy byla jeho interakce s vysokoafinitním vazebným místem na plazmatické membráně oslabena nebo eliminována (Dokládál *et al.*, 2012).

Vlivem β -CRY jsme v rostlinách studovaných genotypů rajčete nezaznamenali žádnou indukci HR nebo buněčné smrti a ani hromadění volné SA nebo její glykosylované formy. V souladu s dřívějšími studiemi na rajčatech (Kawamura *et al.*, 2009; Satková *et al.*, 2017) jsme

však prokázali aktivaci biosyntézy a signálních drah ET a JA (Příloha 3 – Obr. 5a). Aktivace dráhy ET byla potvrzena jednak nalezením zvýšené hladiny transkriptů pro ACCsynthasu (ACS2), což je klíčový enzym regulace biosyntézy ET, a ACCoxidasu (ACO4-LIKE). Dále byla detekována zvýšená produkce ET a v promotorové oblasti většiny genů, u kterých byla naměřena vyšší hladina transkriptů po aplikaci β -CRY a mutantní formy V84F, byla detekována přítomnost vazebného místa pro transkripční faktor ERELEE4 obsahující tzv. ET-responzivní prvek (ET-responsive element). Současně byla pozorována snižující se hladina konjugátu SAG a zároveň zvyšující se hladina volné JA a především konjugátu JA-Ile (Příloha 3 – Obr. 5b). V případě tabáku naopak β -CRY aktivuje HR a expresi PR genů v signálních drahách SA a JA (Kawamura *et al.*, 2009).

Již dříve byla u rostlin a suspenzních buněčných kultur tabáku popsána po přidání elicitinů aktivace MAPK MPK3/WIPK (wound-induced protein kinase, proteinkinasa indukovaná poraněním) prostřednictvím mechanismu nezávislém na ROS (Sharma *et al.*, 2003). Umlčení MPK3 u tabáku má za následek snížení rezistence aktivované elicitinem bez vlivu na HR (Xu *et al.*, 2014). V naší studii β -CRY aktivoval fosforylaci MPK3 u *S. chmielewskii* (Příloha 3 – Obr. 5c). Pozorovaná aktivace fosforylace MPK3 je spojena s regulací transkripčního faktoru WRKY33, který aktivuje transkripci ACS2 (Skottke *et al.*, 2011) pozorovanou v naší studii.

Protein ELR (elicitin response protein, receptor-like protein) nacházející se na plazmatické membráně, byl nedávno popsán jako potenciální kandidát na receptor elicitinů, který zprostředkovává odpovědi na elicitiny u divokého genotypu brambory *Solanum tuberosum*. Genom rajčete a tabáku obsahuje několik ortologů ELR, zatímco žádné ELR ortology zprostředkující odpověď na elicitiny nebyly v kulturních genotypech brambor dosud nalezeny (Du *et al.*, 2015). Neúčinnost mutantní formy L41F vyvolat rezistenci naznačuje spolu s výsledky dřívějších experimentů (Ponchet *et al.*, 1999), že podobný mechanismus rozpoznávání elicitinu může fungovat v celé čeledi *Solanaceae*. Tato hypotéza je dále podpořena neschopností mutantní formy L41F vyvolat rezistenci. Aminokyselinový zbytek L41 je mezi elicitiny vysoce konzervovaný a nachází se ve strukturně důležité oblasti ω -smyčky, o které se předpokládá, že hraje roli v interakci s receptorem na plazmatické membráně (Lochman *et al.*, 2005; Dokládal *et al.*, 2012). V této souvislosti také rozdílná aktivita V84F může souviset s modifikovanou interakcí s receptorem, protože sterol-vazebná aktivita je ovlivněna konformačními změnami v oblasti ω -smyčky, která je nezbytná pro spouštění časných odpovědí způsobených β -CRY na buňkách tabáku (Lochman *et al.*, 2005).

Závěrem lze shrnout, že aplikace bazického elicitinu β -CRY zvyšuje rezistenci k biotrofnímu patogenu *P. neolycopersici* u genotypů *Solanum* spp., přičemž rozsah zvýšení rezistence je závislý na daném genotypu rajčete. Aktivace obranných mechanismů mutantní formou elicitinu β -CRY V84F ukazuje, že pro elicitinový efekt proteinu není nutná schopnost vazby sterolů. Prokázáním aktivace ET/JA signální dráhy spouštějící obranné mechanismy po ošetření rostlin rajčat β -CRY

jsme poukázali na významný rozdíl v typu signální dráhy, kterou β -CRY spouští u různých rostlinných druhů, kde např. v tabáku β -CRY aktivuje SA signální dráhu (Keller *et al.*, 1996b). V obranném mechanismu po elicitaci β -CRY hrají důležitou roli ROS, jejichž zvýšená hladina u rostlin rajčat je přechodná a není spojená s HR jako u rostlin tabáku nebo brambory. Aktivace obranných mechanismů po elicitaci β -CRY a jeho mutantní formou V84F byla potvrzena transkripční studií prokazující zvýšenou transkripci obranných genů kódující tzv. PR proteiny. Mutantní forma L41F, u které byla prokázána velmi malá nebo žádná interakce s vysoce afinitním místem na plazmatické membráně suspenzních buněk tabáku (Dokládal *et al.*, 2012) není ani u rostlin rajčat schopna aktivovat obranné mechanismy. Stejně jako u tabáku i u rajčat se elicitory chovají jako typické MAMP. Výsledky studií s mutantní formou β -CRY L41F a prokázána přítomnost několika ELR ortologů v rajčatovém a tabákovém genomu (Du *et al.*, 2015) poukazují na možnou existenci podobných mechanismů rozpoznávání elicitorů v rámci čeledi *Solanaceae*.

PŘÍLOHA 3

The elicitor β -cryptogein's activity in tomato is mediated by jasmonic acid and ethylene signalling pathways independently of elicitor-sterol interactions

Tomáš Starý, Pavla Satková, Jana Piterková, Barbora Mieslerová, Lenka Luhová,
Jaromír Mikulík, Tomáš Kašparovský, Marek Petřivalský, Jan Lochman

Planta 249 (3), 739-749 (2019)



The elicitor β -cryptogein's activity in tomato is mediated by jasmonic acid and ethylene signalling pathways independently of elicitor–sterol interactions

Tomáš Starý¹ · Pavla Satková² · Jana Píterková² · Barbora Mieslerová³ · Lenka Luhová² · Jaromír Mikulík⁴ · Tomáš Kašparovský¹ · Marek Petřivalský² · Jan Lochman¹

Received: 7 August 2018 / Accepted: 24 October 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Main conclusion The level of resistance induced in different tomato genotypes after β -CRY treatment correlated with the upregulation of defence genes, but not sterol binding and involved ethylene and jasmonic acid signalling.

Elicitins, a family of small proteins secreted by *Phytophthora* and *Pythium* spp., are the most well-known microbe-associated molecular patterns of oomycetes, a lineage of fungus-like organisms that include many economically significant crop pathogens. The responses of tomato plants to elicitor INF1 produced by *Phytophthora infestans* have been studied extensively. Here, we present studies on the responses of three tomato genotypes to β -cryptogein (β -CRY), a potent elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea* that induces hypersensitive response (HR) cell death in tobacco plants and confers greater resistance to oomycete infection than acidic elicitors like INF1. We also studied β -CRY mutants impaired in sterol binding (Val84Phe) and interaction with the binding site on tobacco plasma membrane (Leu41Phe), because sterol binding was suggested to be important in INF1-induced resistance. Treatment with β -CRY or the Val84Phe mutant induced resistance to powdery mildew caused by the pathogen *Pseudoidium neolyopersici*, but not the HR cell death observed in tobacco and potato plants. The level of resistance induced in different tomato genotypes correlated with the upregulation of defence genes including defensins, β -1,3-glucanases, heveins, chitinases, osmotins, and PR1 proteins. Treatment with the Leu41Phe mutant did not induce this upregulation, suggesting similar elicitor recognition in tomato and tobacco. However, here β -CRY activated ethylene and jasmonic acid signalling, but not salicylic acid signalling, demonstrating that elicitors activate different downstream signalling processes in different plant species. This could potentially be exploited to enhance the resistance of *Phytophthora*-susceptible crops.

Keywords Defence-related genes · Elicitors · *Pseudoidium neolyopersici* · Resistance · Signalling · Sterol binding

Abbreviations

| | |
|--------------|--------------------------|
| β -CRY | β -Cryptogein |
| HR | Hypersensitive response |
| JA | Jasmonic acid |
| JA–Ile | Jasmonic acid–isoleucine |
| SA | Salicylic acid |

Tomáš Starý and Pavla Satková contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00425-018-3036-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jan Lochman
lochik@mail.muni.cz

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 61137 Brno, Czech Republic

² Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

³ Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

⁴ Laboratory of Growth Regulators, Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Institute of Experimental Botany ASCR, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

Introduction

Plants are routinely exposed to a wide range of adverse environmental factors that affect their growth and development. Among the most important of these factors are pathogenic microorganisms. The oomycetes are a distinct class of fungus-like eukaryotic microbes that include many economically significant crop pathogens, represented mainly by the genus *Phytophthora*. Small proteinaceous elicitors known as elicitins have been isolated from culture filtrates of *Phytophthora* and *Pythium* (Ponchet et al. 1999) and were shown to belong to a family of conserved lipid transfer proteins with sterol-binding and elicitor activity. They are among the most well-known microbe-associated molecular patterns (MAMPs) of oomycetes and induce a hypersensitive response (HR) in several plants including *Nicotiana* species and some radish and rape cultivars (Ricci et al. 1989; Kamoun et al. 1997; Ponchet et al. 1999). Depending on their pI values, elicitins may be either acidic (α , pI < 7) or basic (β , pI > 7), with basic elicitors generally being more strongly necrotising and capable of inducing systemic resistance in plants.

β -Cryptogein (β -CRY), a member of the β -elicitin family produced by the oomycete *P. cryptogea*, is one of the most extensively characterised elicitors. It induces a strong hypersensitive response in tobacco, which plays a key role in the establishment of effective resistance to oomycete infection (Keller et al. 1996a). β -CRY contains six lysine residues and has a unique elicitor fold consisting of five α -helices, one β -sheet, and one ω -loop, which is believed to be important in interactions with a high-affinity binding site on the plasma membrane of host plant cells (Boissy et al. 1996; Lochman et al. 2005; Dokládal et al. 2012; Du et al. 2015) and potentially for recently described elicitor receptor protein (ELR) detected in wild-type potato only so far (Du et al. 2015). Inside the protein core there is a hydrophobic cavity able to accommodate fatty acids and sterols (Mikes et al. 1997; Dobes et al. 2004). To clarify the role of sterol and fatty acid binding in the induction of resistance (Osman et al. 2001), a set of β -CRY variants with mutations targeting this hydrophobic cavity was prepared (Dokládal et al. 2012). Studies on these mutants suggested that sterol binding is not essential for elicitor activity. However, unexpectedly, the Leu41Phe mutation, which replaces a small leucine residue with a large hydrophobic phenylalanine residue, changed the protein's interaction with the high-affinity binding site on the plasma membrane. A recent study by Sandor et al. (2016) suggested that the only consequence of the elicitors' sterol-trapping activity is an increase in ROS production associated with an increase in the fluidity of the plasma membrane in tobacco cells.

In contrast to its activity in tobacco plants, elicitor INF1 does not induce hypersensitive cell death responses in tomato plants, and elicitors were therefore initially considered non-reactive in tomatoes (Ponchet et al. 1999). However, treatment of different tomato genotypes with the acidic elicitor INF1 (secreted by *P. infestans*) or the pythium oligandrin (secreted by *P. oligandrum*) induced resistance against *Phytophthora* spp., bacterial wilt disease, and powdery mildew (Picard et al. 2000; Benhamou et al. 2001; Kawamura et al. 2009; Satková et al. 2016). This resistance was accompanied by increased expression of pathogenesis-related proteins via a process that was suggested to involve activation of ethylene- and JA-mediated signalling pathways, in contrast to the salicylic acid signalling observed in tobacco (Keller et al. 1996b; Kawamura et al. 2009; Satková et al. 2016).

Here, we analyse the ability of basic elicitors, represented by β -CRY, to induce defence responses and resistance to powdery mildew in three tomato genotypes with different basal resistance levels. Moreover, to correlate the observed responses with the elicitors' sterol-binding activity, which was suggested to be important for the induction of enhanced resistance in tomato plants by the elicitor INF1 (Kawamura et al. 2009), we examined two well-defined β -CRY mutants deficient in sterol binding (Val84Phe) and receptor interaction (Leu41Phe). β -CRY induced a defence response and resistance to powdery mildew without HR cell death, in a manner similar to the elicitor INF1 and the pythium oligandrin. Surprisingly, the Val84Phe mutant induced a more intense response than wild-type β -CRY. However, as also observed in tobacco, the Leu41Phe mutant induced no detectable response in tomato, suggesting that the mechanism of receptor recognition is similar in both species.

Materials and methods

Plant material

Three *Solanum* spp. genotypes with different levels of resistance to *Pseudoidium neolycopersici* (Mieslerová et al. 2001) were used: *S. lycopersicum* cv. Amateur (highly susceptible), *S. chmielewskii* (LA 2663) (moderately resistant) and *S. habrochaites* f. *glabratum* (LA 2128) (highly resistant). Seeds provided by the Department of Botany (Faculty of Science, Palacký University) were sown on moistened Perlite (Agroperlite, Nový Jičín, Czech Republic), and seedlings were transferred to a garden soil–peat mixture (2:1, v/v) in plastic pots of 7 cm diameter. Plants were grown in a growth chamber with a 12-h photoperiod under a light intensity of 100 mmol m⁻² and a day/night temperature of 20/18 °C. Leaf discs were prepared using samples from plants aged approximately 8 weeks.

Isolation of elicitors

Wild-type β -CRY and its mutants (Val84Phe; Leu41Phe) were expressed using the vector pPIC9 containing the β -CRY (wild type or mutated forms) from *Phytophthora cryptogea* with an added N-terminal Gly residue to facilitate post-transcriptional processing. The constructed vectors were transformed into *Pichia pastoris* strain GS115. Screening for optimal protein production was performed, and the most suitable strain in each case was cultivated in a Biostat B-DCU bioreactor (Sartorius, Göttingen, Germany) using a previously described protocol (Uhlíková et al. 2016). After cultivation, the expressed protein was concentrated by ultrafiltration (with a 3 kDa cutoff) and purified by fast protein liquid chromatography using a Source S15 ion-exchange column (GE Healthcare). The molecular weights of the purified proteins were confirmed by MALDI-TOF spectroscopy. Proteins were quantified by BCA Protein Assay Kit (Sigma) and used at a final concentration of 100 nmol l⁻¹.

Leaf disc inoculation and *Pseudoidium neolycopersici* phytoprotection test

Leaf discs (12 mm in diameter) were cut with a cork borer from the fourth true leaves of tomato plants and placed adaxial side up on filter paper in Petri dishes (16 discs per dish) containing 7.5 ml of distilled water (control) or solutions of β -CRY, or one of the β -CRY mutants (Val84Phe or Leu41Phe) at 100 nmol l⁻¹ concentrations. After 24 h, the upper side of each leaf disc was inoculated by surface contact (dusting/tapping) using leaves of tomato cv. Amateur that had 80–100% surface coverage of fresh sporulating mycelium of tomato powdery mildew *Pseudoidium neolycopersici* Kiss (isolate C-2) from the Czech National Collection of Microorganisms UPOC (Olomouc) (Mieslerová et al. 2001). The average number of powdery mildew conidia delivered to leaf discs was 65 ± 15 per mm². After inoculation, the Petri dishes containing the leaf discs were placed in a growth chamber at 20/18 °C with a 12 h photoperiod (light/dark).

At 48 h post-inoculation (hpi), four leaf discs were removed from each Petri dish, cleared by immersion in glacial acetic acid for 48 h, mounted in glycerol, and inspected using a light microscope Olympus BX50 (Piterková et al. 2011). Pathogen structures were stained with 1% Evans blue. Germination of conidia was measured as the number of conidia producing germ tubes per 100 conidia counted for each leaf disc. Fungal development was evaluated in terms of the number of germ tubes per conidium at 48 hpi and the length of the germ tubes (separate measurements were performed for the 1st tubes, which have lobed appressoria, and the 2nd and 3rd tubes, which have

nipple-shaped appressoria). A minimum of 120 conidia were observed per tomato genotype and experimental setting (Piterková et al. 2011).

Semiquantitative determination of O₂⁻ and H₂O₂ in situ

H₂O₂ and O₂⁻ accumulation were determined using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and nitroblue tetrazolium (NBT) staining, respectively, 48 h after treatment of *Solanum* spp. leaves (*S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* and *S. chmielewskii*) with 100 nmol l⁻¹ β -CRY and its mutant Val84Phe (V84F). Detached leaflets from plants subjected to treatments with respective proteins were immersed in a 10 mmol l⁻¹ potassium phosphate buffer (pH 7.8) containing 0.1% NBT and 10 mmol l⁻¹ sodium azide or 1 mg ml⁻¹ of DAB. Leaflets were vacuum infiltrated as described above during 5 min, incubated for 2 h in the dark (without vacuum) and then immersed in destaining solution (ethanol: lactic acid: glycerol, 4:1:1, by vol.) for 20 min at 80 °C to completely eliminate the chlorophyll. Leaflets of plants that received no treatment were also infiltrated with 10 mmol l⁻¹ potassium phosphate buffer (pH 7.8) and used as a control.

Enzyme activity assays

Detached tomato leaves were homogenised on ice in 0.1 mol l⁻¹ K-phosphate buffer, pH 7.0, containing 1% polyvinyl pyrrolidone (PVPP) in ratio 1:4 (w/v), 2 mmol l⁻¹ DTT, 0.5 mmol l⁻¹ Pefabloc[®] SC (Sigma-Aldrich) and 2 mmol l⁻¹ EDTA. For the APX assay, the homogenisation buffer contained 2 mmol l⁻¹ ascorbate. After the centrifugation (20,000g, 20 min, 4 °C) the supernatant was collected for enzyme activity assay. APX activity was determined in microplate reader according to Tománková et al. (2006) by following the ascorbate oxidation for 3 min at 290 nm and 25 °C in a 250 μ l of reaction mixture containing 50 mmol l⁻¹ K-phosphate buffer, pH 7.0, 15 μ l of crude extract and 1.0 mmol l⁻¹ ascorbate. The reaction was started by the addition of hydrogen peroxide (final concentration 1.5 mmol l⁻¹). Guaiacol peroxidase (GPOX) activity was measured by the method of Tománková et al. (2006) in a microplate reader. The total volume 175 μ l of the reaction mixture contained 0.1 mol l⁻¹ K-phosphate buffer, pH 7, 15 mmol l⁻¹ guaiacol and 10 μ l of crude extract. The reaction was started by addition of hydrogen peroxide (final concentration 5 mmol l⁻¹). Formation of coloured product ($A = 436$ nm) was followed continuously for 2 min at 25 °C.

Quantification of defence gene expression

The levels of gene transcripts were determined by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) using the intercalating dye SYBR-Green and a Light Cycler 480 instrument (Roche). Total RNA was isolated from 100 mg of leaf tissue using the TRI reagent (Sigma-Aldrich) and purified using the RapidOut DNA Removal Kit (ThermoFisher Scientific). Reverse transcriptase reactions were performed using an ImProm-II reverse transcription system (Promega) with 0.4 µg of total RNA in a volume of 20 µl according to the manufacturer's instructions. cDNA was amplified by qPCR using gene-specific primers (Supplement Table S1) and the GoTaq qPCR Master Mix (Promega) according to the manufacturer's instructions. PCR amplification was carried out as follows: 45 cycles of DNA denaturation at 95 °C for 20 s, then annealing and extension at 60 °C for 40 s. Three replicates were analysed for each sample. The transcript level of each gene was normalised against those of elongation factor 1 α (*EF-1 α*) and TIP41-like family protein (*Tip41*) gene by the FitPoint method to evaluate the genes' expression relative to endogenous controls. It has been established that the expression of *EF1- α* and *TIP41* is not influenced by different stress conditions (Nicot et al. 2005; Exposito-Rodriguez et al. 2008).

Quantitative analysis of salicylic acid, jasmonic acid and jasmonic acid–isoleucine

Analyses of salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and jasmonic acid–isoleucine (JA–Ile) were performed as previously described in the literature (Segarra et al. 2006). Briefly, 24 h after β -CRY treatment, the tomato leaves were collected and quick-frozen in liquid nitrogen. Frozen samples were then ground under liquid nitrogen with a mortar and pestle. A 100 mg sample of the resulting powder was extracted with 750 µl MeOH–H₂O–HOAc (90:9:1, by vol.), and 100 ng of *o*-anisic acid as internal standard was added. Samples were centrifuged for 1 min at 10,000g, the supernatant was collected, and the extraction was repeated. Pooled supernatants were dried under nitrogen, resuspended in 200 µl of 0.1% HOAc in H₂O–MeOH (90:10, v/v), and finally filtered with a Millex Samplcity™ 0.20 µm filter from Millipore.

LC–MS analyses were performed with the TOF mass spectrometer (Agilent Technologies) equipped with a dual ESI ion source operated in negative ionisation mode was used for qualitative and quantitative analysis. TOF–MS was online coupled with a high-performance liquid chromatography (LC) system (Agilent Technologies). The drying gas temperature was set to 325 °C, the drying gas flow to 10 l min⁻¹, the nebuliser pressure to 35 psi, the VCap voltage to 4000 V, the fragmentor voltage to 200 V, the skimmer

voltage to 65 V, and the Octopole RF Peak voltage to 750 V. Chromatographic separation was carried out onto Zorbax Extend-C18 column (2.1 × 50 mm, 1.8 µm, Agilent). The LC mobile phases were (A) 0.1% acetic acid in water and (B) methanol. A linear gradient profile with the following proportions (v/v) of solvent B was applied [*t* (min), %B]: (0, 15), (10, 100), (15, 100) with 5 min for re-equilibration. The injection volume was 5 µl and the flow rate was 0.2 ml min⁻¹. Retention times in these conditions were 5.5 min for SA, 11.1 min for JA and 12.9 for JA–Ile. The spectra generated for both compounds in negative ion detection gave the deprotonated molecule [M–H] (*m/z* 137.024 for SA, *m/z* 209.121 for JA, and *m/z* 322.202 for JA–Ile). Acquisition was done by monitoring the 137.024 *m/z* (quantifier) 93.032 *m/z* qualifier, 209.121 *m/z* quantifier, 210.121 *m/z* qualifier and 322.202 *m/z* (quantifier), 209.117 *m/z* qualifier for SA, JA and JA–Ile, respectively.

Analysis of ethylene production

Analysis was performed using a gas chromatography-flame ionisation detector as described previously (Malá et al. 2009). Briefly, 1 ml of air was removed from each test tube containing previously weighed whole tomato leaves and analysed using an Agilent GC 6890 (Agilent Technologies) equipped with a flame ionisation detector and 50-m capillary column (HP-AL/S stationary phase, 15 µm, i.d. = 0.535). The injection temperature was set to 200 °C, oven temperature to 40 °C, and detector temperature to 220 °C. The measurements were conducted four times from four different test tubes of each variant. The final concentrations were calculated from the calibration curve and adjusted to vial volume and 1 g of fresh weight.

Immunoblot analysis

Triplicate protein samples collected from leaf discs treated with H₂O (control) and β -CRY at 0, 2 and 4 hpi were used for Western-blot analysis. Protein samples were separated by SDS-PAGE on 12% (w/v) polyacrylamide and then transferred to an Immobilon-P PVDF membrane (Merck). Membranes were stained with Ponceau S to verify equivalent protein loading and then incubated in TBS-T buffer containing 5% bovine serum albumin for 1 h at room temperature. Total MAPKs and phosphorylated MAPKs were detected by overnight incubation at 4 °C with antibodies raised against the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2; Cell Signaling Technology) or antibodies raised against phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2; Cell Signaling Technology) at 1:2000 dilution in the blocking buffer, respectively. Membranes were then washed three times with the blocking buffer for 10 min and incubated at room temperature for 1 h with a horseradish peroxidase-conjugated

anti-rabbit secondary antibody (Cell Signaling Technology) at 1:2000 dilution in the blocking buffer. Finally, the membranes were washed three times with the blocking buffer and chemiluminescence detection was performed with the chemiluminescent substrate Luminata Crescendo (Merck) using a Typhoon 9410 scanner (GE Healthcare). The signal intensities of the 45 band (corresponding to the tomato MPK3 protein) were quantified using the Quantity One 4.6.1 program (Bio-Rad) and expressed as normalised (pixel) intensities relative to that of the RuBisCO large subunit. Significant differences between treatments ($P=0.05$) were identified using the Student's t test.

Results

Response of tomato to β -elicitin cryptogein and its mutants

Previous investigations into the effects of elicitors on tomato leaves used a direct infiltration strategy to explore the proteins' ability to induce responses. By contrast, in this work, we simply soaked the tomato leaf discs in 100 nmol l⁻¹ solutions of β -CRY to verify that basic elicitors can be transported or otherwise moved within leaves because systemic resistance induced by elicitors derives from their presence mediated by systemic movement across the plants (Keller et al. 1996b; Uhlíková et al. 2016). To determine the effects of different tomato genotypes and the sterol-binding properties of elicitors on the induction of resistance, we selected well-characterised highly susceptible domesticated inbred cultivar *S. lycopersicum* cv. *Amateur* together with *S. chmielewskii* and *S. habrochaites* exhibiting moderate and high non-specific resistance (Mieslerová et al. 2005), respectively, and

two previously described β -CRY mutants with impaired sterol binding (Val84Phe) and interaction with the binding site on the tobacco plasma membrane (Leu41Phe) (Dokládál et al. 2012). However, after 2 days of soaking tomato leaf discs in solutions of β -CRY or its mutants, no significant changes of cell death intensity measured by Evans blue method were observed in any tomato genotype (Fig. 1a). Moreover, no HR necrosis appeared at the infiltration site of tomato leaves at 2 days after infiltration with 100 nmol l⁻¹ β -CRY or its mutants representing usual elicitor concentration inducing the HR cell death in tobacco leaves (Dokládál et al. 2012) (Fig. 1b). This demonstrates that like acidic elicitors (Kawamura et al. 2009) and pythins (Satková et al. 2016), basic elicitors do not trigger HR cell death in wild-type or inbred genotypes of tomato plants, in contrast to their effects on tobacco and potato plants. While Ouyang et al. (2015) did observe induction of necrotic symptoms after direct infiltration of pythin oligandrin into tomato leaves, the pythin concentration used by those authors (3 μ mol l⁻¹) was far higher than that typically used in experiments of this type.

Consequently, we examined the elicitors' response by the DAB staining of H₂O₂ accumulation and the NBT staining of O₂⁻ accumulation in treated leaves. Compared with *S. lycopersicum* cv. *Amateur*, the *S. chmielewskii* and especially *S. habrochaites* plants exhibited clearly increased DAB staining intensities in leaves treated with 100 nmol l⁻¹ β -CRY and Val84Phe mutant, reflecting increased levels of H₂O₂ accumulation (Fig. 2a). These genotypes also exhibited increased NBT intensities staining in β -CRY and Val84Phe mutant treated leaves compared with the *S. lycopersicum* cv. *Amateur* plants (Fig. 2b). In resistant genotypes, H₂O₂ production correlated with increased activity of cytosolic guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase (Fig. 2c).

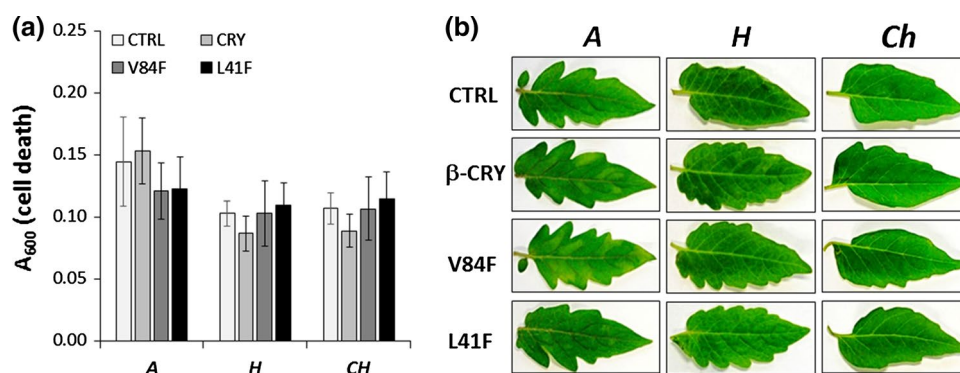


Fig. 1 Changes in cell death and phenotype of *Solanum* spp. leaves treated with β -cryptogein (β -CRY) and its mutants. **a** Evaluation of cell death by monitoring the uptake of Evans blue by leaf tissues of *Solanum* spp. [*S. lycopersicum* cv. *Amateur* (A), *S. habrochaites* (H) and *S. chmielewskii* (Ch)] treated with water (CTRL) and

100 nmol l⁻¹ β -CRY and its mutants Val84Phe (V84F) and Leu41Phe (L41F) ($n=6$). Uptake of vital dye was quantified by spectrophotometry. **b** The phenotype of *Solanum* spp. leaves that were treated with 100 nmol l⁻¹ β -CRY and its mutants

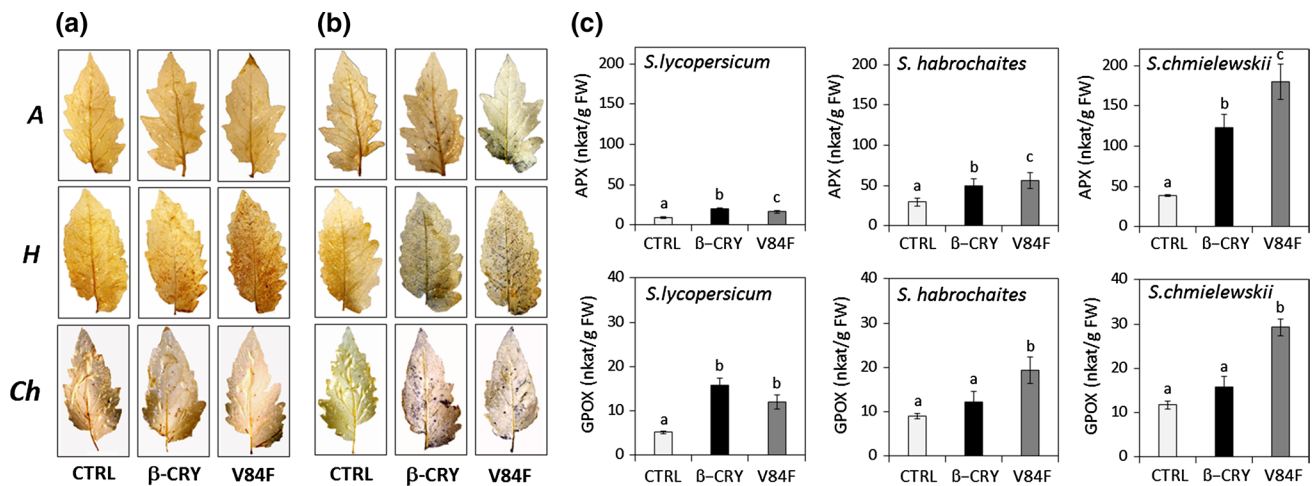


Fig. 2 Analysis of ROS accumulation and peroxidases activity in *Solanum* spp. [*S. lycopersicum* cv. Amateur (A), *S. habrochaites* (H) and *S. chmielewskii* (Ch)] leaves treated with β -cryptogein (β -CRY) and its mutants. H₂O₂ and O₂⁻ accumulation, as detected via DAB staining (a) and NBT staining (b), respectively. c Ascorbate and

soluble guaiacol peroxidase activities 48 h after treatment of *Solanum* spp. leaves with 100 nmol l⁻¹ β -CRY and its mutant Val84Phe (V84F) ($n=3$). The control tissue (CTRL) was a water-treated control sample. Each bar represents the mean \pm SD. Values labelled with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$) based on Student's *t* test

Modulation of plant resistance by elicitor pretreatment

To investigate potential modulation of plant immunity responses by β -CRY and its mutants, we exploited a well-established model pathosystem of three *Solanum* spp. genotypes differing in their resistance to the economically important biotrophic pathogen *P. neolycopersici*: susceptible *S. lycopersicum* cv. Amateur, the moderately resistant *S. chmielewskii* and highly resistant *S. habrochaites* (Mieslerová et al. 2001; Lebeda et al. 2014). Further, treatment of *S. lycopersicum* cv. Amateur plants with elicitin oligandrin at a concentration of 100 nmol l⁻¹ already resulted in induction of plant resistance against *P. neolycopersici* represented by changes in lengths of germination tubes and their representation (Satková et al. 2016). In keeping with previous findings using tomato leaf discs (Piterková et al. 2011), the wild genotypes *S. chmielewskii* and *S. habrochaites* exhibited moderate and high levels of basal resistance to powdery mildew infection, evaluated by decreased lengths of first, second and third germination tubes of developing pathogen at 48 h post-infection (hpi; Fig. 3a). Similarly, β -CRY and its mutants also decreased development of pathogen infection structures determined by the relative abundance of the first, second and third germination tubes (Fig. 3b). Treatment of leaf discs by wild type β -CRY reduced pathogen development only in the moderately and highly resistant genotypes *S. chmielewskii* and *S. habrochaites*, whereas the β -CRY Val84Phe mutant induced greater resistance to *P. neolycopersici* in all three genotypes including the susceptible genotype. This observation is probably related to a relatively limited upregulation of defence

genes by wild-type β -CRY compared to that induced by the Val84Phe mutant. Treatment with the Leu41Phe mutant had no significant effect on pathogen development in all studied tomato genotypes (Fig. 3), in accordance with the transcriptomic data.

Expression of defence-related genes in tomato treated with β -cryptogein and its mutants

Next, we measured the transcript levels of selected pathogenesis-related (PR) genes whose expression was shown to increase in tomato leaves treated with elicitors (Kawamura et al. 2009; Satková et al. 2016). As previously (Satková et al. 2016), we observed significant differences in the basal levels of individual transcripts between the mock treatments of studied tomato genotypes when in both, moderate and highly resistant genotype, only *Glu2* and *Hev2* transcripts showed an upregulation compared to *S. lycopersicum* cv. Amateur, while *Def2*, *P1* and *P6* transcripts were downregulated (Fig. 4a). Treatment of leaf discs with β -CRY and the Val84Phe mutant upregulated most of measured transcripts, with the magnitude of the accumulation depending on the tomato genotype (Fig. 4b). Conversely, the Leu41Phe mutant induced almost no detectable upregulation in any of the studied genotypes (Fig. 4b), but induced a downregulation of *P3* gene and genes involved in ethylene production (Fig. 4b). Since the basal expression levels are highly different from one genotype to the other, we also related transcript levels of moderate and highly resistant genotypes after treatment to that of susceptible genotype *S. lycopersicum* cv. Amateur. Based on this comparison, an

Fig. 3 Resistance to *Pseudoidium neolycopersici* in tomato plants induced by β -cryptogein (β -CRY) and its mutants. Pathogen germ tube lengths (a) and the relative extent of pathogen developmental structures (b) were determined 24 h after inoculation with *P. neolycopersici* (isolate C-2) on leaf discs from 7-week-old tomato plants [*S. lycopersicum* cv. Amateur (A), *S. chmielewskii* (Ch) and *S. habrochaites* (H)] treated with elicitor β -CRY (100 nmol l⁻¹) and its mutants Val84Phe and Leu41Phe. Data are presented as mean \pm SE of three replicates from three independent experiments. Each replicate corresponds to eight inoculated areas on four leaves from one plant. Values labelled with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$) based on Student's *t* test

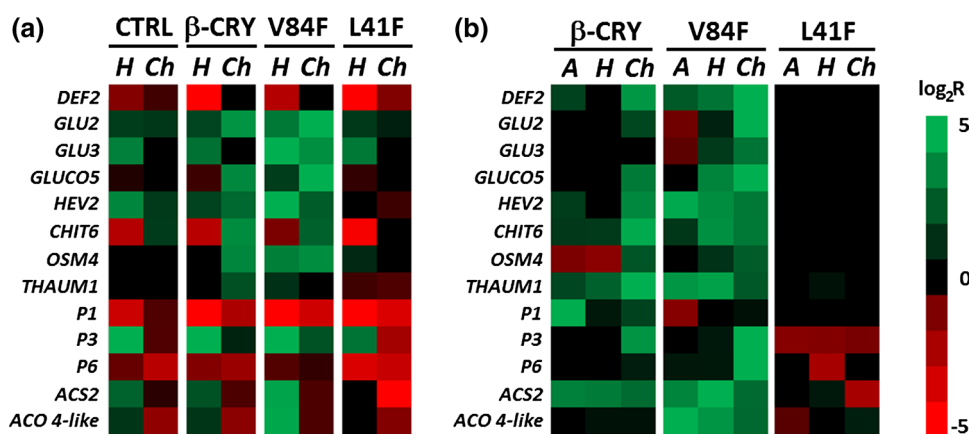
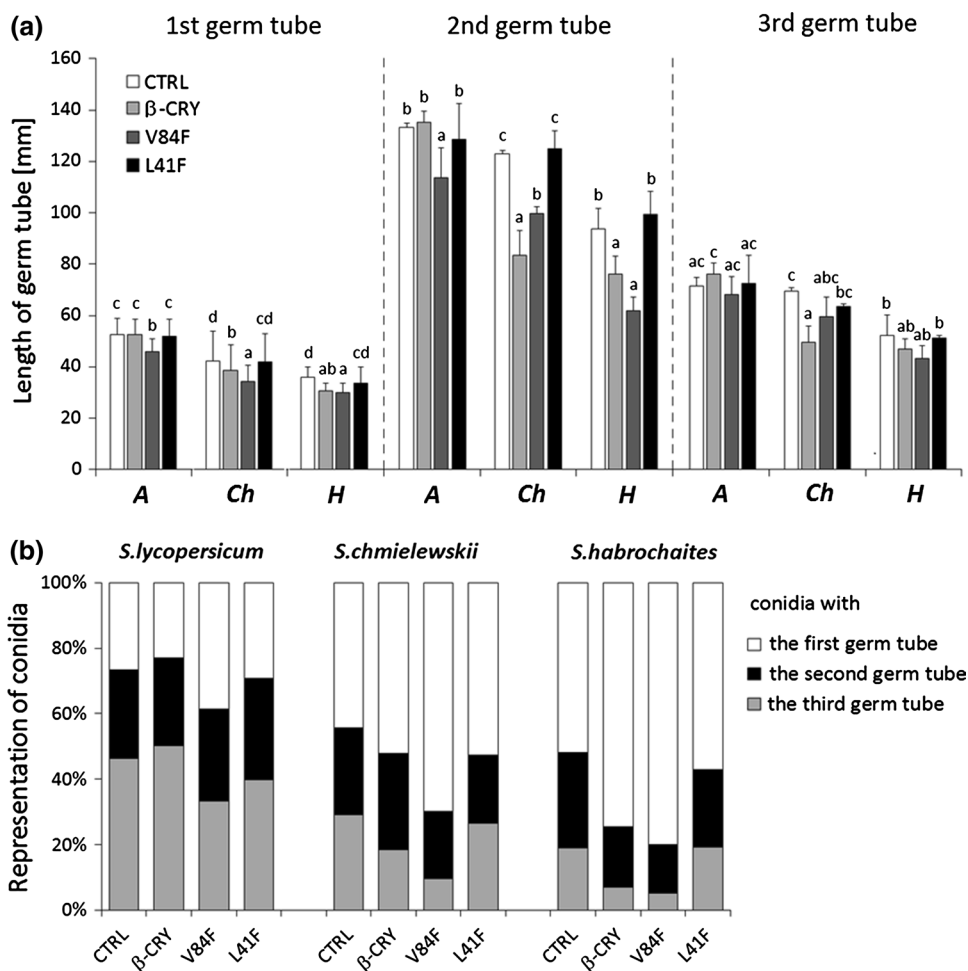


Fig. 4 Changes in the expression of tomato defence-related genes induced by β -cryptogein (β -CRY) and its mutants. Overview of the differential accumulation of candidate defence-related transcripts identified by RT-qPCR 48 h after treatment of three *Solanum* spp. [*S. lycopersicum* cv. Amateur (A), *S. habrochaites* (H) and *S. chmielewskii* (Ch)] with 100 nmol l⁻¹ β -CRY and its mutants Val84Phe (V84F)

and Leu41Phe (L41F). Gene expression relative to control sample of *S. lycopersicum* cv. Amateur (a) or to control sample of each genotype (b) was calculated by the $\Delta\Delta C(t)$ method 48 h after the application of the proteins. Upregulated and downregulated transcripts are shown in green and red, respectively, using a log₂R scale

important role could be suggested for genes *Glu2*, *Glu3*, *Gluco5*, *Hev2*, *Osm4* and *P3* (Fig. 4a) when the great majority of them colocalises on chromosomes 1 and 8 (Supplement Table S2) to QTLs for *P. infestans* resistance (Foolad 2007). Interestingly, more extensive gene upregulation in Val84Phe mutant and downregulation of some genes in Leu41Phe mutant (Fig. 4b) seem to be linked with mutant's sterol-trapping activity from the plasma membrane associated with changes in its fluidity (Sandor et al. 2016), as observed previously in tobacco plants (Dokládál et al. 2012).

Significantly impaired activity of Leu41Phe mutant corresponds with previous results on tobacco plants when its interaction with the high-affinity binding site on the plasma membrane was weakened or eliminated (Dokládál et al. 2012). A similar recognition mechanism might thus be hypothesised to operate in the Solanaceae. Evidence supporting this hypothesis includes the results of previously reported binding experiments (Ponchet et al. 1999). Prospective candidate has been recently described as the cell surface receptor, ELR, that mediates elicitor responses in wild *Solanum tuberosum* because tomato and tobacco genomes contain several orthologues (Fig. S1). However, no ELR orthologues that respond to elicitors have been found in cultivated *S. tuberosum* so far (Du et al. 2015).

Signalling involved in β -cryptogein response

Treatment of leaf discs with β -CRY and the Val84Phe mutant triggered the accumulation of transcripts for ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) synthase (*ACS2*), a key enzyme regulating ethylene synthesis, and ACC oxidase (*ACO 4-like*) (Fig. 4b). This is consistent with increased ethylene production in β -CRY-treated tomato leaves (Fig. 5a) and presence of transcription factor ERELEE4 containing an ethylene-responsive element in promoter regions of the majority of β -CRY-upregulated transcripts (Supplement Table S2). To clarify the roles of the SA- and JA-signalling pathways in β -CRY-induced responses, we measured the concentrations of free SA and JA as well as their conjugates, SA beta-glucoside (SAG) and JA-Ile, in leaf discs of the most responsive genotype, *S. chmielewskii*, 24 h after β -CRY treatment. We were unable to detect free SA and observed only a decreasing trend for SAG (Fig. 5b). However, β -CRY treatment induced the accumulation of free JA and especially the JA-Ile conjugate (Fig. 5b). This is consistent with the finding that the induction of pathogenesis-related (PR) genes by the elicitor INF1 was completely compromised in the *jail-1* mutant tomato line in which the JA-signalling pathway is impaired (Kawamura et al. 2009).

In tobacco plants, mitogen-activated protein kinase MPK3/WIPK was activated by phosphorylation within minutes of elicitor treatment, via a mechanism that was

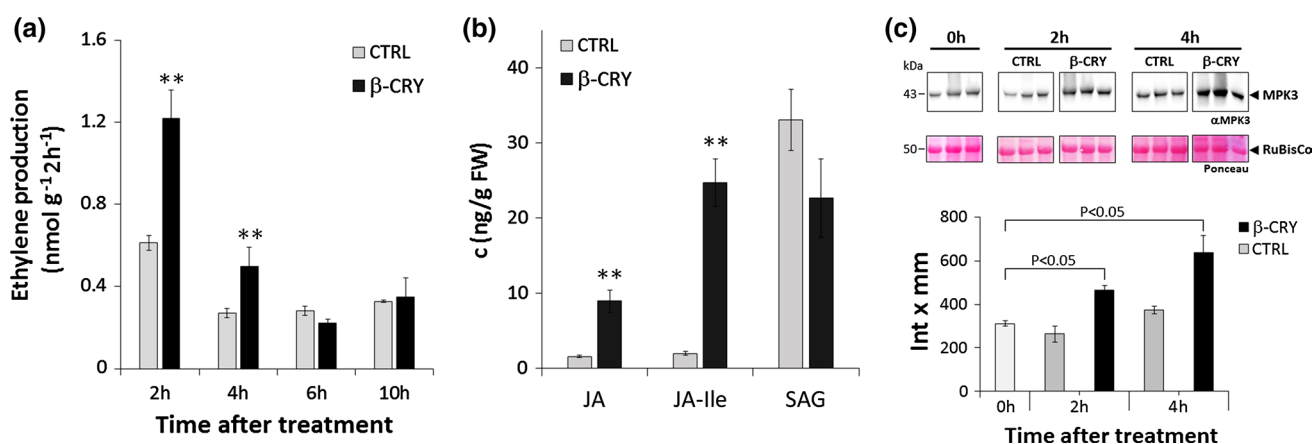


Fig. 5 β -Cryptogein (β -CRY) treatment activates ethylene, JA and JA-Ile production and phosphorylation of MPK3 in tomato leaves. **a** Ethylene production was measured at different times after β -CRY treatment (100 nmol l⁻¹) of *S. chmielewskii* leaves ($n=5$) by gas chromatography. **b** Levels of jasmonic acid (JA), jasmonic acid-isoleucine (JA-Ile), and salicylic acid beta-glucoside (SAG) were measured by HPLC 24 h after β -CRY treatment (100 nmol l⁻¹) of *S. chmielewskii* leaves ($n=3$). The control tissue (CTRL) was a water-treated control sample. Each bar represents the mean \pm SE. Asterisks denote mean values that differ significantly from that for the control group based on Student's *t* test at $P \leq 0.01$ (**). **c** Immunoblot analysis of proteins extracted from *S. chmielewskii* leaves treated with β -CRY

(100 nmol l⁻¹) and water (CTRL) collected 2 and 4 h after treatment. Phosphorylated MPK3 was detected using antibodies raised against human phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2). Three biological replicates were analysed for each treatment. The intensity of bands corresponding to phosphorylated MPK3 were quantified and expressed as normalised intensities (INTxmm) relative to the intensity of the RuBisCO large subunit stained with Ponceau S. Intensities were determined using the QuantityOne program (Bio-Rad). Data are presented as mean \pm SE of three replicates from three independent experiments. Mean values that differ significantly from that for the control group are based on the Student's *t* test

independent of the elicitor-induced rapid oxidative burst (Sharma et al. 2003). Accordingly, here we observed the activation of MPK3 kinase phosphorylation in *S. chmielewskii* leaves within 2 and 4 h after β -CRY treatment (Fig. 5c). The observed activation of MPK3 kinase is connected to the regulation of the transcription factor WRKY33, which activates the ACS2 transcription (Li et al. 2012), as observed here.

Discussion

The responses of tomato plants (*S. lycopersicum*) to the α -elicitor INF1 (from the canonical clade ELI-1) and the pythol oligandrin, secreted by *P. infestans* and *P. oligandrum*, respectively, have been studied extensively (Picard et al. 2000; Takenaka et al. 2006; Kawamura et al. 2009; Ouyang et al. 2015; Satková et al. 2016). Here, we focused on one of the most potent elicitors from the canonical clade ELI-1, β -CRY, which induces extensive HR cell death in tobacco plants and enhances their resistance to infection more strongly than acidic elicitors like INF1 (Ponchet et al. 1999).

Like INF1 and oligandrin (Picard et al. 2000; Kawamura et al. 2009; Satková et al. 2016), β -CRY triggered no detectable HR cell death in tomato plants. β -CRY clearly is perceived by tomato plants because it induced the accumulation of ROS, mainly in moderately and highly resistant genotypes, as well as the accumulation of PR gene transcripts. Variability in the ability of β -CRY and V84F mutant to trigger ROS production and resistance to the biotrophic pathogen *P. neolycopersici* (the causative agent of powdery mildew) in the studied *Solanum* genotypes is clearly linked to different resistance features of the studied genotypes and correlates with previous results regarding histochemical study of ROS generation in the same plant model during pathogen interactions (Tománková et al. 2006). The significant differences in transcript levels and resistance induction observed between the tomato genotypes studied in this work are not wholly surprising, because different tomato genotypes have been shown to differ significantly with respect to their basal transcriptomes and the transcriptomic changes induced by biotic and abiotic stress conditions (Chen et al. 2013; Satková et al. 2016). For instance, a recent transcriptome analysis revealed significant differences in over 7000 transcripts between the genotypes *S. habrochaites* and *S. lycopersicum* (Chen et al. 2015). Similarly, the relatively strong transcripts accumulation in the moderately resistant *S. chmielewskii* could be related to its generally higher responsiveness to infection (as measured by NO and ROS production) compared to the highly resistant *S. habrochaites* (Lebeda et al. 2014).

It has been suggested that the sterol-binding activity of the elicitors plays an important role in the induction of enhanced resistance in tomato plants (Kawamura et al. 2009). On the other hand, Dokládál et al. (2012) observed no evidence for a direct connection between the induction of resistance and sterol binding by elicitors in tobacco plants. In keeping with the latter results, we found that β -CRY sterol-binding/trapping activity seems to be a lowering factor for some elicitor-induced genes, as well as for induction of resistance in analysed tomato genotypes (Figs. 3, 4). A similar effect was already observed in tobacco plants where the Val84Phe mutant induced more extensive accumulation of defence-related genes transcripts and greater resistance to powdery mildew (Dokládál et al. 2012). We can only speculate about the mechanism responsible for this cross talk. Even though simple β -CRY sterol trapping was unable to induce any signalling cascade, recently its role as an enhancing factor of elicitor-induced ROS production was demonstrated (Sandor et al. 2016). Cyclodextrins (showing the same sterol-trapping activity) treatment induced plant defence responses (Morales et al. 1998; Almagro et al. 2012); however, this activity strongly depends on the derivative used (Bru et al. 2006; Valitova et al. 2014) and any signalling cascade has not yet been described for cyclodextrins treatment.

Elicitors are recognised as MAMP because their signalling depends on PRR and coreceptor BAK1/SERK3 (Du et al. 2015). However, on tobacco plants they show some features of effectors. Surprisingly, on tomato plants elicitors behave like typical MAMP without any HR cell death, suggesting differences in their perception or signalling. The failure of the Leu41Phe mutant to induce resistance together with the results of earlier binding experiments (Ponchet et al. 1999) suggests that a similar mechanism of elicitor recognition operates in the Solanaceae. This hypothesis is further supported by the failure of the Leu41Phe mutant to induce resistance. The Leu41 residue is highly conserved among elicitors, and it is located in the structurally important ω -loop region, which was suggested to play a role in an interaction with a receptor on the plasma membrane (Lochman et al. 2005; Dokládál et al. 2012). In this connection, also different activity of Val84Phe mutant could be related to modified interaction with the receptor because sterol-binding activity has been related to conformation changes in the ω -loop region suggested to be necessary for the ability to trigger the early events caused by β -CRY on tobacco cells (Lochman et al. 2005). The signalling pathways activated downstream of elicitor recognition have been only partially disclosed. In tobacco, recognition of β -CRY induces extensive HR cell death and the expression of both SA-responsive and JA-responsive pathogenesis-related genes. However, we observed no HR cell death induction as well

as accumulation of free SA or its glycosylated form and, in keeping with earlier studies on tomatoes (Kawamura et al. 2009; Satková et al. 2016), we demonstrated the activation of pathways associated with the regulation of ethylene and JA synthesis. This suggests activation of at least partial different signalling events after elicitors' perception in tomato plants. In parallel with tobacco plants, an activation of MPK3 kinase was observed, the silencing of which was found to reduce elicitor-induced resistance without affecting the induction of HR cell death in tobacco plants (Xu et al. 2014). It was also shown that the kinase activity of the proposed general interactor for receptor-like proteins (RLPs), receptor-like kinase (RLK) SUPPRESSOR OF BIR1-1 (SOBIR1), is required for Cf-4-mediated HR cell death in tomato plants (Liebrand et al. 2013). It was shown very recently that SOBIR1 is required for INF1-triggered cell death in *Nicotiana benthamiana* and in *Solanum microdontum* and constitutively associates with the elicitor receptor protein ELR (Domazakis et al. 2018). An important role of RLKs encoded by SISOBIR1 and SISOBIR1-like was described during the defence responses induced by *Phytophthora parasitica* and the elicitor Para1 in tomato plants (Peng et al. 2015). According to our findings, a similar mechanism of elicitor recognition by RLP might be suggested in tomato and tobacco plants. Additionally, the tomato genome contains several orthologues to previously described ELR protein in potato. However, largely different signalling pathway in tomato shows that maybe another receptor is able to perceive elicitors in tomato. Having in mind potentially devastating diseases of economically significant crops by the genus *Phytophthora*, further studies on RLPs, RLKs and the signalling components associated with elicitor-induced defence responses in diverse plant species are highly needed.

Author contribution statement TS (Masaryk University) and PS (Palacky University) designed and carried out the research. JP and BM (Palacky University) contributed to carrying out phytopathological experiments. LL contributed to carrying out histochemical and enzymatic analyses. TK (Masaryk University) carried out the HPLC–MS analysis. JM (Palacky University) carried out the ethylene measurement. MP (Palacky University) and JL (Masaryk University) analysed the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements This work was financially supported by the Grant Agency of the Czech Republic (P501-12-0590).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Almagro L, Bru R, Pugin A, Pedreño MA (2012) Early signaling network in tobacco cells elicited with methyl jasmonate and cyclodextrins. *Plant Physiol Biochem* 51:1–9
- Benhamou N, Bélanger RR, 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
- Boissy G, de La Fortelle E, Kahn R et al (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
- Bru R, Sellés S, Casado-Vela J et al (2006) Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *J Agric Food Chem* 54:65–71
- Chen T, Lv Y, Zhao T et al (2013) Comparative transcriptome profiling of a resistant vs. susceptible tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar in response to infection by tomato yellow leaf curl virus. *PLoS One* 8:e80816
- Chen H, Chen X, Chen D et al (2015) A comparison of the low temperature transcriptomes of two tomato genotypes that differ in freezing tolerance: *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites*. *BMC Plant Biol* 15:132
- Dobes P, Kmuníček J, Mikes V, Damborský J (2004) Binding of fatty acids to beta-cryptogein: quantitative structure-activity relationships and design of selective protein mutants. *J Chem Inf Comput Sci* 44:2126–2132
- Dokládál L, Oboril M, Stejskal K et al (2012) Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *J Exp Bot* 63:2203–2215
- Domazakis E, Wouters D, Visser RGF et al (2018) The ELR-SOBIR1 complex functions as a two-component receptor-like kinase to mount defense against *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact* 31(8):795–802. <https://doi.org/10.1094/mpmi-09-17-0217-r>
- Du J, Verzaux E, Chaparro-Garcia A et al (2015) Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nat Plants* 1:15034
- Exposito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Perez A, Perez JA (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol* 8:131. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-131>
- Foolad MR (2007) Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int J Plant Genom* 2007:1–52
- 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 et al (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
- Keller H, Blein JP, Bonnet P, Ricci P (1996a) Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiol* 110:365–376
- Keller H, Bonnet P, Galiana E et al (1996b) Salicylic acid mediates elicitor-induced systemic acquired resistance, but not necrosis in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 9:696–703

- Lebeda A, Mieslerová B, Petřivalský M et al (2014) Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolycopersici*. Eur J Plant Pathol 138:569–596
- Li G, Meng X, Wang R et al (2012) Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in *Arabidopsis*. PLoS Genet 8:e1002767
- Liebrand TWH, van den Berg GCM, Zhang Z et al (2013) Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. Proc Natl Acad Sci U S A 110:10010–10015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220015110>
- Lochman J, Kasparovsky T, Damborsky J et al (2005) Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. Biochemistry 44:6565–6572
- Malá J, Máchová P, Cvrčková H et al (2009) Micropropagation of wild service tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz): the regulative role of different aromatic cytokinins during organogenesis. J Plant Growth Regul 28:341. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9099-2>
- Mieslerová B, Lebeda A, Chetelat RT (2001) Variation in response of wild *Lycopersicon* and *Solanum* spp. against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). J Phytopathol 148:303–311
- Mieslerová B, Lebeda A, Kennedy R (2005) Variation in *Oidium neolycopersici* development on host and non-host plant species and their tissue defence responses. Ann Appl Biol 144:237–248. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2004.tb00339.x>
- Mikes V, Milat ML, Ponchet M et al (1997) The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. FEBS Lett 416:190–192
- Morales M, Bru R, García-Carmona F et al (1998) Effect of dimethyl- β -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with shape *Xylophilus ampelinus*. Plant Cell Tissue Organ Cult 53:179–187
- Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. J Exp Bot 56:2907–2914. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>
- Osman H, Vauthrin S, Mikes V et al (2001) Mediation of elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes. Mol Biol Cell 12:2825–2834
- Ouyang Z, Li X, Huang L et al (2015) Elicitin-like proteins Oli-D1 and Oli-D2 from *Pythium oligandrum* trigger hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana* and induce resistance against *Botrytis cinerea* in tomato. Mol Plant Pathol 16:238–250
- Peng K-C, Wang C-W, Wu C-H et al (2015) Tomato SOBIR1/EVR homologs are involved in elicitin perception and plant defense against the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. Mol Plant-Microbe Interact MPMI 28:913–926. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0405-R>
- Picard K, Ponchet M, Blein J-P et al (2000) Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. Plant Physiol 124:379–396
- Piterková J, Hofman J, Mieslerová B et al (2011) Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp.—*Oidium neolycopersici* interactions. Environ Exp Bot 74:37–44
- Ponchet M, Panabières F, Milat M-L et al (1999) Are elicitins cryptograms in plant-oomycete communications? Cell Mol Life Sci 56:1020–1047
- Ricci P, Bonnet P, Huet JC et al (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. Eur J Biochem FEBS 183:555–563
- Sandor R, Der C, Grosjean K et al (2016) Plasma membrane order and fluidity are diversely triggered by elicitors of plant defence. J Exp Bot 67:5173–5185
- Satková P, Starý T, Plešková V et al (2016) Diverse responses of wild and cultivated tomato to BABA, oligandrin and *Oidium neolycopersici* infection. Ann Bot 119(5):829–840
- Segarra G, Jáuregui O, Casanova E, Trillas I (2006) Simultaneous quantitative LC–ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress. Phytochemistry 67:395–401. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.017>
- Sharma PC, Ito A, Shimizu T et al (2003) Virus-induced silencing of *WIPK* and *SIPK* genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. Mol Genet Genomics 269:583–591
- Takenaka S, Nakamura Y, Kono T et al (2006) Novel elicitin-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. Mol Plant Pathol 7:325–339
- Tománková K, Luhová L, Petřivalský M et al (2006) Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. Physiol Mol Plant Pathol 68:22–32
- Uhlíková H, Obořil M, Klempová J et al (2016) Elicitin-induced distal systemic resistance in plants is mediated through the protein-protein interactions influenced by selected lysine residues. Front Plant Sci 7:59
- Valitova J, Sulkarnayeva A, Kotlova E et al (2014) Sterol binding by methyl- β -cyclodextrin and nystatin-comparative analysis of biochemical and physiological consequences for plants. FEBS J 281:2051–2060
- Xu J, Xie J, Yan C et al (2014) A chemical genetic approach demonstrates that MPK3/MPK6 activation and NADPH oxidase-mediated oxidative burst are two independent signaling events in plant immunity. Plant J Cell Mol Biol 77:222–234

2.2.3 Studium vlivu elicitinu β -kryptogeinu na dynamické změny v subcelulární distribuci enzymu NADPHoxidasy

Rostlinné RBOH jsou hlavním zdrojem ROS produkovaných po interakci rostliny s patogeny. V rámci 8-měsíční vědecko-výzkumné stáže v laboratořích Agroecologie INRA v Dijonu ve Francii jsem se zapojila do řešení projektu zabývajícího se studiem enzymu RBOH se zaměřením na isoformu D (RBOHD) v buňkách tabáku po aplikaci elicitinu β -CRY sekretovaného oomycetou *P. cryptogea*. Výsledky studie jsou prezentovány formou článku s názvem „Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein“, který byl publikován v časopise *Journal of Experimental Botany* v roce 2014 (*Příloha 4*). Hlavním cílem práce bylo studium vlivu elicitinu β -CRY na dynamické změny v subcelulární distribuci RBOHD zodpovědné za produkci ROS. Na řešení studie jsem se podílela měřením produkce ROS metodou chemiluminiscence, detekcí hladin transkriptů enzymu RBOHD a dále jsem byla zapojena do přípravy vzorků pro analýzu konfokální mikroskopii.

V tabákových buňkách BY-2 byly identifikovány dvě kopie *RBOHD* genů, které jsou dále značené jako *RBOHD1* a *RBOHD2*, jejichž sekvenční identita na aminokyselinové úrovni je 98,4 % a identita na úrovni nukleotidů v jejich kódujících regionech je 96,7 %. *RBOHD1* a *RBOHD2* jsou dva homologní geny pocházející z *N. sylvestris* resp. z *N. tomentosiformis*.

Pro studium lokalizace RBOHD v tabákových buňkách BY-2 byly použity konfokální a elektronová mikroskopie, kterými byla prokázána lokalizace proteinů RBOHD1 a RBOHD2 v plazmatické membráně a v endomembránových systémech (*Příloha 4 – Obr. 2*). Ve studii byla nezávislými experimenty prokázána lokalizace RBOHD v Golgiho komplexu. Byla pozorována kolokalizace fluorescence fúzních proteinů RBOHD1-GFP s fluorescenční značkou Man99-mRFP specificky detekující Golgiho komplex (Boulaflous *et al.*, 2009). Signál RBOHD1-GFP byl také nalezen v těsné blízkosti signálu pro endocytový indikátor FM4-64 značící trans-Golgiho síť (TGN) a trans-stranu Golgiho aparátu (Bolte *et al.*, 2004; Lam *et al.*, 2007). RBOHD1-GFP značení bylo citlivé na ošetření brefeldinem A, způsobujícím agregaci Golgiho váčků a TGN (Ritzenthaler *et al.*, 2002). Po ošetření buněk brefeldinem A se signál RBOHD1-GFP přemístil do velkých shluků, které vykazovaly rovněž signál FM4-64 a to 30 až 45 min po aplikaci. Získané výsledky poukazují, že RBOHD jsou z Golgiho komplexu prostřednictvím TGN přeneseny do plazmatické membrány. Podobná cesta z Golgiho komplexu byla navržena pro komplex celulosy synthasy (EC 2.4.1.12) u *Arabidopsis* (Crowell *et al.*, 2009). Tyto výsledky byly potvrzeny pomocí elektronové mikroskopie experimenty detekujícími RBOHD na ultratenkých řezech buněk BY-2 s využitím anti-RBOHD protilátek značených zlatými částicemi (GP, gold particles). GP byly pozorovány na plazmatické membráně, na periférii Golgiho cisteren a u vezikul. GP navázané na anti-RBOHD protilátku se vyskytovaly

na plazmatické membráně a endomembránách jako shluk dvou až tří částic. Podobně i pro RBOH z lidského neutrofilu byla popsána tvorba klastrů v rámci plazmatické membrány (Wientjes *et al.*, 1997).

Proteomické studie ukázaly, že RBOH jsou přítomny v plazmatické membráně ve frakcích nerozpustných v detergentech, což naznačuje, že stejně jako u živočichů mohou být i rostlinné RBOH spojeny *in vivo* s doménami bohatými na steroly a sfingolipidy, které jsou známé jako membránové rafty (Mongrand *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2006; Fujiwara *et al.*, 2009). Experimenty s činidlem methyl- β -cyklodextrinem chelatujícím steroly prokázaly, že asociace RBOHD s plazmatickou membránou není plně závislá na obsahu sterolů v plazmatické membráně. Malá a homogenní velikost klastrů RBOHD spolu s jejich relativní rezistencí vůči cyklodextrinu poukazuje na přítomnost RBOHD v rostlinných membránách ve formě oligomerů. Možnost tvorby funkčních dimerů RBOHD byla již zmíněna na základě struktury a fyziologické studie u rýže (Oda *et al.*, 2010).

Pro lepší pochopení úlohy subcelulární distribuce RBOHD uvnitř buňky byla sledována produkce ROS první hodinu po elicitaci (Příloha 4 – Obr. 5). V BY-2 buňkách produkce ROS vrcholí 10-15 min po přidání β -CRY, pak se produkce ROS snižuje na úroveň mírně nad bazální hladinu a to v čase okolo 30 min. Následně byl zaznamenán mírný nárůst hladiny ROS. Elicitace buněk tabáku BY-2 pomocí β -CRY indukuje rychlou a přechodnou produkci ROS, která závisí na aktivitě RBOHD (Viard *et al.*, 1994; Simon-Plas *et al.*, 2002). Několika metodami bylo nezávisle prokázáno zvýšené zastoupení RBOHD (cca o 50 %) v plazmatické membráně 60 min od elicitace (Příloha 4 – Obr. 4). První zřejmá změna pozorovaná u elicitovaných buněk exprimujících RBOHD1-GFP byla významněji se zvyšující fluorescence plazmatické membrány 30 min od elicitace. Akumulace fúzního proteinu v plazmatické membráně v závislosti na době po elicitaci byla dále prokázána Western blot analýzou s využitím GFP protilátky. Imunodetekce s protilátkou rozpoznávající jak RBOHD1, tak RBOHD2 potvrdily, že nativní isoformy se akumulují v plazmatické membráně 60 min po elicitaci. Elektronovou mikroskopií byl zaznamenán 50% nárůst množství RBOHD v plazmatické membráně.

Simon-Plas *et al.* (2002) prokázali, že β -CRY zvyšuje transkripci RBOHD v buňkách tabáku. Tato skutečnost byla metodou kvantitativní PCR v naší studii potvrzena. Hladiny transkriptů *RBOHD1* a *RBOHD2* byly zvýšeny asi 1,5-krát 30 min a přibližně 2,3-krát 60 min po elicitaci β -CRY (Příloha 4 – Obr. 5). Nárůst transkripce by mohl vysvětlit 50% zvýšení zastoupení RBOHD v plazmatické membráně. Ošetření buněk exprimujících RBOHD1-GFP inhibitorem proteosyntézy cykloheximidem mělo nicméně velmi malý vliv na zvýšení fluorescence vyvolaného β -CRY. To znamená, že zvýšená akumulace RBOHD1-GFP v plazmatické membráně po ošetření β -CRY není způsobena nově syntetizovanými proteiny. Současně se zvýšením fluorescence plazmatické membrány bylo u buněk ošetřených β -CRY pozorováno snížení počtu fluoreskujících intracelulárních kompartmentů (Příloha 4 – Obr. 6). β -CRY

indukoval dvojnásobné snížení fluoreskujících intracelulárních kompartmentů 30 min po ošetření. Z toho vyplývá, že β -CRY spouští cílené uvolnění RBOHD z intracelulárních zásob, kdy dochází k jejich zabudování do plazmatické membrány. Kombinace cykloheximidu a β -CRY vedla ke snížení počtu fluoreskujících intracelulárních kompartmentů 60 min po elicitaci, která byla mnohem výraznější než při působení samotného β -CRY, což naznačuje, že zásoby RBOHD v intracelulárních kompartmentech jsou jak časným zdrojem RBOHD pro akumulaci v plazmatické membráně, tak intracelulární kompartmenty jsou pozdější cílové místa nově syntetizovaných proteinů RBOHD syntetizovaných v endoplazmatickém retikulu. Výsledky poukazují na distribuci RBOHD mezi plazmatickou membránu a Golgiho komplex, které jsou po elicitaci β -CRY posunuty ve prospěch plazmatické membrány, nejprve dodáváním proteinů již přítomných v Golgiho komplexu a poté syntézou nových proteinů. To nastoluje hypotézu, že Golgiho komplex může fungovat jako rezervoár pro RBOHD, přestože dosud není známa žádná studie o RBOH lokalizované v Golgiho komplexu u rostlinných nebo živočišných buněk. Existuje však několik příkladů proteinů spojených s plazmatickou membránou, které cyklují mezi plazmatickou membránou a Golgiho komplexem (Nichols *et al.*, 2001; Le a Nabi, 2003; Milhas *et al.*, 2010).

Zajímavým aspektem regulace RBOHD je nesoulad mezi kinetikou akumulace *RBOHD* transkriptů a produkcí ROS po ošetření β -CRY. Hladiny transkriptů *RBOHD1* a *RBOHD2* nebyly 10 min po elicitaci β -CRY ovlivněny, což potvrzuje, že primární zvýšená produkce ROS je výsledkem aktivace enzymů již přítomných v plazmatické membráně. Navíc skutečnost, že přenos nových RBOHD do plazmatické membrány probíhá ve stejnou dobu jako pokles produkce ROS je v souladu s předchozími výsledky, které ukazují, že produkce ROS lokalizovaná na plazmatické membráně není 30 min po elicitaci detekována (Lherminier *et al.*, 2009). To naznačuje, že aktivované enzymy jsou nahrazeny inaktivovanými enzymy, což umožňuje plazmatické membráně rychle obnovit svou signální kapacitu a dává čas buňce syntetizovat nové enzymy. Publikované výsledky v souhrnu ukazují, že kontrola množství a subcelulární lokalizace RBOH hraje významnou roli v mechanismu produkce ROS indukované elicitiny.

PŘÍLOHA 4

Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein

Elodie Noirot, Christophe Der, Jeannine Lherminier, Franck Robert, Pavla Moricova, Kien Kieu, Nathalie Leborgne-Castel, Françoise Simon-Plas, Karim Bouhidel

Journal of Experimental Botany 65 (17), 5011–5022 (2014)

RESEARCH PAPER

Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein

Elodie Noirot^{1,*}, Christophe Der^{2,*}, Jeannine Lherminier¹, Franck Robert³, Pavla Moricova^{3,4}, Kiên Kiêu⁵, Nathalie Leborgne-Castel², Françoise Simon-Plas³ and Karim Bouhidel^{2,†}

¹ INRA, UMR1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, Plateforme DImaCell, Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne, BP 86510, F-21065 Dijon Cedex, France

² Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, BP 86510, F-21065 Dijon Cedex, France

³ INRA, UMR1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, BP 86510, F-21065 Dijon Cedex, France

⁴ Present address: Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic

⁵ INRA, UR341 Mathématiques et Informatique Appliquées, F-78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

* These authors contributed equally to this work.

† To whom correspondence should be addressed. E-mail: karim.bouhidel@u-bourgogne.fr

Received 20 February 2014; Revised 9 May 2014; Accepted 22 May 2014

Abstract

Plant NADPH oxidases, also known as respiratory burst oxidase homologues (RBOHs), have been identified as a major source of reactive oxygen species (ROS) during plant–microbe interactions. The subcellular localization of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) ROS-producing enzyme RBOHD was examined in Bright Yellow-2 cells before and after elicitation with the oomycete protein cryptogein using electron and confocal microscopy. The plasma membrane (PM) localization of RBOHD was confirmed and immuno-electron microscopy on purified PM vesicles revealed its distribution in clusters. The presence of the protein fused to GFP was also seen in intracellular compartments, mainly Golgi cisternae. Cryptogein induced, within 1 h, a 1.5-fold increase in RBOHD abundance at the PM and a concomitant decrease in the internal compartments. Use of cycloheximide revealed that most of the proteins targeted to the PM upon elicitation were not newly synthesized but may originate from the Golgi pool. ROS accumulation preceded RBOHD transcript- and protein-upregulation, indicating that ROS resulted from the activation of a PM-resident pool of enzymes, and that enzymes newly addressed to the PM were inactive. Taken together, the results indicate that control of RBOH abundance and subcellular localization may play a fundamental role in the mechanism of ROS production.

Key words: BY-2 cells, cryptogein, *Nicotiana tabacum*, protein trafficking, respiratory burst oxidase homolog D (RBOHD), reactive oxygen species, protein trafficking.

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anions ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroxyl radicals (OH^{\cdot}), and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) are natural by-products of plant cell metabolism that must be detoxified to protect cellular functions from their strong oxidative properties (Halliwell, 2006). A transient increase in ROS production is observed when a

Abbreviations: BFA, brefeldin A; BY-2, Bright Yellow-2; CHX, cycloheximide; DIM, detergent-insoluble fraction; GAR, goat anti-rabbit IgG; GP, gold particle; HR, hypersensitive response; M β CD, methyl- β -cyclodextrin; mRFP, monomeric red fluorescent protein; PAG, protein A–gold conjugate; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PM, plasma membrane; RBOH, respiratory burst oxidase homologue; ROS, reactive oxygen species; SAR, systemic acquired resistance; TGN, trans-Golgi network.

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

plant is exposed to a pathogen, and is referred to as the oxidative burst. ROS produced during the oxidative burst are thought to be involved in defence reactions in several ways: directly as antimicrobial agents (Chen and Schopfer, 1999) or cross-linking agents during cell wall reinforcement (Bradley *et al.*, 1992), and indirectly as signalling molecules to trigger the hypersensitive response (HR) and systemic acquired resistance (SAR) (Torres, 2010). The oxidative burst is usually biphasic with a rapid and transient phase within 1 h of pathogen recognition followed by a long-lasting second phase a few hours later that is thought to be responsible for the HR (Lamb and Dixon, 1997). Primary ROS production is predominantly apoplastic and, depending on the plant species, is dependent upon plasma membrane (PM) NADPH oxidase, cell wall peroxidase, or both (O'Brien *et al.*, 2012).

Plant NADPH oxidases, also designated as respiratory burst oxidase homologues (RBOHs), belong to a small family of highly conserved proteins with ten members in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Torres *et al.*, 1998; Marino *et al.*, 2011). RBOHs are membrane proteins composed of six transmembrane domains associated with two haem groups, a C-terminal region with NADPH- and FAD-binding domains, and an N-terminal regulatory region with two calcium-binding EF-hands and phosphorylation domains (Suzuki *et al.*, 2011). RBOHs catalyse the formation of the superoxide anion $O_2^{\cdot-}$ by transferring an electron from intracellular NADPH to an apoplastic molecule of oxygen (O_2) (Sagi and Fluhr, 2006). Superoxide anions, which are short-lived radicals, are then rapidly converted to hydrogen peroxide either spontaneously or by superoxide dismutase (Mori and Schroeder, 2004).

The role of RBOHs in plant–pathogen interactions has been investigated in different plant species using knockout mutants and antisense approaches. In *Arabidopsis*, the RBOHD and RBOHF isoforms are responsible for the ROS burst in response to MAMPs (microbe-associated molecular patterns) (Zhang *et al.*, 2007), DAMPs (damage-associated molecular patterns) (Galletti *et al.*, 2008), and microbial pathogens (Torres *et al.*, 2002; Pogany *et al.*, 2009), but with a prevalent role for RBOHD. In *Nicotiana benthamiana* the orthologues of AtRBOHD and AtRBOHF, named RBOHB and RBOHA, respectively, are the principal ROS producers in response to infection by *Phytophthora infestans* (Yoshioka *et al.*, 2003) or *Botrytis cinerea* (Asai and Yoshioka, 2009), and to elicitors of plant defence reactions (Asai *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). In tobacco (*Nicotiana tabacum*), RBOHD is the sole isoform responsible for the ROS burst in response to cryptogein (Simon-Plas *et al.*, 2002; Lherminier *et al.*, 2009), a proteinaceous elicitor secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea* known to induce the HR and SAR (Ricci *et al.*, 1989; Keller *et al.*, 1996).

Opposite results were obtained regarding the effects of the RBOH-mediated ROS burst on the HR and resistance to pathogens. In *Arabidopsis*, the *rbohD/rbohF* double mutant displayed a reduced HR and unaffected pathogen growth after inoculation with an avirulent *Pseudomonas syringae* strain, but an enhanced HR and resistance to the biotrophic oomycete *Peronospora parasitica* (Torres *et al.*, 2002). In *N. benthamiana*, the *rbohB/rbohA* double mutant exhibited reduced HR

and enhanced susceptibility after infection with the avirulent oomycete *Phytophthora infestans* (Yoshioka *et al.*, 2003). These diverse effects on the HR and disease resistance suggest that RBOH-derived ROS are not simple toxic compounds triggering cell death, but components of signalling pathways that may have opposite effects on plant defence reactions (Torres *et al.*, 2005; Torres, 2010; Marino *et al.*, 2011). A long-distance signalling function has been demonstrated for RBOHD-derived ROS in *Arabidopsis* in response to various abiotic stresses (Miller *et al.*, 2009). Signalling activities of RBOH-derived ROS are probably also modulated by other ROS sources (Bindschedler *et al.*, 2006; Yoda *et al.*, 2006; Daudi *et al.*, 2012) and other signalling molecules. One of them is nitric oxide (NO) that is synthesized following pathogen recognition within the same time frame (Romero-Puertas *et al.*, 2004). Both NO and ROS are known to react with each other to produce pro-death molecules such as singlet oxygen or hydroxyl radicals, and a balanced production between intracellular ROS and NO has been shown to be a key determinant for the HR (Delledonne *et al.*, 2001). The recent finding that NO-mediated S-nitrosylation of AtRBOHD governs a negative feedback loop limiting the production of ROS and the HR (Yun *et al.*, 2011) has shed some light on the mostly unknown molecular mechanisms that underpin the interplay between NO and ROS.

To get a better understanding of the cellular and physiological functions of RBOH-derived ROS as ephemeral signalling molecules in plant–microbe interactions, it is essential to determine the subcellular localization and dynamics of their producers. Cell fractionation and immunolocalization studies were the first to reveal that RBOHs are intrinsic PM proteins of plant cells (Keller *et al.*, 1998; Sagi and Fluhr, 2001; Simon-Plas *et al.*, 2002), a result later confirmed with the use of GFP-fusions (Kobayashi *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2008). Proteomic studies also showed that RBOHs are present in detergent-insoluble fractions (DIMs) of the PM thus suggesting that, like their animal counterparts, they could be associated *in vivo* with sterol- and sphingolipid-enriched domains also known as membrane rafts (Mongrand *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2006; Fujiwara *et al.*, 2009). The non-uniform distribution of several RBOHs within the PM of differentiating cells is in line with this finding (Takeda *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013). However, the cell fate of RBOHs after pathogen perception is not documented.

The focus of the present study was to characterize the subcellular localization of RBOHD in tobacco Bright Yellow-2 (BY-2) cells before and after elicitation with cryptogein using confocal and electron microscopy. Two RBOHD isoforms were identified in BY-2 cells. The RBOHDs were found to reside in the PM in the form of small clusters in the Golgi cisternae and in a second, as yet unidentified, intracellular compartment. The RBOHDs partitioning between the PM and endomembranes were further shown to be altered following elicitation. Finally, examination of the relationships between transcriptional control, subcellular dynamics, and activity of RBOHDs revealed that control of RBOH abundance and localization may play a fundamental role in the mechanism of ROS production in the context of plant defence responses.

Materials and methods

Materials

Tobacco BY-2 cells (*N. tabacum* cv. Bright Yellow-2) were grown at 25°C under continuous light (200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on a rotary shaker (140 rpm). The suspensions were sub-cultured every 7 days at 2:80 ml dilution, in MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 90 mM sucrose, 1.5 mM KH_2PO_4 , 0.55 mM inositol, 1 μM 2,4-D, 3 μM thiamine, and 10 mM MES pH 5.6.

ROS determination

Seven-day-old cells were harvested, filtered, and re-suspended (1 g for 10 ml) in I2 buffer (175 mM mannitol, 0.5 mM CaCl_2 , 0.5 mM K_2SO_4 , 2 mM MES pH 5.8) for a 3 h equilibration period on a rotary shaker (140 rpm), then elicited by the addition of 50 nM cryptogein. Cryptogein was purified from *P. cryptogea* according to Ricci *et al.* (1989). The production of H_2O_2 was measured by chemiluminescence using luminol and a luminometer (BCL book, Berthold). Every 2 min, a 250 μl aliquot of the cell suspension was added to 50 μl of 0.3 mM luminol and 300 μl of the assay buffer (175 mM mannitol, 0.5 mM CaCl_2 , 0.5 mM K_2SO_4 , 50 mM MES pH 6.5).

Plasmid constructions

The *RBOHD1* and *RBOHD2* cDNAs were obtained by reverse transcription of BY-2 total RNA using the ImProm-II™ reverse transcription system (Promega) and PCR amplification using primer pairs attB1-NoxD5/attB2-NoxD1-2 and attB1-NoxD5/attB2-NoxD2-1, respectively (primers are given in Supplementary Table S1 available at JXB online). The PCR products were cloned into Gateway entry vector pDONR221 (Invitrogen) for sequencing. The *RBOHD1* gene was PCR-amplified from BY-2 genomic DNA using primer pair attB1-NtrbohD4/attB2-NtrbohD1 and cloned into Gateway entry vector pDONR-Zeo (Invitrogen). It was then subcloned into plant transformation vector pMDC83 (Curtis and Grossniklaus, 2003) in which the 35S promoter was deleted by digestion with restriction enzymes HindIII/SpeI, blunting of 5'-overhangs with Klenow fragment and re-circularization. The Golgi marker Man99-monomeric red fluorescent protein (mRFP) was a gift from Claude Saint-Jore-Dupas (Boulaflous *et al.*, 2009). It corresponds to the first 99 amino acids of *Glycine max* alpha-mannosidase I fused to mRFP.

Plant cell transformation

The *RBOHD1-GFP* and *Man99-mRFP* constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 by freeze thawing. *RBOHD1-GFP*-containing agrobacteria were used to transform BY-2 cells according to Brandizzi *et al.* (2003). Cells were plated onto agar-MS medium containing 35 mg l^{-1} hygromycin. Transformed microcalli were transferred into MS liquid medium supplemented with 35 mg l^{-1} hygromycin and submitted to constant agitation (140 rpm) at 25°C under continuous light to generate cell suspensions. Eight weeks of subculturing were needed before cell suspension cultures became stable. *RBOHD1-GFP* cells were retransformed with *Man99-mRFP* construct and selected onto 100 mg l^{-1} kanamycin to obtain the doubly transformed cell line.

Real-time qRT-PCR analysis

Total RNA from 7-day-old BY-2 cells was isolated with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) and treated with Ambion DNA-free™ DNase (Life Technologies) to eliminate genomic DNA. First-strand cDNA was produced from 1 μg of total RNA using the ImProm-II™ reverse transcription system (Promega). The product was diluted 1:3 with water, and 2 μl was used as a template for RT-qPCR amplification with a GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) on an ABI

PRISM 7900HT system (Applied Biosystems). The housekeeping genes *EF-1 α* , *L25*, and *PP2A*, whose expression has been shown to be stable in tobacco (Schmidt and Delaney, 2010), were used to normalize candidate gene transcripts. Primers were designed using Primer3 software (Untergasser *et al.*, 2012) and are listed in Supplementary Table S1 available at JXB online. Amplifications were carried out for three independent RNA preparations and two technical replications. Amplification specificity was checked by melting-curve analysis. PCR efficiency was determined using standard curves obtained with serial dilutions of PCR products as templates and shown to be close to 100% for all primer pairs. Data were analysed using the SDS 2.3 software (Applied Biosystems) to obtain cycle threshold values (Ct). Ct values were normalized to the geometric means of three reference genes (ΔCt) and relative expression values were calculated ($2^{-\Delta\text{Ct}}$).

Cell fractionation

Seven-day-old cells were collected by filtration, frozen in liquid nitrogen and homogenized in grinding medium (500 mM sucrose, 20 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 50 mM Tris-MES pH 8.0). The homogenate was centrifuged at 16 000g for 20 min. After centrifugation, supernatants were collected, filtered through two successive screens (63 and 38 μm) and centrifuged at 96 000g for 35 min. The microsomal fraction was purified by partitioning in an aqueous two-phase system containing polyethylene glycol 3350/dextran T-500, 6.6% each (Larsson *et al.*, 1994), to obtain the PM fraction, which was re-suspended in storage buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 20% glycerol, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pepstatin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM Tris-MES pH 7.3). The amount of protein present in the PM fraction was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

Western blot analysis

Samples of 20 μg protein from PM fractions were solubilized in a buffer containing 40 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% β -mercaptoethanol, 1.5% SDS, 1 mM EDTA, 2 M/1 M urea/thiourea, 1% *n*-octyl glucoside, 10% glycerol, and bromophenol blue for 2 h at room temperature, then loaded on a 4–8% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis separation (1 h, 40 mA) protein fractions were electroblotted onto nitrocellulose membrane in a buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, 0.1% SDS (2.5 h, 200 mA). The membrane was blocked with TBS-Tween buffer (150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 20 mM Tris pH 7.6) containing 5% milk. Probing and detection of western blots were performed as described in the ECL Western Blotting detection kit (Amersham). The RBOHD antibody used for western blots and immunogold labelling (see below) was a rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 138–152 (CLNKRPIPTGRFDRNK) and 784–798 (IAKNKGNKSGSASGGC) of RBOHD1 (Simon-Plas *et al.*, 2002). Dot-blot analysis revealed that the antibody only recognized oligopeptide 138–152. The fact that this oligopeptide is also present in the RBOHD2 sequence indicates that the antibody was able to detect both RBOHD isoforms. Primary anti-RBOHD and anti-GFP antibodies (Invitrogen) were used at a dilution of 1:1000 in TBS-Tween. A horseradish peroxidase anti-rabbit IgG antibody (Bio-Rad) was used at a 1:10 000 dilution in TBS-Tween for revelation.

Confocal microscopy

Seven-day-old cells were mounted in culture medium or in I2 buffer when cryptogein treatment was required. FM4-64 (4.25 μM final) was added to the cell suspension in the dark at 25°C and labelling was imaged at different time points. Brefeldin A (BFA) (40 μM final) was added to the cell suspension 60 min prior to imaging. Cryptogein (50 nM final) and cycloheximide (CHX) (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ final) were added alone or in combination, and effects were

observed at different time points. Images were acquired using a Leica TCS SP2-AOBS laser scanning confocal microscope with the 488 nm line of an argon laser for GFP and FM4-64, and with the 594 nm line of a helium-neon laser for mRFP. GFP fluorescence was band-pass filtered between 500 and 550 nm, FM4-64 fluorescence between 600 and 700 nm, and mRFP fluorescence between 620 and 700 nm. Images were processed using Photoshop CS5 (Adobe Systems). The PM fluorescence was quantified using Image J software version 1.47h (Schneider *et al.*, 2012) as follows. One-pixel-wide lines (5–15 μm length) were drawn along the PM of at least 30 BY-2 cells per condition and time point, and average fluorescence intensity was measured. Fluorescence intensities were normalized to the time-0 point and graphed as percentages (mean \pm SD; $n = 5$ –16). Fluorescent intracellular compartments were scored at the periphery of the PM and scaled to 100 μm of PM using Image J. Compartment numbers were normalized to the time-0 point and graphed as percentages (mean \pm SD; $n = 6$ –11).

High-pressure freezing and freeze substitution for transmission electron microscopy

The BY-2 cells suspended in I2 buffer were concentrated by centrifugation (2000g, 10 s), and immediately frozen, without addition of cryoprotectant, in a Leica EM HPM 100 high-pressure freezer. Freeze substitution was subsequently performed using automatic Leica EM AFS1 pre-cooled to -90°C . Samples were substituted in anhydrous acetone containing 0.2% uranyl acetate and 0.1% glutaraldehyde at -90°C for 72 h. The temperature was gradually increased to -50°C (slope 5°C h^{-1}) and kept at this temperature. Samples were rinsed with pure acetone, then pure ethanol for 24 h for each solvent. They were then gradually infiltrated with mixtures of ethanol/Lowicryl HM20 (with increasing concentrations of resin) and finally embedded in pure Lowicryl HM20. Polymerization was carried out at -50°C for 48 h, followed by 24 h at -35°C , and finally 24 h at 0°C . Following polymerization, the blocks of Lowicryl-embedded BY-2 cells were ready for thin sectioning and immunolabelling.

Immunogold labelling of RBOHDs on thin sections of BY-2 cells and on purified PM

Ultrathin sections of tobacco cells were collected onto carbon-collodion-coated nickel grids. Grids were treated with 10 mM PBS pH 7.2, supplemented with 10 mM glycine for 15 min, then with PBS containing 0.5% milk, 10% normal goat serum and Aurion blocking solution for 30 min (Aurion), and then with polyclonal anti-RBOHD antibody at a 1:50 dilution in PBS containing 0.1% BSA-c (Aurion) for 1 h at room temperature. Incubation with goat secondary antibody conjugated to 6 nm gold particles (GPs; Sigma-Aldrich) and diluted 1:25 in PBS containing 0.1% BSA-c was then performed for 1 h at room temperature. Purified BY-2 cell PM vesicles, pretreated or not with 20 mM methyl- β -cyclodextrin (M β CD) in buffered conditions (150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 20 mM Tris pH 7.6) under constant agitation, were directly deposited onto collodion and carbon-coated microscope nickel grids. 10 μl of PM vesicles ($0.2 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$) were deposited on each grid. Grids were floated, during 30 min at room temperature, on 20 μl droplets of TBS containing 0.1% BSA, 0.1% glycine, and 5% normal goat serum (NGS), to reduce unspecific background. After three washing steps of 5 min in droplets of TBS, the grids were incubated for 1 h at RT with anti-RBOHD antibody or anti-GFP antibody diluted 1:50 in TBS. Antibody was detected with 5 nm gold-labelled goat anti-rabbit IgG [EM GAR 5 nm, British Biocell International (BBI)] or 5 nm gold-labelled Protein A (EM protein A 5 nm, BBI) at the dilution 1:20 for 45 min at room temperature. After a 10 min fixation in 0.1 M phosphate buffer containing 2.5% glutaraldehyde, preparations were negatively stained during 30 s in 1% ammonium molybdate at room temperature and air-dried. Sections and grids were observed with a Hitachi H7500

transmission electron microscope operating at 80 kV equipped with an AMT camera driven by AMT software (Hitachi).

Labelling analysis and spatial statistics

In order to characterize PM vesicle labelling, the density of labelling was evaluated by counting the number of GPs per square micrometre of PM. When groups of GPs were identified on a vesicle, distances between all GPs in a group were measured with AMT software and the proportion of GPs in groups (2, 3, and 4 particles) was compared to total labelling. Counting and measurement were performed on three repetitions for each time of treatment and 30 PM vesicles per sample were observed. For spatial statistics, coordinates of the GPs and vesicle contours were determined using ImageJ software version 1.47h (Schneider *et al.*, 2012). The GP patterns within PM vesicles were considered as realizations of a stationary point process observed in windows of varying sizes and shapes. The spatial distribution of a stationary point process can be quantified based on Ripley's K-function (Ripley, 1976). For a given radius r , $K(r) = N(r)/\lambda$ where $N(r)$ is the expected number of neighbours lying within distance r from a typical point and λ is the mean number of points per unit area. For a completely random (Poisson) point process, $K(r) = \pi r^2$. When K is above πr^2 , a point process is considered as spatial clustering. When K is below πr^2 , it is considered as spatially repulsive. Estimation of the K-function was performed using the translation correction (Ohser, 1983). Instead of computing individual estimates on each realization (PM vesicle), a global estimation was performed by pooling together all observed patterns using the approach proposed by Baddeley *et al.* (1993). Computation of the global estimates was implemented as a modified version of the Kest function provided by the R spatstat package (Baddeley *et al.*, 1993; R Development Core Team, 2009). Simulation envelopes of the K-function under the Poisson hypothesis were computed from a modified version of the envelope function of spatstat.

Results and discussion

Two RBOHD genes are expressed in BY-2 cells

In order to express an RBOHD-GFP fusion protein at native level in tobacco BY-2 cells, a BLAST search of the SOL genomic network (SGN) database was performed with *RBOHD* cDNA (accession number AJ309006.1) to identify the tobacco *RBOHD* gene. The search identified two copies of the *RBOHD* gene, which were named *RBOHD1* and *RBOHD2* (Fig. 1). *N. tabacum* is a young allotetraploid species resulting from the hybridization of the diploid species *N. tomentosiformis* and *N. sylvestris* less than 200 000 years ago (Leitch *et al.*, 2008). A second BLAST search of the SGN database identified a single *RBOHD* gene in the *N. tomentosiformis* genome (*NtoRBOHD*) and *N. sylvestris* genome (*NsRBOHD*). The intron insertion pattern was identical in all four genes (Fig. 1). Intron length was different for *RBOHD1* and *RBOHD2*, but almost identical for *RBOHD1* and *NsRBOHD*, and for *RBOHD2* and *NtoRBOHD*. The cDNAs for *RBOHD1* and *RBOHD2* were successfully isolated from BY-2 cells. Both sequences shared 98.4% identity at the amino-acid level and 96.7% identity at the nucleotide level in their coding regions (Supplementary Figure S1 available at JXB online). Sequence comparison with *N. tomentosiformis* and *N. sylvestris* *RBOHD* coding regions showed that *RBOHD2* shared 100% identity at the nucleotide level with

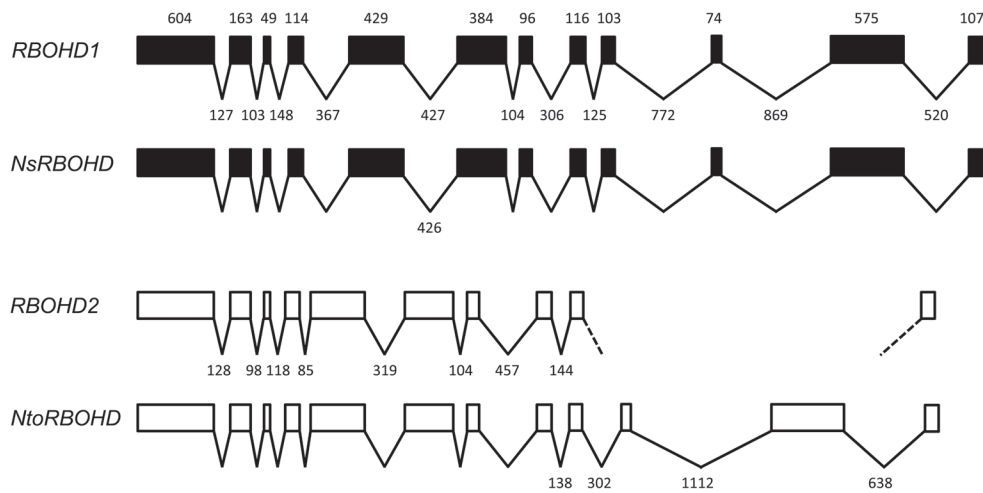


Fig. 1. *RBOHD* gene structure in *N. tabacum* and parental species. Protein-coding regions are represented by boxes and introns by broken lines. The length of protein-coding regions in base pairs is marked above the *RBOHD1* sequence and is identical in all four genes. The length of introns is marked below the *RBOHD1* and *RBOHD2* genes and only marked below the *NsRBOHD* and *NtoRBOHD* genes when different from the tobacco genes. All sequences are drawn to scale. The *RBOHD1* gene sequence was completed after amplification and sequencing of BY-2 genomic DNA. A part of the *RBOHD2* gene near the 3'-end has not been found in the SGN database.

NtoRBOHD and *RBOHD1* displayed a single mismatch with *NsRBOHD* (data not shown). Altogether, the results indicate that *RBOHD1* and *RBOHD2* are two homeologous genes originating from *N. sylvestris* and *N. tomentosiformis*, respectively, that are transcribed in BY-2 cells.

RBOHDs localize to the PM and endomembranes

The *RBOHD1* gene including a ~2-kb fragment upstream of the start codon was fused to GFP coding sequence and used to transform BY-2 cells. GFP fluorescence was detected at the PM and also intracellularly in the form of dots and rings (Fig. 2A–C). Similar fluorescence patterns were observed with 35S-driven fusion constructs *RBOHD1-GFP*, *GFP-RBOHD1*, and *RBOHD2-GFP* suggesting that cell localization of the fusion protein is not significantly influenced by its expression level, the position of the fluorescent tag, or the identity of the isoform (data not shown).

Unlike their animal counterparts (Ushio-Fukai, 2009), plant NADPH oxidases have not been reported to be associated with intracellular compartments. This prompted us to identify the ones that are labelled by *RBOHD1-GFP*.

Fluorescent rings were previously observed in plant cells expressing Golgi fusion proteins (Robinson *et al.*, 2008). *RBOHD1-GFP* rings were identified as Golgi from the following results. Firstly, *RBOHD1-GFP* co-localized with the Golgi marker Man99-mRFP (Boulaflous *et al.*, 2009) and formed a rim around the Man99-GFP signal, suggesting a location at the periphery of the Golgi cisternae (Fig. 2D–F). Secondly, the *RBOHD1-GFP* signal was found in close apposition with that of FM4-64, an endocytic tracer that labels the *trans*-Golgi network (TGN) and the *trans* side of the Golgi stack 30 min after internalization (Bolte *et al.*, 2004; Lam *et al.*, 2007) (Fig. 2G–I). Thirdly, *RBOHD1-GFP* labelling was sensitive to treatment with BFA, a fungal toxin that causes aggregation of Golgi stacks and TGN into BFA bodies (Ritzenthaler *et al.*, 2002). Upon BFA

treatment, *RBOHD1-GFP* relocated to large aggregates that were also labelled by FM4-64 30 to 45 min after uptake (Fig. 2J–L).

RBOHD1-GFP-labelled dots were not identified in the course of our study. Co-localization studies performed with FM4-64 over a 1 h time course always showed the continuous presence of a population of GFP-only labelled dots (Fig. 2M–O). At time 60 min, FM4-64 labelled the tonoplast (Fig. 2O). This result suggests that the unidentified compartment does not lie on the endocytic pathway and could correspond to an exocytic compartment that delivers *RBOHDs* from the Golgi to the PM via a TGN-independent route. A similar exit route from the Golgi complex has been suggested for the cellulose synthase complex in *Arabidopsis* (Crowell *et al.*, 2009).

Knowing that the location of a fusion protein may be different from that of its native form, ultrathin sections of BY-2 cells were immunogold-labelled with an anti-peptide antibody that recognized the two *RBOHD* isoforms. Gold particles were observed at the PM, at the periphery of the Golgi cisternae, and associated with vesicle-like compartments (Fig. 2P–R), supporting the results of the live cell fluorescence microscopy studies. It should be mentioned that overall labelling density was low, either arguing for low abundance of the native *RBOHDs* or for poor epitope accessibility.

Altogether, the confocal and electron microscopy studies revealed that *RBOHD* isoforms were partitioned between the PM and endomembranes in BY-2 cells.

RBOHDs are organized in clusters within the PM

Despite the low density of the labelling observed on BY-2 cell sections, GPs linked to the anti-*RBOHD* antibody mostly occurred as groups of 2–4 on cell PM and endomembranes (Fig. 2P–R). Purified PM vesicles of BY-2 cells were probed with the anti-*RBOHD* antibody to analyse the distribution pattern of *RBOHDs* on the PM surface (Fig. 3A). The mean density of the labelling over three independent biological

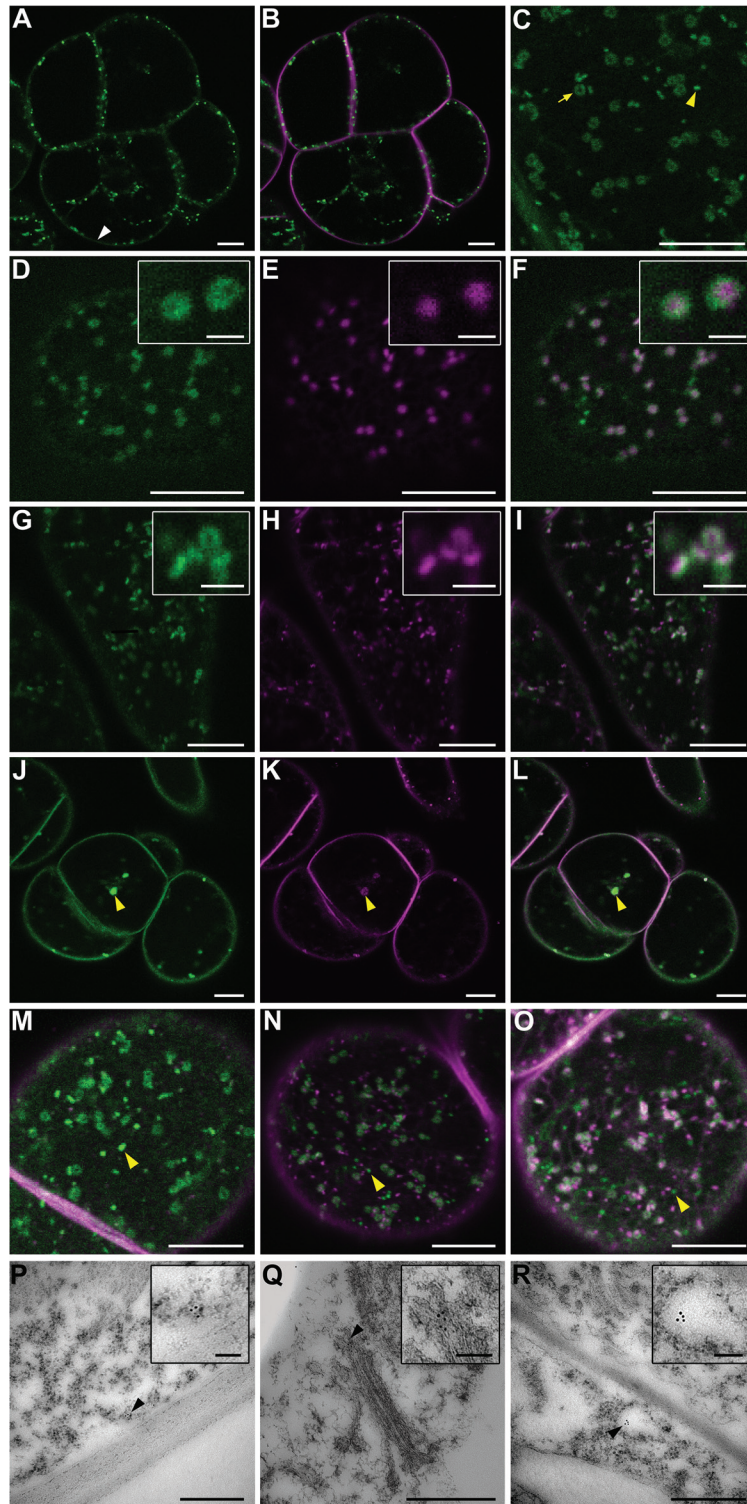


Fig. 2. RBOHDs mostly localize to the PM and Golgi in BY-2 cells, as shown by confocal microscopy of RBOHD1-GFP-expressing BY-2 cells (A–O) and immunogold labelling of RBOHDs on ultrathin sections of wild-type cells (P–R). (A–C) Cells expressing RBOHD1-GFP and stained with the endocytic tracer FM4-64 for 5 min. Shown are GFP fluorescence alone (A, C) and an overlay of GFP and FM4-64 fluorescence (B). GFP signals were observed at the PM [white arrowhead in (A)] and in intracellular dots and rings [yellow arrowhead and yellow arrow, respectively, in (C)]. (D–F) Cells co-expressing RBOHD1-GFP and the Golgi marker Man99-mRFP. Shown are GFP fluorescence (D), mRFP fluorescence (E), and overlay (F). The insets show that RBOHD1-GFP labelled the margin of the Golgi. (G–I) Cells expressing RBOHD1-GFP and stained with the endocytic tracer FM4-64 for 30 min. Shown are GFP fluorescence (G), FM4-64 fluorescence (H), and overlay (I). The inset in (I) shows tricoloured labelling due to partial overlap. (J–L) Cells expressing RBOHD1-GFP, treated with BFA for 60 min and with FM4-64 for 30 min. Shown are GFP fluorescence (J), FM4-64 fluorescence (K), and overlay (L). The yellow arrowhead indicates a BFA body. (M–O) RBOHD1-GFP-expressing cells were stained with FM4-64 for 10 min (M), 20 min (N), and 60 min (O). Shown are overlays of GFP and FM4-64 fluorescence. Yellow arrow and arrowheads indicate FM4-64-labelled tonoplast and green-only dots, respectively. (P–R) Immunogold-labelled sections of BY-2 cells performed with anti-RBOHD antibody. Black arrowheads indicate GPs associated with the PM (P), the margin of the Golgi (Q), and a vesicle-like compartment (R). Scale bar represents 10 μm (A–O), 2 μm (insets in panels D–I), 500 nm (P–R), and 100 nm (insets in panels P–R).

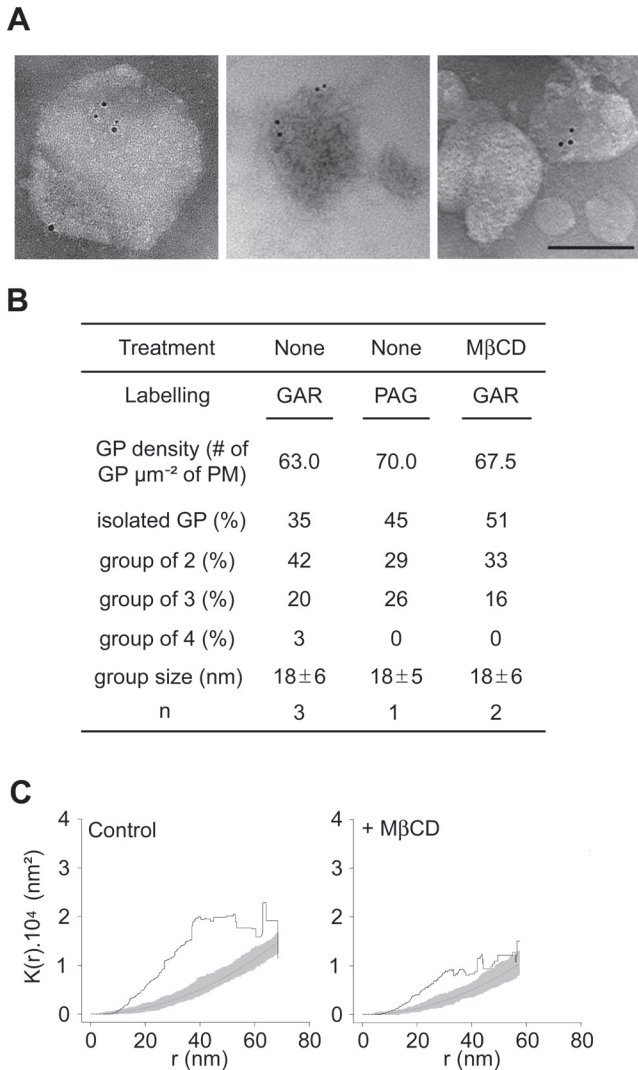


Fig. 3. RBOHDs form clusters in the PM. (A) Representative transmission electron micrographs of BY-2 cell PM vesicle labelled with anti-RBOHD antibody and secondary IgG coupled to GPs of 5 nm (GAR). Scale bar = 100 nm. (B) Labelling characteristics of PM vesicles. Vesicles were treated or not with MβCD, then labelled with anti-RBOHD and either GAR or PAGs of 5 nm (n, number of experiments). (C) Ripley's K-function analysis of RBOHD distribution on PM vesicles. K(r) (y axis) is the average number of particles lying at a distance less than r (x axis) from a typical particle, normalized by the mean particle density. K(r) values displayed above simulation intervals for a completely random (Poisson) point pattern indicate an aggregated pattern. Black line, sample K(r); dotted line, theoretical Poisson K(r); grey area, 99% Poisson simulation interval.

experiments was 63 GPs μm⁻² of PM (Fig. 3B). This value is low compared to the ones obtained on the same material for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) and H⁺-ATPase PMA2 (Furt et al., 2010), which were, respectively, of 160 and 1200 μm⁻² PM, but is in agreement with the low density of the labelling observed on cell sections. 65% of the labelling was observed as groups of GPs and 35% as isolated GPs (Fig. 3B). For aggregated labelling, the groups, with a mean size of 18 ± 6 nm, were 65% composed of two particles, 31% composed of three particles, and 4% composed of four particles. Statistical significance of the aggregated pattern of RBOHDs was evaluated with Ripley's K function (Ripley, 1976), a spatial analysis method previously used to investigate

the spatial distribution of animal membrane proteins (Prior et al., 2003; Lillemeier et al., 2006). K-function analysis confirmed that the gold pattern was aggregated, since K(r) values laid clearly above the simulation envelope for the K-function of completely random patterns (Fig. 3C, left panel). To rule out the possibility that groups might correspond to the binding of several secondary antibodies to a single primary antibody, a fourth experiment was performed with protein A-gold conjugates (PAG). The number of particles within groups was only slightly reduced (by 10%) in PAG-labelled vesicles compared to secondary antibody-labelled vesicles (Fig. 3B), clearly indicating that RBOHDs are organized in clusters at the PM. Labelling of PM vesicles prepared from RBOHD1-GFP cells with an anti-GFP antibody revealed that the fusion protein forms similar clusters in the PM (Supplementary Figure S3 available at JXB online), but with a lower density that could be due to the lower sensitivity of the GFP antibody and/or the lower abundance of the antigen.

Similarly, NADPH oxidase from human neutrophil was reported to be distributed in clusters within the PM (Wientjes et al., 1997). In line with this finding are the non-uniform distribution of several plant RBOHDs in the PM of differentiating cells (Takeda et al., 2008; Liu et al., 2009; Lee et al., 2013) and the demonstration that H₂O₂ resulting from the activity of RBOHDs upon cryptogin treatment was observed as discrete patches along the PM of BY-2 cells (Lherminier et al., 2009).

Such a clustering is also in agreement with previous experiments showing that RBOHDs are found in the DIM fractions of tobacco (Mongrand et al., 2004; Morel et al., 2006) or rice (Fujiwara et al., 2009). Indeed, preferential association of a protein (or lipid) with sterol- and sphingolipid-enriched DIM fractions has been proven to be indicative of its presence in subdomains of the membrane in numerous studies (reviewed by Simons and Gerl, 2010). Like RBOHDs, the lipid PIP₂, and the proteins remorin and flotillin, have been found predominantly associated with the DIM fractions of plant PM and detected by immuno-electron microscopy in PM nano-domains of 25, 70, and 100 nm, respectively (Raffaele et al., 2009; Furt et al., 2010; Li et al., 2012).

The sterol-chelating agent MβCD was used on PM vesicles to assess the possible sterol-dependency of the clustered distribution. A 30-min treatment with MβCD, which removed ~60% of PM sterols (data not shown), increased by 16% the number of isolated particles but did not modify either the labelling density or the size of the GP groups (Fig. 3B). Accordingly, K-function analysis of MβCD-treated vesicles indicated that the distribution of GPs was still clustered, although the amplitude of K curves was lower than for untreated vesicles, suggesting a decrease in the degree of aggregation after treatment with MβCD (Fig. 3C, right panel). This indicates that neither the association of RBOHD proteins to the PM nor their pattern within the membrane is fully dependent upon PM sterol content. Similar results have been obtained for several raft markers such as ganglioside M1 in mouse fibroblast PM (Fujita et al., 2007), a tyrosine kinase lck-derived oligopeptide in mouse T-cell PM (Lillemeier et al., 2006), and PIP₂ in tobacco cell PM (Furt et al., 2010).

The small and homogeneous size of the RBOHDs clusters, together with their relative resistance to cyclodextrin, suggests that RBOHDs might be present in plant membranes as oligomers. Interestingly, Nox5, an animal NADPH oxidase which is structurally more closely related to plant RBOHDs than any of the other animal isoforms (Suzuki *et al.*, 2011), forms an active oligomer in the PM (Kawahara *et al.*, 2011). Moreover, structure and physiological studies of rice RBOHD revealed that it could form a functional dimer (Oda *et al.*, 2010). This does not question the fact that RBOHD clusters might reside in particular sterol-rich domains of the membrane. Indeed, in animal cells, several classes of proteins have been demonstrated to be associated with membrane domains as oligomers. For instance, the matrix protein VP40 from the Ebola virus is found essentially in the DIM fractions as oligomers whereas the low amount of the protein present in the soluble fraction consists mostly of monomers (Panchal *et al.*, 2003). For members of the flotillin family, found associated to membrane rafts in various models and proven to form oligomers, oligomerization is necessary to mediate association with DIMs (Neumann-Giesen *et al.*, 2004). Furthermore, oligomerization of the amyloid β -peptide is ganglioside-dependent and M β CD-insensitive within lipid rafts of CHO cells (Kim *et al.*, 2006). Finally, a very interesting study with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in MDCK epithelial cells identified oligomerization as one of the determinants of their association to sterol-rich domains in the Golgi and their polarized transport to the apical cell membrane (Paladino *et al.*, 2004).

All these data are thus consistent with the hypothesis that RBOHDs might reside as oligomers within sterol-rich domains of the tobacco PM. Further investigations such as blue native gel and radiation inactivation analyses will be required to ascertain the oligomeric nature of RBOHDs.

Intracellular and PM-associated pools of RBOHDs are differentially affected following cryptogeiin treatment

Elicitation of tobacco cells by cryptogeiin induces a rapid and transient production of ROS (Viard *et al.*, 1994) that depends upon the activity of RBOHDs (Simon-Plas *et al.*, 2002). In BY-2 and RBOHD1-GFP-expressing cells, ROS production peaked 10–15 min after cryptogeiin addition then decreased to a level slightly above basal levels at 30 min (Supplementary Figure S2 available at *JXB* online). ROS production was consistently higher in RBOHD1-GFP-expressing cells suggesting that the fusion protein retained some enzymatic activity as previously reported for an N-terminal fusion (Takeda *et al.*, 2008). As this is not direct evidence for activity, one has to keep in mind that the fusion enzyme could exhibit a reduced enzymatic activity due to the presence of the fluorescent tag. To better understand the transient production of ROS, the subcellular distribution of RBOHDs was investigated within the first hour of elicitation.

The first obvious change observed in elicited RBOHD1-GFP cells was an increase in PM fluorescence (Fig. 4A). PM fluorescence intensity of RBOHD1-GFP cells was significantly different from that of untreated cells at 30 min and

was ~40% higher at 60 min (Fig. 4B). PM accumulation of the fusion protein was also shown by western blot analysis of PM-enriched fractions using GFP antibody (Fig. 4C). Furthermore, immunodetection with an antibody recognizing both RBOHD1 and RBOHD2 revealed that native isoforms accumulate at the PM 60 min after elicitation (Fig. 4C). Immunolabelling of PM vesicles also showed a 50% increase in the number of GPs (Fig. 4D). All these approaches thus yielded a similar result, namely an increase of about 50% of the amount of RBOHDs present on the PM after 1 h of cryptogeiin treatment, and further confirmed that the fusion protein is a faithful reporter for monitoring RBOHDs subcellular dynamics.

Simon-Plas and collaborators previously showed that cryptogeiin upregulates *RBOHD* transcription in tobacco cells (Simon-Plas *et al.*, 2002). This was confirmed in the present study using real-time PCR. *RBOHD1* and *RBOHD2* transcript levels were upregulated ~1.5-fold 30 min after elicitation and ~2.3-fold at time 60 min (Fig. 5). Transcriptional upregulation could explain the 50% increase in abundance of RBOHDs at the PM. However, treatment of RBOHD1-GFP-expressing cells with the protein synthesis inhibitor CHX had very little effect on the cryptogeiin-triggered increase in PM fluorescence (Fig. 6A). This indicates that RBOHD1-GFP accumulation at the PM after exposure to cryptogeiin is not mainly due to the delivery of newly synthesized proteins.

At the same time as the increase in PM fluorescence, a decrease in the number of fluorescent intracellular compartments was observed in elicited cells. Indeed, cryptogeiin induced a 2-fold reduction in the number of these compartments 30 min after treatment (Figs 4A and 6B). A mechanistically relevant explanation is that cryptogeiin triggers the targeting to the PM of RBOHDs released from intracellular stores. The combination of cryptogeiin and CHX led to a decrease in the number of fluorescent intracellular compartments 60 min after elicitation which was much more pronounced than with cryptogeiin alone, suggesting that internal stores are both the early source of RBOHD proteins accumulating at the PM and the late destination of newly synthesized proteins arriving from the endoplasmic reticulum.

Altogether these results are in favour of a distribution of RBOHDs between PM and Golgi pools that is shifted in favour of the PM pool following elicitation, first by the delivery of proteins already present in the Golgi, and then by the synthesis of new proteins. This raises the question of the Golgi as a genuine reservoir for RBOHDs. There is no report in the literature of any Golgi-localized NADPH oxidase in plant or animal cells. However, there are several examples of PM-associated proteins that cycle between the PM and the Golgi (Nichols *et al.*, 2001; Le and Nabi, 2003; Milhas *et al.*, 2010). Interestingly, these proteins have been found associated with lipid rafts. Raft assembly is presumed to be initiated at the ER with proteins being incorporated at the Golgi complex (Brown and London, 1998; Heino *et al.*, 2000). Nichols and collaborators have raised the possibility that recycling of PM raft components could play a role in raft assembly and in the regulation of signalling pathways that are lipid raft-dependent (Nichols *et al.*, 2001). Further experiments

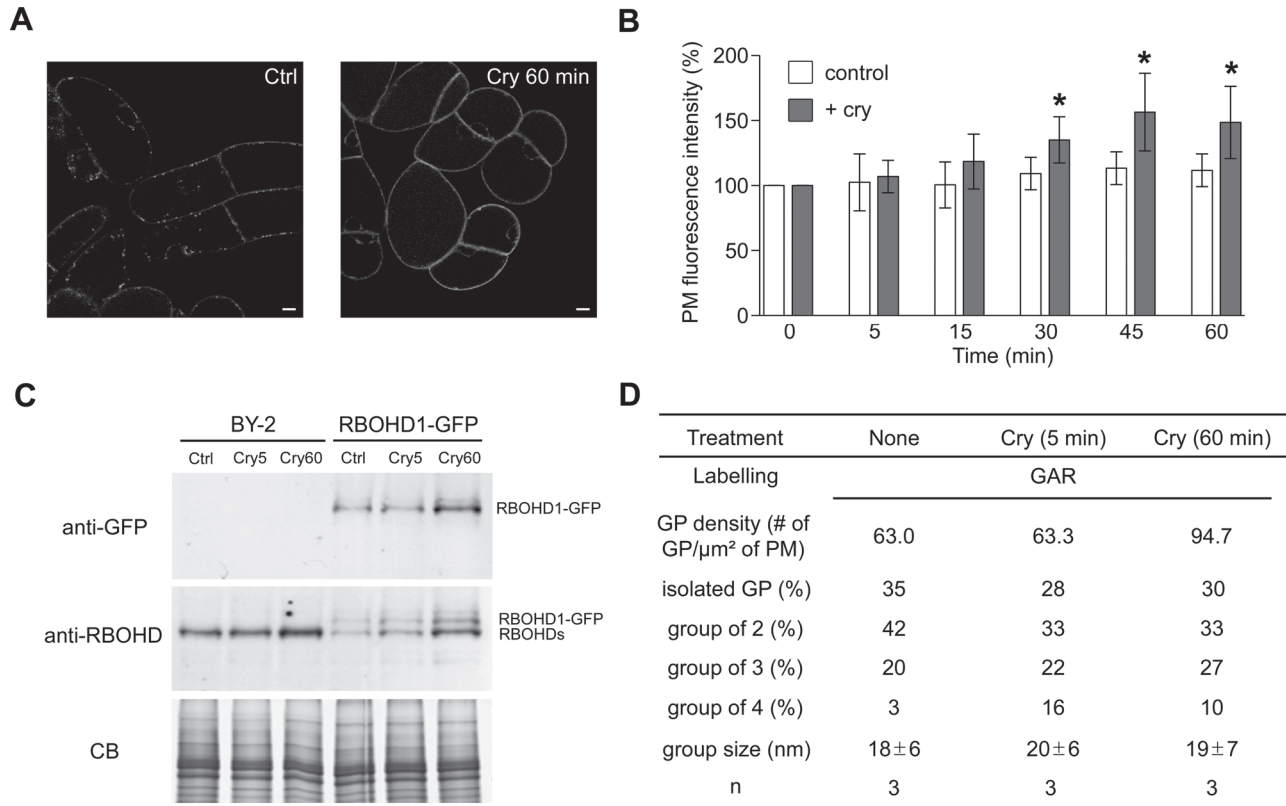


Fig. 4. PM abundance of RBOHDs increases upon elicitation by cryptogein. (A) RBOHD1-GFP-expressing cell before (Ctrl) and after 60 min incubation with cryptogein (Cry 60 min). Scale bars = 10 μm . (B) Quantification of the PM fluorescence in RBOHD1-GFP cells. Values are means \pm SD of 5–16 independent experiments. An asterisk indicates a difference of statistical significance between non-elicited and elicited cells for each time point, Mann-Whitney test ($P < 0.05$). (C) Western blot analysis of PM fractions from BY-2 and RBOHD1-GFP cells with anti-RBOHD and anti-GFP antibodies. Cells were untreated (Ctrl) or cryptogein-treated for 5 min (Cry5) or 60 min (Cry60). CB: Coomassie blue staining as a loading control. (D) RBOHD distribution on PM vesicles from elicited BY-2 cells. Values for non-elicited cells are the same as the ones reported in Fig. 2B. Abbreviation: n, number of experiments.

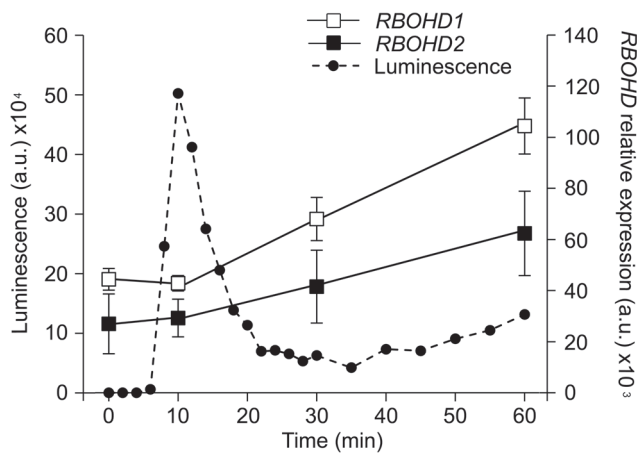


Fig. 5. Kinetics of ROS production and RBOHD gene expression following elicitation. The kinetics of ROS production, measured by chemiluminescence (dashed line, left axis), is plotted against the kinetics of RBOHD1 and RBOHD2 mRNA accumulation, measured by qRT-PCR (solid lines, right axis). ROS kinetics is representative of three independent experiments. Expression values are means \pm SEM of log₂-transformed mRNA levels relative to the geometric mean of reference genes *EF-1 α* , *L25*, and *PP2A* ($n = 3$). Values are expressed in arbitrary units (a.u.).

involving pharmacological and/or genetic alterations of the endocytic and exocytic pathways, coupled with the use of photoswitchable fluorescent proteins, will be required to demonstrate that a similar cycling operates in plant cells to regulate the abundance of RBOHD at the PM.

Insights on the regulation of RBOHD activity

Since RBOHD-mediated ROS production was observed a few minutes after elicitation with cryptogein (Fig. 5), we asked whether RBOHD activation was associated with their redistribution in the PM. The percentage of GPs within groups and the size of the groups did not change significantly 5 min after elicitation (Fig. 4D), indicating that activation of the protein that occurs within this time frame does not result from the aggregation of enzyme-containing nanodomains to generate large redox platforms as documented for animal cells (Jin *et al.*, 2011). Our results, however, do not rule out the possibility that signalling platforms are formed from the coalescence of nanodomains containing different sets of signalling components including RBOHDs, or targeting of regulatory proteins to RBOHD nanodomains. Consistent with

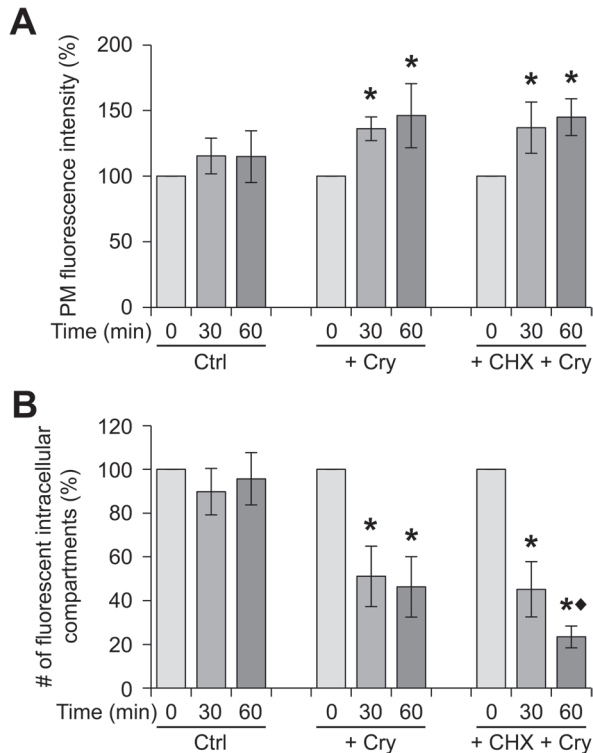


Fig. 6. RBOHDs are mobilized from the internal compartments to the PM upon elicitation by cryptogein. RBOHD1-expressing cells were untreated (Ctrl), or treated with cryptogein alone (Cry), or in combination with the protein synthesis inhibitor CHX. PM fluorescence (A) and fluorescent intracellular compartments (B) were quantified for 10–30 cells for each time point. Values are means \pm SD of 6–11 independent experiments. A difference of statistical significance is indicated by an asterisk (control vs treated cells) or a black diamond (Cry-treated vs Cry + CHX-treated cells) for each time point. Mann-Whitney test, $P < 0.05$.

the latter hypothesis is the observation that DIMs extracted from BY-2 cells, treated or not with cryptogein for 5 min, displayed the same amount of RBOHD, whereas the abundance of proteins involved in signal transduction, such as 14-3-3 proteins, was increased (Stanislas et al., 2009). At time 60 min, when new RBOHDs accumulated at the PM, the percentage of isolated GPs as well as the size of the groups also remained unchanged (Fig. 4D), suggesting that RBOHDs reach the PM as clusters that might have been assembled at the rim of the Golgi cisternae (Fig. 2Q).

Another interesting aspect of RBOHD regulation is the discrepancy between the kinetics of *RBOHD* transcript accumulation and ROS production upon cryptogein treatment. Indeed, *RBOHD1* and *RBOHD2* transcript levels were unaffected 10 min after elicitation (Fig. 5) indicating that ROS production results from the activation of a PM-resident pool of enzymes. Moreover, the fact that arrival of new RBOHDs at the PM coincides with the decrease in ROS production is fully consistent with previous results indicating that PM-localized ROS production is no longer detected after 30 min of elicitation (Lherminier et al., 2009). This suggests that activated enzymes are turned over and replaced by inactivated ones, thus enabling the PM rapidly to restore its signalling capacity and giving time for the cell to synthesize new enzymes. The catalytic core of the phagocytic NADPH oxidase cycles

between the PM and internal reservoirs in macrophages, and it has been proposed that cycling could represent a mechanism by which superoxide production is regulated (Casbon et al., 2009; Ejlerskov et al., 2012).

Conclusion

The results presented here allow a new hypothesis concerning the regulation of plant NADPH oxidases during the set-up of plant defence. Until now, this regulation has mainly been addressed by considering variation of gene expression, post-translational modifications, or regulation by other proteins or secondary messengers such as calcium or phosphatidic acid. It now seems of interest to consider subcellular trafficking as a potential determinant of RBOH activity. Future prospects will be to decipher the mechanisms underlying the subcellular dynamics of RBOHDs and to evaluate the roles of the different pools of RBOHDs in the signalling process associated with plant defence.

Supplementary material

Supplementary data can be found at *JXB* online.

[Supplementary Table S1](#). Primers used in this study.

[Supplementary Figure S1](#). Alignment of RBOHD1 and RBOHD2 amino acid sequences.

[Supplementary Figure S2](#). Kinetics of ROS production upon elicitation by cryptogein.

[Supplementary Figure S3](#). RBOHD-GFP protein forms clusters in the PM.

Funding

This work was supported by grants from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche; Institut National de la Recherche Agronomique (INRA); and the Grant Agency of the Czech Republic (P501/12/0590 to P.M.).

Acknowledgements

We are grateful to Claude Saint-Jore-Dupas (Université de Rouen) for the gift of the *Man99-mRFP* construct. We wish to thank the Microscopy Centre INRA/uB of the DIImaCell platform for technical assistance in confocal and electron microscopy. No conflict of interest is declared.

References

- Asai S, Ohta K, Yoshioka H. 2008. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell* **20**, 1390–1406.
- Asai S, Yoshioka H. 2009. Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 619–629.
- Baddeley AJ, Moyeed RA, Howard CV, Boyde A. 1993. Analysis of a three-dimensional point pattern with replication. *Journal of the Royal Statistical Society Series C (Applied Statistics)* **42**, 641–668.
- Bindschedler LV, Dewdney J, Blee KA et al. 2006. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal* **47**, 851–863.

- Boite S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B.** 2004. FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy* **214**, 159–173.
- Boulaflois A, Saint-Jore-Dupas C, Herranz-Gordo M-C, Pagny-Salehabadi S, Plasson C, Garidou F, Kiefer-Meyer M-C, Ritzenthaler C, Faye L, Gomord V.** 2009. Cytosolic N-terminal arginine-based signals together with a luminal signal target a type II membrane protein to the plant ER. *BMC Plant Biology* **9**, 144.
- Bradford MM.** 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ.** 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**, 21–30.
- Brandizzi F, Irons S, Kearns A, Hawes C.** 2003. BY-2 cells: culture and transformation for live cell imaging. In: Bonifacio JS *et al.*, eds. *Current protocols in cell biology*, Ch. 1, Unit 1.7. Wiley
- Brown DA, London E.** 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *Journal of Membrane Biology* **164**, 103–114.
- Casbon A-J, Allen L-AH, Dunn KW, Dinuer MC.** 2009. Macrophage NADPH oxidase flavocytochrome B localizes to the plasma membrane and Rab11-positive recycling endosomes. *Journal of Immunology* **182**, 2325–2339.
- Chen SX, Schopfer P.** 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry* **260**, 726–735.
- Crowell EF, Bischoff V, Desprez T, Rolland A, Stierhof Y-D, Schumacher K, Gonneau M, Hofte H, Vernhettes S.** 2009. Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 1141–1154.
- Curtis MD, Grossniklaus U.** 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* **133**, 462–469.
- Daudi A, Cheng Z, O'Brien JA, Mammarella N, Khan S, Ausubel FM, Bolwell GP.** 2012. The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity. *The Plant Cell* **24**, 275–287.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C.** 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 13454–13459.
- Ejlervskov P, Christensen DP, Beyaie D, Burritt JB, Paclat M-H, Gorlach A, van Deurs B, Vilhardt F.** 2012. NADPH oxidase is internalized by clathrin-coated pits and localizes to a Rab27A/B GTPase-regulated secretory compartment in activated macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 4835–4852.
- Fujita A, Cheng J, Hirakawa M, Furukawa K, Kusunoki S, Fujimoto T.** 2007. Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 2112–2122.
- Fujiwara M, Hamada S, Hiratsuka M, Fukao Y, Kawasaki T, Shimamoto K.** 2009. Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice. *Plant and Cell Physiology* **50**, 1191–1200.
- Furt F, Konig S, Bessoule JJ *et al.*** 2010. Polyphosphoinositides are enriched in plant membrane rafts and form microdomains in the plasma membrane. *Plant Physiology* **152**, 2173–2187.
- Galletti R, Denoux C, Gambetta S, Dewdney J, Ausubel FM, De Lorenzo G, Ferrari S.** 2008. The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in *Arabidopsis* is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **148**, 1695–1706.
- Halliwell B.** 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* **141**, 312–322.
- Heino S, Lusa S, Somerharju P, Ehnholm C, Oikkonen VM, Ikonen E.** 2000. Dissecting the role of the Golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 8375–8380.
- Jin S, Zhou F, Katirai F, Li P-L.** 2011. Lipid raft redox signaling: molecular mechanisms in health and disease. *Antioxidants and Redox Signaling* **15**, 1043–1083.
- Kawahara T, Jackson HM, Smith SME, Simpson PD, Lambeth JD.** 2011. Nox5 forms a functional oligomer mediated by self-association of its dehydrogenase domain. *Biochemistry* **50**, 2013–2025.
- Keller H, Blein J, Bonnet P, Ricci P.** 1996. Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiology* **110**, 365–376.
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C.** 1998. A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *The Plant Cell* **10**, 255–266.
- Kim SI, Yi JS, Ko YG.** 2006. Amyloid β oligomerization is induced by brain lipid rafts. *Journal of Cellular Biochemistry* **99**, 878–889.
- Kobayashi M, Kawakita K, Maeshima M, Doke N, Yoshioka H.** 2006. Subcellular localization of Strboh proteins and NADPH-dependent O₂⁻-generating activity in potato tuber tissues. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1373–1379.
- Lam SK, Siu CL, Hillmer S, Jang S, An G, Robinson DG, Jiang L.** 2007. Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-Golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *The Plant Cell* **19**, 296–319.
- Lamb C, Dixon RA.** 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 251–275.
- Larsson C, Sommarin M, Widell S.** 1994. Isolation of highly purified plasma membranes and the separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Methods in Enzymology* **228**, 451–469.
- Le PU, Nabi IR.** 2003. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* **116**, 1059–1071.
- Lee Y, Rubio MC, Alassimone J, Geldner N.** 2013. A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell* **153**, 402–412.
- Leitch IJ, Hanson L, Lim KY, Kovarik A, Chase MW, Clarkson JJ, Leitch AR.** 2008. The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (*Solanaceae*). *Annals of Botany* **101**, 805–814.
- Lherminier J, Elmayan T, Fromentin J, Elaraqui KT, Vesa S, Morel J, Verrier J-L, Cailleteau B, Blein J-P, Simon-Plas F.** 2009. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 868–881.
- Li R, Liu P, Wan Y, Chen T *et al.*** 2012. A membrane microdomain-associated protein, *Arabidopsis* Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. *The Plant Cell* **24**, 2105–2122.
- Lillemeier BF, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Wilson BS, Davis MM.** 2006. Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 18992–18997.
- Liu P, Li R-L, Zhang L, Wang Q-L, Niehaus K, Baluska F, Samaj J, Lin J-X.** 2009. Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. *The Plant Journal* **60**, 303–313.
- Marino D, Dunand C, Puppo A, Pauly N.** 2011. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science* **17**, 9–15.
- Milhas D, Clarke CJ, Idkowiak-Baldys J, Canals D, Hannun YA.** 2010. Anterograde and retrograde transport of neutral sphingomyelinase-2 between the Golgi and the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **1801**, 1361–1374.
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R.** 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* **2**, ra45.
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde J-P, Hartmann M-A, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule J-J.** 2004. Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 36277–36286.

- Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt F, Fromentin J, Bessoule J-J, Blein J-P, Simon-Plas F.** 2006. Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Molecular and Cellular Proteomics* **5**, 1396–1411.
- Mori IC, Schroeder JI.** 2004. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology* **135**, 702–708.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Neumann-Giesen C, Falkenbach B, Beicht P, Claasen S, Luers G, Stuermer CA, Herzog V, Tikkanen R.** 2004. Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochemical Journal* **378**, 509–518.
- Nichols BJ, Kenworthy AK, Polishchuk RS, Lodge R, Roberts TH, Hirschberg K, Phair RD, Lippincott-Schwartz J.** 2001. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *Journal of Cell Biology* **153**, 529–541.
- O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP.** 2012. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**, 765–779.
- Oda T, Hashimoto H, Kuwabara N *et al.*** 2010. Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 1435–1445.
- Ohser J.** 1983. On estimators for the reduced second moment measure of point processes. *Mathematische Operationsforschung und Statistik, Series Statistics* **14**, 63–71.
- Paladino S, Sarnataro D, Pillich R, Tivodar S, Nitsch L, Zurzolo C.** 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *Journal of Cell Biology* **167**, 699–709.
- Panchal RG, Ruthel G, Kenny TA, Kallstrom GH, Lane D, Badie SS, Li L, Bavari S, Aman MJ.** 2003. In vivo oligomerization and raft localization of Ebola virus protein VP40 during vesicular budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**, 15936–15941.
- Pogany M, von Rad U, Grun S, Dongo A, Pintye A, Simoneau P, Bahng W, Kiss L, Barna B, Durner J.** 2009. Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria* pathosystem. *Plant Physiology* **151**, 1459–1475.
- Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF.** 2003. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *Journal of Cell Biology* **160**, 165–170.
- R Development Core Team.** 2009. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Raffaele S, Bayer E, Lafarge D *et al.*** 2009. Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *The Plant Cell* **21**, 1541–1555.
- Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernollet JC.** 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Biochemistry* **183**, 555–563.
- Ripley BD.** 1976. The second order analysis of stationary point process. *Journal of Applied Probability* **13**, 255–266.
- Ritzenthaler C, Nebenfuhr A, Movafeghi A, Stussi-Garaud C, Behnia L, Pimpl P, Staehelin LA, Robinson DG.** 2002. Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *The Plant Cell* **14**, 237–261.
- Robinson DG, Jiang L, Schumacher K.** 2008. The endosomal system of plants: charting new and familiar territories. *Plant Physiology* **147**, 1482–1492.
- Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M.** 2004. Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**, 795–803.
- Sagi M, Fluhr R.** 2001. Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **126**, 1281–1290.
- Sagi M, Fluhr R.** 2006. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* **141**, 336–340.
- Schmidt GW, Delaney SK.** 2010. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics* **283**, 233–241.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW.** 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671–675.
- Simon-Plas F, Elmayan T, Blein J-P.** 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *The Plant Journal* **31**, 137–147.
- Simons K, Gerl MJ.** 2010. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 688–699.
- Stanislas T, Bouyssie D, Rossignol M, Vesa S, Fromentin J, Morel J, Pichereaux C, Monsarrat B, Simon-Plas F.** 2009. Quantitative proteomics reveals a dynamic association of proteins to detergent-resistant membranes upon elicitor signaling in tobacco. *Molecular and Cellular Proteomics* **8**, 2186–2198.
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R.** 2011. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 691–699.
- Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, Dolan L.** 2008. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* **319**, 1241–1244.
- Torres MA.** 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* **138**, 414–429.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JDG.** 2002. *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**, 517–522.
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL.** 2005. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* **37**, 1130–1134.
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JD.** 1998. Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91^{phox}). *The Plant Journal* **14**, 365–370.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG.** 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**, e115.
- Ushio-Fukai M.** 2009. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxidants and Redox Signaling* **11**, 1289–1299.
- Viard M, Martin F, Pugin A, Ricci P, Blein J.** 1994. Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology* **104**, 1245–1249.
- Wientjes FB, Segal AW, Hartwig JH.** 1997. Immunoelectron microscopy shows a clustered distribution of NADPH oxidase components in the human neutrophil plasma membrane. *Journal of Leukocyte Biology* **61**, 303–312.
- Yoda H, Hiroi Y, Sano H.** 2006. Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiology* **142**, 193–206.
- Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JDG, Doke N.** 2003. *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell* **15**, 706–718.
- Yun B-W, Feechan A, Yin M *et al.*** 2011. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264–268.
- Zhang H, Fang Q, Zhang Z, Wang Y, Zheng X.** 2009. The role of respiratory burst oxidase homologues in elicitor-induced stomatal closure and hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3109–3122.
- Zhang J, Shao F, Li Y *et al.*** 2007. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host and Microbe* **1**, 175–185.

2.3 Závěr

V rámci řešení disertační práce jsem se zaměřila na studium aktivace obranných mechanismů u rostlin po aplikaci elicitinů, proteinových elicitorů produkovaných fytopatogeny rodu *Phytophthora* a *Pythium*. Významnou roli v obranných reakcích rostlin v průběhu patogeneze mají ROS, na jejichž produkci se podílí zejména membránový enzym RBOH. V průběhu zahraniční stáže jsem se zapojila do studie dynamiky změn v lokalizaci isoformy proteinu RBOHD a s tím spojených změn hladiny ROS u tabákových buněk vlivem β -CRY. Pro rostliny disponující obrannými mechanismy zajišťujícími rezistenci vůči danému patogenu je charakteristické dvoufázové navýšení hladiny ROS v rámci interakce rostlina-patogen. Studie prokázala, že RBOHD se v tabákových buňkách nachází v plazmatické membráně a v Golgiho komplexu. V první fázi po elicitaci β -CRY se RBOHD plazmatické membrány podílí na zvýšené produkci ROS společně s RBOHD původně lokalizovanou v Golgiho aparátu. Nově syntetizovaná RBOHD je zapojena do produkce ROS až v následné druhé fázi. Na regulaci aktivity RBOHD se tedy vedle regulace pomocí Ca^{2+} iontů nebo prostřednictvím PA a posttranslačních modifikací jako je fosforylace a S-nitrosylace, podílí významnou měrou i subcelulární distribuce RBOHD.

Na modelovém systému tří genotypů *Solanum* spp. s rozdílnou rezistencí k patogenu *P. neolycopersici* byly studovány mechanismy obranných reakcí aktivovaných po aplikaci α -elicitinu oligandrinu, β -elicitinu β -CRY a sloučeniny BABA, patřící mezi látky označované jako „priming agents“. Byl prokázán vliv elicitace na zvýšení rezistence jednotlivých genotypů k danému patogenu. Intenzita změn v odolnosti rostliny závisela na typu použitého elicitinu a genotypu *Solanum* spp. V případě oligandrinu byla pozorována zvýšená rezistence u náchylného genotypu, v případě β -CRY naopak u genotypů vykazujících určitý stupeň rezistence.

Podobně jako v dříve publikovaných studiích s elicitem INF1, po elicitaci oligandrinem a β -CRY nebyla u rajčat detekována v rámci obranných reakcí HR. Ve studii s β -CRY byla jednoznačně prokázána zvýšená hladina ROS společně s aktivitou antioxidantních enzymů GPOX a APX.

V rámci realizovaných transkripčních studií bylo s rozdílnou intenzitou u jednotlivých genotypů *Solanum* spp. prokázáno zapojení obranných proteinů patřících do skupiny tzv. PR proteinů v reakci na elicitaci α - i β -elicitiny. Vysoce rezistentní genotyp *S. habrochaites* vykazuje vysokou bazální hladinu transkriptů s prokázanou rolí v rezistenci proti širokému spektru patogenů a větší rozsah indukce obranných transkriptů po infekci.

Cílem realizovaných studií bylo odhalit, která hormonální signální dráha je aktivovaná studovanými elicitiny. Transkripční studií zaměřenou na charakterizaci genů klíčových enzymů biosyntézy ET a stanovením produkce ET bylo prokázáno, že rezistence indukovaná BABA,

oligandrinem i β -CRY u rajčete je závislá na signální dráze ET. V případě β -CRY výsledky navíc poukazují na zapojení i signální dráhy JA.

Pro další upřesnění mechanismu aktivace rezistence elicitivity byly použity dvě mutantní formy β -CRY. Aktivace obranných mechanismů mutantní formou V84F, která efekt β -CRY významně zesiluje, ukazuje, že elicitální efekt elicitinu není závislý na schopnosti vazby sterolů do struktury elicitinu. Mutantní forma β -CRY L41F, u které byla prokázána velmi malá nebo žádná interakce s vysoce afinitním místem na plazmatické membráně, není schopna podobně jako v případě tabákových rostlin aktivovat obranné mechanismy na rostlinách rajčat. Právě residuum L41 je vysoce konzervované napříč elicitivity a je lokalizováno ve strukturálně důležité pozici ω -smyčky, která hraje roli v interakci s receptorem na plazmatické membráně.

Výsledky dosažené při řešení disertační práce jsou součástí čtyř publikací a rozšiřují informace o aktivaci a mechanismech obranných reakcí vedoucí ke změnám v rezistenci rostlin, které vykazují variabilitu v závislosti na typu organismu a jeho úrovni rezistence a rovněž na typu elicitálního faktoru.

2.4 Seznam použité literatury

Adachi H., Nakano T., Miyagawa N., Ishihama N., Yoshioka M., Katou Y., Yaeno T., Shirasu K., Yoshioka H. (2015): WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **27**, 2645-2663.

Adie B. A., Pérez-Pérez J., Pérez-Pérez M. M., Godoy M., Sánchez-Serrano J. J., Schmelz E. A., Solano R. (2007): ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1665-1681.

Agrios G. N. (2005): *Plant Pathology*. 5th ed., Academic Press, London, UK, 952 stran.

Ahn I. P., Kim S., Lee Y. H., Suh S. C. (2007): Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**, 838-848.

Ali S., Ganai B. A., Kamili A. N., Bhat A. A., Mir Z. A., Bhat J. A., Tyagi A., Islam S. T., Mushtaq M., Yadav P., Rawat S., Grover A. (2018a): Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research* **212-213**, 29-37.

Ali M., Cheng Z., Ahmad H., Hayat S. (2018b): Reactive oxygen species (ROS) as defenses against a broad range of plant fungal infections and case study on ROS employed by crops against *Verticillium dahliae* wilts. *Journal of plant interactions* **13**, 353-363.

Alvarez M. A. E., Pennell R. I., Meijer P. J., Ishikawa A., Dixon R. A., Lamb C. (1998): Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**, 773-784.

Anand A., Lei Z. T., Sumner L. W., Mysore K. S., Arakane Y., Bockus W. W., Muthukrishnan S. (2004): Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 1306-1317.

Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399.

Arc E., Sechet J., Corbineau F., Rajjou L., Marion-Poll A. (2013): ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in plant science* **4**, 63.

Argueso C. T., Hansen M., Kieber J. J. (2007): Regulation of ethylene biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 92-105.

Arisz S. A., Testerink C., Munnik T. (2009): Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1791**, 869-875.

Astier J., Kulik A., Koen E., Besson-Bard A., Bourque S., Jeandroz S., Lamotte O., Wendehenne D. (2012): Protein S-nitrosylation: what's going on in plants? *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 1101-1110.

Astier J., Gross I., Durner J. (2018): Nitric oxide production in plants: an update. *Journal of Experimental Botany* **69**, 3401-3421.

Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S. (2014): Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**, 360438.

Bai Y., Lindhout P. (2007): Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany* **100**, 1085-1094.

Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., López-Jaramillo J., Padilla M. N., Carreras A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2014): Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **65**, 527-538.

- Beligni M. V., Fath A., Bethke P. C., Lamattina L., Jones R. L. (2002): Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiology* **129**, 1642-1650.
- Ben Rejeb K., Benzarti M., Debez A., Bailly C., Savoure A., Abdelly C. (2015a): NADPH oxidase-dependent H₂O₂ production is required for salt-induced antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **174**, 5-15.
- Ben Rejeb K., Lefebvre-De Vos D., Le Disquet I., Leprince A. S., Bordenave M., Maldiney R., Jdey A., Abdelly C., Savoure A. (2015b): Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **208**, 1138-1148.
- Benhamou N., Nicole M. (1999): Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**, 703-719.
- Benhamou N., Bélanger R. R., Rey P., Tirilly Y. (2001): Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 681-696.
- Benhamou N., Le Floch G., Vallance J., Gerbore J., Grizard D., Rey P. (2012): *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology* **158**, 2679-2694.
- Berens M. L., Berry H. M., Mine A., Argueso C. T., Tsuda K. (2017): Evolution of hormone signaling networks in plant defense. *Annual Review of Phytopathology* **55**, 401-425.
- Bergougnoux V. (2014): The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology Advances* **32**, 170-189.
- Berrocal-Lobo M., Stone S., Yang X., Antico J., Callis J., Ramonell K. M., Somerville S. (2010): ATL9, a RING zinc finger protein with E3 ubiquitin ligase activity implicated in chitin- and NADPH oxidase-mediated defense responses. *PLoS One* **5**, e14426
- Betsuyaku S., Katou S., Takebayashi Y., Sakakibara H., Nomura N., Fukuda H. (2018): Salicylic acid and jasmonic acid pathways are activated in spatially different domains around the infection site during effector-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **59**, 8-16.
- Bezier A., Lambert B., Baillieul F. (2002): Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 111-120.
- Binder B.-M., Kim H. J., Mathews D. E., Hutchison C. E., Kieber J. J., Schaller G. E. (2018): A role for two-component signaling elements in the Arabidopsis growth recovery response to ethylene. *Plant direct* **2**, 1-9.
- Blein J. P., Milat M. L., Ricci P. (1991): Responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*: possible plasmalemma involvement. *Plant Physiology* **95**, 486-491.
- Boissy G., O'Donohue M., Gaudemer O., Perez V., Pernollet J. C., Brunie S. (1999): The 2.1 A structure of an elicitor-ergosterol complex: a recent addition to the sterol carrier protein family. *Protein Science* **8**, 1191-1199.
- Boller T., Felix G. (2009): A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 379-406.
- Boller T., He S. Y. (2009): Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* **324**, 742-744.
- Bolte S., Talbot C., Boutte Y., Catrice O., Read N. D., Satiat-Jeunemaitre B. (2004): FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy* **214**, 159-173.

- Bonnet P. (1988): Purification de divers filtrats de culture de *Phytophthora* et activités biologiques sur le tabac des différentes fractions. *Agronomie* **4**, 347-350.
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J. P., Ricci P. (1996): Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 181-192.
- Boulaflous A., Saint-Jore-Dupas C., Herranz-Gordo M.-C., Pagny-Salehabadi S., Plasson C., Garidou F., Kiefer-Meyer M.-C., Ritzenthaler C., Faye L., Gomord V. (2009): Cytosolic N-terminal arginine-based signals together with a luminal signal target a type II membrane protein to the plant ER. *BMC Plant Biology* **9**, 144.
- Bourque S., Ponchet M., Binet M. N., Ricci P., Pugin A., Lebrun-Garcia A. (1998): Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors into tobacco cells. *Plant Physiology* **118**, 1317-1326.
- Brooks D. M., Bender C. L., Kunkel B. N. (2005): The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **6**, 629-639.
- Buchel A. S., Brederode F. T., Bol J. F., Linthorst H. J. (1999): Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. *Plant Molecular Biology* **40**, 387-396.
- Cacas J. L., Vaillau F., Davoine C., Ennar N., Agnel J.-P., Tronchet M., Ponchet M., Blein J.-P., Roby D., Triantaphylides C., Montillet J.-L. (2005): The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. *Plant, Cell & Environment* **28**, 1367-1378.
- Cacas J. L., Gerbeau-Pissot P., Fromentin J., Cantrel C., Thomas D., Jeannette E., Kalachova T., Mongrand S., Simon-Plas F., Ruelland E. (2017): Diacylglycerol kinases activate tobacco NADPH oxidase-dependent oxidative burst in response to cryptogein. *Plant, Cell & Environment* **40**, 585-598.
- Cao H., Bowling S. A., Gordon A. S., Dong X. N. (1994): Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1583-1592.
- Caverzan A., Passaia G., Rosa S. B., Ribeiro C. W., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M. (2012): Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* **35**, 1011-1019.
- Chen F., D'Auria J., Tholl D., Ross J., Gershenzon J., Noel J., Pichersky E. (2003): An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by abiochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant Journal* **36**, 577-588.
- Chen Y.-F., Etheridge N., Schaller G. E. (2005): Ethylene signal transduction. *Annals of Botany* **95**, 901-915.
- Cheng M.-C., Ko K., Chang W.-L., Kuo W.-C., Chen G.-H., Lin T.-P. (2015): Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in *Arabidopsis*. *Plant Journal for Cell Molecular Biology* **83**, 926-939.
- Chew O., Whelan J., Millar A. H. (2003): Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 46869-46877.
- Christensen A. B., Cho B. H., Naesby M., Gregersen P. L., Brandt T., Ordenna K. M., Collinge D. B., Lu G. (2002): The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis related proteins. *Molecular Plant Pathology* **3**, 135-144.
- Clark D., Durner J., Navarre D. A., Klessig D. F. (2000): Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 1380-1384.

- Cohen Y., Reuveni M., Baider A. (1999): Local and systemic activity of BABA (DL-3 aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. *European Journal of Plant Pathology* **105**, 351-361.
- Conrath U., Pieterse C., Mauch-Mani B. (2002): Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **7**, 210-216.
- Conrath U. (2009): Priming of induced plant defense responses. In: *Advances in Botanical Research*. Vol. 51, (Van Loon L. C. ed.), Academic Press, London, UK, 361-395.
- Crowell E. F., Bischoff V., Desprez T., Rolland A., Stierhof Y.-D., Schumacher K., Gonneau M., Hofte H., Vernhettes S. (2009): Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 1141-1154.
- Czarnocka W., Karpinski S. (2018): Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine* **122**, 4-20.
- Dahan J., Pichereaux C., Rossignol M., Blanc S., Wendehenne D., Pugin A., Bourque S. (2009): Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochemical Journal* **418**, 191-200.
- Dana M. D., Pintor-Toro J. A., Cubero B. (2006): Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology* **142**, 722-730.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 779-795.
- David K. M., Perrot-Rechenmann C. (2001): Characterization of a tobacco Bright Yellow 2 cell line expressing the tetracycline repressor at a high level for strict regulation of transgene expression. *Plant Physiology* **125**, 1548-1553.
- Dean J. V., Shah R. P., Mohammed L. A. (2003): Formation and vacuolar localization of salicylic acid glucose conjugates in soybean cell suspension cultures. *Plant Physiology* **118**, 328-336.
- Dean J. V., Mills J. D. (2004): Uptake of salicylic acid 2-O-beta-d-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiologia Plantarum* **120**, 603-612.
- Dean J. V., Mohammed L. A., Fitzpatrick T. (2005): The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* **221**, 287-296.
- Delaney T. P., Friedrich L., Ryals J. A. (1995): *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 6602-6606.
- Del Río L. A., Corpas F. J., Sandalio L. M., Palma J. M., Gómez M., Barroso J. B. (2002): Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1255-1272.
- De Pinto M. C., Locato V., Sgobba A., Romero-Puertas Mdel C., Gadaleta C., Delledonne M., De Gara L. (2013): S-nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signaling in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiology* **163**, 1766-1775.
- Derevnina L., Dagdas Y. F., De La Concepcion J. C., Bialas A., Kellner R., Petre B., Domazakis E., Du J., Wu C-H., Lin X., Aguilera-Galvez C., Cruz-Mireles N., Vleeshouwers V. G. A. A., Kamoun S. (2016): Nine things to know about elicitors. *New Phytologist* **212**, 888-895.
- Desikan R., Last K., Harrett-Williams R., Tagliavia C., Harter K., Hooley R., Hancock J. T., Neill S. J. (2006): Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. *The Plant Journal* **47**, 907-916.

- Doares S. H., Syrovets T., Weiler E. W., Ryan C. A. (1995): Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 4095-4098.
- Dodds P. N., Rafiqi M., Gan P. H. P., Hardham A. R., Jones D. A., Ellis J. G. (2009): Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytologist* **183**, 993-999.
- Dokládál L., Obořil M., Stejskal K., Zdráhal Z., Ptáčková N., Chaloupková R., Damborský J., Kašparovský T., Jeandroz S., Žďárská M., Lochman J. (2012): Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2203-2215.
- Drzeżdżo J., Jacewicz D., Chmurzyński L. (2018): The impact of environmental contamination on the generation of reactive oxygen and nitrogen species – Consequences for plants and humans. *Environment International* **119**, 133-151.
- Du Y. L., Wang Z. Y., Fan J. W., Turner N. C., Wang T., Li F. M. (2012): β -Aminobutyric acid increases abscisic acid accumulation and desiccation tolerance and decreases water use but fails to improve grain yield in two spring wheat cultivars under soil drying. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4849-4860.
- Du J., Verzaux E. C., Chaparro-Garcia A., Bijsterbosch G., Keizer L. C. P., Zhou J., Liebrand T. W. H., Xie C., Govers F., Robatzek S., Van der Vossen E. A. G., Jacobsen E., Visser R. G. F., Kamoun S., Vleeshouwers V. G. A. A. (2015): Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nature Plants* **1**, 15034.
- Dubiella U., Seybold H., Durian G., Komander E., Lassig R., Witte C. P., Schulze W. X., Romeis T. (2013): Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 8744-8749.
- Durrant W. E., Dong X. (2004): Systemic Acquired Resistance. *Annual review of phytopathology* **42**, 185-209.
- Ellinger D., Naumann M., Falter C., Zwikowics C., Jamrow T., Manisseri C., Somerville S. C., Voigt C. A. (2013): Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **161**, 1433-1444.
- Eckardt N. A. (2008): Oxylin signaling in plant stress responses. *Plant Cell* **20**, 495-497.
- Erwin D. C., Ribeiro O. K. (1996): *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society, Saint Paul, Minnesota, USA, 562 stran.
- Facchini P. J., Chappell J. (1992): Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 11088-11092.
- Fagard M., Dellagi A., Roux C., Perino C., Rigault M., Boucher V., Shevchik V. E., Expert D. (2007): *Arabidopsis thaliana* expresses multiple lines of defense to counterattack *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 794-805.
- Fefeu S., Bouaziz S., Huet J. C., Pernollet J. C., Guittet E. (1997): Three-dimensional solution structure of beta cryptogein, a beta elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Science* **6** (11), 2279-2284.
- Floryszak-Wieczorek J., Arasimowicz-Jelonek M., Abramowski D. (2015): BABA-primed defense responses to *Phytophthora infestans* in the next vegetative progeny of potato. *Frontiers in Plant Science* **6**, 844.
- Foolad M. R. (2007): Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics* **2007**, 64358.

- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H. F., Mylona P., Mledema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J. D. G., Davies J. M., Dolan L. (2003): Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**, 442-446.
- Foyer Ch., Noctor G. (2011): Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**, 2-18.
- Freschi L. (2013): Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **4**, 398.
- Frugoli J. A., Zhong H. H., Nuccio M. L., McCourt P., McPeck M. A., Thomas T. L., McClung C. R. (1996): Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* **112** (1), 327-336.
- Fu Z. Q., Dong X. (2013): Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 839-863.
- Fujiwara M., Hamada S., Hiratsuka M., Fukao Y., Kawasaki T., Shimamoto K. (2009): Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice. *Plant and Cell Physiology* **50**, 1191-1200.
- Garg N., Manchanda G. (2009): ROS Generation in Plants: Boon or Bane? *Plant Biosystems* **143**, 8-96.
- Gerbeau-Pissot P., Der C., Thomas D., Anca I.-A., Grosjean K., Roche Y., Perrier-Cornet J. M., Mongrand S., Simon-Plas F. (2014): Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Physiology* **164**, 273-286.
- Gill S. S., Anjum N. A., Gill R., Yadav S., Hasanuzzaman M., Fujita M., Mishra P., Sabat S. C., Tuteja N. (2015): Superoxide dismutase-mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 10375-10394.
- Glawe G. A., Zavala J. A., Kessler A., van Dam N. M., Baldwin I. T. (2003): Ecological costs and benefits correlated with trypsin protease inhibitor production in *Nicotiana attenuata*. *Ecology* **84**, 79-90.
- Glazebrook J., Rogers E. E., Ausubel F. M. (1996): Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**, 973-982.
- Glazebrook J. (2001): Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* - 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 301-308.
- Glazebrook J. (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of Phytopathology* **43**, 205-227.
- Golshani F., Fakheri B. A., Behshad E., Vashvaei R. M. (2015): PRs proteins and their mechanism in plants. *Biological Forum - An International Journal* **7**, 477-495.
- Gordon-Weeks R., Sugars J. M., Antoniuw J. F., White R. F. (1997): Accumulation of novel PR1 proteins in *Nicotiana* leaves in response to virus infection or treatment with salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**, 263-273.
- Hahn M. G. (1996): Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 387-412.
- Hakim, Ullah A., Hussain A., Shaban M., Khan A. H., Alariqi M., Gul S., Jun Z., Lin S., Li J., Jin S., Munis M. F. H. (2018): Osmotin: A plant defense tool against biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **123**, 149-159.
- Hamiduzzaman M. M., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus J. M., Mauch-Mani B. (2005): β -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 819-829.

Hammerschmidt R., Nicholson R. L. (1999): A survey of plant defense responses to pathogens. In: *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture*. (Agrawal A., Tuzun S., Bent E. eds.), American Phytopathological Society, Saint Paul, Minnesota, USA, 55-71.

Hao L. H., Wang W. X., Chen C., Wang Y. F., Liu T., Li X., Shang Z. L. (2012): Extracellular ATP promotes stomatal opening of *Arabidopsis thaliana* through heterotrimeric G protein alpha subunit and reactive oxygen species. *Molecular Plant* **5**, 852-864.

Hao H., Fan L., Chen T., Li R., Li X., He Q., Botella M. A., Lin J. (2014): Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 1729-1745.

Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M. (2013): Extreme Temperature Responses, Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants. In: *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. (Vahdati K., ed.), InTechOpen, Rijeka, Chorvatsko, 169-205.

Hasanuzzaman M., Nahar K., Anee T. I., Fujita M. (2017): Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **23**, 249-268.

Hase S., Shimizu A., Nakaho K., Takenaka S., Takahashi H. (2006): Induction of transient ethylene and reduction in severity of tomato bacterial wilt by *Pythium oligandrum*. *Plant Pathology* **55**, 537-543.

Hase S., Takahashi S., Takenaka S., Nakaho K., Arie T., Seo S., Ohashi Y., Takahashi H. (2008): Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathology* **57**, 870-876.

He H., Van Breusegem F., Mhamdi A. (2018): Redox-dependent control of nuclear transcription in plants. *Journal of Experimental Botany* **69**, 3359-3372.

Hennig J., Malamy J., Gryniewicz G., Indulski J., Klessig D. F. (1993): Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant Journal* **4**, 593-600.

Hettenhausen C., Schuman M. C., Wu J. (2015): MAPK signaling: a key element in plant defense response to insects. *Insect Science* **22**, 157-164.

Hoffmann-Sommergruber K. (2000): Plant allergens and pathogenesis-related proteins: what do they have in common? *International Archives of Allergy and Immunology* **122**, 155-166.

Hossain M. A., Bhattacharjee S., Armin S.-M., Qian P., Xin W., Li H.-Y., Burritt D. J., Fujita M., Tran L. S. P. (2015): Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science* **6**, 420.

Hu X., Neill S., Cai W., Tang Z. (2003): Hydrogen peroxide and jasmonic acid mediate oligogalacturonic acid-induced saponin accumulation in suspension-cultured cells of *Panax ginseng*. *Physiologia Plantarum* **118**, 414-421.

Huang C. C., Groot T., Meijer-Dekens F., Niks R. E., Lindhout P. (1998): The resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon* species is mainly associated with hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 399-407.

Hwang H.-J., Kim H., Yu H.-J., Oh M.-H., Lee I., Kim S.-G. (2003): Gene encoding pathogenesis-related 10 protein of *Lithospermum* is responsive to exogenous stimuli related to plant defense system. *Plant Science* **165**, 1297-1302.

Index Fungorum: <http://www.indexfungorum.org/Names/namesrecord.asp?RecordID=231743> (7.9.2017)

Index Fungorum: <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=272830> (7.9.2017)

Index Fungorum: <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=467775> (7.9.2017)

- Iqbal N., Trivellini A., Masood A., Ferrante A., Khan N. A. (2013): Current understanding on ethylene signalling in plants: the influence of nutrient availability. *Plant Physiology and Biochemistry* **73**, 128-138.
- Iriti M., Giulia C., Sara V., Ilaria M., Soave C., Fico G., Faoro F. (2010): Chitosan-induced ethylene-independent resistance does not reduce crop yield in bean. *Biological Control* **54**, 241-247.
- Jakab G., Cottier V., Toquin V., Rigoli G., Zimmerli L., Métraux J.-P., Mauch-Mani B. (2001): β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 29-37.
- Janků M., Luhová L., Petřivalský M. (2019): On the Origin and Fate of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Compartments. *Antioxidants* **8**, 105.
- Jia Z., Zou B., Wang X., Qiu J., Ma H., Gou Z., Song S., Dong H. (2010): Quercetin-induced H₂O₂ mediates the pathogen resistance against *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **396**, 522-527.
- Jiang S., Yao J., Ma K.-W., Zhou H., Song J., He S. Y., Ma W. (2013): Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. *PLoS Pathogens* **9**, e1003715.
- Jimenez A., Hernandez J. A., Del Rio L. A., Sevilla F. (1997): Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* **114**, 275-284.
- Jones H., Whipps J. M., Gurr S. J. (2001): The tomato powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*. *Molecular Plant Pathology* **2**, 303-309.
- Jones J. D., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Jupe J., Stam R., Howden A. J. M., Morris J. A., Zhang R., Hedley P. E., Huitema E. (2013): *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemibiotrophic lifestyle. *Genome Biology* **14**, R63.
- Kadota Y., Sklenar J., Derbyshire P., Stransfeld L., Asai S., Ntoukakis V., Jones J. D., Shirasu K., Menke F., Jones A., Zipfel C. (2014): Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR associated kinase BIK1 during plant immunity. *Molecular Cell* **54**, 43-55.
- Kadota Y., Shirasu K., Zipfel C. (2015): Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant and Cell Physiology* **56**, 1472-1480.
- Kamoun S., Van West P., De Jong A. J., De Groot K. E., Vleeshouwers V. G. A. A., Govers F. (1997): A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 13-20.
- Kamoun S. (2006): A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 41-60.
- Kamoun S. (2007): Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 358-365.
- Kandath P. K., Ranf S., Pancholi S. S., Jayanty S., Walla M. D., Miller W., Howe G. A., Lincoln D. E., Stratmann J. W. (2007): Tomato MAPKs *LeMPK1*, *LeMPK2*, and *LeMPK3* function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 12205-12210.
- Karapetyan S., Dong X. (2018): Redox and the circadian clock in plant immunity: a balancing act. *Free Radical Biology and Medicine* **119**, 56-61.
- Karuppanapandian T., Moon J. C., Kim C., Manoharan K., Kim W. (2011): Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* **5**, 709-725.

- Katsir L., Schillmiller A. L., Staswick P. E., He S. Y., Howe G. A. (2008): COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 7100-7105.
- 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. *Journal of Phytopathology* **157**, 287-297.
- Keller H., Blein J. P., Bonnet P., Ricci P. (1996a): Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiology* **110**, 365-376.
- Keller H., Bonnet P., Galiana E., Pruvot L., Friedrich L., Ryals J., Ricci P. (1996b): Salicylic acid mediates elicitor-induced systemic acquired resistance, but not necrosis in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**, 696-703.
- Kessler A., Baldwin I. T. (2002): Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 299-328.
- Keyster M., Klein A., Egbichi I., Jacobs A., Ludidi N. (2011): Nitric oxide increases the enzymatic activity of three ascorbate peroxidase isoforms in soybean root nodules. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 956-961.
- Khan T. A., Yusuf M., Fariduddin Q. (2018): Hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism: Signalling and its effect under abiotic stress. *Photosynthetica* **56**, 1237-1248.
- Khokon M., Okuma E., Hossain M. A., Munemasa S., Uraji M., Nakamura Y., Mori I. C., Murata Y. (2011): Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **34**, 434-443.
- Kinkema M., Fan W. H., Dong X. N. (2000): Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* **12**, 2339-2350.
- Kliebenstein D. J. (2012): Plant defense compounds: systems approaches to metabolic analysis. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 155-173.
- Knight H., Knight M. R. (2001): Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* **6**, 262-267.
- Koffler B. E., Bloem E., Zellnig G., Zechmann B. (2013): High resolution imaging of subcellular glutathione concentrations by quantitative immunoelectron microscopy in different leaf areas of *Arabidopsis*. *Micron* **45**, 119-128.
- Kombrink E., Schmelzer E. (2000): The Hypersensitive Response and its Role in Local and Systemic Disease Resistance. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 69-78.
- Kulik A., Noirot E., Grandperret V., Bourque S., Fromentin J., Salloignon P., Truntzer C., Dobrowolska G., Simon-Plas F., Wendehenne D. (2015): Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogein signalling. *Plant, Cell & Environment* **38**, 331-348.
- Lam S. K., Siu C. L., Hillmer S., Jang S., An G., Robinson D. G., Jiang L. (2007): Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-Golgi-located tubular vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* **19**, 296-319.
- Lascombe M. B., Milat M. L., Blein J. P., Panabières F., Ponchet M., Prangé T. (2000): Crystallization and preliminary X-ray studies of oligandrin, a sterol-carrier elicitor from *Pythium oligandrum*. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography* **56** (Pt 11), 1498-1500.
- Lässig R., Gutermuth T., Bey T. D., Konrad K. R., Romeis T. (2014): Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *Plant Journal* **78**, 94-106.

- Łaźniewska J., Macioszek V. K., Kononowicz A. K. (2012): Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **78**, 24-30.
- Le P. U., Nabi I. R. (2003): Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* **116**, 1059-1071.
- Lebeda A., Mieslerová B., Petřivalský M., Luhová L., Špundová M., Sedlářová M., Nožková-Hlaváčková V., Pink D. A. C. (2014): Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolycopersici*. *European Journal of Experimental Botany* **138**, 569-596.
- Le Berre J. Y., Panabieres F., Ponchet M., Denoroy L., Bonnet P., Marais A., Ricci P. (1994): Occurrence of multiple forms of elicitors in *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**, 251-258.
- Leborgne-Castel N., Lherminier J., Der C., Fromentin J., Houot V., Simon-Plas F. (2008): The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiology* **146**, 1255-1266.
- Leborgne-Castel N., Adam T., Bouhidel K. (2010): Endocytosis in plant-microbe interactions. *Protoplasma* **247**, 177-193.
- Le Floch G., Rey P., Benizri E., Benhamou N., Tirilly Y. (2003): Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant and Soil* **257**, 459-470.
- Leitch I. J., Hanson L., Lim K. Y., Kovarik A., Chase M. W., Clarkson J. J., Leitch A. R. (2008): The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (*Solanaceae*). *Annals of Botany* **101**, 805-814.
- Leon-Reyes A., Spoel S. H., De Lange E. S., Abe H., Kobayashi M., Tsuda S., Millenaar F. F., Welschen R. A., Ritsema T., Pieterse C. M. (2009): Ethylene modulates the role of *NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1* in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiology* **149**, 1797-1809.
- Leshem Y., Seri L., Levine A. (2007): Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant Journal* **51**, 185-197.
- Leubner-Metzger G., Meins F. Jr (1999): Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). In: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. (Datta S. K., Muthukrishnan S., eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 49-76.
- Lherminier J., Benhamou N., Larrue J., Milet M.-L., Boudon-Padieu E., Nicole M., Blein J.-P. (2003): Cytological characterization of elicitor induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. *Phytopathology* **93**, 1308-1319.
- Lherminier J., Elmayan T., Fromentin J., Elaraqui K. T., Vesa S., Morel J., Verrier J.-L., Cailleteau B., Blein J.-P., Simon-Plas F. (2009): NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 868-881.
- Li L., Li C., Lee G. I., Howe G. A. (2002): Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 6416-6421.
- Li L., Li M., Yu L., Zhou Z., Liang X., Liu Z., Cai G., Gao L., Zhang X., Wang Y., Chen S., Zhou J. M. (2014): The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host & Microbe* **15**, 329-338.
- Li J., Li C., Smith S. M. (2017): *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. 1st ed., Academic Press, London, UK, 616 stran.

- Lin Z., Zhong S., Grierson D. (2009): Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3311-3336.
- Liu D., Raghothama K. G., Hasegawa P. M., Bressan R. A. (1994): Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 1888-1892.
- Liu P.-P., Yang Y., Pichersky E., Klessig D. F. (2010): Altering expression of benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase 1 compromises systemic acquired resistance and PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 82-90.
- Liu Y. (2012): Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling. *Plant Cell Reports* **31**, 1-12.
- Liu Y., He C. (2016): Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Reports* **35**, 995-1007.
- Locato V., Cimini S., De Gara L. (2018): ROS and redox balance as multifaceted players of cross-tolerance: epigenetic and retrograde control of gene expression. *Journal of Experimental Botany* **69**, 3373-3391.
- Lochman J., Kašparovský T., Damborský J., Osman H., Marais A., Chaloupková R., Ponchet M., Blein J. P., Mikeš V. (2005): Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry* **44**, 6565-6572.
- Lopez-Kleine L., Pinzon A., Chaves D., Restrepo S., Riano-Pachon D. M. (2013): Chromosome 10 in the tomato plant carries clusters of genes responsible for field resistance/defence to *Phytophthora infestans*. *Genomics* **101**, 249-255.
- Lorenzo O., Chico J. M., Sánchez-Serrano J. J., Solano R. (2004): *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 1938-1950.
- Lou B., Wan A., Lin Ch., Xu T., Zhen X. (2011): Enhancement of defense responses by oligandrin against *Botrytis cinerea* in tomatoes. *African Journal of Biotechnology* **10**, 11442-11449.
- Lu F., Liang X., Lu H., Li Q., Chen Q., Zhang P., Li K., Liu G., Yan W., Song J., Duan C., Zhang L. (2017): Overproduction of superoxide dismutase and catalase confers cassava resistance to *Tetranychus cinnabarinus*. *Scientific Reports* **7**, 40179.
- Luna E., López A., Kooima J., Ton J. (2014): Role of NPR1 and KYP in long-lasting induced resistance by β -aminobutyric acid. *Frontiers in Plant Science* **5**, 184.
- Macho A. P., Boutrot F., Rathjen J. P., Zipfel C. (2012): ASPARTATE OXIDASE plays an important role in *Arabidopsis* stomatal immunity. *Plant Physiology* **159**, 1845-1856.
- Malá J., Máchová P., Cvrčková H., Karady M., Novák O., Mikulík J., Hauserová E., Greplová J., Strnad M., Doležal K. (2009): Micropropagation of wild service tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz): the regulative role of different aromatic cytokinins during organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**, 341.
- Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. (2012): A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science* **17**, 9-15.
- Martin F. N., Abad Z. G., Balci Y., Ivors K. (2012): Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease Journal* **96**, 1080-1103.
- Martin F. N., Blair J. E., Coffey M. D. (2014): A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology* **66**, 19-32.
- Martínez-Aguilar K., Ramírez-Carrasco G., Hernández-Chávez J. L., Barraza A., Alvarez-Venegas R. (2016): Use of BABA and INA as activators of a primed state in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Frontiers in Plant Science* **7**, 653.

- Mazzotta S., Kemmerling B. (2011): Pattern recognition in plant innate immunity. *Journal of Plant Pathology* **93**, 7-17.
- McDowell J. M., Dangl J. L. (2000): Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 79-82.
- Merchante C., Alonso J. M., Stepanova A. N. (2013): Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 554-560.
- Mersmann S., Bourdais G., Rietz S., Robatzek S. (2010): Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiology* **154**, 391-400.
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. (2010): Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4197-4220.
- Mieslerová B., Lebeda A., Chetelat R. T. (2000): Variation in response of wild *Lycopersicon* and *Solanum* spp. against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). *Journal of Phytopathology* **148**, 303-311.
- Mieslerová B., Lebeda A., Kennedy R. (2004): Variation in *Oidium neolycopersici* development on host and non-host plant species and their tissue defence responses. *Annals of Applied Biology* **144**, 237-248.
- Mieslerová B., Lebeda A. (2010): Influence of temperature and light conditions on germination, growth and conidiation of *Oidium neolycopersici*. *Journal of Phytopathology* **158**, 616-627.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **245**, 133-139.
- Milhas D., Clarke C. J., Idkowiak-Baldys J., Canals D., Hannun Y. A. (2010): Anterograde and retrograde transport of neutral sphingomyelinase-2 between the Golgi and the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **1801**, 1361-1374.
- Miller G., Shulaev V., Mittler R. (2008): Reactive oxygen signalling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* **133**, 481-489.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004): Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 490-498.
- Mlíčková K., Luhová L., Lebeda A., Mieslerová B., Peč P. (2004): Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant physiology and biochemistry* **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.
- Monaghan J., Matschi S., Shorinola O., Rovenich H., Matei A., Segonzac C., Malinovsky F. G., Rathjen J. P., MacLean D., Romeis T., Zipfel C. (2014): The calcium-dependent protein kinase CPK28 buffers plant immunity and regulates BIK1 turnover. *Cell Host & Microbe* **16**, 605-615.
- Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde J.-P., Hartmann M.-A., Bonneau M., Simon-Plas F., Lessire R., Bessoule J.-J. (2004): Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 36277-36286.

- Morel J., Claverol S., Mongrand S., Furt F., Fromentin J., Bessoule J.-J., Blein J.-P., Simon-Plas F. (2006): Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Molecular and Cellular Proteomics* **5**, 1396-1411.
- Mou Z., Fan W. H., Dong X. N. (2003): Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**, 935-944.
- Mur L. A. J., Santosa I. E., Laarhoven L. J. J., Holton N. J., Harren F. J. M., Smith A. R. (2005): Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars. *Plant Physiology* **138**, 1247-1258.
- Mur L. A. J., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C. (2006): The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* **140**, 249-262.
- Mur L. A. J., Laarhoven L. J. J., Harren F. J. M., Hall M. A., Smith A. R. (2008): Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response. *Plant Physiology* **148**, 1537-1546.
- Mur L. A. J., Prats E., Pierre S., Hall M. A., Hebelstrup K. H. (2013): Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ ethylene plant defense pathways. *Frontiers in Plant Science* **4**, 215.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1237-1247.
- Nichols B. J., Kenworthy A. K., Polishchuk R. S., Lodge R., Roberts T. H., Hirschberg K., Phair R. D., Lippincott-Schwartz J. (2001): Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *Journal of Cell Biology* **153**, 529-541.
- Nitta Y., Ding P., Zhang Y. (2015): Heterotrimeric G proteins in plant defense against pathogens and ABA signaling. *Environmental and Experimental Botany* **114**, 153-158.
- Nisar N., Li L., Lu S., Khin N. C., Pogson B. J. (2015): Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant* **8**, 68-82.
- Noctor G., Reichheld J.-P., Foyer Ch. H. (2018): ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **80**, 3-12.
- Noirot E., Der C., Lherminier J., Robert F., Moricova P., Kiêu K., Leborgne-Castel N., Simon-Plas F., Bouhidel K. (2014): Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5011-5022.
- Norman-Setterblad C., Vidal S., Palva E. T. (2000): Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 430-438.
- Noutoshi Y., Okazaki M., Kida T., Nishina Y., Morishita Y., Ogawa T., Suzuki H., Shibata D., Jikumaru Y., Hanada A., Kamiya Y., Shirasu K. (2012): Novel plant immune-priming compounds identified via high-throughput chemical screening target salicylic acid glucosyltransferases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 3795-3804.
- Oda T., Hashimoto H., Kuwabara N., Akashi S., Hayashi K., Kojima C., Wong H. L., Kawasaki T., Shimamoto K., Sato M., Shimizu T. (2010): Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 1435-1445.
- Oldach K. H., Becker D., Lorz H. (2001): Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Molecular Plant- Microbe Interactions* **14**, 832-838.
- Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Yang Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Nara M., Suzuki K., Tanokura M., Kuchitsu K. (2008): Synergistic activation of the

Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 8885-8892.

Olendo F. G., Molino A., Palenzuela P. R. (1999): Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**, 479-491.

Oostendorp M., Kunz W., Dietrich B., Staub T. (2001): Induced Disease Resistance in Plants by Chemicals. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 19-28.

Orozco-Cardenas M. L., Ryan C. A. (1999): Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 6553-6557.

Orozco-Cardenas M. L., Narváez-Vásquez J., Ryan C. A. (2001): Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell* **13**, 179-191.

Orozco-Cardenas M. L., Ryan C. A. (2002): Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiology* **130**, 487-493.

Oswald W., Fleischmann F., Rigling D., Coelho A. C., Cravador A., Diez J., Dalio R. J., Horta Jung M., Pfanz H., Robin C., Sipos G., Solla A., Cech T., Chambery A., Diamandis S., Hansen E., Jung T., Orlikowski L. B., Parke J., Prospero S., Werres S. (2014): Strategies of attack and defence in woody plant-*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology* **44**, 169-190.

Ouyang Z., Li X., Huang L., Hong Y., Zhang Y., Zhang H., Li D., Song F. (2015): Elicitin-like proteins Oli-D1 and Oli-D2 from *Pythium oligandrum* trigger hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana* and induce resistance against *Botrytis cinerea* in tomato. *Molecular Plant Pathology* **16**, 238-250.

Panabières F., Marais A., Le Berre J. Y., Penot I., Fournier D., Ricci P. (1995): Characterization of a gene cluster of *Phytophthora cryptogea* which codes for elicitins, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 996-1003.

Panabières F., Birch P. R., Unkles S. E., Ponchet M., Lacourt I., Venard P., Keller H., Allasia V., Ricci P., Duncan J. M. (1998): Heterologous expression of a basic elicitin from *Phytophthora cryptogea* in *Phytophthora infestans* increases its ability to cause leaf necrosis in tobacco. *Microbiology* **144**, 3343-3349.

Panabières F., Le Berre J. Y. (1999): A family of repeated DNA in genome of the oomycete plant pathogen *Phytophthora cryptogea*. *Current genetics* **36**, 105-112.

Pandey P., Singh J., Achary V. M. M., Reddy M. K. (2015): Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway. *Frontiers in Environmental Science* **3**, 25.

Pastor V., Blamer A., Gamir J., Flors V., Mauch-Mani B. (2014): Preparing to fight back: generation and storage of priming compounds. *Frontiers in Plant Science* **5**, 295.

Peer M., Bach M., Mueller M. J., Waller F. (2011): Free sphingobases induce RBOHD-dependent reactive oxygen species production in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Letters* **585**, 3006-3010.

Pei Y., Li X., Zhu Y., Ge X., Sun Y., Liu N., Jia Y., Li F., Hou Y. (2019): GhABP19, a novel germin-like protein from *Gossypium hirsutum*, plays an important role in the regulation of resistance to *Verticillium* and *Fusarium* Wilt Pathogens. *Frontiers in Plant Science* **10**, 583.

Pennecks I. A., Eggermont K., Terra F. R. G., Thomma B. P. H., Buchlag A., Metraux J. P., Broeckaert W. F. (1996): Pathogen induced activation of plant defense gene is independent of salicylic acid. *Plant Cell* **8**, 2309-2323.

Pernollet J. C., Sallantin M., Salletourne M., Huet J. C. (1993): Elicitin isoforms from 7 *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**, 53-67.

Pethybridge G. H., Lafferty H. A. (1919): A disease of tomato and other plants caused by a new species of *Phytophthora*. *Science Proceedings of the Royal Dublin Society* **15**, 487-503.

Petroutsos D., Amiar S., Abida H., Dolch L.-J., Bastien O., Rébeillé F., Jouhet J., Falconet D., Block M. A., McFadden G. I., Bowler C., Botté C., Maréchal E. (2014): Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways—from cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research* **54**, 68-85.

Picard K., Ponchet M., Blein J. P., Rey P., Tirilly Y., Benhamou N. (2000): Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiology* **124**, 379-396.

Pieterse C., Van Pelt J., Verhagen B., Ton J., Van Wees A. C. M., Léon-Kloosterziel K. M., Van Loon L. C. (2003): Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis* **35**, 39-54.

Pieterse C. M., Van Loon L. C. (2004): NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 456-464.

Pieterse C. M., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Van Wees S. C. (2009): Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**, 308-316.

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.

Piterková J., Petřivalský M., Luhová L., Mieslerová B., Sedlářová M., Lebeda A. (2009): Local and systemic production of nitric oxide and tomato responses to powdery mildew infection. *Molecular plant pathology* **10**, 501-513.

Piterková J., Hofman J., Mieslerová B., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A., Petřivalský M. (2011): Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp. - *Oidium neolycopersici* interactions. *Environmental and Experimental Botany* **74**, 37-44.

Pitzschke A., Hirt H. (2006): Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiology* **141**, 351-356.

Plešková V., Kašparovský T., Obořil M., Ptáčková N., Chaloupková R., Ladislav D., 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 Physiology Biochemistry* **49**, 321-328.

Pogany M., Von Rad U., Grun S., Dongo A., Pintye A., Simoneau P., Bahnweg G., Kiss L., Barna B., Durner J. (2009): Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis*-*Alternaria* pathosystem. *Plant Physiology* **151**, 1459-1475.

Pokotylo I., Pejchar P., Potocký M., Kocourková D., Krčková Z., Ruelland E., Kravets V., Martinec J. (2013): The plant non-specific phospholipase C gene family. Novel competitors in lipid signalling. *Progress in Lipid Research* **52**, 62-79.

Pokotylo I., Kolesnikov Y., Kravets V., Zachowski A., Ruelland E. (2014): Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: variations around a canonical theme. *Biochimie* **96**, 144-157.

Ponchet M., Panabieres F., Milat M. L., Mikeš V., Montillet J. L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y., Blein J. P. (1999): Are elicitins cryptograms in plant-*Oomycete* communications? *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**, 1020-1047.

Ptáčková N., Klempová J., Obořil M., Nedělová S., Lochman J., Kašparovský T. (2015): The effect of cryptogein with changed abilities to transfer sterols and altered charge distribution on extracellular alkalization, ROS and NO generation, lipid peroxidation and LOX gene transcription in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology and Biochemistry* **97**, 82-95.

- Pugin A., Frachisse J. M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R., Guern J. (1997): Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *The Plant Cell* **9**, 2077-2091.
- Qi J., Song C. P., Wang B., Zhou J., Kangasjarvi J., Zhu J.-K., Gong Z. (2018): Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack. *Journal of Integrative Plant Biology* **60**, 805-826.
- Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavarz T. (2003): Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **37**, 91-102.
- Rahikainen M., Pascual J., Alegre S., Durian G., Kangasjärvi S. (2016): PP2A phosphatase as a regulator of ROS signaling in plants. *Antioxidants* **5**, 8.
- Ranjan A., Vadassery J., Patel H. K., Pandey A., Palaparathi R., Mithöfer A., Sonti R. V. (2015): Upregulation of jasmonate biosynthesis and jasmonate-responsive genes in rice leaves in response to a bacterial pathogen mimic. *Functional & Integrative Genomics* **15**, 363-373.
- Rekhter D., Lüdke D., Ding Y., Feussner K., Zienkiewicz K., Lipka V., Wiermer M., Zhang Y., Feussner I. (2019): PBS3 is the missing link in plant-specific isochlorismate-derived salicylic acid biosynthesis. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/600692>
- Rey P., Le Floch G., Benhamou N., Tirilly Y. (2008): *Pythium oligandrum* biocontrol: its relationships with fungi and plants. In: *Plant-Microbe Interactions*. (Barka E. A. a Clément C., eds.), Research Signpost, Kerala, India, 43-67.
- Ricci P., Bonnet P., Huet J. C., Sallantin M., Beauvais-Cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G., Pernollet J. C. (1989): Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Biochemistry* **183**, 555-563.
- Ridout C. J. (2009): Profiles in Pathogenesis and Mutualism: Powdery Mildews. In: *The Mycota. Plant Relationships*, 2nd ed., (Deising H. B., ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, 51-68.
- Ritzenthaler C., Nebenfuhr A., Movafeghi A., Stussi-Garaud C., Behnia L., Pimpl P., Staehelin L. A., Robinson D. G. (2002): Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *The Plant Cell* **14**, 237-261.
- Robert N., Roche K., Lebeau Y., Breda C., Boulay M., Esnault R., Buffard D. (2002): Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Science* **162**, 389-400.
- Robert-Seilaniantz A., Navarro L., Bari R., Jones J. D. (2007): Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 372-379.
- Rodriguez M. C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621-649.
- Rosnoblet C., Bègue H., Blanchard C., Pichereaux C., Besson-Bard A., Aimé S., Wendehenne D. (2017): Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogein-induced immune response in tobacco. *Plant, Cell & Environment* **40**, 491-508.
- Ruan J., Zhou Y., Zhou M., Yan J., Khurshid M., Weng W., Cheng J., Zhang K. (2019): Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 2479.
- Rustérucci C., Montillet J. L., Agnel J. P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J. J., Etienne P., Suty L., Blein J. P., Triantaphylidès C. (1999): Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 36446-36455.

- Sagi M., Fluhr R. (2006): Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* **141**, 336-340.
- Sandor R., Der C., Grosjean K., Anca I., Noirot E., Leborgne-Castel N., Lochman J., Simon-Plas F., Gerbeau-Pissot P. (2016): Plasma membrane order and fluidity are diversely triggered by elicitors of plant defence. *Journal of Experimental Botany* **67**, 5173-5185.
- Satková P., Starý T., Plešková V., Zapletalová M., Kašparovský T., Činčalová-Kubienová L., Luhová L., Mieslerová B., Mikulík J., Lochman J., Petřivalský M. (2017): Diverse responses of wild and cultivated tomato to BABA, oligandrin and *Oidium neolycopersici* infection. *Annals of Botany* **119** (5), 829-840.
- Savatin D. V., Bisceglia N. G., Marti L., Fabbri C., Cervone F., De Lorenzo G. (2014): The *Arabidopsis* NUCLEUS- AND PHRAGMOPLAST-LOCALIZED KINASE1-related protein kinases are required for elicitor-induced oxidative burst and immunity. *Plant Physiology* **165**, 1188-1202.
- SCOPe (Structural Classification of Proteins - extended): <http://scop.berkeley.edu/sunid=48649> (1.9.2019)
- Segarra G., Jáuregui O., Casanova E., Trillas I. (2006): Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress. *Phytochemistry* **67**, 395-401.
- Sels J., Mathys J., De Coninck B., Bruno C., De Bolle M. (2008): Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 941-950.
- Shah J., Tsui F., Klessig D. F. (1997): Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 69-78.
- Sharma P. C., Ito A., Shimizu T., Terauchi R., Kamoun S., Saitoh H. (2003): Virus-induced silencing of *WIPK* and *SIPK* genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Genetics and Genomics* **269**, 583-591.
- Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* **2012**, 217037.
- Shigenaga A. M., Argueso C. T. (2016): No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **56**, 174-189.
- Shivakumar P. D., Vasanthi N. S., Shetty H. S., Petersen V. S. (2000): Ribonucleases in the seedlings of pearl millet and their involvement in resistance against downy mildew disease. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 825-836.
- Siegrist J., Orober M., Buchenauer H. (2000): β -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **56**, 95-106.
- Simon-Plas F., Elmayan T., Blein J.-P. (2002): The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant Journal* **31**, 137-147.
- Sinha M., Singh R. P., Kushwaha G. S., Iqbal N., Singh A., Kaushik S., Kaur P., Sharma S., Singh T. P. (2014): Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related Protein Families. *Scientific World Journal* **16**, 543195.
- Skottke K. R., Yoon G. M., Kieber J. J., DeLong A. (2011): Protein phosphatase 2A controls ethylene biosynthesis by differentially regulating the turnover of ACC synthase isoforms. *PLoS Genetics* **7**, e1001370.
- Slaughter A., Daniel X., Flors V., Luna E., Hohn B., Mauch-Mani B. (2012): Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiology* **158**, 835-843.

- Slesak I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S., Miszalski Z. (2007): The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta biochimica Polonica* **54**, 39-50.
- Song C. J., Steinebrunner I., Wang X., Stout S. C., Roux S. J. (2006): Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**, 1222-1232.
- Song L. X., Xu X. C., Wang F. N., Wang Y., Xia X. J., Shi K., Zhou Y. H., Zhou J., Yu J. Q. (2018): Brassinosteroids act as a positive regulator for resistance against root-knot nematode involving RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG-dependent activation of MAPKs in tomato. *Plant, Cell and Environment* **41**, 1113-1125.
- Speth E. B., Lee Y. N., He S. Y. (2007): Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 580-586.
- Spoel S. H., Dong X. (2012): How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* **12**, 89-100.
- Starý T., Satková P., Piterková J., Mieslerová B., Luhová L., Mikulík J., Kašparovský T., Petřivalský M., Lochman J. (2019): The elicitor β -cryptogein's activity in tomato is mediated by jasmonic acid and ethylene signalling pathways independently of elicitor-sterol interactions. *Planta* **249**, 739-749.
- Sticher L., Mauch-Mani B., Metraux J. P. (1997): Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **35**, 235-270.
- Sudisha J., Sharathchandra R. G., Amruthesh K. N., Kumar A., Shetty H. S. (2012): Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response. In: *Plant Defence: Biological Control*. 1st ed., (Merillon J. M., Ramawat K. G.), Springer Netherlands, Dordrecht, Nizozemsko, 379-404.
- Suhita D., Raghavendra A. S., Kwak J. M., Vavasseur A. (2004): Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate-and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology* **134**, 1536-1545.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M. A., Mittler R. (2011): Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 691-699.
- Tada Y., Spoel S. H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008): Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952-956.
- Takenaka S., Nishio Z., Nakamura Y. (2003): Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathology* **93**, 1228-1232.
- Takenaka S., Nakamura Y., Kono T., Sekiguchi H., Masunaka A., Takahashi H. (2006): Novel elicitor-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. *Molecular Plant Pathology* **7**, 325-339.
- Takenaka S., Sekiguchi H., Nakaho K., Tojo M., Masunaka A., Takahashi H. (2008): Colonization of *Pythium oligandrum* in the tomato rhizosphere for biological control of bacterial wilt disease analyzed by real-time PCR and confocal laser-scanning microscopy. *Phytopathology* **98**, 187-195.
- Tavernier E., Wendehenne D., Blein J.-P., Pugin A. (1995): Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiology* **109**, 1025-1031.
- Thakker J. N., Patel S., Dhandhukia P. C. (2013): Induction of Defense-Related Enzymes in Banana Plants: Effect of Live and Dead Pathogenic Strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *ISRN Biotechnology* **2013**, 601303.

- Thines M., Kamoun, S. (2010): Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 427-433.
- Thomma B. P. H. J., Cammel B. P. A., Thevissen K. (2002): Plant defensins. *Biopolymers* **47**, 479-491.
- Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P., Lebeda A. (2006): Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**, 22-32.
- Ton J., Van Pelt J. A., Van Loon L. C., Pieterse C. M. J. (2002): Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 27-34.
- Ton J., Mauch-Mani B. (2004): β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal* **38**, 119-130.
- Ton J., Jakab G., Toquin V., Flors V., Iavicoli A., Maeder M. N., Métraux J. P., Mauch-Mani B. (2005): Dissecting the β -Aminobutyric Acid-Induced Priming Phenomenon in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 987-999.
- Torenero P., Conejero V., Vera P. (1997): Identification of a new pathogen induced member of subtilisin like processing family from plants. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 14412-14419.
- Torres M. A., Dangl J. L., Jones J. D. G. (2002): *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 517-522.
- Torres M. A., Jones J. D. G., Dangl J. L. (2006): Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* **141**, 373-378.
- Torrens-Spence M. P., Bobokalonova A., Carballo V., Glinkerman Ch. M., Pluskal T., Shen A., Weng J. K. (2019): PBS3 and EPS1 complete salicylic acid biosynthesis from isochorismate in *Arabidopsis*. doi: <https://doi.org/10.1101/601948>
- Tovar-Méndez A., Matamoros M. A., Bustos-Sanmamed P., Dietz K. J., Cejudo F. J., Rouhier N., Sato S., Tabata S., Becana M. (2011): Peroxiredoxins and NADPH-dependent thioredoxin systems in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **156**, 1535-1547.
- Tripathy B. C., Oelmüller R. (2012): Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 1621-1633.
- Tsuda K. (2018): Division of Tasks: Defense by the Spatial Separation of Antagonistic Hormone Activities. *Plant and Cell Physiology* **59**, 3-4.
- Tyler B. M., Tripathy S., Zhang X., Dehal P., Jiang R. H., Aerts A., Arredondo F. D., Baxter L., Bensasson D., Beynon J. L., Chapman J., Damasceno C. M., Dorrance A. E., Dou D., Dickerman A. W., Dubchak I. L., Garbelotto M., Gijzen M., Gordon S. G., Govers F., Grunwald N. J., Huang W., Ivors K. L., Jones R. W., Kamoun S., Krampis K., Lamour K. H., Lee M. K., McDonald W. H., Medina M., Meijer H. J., Nordberg E. K., Maclean D. J., Ospina-Giraldo M. D., Morris P. F., Phuntumart V., Putnam N. H., Rash S., Rose J. K., Sakihama Y., Salamov A. A., Savidor A., Scheuring C. F., Smith B. M., Sobral B. W., Terry A., Torto-Alalibo T. A., Win J., Xu Z., Zhang H., Grigoriev I. V., Rokhsar D. S., Boore J. L. (2006): *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**, 1261-1266.
- Uhlíková H., Obořil M., Klempová J., Šedo O., Zdráhal Z., Kašparovský T., Skládal P., Lochman J. (2016): Elicitin-induced distal systemic resistance in plants is mediated through the protein-protein interactions influenced by selected lysine residues. *Frontiers in Plant Science* **7**, 59.
- Uppalapati S. R., Ishiga Y., Wangdi T., Kunkel B. N., Anand A., Mysore K. S., Bender C. L. (2007): The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid

accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 955-965.

Ushio-Fukai M. (2009): Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**, 1289-1299.

Van der Plaats-Niterink A. J. (1981): *Monograph of the genus Pythium*. Studies in Mycology 21, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Nizozemsko, 242 stran.

Van Loon L. C., van Kammen A. (1970): Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II: Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 190-211.

Van Loon L. C., Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J. (1998): Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 453-483.

Van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. (2006): Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 135-162.

Vauthrin S., Mikeš V., Milat M. L., Ponchet M., Maume B., Osman H., Blein J. P. (1999): Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1419**, 335-342.

Vellosillo T., Vicente J., Kulasekaran S., Hamberg M., Castresana C. (2010): Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiology* **154**, 444-448.

Viard M., Martin F., Pugin A., Ricci P., Blein J. (1994): Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology* **104**, 1245-1249.

Vivancos P. D., Dong Y., Ziegler K., Markovic J., Pallardó F. V., Pellny T. K., Verrier P. J., Foyer Ch. (2010): Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *The Plant Journal* **64**, 825-838.

Walling L. L. (2000): The Myriad Plant Responses to Herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 195-216.

Walters D., Daniell T. (2007): Microbial induction of resistance to pathogens. In: *Induced Resistance for Plant Defence: A Sustainable Approach to Crop Protection*. 1st ed., (Walters D., Newton A., Lyon G.), Blackwell Publishing, Oxford, UK, 143-156.

Wang Y., Meng Y. L., Zhang M., Tong X. M., Wang Q. H., Sun Y. Y., Quan J. L., Govers F., Shan W. X. (2011): Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Phytophthora parasitica* and identification of variation in host specificity. *Molecular Plant Pathology* **12**, 187-201.

Wang G., Ryu S., Wang X. (2012): Plant phospholipases: an overview. *Methods in Molecular Biology* **861**, 123-137.

Wang K., Wu D., Bo Z., Chen S., Wang Z., Zheng Y., Fang Y. (2019): Regulation of redox status contributes to priming defense against *Botrytis cinerea* in grape berries treated with β -aminobutyric acid. *Scientia Horticulturae* **244**, 352-364.

Wasternack C., Hause B. (2013): Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **111**, 1021-1058.

Whipps J. M., Budge S. P., Fenlon J. S. (1998): Characteristics and host range of tomato powdery mildew. *Plant Pathology* **47**, 36-48.

- Wientjes F. B., Segal A. W., Hartwig J. H. (1997): Immunoelectron microscopy shows a clustered distribution of NADPH oxidase components in the human neutrophil plasma membrane. *Journal of Leukocyte Biology* **61**, 303-312.
- Wiesel L., Newton A. C., Elliott I., Booty D., Gilroy E. M., Birch P. R. J., Hein I. (2014): Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science* **5**, 655.
- Wilkinson S. W., Pastor V., Paplauskas S., Pétriacq P., Luna E. (2018): Long lasting β -aminobutyric acid-induced resistance protects tomato fruit against *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* **67**, 30-41.
- Worrall D., Holroyd G. H., Moore J. P., Glowacz M., Croft P., Taylor J. E., Paul N. D., Roberts M. R. (2012): Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. *New Phytologist* **193**, 770-778.
- Xia X. J., Zhou Y. H., Shi K., Zhou J., Foyer Ch. H., Yu J. Q. (2015): Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2839-2856.
- Xiang T., Zong N., Zou Y., Wu Y., Zhang J., Xing W., Li Y., Tang X., Zhu L., Chai J., Zhou J. M. (2008): *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology* **18**, 74-80.
- Xie H. T., Wan Z. Y., Li S., Zhang Y. (2014): Spatiotemporal production of reactive oxygen species by NADPH oxidase is critical for tapetal programmed cell death and pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 2007-2023.
- Xu J., Xie J., Yan C., Zou X., Ren D., Zhang S. (2014): A chemical genetic approach demonstrates that MPK3/MPK6 activation and NADPH oxidase-mediated oxidative burst are two independent signaling events in plant immunity. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **77**, 222-234.
- Xue L., Li S., Sheng H., Feng H., Xu S., An L. (2007): Nitric oxide alleviates oxidative damage induced by enhanced ultraviolet-B radiation in cyanobacterium. *Current Microbiology* **55**, 294-301.
- Yang H., Mu J., Chen L., Feng J., Hu J., Li L., Zhou J.-M., Zuo J. (2015): S-Nitrosylation Positively Regulates Ascorbate Peroxidase Activity during Plant Stress Responses. *Plant Physiology* **167**, 1604-1615.
- Yang X., Balc Y., Brazee N. J., Loyd A. L., Hong C. X. (2016): A unique species in *Phytophthora* clade 10, *Phytophthora intercalaris* sp. nov., recovered from stream and irrigation water in the eastern USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**, 845-855.
- Yun B. W., Feechan A., Yin M., Saidi N. B., Le Bihan T., Yu M., Moore J. W., Kang J. G., Kwon E., Spoel S. H., Pallas J. A., Loake G. J. (2011): S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264-268.
- Zafra A., Castro A. J., Alché J. D. (2018): Identification of novel superoxide dismutase isoenzymes in the olive (*Olea europaea* L.) pollen. *BMC Plant Biology* **18**, 114.
- Zandalinas S. I., Mittler R. (2018): ROS-induced ROS release in plant and animal cells. *Free Radical Biology and Medicine* **122**, 21-27.
- Zander M., La Camera S., Lamotte O., Métraux J. P., Gatz C. (2010): *Arabidopsis thaliana* class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. *The Plant Journal* **61**, 200-210.
- Zechmann B. (2011): Subcellular distribution of ascorbate in plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 360-363.

- Zhang Y., Zhu H., Zhang Q., Li M., Yan M., Wang R., Wang L., Welti R., Zhang W., Wang X. (2009a): Phospholipase α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 2357-2377.
- Zhang H., Fang Q., Zhang Z., Wang Y., Zheng X. (2009b): The role of respiratory burst oxidase homologues in elicitor-induced stomatal closure and hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3109-3122.
- Zhang A., Zhang J., Ye N., Cao J., Tan M., Zhang J., Jiang M. (2010): ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated self-propagation of apoplastic H₂O₂ in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4399-4411.
- Zhang W., Zhao F., Jiang L., Chen C., Wu L., Liu Z. (2018): Different Pathogen Defense Strategies in *Arabidopsis*: More than Pathogen Recognition. *Cells* **7**, 252.
- Zheng X.-Y., Spivey N. W., Zeng W., Liu P.-P., Fu Z. Q., Klessig D. F., He S. Y., Dong X. (2012): Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host & Microbe* **11**, 587-596.
- Zhong Y., Wang B., Yan J., Cheng L., Yao L., Xiao L., Wu T. (2014): DL- β -Aminobutyric Acid-Induced Resistance in Soybean against *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae). *PLoS One* **9**, e85142.
- Zhu B. L., Chen T. H. H., Li P. H. (1996): Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta* **198**, 70-77.
- Zhu F., Xi D.-H., Yuan S., Xu F., Zhang D.-W., Lin H.-H. (2014): Salicylic acid and jasmonic acid are essential for systemic resistance against tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**, 567-577.
- Zimmerli L., Jakab G., Métraux J.-P., Mauch-Mani B. (2000): Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 12920-12925.
- Zimmerli L., Métraux J. P., Mauch-Mani B. (2001): Beta-aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **126**, 517-523.
- Zimmerli L., Hou B. H., Tsai C. H., Jakab G., Mauch-Mani B., Somerville S. (2008): The xenobiotic β -aminobutyric acid enhances *Arabidopsis* thermotolerance. *Plant Journal* **53** (1), 144-156.

2.5 Seznam použitých zkratek

| | |
|--------------|--|
| 4,5-ddh-JA | 4,5-didehydrojasmonát |
| 12-OH-JA | kyselina 12-hydroxyjasmonová |
| ABA | kyselina abscisová |
| ABC | ATP-vazebný transportérový protein (ATP binding cassette) |
| ACC | 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina |
| ACO | ACCoxidasa |
| ACS | ACCsynthasa |
| AE | kyselý (acidic) elicitin |
| AHP | proteinový přenašeč (<i>Arabidopsis thaliana</i> histidine phosphotransfer proteins) |
| AMP | adenosinmonofosfát |
| AOC | allenoxidcyklasa |
| AOS | allenoxidsynthasa |
| APX | askorbátperoxidasa |
| ARR | transkripční faktor (Authentic response regulator) |
| AsA | kyselina askorbová |
| AsA-GSH | askorbát-glutathionový cyklus |
| At | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ATP | adenosintrifosfát |
| AZI1 | protein přenášející lipidy (Azelaic acid induced 1) |
| BABA | kyselina β -aminomáselná |
| BAHD | acyltransferasy nalezené u vyšších rostlin z čeledi <i>Brassicaceae</i> |
| BE | bazický (basic) elicitin |
| BIK1 | serin/threonin proteinkinasa (Botrytis-induced kinase 1) |
| <i>BRCA2</i> | tumor supresorový gen (Breast cancer susceptibility 2) |
| BY-2 | Bright yellow 2 (tabáková buněčná suspenze) |
| CAT | katalasa |
| CBD | chitin-vazebné domény |
| CBL | kalcineurin B-like |
| Cdc48 | molekulární chaperony |
| CDPK | Ca ²⁺ -dependentní proteinkinasa |
| CIN | cinnamomin |
| CIPK | CBL-interagující proteinkinasa |
| COI1 | receptor, jednotka komplexu multiproteinu E3 ubiquitin ligasy SCF (Coronatine insensitive 1) |
| COR | koronatin |

| | |
|------------------|--|
| CPK | Ca ²⁺ -dependentní proteinkinasy |
| CRY | kryptogein |
| CSBP | proteiny specificky vážící cytokinin |
| CTR1 | serin/threonin proteinkinasa, negativní regulátor ethylenové dráhy (Constitutive triple response 1) |
| CUL3 | ubikvitinligasa Cullin3 |
| DAG | diacylglycerol |
| DAMP | molekulární vzory spojené s poškozením (Damage-associated molecular patterns) |
| DGK | diacylglycerolkinasa |
| <i>DEF</i> | geny kódující defensiny |
| DHA | dehydroaskorbát |
| DHAR | dehydroaskorbátreduktasa |
| DHE | 7-dehydroergosterol |
| DIR1 | protein přenášející lipidy (Defective induced resistance 1) |
| DNA | kyselina deoxyribonukleová |
| dn-OPDA | kyselina dinor-12-oxo-fytodienová |
| DRE | drechslerin |
| EDS5 | isochorismátový exportér (Enhanced disease susceptibility) |
| <i>EF-1α</i> | gen kódující elongační faktor (housekeeping gen) |
| EIN2, EIN3, EIN4 | transkripční faktor, pozitivní regulátor ethylenové dráhy (Ethylene- insensitive protein 2, 3, 4) |
| EIN3/EIL | transkripční faktory (Ethylene insensitive EIN3/EIL-like transcription regulator) |
| ELR | potenciální receptor elicitinů (Elicitin response protein, receptor-like protein) |
| EPS1 | protein z rodiny BAHD acyltransferas nalezené u rostlin z čeledi <i>Brassicaceae</i> |
| ERELEE4 | transkripční faktor (Ethylene responsive element of tomato) |
| ERF1 | transkripční faktor (Ethylene-responsive factor 1) |
| ERS1, 2 | histidinkinasy, ethylenové receptory (Ethylene response sensor 1, 2) |
| ESI | elektrosprej |
| ET | ethylen |
| ETI | efektorem spuštěná imunita (Effector-triggered immunity) |
| ETR1, 2 | histidinkinasy, ethylenové receptory (Ethylene response 1, 2) |
| ETS | efektorem spuštěná citlivost (Effector-triggered susceptibility) |
| FAD | flavinadenindinukleotid |

| | |
|--------------|---|
| G3P | glycerol-3-fosfát |
| <i>GERM</i> | geny kódující germiny |
| GFP | zelený flourescenní protein (Green fluorescent protein) |
| GLP | proteiny podobné germinům (Germin-like proteiny) |
| <i>GLU</i> | geny kódující β -1,3-glukanasy |
| <i>GLUCO</i> | geny kódující β -1,4-glukanasy |
| GP | zlaté částice (gold particles) |
| GPOX | guajakolperoxidasa |
| GPX | glutathionperoxidasa |
| GR | glutathionreduktasa |
| GRX | glutaredoxin |
| GSH | glutathion |
| GSSG | glutathion disulfid |
| HAE | vysoce kyselý (highly acidic) elicitin |
| <i>HEV</i> | geny kódující heveiny |
| HDAC6, 9 | histondeacetylasa 6, 9 |
| HopZl | efektor z <i>P. syringae</i> s předpokládanou aktivitou acetyltransferasy |
| HPLC | vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography) |
| hpi | hodin po infekci |
| HR | hypersenzitivní reakce |
| ICS | isochorismátsynthasa |
| IGS | isochorismoyl-glutamátsynthasa |
| INF | infestin |
| IPGL | isochorismoyl-glutamát A pyruvoyl-glutamátlyasa |
| IPL | isochorismátpyruvátlyasa |
| ISR | indukovaná systémová rezistence (Induced systemic resistance) |
| JA | kyselina jasmonová |
| JA-Ile | 7-isojasmonoyl-L-isoleucin (Jasmonát-isoleucin) |
| JAR1 | jasmonová kyselina-amidosynthetasa |
| JAT1 | ABC transportér kyseliny jasmonové (Jasmonic acid transfer protein1) |
| JAZ | negativní regulátor signální dráhy kyseliny jasmonové (Jasmonate ZIM domain) |
| JIH1 | jasmonoyl-L-isoleucinhydrolasa 1 |
| JMT | jasmonát-O-methyltransferasa |
| K13H | mutant kryptogeinu (lysin13histidin) |
| K13V | mutant kryptogeinu (lysin13valin) |

| | |
|---------------|---|
| KMB | 2-keto-4-methylthiobutyát |
| L15W/L36F + R | mutant kryptogeinu (leucin15tryptofan/leucin36fenylalanin + arginin) |
| L19R | mutant kryptogeinu (leucin19arginin) |
| L25 | gen kódující ribozomální protein (housekeeping gen) |
| L41F | mutant kryptogeinu (leucin41fenylalanin) |
| LAR | lokálně získaná rezistence (Localized acquired resistance) |
| LCB | báze s dlouhým řetězcem (Long chain bases) |
| LOX | lipoxygenasa |
| LTP | proteiny přenášející lipidy (Lipid transfer proteins) |
| MACC | malonyl-ACC |
| MALDI-TOF | hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight) |
| MAMP | molekulární vzory asociované s mikroby (Microbe-associated molecular patterns) |
| MAPK | mitogenem-aktivované proteinkinasy (Mitogen-activated protein kinases) |
| MAPKK | mitogenem-aktivované proteinkinasy kinasy (Mitogen-activated protein kinases kinases) |
| MAPKKK | mitogenem-aktivované proteinkinasy kinasy kinasy (Mitogen-activated protein kinases kinases kinases) |
| MDHA | monodehydroaskorbát |
| MDHAR | monodehydroaskorbátreduktasa |
| MeJA | methyljasmonát |
| MeSA | methylsalicylát |
| MLP | hlavní latexové proteiny |
| MPK | mitogenem-aktivovaná proteinkinasa |
| MTA | 5-methylthioadenosin |
| MTR | 5-methylthioribosa |
| MYC2 | transkripční faktor dráhy kyseliny jasmonové |
| NADPH | nikotinamidadenindinukleotidfosfát |
| NBD-PC | fosfatidylcholin značený nitrobenzoxadiazolem |
| NC | (S)-norcoclaurinsynthasa |
| NINJA | negativní regulátor transkripce (Novel interactor of JAZ) |
| NO | oxid dusnatý (Nitric oxide) |
| NPR1 | regulační protein (Non-expressor of pathogenesis-related genes 1) |
| Ns | <i>Nicotiana glauca</i> |

| | |
|-------------|--|
| Nt | <i>Nicotiana tabacum</i> |
| Nto | <i>Nicotiana tomentosiformis</i> |
| NTR | NADPHthioredoxinreduktasa |
| OG | oligogalakturonid |
| OLP | proteiny podobné oxalátoxidase (Oxalate oxidase-like proteins) |
| OPC4 | kyselina 4-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)butanová |
| OPC6 | kyselina 6-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)hexanová |
| OPC8 | kyselina 8-(3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl)oktanová |
| OPDA | kyselina 12-oxo-fytodienová |
| OPR1, 2, 3 | 12-oxofytodienoátreduktasa 1, 2, 3 |
| ORA59 | transkripční faktor (Octadecanoid-responsive Arabidopsis 59) |
| <i>OSM</i> | geny kódující osmotiny |
| OST1 | serin/threonin proteinkinasa (Open Stomata1) |
| P | protein |
| <i>P1-6</i> | geny kódující proteiny ze skupiny PR-1 |
| PA | kyselina fosfatidová |
| PAL | fenylalaninamoniaklyasa |
| PAMP | molekulární vzory (sloučeniny) typické pro povrch buněk patogenních mikroorganismů (Pathogen-associated molecular pattern) |
| PBS3 | amidotransferasa (Amido-transferase AvrPphB susceptible 3) |
| PCD | programovaná buněčná smrt (Programmed cell death) |
| PCR | polymerasová řetězová reakce |
| PDF1.2. | defensiny |
| pI | isoelektrický bod |
| PI-PLC | fosfoinositid-fosfolipasa C |
| PLD | fosfolipasa D |
| PM | plazmatická membrána |
| PmsB | protein pro biosyntézu kyseliny salicylové (Salicylic acid biosynthesis protein) |
| <i>PP2A</i> | gen kódující proteinfosfatasu 2A (housekeeping gen) |
| PR protein | protein související s patogenezí (Pathogenesis-related protein) |
| PRR | receptory rozpoznávající patogenní struktury (Pathogen recognition receptor) |
| PRX | peroxiredoxin |
| PTI | spuštění imunity prostřednictvím molekulárních vzorů typickými pro povrch buněk patogenních mikroorganismů (PAMP-triggered immunity) |

| | |
|--------------------|---|
| PVDF | polyvinylidenfluorid |
| QTL | lokusy kvantitativních znaků (Quantitative trait loci) |
| RAD51 | protein účastnící se oprav dvouvláknových zlomů DNA |
| RBOH | NADPHoxidasa (Respiratory burst oxidase homologs) |
| RIRR | reaktivní formy kyslíku indukující uvolňování reaktivních forem kyslíku (ROS-induced ROS release) |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RNS | reaktivní formy dusíku |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| SA | kyselina salicylová |
| SAA | systémová získaná aklimatizace (Systemic acquired acclimatization) |
| SAG | kyselina salicylová-β-glukosid |
| SAM | S-adenosylmethionin |
| SAR | systémová získaná rezistence (Systemic acquired resistance) |
| SCF ^{COI} | komplex multiproteinu E3 ubiquitin ligasa (Skp-Cullin-F-box) |
| Ser | serin |
| SID2 | synonymum pro isochorismátsynthasu (Salicylic acid induction deficient 2) |
| SnRK2-8 | serin/threonin kinasa |
| SOD | superoxiddismutasa |
| SUMO3 | ubiquitin-like protein (Small Ubiquitin Like Modifier 3) |
| <i>THAUM</i> | geny kódující thaumatiny |
| TF | transkripční faktory |
| TGA | transkripční faktory |
| TGN | trans-Golgiho síť (trans-Golgi network) |
| <i>TIP41</i> | gen kódující TIP41 (housekeeping gen, Type 2A phosphatase activator) |
| TLP | proteiny podobné thaumatinu (Thaumatatin-like proteins) |
| tnOPDA | tetranor-kyselina 12-oxo-fytodienová |
| TOF-MS | hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu (Time-of-flight mass spectrometry) |
| TPL | transkripční represor Topless |
| TRX | thioredoxin |
| UV | ultrafialové |
| V84F | mutant kryptogeinu (valin84fenylalanin) |
| VSP2 | zásobní protein (Vegetative storage protein 2) |
| WIPK | proteinkinasa indukovaná poraněním (Wound-induced protein kinase) |
| WIR | indukovaná rezistence vyvolaná zraněním (Wound induced resistance) |

WRKY

transkripční faktory

ZIM

doména JAZ represorů (Zinc-finger protein expressed in inflorescence meristem)

PŘÍLOHA 5

Supplementary material

k uvedeným publikacím

Annals of Botany

Diverse responses of wild and cultivated tomato to BABA, oligandrin and *Oidium neolycopersici* infection

Pavla Satková, Tomáš Starý, Veronika Plešková, Martina Zapletalová, Tomáš Kašparovský,
Lucie Činčalová-Kubienová, Lenka Luhová, Barbora Mieslerová, Jaromír Mikulík, Jan Lochman,
Marek Petřivalský

Table S1 List of gene-specific primers used for qPCR analysis

| Acronym | Type | Accession number | Primer | Sequence of primer | T _m [°C] | Product size (bp) |
|---------|---------------------|------------------|---------|------------------------|---------------------|-------------------|
| DEF1 | Defensin | NM_001247943 | Forward | CTGGACCAATGAGAATTGTTG | 58,06 | 112 |
| | | | Reverse | AATCCTTCGGTCTCACATACC | 57,99 | |
| DEF2 | Defensin | BW692307.1 | Forward | CACAATCCATTGTTTCTTTG | 58,13 | 110 |
| | | | Reverse | GCTCAACGACTCACAAATGTCT | 57,94 | |
| DEF3 | Defensin | U20591 | Forward | ATTTTTGGTCTTGGAATGAT | 58,43 | 93 |
| | | | Reverse | CATAATCCTGGGAAAGTTTGG | 58,43 | |
| GERM2 | Germin-like protein | DB688945 | Forward | AGCAGCTCTAATCCTGGACTTC | 59,15 | 135 |
| | | | Reverse | AGTACCTCCAAGCACACCCTTA | 60,05 | |
| Germ4 | Germin-like protein | FS205432 | Forward | TTGGATTGATCTCACCACACA | 59,95 | 114 |
| | | | Reverse | TCGATTTGAAAGGATTTCTGTG | 60,06 | |
| GERM10 | Germin-like protein | FS184462 | Forward | TGCCTTTGGAAAATTTGTTGT | 59,48 | 189 |
| | | | Reverse | GCTATGGCCATTGATGAAAAG | 59,56 | |
| GERM11 | Germin-like protein | BI210469 | Forward | GTTTCGCTTCATCACCAACTGT | 60,17 | 162 |
| | | | Reverse | AACAAGCTCTACCAAACGAA | 59,91 | |
| GLU1 | 1-3 Glucanase | NM_001247876 | Forward | CAAATCATGGAGCTTTGAATG | 58,23 | 128 |
| | | | Reverse | ACGTTCTTCTGTACCCACCAT | 58,44 | |
| GLU2 | 1-3 Glucanase | NM_001247229 | Forward | CTCATCAACCAACTCTCCAAG | 57,37 | 93 |
| | | | Reverse | GCTAGACGCCGATATTCTGA | 58,09 | |
| GLU3 | 1-3 Glucanase | XM_004251009 | Forward | AACTCTTTCCGCCTTCTTCT | 58,66 | 142 |
| | | | Reverse | CGTTGGGTTTGTCTTTGTATG | 58,07 | |
| GLU4 | 1-3 Glucanase | BI925625 | Forward | AGAAGAAAGGAAGTCCGTTGA | 58,04 | 105 |
| | | | Reverse | CGTAGTTACGCTCCGACATAG | 57,64 | |
| GLU6 | 1-3 Glucanase | JG699805 | Forward | GAACGTCCTGGGAATACTT | 58,04 | 142 |
| | | | Reverse | TAGCATTGCGCTTTAACACAC | 57,99 | |
| GLU7 | 1-3 Glucanase | BE451140 | Forward | ACTGATCCGCTGTTCTTACA | 57,50 | 115 |
| | | | Reverse | CCCATGAATCCGTAAGACT | 58,06 | |
| GLU8 | 1-3 Glucanase | BG124038 | Forward | CTGCATCACATGCTTCTTTT | 58,04 | 141 |
| | | | Reverse | CCCAGTAGTCGCATAGAGACA | 57,99 | |
| GLU10 | 1-3 Glucanase | X74905 | Forward | TCCACAGCTATTGAAACTGG | 57,89 | 141 |
| | | | Reverse | TAAAGTTGACAAGCAAAGGA | 57,56 | |
| GLUCO1 | 1-4 Glucanase | BP887011 | Forward | GCCGTTTGAGATTGTTTTGA | 60,10 | 194 |
| | | | Reverse | CAGGAAGGCAGCATTGACTAC | 59,98 | |
| GLUCO2 | 1-4 Glucanase | NM_001247014 | Forward | CGTATGAGGCTGTTTCTGAGC | 60,03 | 138 |
| | | | Reverse | TTGGATTAGCCCTCTTTTGT | 59,95 | |
| GLUCO3 | 1-4 Glucanase | NM_001247243 | Forward | ACCGATCTGTCAGTGGATACG | 60,00 | 221 |
| | | | Reverse | TGCATTATGACCAGCCTTACC | 59,97 | |
| GLUCO5 | 1-4 Glucanase | NM_001247933 | Forward | AGCCTCATCACTCCCTTCAAT | 60,09 | 146 |
| | | | Reverse | TAAATTGGTCCCGGAATTAG | 60,02 | |
| HEV1 | Hevein | U89764 | Forward | CAAGTTCGAGCAACGTATCAT | 57,92 | 121 |
| | | | Reverse | CATACTTACTCCGCATGAGT | 56,86 | |
| HEV2 | Hevein | NM_001247154 | Forward | GGTAGATGCTTGAGGGTGAC | 57,16 | 102 |
| | | | Reverse | AACGTTTACATCCAAATCAAGC | 58,19 | |

Table S1 (continuation)

| Acronym | Type | Accession number | Primer | Sequence of primer | Tm [°C] | Product size (bp) |
|---------|----------------------------|------------------|---------|-------------------------|---------|-------------------|
| CHIT1 | Chitinase | GO374862 | Forward | TAACCTACCCATGCACTCCTG | 60,00 | 245 |
| | | | Reverse | ATTCCTTGTGGGCTTCCAGTT | 59,99 | |
| CHIT2 | Chitinase | XM_004248589 | Forward | AATTTCCCTTTTTCGTGCAGT | 59,99 | 164 |
| | | | Reverse | GCGTCATCTCAAATTCATGT | 59,95 | |
| CHIT3 | Chitinase | NM_001247471 | Forward | ACGAGATGCTGAAGAATCGAA | 59,97 | 192 |
| | | | Reverse | CAGCACTTAGGCTACCACCAG | 59,94 | |
| CHIT4 | Chitinase | NM_001247475 | Forward | AACTACGAACGAGCTGGACAA | 59,93 | 152 |
| | | | Reverse | ATAACGTTGTGGCATGATGGT | 60,13 | |
| CHIT5 | Chitinase | NM_001247474 | Forward | GGACCTAGGCGGTGTTATTTTC | 59,85 | 124 |
| | | | Reverse | AGACCCAGCAGCAGTAACAAA | 59,93 | |
| CHIT6 | Chitinase | FS192910 | Forward | TAGTGCTGCCAAGTCATTTCC | 60,26 | 152 |
| | | | Reverse | AGCAGTAACCCCATGCGTAG | 60,15 | |
| CHIT7 | Chitinase | DB685982 | Forward | TGGACAAACACCAGTGTGAA | 60,03 | 133 |
| | | | Reverse | AACACCACCACCAAGTAAAG | 59,92 | |
| CHIT9 | Chitinase | GT168346 | Forward | GGTAACCCCGGTGACTACTGT | 60,16 | 181 |
| | | | Reverse | ATGAGATGACTGGGTCTGTGG | 59,98 | |
| CHIT10 | Chitinase | U30465 | Forward | TTCTGGATGACAGCACAACAG | 59,89 | 142 |
| | | | Reverse | ATTCATTCCACCATTGATGA | 60,01 | |
| OSM1 | Osmotin | M21346 | Forward | GTCTTACAGTGTACCGGATGG | 57,07 | 169 |
| | | | Reverse | AATGAATTGCGTGACATTTTC | 57,62 | |
| OSM2 | Osmotin | X66416 | Forward | ATTGCAACTTTGATGGTGATG | 58,49 | 130 |
| | | | Reverse | AGGTTGCTAAACTGGTCCAAG | 58,38 | |
| OSM3 | Osmotin | AJ277064 | Forward | TTGAACCAGTTTGGTAACCTAGA | 57,87 | 118 |
| | | | Reverse | TGCATTGAATTGGATGACATT | 57,83 | |
| OSM4 | Osmotin | NM_001247422 | Forward | CATCCAATTCAATGTGTTGCT | 58,49 | 102 |
| | | | Reverse | TTGTTGTCTCCGAATGTAGT | 57,19 | |
| OSM5 | Osmotin | NM_001247785 | Forward | CCCAGTTTGTCTACATCACG | 58,15 | 106 |
| | | | Reverse | CCTTTACCTTCGTGTGGAGTT | 58,24 | |
| OSM6 | Osmotin | DB684241 | Forward | GACGGGATGTTTAGTGGATTT | 57,92 | 121 |
| | | | Reverse | TGCAACAGTAAATCGGATCAT | 58,11 | |
| THAUM1 | Thaumatococin-like protein | GT168633 | Forward | TGGTAACTGTGGTCCGACTAA | 58,15 | 115 |
| | | | Reverse | ATTAGTACCAGCAGGGCAAGT | 57,91 | |
| THAUM2 | Thaumatococin-like protein | BP885104 | Forward | GGCGACTAGCAGAGTTTAC | 56,80 | 100 |
| | | | Reverse | ACTCACCTCCACCATCATAGG | 58,88 | |
| THAUM3 | Thaumatococin-like protein | BP901021 | Forward | CAACGGGATGGATTTCTTCTA | 59,03 | 90 |
| | | | Reverse | CAATTGTTACCAGAACCACCTT | 58,04 | |
| P1 | PR1 | XM_004246675 | Forward | ACGCTCAAAATTCACCACAAG | 60,16 | 181 |
| | | | Reverse | CTACCCTTGGAAGATTCTCC | 60,08 | |
| P2 | PR1 | EU589238 | Forward | TGTGAAGATGTGGGTTGATGA | 59,95 | 189 |
| | | | Reverse | CTCCAGTTACCTGGTGGATCA | 59,97 | |
| P3 | PR1 | NM_001247199 | Forward | CTGCTTTTCCACAGCTAAACG | 60,06 | 144 |
| | | | Reverse | GACGTACCGACTTACGCCATA | 60,03 | |

Table S1 (continuation)

| Acronym | Type | Accession number | Primer | Sequence of primer | T _m [°C] | Product size (bp) |
|-----------|----------------------|------------------|---------|------------------------|---------------------|-------------------|
| P4 | PR1 | NM_001247594 | Forward | GAGCGGGTGATTGTAATTTGA | 59,95 | 191 |
| | | | Reverse | GACTGAGTTGCGCCAGACTAC | 60,07 | |
| P6 | PR1 | NM_001247385 | Forward | ATCTTGCGGTTTCATAACGATG | 59,97 | 106 |
| | | | Reverse | CCAGCTTTGAGTTGGCATAG | 60,02 | |
| SYST1 | Systemin 1 | M84801 | Forward | TCCATCCCAAGATATCAACAA | 57,87 | 101 |
| | | | Reverse | CATATCCTCCCTCCTCATGTT | 57,93 | |
| ACO1 | ACC oxidase | NM_001247095 | Forward | GCTGCACAGAGTAATTGCACA | 60,07 | 236 |
| | | | Reverse | GCTGCACAGAGTAATTGCACA | 60,07 | |
| ACO4-like | ACC oxidase | XM_004236884 | Forward | CCCAGTTTCTTCATCCA | 60,10 | 90 |
| | | | Reverse | AGAAAAGTCGACGACGGGTAT | 60,01 | |
| ACO1-like | ACC oxidase | XM_004236746 | Forward | AAGCCGGTGTAAAAGGACTA | 60,01 | 119 |
| | | | Reverse | ATGTCTGAGCCTGAATCGAGA | 59,97 | |
| ACS6 | ACC synthase | AF167428 | Forward | TGGACATGGAGAAAATTCAGC | 60,07 | 169 |
| | | | Reverse | AATTGAGGCTTTGGGTTGTT | 59,86 | |
| ACS1a | ACC synthase | U18056 | Forward | CATTGCTGAGAGTTCCGAAAG | 60,00 | 127 |
| | | | Reverse | AAGCCTCCTTAAATCCATCCA | 59,92 | |
| ACS2 | ACC synthase | X59145 | Forward | CCTTACCATACTACCCAGCA | 60,00 | 190 |
| | | | Reverse | ATGGATTTGATGGATTGGTCA | 60,01 | |
| EF1a | Elongation factor 1a | X53043 | Forward | GGTCATCATCATGAACCATCC | 60,01 | 175 |
| | | | Reverse | CATACCAGCATCACCGTTCTT | 60,01 | |
| TIP41 | Tip41 | XM_004248715 | Forward | ATGGAGTTTTGAGTCTTCTGC | 53,20 | 235 |
| | | | Reverse | GCTGCGTTTCTGGCTTAGG | 56,60 | |

Table S2 Results of qPCR analysis of selected genes involved in tomato defence responses

| Acronym | Type | NCBI Accession number | Genome number ^a | pI ^b | MW (kDa) ^b | Signal peptide ^c | BABA treatment | | Oidium neoyoungii infection | | Oligandrin treatment | | Presence in improvement sweeps region according to Lin et al. 2014 | Change after <i>P. capsici</i> infection according to Jupe et al. 2013 (48h X nt) | Solanum lycopersicum cis-acting elements analysis of 5'-upstream regulatory elements ^d |
|-----------|------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|--|---|---|
| | | | | | | | S.I. cv. Amateur | S. habrochaites | S.I. cv. Amateur | S. habrochaites | S.I. cv. Amateur | S. habrochaites | | | |
| DEF1 | Defensin | NM_001247943 | SV0700750.2.1 | 9.0 | 8.5 | + | log ₂ R | SD | log ₂ R | SD | log ₂ R | SD | + | NC | IBOX, POLLENILEATS2, TGBOXATPIN2 |
| DEF2 | Defensin | BW692307 | SV0700750.2.1 | 9.1 | 8.8 | + | 0.08 | 0.13 | 0.03 | 0.07 | 0.21 | 0.17 | Yes | NC | CACADIANILEHC, IBOX, LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |
| DEF3 | Defensin | U20591 | SV0700750.2.1 | 9.2 | 8.4 | + | 0.13 | 0.08 | 0.00 | 0.16 | 0.10 | 0.21 | No | NC | CACADIANILEHC, IBOX, LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |
| GERM2 | Germi-like p. | DB688945 | SV030123410.1.1 | 5.8 | 21.6 | + | -0.86 | 0.16 | -0.02 | 0.21 | -0.93 | 0.21 | No | Downregulated | ABRE, ERFLEF4, IBOX, LECPEFACS2, MWBIETPR, POLLENILEATS2 |
| GERM4 | Germi-like p. | F5205432 | SV030900040.2.1 | 6.1 | 24.9 | + | -0.15 | 0.05 | 0.26 | 0.08 | -0.89 | 0.05 | No | NC | N.A. |
| GERM10 | Germi-like p. | F1384662 | SV0301102400.2.1 | 8.9 | 23.3 | + | -0.04 | 0.16 | -0.07 | 0.07 | 0.03 | 0.14 | No | Upregulated | N.A. |
| GERM11 | Germi-like p. | B1210469 | SV0301102400.2.1 | 8.5 | 23.2 | + | 0.01 | 0.12 | 0.13 | 0.17 | 0.04 | 0.16 | No | Upregulated | N.A. |
| GLU1 | 1,3-glucanase (Class2) | NM_001247876 | SV01000020.2.1 | 7.8 | 39.7 | + | 0.35 | 0.18 | 0.25 | 0.16 | 0.35 | 0.19 | No | NC | N.A. |
| GLU2 | 1,3-glucanase (Class2) | NM_001247229 | SV01000020.2.1 | 9.4 | 37.8 | + | 0.87 | 0.18 | 0.43 | 0.07 | 0.59 | 0.18 | No | Upregulated | CACADIANILEHC, ERFLEF4, IBOX, P1B5, POLLENILEATS2 |
| GLU3 | 1,3-glucanase (Class2) | NM_004251009 | SV011008440.1.1 | 6.6 | 42.6 | + | -0.12 | 0.16 | -0.33 | 0.18 | 0.17 | 0.16 | No | Upregulated | N.A. |
| GLU4 | 1,3-glucanase (Class2) | B1925625 | SV012005580.1.1 | 6.5 | 45.5 | + | 0.02 | 0.04 | 0.33 | 0.08 | 0.04 | 0.08 | No | NC | ABRE, IBOX, LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |
| GLU6 | 1,3-glucanase (Class1) | J6599805 | SV050505500.2.1 | 6.3 | 52.8 | + | 0.20 | 0.04 | 0.03 | 0.06 | 0.14 | 0.05 | No | NC | ABRE, IBOX, LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |
| GLU7 | 1,3-glucanase (Class2) | BF451140 | SV012004420.1.1 | 5.3 | 37.8 | + | -0.12 | 0.18 | -0.04 | 0.16 | -0.03 | 0.14 | No | Downregulated | ABRE, IBOX, POLLENILEATS2 |
| GLU8 | 1,3-glucanase (Class1) | BG124038 | SV012008980.1.1 | 6.3 | 53.9 | + | -0.04 | 0.09 | -0.06 | 0.09 | -0.55 | 0.07 | No | Downregulated | POLLENILEATS2, LECPEFACS2, IBOX |
| GLU10 | 1,3-glucanase (Class2) | X74905 | SV0100016470.1.1 | 5.4 | 37.9 | + | 1.13 | 0.19 | 0.20 | 0.09 | 1.04 | 0.18 | No | Downregulated | CACADIANILEHC, ERFLEF4, IBOX, POLLENILEATS2 |
| GLUCO1 | 1,4-glucanase | BP887011 | SV050500500.2.1 | 8.9 | 68.3 | - | 0.22 | 0.12 | 0.22 | 0.15 | -0.16 | 0.12 | No | Downregulated | N.A. |
| GLUCO2 | 1,4-glucanase | NM_001247014 | SV010110250.2.1 | 8.9 | 68.6 | - | -0.20 | 0.10 | -0.02 | 0.10 | 0.25 | 0.10 | No | NC | ERFLEF4, POLLENILEATS2, RBSCONSENSUS |
| GLUCO3 | 1,4-glucanase | NM_001247243 | SV080802250.2.1 | 9.3 | 68.9 | + | 0.18 | 0.02 | 0.50 | 0.16 | -0.39 | 0.06 | No | Downregulated | ABRE, CACGGTGMOTIF, CACADIANILEHC, MWBIETPR, POLLENILEATS2 |
| GLUCO5 | 1,4-glucanase | NM_001247933 | SV080802250.2.1 | 7.6 | 53.3 | + | -0.13 | 0.15 | -0.15 | 0.05 | -0.84 | 0.14 | No | NC | ABRE, ERFLEF4, IBOX, MWBIETPR, POLLENILEATS2 |
| HEV1 | Hevein | U89764 | SV01009720.2.1 | 8.4 | 22.7 | + | 0.14 | 0.15 | 0.12 | 0.09 | 0.17 | 0.14 | Yes | Upregulated | N.A. |
| HEV2 | Hevein | NM_001247154 | SV01009720.2.1 | 8.5 | 16.0 | + | 0.88 | 0.16 | 0.37 | 0.05 | 1.54 | 0.03 | Yes | Upregulated | ERFLEF4, LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |
| CHT1 | Chitinase (Class 2) | GO374862 | SV050909850.1.1 | 8.0 | 35.6 | + | -0.07 | 0.08 | 0.04 | 0.05 | 0.52 | 0.12 | No | NC | N.A. |
| CHT2 | Chitinase (Class 1a) | NM_001247471 | SV020208290.2.1 | 8.6 | 35.4 | + | 0.27 | 0.08 | -0.17 | 0.15 | 0.49 | 0.14 | No | Upregulated | CACADIANILEHC, GCCCORE, POLLENILEATS2 |
| CHT3 | Chitinase (Class 2) | NM_001247471 | SV020208290.2.1 | 4.7 | 26.6 | + | 0.27 | 0.06 | -0.11 | 0.12 | 1.11 | 0.05 | Yes | Upregulated | N.A. |
| CHT4 | Chitinase (Class 2) | NM_001247471 | SV020208290.2.1 | 5.9 | 27.6 | + | 0.71 | 0.10 | 0.42 | 0.14 | 1.04 | 0.10 | Yes | Upregulated | ABRE, CACADIANILEHC, IBOX, POLLENILEATS2, TGBOXATPIN2 |
| CHT5 | Chitinase (Class 1b) | NM_001247474 | SV010055810.1.1 | 6.2 | 34.4 | + | 0.24 | 0.13 | 0.29 | 0.18 | 0.27 | 0.13 | No | Upregulated | CACADIANILEHC, GCCCORE, IBOX, LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |
| CHT6 | Chitinase (Class 4) | F1192910 | SV010055820.1.1 | 6.4 | 34.9 | + | 0.33 | 0.19 | -0.35 | 0.05 | 0.05 | 0.12 | No | Upregulated | ABRE, GCCCORE, IBOX, LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |
| CHT7 | Chitinase (Class 3) | DB685982 | SV05050130.2.1 | 8.5 | 31.4 | + | 0.30 | 0.05 | 0.26 | 0.16 | 0.20 | 0.06 | No | Downregulated | N.A. |
| CHT9 | Chitinase (Class 4) | G1168466 | SV010074440.1.1 | 8.8 | 34.5 | + | 0.14 | 0.15 | -0.03 | 0.15 | 0.10 | 0.15 | No | Upregulated | N.A. |
| CHT10 | Chitinase (Class 2) | U30465 | SV020206170.2.1 | 8.4 | 28.8 | + | 0.55 | 0.14 | 0.04 | 0.09 | 0.83 | 0.14 | No | Upregulated | ERFLEF4, LECPEFACS2, P1B5, POLLENILEATS2 |
| OSM1 | Osmotin | M21346 | SV080806040.1.1 | 8.3 | 26.7 | + | 0.62 | 0.19 | -0.02 | 0.13 | 0.99 | 0.19 | Yes | Upregulated | CACADIANILEHC, ERFLEF4, LECPEFACS2, MWBIETPR, POLLENILEATS2 |
| OSM2 | Osmotin | X66416 | SV080806040.1.1 | 6.7 | 26.7 | + | 0.68 | 0.18 | 0.35 | 0.16 | 0.33 | 0.17 | Yes | Upregulated | LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |
| OSM3 | Osmotin | A1277064 | SV080806040.1.1 | 6.2 | 27.5 | + | -0.29 | 0.23 | -0.20 | 0.14 | 1.08 | 0.23 | Yes | Upregulated | N.A. |
| OSM4 | Osmotin | NM_001247422 | SV080806040.1.1 | 5.8 | 27.5 | + | 0.29 | 0.23 | 0.01 | 0.19 | 1.19 | 0.23 | Yes | Upregulated | CACADIANILEHC, GCCCORE, POLLENILEATS2 |
| OSM5 | Osmotin | NM_001247875 | SV010006130.1.1 | 8.2 | 27.3 | + | -0.33 | 0.13 | 0.10 | 0.05 | -0.37 | 0.13 | No | Upregulated | ABRE, CACADIANILEHC, LECPEFACS2, P1B5, POLLENILEATS2 |
| OSM6 | Osmotin | DB684241 | SV01011320.2.1 | 8.1 | 28.6 | + | 0.09 | 0.05 | 0.14 | 0.04 | -0.19 | 0.07 | No | NC | N.A. |
| THAUM1 | Thaumatin-like protein | G1168453 | SV01011320.2.1 | 8.7 | 24.0 | + | -0.05 | 0.03 | 0.23 | 0.08 | -0.38 | 0.03 | Yes | Upregulated | ABRE, POLLENILEATS2, LECPEFACS2, IBOX |
| THAUM2 | Thaumatin-like protein | BP885104 | SV020208370.2.1 | 4.5 | 35.4 | + | -0.25 | 0.10 | -0.43 | 0.12 | -0.51 | 0.09 | Yes | Downregulated | IBOX, LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |
| THAUM3 | Thaumatin-like protein | BP910121 | SV020208370.2.1 | 5.0 | 35.4 | + | -0.04 | 0.09 | 0.04 | 0.04 | 0.60 | 0.09 | No | Downregulated | CACADIANILEHC, ERFLEF4, IBOX, LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |
| P1 | PR1 | XM_004246675 | SV0509006010.2.1 | 8.5 | 20.1 | + | 1.42 | 0.18 | 0.08 | 0.12 | 0.79 | 0.18 | No | NC | CACADIANILEHC, ERFLEF4, LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |
| P2 | PR1 | EUS99238 | SV010110660.2.1 | 8.6 | 17.7 | + | 0.40 | 0.15 | 0.25 | 0.13 | 0.39 | 0.15 | No | Upregulated | CACADIANILEHC, GCCCORE, IBOX, LECPEFACS2, MWBIETPR, POLLENILEATS2, RBSCONSENSUS |
| P3 | PR1 | NM_001247199 | SV010110660.2.1 | 6.4 | 19.8 | + | 0.41 | 0.15 | 0.20 | 0.09 | 0.47 | 0.16 | No | Upregulated | CACADIANILEHC, GCCCORE, IBOX, LECPEFACS2, MWBIETPR, POLLENILEATS2, RBSCONSENSUS |
| P4 | PR1 | NM_001247594 | SV0509007010.1.1 | 7.6 | 17.4 | + | 2.41 | 0.23 | 0.96 | 0.05 | 1.77 | 0.23 | No | Upregulated | ABRE, CACADIANILEHC, ERFLEF4, GCCCORE, LECPEFACS2, POLLENILEATS2, RBSCONSENSUS |
| P6 | PR1 | NM_001247385 | SV0509007010.1.1 | 9.0 | 17.5 | + | 0.92 | 0.08 | 1.43 | 0.20 | 2.35 | 0.19 | No | Upregulated | ABRE, CACADIANILEHC, ERFLEF4, GCCCORE, IBOX, POLLENILEATS2, TGBOXATPIN2 |
| SVS1 | Systemin | M84801 | SV050501750.2.1 | 4.6 | 23.0 | - | -0.29 | 0.04 | -0.10 | 0.12 | -0.49 | 0.06 | No | NC | ABRE, POLLENILEATS2, LECPEFACS2, IBOX |
| ACG01 | ACC oxidase | NM_001247095 | SV020204950.2.1 | 5.2 | 33.5 | - | 0.22 | 0.07 | -2.83 | 2.28 | -0.43 | 0.25 | No | NC | N.A. |
| ACG04like | ACC oxidase | XM_004236884 | SV040007980.2.1 | 5.3 | 41.3 | - | 0.74 | 0.02 | 0.95 | 0.01 | 0.61 | 0.03 | Yes | Upregulated | ABRE, ERFLEF4, POLLENILEATS2, LECPEFACS2, P1B5, TGBOXATPIN2 |
| ACG04like | ACC oxidase | XM_004236746 | SV040007980.2.1 | 5.2 | 41.3 | - | -0.07 | 0.12 | 0.09 | 0.09 | -0.19 | 0.16 | No | NC | N.A. |
| ACG6 | ACC synthase | AF167428 | SV080808100.2.1 | 6.6 | 53.9 | - | -0.05 | 0.12 | -1.48 | 0.97 | 0.09 | 0.09 | No | NC | N.A. |
| ACS1a | ACC synthase | U18056 | SV080808150.2.1 | 6.0 | 54.8 | - | -0.10 | 0.13 | -0.49 | 0.27 | -0.21 | 0.14 | Yes | NC | N.A. |
| ACS2 | ACC synthase | X59145 | SV010095080.2.1 | 7.9 | 54.7 | - | 1.45 | 0.12 | -0.21 | 0.31 | 0.90 | 0.12 | No | Upregulated | IBOX, LECPEFACS2, POLLENILEATS2 |

^a according to solgenomics network (<http://solgenomics.net>)

^b Theoretical Mr (kDa) and pI are calculated using the Compute pI/Mr tool from ExPASy

^c Signal peptide presence is determined using the Phobius predictor (Käll, L., Krogh, A., Sonnhammer, E.L.L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.* 2004;338:1027-36)

^d Analysed by PlantPAN programme (Chang et al., 2008, PlantPAN: plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics* 9)

NC-not changed; N.A. - not analysed

Lin T. et al. "Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding." *Nature genetics* (2014).

Jupe J. et al. "Phytophthora capsici-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle." *Genome Biol* 14 (2013)

Planta

The elicitor β -cryptogein's activity in tomato is mediated by jasmonic acid and ethylene signalling pathways independently of elicitor-sterol interactions

Tomáš Starý, Pavla Satková, Jana Piterková, Barbora Mieslerová, Lenka Luhová, Jaromír Mikulík, Tomáš Kašparovský, Marek Petřivalský, Jan Lochman

Table S1. Sequences of primers used for qPCR analysis of transcripts

| Acronym | Type | Accession number | Primer | Sequence of primer | T _m [°C] | Product size (bp) |
|-----------|----------------------------|------------------|---------|------------------------|---------------------|-------------------|
| DEF2 | Defensin | BW692307.1 | Forward | CACAATCCATTGTTTCTTTG | 58,13 | 110 |
| | | | Reverse | GCTCAACGACTCACAATGTCT | 57,94 | |
| GLU2 | 1-3 Glucanase | NM_001247229 | Forward | CTCATCAACCAACTCTCCAAG | 57,37 | 93 |
| | | | Reverse | GCTAGACGCCGATATTCTGA | 58,09 | |
| GLU3 | 1-3 Glucanase | XM_004251009 | Forward | AACTCTTTTCCGCCTTCTTCT | 58,66 | 142 |
| | | | Reverse | CGTTGGGTTTGCTTTGTATG | 58,07 | |
| GLUCO5 | 1-4 Glucanase | NM_001247933 | Forward | AGCCTCATCACTCCCTTCAAT | 60,09 | 146 |
| | | | Reverse | TAAATTGGTCCCGGAATTAG | 60,02 | |
| HEV2 | Hevein | NM_001247154 | Forward | GGTAGATGCTTGAGGGTGAC | 57,16 | 102 |
| | | | Reverse | AACGTTTACATCCAATCAAGC | 58,19 | |
| CHIT6 | Chitinase | FS192910 | Forward | TAGTGCTCCAAGTCATTTC | 60,26 | 152 |
| | | | Reverse | AGCAGTAACCCATGCGTAG | 60,15 | |
| OSM4 | Osmotin | NM_001247422 | Forward | CATCCAATCAATGTGTGCT | 58,49 | 102 |
| | | | Reverse | TTGTGTCTCCGAATGTAGT | 57,19 | |
| THAUM1 | Thaumatococin-like protein | GT168633 | Forward | TGGTAACTGTGGTCCGACTAA | 58,15 | 115 |
| | | | Reverse | ATTAGTACCAGCAGGGCAAGT | 57,91 | |
| P1 | PR1 | XM_004246675 | Forward | ACGCTCAAAATTCACCACAAG | 60,16 | 181 |
| | | | Reverse | CTACCCTGGCAAGATTCTCC | 60,08 | |
| P3 | PR1 | NM_001247199 | Forward | CTGCTTTTCCACAGCTAAACG | 60,06 | 144 |
| | | | Reverse | GACGTACCGACTTACGCCATA | 60,03 | |
| P6 | PR1 | NM_001247385 | Forward | ATCTTGCGGTTTATAACGATG | 59,97 | 106 |
| | | | Reverse | CCAGCTCTTGAGTTGGCATAG | 60,02 | |
| ACO4-like | ACC oxidase | XM_004236884 | Forward | CCCAGTTTCTTCATCCACTCA | 60,10 | 90 |
| | | | Reverse | AGAAAAGTCGACGACGGGTAT | 60,01 | |
| ACS2 | ACC synthase | X59145 | Forward | CCTTCACCATACTACCCAGCA | 60,00 | 190 |
| | | | Reverse | ATGGATTGATGGATTGGTCA | 60,01 | |
| EF1a | Elongation factor 1a | X53043 | Forward | GGTCATCATCATGAACCATCC | 60,01 | 175 |
| | | | Reverse | CATACCAGCATCACCGTTCTT | 60,01 | |
| TIP41 | Tip41 | XM_004248715 | Forward | ATGGAGTTTTTGAGTCTTCTGC | 53,20 | 235 |
| | | | Reverse | GCTGCGTTTCTGGCTTAGG | 56,60 | |

Table S2A. Changes in the expression of tomato defence-related genes induced by β -cryptoglycogen and its mutants. Overview of the differential accumulation of candidate defence-related transcripts identified by RT-qPCR 48 h after treatment of three Solanum spp. with 100 nM β -cryptoglycogen (β -CR) and its mutants Valisphae (V84F) and Leudipine (L41F). Gene expression relative to control sample of each genotype was calculated by the $\Delta\Delta Ct$ method 48 hours after the application of the proteins. Significantly upregulated and downregulated transcripts (fold change ≥ 2 , $P < 0.05$ by Student's T-test) are shown in green and red, respectively, using a $\log_2 R$ scale.

| Acronym | Type | NCBI Accession number | Genome number ^a | pI ^b | MW (kDa) ^b | Signal peptide ^c | S. l. cv. Amateur | | β -CR treatment | | Valisphae mutant treatment | | Leudipine mutant treatment | | | | | | | | | | | |
|-----------|------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------|-------|-----------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------|-------|
| | | | | | | | log ₂ R | SE | S. habrochaites | S. habrochaites | S. chmielewskii | S. chmielewskii | S. l. cv. Amateur | S. l. cv. Amateur | S. habrochaites | S. chmielewskii | S. l. cv. Amateur | S. habrochaites | S. chmielewskii | S. l. cv. Amateur | S. habrochaites | S. chmielewskii | | |
| DEF2 | Defensin | BW692307 | SolyC01g007760.2.1 | 9.1 | 8.8 | + | 2.45 | -0.07 | -0.51 | -0.22 | 4.43 | -0.01 | 3.00 | -0.05 | 3.62 | -0.01 | 5.59 | 0.00 | 0.08 | -0.20 | 0.60 | -0.11 | 0.88 | -0.03 |
| GLU2 | 1,3-glucanase (Class2) | NM_001247229 | SolyC01g079860.1.1 | 9.4 | 37.8 | + | -0.40 | -0.45 | -0.31 | -0.40 | 2.58 | -0.03 | -1.67 | -0.43 | 2.27 | -0.07 | 3.63 | 0.00 | -0.93 | -0.35 | -0.03 | -0.13 | -0.55 | -0.02 |
| GLU3 | 1,3-glucanase (Class2) | NM_00251009 | SolyC11g06840.1.1 | 6.6 | 42.6 | + | -0.10 | -0.46 | -0.33 | -0.38 | 0.17 | -0.03 | -1.24 | -0.29 | 3.63 | -0.03 | 3.63 | -0.03 | 0.12 | -0.23 | -0.11 | -0.33 | -0.15 | -0.04 |
| GLUC5 | 1,4-glucanase | NM_001247933 | SolyC08g081630.2.1 | 7.6 | 55.3 | + | 0.65 | -0.30 | -0.30 | -0.26 | 3.76 | -0.03 | 0.42 | -0.35 | 3.99 | -0.02 | 5.29 | -0.01 | -0.79 | -0.41 | 0.73 | -0.21 | 0.02 | -0.03 |
| HEZ7 | Hevein | NM_001247154 | SolyC01g097240.2.1 | 8.5 | 16.0 | + | 2.33 | -0.08 | 0.57 | -0.09 | 4.08 | -0.01 | 4.86 | -0.01 | 4.19 | -0.01 | 3.73 | -0.01 | 0.65 | -0.14 | -0.40 | -0.19 | -0.69 | -0.07 |
| OSM4 | Osmotin | F5192910 | SolyC08g080670.1.1 | 6.4 | 34.9 | + | -1.99 | -0.11 | -2.30 | -0.11 | 4.86 | -0.02 | 2.19 | -0.13 | 4.28 | -0.03 | 3.71 | -0.04 | 0.57 | -0.22 | 0.26 | -0.38 | 0.41 | -0.06 |
| OSM4 | Osmotin | NM_001247422 | SolyC08g080670.1.1 | 6.4 | 34.9 | + | -1.99 | -0.11 | -2.30 | -0.11 | 4.86 | -0.02 | 2.19 | -0.13 | 4.28 | -0.03 | 3.71 | -0.04 | 0.57 | -0.22 | 0.26 | -0.38 | 0.41 | -0.06 |
| THAUM1 | Thaumatin-like protein | GI156833 | SolyC08g080590.2.1 | 8.7 | 24.0 | + | 2.54 | -0.08 | 3.18 | -0.03 | 5.23 | -0.01 | 4.40 | -0.02 | 4.67 | -0.01 | 2.97 | -0.04 | 0.86 | -0.14 | 1.30 | -0.12 | 0.56 | -0.13 |
| P1 | PR1 | NM_002426675 | SolyC01g06010.2.1 | 8.5 | 20.1 | + | 4.95 | -0.02 | 1.46 | -0.10 | 2.45 | -0.04 | -2.21 | -0.55 | -0.15 | -0.28 | 1.30 | -0.37 | -0.41 | -0.40 | -0.38 | -0.44 | 0.93 | -0.19 |
| P2 | PR1 | NM_001247199 | SolyC01g06010.2.1 | 6.4 | 19.8 | + | 0.28 | -0.07 | -0.26 | -0.29 | 4.36 | -0.01 | 0.55 | -0.19 | 1.48 | -0.09 | 5.57 | 0.00 | -2.18 | -0.49 | -2.09 | -0.48 | -1.87 | -0.02 |
| P6 | PR1 | NM_001247385 | SolyC01g074340.1.1 | 9.0 | 17.5 | + | 0.41 | -0.27 | -0.07 | -0.13 | 1.58 | -0.06 | 1.45 | -0.14 | 1.47 | -0.05 | 4.98 | -0.01 | -0.57 | -0.29 | -2.94 | -0.45 | 0.18 | -0.15 |
| ACO4-like | ACC oxidase | XM_000236884 | SolyC04g07980.2.1 | 5.3 | 41.3 | + | 3.93 | -0.03 | 3.81 | -0.03 | 3.42 | -0.06 | 4.02 | -0.03 | 6.01 | -0.01 | 3.42 | -0.04 | -0.59 | -0.36 | 1.48 | -0.16 | -2.93 | -0.53 |
| ACS2 | ACC synthase | X59145 | SolyC01g095080.2.1 | 7.9 | 54.7 | - | 0.81 | -0.22 | 1.31 | -0.07 | 1.33 | -0.08 | 5.00 | -0.01 | 4.39 | -0.01 | 3.35 | -0.02 | -1.12 | -0.40 | -0.84 | -0.29 | 1.61 | -0.07 |

NC=not changed; N.A.= not analysed
 Numbers in dark red = significant changes (more than 2-fold change, $P < 0.05$ by Student's T-test)
 according to solgenomics network (<http://solgenomics.net>)
^a Theoretical Mr (kDa) and pI are calculated using the Compute pI/Mr tool from ExPASy

^b Signal peptide presence is determined using the Phobius predictor (Keil, L., Krogh, A., Sonnhammer, E.L.L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.* 2004;338:327-348)

^c Analysed by PlantPAV programme (Chang et al., 2008, PlantPAV: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics* 9)

^d INF1, Kawamura et al., 2009; OIL, Sitkova et al., 2016; P, caracul, Jupe et al., 2013

References:

- Kawamura Y et al., INF1, Elicitin Activates Jasmonic Acid- and Ethylene-mediated Signaling Pathways and Induces Resistance to Bacterial Wilt Disease in Tomato. *J. Phytopathol.* 157 (2009)
- Jupe L et al., "Phytophthora capsici-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle." *Genome Biol.* 14 (2013)
- Lin T et al., "Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding." *Nature genetics* (2014)
- Sitková P et al., "Diverse responses of wild and cultivated tomato to *Bdiba*, oligonin and Oidium neoykopselic infection. *Ann. Bot.* (2016)

Table S2B. Changes in the expression of tomato defence-related genes induced by β -caryophenol and its mutants. Overview of the differential accumulation of candidate defence-related transcripts identified by RT-qPCR 48 h after treatment of three *Solanum* spp. with 100 nM β -caryophenol (β -CR) and its mutants Va184Phe (V84F) and Leu41Phe (L41F). Gene expression relative to control sample of *S. lycopersicum* cv. Amateur was calculated by the $\Delta\Delta Ct$ method 48 hours after the application of the proteins. Significantly upregulated and downregulated transcripts (fold change ≥ 2 , $P < 0.05$ by Student's *t*-Test) are shown in green and red, respectively, using a $\log_2 R$ scale.

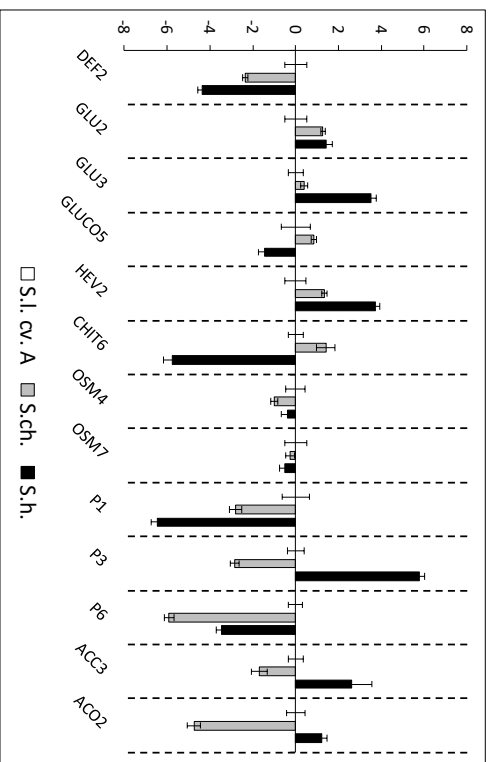
| Acronym | Type | NCBI Accession number | Genome number ^a | pI ^b | MW (kDa) ^b | Signal peptide ^c | β -CR treatment | | Va184Phe mutant treatment | | Leu41Phe mutant treatment | | | | | | | |
|-----------|------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------|-------|---------------------------|--------|---------------------------|-------|------------------------|--------|------------------------|-------|------------------------|----|
| | | | | | | | <i>S. habrochaites</i> | | <i>S. chmielewskii</i> | | <i>S. habrochaites</i> | | <i>S. chmielewskii</i> | | <i>S. habrochaites</i> | | <i>S. chmielewskii</i> | |
| | | | | | | | log2R | SE | log2R | SE | log2R | SE | log2R | SE | log2R | SE | log2R | SE |
| DEF2 | Defensin | BW692307 | SolyC07g007f60.2.1 | 9.1 | 8.8 | -9.68 | 0.25 | -0.37 | 0.07 | -5.55 | 0.07 | 0.80 | 0.06 | -8.57 | 0.12 | -3.91 | 0.07 | |
| GLU2 | 1,3-glucanase (Class2) | NM_001247229 | SolyC10g079860.1.1 | 9.4 | 37.8 | 2.15 | 0.15 | 4.25 | 0.07 | 3.53 | 0.08 | 7.55 | 0.07 | 1.81 | 0.15 | 1.12 | 0.07 | |
| GLU3 | 1,3-glucanase (Class2) | NM_004251009 | SolyC11g080440.1.1 | 6.6 | 42.6 | 3.29 | 0.41 | 0.67 | 0.10 | 5.89 | 0.12 | 4.13 | 0.10 | 3.51 | 0.34 | 0.35 | 0.10 | |
| GLUCOS | 1,4-glucanase | NM_001247933 | SolyC08g081620.2.1 | 7.6 | 55.3 | -1.71 | 0.29 | 3.95 | 0.07 | 1.91 | 0.07 | 5.48 | 0.07 | -1.35 | 0.22 | 0.21 | 0.08 | |
| HEV2 | Hevein | NM_001247154 | SolyC01g097240.2.1 | 8.5 | 16.0 | 2.07 | 0.16 | 3.10 | 0.07 | 5.59 | 0.07 | 2.74 | 0.07 | 1.00 | 0.21 | -1.67 | 0.10 | |
| CHIT6 | Chitinase (class 4) | FS192910 | SolyC10g055820.1.1 | 6.4 | 34.9 | -5.72 | 0.43 | 4.05 | 0.24 | -3.70 | 0.24 | 2.90 | 0.24 | -7.72 | 0.45 | -0.41 | 0.25 | |
| OSM4 | Osmotin | NM_001247422 | SolyC08g080701.1 | 5.8 | 27.5 | -0.70 | 0.27 | 3.88 | 0.11 | 3.68 | 0.11 | 4.07 | 0.11 | -1.37 | 0.24 | 0.32 | 0.10 | |
| THAUM1 | Thaumatin-like protein | GI168633 | SolyC08g080590.2.1 | 8.7 | 24.0 | 0.12 | 0.20 | 2.42 | 0.11 | 1.60 | 0.11 | 0.16 | 0.12 | -1.76 | 0.17 | -2.24 | 0.17 | |
| P1 | PR1 | NM_004246675 | SolyC02g060010.2.1 | 8.5 | 20.1 | -9.93 | 0.30 | -5.29 | 0.17 | -11.54 | 0.33 | -6.44 | 0.41 | -12.27 | 0.47 | -6.81 | 0.25 | |
| P3 | PR1 | NM_001247199 | SolyC01g106610.2.1 | 6.4 | 19.8 | 5.23 | 0.35 | 1.23 | 0.12 | 6.97 | 0.15 | 2.44 | 0.12 | 3.40 | 0.49 | -5.00 | 0.12 | |
| P6 | PR1 | NM_001247385 | SolyC00g174340.1.1 | 9.0 | 17.5 | -3.95 | 0.26 | -4.74 | 0.14 | -2.42 | 0.14 | -1.33 | 0.13 | -6.82 | 0.46 | -6.14 | 0.20 | |
| ACC4-like | ACC oxidase | NM_004236884 | SolyC04g007980.2.1 | 5.3 | 41.3 | 2.49 | 0.37 | -2.20 | 0.22 | 4.69 | 0.21 | -2.20 | 0.22 | 0.16 | 0.26 | -8.54 | 0.57 | |
| ACS2 | ACS synthase | XS9145 | SolyC01g095080.2.1 | 7.9 | 54.7 | 1.73 | 0.31 | -4.21 | 0.19 | 4.81 | 0.17 | -2.19 | 0.17 | -0.43 | 0.34 | -3.94 | 0.19 | |

Numbers in dark red - significant changes (more than 2-fold change, $p < 0.05$ by Student's *t*-Test)

^a according to solgenomics network (<http://solgenomics.net>)

^b Theoretical Mr (kDa) and pI are calculated using the Compute pI/Mr tool from EXPASY

^c Signal peptide presence is determined using the Phobius predictor (Kall L, Krogh A, Sonnhammer ELL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.* 2004;338:1027-36)



Differences in the basal levels of defence-related gene transcripts between tomato genotypes (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur (A), *Solanum chmielewskii* (Ch) and *Solanum habrochaites* (H)).

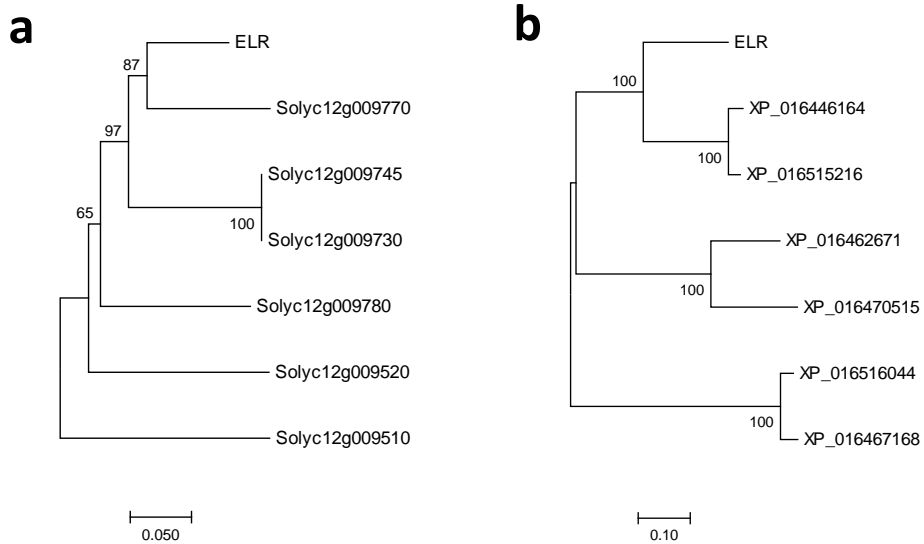


Fig. S1 Homologs of the ELR protein in tomato and tobacco. Phylogenetic tree of the six tomato (**a**) and tobacco (**b**) genes exhibiting the highest homology to the ELR protein from potato (Du et al. 2015). The tree was constructed using the Neighbor-Joining method in MEGA7 (Kumar et al. 2016), and the percentages of replicate trees in which the associated genes clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874

Journal of Experimental Botany

Subcellular localization and dynamics of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD upon cryptogein elicitation

Elodie Noirot, Christophe Der, Jeannine Lherminier, Franck Robert, Pavla Moricova, Kiên Kiêu, Nathalie Leborgne-Castel, Françoise Simon-Plas, and Karim Bouhidel


```

RBOHD1      MQNSENHHPHHQHHSDETEIIGNDRASYSGPLSGPLNKRGGKKSARFNIPESTDIGTSVG 60
RBOHD2      MQNSENHHPHHQHHSDETEIIGNDRASYSGPLSGPLNKRGGKKSARFNIPESTDIGTSVG 60
*****:*****

RBOHD1      TGKSNDDAYVEITLDVREDSVAVHSVKTAGGDDVEDPELALLAKGLEKKSTLGSSLVRN 120
RBOHD2      TGKSNDDAYVEITLDVREDSVAVHSVKTAGGDDVEDPELALLAKGLEKKSTLGSSLVRN 120
** .*****

RBOHD1      ASSRIRQVSQELRRLASLNKRPIPTGRFDRNKSAAAHALKGLKFI SKTDGGAGWAAVEKR 180
RBOHD2      ASSRIRQVSQELRRLASLNKRPIPTGRFDRNKSAAAHALKGLKFI SKTDGGAGWAAVEKR 180
*****

RBOHD1      FDEITASTTGLLPRAKFGECIGMNKESKEFAVELYDALARRNITTD SINKAQLKEFWDQ 240
RBOHD2      FDEITASTTGLLPRAKFGECIGMNKESKEFAVELYDALARRNITTD SINKAQLKEFWDQ 240
*****

RBOHD1      VADQSFDSRLQTFDFMVDKADGRIT EEEVREIIGLSASANRLSTIQKQADEYAAMIMEE 300
RBOHD2      VADQSFDSRLQTFDFMVDKADGRIT EEEVREIIGLSASANRLSTIQKQADEYAAMIMEE 300
*****

RBOHD1      LDPNNLGYIMIENLEMLLLQAPNQSVQRGGESRNL SQMLSQKLKHTQERNPIVRWYKSF 360
RBOHD2      LDPNNLGYIMIENLEMLLLQAPNQSVQRGGESRNL SQMLSQKLKHTQERNPIVRWYKSF 360
*****

RBOHD1      YFLLDNWQRVWVLLWIGIMAGLFTWKYIQYKEKAAYKVMGPCVCF AKGAAETLKLNMAI 420
RBOHD2      YFLLDNWQRVWVLLWIGIMAGLFTWKYIQYKEKAAYKVMGPCVCF AKGAAETLKLNMAI 420
*****

RBOHD1      ILLPVCRNITITWLRNKTRLGAAVPFDDNLFHKVIAVAIALGVGIHGLSHLTCDFPRLLN 480
RBOHD2      ILLPVCRNITITWLRNKTRLGAAVPFDDNLFHKVIAVAIALGVGIHGLSHLTCDFPRLLN 480
** :*****

RBOHD1      ASEEEYEPKYYFGDQPESYWWFIKGV EGVGTGIIMVVLMAIAFTLATPWFRNRVSLPKP 540
RBOHD2      ASEEEYEPKYYFGDQPESYWWFIKGV EGVGTGIIMVVLMAIAFTLATPWFRNRVSLPKP 540
*****

RBOHD1      FHKLTFGNFVYSHHLFVIVYTLFIVHGEKLYITKD WYKRTTWMYLTIPIILYASERLIR 600
RBOHD2      FHKLTFGNFVYSHHLFVIVYTLFIVHGEKLYITKD WYKRTTWMYLTIPIILYASERLIR 600
*****

RBOHD1      AFRSSIKAVKILKVAVYPGNVLAHMSKPPQGYKYKSGQYMFVNCAAVSPFEWHPFSITSA 660
RBOHD2      ALRSSIKAVKILKVAVYPGNVLAHMSKPPQGYKYKSGQYMFVNCAAVSPFEWHPFSITSA 660
* :*****

RBOHD1      PGDDYLSVHIRTLDWTRQLKTVFSEVCQPPNGKSGLLRADY LQGENNPNFPRVLIDGP 720
RBOHD2      PGDDYLSVHIRTLDWTRQLKTVFSEVCQPPNGKSGLLRADY LQGENNPNFPRVLIDGP 720
*****

RBOHD1      YGAPAQDYKKYEVVLLVGLGIGATPMISIVKDIVNNMKAMDEEENSL EDGHNMMAPNSS 780
RBOHD2      YGAPAQDYKKYEVVLLVGLGIGATPMISIVKDIVNNMKAMDEEENSL ENGDNNMAQNSS 780
*****:*.****

RBOHD1      PNIAKNKGNKSGSASGGNNFNTRRAYFYWVTREQGSFDWFKGIMNEAAEMDHKGV IEMHN 840
RBOHD2      PNIAQKRGKSDSASGRNNFNTRRAYFYWVTREQGSFDWFKGIMNEAAEMDHKGV IEMHN 840
*****:*.****

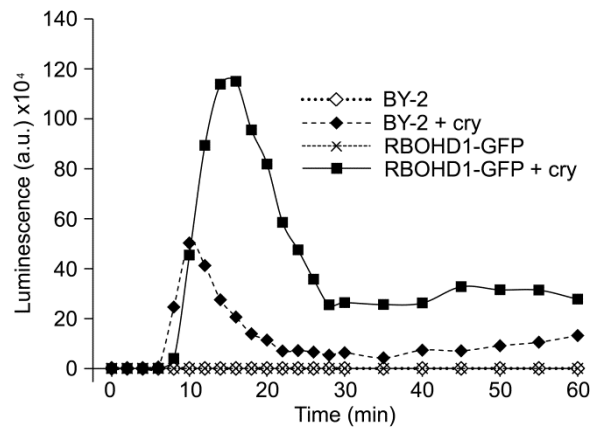
RBOHD1      YCTSVYEEGDARSALITMLQSLHHA KNGVDIVSGTRVKSHFAKPNWRNVYKR IALNHPDA 900
RBOHD2      YCTSVYEEGDARSALITMLQSLHHA KNGVDIVSGTRVKSHFAKPNWRNVYKR IALNHPDA 900
*****:

RBOHD1      KVGVFYCGAPALTKELRQH ALDFSHKTSTKFDHKNF 938
RBOHD2      KVGVFYCGAPALTKELRQH ALDFSHKTSTKFDHKNF 938
*****

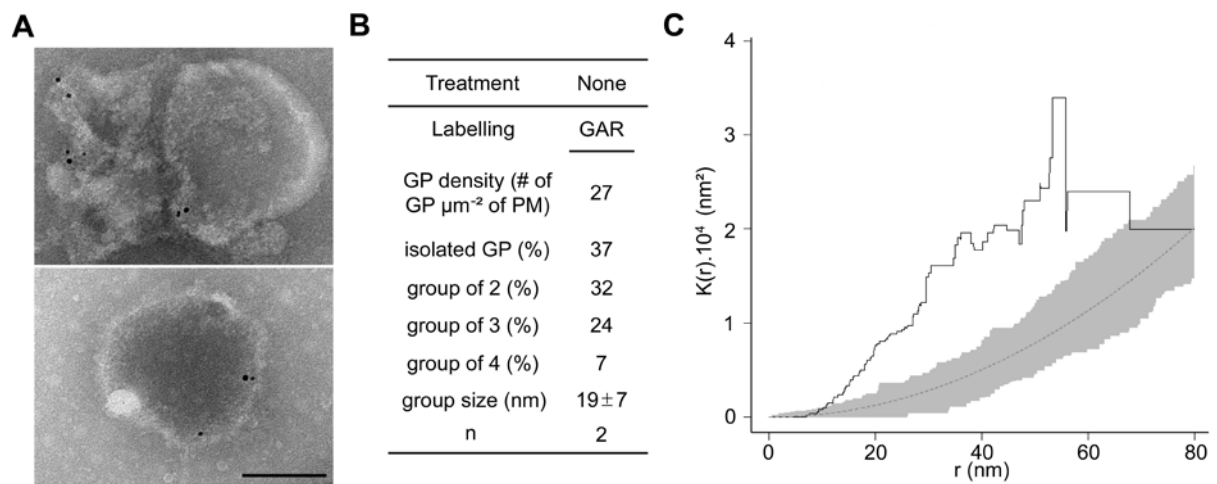
```

Supplementary Fig. S1. Alignment of RBOHD1 and RBOHD2 amino acid sequences. Alignment was realized using ClustalW (Larkin et al., 2007). Fourteen amino acid differences are found in the two tobacco genes.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23, 2947-2948.



Supplementary Fig. S2. Kinetics of ROS production upon elicitation by cryptogein. ROS burst was measured in wild-type and *NtrbohD1*-expressing BY-2 cells by chemiluminescence (a.u.: arbitrary units). Kinetics is representative of 3 independent experiments.



Supplementary Fig. S3. RBOHD-GFP protein forms clusters in the plasma membrane. (A) Representative transmission electron micrographs of PM vesicles from RBOHD-GFP-expressing cells and labelled with anti-GFP antibody and secondary IgG coupled to GPs of 5 nm (GAR). (Scale bar = 100 nm). (B) Labelling characteristics of PM vesicles. n = number of experiments. (C) Ripley's K-function analysis of RBOHD-GFP distribution on PM vesicles. Black line: sample $K(r)$, dotted line: theoretical Poisson $K(r)$, grey area: 99% Poisson simulation interval.

Supplementary Table S1. Primers used in this study

Cloning primers

| Primer name | Sequence |
|----------------|--|
| attB1-NoxD5 | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAATGCAAAATTCGGAAAAT |
| attB2-NoxD1-2 | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAACCTGTGTCCTTAGCTG |
| attB2-NoxD2-1 | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATAGGGAGAGGTGGTAGATTC |
| attB1-NtrbohD4 | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGTTTATTTAGGGCAAGTT |
| attB2-NtrbohD1 | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGAAATTTTCTTTATGGAAATCAAAC |

qRT-PCR primers

| Gene name | Sequence |
|---------------|---|
| EF-1a | Forward 5'-TGAGATGCACCACGAAGCTC Reverse 5'-CCAACATTGTCACCAGGAAGTG |
| L25 | Forward 5'-CCCCTCACCACAGAGTCTGC Reverse 5'-AAGGGTGTTGTTGTCCTCAATCTT |
| PP2A | Forward 5'-GTGAAGCTGTAGGGCCTGAGC Reverse 5'-CATAGGCAGGCACCAAATCC |
| <i>RBOHD1</i> | Forward 5'-CATCAAAACAGCTAAGGACACAG Reverse 5'-GTACACAATAGGGAGAGTTGGTAGAC |
| <i>RBOHD2</i> | Forward 5'-AGATACCAAGGGAATTAAGAATGTG Reverse 5'-GGCACCCATCAAAGAGG |

Seznam autorských prací

1. Starý T., **Satková P.**, Piterková J., Mieslerová B., Luhová L., Mikulík J., Kašparovský T., Petřivalský M., Lochman J. (2019): The elicitor β -cryptogein's activity in tomato is mediated by jasmonic acid and ethylene signalling pathways independently of elicitor-sterol interactions. *Planta* 249 (3), 739-749.
2. **Satková P.**, Starý T., Plešková V., Zapletalová M., Kašparovský T., Činčalová-Kubienová L., Luhová L., Mieslerová B., Mikulík J., Lochman J., Petřivalský M. (2017): Diverse responses of wild and cultivated tomato to BABA, oligandrin and *Oidium neolyopersici* infection. *Annals of Botany* 119 (5), 829-840.
3. **Moricová P.**, Luhová L., Lochman J., Kašparovský T., Petřivalský M. (2014): Elicitiny: klíčové molekuly interakcí rostlin a patogenů. *Chemické listy* 108, 1133-1139.
4. Noirot E., Der Ch., Lherminier J., Robert F., **Moricova P.**, Kieu K., Leborgne-Castel N., Simon-Plas F., Bouhidel K. (2014): Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. *Journal of Experimental Botany* 65 (17), 5011-5022.
5. **Moricová P.**, Ondřej V., Navrátilová B., Luhová L. (2013): Changes of DNA methylation and hydroxymethylation in plant protoplast cultures. *Acta Biochimica Polonica* 60 (1), 33-36.

Prezentace výsledků na konferencích

(osobní účast označena *)

Piterková J., **Moricová P.**, Luhová L., Petřivalský M., Fellner M.: poster - The relationship between nitric oxide production and plant hormone gibberelic acid during germination and growth of tomato exposed to osmotic stress. XIII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, 14.-15.4.2009, Brno.

Piterková J., **Moricová P.**, Luhová L., Petřivalský M., Fellner M.: poster - The relationship between nitric oxide production and plant hormone gibberelic acid during germination and growth of tomato exposed to osmotic stress. Annual Main Meeting of the Society for Experimental Biology, 28.6.-1.7.2009, Glasgow, UK

***Moricová P.**, Luhová L., Panáček A., Navrátilová B., Petřivalský M.: poster – Vliv nanočástic stříbra na regeneraci protoplastů. XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, 20.-21.4.2010, Brno

***Moricová P.**, Luhová L., Ondřej V., Panáček A., Navrátilová B., Petřivalský M.: poster - Působení nanočástic stříbra na proces regenerace protoplastů. XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, 1.-2.11.2011, Brno.

Jahnová J., Kubienová L., ***Moricová P.**, Piterková J., Tichá T., Mieslerová B., Navrátilová B., Sedlářová M., Ondřej V., Panáček A., Fellner M., Lebeda A., Luhová L., Petřivalský M.: přednáška M. Petřivalského – Úloha reaktivních forem dusíku a kyslíku ve vývoji a stresové odpovědi rostlin. XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, 1.-2.11.2011, Brno.

Moricová P., Luhová L., Ondřej V., Navrátilová B., Petřivalský M.: poster - Vliv stříbra na proces regenerace protoplastů. Nové poznatky z genetiky a šlechtění poľnohospodárskych rastlín, 8.-9.11.2011, Piešťany, Slovensko.

***Moricová P.**, Piterková J., Luhová L., Kašparovský T., Lochman J., Petřivalský M.: poster - Interakce elicitorů oligandrinu, kryptogeinu a jeho mutantů s patosystémem *Solanum* spp. - *Oidium neolyopersici*. XXIII. Biochemický sjezd, 26.-29.8.2012, Brno.

***Moricová P.**, Piterková J., Luhová L., Petřivalský M., Ilík P.: poster - Studium elicitinů sledováním biofotonové emise u rostlin *Nicotiana tabacum*. XIII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků (Sigma Aldrich), 14.-17.5.2013, Žďár nad Sázavou.

Moricová P., Ilík P., Luhová L., Piterková J., Lochman J., Kašparovský T., Petřivalský M.: poster - Biophoton imaging after elicitin treatment of plants. 11th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, 17.-19.7.2013, Warsaw, Poland.

Kraiczová V., Kubienová L., **Moricová P.**, Lamattina L., Petřivalský M., Luhová L.: poster - Vliv NO a eATP na vývoj kořenového vlášení u semenáčků genotypů rajčete lišících se rezistencí k padlí rajčatovému. XIV. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, 13.5.-16.5.2014, Milovy.

Jendřišáková T., **Moricová P.**, Železná M., Luhová L., Lochman J., Kašparovský T., Petřivalský M.: poster - The role of S-nitrosoglutathione reductase in defence response of tobacco plants and cells to elicitors. 16th European congress on biotechnology, 13.-16.6.2014, Edinburgh, Scotland.

***Moricová P.**, Železná M., Jendřišáková T., Luhová L., Petřivalský M., Lochman J., Kašparovský T.: poster - Involvement of S-nitrosoglutathione reductase in responses of tobacco cells and plants to cryptogein. 5th Plant NO club meeting, 24.-25.6.2014, Munich, Germany.

Starý T., **Moricová P.**, Pečinková M., Kubienová L., Luhová L., Kašparovský T., Petřivalský M., Lochman J.: poster - Study of transcriptome changes in tomato plants after application of elicitin oligandrin and β -aminobutyric acid (BABA). 11th conference of the European foundation for plant pathology, 8.-13.9.2014, Cracow, Poland.

***Moricová P.**, Starý T., Pečinková M., Lochman J., Mieslerová B., Kubienová L., Luhová L., Kašparovský T., Petřivalský M.: poster - Oligandrin and β -aminobutyric acid-induced resistance to *Oidium neolyopersici* in tomato plants. FEBS Young Scientists' Forum, 27.-29.8.2014, Paris, France.

***Moricová P.**, Starý T., Pečinková M., Lochman J., Mieslerová B., Kubienová L., Luhová L., Kašparovský T., Petřivalský M.: poster - Oligandrin and β -aminobutyric acid-induced resistance to *Oidium neolyopersici* in tomato plants. FEBS EMBO 30.8.-4.9. 2014, Paris, France.

Jendřišáková T., ***Moricová P.**, Železná M., Luhová L., Lochman J., Kašparovský T., Petřivalský M.: poster - The role of S-nitrosoglutathione reductase in defence response of tobacco plants and cells to elicitors. XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, 11.-12.11.2014, Brno.

Kraiczová V., Kubienová L., ***Moricová P.**, Lamattina L., Petřivalský M., Luhová L.: poster - Vliv NO a eATP na vývoj kořenového vlášení u semenáčků genotypů rajčete lišících se rezistencí k padlí rajčatovému. XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, 11.-12.11.2014, Brno.

Starý T., ***Moricová P.**, Pečinková M., Kubienová L., Luhová L., Kašparovský T., Petřivalský M., Lochman J.: přednáška T. Starého - Study of transcriptome changes in tomato plants after application of elicitin oligandrin and β -aminobutyric acid (BABA). XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, 11.-12.11.2014, Brno.

***Satková P.**, Pečinková M., Starý T., Lochman J., Mieslerová B., Luhová L., Kašparovský T., Petřivalský M.: poster - Elicitor oligandrin indukuje rezistenci *Solanum* spp. proti *Oidium neolyopersici*. XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, 11.-12.11.2014, Brno.

Jendřišáková T., **Satková P.**, Luhová L., Lochman J., Kašparovský T., Petřivalský M.: poster - Role S-nitrosoglutathionreduktasy v obranném mechanismu buněk tabáku po aplikaci elicitinů. XV. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, 12.-15.5.2015, Milovy.

Satková P., Jendřišáková T., Železná M., Tichá T., Luhová L., Lochman J., Kašparovský T., Petřivalský M.: poster - Differential activation of tobacco defence responses elicited by modified cryptogein with modulated capacity to induce ROS production. 12th international conference on reactive oxygen and nitrogen species in plants: from model systém to field, 24.-26.6.2015, Verona, Italy.

Curriculum vitae

Osobní údaje

Jméno a příjmení: **PAVLA SATKOVÁ**
Rodné příjmení: Moricová
Datum a místo narození: 16.9.1986, Opava
E-mail: moricovapavla@seznam.cz
Telefon: +420 776 208 675

Vzdělání

2011 – dosud: Doktorské studium, obor Biochemie, PřF UP Olomouc
Disertační práce na téma: „Studium obranných mechanismů rostlin aktivovaných elicitinu“
Vedoucí disertační práce: doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.

2009 – 2011: Magisterské studium, obor Biochemie, PřF UP Olomouc
Diplomová práce na téma: „Studium vlivu koloidního stříbra na proces regenerace protoplastů“
Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.

2006 – 2009: Bakalářské studium, obor Biochemie, PřF UP Olomouc
Bakalářská práce na téma: „Vztah mezi produkcí oxidu dusnatého a rostlinných hormonů za fyziologických a stresových podmínek“
Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.

2002 – 2006: Střední zdravotnická škola v Ostravě, obor Farmaceutický laborant

Pracovní zkušenosti

Září 2011 – říjen 2015: Katedra Biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci
Pozice: Vědecký pracovník (projekt GAČR, úvazek 0,5)

Září – prosinec 2011, leden – únor 2013, leden – červen 2014:
Katedra Biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci
Pozice: Koordinátor praxí (projekt OPVK Biolink, úvazek 0,2)

Pedagogická činnost

2012, 2014, 2015: Základní cvičení z biochemie (KBC/BCHC)

2011 – 2015: Spoluúčast na výuce v rámci předmětů Experimentální metody studia obranné reakce rostlin (KBC/EMORR), Experimentální metody biochemie (KBC/EMB)

2012 – 2015: Konzultant bakalářské práce Terezy Jendrišákové (obhájeno červen 2013), diplomové práce Bc. Martiny Železné (obhájeno srpen 2014) a Bc. Terezy Jendrišákové (obhájeno červen 2015)

2011 – 2015: Vedení workshopů pro studenty bakalářských a magisterských studijních programů a středoškolské studenty v rámci OPVK projektů

Přehled absolvovaných vědecko-výzkumných stáží

Duben 2014: Universidad de Jaén, Department of Experimental Biology, Jaén, Španělsko (Dr. Juan Bautista Barroso Albarracín) – 1 měsíc

Listopad 2013: Universidad Nacional de Mar del Plata, Instituto de Investigaciones Biológicas, Mar del Plata, Argentina (prof. Lorenzo Lamattina) – 1 měsíc

Březen – říjen 2013: Agroecologie INRA, Dijon, Francie (Dr. Karim Bouhidel, Dr. Nathalie Leborgne-Castel) – 8 měsíců

Přehled absolvovaných praxí

Červenec 2008: Slezská nemocnice v Opavě, oddělení Centrálních laboratoří - úsek klinické biochemie, hematologie, radioimunoanalýzy (vrchní laborant - Dana Kožaná) – 1 měsíc

Květen 2005: Lékárna U Anděla strážce, Ostrava, pozice farmaceutický laborant (vedoucí lékárny - Mgr. Jitka Letochová) – 1 měsíc

Řešené grantové projekty – člen řešitelského týmu

2012 – 2015: GAČR 501/12/0590 „Charakterizace procesů zapojených v indukci resistance rostlin na patogeny s využitím elicitinů se změněnou schopností vyvolávat obranné reakce“ (řešitelka doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.) – vědecký pracovník

2012 – 2014: OPVK BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (řešitel doc. Ing. Martin Mandl, CSc.) – vedení workshopů a stáží, vědecko-výzkumná stáž (Francie)

2012 – 2014: OPVK FytoChem - mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii (řešitelka doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.) – vedení workshopů, tvorba výukových modulů

2012 – 2013: Mobility ČR-Argentina „Interakce signálních drah extracelulárního ATP, oxidu dusnatého a rostlinných hormonů při regulaci růstu a vývoje rostlin“ (řešitel doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.) – vědecká činnost, vědecko-výzkumná stáž (Argentina)

2011 FRVŠ 2043/2011/G4: „Zavedení nových úloh do experimentálního cvičení studentů oboru biochemie - Studium S-nitrosoglutathionreduktasy v průběhu vývoje rostliny“ (řešitelka Mgr. Lucie Kubienová, Ph.D.) – účast na výuce cvičení EMORR

2011 – 2014: OPVK Biolink - Podpora spolupráce mezi akademickou sférou a praxí v oblasti biochemických oborů (řešitel doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.) – vedení workshopů, koordinátor praxí, vědecko-výzkumná stáž (Španělsko)

2011 – 2012: OPVK AescuLab - systematické laboratorní vzdělávání studentů a pracovníků VaV v oblasti Life Sciences s podporou e-learningu (řešitelka doc. Lenka Luhová, Ph.D.) – vedení workshopů

2010 – 2013: OPVK Přírodní vědy ve 21. století - Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů (řešitelka doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.) – vedení laboratorních cvičení pro středoškolské studenty