

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv modifikace struktury elicitinů infestinu a
kryptogeinu na schopnost aktivace obranných
mechanismů na modelovém systému *Solanum spp.***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jarmila Králíková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Martina Janků
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové 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 24.4.2018

...

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

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

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Jarmila Králíková
Název práce: Vliv modifikace struktury elicitinů infestinu a kryptogeinu na schopnost aktivace obranných mechanismů na modelovém systému *Solanum spp.*
Typ práce: Diplomová
Pracoviště: Katedra biochemie
Vedoucí práce: doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Martina Janků
Rok obhajoby práce: 2018

Abstrakt:

Oomycety *Phytophthora infestans* a *Phytophthora cryptogea* jsou známé jako celosvětově rozšířené patogeny parazitující na významných hospodářských plodinách, jako jsou např. rajčata, brambor nebo tabák. Tyto oomycety sekretují nízkomolekulární proteinové efekторы známé jako elicitiny. Hlavními zástupci jsou elicitin infestin a kryptogein. Cílem diplomové práce bylo studium vlivu infestinu a kryptogeinu včetně jejich mutantních forem s modifikací v poloze 13 a 84 na aktivaci obranných mechanismů vybraných genotypů *Solanum spp.* vedoucí k ovlivnění vývoje patogenu *Pseudoidium neolycopersici*. Modifikace v poloze 13 a 84 ovlivňují nekrotický účinek elicitinů a schopnost aktivovat produkci reaktivních forem kyslíku. Po aplikaci všech testovaných elicitinů byl zaznamenán inhibiční efekt s různou intenzitou na vývoj patogenu u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur a infestinu a jeho mutantů u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii*. Byl pozorován rozdílný efekt elicitinů na aktivaci produkce ROS u jednotlivých genotypů *Solanum spp.*, tvorbu nekrotických ložisek na listech a změny v askorbátperoxidasové a guajakolperoxidasové aktivitě doplněné detekcí metodou nativní gelové elektroforézy, stejně tak, jako změny v histochemické lokalizaci produkce peroxidu vodíku a superoxidu.

Klíčová slova:

Askorbátperoxidasa, elicitiny, guajakolperoxidasa, infestin, kryptogein, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora infestans*, *Pseudoidium neolycopersici*, reaktivní formy kyslíku a dusíku, *Solanum spp.*, superoxid

Počet stran: 100
Počet příloh: 0
Jazyk: Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Jarmila Králíková
Title: The effect of modification of elicitor infestin and cryptogein structures to ability to activate defence mechanisms in a model system *Solanum spp.*
Type of thesis: Diploma
Department: Department of Biochemistry
Supervisor: doc.RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Consultant: Mgr. Martina Janků
The year of presentation: 2018

Abstract:

Oomycetes *Phytophthora infestans* and *Phytophthora cryptogea* are known as worldwide widespread pathogens, which parasitise on important agricultural crops like tomato, potato and tobacco. These oomycetes secrete low-molecular weight protein effectors known as elicitors. Infestin and cryptogein belong to the main elicitor representatives. The aim of the diploma thesis was to study effects of infestin and cryptogein including their mutated forms modified in position 13 and 84 on activation of defence mechanisms of selected *Solanum spp.* genotypes which influence development of pathogen *Pseudoidium neolyopersici*. Modifications in positions 13 and 84 influence elicitor necrotic activity and their capacity to activate production of reactive oxygen species. Inhibitory effect of variable intensity to pathogen development was detected for all tested elicitors on plants of sensitive genotype *S. lycopersicum* cv. Amateur and for infestin and its mutant for moderately resistant *S. chmielewskii* genotype. Different effects of elicitors on activation of ROS production in *Solanum spp.* genotypes, necrotic lesions formation in leaves and changes in ascorbate- and guaiacol peroxidase activities, which were detected by native gel electrophoresis, as well as changes in histochemical localization of production of hydrogen peroxide and superoxide.

Keywords: Ascorbate peroxidase, elicitors, guaiacol peroxidase, infestin, cryptogein, hydrogen peroxide, *Phytophthora infestans*, *Pseudoidium neolyopersici*, reactive oxygen and nitrogen species, *Solanum spp.*, superoxide

Number of pages: 100
Number of appendices: 0
Language: Czech

OBSAH

1.	Úvod	1
2.	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Rod <i>Phytophthora</i>	2
2.1.1	<i>Phytophthora infestans</i>	2
2.1.2	<i>Phytophthora cryptogea</i>	5
2.2	Imunita	7
2.3	Elicitiny	10
2.3.1	Klasifikace elicitinů	10
2.3.2	Infestin	12
2.3.3	Kryptogein	14
2.3.3.1	Mutantní formy kryptogeinu	15
2.3.4	Signální dráhy rostlin aktivované elicitiny	15
2.3.5	Hypersenzitivní reakce a buněčná smrt	17
2.3.6	Systémově získaná rezistence	17
2.4	Reaktivní formy kyslíku	20
2.4.1	Produkce ROS	22
2.4.2	Odbourávání ROS	23
2.4.2.1	Neenzymové mechanismy odbourávání ROS	24
2.4.2.2	Enzymové mechanismy odbourávání ROS	25
2.4.3	Askorbát-glutathionový cyklus	27
2.5	Reaktivní formy dusíku	29
2.5.1	Role NO u rostlin	30
2.5.2	Produkce RNS	31
2.5.3	Interakce mezi RNS a ROS	33
2.5.3.1	Interakce RNS a ROS v průběhu symbiózy	34
2.5.4	Zapojení RNS a ROS v obranných reakcích rostlin	35
2.5.5	S-nitrosylace	36
2.5.5.1	Role transkripčního kofaktoru NPR1 v průběhu S-nitrosylace	37
2.5.5.2	Nitrosylace kovů a oxidace Zn-thiolátových komplexů	39
2.5.6	Nitrace tyrosinu	39
2.5.7	Vliv posttranslačních modifikací na enzymovou aktivitu Regulace askorbát-glutathionového cyklu prostřednictvím nitrace tyrosinu	41
2.5.8	Regulace askorbát-glutathionového cyklu prostřednictvím S- nitrosylace	44
3.	Experimentální část	46
3.1	Použité chemikálie	46
3.2	Přístroje a experimentální vybavení	46
3.3	Rostlinný materiál	46
3.4	Patogen	47
3.5	Metody	47
3.5.1	Příprava rostlinného materiálu – elicitace listů s následnou inokulací patogenem <i>Pseudoidium neolycopersici</i>	47
3.5.2	Příprava listových disků pro fytopatologickou studii vlivu aplikace elicitinů na vývoj patogenu <i>Pseudoidium neolycopersici</i>	48
3.5.3	Fytopatologické zhodnocení vývoje patogenu <i>P. neolycopersici</i>	48

3.5.4	Lokalizace produkce reaktivních forem kyslíku	48
3.5.5	Příprava extraktů	49
3.5.6	Stanovení aktivity askorbátperoxidasy	49
3.5.7	Stanovení aktivity guajakolperoxidasy	49
3.5.8	Detekce peroxidase aktivity metodou nativní gelové elektroforézy	50
3.5.9	Stanovení koncentrace proteinů	50
4.	Výsledky	51
	Fytopatologická studie srovnání vývoje patogenu <i>Pseudoidium neolycopersici</i> na genotypch <i>Solanum spp.</i>	51
4.1	Fyziologický efekt elicitace na vývoj patogenu – fytopatologická studie	54
4.2	Fyziologický efekt elicitace-detekce listových nekrot po elicitaci a inokulaci patogenem	57
4.3	Lokalizace produkce reaktivních forem kyslíku	61
4.4	Lokalizace produkce superoxidu	61
4.4.1	Lokalizace produkce peroxidu vodíku	65
4.4.2	Askorbátperoxidase a guajakolperoxidase aktivita	68
4.5	Porovnání aktivity askorbátperoxidasy a guajakolové peroxidasy u jednotlivých genotypů <i>Solanum spp.</i>	68
4.5.1	Stanovení aktivity askorbátperoxidasy	69
4.5.2	Stanovení aktivity guajakolové peroxidasy	71
4.5.3	Detekce peroxidase aktivity metodou nativní gelové elektroforézy	72
4.5.4	5. Diskuze	74
5.	Diskuze	74
6.	Závěr	85
7.	Literatura	86
7.1	Internetové zdroje	98
8.	Seznam použitých zkratk	100

CÍLE PRÁCE

1. Úkolem teoretické části diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši zaměřenou na úlohu reaktivních forem kyslíku a dusíku včetně zapojení antioxidačních mechanismů v obranných reakcích rostlin po infekci patogenem *Phytophthora infestans* a *Phytophthora cryptogea*. Literární rešerše se dále zabývá charakterizací elicitinů infestinu a kryptogeinu včetně popisu signálních drah aktivovaných elicitinů.

2. V experimentální části bylo cílem:
 - 2.1 Testování vlivu aplikace elicitinů infestinu a kryptogeinu včetně jejich modifikací v poloze 13 a 84 na rezistenci vybraných genotypů *Solanum* spp. v průběhu patogenese *Pseudoidium neolycopersici* na základě charakterizace vývoje patogenních struktur.

 - 2.2 Studium vlivu aplikace vybraných elicitinů na produkci ROS
 - 2.2.1 Detekce nekrotických lézí na listech jednotlivých genotypů *Solanum* spp.
 - 2.2.2 Histochemická detekce produkce peroxidu vodíku a superoxidu

 - 2.3 Studium vlivu aplikace elicitinů na aktivaci antioxidačních systémů
 - 2.3.1 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy a guajakolperoxidasy
 - 2.3.2 Detekce peroxidasové aktivity metodou nativní gelové elektroforézy

1. ÚVOD

Elicitiny jsou 98 kDa apoplastické proteiny sekretované oomycetami rodu *Phytophthora* a *Pythium*, které dokáží po aplikaci v průběhu rostlino-patogenní interakce aktivovat širokou škálu obranných reakcí, přičemž účinkují již v nanomolárních koncentracích. V průběhu patogenese dochází ke kontaktu hydrofobní dutiny jádra elicitinu s povrchovým proteinem rostliny, přičemž patogen si takto získává důležité steroly a látky lipidního charakteru, které si sám nedokáže vytvořit. Zároveň bylo také zjištěno, že po rozpoznání patogenu produkujícího elicitinu dochází k rychlé aktivaci rozsáhlé sítě signálních drah jako je hypersenzitivní reakce, aktivace iontových kanálů, mobilizace GTP-vazebných proteinů a kinas. Přenosem signálu elicitinu na další přenašeče dochází k amplifikaci tohoto signálu, což vyústí ve fosforylaci/defosforylaci cílových proteinů, ovlivnění exprese obranných genů a velmi intenzivní produkci ROS a RNS. Dále také dochází k regulaci koncentrace vápenatých iontů v buňce a mimo jiné také k aktivaci antioxidantních mechanismů nezbytných pro vychytávání toxického nadbytku reaktivních forem kyslíku a dusíku. Studium interakce mezi elicitiny aplikovanými na modelovém systému *Solanum spp.* a patogenem *Pseudoidium neolycopersici* se zabývá pracoviště Katedry biochemie PŘF ve spolupráci s Katedrou botaniky PŘF Univerzity Palackého v Olomouci a také s Ústavem biochemie Masarykovy univerzity v Brně.

Doposud známá fakta o infestinu a kryptogeinu jsou v současnosti doplňována studii mutantních forem těchto elicitinů. V rámci modifikace byla u kryptogeinu zaměněna aminokyselina lysin za valin v pozici 13, následkem čehož došlo k prudkému snížení toxicity a oslabení vazby sterolu ve srovnání s divokým typem kryptogeinu. Podobně také záměna valinu za objemnější fenylalanin v pozici 84 vede k vazbě pouze mastných kyselin, nikoli sterolů. V případě mutantní formy Cry V84F je potvrzen výrazný vliv na aktivaci produkce ROS a aktivaci antioxidantních enzymů; tento stimulační efekt se také předpokládá u testované mutantní formy infestinu Inf V84F.

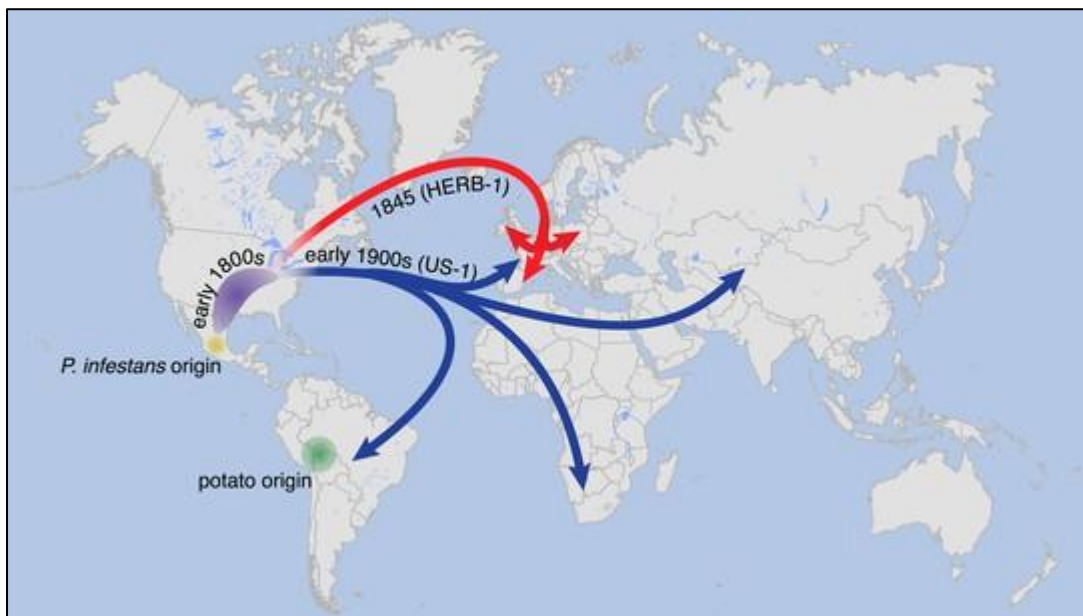
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Rod *Phytophthora*

Rod *Phytophthora* se vyčlenil z říše hub a nyní je klasifikován do říše *Chromista*, kmene *Stramenopila* a třídy *Oomycet* (Dick, 2001). Různé druhy rodu *Phytophthora* s omezenou saprofytickou aktivitou byly intenzivně studovány zejména z hlediska rostlinno-patogenních interakcí na modelech (patogen x rostlina) *P. infestans* x brambor, *P. sojae* x sója a *P. cryptogea* x tabák. Výsledkem působení patogenů rodu *Phytophthora* jsou choroby zemědělských plodin vedoucí k významným celosvětovým ekonomickým ztrátám (Oliva *et al.*, 2010; Bozkurt *et al.*, 2012).

2.1.1 *Phytophthora infestans*

Poprvé byl výskyt hemibiotrofní oomycety *P. infestans* zaznamenán v USA ve Filadelfii v roce 1843. Během několika let se patogen *P. infestans* rozšířil také do dalších zemí světa, jako je Belgie, Holandsko, Německo, Švýcarsko, Francie, Itálie či Skotsko (Obr.1) (Stevens, 1933, Yoshida *et al.*, 2013). Značné škody napáchal genotyp HERB-1 ve 40. letech 19. století v Irsku, kdy díky plesnivění brambor nastal velký irský hladomor (Yoshida *et al.*, 2013).



Obr.1: Předpokládaná cesta migrace *Phytophthora infestans* genotyp HERB-1 and US-1 (převzato z Yoshida *et al.*, 2013).

P. infestans je neobvykle virulentní patogen, který parazituje na úzké škále hostitelských rostlin rodu *Solanum* spp. a to nejen v místech původního výskytu (Mexiko, Andy), ale také v dalších oblastech, kde jsou tyto plodiny pěstovány, díky své schopnosti

se rychle adaptovat na změny prostředí (Fry *et al.*, 2009, Kamoun *et al.*, 2015). Kromě zemědělsky využívaných plodin parazituje také na petúniích nebo tabáku (Chaparro-Garcia *et al.*, 2011).

Aktuálně řešeným problémem je v současnosti vytvoření rezistence *P. infestans* vůči fungicidům na bázi fenylamidů či metaxyly a zároveň záchyt nových kmenů tohoto patogenu (Drenth *et al.*, 1993). Izoláty *P. infestans* z Kanady a USA si vytvořily rezistenci vůči metaxyly díky migraci genů (Fabritius *et al.*, 1997). Nové kmeny *P. infestans* byly objevené především u rajčat (Drenth *et al.*, 1993).

Symptomy infekce se projevují zejména na listech, plodech a hlízách (Obr.2). Na listech je patrná plíseň, která vytváří světle zelené, vodou nasáklé léze ohraničené žlutozeleným okrajem. Tyto skvrny postupně tmavnou do tmavě hnědé až černé barvy. Stonky infikovaných rostlin jsou taktéž zbarveny hnědě až černě. Na hlízách či plodech se infekce projevuje jako hnědooranžová hnilobná místa, která jsou na povrchu hladká a suchá, uvnitř jsou naopak granulovitá. Příznaky infekce jsou dále zesílené působením dalších invazivních organismů a bakterií (Selman *et al.*, 2008).

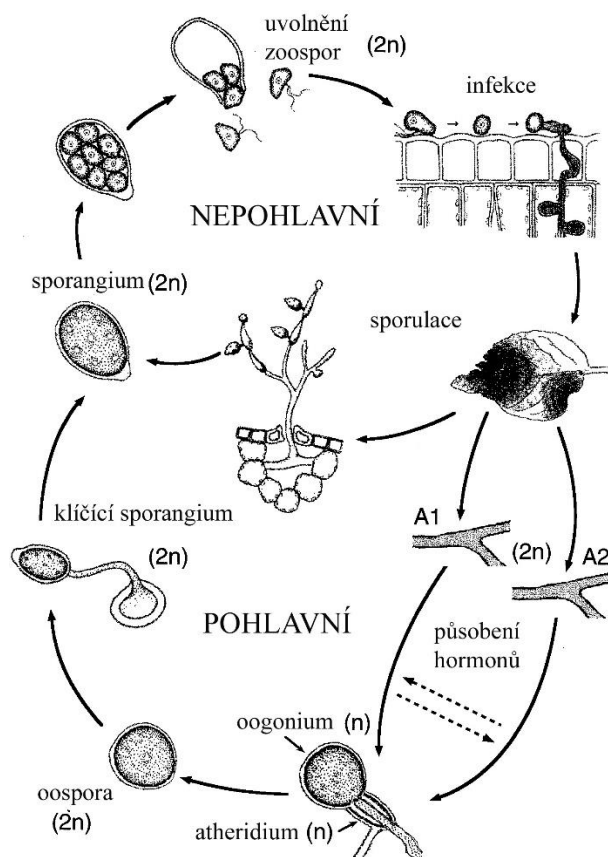


Obr.2: Symptomy napadení listů bramboru patogenem *Phytophthora infestans* (převzato z Porter, 2013).

Buněčná stěna *P. infestans* obsahuje především celulosu. Chitin je zastoupen v nižší míře a proto je tento organismus blíže příbuzný hnědým řasám než pravým houbám. Toto zjištění bylo navíc potvrzeno molekulárně-biologickou studií mitochondriálního genomu oomycety, který se vyznačuje velikostí 38 kb a mnoha repetitivními sekvencemi (Chesnick *et al.*, 1996).

P. infestans se rozmnožuje převážně nepohlavně (Obr.3), na hostitelských rostlinných pletivech tvoří sporangia, ze kterých za vyšších teplot (20-25°C) buď přímo klíčí hyfy, nebo se za nižších teplot (10-15°C) nepřímo uvolňují zoospory, ze kterých se

v rámci minut až hodin vyvine klíční vlákno (Obr.3). Klíční vlákno může proniknout dovnitř pletiva a iniciovat infekci. Ke sporulaci dochází za mírných teplot (15-22°C), kdy každá léze obsahuje stovky tisíc sporangií, která mohou být rozptýlena vzduchem. Tento typ rozmnožování přispívá ke vzniku klonálních linií, kdy jedinci každé linie pochází z jedné rekombinace, jsou si fenotypově podobní a liší se navzájem pouze mutací nebo mitotickou rekombinací (Fry *et al.*, 2013). Během nevýhodných environmentálních podmínek přežívá oomyceta v podobě mycelia např. uvnitř bramborových hlíz, které takto přispívají k šíření plísňové epidemie na další brambory (Fry a Goodwin; 1997). Geny zahrnuté ve sporulaci, zoosporogenesi a chování zoospor byly studovány na základě genové exprese (Kim a Judelson, 2003). Judelson a Roberts v roce 2002 identifikovali proteinkinasu v *P. infestans*, jejíž aktivita byla stimulována ve sporangiích vystavených chladu a je důležitá pro zoosporogenesi. Za nízkých teplot dochází ke zvýšení hladiny intracelulárních Ca^{2+} a pH, dále se multijaderná cytoplazma ve sporangiu začne dělit na jednojaderné složky a zformují se bičíky (Hardham, 2005).

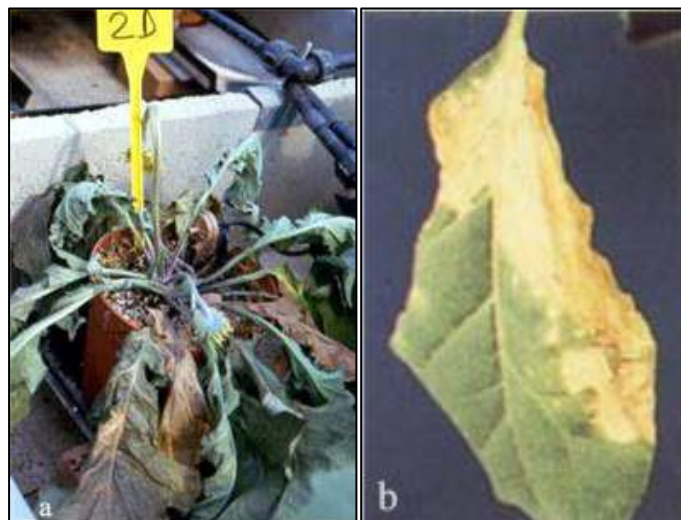


Obr.3: Životní cykly *Phytophthora infestans* (převzato z Judelson, 1997).

V menší míře je *P. infestans* schopná i pohlavního rozmnožování a to při styku dvou fyziologicky rozlišených stélek zvaných A1 a A2 (Gallegly a Galindo; 1958) (Obr.3). Tyto dva typy jsou rozpoznatelné díky produkci specifických hormonů, které vyvolávají tvorbu gametangii u opačného typu stélky (Judelson, 1997). Diploidní vegetativní mycelium se diferencuje a tvoří buď antheridia (samčí gametangia) nebo oogonia (samičí gametangia), ve kterých probíhá meióza. Fúze gametangií vyústí v uspořádání diploidních oospor, které mohou přežívat v rostlině po dlouhou dobu (Ko, 1998).

2.1.2 *Phytophthora cryptogea*

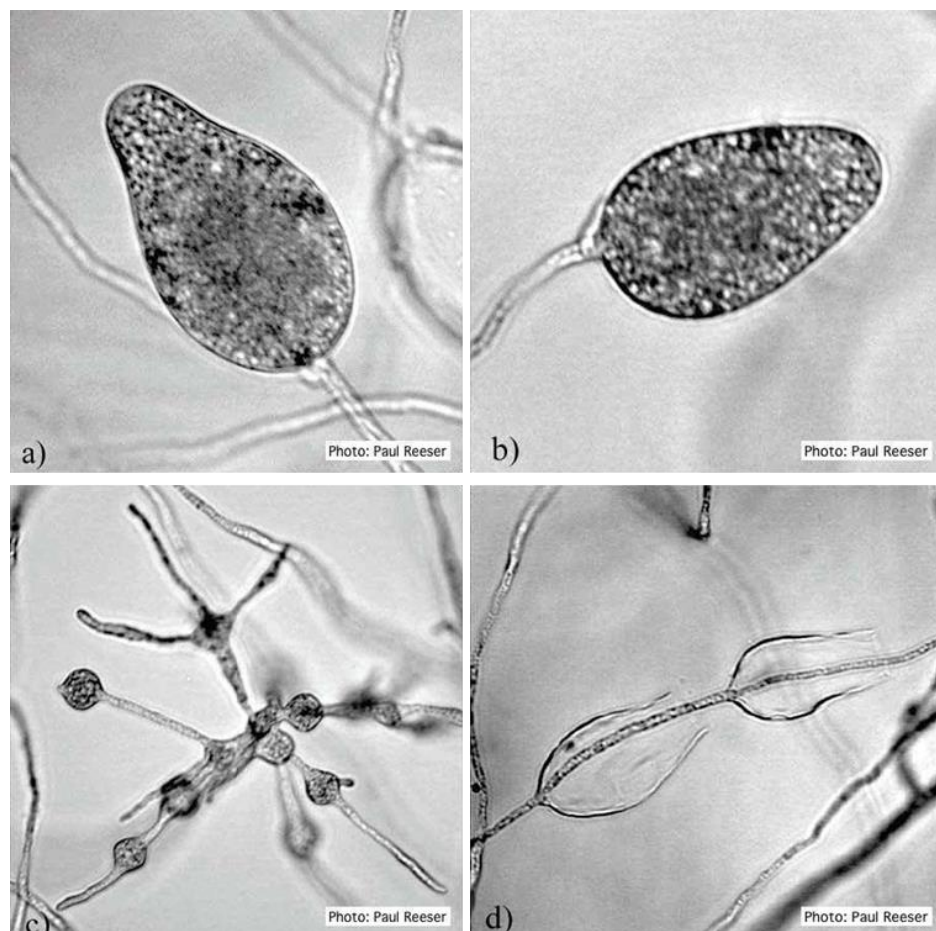
P. cryptogea byla poprvé popsána Pethybridgem a Laffertym jako příčina hniloby rajčete v Irsku roku 1919. Jedná se o kosmopolitní patogen parazitující po celém světě na řadě hostitelů, mezi něž patří především tabák, rajčata, gerbery či různé okrasné rostliny (Erwin a Ribeiro, 1996). Ke hnilobě kořenů rajčat dochází zejména v mokrých či podmáčených půdách. Hniloba se projevuje ve formě hnědočerných lézí na bázi stonku a mohou se šířit dál, až rostlinu zničí (Obr.4). V případě okrasných rostlin a dřevin dochází k vadnutí listů a následně k jejich opadu, což vede k chloróze a zakrnění rostlin (zejména u rostlin rodu *Pinus*). Minimální teplota pro růst *P. cryptogea* je okolo 1°C, teplotní optimum se nachází v rozmezí 22-25°C, maximální teplota pro růst je 31-33°C (Erwin a Ribeiro, 1996).



Obr.4.: Příznaky *Phytophthora cryptogea*. a) Symptomy nekrózy na gerbeře po infekci *P. cryptogea* (převzato z Ilri Research computing homepage - <http://hpc.ilri.cgiar.org>), b) Symptomy nekrózy na listu tabáku po působení *P. cryptogea* (převzato z Ricci *et al.*, 1989).

P. cryptogea je z hlediska morfologie nápadně podobná oomycetě *Phytophthora drechsleri*. Hlavním rysem, kterým se tyto oomycety odlišují, je vliv teploty na růst. Při teplotě 35°C, vhodné pro vývoj izolátů *P. drechsleri*, izoláty *P. cryptogea* nerostou (Ho a Jong, 1991). Teplota ale není jediným kritériem pro odlišení těchto dvou druhů. Toto rozlišení bylo potvrzeno také analýzou proteinového profilu oomycet pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy (Erwin a Ribeiro, 1996). Mills *et al.* v roce 1990 studovali isoenzymové zastoupení a strukturu mitochondriální DNA metodou RFLP (*restriction fragment length polymorphism* = jev, kdy restriční endonukleázy naštípou DNA na fragmenty o různé délce) ze 123 izolátů patřících k *P. cryptogea* nebo *P. drechsleri*, přičemž zjistili, že klastry genů se v rámci těchto dvou druhů od sebe velmi liší a že existuje alespoň sedm různých genových klastrů. Genová příbuznost *P. cryptogea* je blíže k *Phytophthora erythroseptica*, než k *P. drechsleri*, jak prokázal Cline *et al.* v roce 2008.

P. cryptogea tvoří oválná až hruškovitá sporangia bez papil, délky 20-93 µm a šířky 15-51 µm (Stamps, 1978; Ho a Jong, 1991) (Obr.5).



Obr.5: Morfologie oomycety *Phytophthora cryptogea*: a) a b) sporangium, c) shluky hyf, d) klíčení sporangia (převzato od Paul Reeser – <http://forestphytphoras.org> – 30.3. 2018).

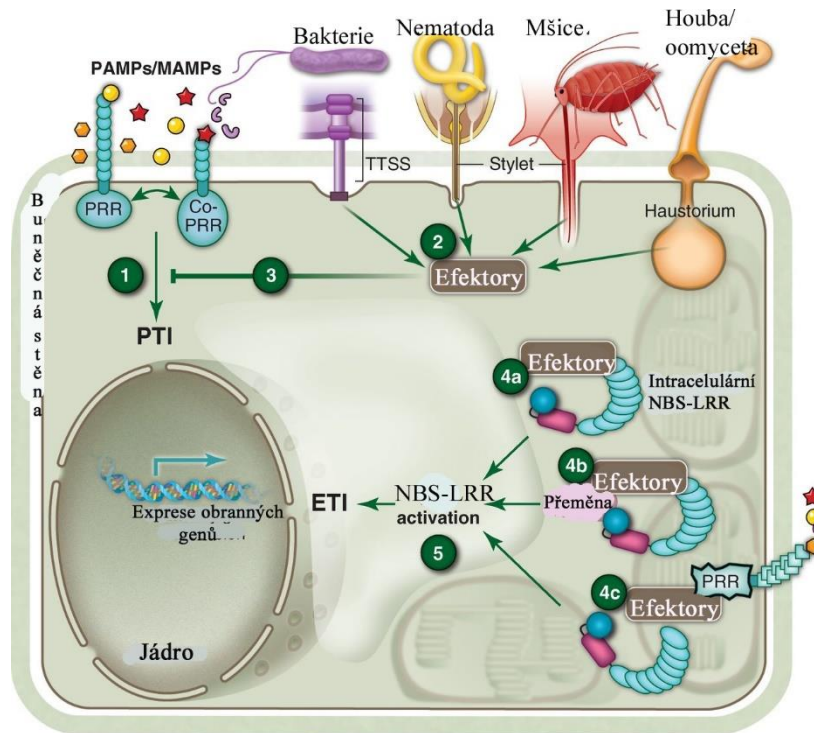
Na velikost mají vliv také nutriční podmínky – např. sporangia, která rostla zpočátku na bramborovo-dextrosovém agaru byla menší než ta, která rostla na hráškovém vývaru. Tudíž, pro srovnání velikosti sporangií jsou nutná tři kritéria: živiny v substrátu, typ roztoku používaného na omytí mycelia (voda, minerální soli, půdní extrakt) a inkubace při světle. Sporangiofory široké 2-3,5 μm poté prorůstají skrz sporangium, nebo se vyvíjejí sympodiálně pod sporangiem (Erwin a Ribeiro, 1996).

2.2 Imunita

Bazální obranné mechanismy rostlin jsou indukované detekcí vysoce konzervovaných molekulárních struktur patogenů či mikrobů, tzv. PAMPs (*patogen-associated molecular patterns*) nebo MAMPs (*microorganism-associated molecular patterns*) transmembránovými rostlinnými proteiny, které fungují jako receptory PRRs (*pattern recognition receptors*). Určité receptory jsou přítomné v široké škále rostlinných čeledí, jiné jsou naopak specifické pro konkrétní rostlinný druh. Jako příklad receptoru lze uvést FLS2 receptor (*flagellin-sensitive2 receptor*) a EFR (EF-TU receptor) (*elongation factor thermo unstable receptor*) (Boller a Felix, 2009). Imunitní odpovědi indukované PAMPs se označují jako PTI (*PAMP-triggered immunity*) (Jones a Dangl, 2006; Beck *et al.*, 2012) (Obr. 6).

Patogen může do rostliny sekretovat tzv. efektory. Z chemického hlediska se jedná o celé spektrum látek zahrnující proteiny, peptidy, oligosacharidy i nízkomolekulární sloučeniny, které slouží k potlačení či zastavení PTI, v případě, že rostlina nevlastní R proteiny (Obr.6). Specifické avirulentní efekторы AVR jsou přenesené do cytoplasmy rostlinných buněk, kde jsou nasměrovány do specifických míst buňky s cílem potlačit PTI a usnadnit virulenci. V případě přítomnosti intracelulárních R (rezistenčních) proteinů dochází k detekci specifických efektorů (Jones a Dangl, 2006; Dodds a Rathjen, 2010; Rafiqi *et al.*, 2012). R proteiny fungují jako receptory patřící do třídy tzv. NBS-LRR proteinů (*nucleotide binding site-leucine-rich-repeat*, tj. proteinů bohatých na leucinové sekvence, ale zároveň obsahují sekvence, prostřednictvím kterých mohou vázat nukleotidy). Po interakci intracelulárních receptorů s patogenními efektory dochází následně k aktivaci silné obranné reakce ETI (*effector-triggered immunity*) často doprovázené hypersenzitivní reakcí s cílem zamezit růstu biotrofních patogenů (Singh *et al.*, 2011). Zajímavé je, že některé efektorově vyvolané odezvy vyžadují pár NBS-LRR proteinů, kdy jeden z nich je aktivovaný efektořem a slouží jako „senzor NBS-LRR“ a druhý je nezbytný z hlediska své funkce jako „helper NBS-LRR“ (Bonardi *et al.*, 2011).

Buněčná místa aktivace NBS-LRR se mezi jednotlivými proteiny liší, některé vyžadují prostředí cytoplasmy, jiné se aktivují na plasmatické membráně (Bonardi *et al.*, 2012). Tyto proteiny se v rostlinných či živočišných systémech mezi sebou liší také N-terminální doménou, která hraje významnou roli např. při navázání různých kofaktorů po aktivaci, jak bylo potvrzeno vazbou N-terminálních domén NBS-LRR s transkripčními faktory (Saintenac *et al.*, 2013).



Obr.6: Schéma rostlinného imunitního systému: 1) Patogen v průběhu kolonizace rostliny sekretuje PAMPs (patogen-associated molecular patterns) či MAMPs (*microorganism-associated molecular patterns*). Tyto látky jsou zachyceny pomocí vysoce afinitních receptorů PRRs (pattern recognition receptors) a dochází tak ke spuštění PTI (*PAMP-triggered immunity*). 2) Patogen dopraví virulentní efekty dovnitř buňky. 3) Efekty jsou nasměrovány do specifických míst buňky, kde potlačí PTI a usnadňují virulenci. 4) Rozpoznání efektorů NBS-LRR proteiny a) ligand-receptorovou interakcí, b) efektem řízenou změnou proteinu, který strukturně napodobuje cíl efektoru, c) rozpoznání efektem řízené změny hostitelského virulentního cíle (např. cytosolová doména PRR). 5) Aktivace NBS-LRR receptorů a vyvolání ETI (*Effector-triggered immunity*) a následné exprese příslušných obranných genů (převzato z Dangl *et al.*, 2013).

V případě infekce *P. infestans* jsou rostlinné R geny, kodující proteiny cytoplasmatických receptorů, které reagují s efekty patogenu, klasifikovány jako druhově specifické a druhově nespecifické. Druhově specifické geny (R1-R11) pochází z divokých druhů *Solanum demissum*. V rámci šlechtění bylo dosaženo zvýšené rezistence vůči *P. infestans* po vložení těchto genů do řady bramborových kultivarů. Nové kultivary ale dozrávaly později oproti dříve známým odrudám (Gebhardt a Valkonen, 2001). Dále byly identifikovány druhově nespecifické R geny pro široké

spektrum rezistence (*Rpi* geny) vůči *P. infestans*, např. *RB/Rpi-blb1* a *Rpi-blb2* ze *Solanum bulbocastanum* a *Rpi-moc1* ze *Solanum mochiquense*. Vložení těchto *Rpi* genů do bramborových kultivarů je obecně považováno za velmi praktickou metodu pro získání rezistence brambor vůči *P. infestans*. (Smilde *et al.*, 2005; Van der Vossen *et al.*, 2005).

Pro efektory oomycet je charakteristická přítomnost signální peptidové sekvence, která napomáhá jejich translokaci do rostlinných buněk. *P. infestans* produkuje do hostitelských buněk tzv. RXLR efektory (X představuje jakoukoliv aminokyselinu), které slouží k potlačení imunitního systému rostlin tím, že blokují aktivitu cílových proteinů (Bozkurt *et al.*, 2012; Anderson *et al.*, 2015) (Tab.1). Aktivita těchto efektorů byla lokalizovaná na jejich C-terminálních doménách (Win *et al.*, 2007).

Tab.1: Efekторы *P. infestans* a jejich funkce a distribuce (převzato z Giraldo a Valent, 2013).

Název genu	Funkce	Distribuce
EPIC1	Inhibitor PLCP (RCR3 a C14) (rajčatové proteasy)	Nespecifická (také u <i>Ustilago</i> a <i>Cladosporium</i>)
EPIC2	Inhibitor PLCP (C14)	Nespecifická (také u <i>Ustilago</i> a <i>Cladosporium</i>)
EPIC2B	Inhibitor PLCP (RCR3) a PR (<i>pathogenesis related</i>) proteinu PIP1	Nespecifická (také u <i>Ustilago</i> a <i>Cladosporium</i>)
EPI1	Extracelulární inhibitor serinproteas	Specifická pro <i>Phytophthoru</i>
EPI10	Extracelulární inhibitor serinproteas	Specifická pro <i>Phytophthoru</i>
AVRBLB1	RXLR cytoplasmatický efektor - AVR protein pro <i>Rpi-blb1</i>	Specifická pro <i>Phytophthoru</i>
AVRBLB2	RXLR cytoplasmatický efektor - AVR protein pro <i>Rpi-blb2</i> , brání sekreci PLCP (C14)	Specifická pro <i>Phytophthoru</i>
AVR2	RXLR cytoplasmatický efektor - AVR protein interagující s R2 ze <i>S. demissum</i>	Nespecifická (také u <i>Ustilago</i> a <i>Cladosporium</i>)
AVR3a	RXLR cytoplasmatický efektor - AVR protein interagující s R3a ze <i>S. demissum</i>	Specifická pro <i>Phytophthoru</i>
CRN8	CRN cytoplasmatický efektor - v jádru vyvolává smrt hostitelských buněk	Specifická pro <i>Phytophthoru</i>

Legenda: AVR (avirulentní faktor), PLCP (*papain-like cysteine protease*); RCR3 (cysteinproteasa z rajčete), C14 (proteasa z rajčete), PIP1 (typ PLCP příbuzný RCR3), *Rpi-blb2* (gen kódující protein s NBS-LRR), R2 (imunitní receptor *Solanum demissum*), R3a (rezistenční protein), CRN (Crincklerova struktura fungující jako signál pro translokaci do hostitelské cytoplasmy).

2.3. Elicitiny

Jedná se o apoplastické proteinové efekторы, které jsou produkované oomycetami rodu *Phytophthora* a *Phytium*. Pro tyto strukturně konzervované proteiny, které jsou tvořené 98 aminokyselinami, je typická strukturní doména tvořená šesti cysteinovými rezidui, které tvoří vzájemně tři disulfidové můstky. Důležitá je také přítomnost dalších aminokyselinových zbytků bohatých na serin či threonin (Ponchet *et al.*, 1999).

2.3.1 Klasifikace elicitinů

Elicitiny jsou klasifikovány na základě struktury do tří tříd. Další důležitou charakteristikou elicitinů je jejich izoelektrický bod (Tab.2, Tab.3). Mezi α -elicitiny (třída I-A) patří kyselé elicitin s pI 4-5, mezi β -elicitiny (třída I-B) patří bazické elicitin s pI v rozezi 7,5-8,5. Hodnota pI je ovlivněna obsahem lysinu v molekule (2-4 u α -elicitinů, 6 v β -elicitinech). Jednotlivé elicitin se liší schopností vyvolat nekrosu rostlinných buněk, která závisí na charakteru aminokyseliny v pozici 13 (O'Donohue *et al.*, 1995, Plešková *et al.*, 2011). V případě β -elicitinů, vykazujících vysokou nekrotickou aktivitu, se jedná o hydrofobní aminokyselinu lysin a u α -elicitinů lipofilní aminokyselinu valin (Pernollet *et al.*, 1993; Kamoun *et al.*, 1997). Na základě studia terciární struktury elicitinů cryptogeinu (Cry) a β -cinnamonu bylo zjištěno, že tyto sloučeniny mohou fungovat také jako přenašeče lipidů a dalších sterolů z liposomů a plasmatických membrán (Mikes *et al.*, 1997, Rodrigues *et al.*, 2006). Méně početnou skupinu tvoří elicitin třídy II, které se vyznačují krátkým C-terminálním koncem a také nízkým pI (3,5). Do třídy III – tzv. ELL (*elicitin-like*) se řadí nově objevené elicitin, které se liší od dříve charakterizovaných elicitinů třídy I především úrovní sbalení proteinu (Ponchet *et al.*, 1999). Kromě toho mají C-terminální konec variabilní délky, jsou charakteristické vysokým obsahem prolinu, threoninu či serinu v molekule a přítomnosti glykosylfosfatidylinositolového místa, díky čemuž mohou asociovat s buněčnou stěnou, popřípadě s cytoplasmatickou membránou (Jiang *et al.*, 2006).

Tab.2: Základní rozdělení elicitinů (převzato z Oswald *et al.*, 2014).

Třída (podtřída)	Počet aminokyselin	Isoelektrický bod	Charakteristika
I (I-A)	98	kyselé	valin na pozici 13 (hydrofobní)
I (I-B)	98	bazický	lysin na pozici 13 (hydrofilní)
II	103-104	velmi kyselé	
III	98+	kyselé	

Tab.3: Přehled elicitinů – klasifikace a charakteristika (převzato z Oswald *et al.*, 2014).

<i>Phytophthora</i> <i>a spp.</i>	Elicitin	Třída	pI
<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>	AE1.1	I-A	4,99
	AE2	I-A	4,99
<i>P. cactorum</i>	CAC-A	I-A	4
<i>P. capsici</i>	Capsicein(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>	Citro	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
	Inf 2a	III	3,37
	Inf 2b	III	3,73
	Inf 4	I-B	9,97
	Inf 5	III	4,09
	Inf 6	III	3,34
<i>P. hibernalis</i>	Hib1	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. nicotinae</i>	172 - Parasiticein	I-A	<4
<i>P. palmivora</i>	Palmivorein	I-A	4
<i>P. parasitica</i>	PARA1-Parasiticein	I-A	4,22
	310 - Parasiticein	I-A	4,7
<i>P. plurivora</i>	Plurivorin	I-A	4,2
<i>P. quercina</i>	Quercinin	I-A	3,6
		I-A	3,9
		I-B	8,3
<i>P. ramorum</i>	ram α -1 + ram α 2	I-A	
<i>P. syringae</i>	Syringicin	I-A	4,31
<i>P. sojae</i>	SOJA, SOJB	I-A	3; 5

Hlavní funkcí elicitinů je indukce buněčné smrti a dalších obranných reakcí po napadení rostlin z čeledi *Nicotiana*, *Solanaceae* a *Brassicaceae* příslušným patogenem. Elicitiny vystupují jako PAMPs, tudíž mohou být rozpoznávány PRRs (Kamoun *et al.*, 1997; Chaparro-Garcia *et al.*, 2011). V rámci rodu *Phytophthora* a *Phytium* jsou exprimovány *eli* a *ell* geny, které kódují elicitiny, v různé míře a v závislosti na fázi životního cyklu, ve které se organismus nachází. *Eli* geny kódují elicitiny třídy Ia, Ib a II, zatímco *ell* geny kódují tzv. *elicitin-like sequences*, tedy elicitiny třídy III (Oswald *et al.*, 2014). Elicitiny třídy I a II jsou exprimované převážně v myceliu (*P. infestans*) či infikovaném hostitelském pletivu (*P. sojae*). Naopak elicitiny třídy III se tvoří zejména v zoosporách (*P. infestans*, *P. sojae*) (Jiang *et al.*, 2006). Podobně je také elicitin β -Cin z *P. cinnamomi* exprimován ve velkém množství v brzkých fázích infekce, v pokročilejších stádiích infekce se jeho hladina snižuje, zatímco exprese elicitinu α -Cin stejně jako dalších (α) elicitinů se naopak zvyšuje (Horta *et al.*, 2008).

Další studie ukázaly, že úloha elicitinů je vztažena na konkrétní stadia infekce, např. sporulaci či přežití patogenu za saprofytických podmínek, kdy dochází k expresi příslušných elicitinů s variabilními pI, což napomáhá k regulaci vývoje patogena a infekce za různých environmentálních podmínek (Jiang *et al.*, 2006).

2.3.2 Infestin

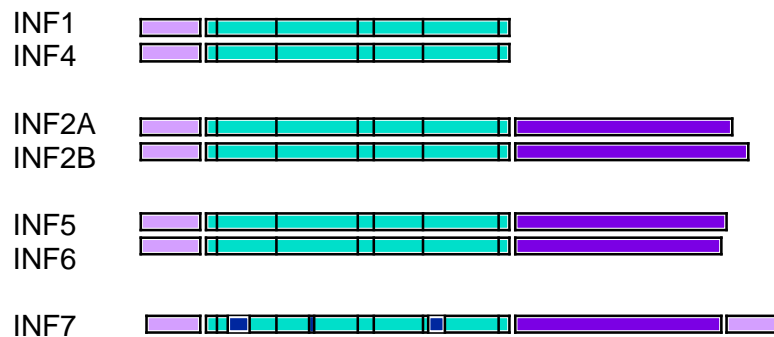
Elicitin infestin (Inf) je 10-kDa protein produkovaný oomycetou *Phytophthora infestans*, který vyvolává hypersenzitivní reakci a další biochemické změny spojené s obrannými systémy u modelu *Nicotiana spp.* a *Solanaceae* (Kamoun *et al.*, 1993). Bylo zjištěno, že kmeny *P. infestans* deficientní na Inf1 způsobily léze na *Nicotiana benthamiana*, což značí že Inf1 vytváří u tohoto druhu rezistenci (Kamoun *et al.*, 1998).

Infestin má vliv na produkci NO, jak bylo zaznamenáno po ošetření *N. benthamiana* Inf1, kdy se zvýšila produkce NO, nicméně při umlčení genů kódujících nitrátreduktasu došlo u takto ošetřených vzorků naopak ke snížení produkce NO (Yamamoto-Katou *et al.*, 2006). V práci Saito *et al.* z roku 2006 byla zaznamenána rychlá tvorba peroxynitritu, kdy maximální rychlosti bylo dosaženo po 6-12 hodinách od aplikace infestinu k tabákovým buňkám.

Na základě experimentu, kdy byly citlivé genotypy *Solanum* vystaveny purifikovanému rekombinantnímu Inf1, bylo zjištěno, že Inf1 funguje jako obecný

elicitin u zástupců rodu *Solanum* (Vleeshouwers *et al.*, 2006). Inf1 aktivuje u rajčat také důležité signální dráhy řízené kyselinou jasmonovou (JA) a ethylenem (ET), ale nevyvolává buněčnou smrt – nicméně v přítomnosti vysoké koncentrace Inf1 dochází k aktivaci řady obranných reakcí (Kawamura *et al.*, 2009). Rozdílný efekt elicitinu infestinu na genotypy lišící se svou rezistencí k danému patogenu potvrdil ve své práci z roku 2011 i Bariya *et al.*, kdy bylo zjištěno, že infestin vyvolává hypersensitivní reakci (HR) a systémově získanou rezistenci (SAR-systemic *acquired resistance*) v případě rezistentních ale ne citlivých genotypů brambor.

Fabritius *et al.* v roce 2002 prokázal existenci komplexní sady osmi genů kódujících elicitinu. Tyto geny kódují extracelulární proteiny, které mají shodnou 98-aminokyselinovou elicitinovou strukturu odpovídající elicitinům I-A třídy, jako je např. Inf1 (Obr.7). Šest genů kódujících infestin (*inf2A*, *inf2B*, *inf5*, *inf6*, *inf7* a M-25) kódují proteiny s C-terminální doménou, která doplňuje N-terminální elicitinovou doménu. Sekvenční analýza C-domény odhalila vysokou frekvenci výskytu serinu, threoninu, alaninu a prolinu, jejichž vzájemná kompozice vytváří O-glykosylační místa (Kamoun *et al.*, 1997).

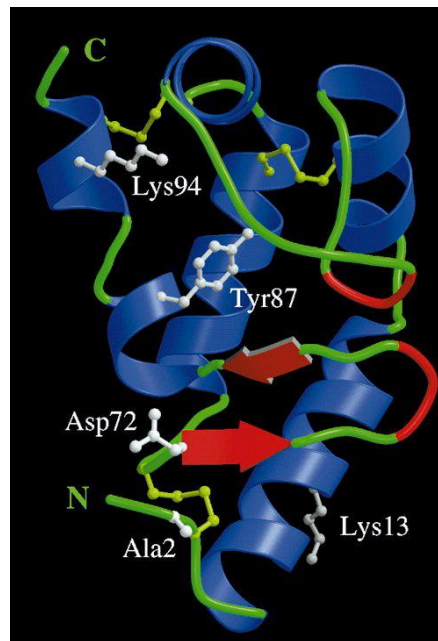


Obr.7: Schéma elicitinové infestinové skupiny *P. infestans*: čtyři hlavní domény odpovídají signálnímu peptidu – elicitinová doména, C-terminální doména a transmembránová doména; vertikální linie odpovídají konzervovaným cysteinovým zbytkům; černé boxy u Inf7 odpovídají delecím (převzato z Kamoun *et al.* 1997).

Elicitace infestinem ovlivňuje genovou expresi podle Ohtsu *et al.*, který v roce 2014 prokázal, že vzorky *N. benthamiana* ošetřené Inf1 vykazovaly značně zvýšenou expresi genů kódujících enzymy mevalonátové dráhy, což naznačuje, že produkce isopentenyl pyrofosfátu, je v průběhu obranných reakcí zrychlena.

2.3.3 Kryptogein

P. cryptogea produkuje intenzivně studovaný bazický proteinový elicitin β -kryptogein (Cry β), jehož strukturu zaznamenal Ricci *et al.* v roce 1989 (Obr.8). Podle Blein *et al.* (2002) elicitin Inf1 a Cry β mají ze 79% identickou aminokyselinovou sekvenci. Cry β se skládá z pěti α helixů, jednoho β -skládaného listu a tří disulfidových můstků. Jádro proteinu tvoří hydrofobní dutina, spojená tunelem s povrchem proteinu, skrz kterou dochází k přenosu sterolů a dalších látek lipidního charakteru až k patogenu, který si sám tyto látky nedokáže vytvořit (Ricci *et al.*, 1989, Dobeš *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že tento protein hraje významnou roli v rostlinno-patogenních interakcích, kdy vyvolává hypersenzitivní reakci u tabáku, která se projevuje tvorbou zjevných lokálních i distálních nekrotických listů. Za tvorbu nekrotických listů jsou zodpovědné aminokyselinové zbytky v poloze 2, 13, 14, 72 a 94 (O'Donohue *et al.*, 1995). Bylo zjištěno, že konkrétně charakter postranního řetězce aminokyselinového zbytku v poloze 13 přímo koreluje s tvorbou nekrotických listů (O'Donohue *et al.*, 1995).



Obr.8: Struktura molekuly β -kryptogeinu znázorňující klíčový aminokyselinový zbytek Lys 13 a tři možné aminokyselinové zbytky modifikující aktivitu (Ala2, Asp72 a Lys94). Legenda: modrá barva (helixy), červená barva (β -skládané listy), zelená barva (smyčky), žlutozelená barva (disulfidové můstky), bílá barva (konzervovaný zbytek Tyr87) (Boissy *et al.*, 1996).

Cry β se podílí na aktivaci řady obranných mechanismů, jako je např. ukládání fytoalexinů (obrné sloučeniny rostlin) a produkci ethylenu – hormonu, zahrnutém v intracelulární stresové signalizaci (Milat *et al.*, 1991). Také signální dráha oxidu dusnatého indukovaná Cry β je propojena se signálními drahami cytosolického vápníku

prostřednictvím posttranslačních modifikací calmodulinu (Jeandroz *et al.*, 2013). Mezi další proteiny, které jsou vlivem NO modifikované patří NtCDC 48, který se účastní buněčného cyklu jako ATPasa spojená s dalšími aktivitami buňky (Astier *et al.*, 2012). Elicitace Cry β podporuje produkci NO během prvních minut po aplikaci v epidermálních buňkách tabáku, což bylo potvrzeno experimenty s využitím fluorescenční sondy DAF, elektrochemických metod a detektoru NO (Besson-Bard *et al.*, 2008; Vitecek *et al.*, 2008). Cry β dokáže rychle měnit tok iontů skrz buněčnou plasmalemu a ovlivňuje přechodnou produkci reaktivních forem kyslíku, která je doprovázená také tvorbou NO (Blein *et al.*, 1991, Bottin *et al.*, 1994, Lherminier *et al.*, 2009). Navíc bylo prokázáno, že u tabáku ošetřeném Cry β , došlo také k akumulaci obranného proteinu PR-1 (Ricci *et al.*, 1989).

2.3.3.1 Mutantní formy kryptogeinu

Při studiu vlivu struktury elicitinů byl testován efekt elicitinů s cílenou mutací vedoucí k záměně aminokyselin ve vybraných pozicích. Takto byly připraveny mutantní formy Cry β L13V, V84F, L41F, L80 a další).

Nahrazení lysinu v pozici 13 valinem vedlo k prudkému snížení toxicity a zároveň ke snížení vazby sterolů oproti nemodifikovanému Cry β (O'Donohue *et al.*, 1995, Dokládal *et al.*, 2012). Mutantní forma V84F má valin zaměněný za fenylalanin, což je objemnější aminokyselina a díky této změně má kryptogein schopnost vázat pouze mastné kyseliny, ale neváže steroly, nicméně v přenosu fosfolipidů je velmi podobný nemodifikovanému Cry β (Dobeš *et al.*, 2004). Podle Dokládal *et al.* (2012) je rezistence vyvolaná mutantem V84F srovnatelná s nemodifikovaným Cry β .

2.3.4 Signální dráhy rostlin aktivované elicitinými

Elicitiny jsou rozpoznávány receptorovými proteiny na povrchu buněk, tzv. RLP (*receptor-like protein*), které vyžadují transmembránové proteiny BAK1/SERK3 a SOBIR1 (Chaparro-Garcia *et al.*, 2011, Du *et al.*, 2015). V současné době v rámci intenzivní studie zaměřené na receptorové proteiny byl naklonován povrchový receptor elicitinů z divokého typu *Solanum microdontum*, který napomáhá řízení HR a buněčné smrti (Du *et al.*, 2015).

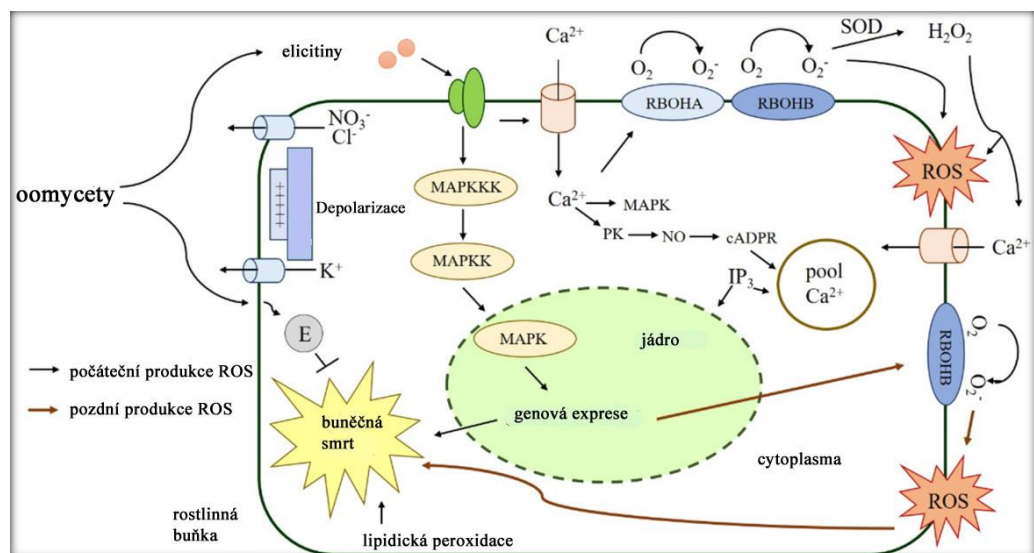
Interakce elicitinů s receptory v rané fázi infekce, vyvolá imunitní odpověď, která zahrnuje fosforylaci efektorových proteinů, aktivaci chloridových kanálků, rychlou

produkcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS - *reactive oxygen species*) pomocí aktivace NADPH oxidas (E.C.1.6.3.1), zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu a aktivaci kaskády MAPK (Tavernier *et al.*, 1995, Chaparro-Garcia *et al.*, 2011). Alkalizace extracelulárního média vede k zesílení aktivace NADPH oxidasy a k rychlejšímu zabudování Ca^{2+} do buněčné stěny (Hahn, 1996).

Díky vyplavení K^+ a Cl^- z buňky dochází k depolarizaci membrány, což vede nejprve k aktivaci NADPH oxidas a blokaci H^+ -ATPasy. NADPH oxidasa produkuje O_2^- , který se přemění poté na peroxid vodíku a další ROS, zatímco inhibicí H^+ -ATPasy dojde ke snížení pH cytosolu a zvýšení intracelulárního množství ATP (Pugin *et al.*, 1997) (Obr.9).

Kromě ROS jsou do obranných reakcí rostlin zapojeny také reaktivní formy dusíku (RNS - *reactive nitrogen species*). Při aplikaci elicitinů dochází k prudkému zvýšení koncentrace NO, která reguluje enzymové aktivity prostřednictvím posttranslačních modifikací jako je S-nitrosylace cysteinových thiolů (Astier *et al.*, 2011).

V průběhu pozdní fáze obranné reakce dochází k expresi obranných genů, které kódují tzv. PR (*pathogenesis-related*) proteiny, fenylalaninamoniaklyasu či proteiny biosyntézy fytoalexinů. Dále dochází k aktivaci signálních drah ET, JA a kyseliny salicylové (SA) a k aktivaci SAR (Kawamura *et al.*, 2009).



Obr:9: Vazba elicitinu na membránový receptor vyvolá dvoufázovou akumulaci ROS. Po navázání elicitinu dojde k aktivaci imunitních signálů: vtoku Ca^{2+} , aktivaci MAPK a primární produkci ROS prostřednictvím NADPH oxidas (RBOHA a RBOHB). MAPK kaskáda vyústí ve stimulaci genové exprese *rboh*b a následně k sekundární produkci ROS, hypersenzitivní reakci a buněčné smrti. Efektor RXLR Avr3A z *Phytophthora infestans* negativně ovlivňuje buněčnou smrt vyvolanou pomocí INF-1 (upraveno dle: Derevnina *et al.*, 2016).

2.3.5 Hypersenzitivní reakce a buněčná smrt

Adachi *et al.* v roce 2015 potvrdil, že k hypersenzitivní reakci dochází až po aktivní sekundární produkci ROS, která vzniká aktivací MAPKs, které fosforylují transkripční faktory WRKY7/8/9/11. V důsledku toho dochází k sekundární produkci ROS, která vede k buněčné smrti (Kamoun *et al.*, 2015). Elicitiny nevyvolávají HR a buněčnou smrt u všech rostlin (Kamouen *et al.*, 1997). Např. bylo prokázáno, že Inf1 sice aktivuje základní obranné mechanismy řízené ET a JA a zvyšuje rezistenci rajčete vůči patogenu *Ralstonia solanacearum*, ale nedochází k aktivaci HR. Navzdory aktivaci těchto signálních drah a při aplikaci Inf1 o koncentraci 100 nmol/ml (koncentrace, která běžně aktivuje HR u tabáku) není aktivována HR a rozvoj infekce *P. infestans* není potlačen, tzn. rajče vůči patogenu zůstává citlivé (Kawamura *et al.*, 2009). Podobně při studiu působení proteinové frakce z buněčné stěny, která obsahovala elicitory z nepatogenního organismu *Phytium oligandrum*, došlo k aktivaci signálních drah řízených ET a JA bez spuštění HR a aktivace buněčné smrti (Takenaka *et al.*, 2006).

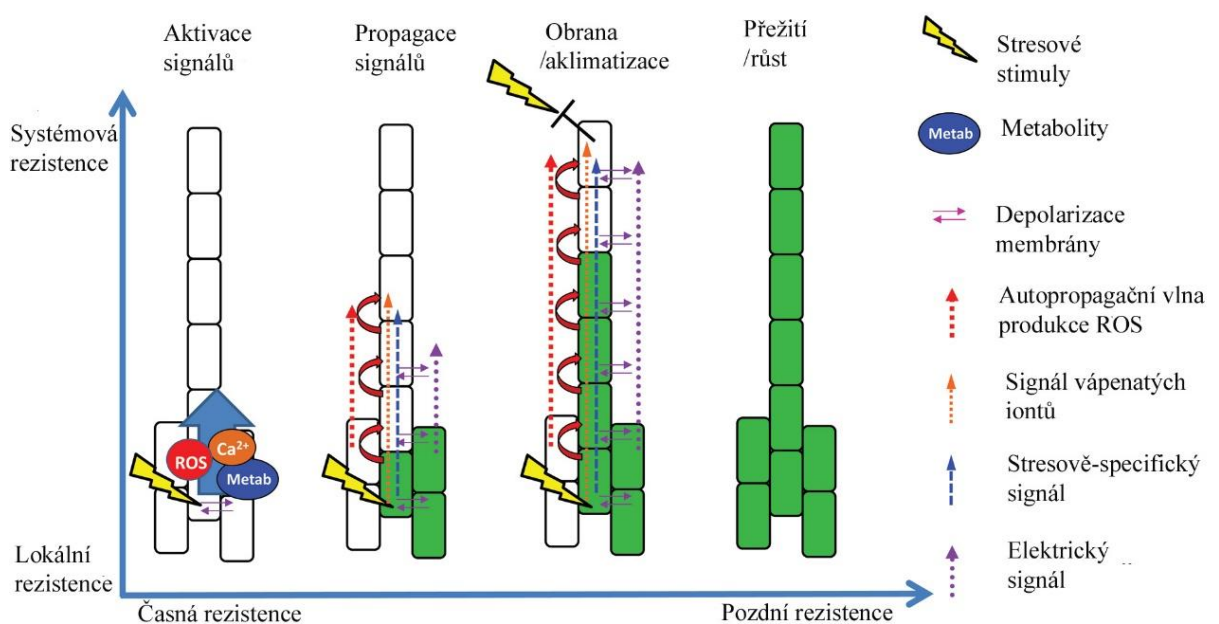
Studie od Kamoun *et al.* z r. 1997 ukazují, že rostliny reagující na elicitory vykazují vyšší rezistenci vůči patogenům, které produkují elicitory, než vůči těm, které je neprodukují. Tato skutečnost je demonstrována na systémech *P. parasitica* a *P. infestans* po infekci tabáku, kdy nízká produkce elicitinů přímo koreluje se zvýšenou virulencí. V případě *P. parasitica* nedochází k produkci elicitinů, což koreluje s virulencí na tabáku. Rozpoznávání elicitinů je tedy významnou součástí nehostitelské rezistence zástupců *Nicotiana* vůči *P. infestans* a dalším druhům *Phytophthora*, které elicitory produkují (Kamoun *et al.*, 1998).

Produkce efektorů patogenními oomycetami do rostlinné buňky může vést k potlačení imunitních odpovědí hostitelské rostliny (Win *et al.*, 2012) (Obr. 10). Jako příklad lze uvést cytoplasmatický efektor *P. infestans* AVR3, který potlačuje proces HR vedoucí k buněčné smrti aktivovaný Inf1 (Bos *et al.*, 2006). Mechanismus tohoto působení je limitován efektozem AVR3, který řídí hostitelský ubikvitin-proteasomový systém stabilizací rostlinné E3 ubikvitin ligasy CMPG1. Další studie odhalily více než 30 efektorů ze čtyř různých druhů oomycet, které potlačují imunitní odpovědi vyvolané Inf1 (Gilroy *et al.*, 2011).

2.3.6 Systémově získaná rezistence

Systémově získaná rezistence (SAR) představuje hlavní mechanismus, prostřednictvím kterého rostliny aktivují obranné mechanismy nejen v místech samotného působení

stresového faktoru, ale také v ostatních částech rostliny (Luna *et al.*, 2012). Iniciační fáze může být pouze přechodná a zahrnuje veškeré procesy, které vedou k vytvoření tohoto typu rezistence, jako např. produkce jasmonátů a derivátů indolu, která je následovaná akumulací SA (Truman *et al.*, 2010). Současně dochází také k akumulaci dalších obranných sloučenin jako je methylsalicylát (MeSA), glycerolipidy, kyselina azaleová a glycerol-3-fosfát (Luna *et al.*, 2012). Podle Liu *et al.* (2011) je SAR kontrolována interakcí mezi MeSA a DIR1 (*protein přenášející lipidy*) a lipidovými deriváty. Závislost SAR na MeSA ovlivňuje i světlo – pokud je SAR vyvolána v době, kdy je světla méně, rostliny získají méně světla, MeSA a enzymy, které jej metabolizují, se tak stávají pro SAR esenciálními (Obr.10).

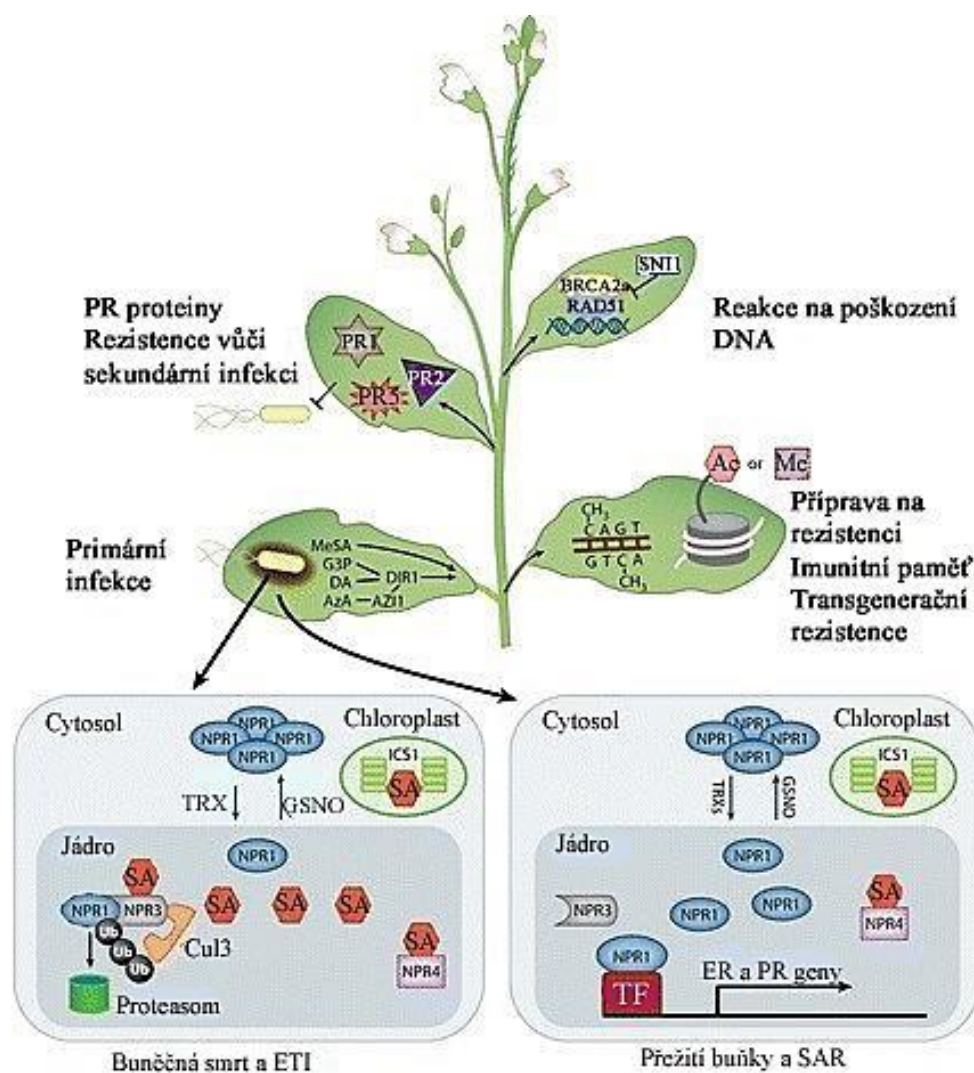


Obr. 10: Hypotetický model lokální a systémové stresové signální transdukce u rostlin: Lokální stresový stimul vyvolá rychlé signální dráhy jako např. zvýšení hladiny cytosolického Ca^{2+} , produkci ROS a aktivaci stresově-specifických metabolitů v rámci prvních vteřin či minut. Tyto signály přenášené po celé rostlině mohou systémově aktivovat obranné či aktivační mechanismy jako např. růst, vývoj a přežití buněk (převzato z Baxter *et al.*, 2014).

Studie se zaměřovaly zejména na signální dráhy, jež řídí indukci SAR pro kterou je nutná endogenní akumulace SA, která působí jako rostlinný hormon a také akumulace transkripčního faktoru NPR1 (*nonexpressor PR1 proteinů*), který se účastní interakcí mezi JA a SA a JA-dependentních obranných procesů (Durrant a Dong, 2004; Koornneef a Pieterse, 2008).

Následující fáze udržování popisuje ustálený stav, který je výsledkem procesů fáze iniciační (Ryals *et al.*, 1994). Patogen je schopný vyvolat kromě hypersenzitivní reakce a lokální buněčné smrti také další změny, jako je masivní transkripční

přeprogramování, které je závislé na transkripčním faktoru NPR1 a dalších transkripčních faktorech, poté následuje produkce obranných, případně signálních látek, jako je SA, MeSA, ROS, NO a další (Metraux *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 2009) (Obr.11). V důsledku produkce těchto látek dochází dále k systémové expresi antimikrobiálních PR genů i ve vzdálených neinfikovaných pletivech. Jedná se o sekundární obranný mechanismus vůči infekci, který může přetrvávat týdny, měsíce či celé vegetační období (Durrant a Dong, 2004). Díky těmto mechanismům je rostlina schopna odolávat širokému spektru patogenních hub, oomycet, virů i bakterií (Kuc, 1987). SAR není oproti ETI spojena s programovanou buněčnou smrtí, naopak umožňuje buňkám přežít ve stresové situaci (Dong, 2004).



Obr.11: Signální transdukce v rámci systémově získané rezistence (SAR). Primární lokální infekce může vyvolat nejen efektorově-vyvolanou imunitu (ETI), která je často spojena s programovanou buněčnou smrtí, ale také produkci kyseliny salicylové (SA) v chloroplastech prostřednictvím aktivity isochorismátsynthasy1. Dále jsou produkovány molekuly jako např.

kyselina azealová (AzA), glycerol-3-fosfát (G3P), methylsalicylát (MeSA), anebo dehydroabietinal (DA). AzA reguluje expresi proteinu Az11 (inhibitor proteas, přenašeč lipidů), zatímco G3P a DA vyžadují pro své funkce DIR1 (protein přenášející lipidy). Akumulace SA ovlivňuje redoxní potenciál buňky, Translokace NPR1 (*nonexpressor PR1 proteinů*) do jádra je regulována prostřednictvím S-nitrosoglutathionu (GSNO) a thioredoxinů (TRX). Koncentrace NPR1 je kontrolována hladinou SA díky receptorům pro NPR3 a NPR4. Vysoká koncentrace SA v místě infekce umožňuje interakci mezi NPR1-NPR3 a degradaci NPR1, přičemž poté dochází k ETI a programované buněčné smrti (PCD). U buněk ve vzdáleném pletivu od místa primární infekce přechodná hladina SA přerušuje interakci mezi NPR1-NPR4, což vyústí v akumulaci NPR1. NPR1 poté reaguje s transkripčními faktory (TF), následuje exprese PR proteinů (PR-1, PR2, PR-5) a dochází ke vzniku rezistence vůči sekundární infekci. Dochází také k acetylaci histonu H3K9 a methylaci histonu H3K4 na genových promotorech, které doprovázejí SAR. Methylace DNA a proteiny, které ovlivňují sbalení chromatinu (SNI1) a opravu DNA (RAD51, BRCA2) mohou udržovat stabilitu genomu nejen v rámci současné generace, ale také u potomstva (převzato z Fu a Dong, 2013)

2.4 Reaktivní formy kyslíku

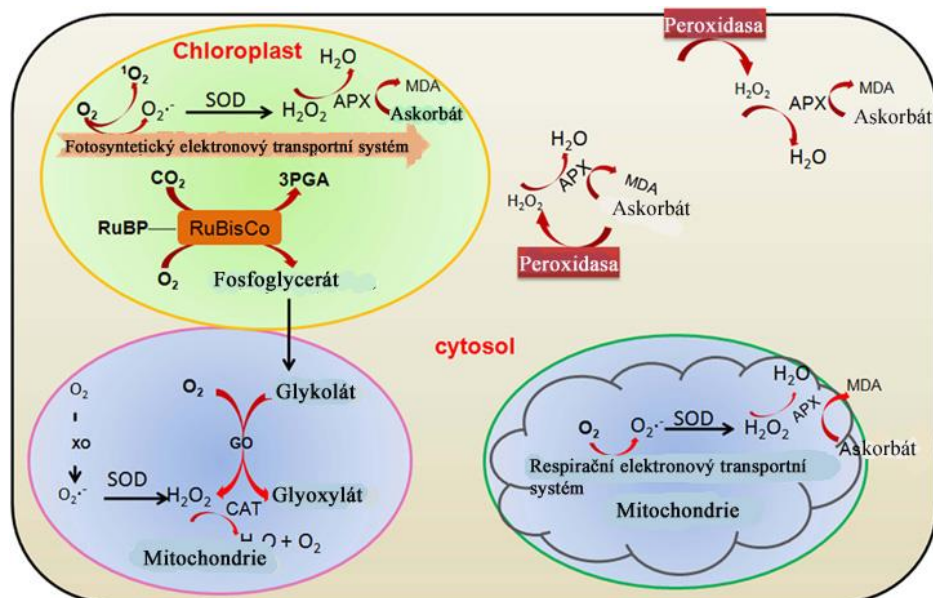
Pojem reaktivní formy kyslíku (ROS) zahrnuje reaktivní radikály kyslíku, jako je např. hydroxylový radikál (OH^\cdot), superoxidový radikál (O_2^\cdot), peroxid vodíku (H_2O_2) či singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). ROS jsou konstitutivně produkovány v nízkých hladinách při běžných fyziologických procesech jako je fotosyntéza, respirace, oxidace mastných kyselin apod (Mittler, 2002) (Tab. 4)

Tyto formy kyslíku vytváří rozsáhlou signální síť, která kontroluje u aerobních organismů důležité biologické procesy, jako je např. růst a vývoj či reakce na biotické/abiotické stresové faktory (Mittler *et al.*, 2011). Membránově propustný peroxid vodíku může sloužit jako signální molekula, která ovlivňuje buněčný mechanismus zahrnutý v růstu, vývoji a odpovědi na environmentální stimuly (Xia *et al.*, 2009). ROS také kooperují s dalšími signálními molekulami a hormony, což přispívá k regulaci řady biologických procesů, které probíhají v různých typech pletiv za rozdílných environmentálních podmínek. V rámci buňky mohou také ROS nespecificky reagovat s makromolekulami typu proteinů, DNA či lipidů a tím způsobit oxidaci proteinů, mutace DNA nebo peroxidaci lipidů, což může vést k progresivní senescenci až programované buněčné smrti (Beckman a Ames, 1998).

Tab.4: Reaktivní formy kyslíku a jejich vlastnosti (převzato z Das a Roychoudhury, 2014).

ROS	$t_{1/2}$	Zdroje	Funkce	Reakce s DNA	Reakce s proteiny	Reakce s DNA	Zachycovací systémy
Superoxid	1-4 μ s	Membrány chloroplasty mitochondrie	Reakce se sloučeninami s dvojnou vazbou (Fe-S proteiny)	Ne	Pomocí Fe-centra	Extrémně nízká	SOD
Hydroxylový radikál	1 μ s	Membrány, chloroplasty, mitochondrie	Extrémně reaktivní se všemi biomolekulami	Rychlá	Rychle	Rychlá	Flavonoidy a prolin
Peroxid vodíku	1 ms	Membrány chloroplasty mitochondrie peroxisomy	Oxidace proteinů, tvorba hydroxylového radikálu	Ne	Atakuje Cys-rezidua	Extrémně nízká	CAT, POX a flavonoidy
Singletový kyslík	1-4 μ s	Membrány chloroplasty mitochondrie	Oxidace proteinů a DNA	Reaguje s G-reziduem	Atakuje Trp, His, Tyr, Met a Cys-rezidua	Polynenasycené mastné kyseliny	Karotenoidy a α -tokoferol

Hlavním intracelulárním zdrojem ROS u živočichů jsou mitochondrie, zatímco u rostlin jsou to chloroplasty a peroxisomy (Obr. 12). Ve dne vyprodukují chloroplasty u rostlin 20x větší množství ROS než mitochondrie, ovšem v noci jsou největším producentem ROS mitochondrie (Rhoads *et al.*, 2006).



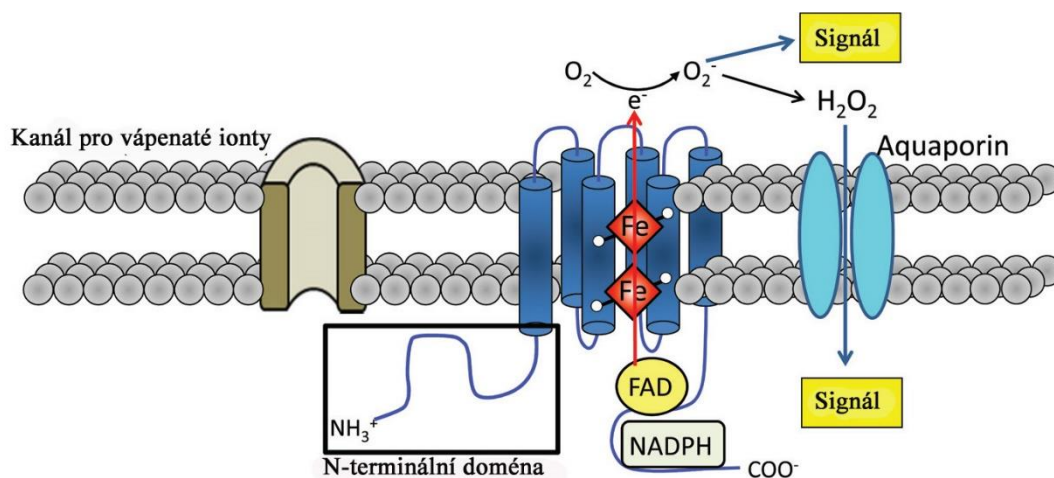
Obr.12: Hlavní místa produkce ROS včetně lokalizace hlavních antioxidačních enzymů. Glykolát oxidasa (E.C.1.1.3.1) (GO), 3-fosfoglycerát (3PGA), ribulosa - 1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa (E.C.4.1.1.39) (RUBISCO), ribulosa-1,5-bisfosfát (RuBP), superoxid dismutasa (E.C.1.15.1.1) (SOD), xanthinoxidasa (E.C.1.18.3.2) (XOR), katalasa (E.C.1.11.1.6) (CAT), askorbátperoxidasa (E.C.1.1.11.1) (APX) (převzato z Das *et al.*, 2015).

2.4.1 Produkce ROS

Za běžných fyziologických podmínek je hladina ROS regulována přítomností řady antioxidačních systémů. Pokud vlivem vnějšího faktoru dojde k porušení rovnováhy mezi produkcí a degradací ROS, změna v intracelulární hladině ROS může vést ke změnám v buněčném transkriptomu (Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001). Většina organismů se na ROS adaptovala a využívá je zejména jako sekundární přenašeče v procesu transdukce signálu do jádra (Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001).

Extracelulární produkci ROS, která je indukovaná na základě působení vnějšího stimulu, zajišťují peroxidasy buněčné stěny a NADPH oxidasy, které jsou u rostlin známé jako tzv. RBOHs (*homology oxidas během oxidačního stresu*). RBOHs regulují signální dráhy rostlin zahrnuté v růstu kořenových vlásků, otevírání/zavírání průduchů, v obraně rostlin a aklimatizaci na biotický a abiotický stres (Miller *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2011). Rostlinné RBOHs mají cytosolickou FAD- a NADPH-vazebnou doménu na C-konci a k tomu šest konzervovaných transmembránových domén, které jsou homologní

k savčím NADPH oxidasám (Obr. 13). Tyto enzymy mají na N-konci Ca^{2+} vazebné EF domény (pro vazbu elongačního faktoru) a cílová místa pro fosforylaci, která jsou nezbytná pro zvýšení jejich aktivity (Kobayashi *et al.*, 2007).



Obr.13: Základní struktura RBOH proteinu. RBOH má cytosolární FAD- a NADPH-doménu na C-konci a šest konzervovaných transmembránových domén. N-konec obsahuje dvě EF-domény a fosforylační místa, která jsou nezbytná pro aktivitu RBOH (převzato z Baxter *et al.*, 2014).

Pomocí RBOH proteinů je produkován v apoplastu superoxidový radikál, který je dále (ne)enzymaticky přeměněn. Bylo zjištěno, že oxalát oxidasa je zahrnutá v produkci ROS v kořenových buňkách během sucha, zatímco glykolát oxidasa (GOX) hraje roli v nehostitelské rezistenci vůči patogenu, jak bylo potvrzeno u *Arabidopsis* a tabáku (Rojas *et al.*, 2012; Voothuluru a Sharp, 2013). V průběhu obranných reakcí rostlin se podílí na produkci ROS také peroxidasy (PRX) (1.11.1.x). Jako příklad lze uvést PRX33 a PRX34, které přispívají u *Arabidopsis* k produkci ROS během aplikace houbového elicitoru nebo bakteriálních patogenů. Takto produkováné ROS mají značný význam také při ukládání kalosy nebo expresi obranných genů (Wrzaczek *et al.*, 2013).

Produkce ROS a enzymů účastnících se jejich metabolismu je transkripčně regulována. Konkrétně v kořenových buňkách transkripční faktor TF UPBEAT1 reguluje expresi peroxidasy a tudíž kontroluje hladinu ROS, která je důležitá pro vývoj kořene (Tsukagoshi *et al.*, 2010). Na úrovni transkripce MAPK8 je regulována exprese RBOH, která je vyvolána mechanickým poškozením (Takahashi *et al.*, 2011).

2.4.2 Odbourávání ROS

Mechanismy vedoucí k degradaci ROS při jejich zvýšených intracelulárních hladinách lze klasifikovat jako enzymové a neenzymové (Jamieson, 1998). Neenzymové systémy zahrnují malé, ve vodě rozpustné molekuly, které jsou prostřednictvím ROS oxidovány

a tudíž tyto oxidanty eliminují. Mezi takové sloučeniny patří např. glutathion (GSH), fytochelatiny, kyselina askorbová, prolin, polyaminy, flavonoidy, alkaloidy či karotenoidy (Jamieson, 1998).

2.4.2.1 Neenzymové mechanismy odbourávání ROS

Askorbát (AA) je nejvíce prostudovaný antioxidant, který slouží jako donor elektronů pro enzymové i neenzymové reakce. Většina AA se tvoří v mitochondriích Smirnov-Wheelerovou dráhou, menší množství je generované z kyseliny D-galakturonové (Barnes *et al.*, 2002). AA je lokalizován převážně v cytosolu, ale v menší míře i v apoplastu a je tak jednou ze složek první linie obrany vůči ROS (Barnes *et al.*, 2002). AA je oxidován na MDHA (monodehydroaskorbát), který je buď ihned redukován na askorbát, nebo disproportionuje na askorbát a dehydroaskorbát za katalýzy řady antioxidantních enzymů, které budou následně uvedeny (Obr. 15). Zároveň AA reaguje s ROS a regeneruje α -tokoferol z tokoferoxylového radikálu a tím chrání membrány buněk před oxidačním poškozením (Shao *et al.*, 2005).

Redukovaný glutathion (GSH), thiolový tripeptid, je významný antioxidant a růstový regulátor, který se kumuluje v redukovaném stavu v cytoplasmě rostlinných buněk (zejména v ER, mitochondriích, chloroplastech, vakuolách, peroxisomech), kde je produkován ve vysokých koncentracích. Účastní se mnoha biologicky významných procesů, jako je buněčný růst a dělení, buněčná diferenciaci, senescence, regulace transportu síranů, detoxifikace xenobiotik, propojení metabolitů, regulace enzymové aktivity, syntéza proteinů, nukleotidů, fytochelatinů a exprese genů odpovídajících na stres (Mullineaux a Rausch, 2005). Při změně jeho redoxního stavu dochází k ovlivnění mechanismů hypersenzitivní reakce vedoucí k programované buněčné smrti (Romero-Puertas *et al.*, 2008). GSH zachycuje ROS, chrání různé biomolekuly tvorbou aduktů nebo je redukuje. GSH, který je základním stavebním kamenem fytochelatinů vznikajících za katalýzy fytochelatinsynthasy, se tak podílí i na chelataci těžkých kovů, čímž se eliminuje potenciální zdroj ROS (Roychoudhury *et al.*, 2012).

α -tokoferol je lipofilní antioxidant nepostradatelný pro ochranu biologických membrán před poškozením ROS či lipidových radikálů (Kiffin *et al.*, 2006). Existují čtyři isoformy tokoferolu, které jsou syntetizované fotosyntetizujícími organismy. α -tokoferol je syntetizován z γ -tokoferolu pomocí γ -tokoferolmethyltransferasy (E.C.2.1.1.95), poté je schopný reagovat s lipidovými radikály typu $RO\cdot$ a $ROO\cdot$ (R = reziduum mastné

kyseliny), které přeměňuje na TOH· (tokoferolový radikál). Radikál TOH· je nadále redukován interakcí s GSH a AA (Igamberdiev *et al.*, 2004).

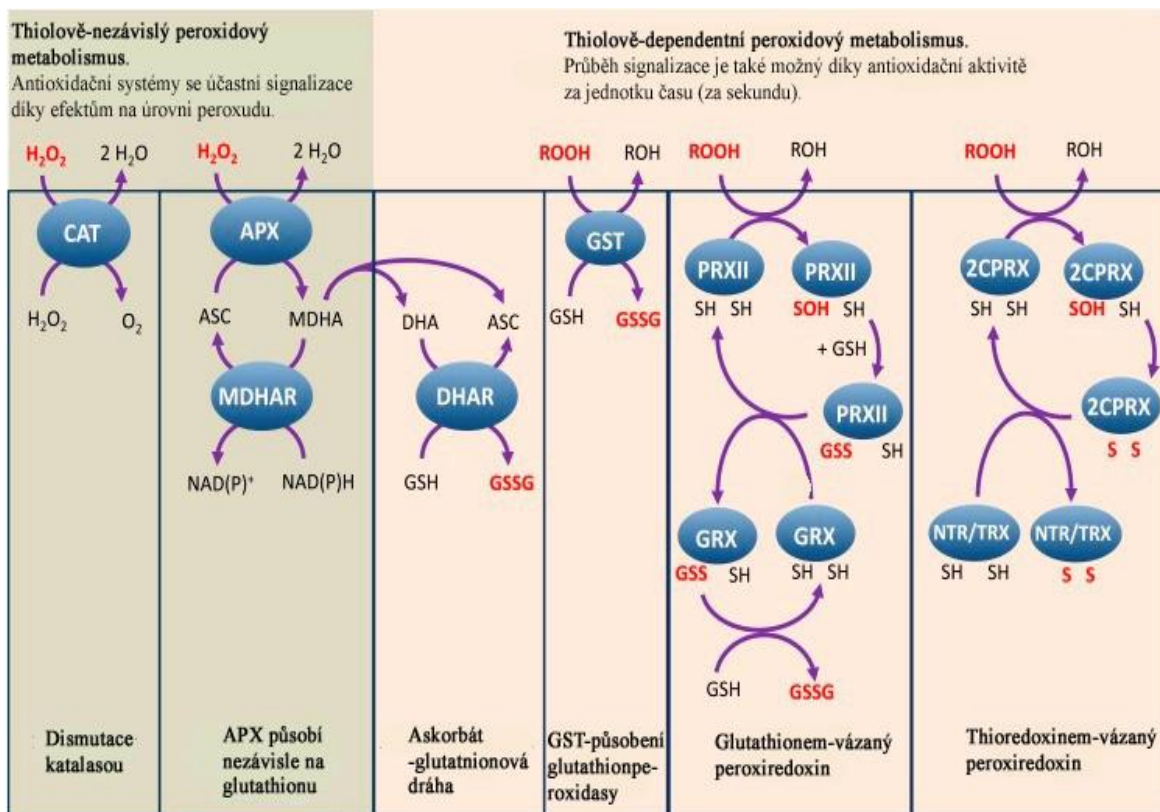
Karotenoidy, patří mezi lipofilní antioxidanty, které jsou produkovány v plastidech rostlin i mikroorganismů. Patří do tzv. „anténních molekul“, které absorbují světelné záření o vlnové délce 450-570 nm a přenáší jej na molekuly chlorofylu. Karotenoidy vykazují antioxidační aktivitu v těchto krocích: 1) reagují s produkty lipidové peroxidace a ukončují řetězové reakce, 2) zachycují $^1\text{O}_2$ a vytváří teplo, 3) zabraňují tvorbě $^1\text{O}_2$ reakcí s $^3\text{Chl}^*$ (excitovaný chlorofyl v tripletovém stavu) a excitovaným chlorofylem Chl^* , 4) rozptylují přebytek excitační energie pomocí xantofylového cyklu (Fini *et al.*, 2011).

Flavonoidy se u rostlin vyskytují hlavně v listech, květech a pylových zrnech a mohou být klasifikované na základě struktury na flavonoly, flavony, isoflavony a anthokyaniny. Kromě zachycování ROS umožňují pigmentaci květin, ovoce, klíčení semen a účastní se také obranných reakcí vůči patogenu (Fini *et al.*, 2011).

Prolin je iminokyselina zmírňující toxické působení ROS a je považována za silný neenzymatický antioxidant. Prolin je syntetizován z kyseliny glutamové, kdy v prvním kroku katalyzovaném δ -pyrrolin-5-karboxylátsynthetasou (E.C.2.7.2.11) vzniká δ -pyrrolin-5-karboxylát a následně za katalýzy pyrrolin-5-karboxylátreduktasy (EC 1.5.1.2) vzniká prolin. V průběhu stresu se prolin akumuluje u rostlin ve vysokých koncentracích v důsledku jeho zvýšené syntézy či redukované degradace (Verbruggen a Hermans, 2008).

2.4.2.2 Enzymové mechanismy odbourávání ROS

Enzymové mechanismy degradace ROS zahrnují superoxiddismutasu, různé peroxidasy – např. glutathionperoxidasu (E.C.1.11.1.9) (GPRX) a askorbátperoxidasu (1.11.1.11), glutathionreduktasu (GR) (E.C.1.6.4.2), monodehydroaskorbátreduktasu (MDHAR) (E.C.1.6.5.4), dehydroaskorbátreduktasu (DHAR) (1.8.5.1), peroxiredoxin (Prx) a katalasu (CAT) (E.C.1.11.1.6) (Obr.14, Tab. 5) (Heller a Tudzynski, 2013).



Obr.14: Přehled nejlépe charakterizovaných enzymů, které se podílí na metabolismu peroxidu vodíku. *Legenda:* 2-cyteinperoxidasa (2CPRX); askorbát (ASC), dehydroaskorbátreduktasa (DHAR), monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR), NADPH-thioredoxin C (NTR), peroxidasa typu II (PRXII), voda/alkohol (ROH), ROOH = H₂O₂ nebo organický peroxid, atom síry disulfidického můstku (S), sulfhydrylová (thiolová) skupina (SH), funkční skupina kyseliny sulfonové (SOH) (převzato z Noctor *et al.* 2014).

Superoxiddismutasa je metaloenzym přítomný u všech živých organismů. Lze rozlišit tři isoenzymy, které se liší buněčnou lokalizací a kovem vázaným v molekule. Příkladem je mitochondriální Mn-SOD, chloroplastová Fe-SOD a Cu/Zn SOD v cytosolu, peroxisomech a chloroplastech (Mittler *et al.*, 2002). Superoxidový radikál pomocí SOD se přeměňuje na peroxid vodíku, který je aktivně zapojen v první linii obranných reakcí, avšak v případě jeho nadbytku je peroxid vodíku degradován CAT nebo GPX (Lin *et al.*, 2009).

Katalasa je tetramerní enzym obsahující ve své molekule vázaný hem, který katalyzuje dismutaci peroxidu vodíku na vodu a kyslík, zároveň také přeměňuje organické peroxidy. CAT je lokalizovaná především v peroxisomech a mitochondriích, kde se účastní odbourání H₂O₂, který vzniká v průběhu β-oxidace mastných kyselin, fotorespirace, katabolismu purinu či oxidačního stresu (Mittler *et al.*, 2002).

Tab.5: Přehled enzymových a neenzymových antioxidačních systémů včetně funkcí a buněčné lokalizace (převzato z Das a Roychoudhury, 2014).

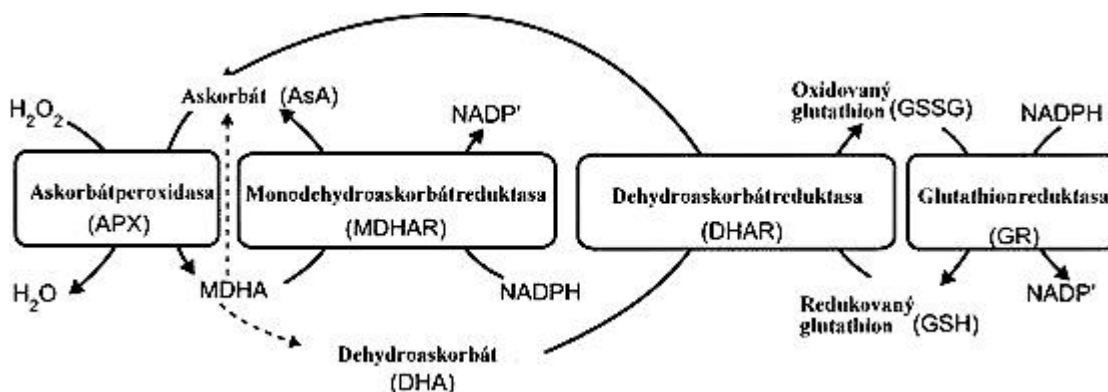
Enzymové antioxidanty	Katalogové číslo	Katalyzovaná reakce	Subcelulární lokalizace
Superoxiddismutasa (SOD)	1.15.1.1	$2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Peroxisomy, mitochondrie, chloroplasty, cytosol
Katalasa (CAT)	1.11.1.6	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	Peroxisomy, mitochondrie
Askorbátperoxidasa (APX)	1.11.1.11	$2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AA} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{DHA}$	Peroxisomy, mitochondrie, chloroplasty, cytosol
Monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR)	1.6.5.4	$2\text{MDHA} + \text{NADH} \rightarrow 2\text{AA} + \text{NAD}^+$	Mitochondrie, chloroplasty, cytoplasma
Dehydroaskorbátreduktasa (DHAR)	1.8.5.1	$\text{DHA} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{AA} + \text{GSSG}$	Mitochondrie, chloroplasty, cytoplasma
Glutathionreduktasa (GR)	1.6.4.2	$\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$	Mitochondrie, chloroplasty, cytoplasma
Guajakolperoxidasa (GPX)	1.11.1.7	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DHA} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$	Mitochondrie, chloroplasty, cytoplasma, endoplazmat. retikulum

Neenzymové antioxidanty	Funkce	Subcelulární lokalizace
Kyselina askorbová (AA)	Detoxifikace H_2O_2 s pomocí APX	Peroxisomy, mitochondrie, chloroplasty, cytosol, vakuola, apoplast
Redukovaný glutathion (GSH)	Detoxifikační kosubstrát GR a GST	Peroxisomy, mitochondrie, chloroplasty, cytosol, vakuola, apoplast
α -Tokoferol	Detoxifikace produktů lipidické peroxidace	Buněčné membrány
Karotenoidy	Tlumí přebytek energie z fotosystémů	Chloroplasty a další plastidy
Flavonoidy	Zachycovač H_2O_2 , O_2^- , OH^-	Vakuola
Prolin	Zachycovač OH^- a O_2^- , chrání před lipidickou peroxidací	Mitochondrie, chloroplasty, cytoplasma

2.4.3 Askorbát-glutathionový cyklus

Jedná se o hlavní antioxidační mechanismus rostlinných buněk, který likviduje nadměrnou produkci ROS během vývoje a nepříznivých podmínek. Tento cyklus tvoří enzymy jako je askorbátperoxidasa, monodehydroaskorbátreduktasa, dehydroaskorbátre-

duktasa a glutathionreduktasa a další neenzymové antioxidanty jako je askorbát a glutathion (Obr. 15) (Ahmad *et al.*, 2013).



Obr.15: Askorbát-glutathionový cyklus. APX katalyzuje redukci peroxidu vodíku a oxidaci askorbátu za vzniku vody a MDHA. Pokud se MDHA rychle nezredukuje zpět na askorbát prostřednictvím MDHAR, rozpadne se spontánně na askorbát a DHA. DHAR recykluje askorbát z DHA za použití redukovaného glutathionu, který je regenerován činností NADPH-dependentní reakce. *Legenda:* přerušované linie značí neenzymové reakce, askorbátperoxidasa (APX), monodehydroaskorbát (MDHA), dehydroaskorbát (DHA), redukovaný glutathion (GSH), oxidovaný glutathion (GSSG), monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR), dehydroaskorbátreduktasa (DHAR), glutathionreduktasa (GR) (převzato z Ahmad *et al.*, 2013).

Askorbátperoxidasa je hlavním enzymem askorbát-glutathionového cyklu. Je možné rozlišit pět isoform tohoto enzymu, které se vzájemně liší buněčnou lokalizací (cytosolická, mitochondriální, peroxisomální a chloroplastová – stromatální a thylakoidní) a aminokyselinovým složením. V cytosolu a chloroplastech zastává stejnou funkci jako CAT, ale jeho hlavní funkcí je přeměna H_2O_2 na vodu a dehydroaskorbát (DHA), kdy jako redukční činidlo slouží kyselina askorbová (Sharma a Dubey, 2004). APX se účastní důležitých fyziologických procesů, jako je abiotický stres, klíčení semen, vývoj nodulí, a tvorba laterálních kořenů (Correa- Aragunde *et al.*, 2015). Regulace aktivity APX přispívá mimo jiné ke kontrole programované buněčné smrti (De Pinto *et al.*, 2013).

Monodehydroaskorbátreduktasa regeneruje askorbát z monodehydro-askorbátu (MDHA) za využití NADPH jako redukčního činidla. Jakmile je kyselina askorbová regenerována může být znovu oxidována v peroxisomech APX. Dosud je známo několik isoenzymů MDHAR, které jsou lokalizované v mitochondriích, peroxisomech, chloroplastech, glyoxysomech a cytosolu (Mittler *et al.*, 2002).

Dehydroaskorbátreduktasa redukuje dehydroaskorbát na askorbát, za využití GSH jako donoru elektronů. Dehydroaskorbátreduktasa se takto podílí na udržování buněčné hladiny askorbátu a redoxního potenciálu v symplastu a apoplastu. DHAR je

možné detekovat v semenech, kořenech a výhoncích rostlin (Chen a Gallie, 2006; Eltayeb *et al.*, 2007).

Glutathionreduktasa je oxidoreduktasou flavoproteinového typu, která využívá NADPH jako redukční činidlo pro redukci GSSG na GSH. Redukovaný glutathion se uplatňuje při regeneraci askorbátu z MDHA a DHA a nakonec je znovu oxidován na GSSG. Glutathionreduktasa je tedy rozhodujícím enzymem při uspořádání disulfidových můstků v GSSG a podílí se na udržování vysokého buněčného poměru GSH/GSSG. GR se nejhojněji vyskytuje v chloroplastech, v menší míře také v mitochondriích a cytosolu (Asada, 2006).

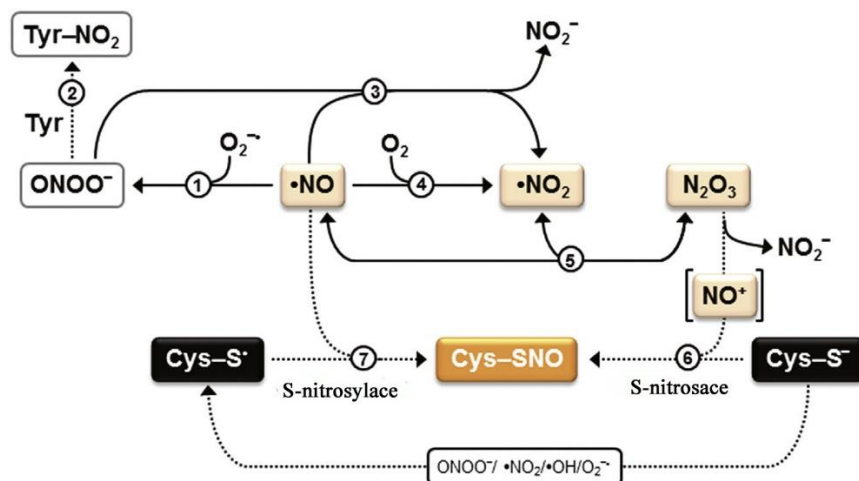
Guajakolperoxidasa je monomerní oxidoreduktasa, která váže hem jako kofaktor a je přítomná v cytosolu, chloroplastech, buněčné stěně i extracelulárním prostoru. Slouží k eliminaci přebytku H_2O_2 za normálních podmínek i v průběhu stresu. Hraje klíčovou roli také při biosyntéze ligninu a uplatňuje se při obranných reakcích rostlin, kdy degraduje kyselinu indolactovou za využití peroxidu vodíku. GPX využívá jako donory elektronů aromatické sloučeniny jako je pyrogallol či guajakol (Asada, 2006).

2.5. Reaktivní formy dusíku

Oxid dusnatý patří mezi hlavní zástupce tzv. reaktivních forem dusíku (RNS). Do skupiny těchto dusíkových radikálů lze řadit nitrosoniový ion (NO^+), nitroxylový ion (NO^-), NO^* radikál, oxidy dusíku (NO_2 , N_2O_3), kyselinu dusitou HNO_2 , S-nitrosoglutathion (GSNO) a S-nitrosothiol (Ferrer-Sueta a Radi, 2009) (Obr.16, Tab.6).

Tab.6. Přehled základních reaktivních forem dusíku (převzato z Rahman *et al.*, 2012).

Radikálové formy dusíku	Jiné formy dusíku
Oxid dusnatý (NO)	Oxid dusičitý (NO_2)
Kyselina dusitá (HNO_2)	Nitrosylový kation (NO^+)
	Nitrosylový anion (NO^-)
	Oxid dusičitý (N_2O_4)
	Oxid dusitý (N_2O_3)
	Peroxydusitan ($ONOO^-$)
	Kyselina peroxydusitá ($ONOOH$)
	Alkylperoxydusitany ($ROONO$)



Obr.16: Reakce NO v biologických systémech. 1) Reakcí NO se superoxidem vzniká peroxydusitan (ONOO^-). 2) Tyrosiny obsažené v proteinech mohou reagovat s peroxydusitanem za vzniku nitrovaných aduktů (Tyr-NO_2). 3) Alternativně peroxydusitan reaguje s NO za tvorby oxidu dusičitého (NO_2). 4) NO_2 vzniká také reakcí NO s kyslíkem, rychlost reakce je přímo úměrná koncentraci NO. 5) NO_2 podléhá radikálové reakci s NO za vzniku oxidu dusitého (N_2O_3). 6) V přítomnosti nukleofilu jako např. thiolátu, N_2O_3 přenáší svou nitrososkupinu (NO^+) a tvoří nitrosothiol (S-nitrosace). ROS či RNS slouží jako akceptory elektronů během oxidace thiolátů. 7) Oxidací thiolů vznikají thiylové radikály, které s NO tvoří S-nitrosothioly (S-nitrosylace) (převzato ze Zaffagnini *et al.*, 2016).

2.5.1. Role NO u rostlin

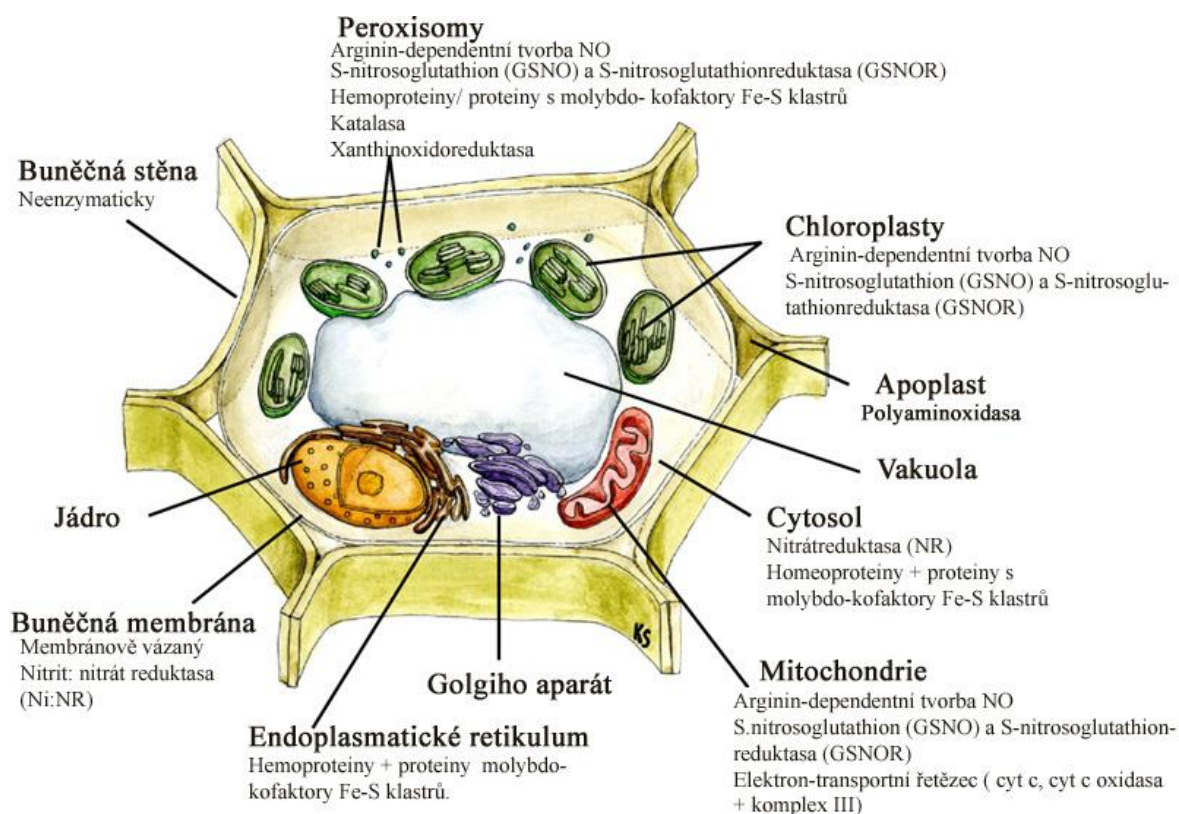
NO a ostatní RNS hrají důležitou roli v průběhu životního cyklu rostlin. NO je nízkomolekulární látka plynného skupenství, která proniká skrz buňky prostou difúzí a účastní se důležitých fyziologických procesů, jako je např. klíčení, regulace otevírání průduchů, inhibice aktivity určitých enzymů, aktivace obranných genů a MAP kinasové kaskády, či reakce na abiotický/ biotický stresový faktor a další (Wilson *et al.*, 2008). K NO signalizaci dochází prostřednictvím komplexní sítě sekundárních přenašečů, jako jsou Ca^{2+} , cGMP či cADP, které přispívají k regulaci exprese řady genů (Trapet *et al.*, 2015).

Noritake *et al.* v roce 1996 poprvé prokázal akumulaci fytoalexinu rišitinu u bramboru ošetřeném NO. V řadě studií byla prokázána signální role NO, vedoucí ke aktivaci exprese genů, např. kódujících enzymy fenylypropanoidové dráhy (např. fenylyalaninammonialyasa – PAL), enzymy zahrnutých v biosyntéze fytoalexinů (Delledonne *et al.*, 1998). Mimo jiné se NO dále podílí také na expresi genů pro biosyntézu SA, která funguje jako hlavní regulační prvek systémových obranných reakcí (Polverari *et al.*, 2003). NO je součástí komplexní signální sítě zahrnující kromě peroxidu vodíku a dalších reaktivních forem kyslíku (ROS), také hormony a důležité sekundární přenašeče jako je Ca^{2+} nebo cGMP, cAMP, cADP-ribosa (Gaupels *et al.*, 2011).

V průběhu infekce či působení jiného stresového faktoru dochází u rostlin k rychlé produkci a prudkému nárůstu hladiny ROS i RNS (Baxter *et al.*, 2014).

2.5.2 Produkce RNS

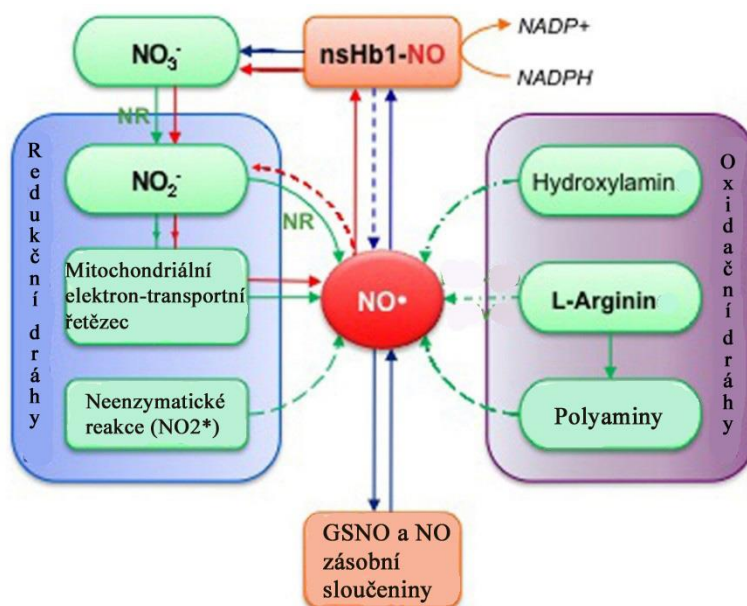
Dostupnost oxidu dusnatého v průběhu života rostlin závisí na různých mechanismech jeho syntézy, ale také i jeho degradace (Obr.17). Oxid dusnatý je produkován každou rostlinnou buňkou především v peroxisomech, chloroplastech a mitochondriích, ale jeho hladina kolísá v závislosti na působení endogenních i exogenních stimulů (Galatro *et al.*, 2013; Vanlerberghe, 2013). Existují dva hlavní mechanismy jeho tvorby u rostlin - oxidační a redukční metabolická dráha (Ribeiro *et al.*, 1999).



Obr.17: Buněčná lokalizace tvorby a degradace NO (převzato z Helmolz-Muenchen -German Research Center for Environmental Health: <https://www.helmholtz-muenchen.de>)

U savců je NO tvořen prostřednictvím NO synthasy (E.C.1.14.13.39), nicméně rostlinný genom neobsahuje homology tohoto enzymu (Fröhlich a Durner, 2011). Corpas a Barroso v roce 2014 zachytili aktivitu podobnou živočišné NOS v extraktech listů hrachu, které byly vystavené inhibitorům savčí NOS. Dopusud byl evidován pouze jediný případ v říši rostlin, kdy byla detekována NO synthasa a to v případě zelené mořské řasy *Ostreococcus tauri*, která vykazovala 45% sekvenční podobnost s lidskou NOS (Foresi *et*

al., 2010). V roce 2015 zjistil Kumar *et al.* pomocí veřejných datových bank sekvence podobné NOS také u *Bathycoccus prasinos* a *Ostreococcus lucimarinus*. V oxidační dráze produkuje NO enzym, který má podobnou funkci jako savčí NO synthasa (NOS), která využívá jako substrát L-arginin, jež je dále přeměňován na citrullin, jak bylo potvrzeno immunogold značením či pomocí chemiluminiscence (Del Río *et al.*, 2002; Corpas *et al.*, 2004). Zároveň byl tento enzym lokalizován v kořenech, stoncích a listech hrachu (Corpas *et al.*, 2006). NO je tvořen také prostřednictvím oxidace hydroxylaminu či polyaminů – v případě oxidace polyaminů se NO zároveň účastní také kořenového vývoje, stresu při suchu a embryogeneze (Tun *et al.*, 2006, Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2009). Mechanismus oxidační tvorby NO probíhá v chloroplastech, mitochondriích či peroxisomech. (Rumer *et al.*, 2009). Oproti tomu redukční dráha probíhající v mitochondriích využívá konverzi dusičnanu na NO za katalýzy NAD(P)H-dependentní nitrátreduktasy (NR) (E.C.1.7.1.2), která přemění dusičnan na dusitan, dále dochází pomocí mitochondriálního elektronového transportního řetězce za účasti nitrit:NO reduktasy (NiNOR) (E.C.1.7.2.1) k redukci dusitanu na NO, nebo také k redukci peroxisomální xanthinoxidoreduktasou (XOR) (E.C.1.17.3.2), (Rockel *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2005) (Obr.18).



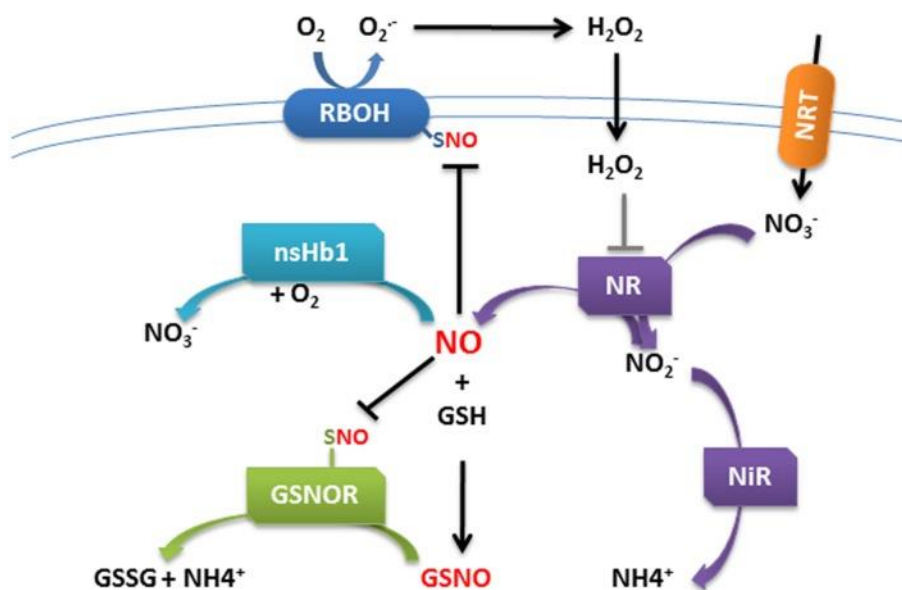
Obr.18: Rovnováha a biosyntéza NO u rostlin. Nitrátreduktasa (NR) katalyzuje redukci dusičnanu (získaného asimilací) na dusitan. Další redukce dusitanu na NO probíhá enzymově prostřednictvím NR nebo mitochondriálními elektron-transportními řetězci nebo neenzymově (reduktivní dráhy). Alternativně může k syntéze NO docházet díky oxidaci hydroxylaminu, polyaminů či L-argininu. U rostlin probíhá syntéza z L-argininu pomocí enzymu, který je podobný savčí NO synthase. V tomto případě je hladina NO ovlivněna aktivitou nesymbiotickým hemoglobinem 1-dioxygenasou (nsHb1) (E.C.1.14.12.17), která přeměňuje NO na dusičnan. NO také může reagovat s redukováným glutathionem (GSH) nebo thioley za vzniku S-nitrosothiolů.

Červené šipky značí tzv. nitrát-NO cyklus (např. při hypoxii), zelené šipky odpovídají biosyntézám, bílé šipky značí reakce zahrnuté v udržování rovnováhy NO (převzato z Moreau *et al.*, 2010).

Produkce NO závisí na buněčné/orgánové lokalizaci, ale také na vnějších podmínkách. NiNOR tvoří oxid pouze v kořenech a hraje významnou roli v průběhu mykorrhizy s houbami (Moche *et al.*, 2010). XOR je aktivní za anaerobních podmínek, či ve stavu hypoxie, kdy jako substrát využívá xanthin nebo NADH (Godber *et al.*, 2000). NR vytváří NO především při obranných reakcích rostlin na sucho, osmotický stres, uzavírání průduchů, či chlad (Stohr *et al.*, 2001, Srivastava *et al.*, 2009).

2.5.3 Interakce mezi RNS a ROS

Signální dráhy NO a ROS v průběhu biotických interakcí jsou úzce propojené (obr.19). Vzájemným působením mohou ovlivňovat expresi genů zahrnutých v stresových reakcích rostlin, primární metabolismus nebo fytohormonální signalizaci (Moreau *et al.*, 2010).



Obr. 19: Křížové reakce mezi RNS a ROS v rostlinných buňkách: Peroxid vodíku produkovaný NADPH oxidasou vede k aktivaci nitrátreduktasy (NR) a produkci NO. Akumulace NO naopak prostřednictvím S-nitrosylace oslabí aktivitu NADPH oxidasy, což brání nadměrné produkci ROS. V průběhu asimilace dusíku je přenesen dusičnan (NO_3^-) dusičnanovými transportéry (NRT) a redukován na dusitan (NO_2^-) pomocí NR. Následně je dusitan redukován na NO díky NR. NO reaguje v přítomnosti kyslíku s redukováným glutathionem (GSH) za tvorby S-nitrosoglutathionu (GSNO). GSNO je přeměněn S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR) (E.C.1.2.1.46) na oxidovaný glutathion (GSSG) a amoniak (NH_3). Produkce NO vede k S-nitrosylaci GSNOR a inhibici její aktivity, čímž se zabrání degradaci GSNO (převzato z Damiani *et al.*, 2016).

NO je z hlediska svého redoxního potenciálu schopný účastnit se širokého spektra fyziologických chemických reakcí. Může interagovat s nadbytkem O_2^- za tvorby

peroxydusitanu (ONOO^-). V případě vysoké hladiny NO dochází ke tvorbě oxidu dusitého a následné nitrosaci (adice NO). Pokud je hladina NO i O_2^- vysoká, autooxidací NO se vytváří oxid dusičitý (Frein *et al.*, 2005). Peroxydusitan spolu s ROS je ve vysoké koncentraci u rostlin schopný ovlivnit aktivitu proteinů prostřednictvím tyrosinové nitrace anebo posttranslační modifikace sulfenylace cysteinových reziduí, zároveň dokáže poškodit také DNA nebo vyvolat peroxidaci lipidů (Astier a Lindermayr, 2012; Gaupels *et al.*, 2011). Hladina peroxydusitanu v buňkách je regulována peroxiredoxiny (peroxidasy na bázi thiolů), přičemž peroxidasová a peroxydusitanreduktasová aktivita Prx II E z *A. thaliana* může být při biotickém stresu inhibovaná S-nitrosylací, což zesiluje škodlivé účinky peroxydusitanu (Romero-Puertas *et al.*, 2007).

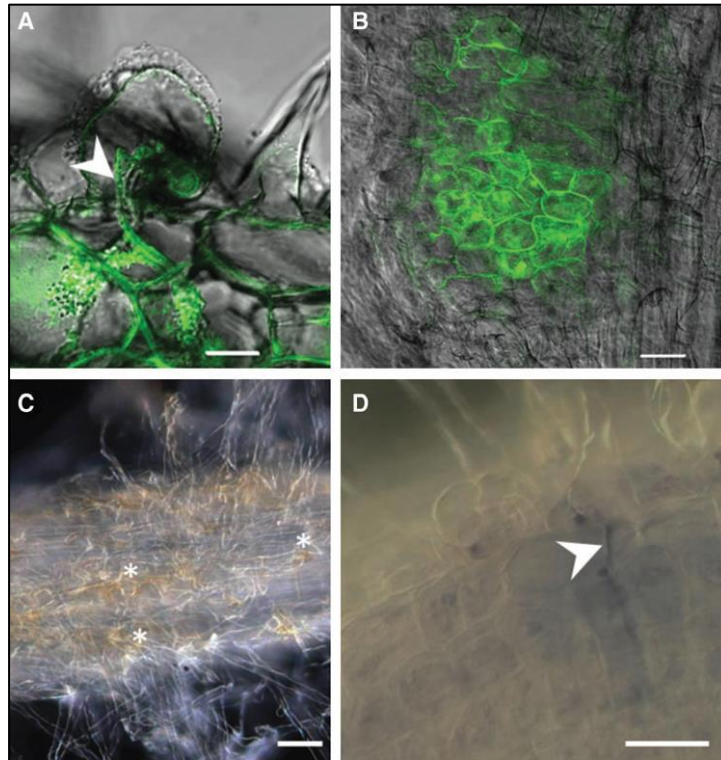
Pokud NO reaguje s kyslíkem, tvoří se zpravidla dusitan a dusičnan. Takto vytvořený dusitan slouží poté jako substrát pro opětovnou produkci NO prostřednictvím NR (Damiani *et al.*, 2016).

2.5.3.1 Interakce RNS a ROS v průběhu symbiózy

Příkladem modelem interakce ROS a NO je symbióza bobovitých rostlin s bakteriemi *Rhizobium*. Během různých vývojových stádií nodul *Rhizobia* byla zaznamenána výrazná produkce NO. Snížením produkce NO došlo také k ovlivnění vývoje nodul během časných fází infekce. Analogické výsledky byly zaznamenány také při detekci ROS během této interakce, což značí, že NO i ROS jsou nezbytné pro průběh symbiózy (Puppo *et al.*, 2013) (Obr.20).

V případě hypoxie nahradí dusitan, který vznikl jako produkt přeměny dusičnanu prostřednictvím NR, kyslík jakožto koncový akceptor elektronů v respiračním řetězci, což vyústí v produkci NO. Takto vytvořený NO je dále recyklován hemoglobin-dependetním oxidačním mechanismem opět na dusičnan. Tento respirační proces se uplatňuje především v případě interakce rostlin s *Rhizobium* a následné fixaci dusíku (Meilhoc *et al.*, 2011). Podle studie Cam *et al.* z roku 2012 značí výrazný nárůst NO v nodulích bakterie vývojově a stresově vyvolanou senescenci, proto bakterie dále detoxifikuje NO, aby zabránila předčasné senescenci nodul. Další z metabolických drah využívá přeměnu NO na dusičnan prostřednictvím nesymbiotických hemoglobinů, jako je např. u *Arabidopsis* Hb1, kdy dochází ke tvorbě dusičnanu v závislosti na NADPH, který slouží jako zdroj elektronů (Perazolli *et al.*, 2004). Naopak v průběhu symbiózy jsou u rhizobakterií přítomné také různé antioxidační enzymy, které napomáhají udržovat redukční prostředí kompatibilní s nitrogenasovou aktivitou (Puppo *et al.*, 2013).

Zajímavé je, že exprese genu kódující NADPH oxidasu MtRBOHA (*respiratory burst oxidase homolog A*) z *Medicago truncatula* byla omezena pouze na oblast noduly, která fixuje dusík, přičemž tato exprese přímo koreluje s fixací dusíku, což značí významnou roli tohoto enzymu při symbióze (Marino *et al.*, 2011). Další analýzy odhalily, že NO kontroluje expresi genů zahrnutých v procesu nodulace a chelataci NO dochází k potlačení regulace obranných genů v průběhu tvorby nodul (Boscari *et al.*, 2013).



Obr.20: Detekce ROS a RNS během symbiotické rhizobiální interakce. A,B) Detekce NO pomocí DAF-2 DA; C) Detekce H₂O₂ DAB značením; D) Detekce O₂⁻ značením NBT (převzato z Puppo *et al.*, 2013).

2.5.4 Zapojení RNS a ROS v obranných reakcích rostlin

Další z významných úloh NO v koordinaci s peroxidem vodíku je spuštění hypersenzitivní reakce a programované buněčné smrti v průběhu stresu v infikovaných pletivech (Yun *et al.*, 2011). Analogické reakce vyvolala také elicitace tabákových buněk kryptogeinem (Kulik *et al.*, 2015). Turrion-Gomez a Benito v roce 2011 pozorovali produkci NO *Botrytis cinerea*, přičemž NO difundoval do rostlinných pletiv, kde se účastnil indukce HR a buněčné smrti. Podobně patogen *Magnaporthe oryzae* a *Blumeria graminis* silně produkují NO během tvorby apresoria (Prats *et al.*, 2008; Samalova *et al.*, 2013). Také *Magnaporthe grisea* (patogen rýže) produkuje ROS, které jsou nezbytné v průběhu patogeneze (Egan *et al.*, 2007).

Propojení NO a ROS během obranných reakcí rostlin bylo potvrzeno také studii zaměřenými na stabilní transgenní rostlinné linie exprimující savčí neuronální NO synthasy (nNOS). Tyto linie akumulovaly vysoké hladiny NO a H₂O₂, které korelovaly se zvýšenou rezistencí rostlin vůči SA, JA a ET (Chun *et al.*, 2012, Shi *et al.*, 2012).

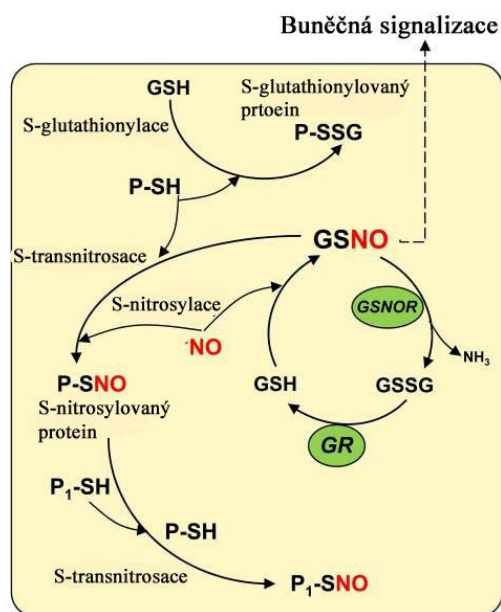
V průběhu rostlinné obranné reakce také dochází k NO-dependentní modulaci produkce ROS. Yun *et al.* v roce 2011 prokázal, že aktivita proteinu AtRBOHD, který je zodpovědný za produkci ROS zaznamenanou po rozpoznání patogenu u *Arabidopsis*, je inhibována S-nitrosylací. Naopak produkce NO je vyžadována pro úplnou indukci akumulace H₂O₂, která následovala po ošetření listových disků *A. thaliana* oligogalakturonidy. Tyto výsledky odhalují úzkou komplexní regulaci NO a ROS signalizace při obranných reakcích rostlin (Rasul *et al.*, 2012).

2.5.5 S-nitrosylace

Působení NO je v rámci rostlinné buňky realizováno buď prostřednictvím přímých interakcí NO s cílovými molekulami, nebo pomocí posttranslačních proteinových modifikací (Bellin *et al.*, 2013). S-nitrosylace proteinů je jednou, v současné době velmi intenzivně studovanou, formou postranslační modifikace proteinové struktury, kdy dochází v reakci s NO nebo s nízkomolekulárními S-nitrosothioly k vazbě NO na thiolovou funkční skupinu cysteinu a tím k ovlivnění proteinové aktivity, lokalizace a protein-proteinových interakcí (Yun *et al.*, 2011). Významnou reakcí je interakce NO s redukováným glutathionem (GSH) za tvorby S-nitrosylovaného glutathionu (GSNO), případně transnitrosylace RNS s GSH. GSNO je schopen také obratem uvolnit NO nebo funguje jako transnitrosylační činidlo – tudíž je považován také za RNS a přirozený zdroj NO. S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) je enzym, který kontroluje hladinu GSNO v buňce tím, že jej redukuje na amoniak a oxidovanou formu glutathionu - GSSG (Cai a Jones, 1998; Liu *et al.*, 2001, Ball *et al.*, 2004) (Obr.21).

Během experimentu s *Arabidopsis*, kvasinkami a myší, které byly deficientní v GSNOR aktivitě, byly prokázány výrazně zvýšené koncentrace nízkomolekulárních S-nitrosothiolů ve srovnání s kontrolními divokými typy (Liu *et al.*, 2001). Také Kwon *et al.* v roce 2012 prokázal při experimentu s *Arabidopsis*, které měly narušenou funkci GSNOR, významně zvýšenou hladinu S-nitrosothiolů. Mimo jiné tyto rostliny vykazovaly vůči divokým typům odlišnosti ve vývoji, imunitě, termotoleranci, což značí, že GSNOR nepřímo kontroluje hladinu biologicky aktivních S-nitrosylovaných proteinů.

Při zvýšené aktivitě GSNOR dochází také ke zvýšené ochraně vůči běžným virulentním mikrobiálním patogenům (Feechan *et al.*, 2005). U bakterií, kvasinek a živočichů byla zaznamenána přítomnost glutathion-dependentní formaldehyd-dehydrogenasy (FALDH; EC 1.2.1.1), která má podobnou funkci jako GSNOR u rostlin (Liu *et al.*, 2001). V roce 2014 prokázal Rodriguez-Serrano *et al.* efekt S-nitrosylace aktinu v peroxisomech listových buněk u *Pisum sativum*, kdy vlivem NO došlo k rozrušení struktury aktinu a tím i cytoskeletu. S-nitrosylace také ovlivňuje enzymovou aktivitu podle Yun *et al.* v roce 2011, který detekoval díky S-nitrosylaci sníženou aktivitu NADPH oxidasy, což vedlo k limitované buněčné smrti v průběhu hypersenzitivní reakce.

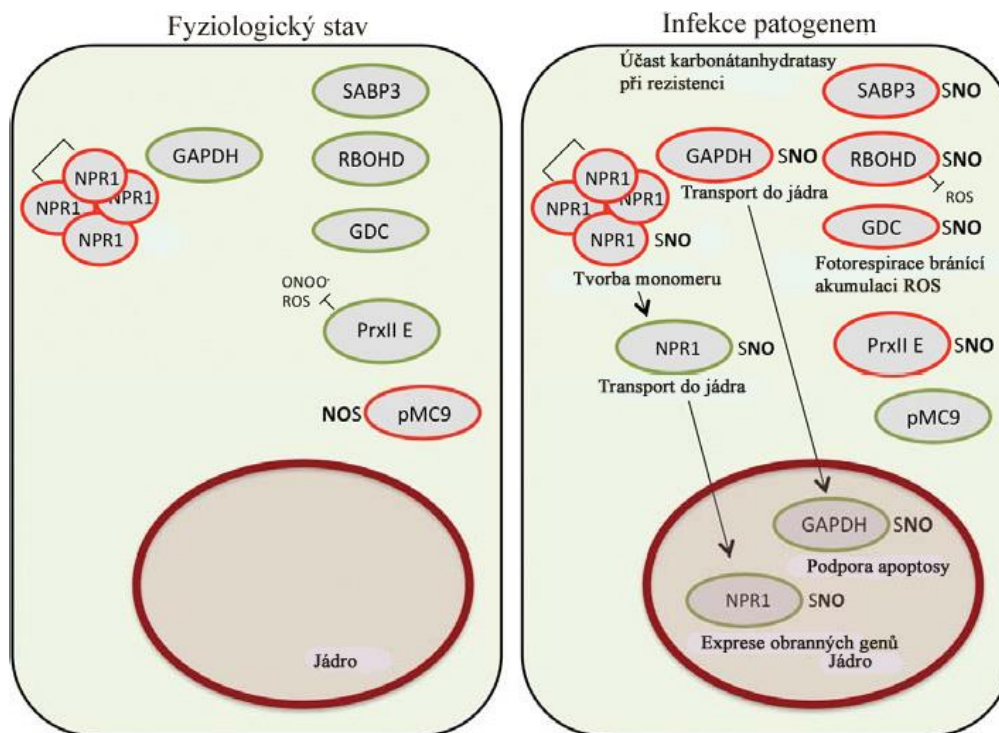


Obr.21: Metabolismus S-nitrosoglutathionu v rostlinných buňkách. Interakce mezi GSH a NO umožňuje produkci GSNO prostřednictvím S-nitrosylace. GSNO může být přeměněn GSNOR na oxidovaný glutathion (GSSG), který je substrátem glutathionreduktasy (GR). GSSG je následně zredukován na redukovaný glutathion (GSH). GSNO jako nejběžnější nízkomolekulární S-nitrosothiol reaguje se sulfhydrylovými (-SH) skupinami proteinů za tvorby vysokomolekulárních S-nitrosothiolů (S-transnitrosace). Tyto S-nitrosothioly mohou přenášet NO na -SH skupinu dalších proteinů (P₁-SH) procesem S-transnitrosace. Naopak GSH také interaguje se specifickými -SH skupinami proteinů v procesu tzv. S-glutathionylace (převzato z Corpas *et al.*, 2013).

2.5.5.1 Role transkripčního kofaktoru NPR1 v průběhu S-nitrosylace

Výzkum genové exprese vlivem NO byl ovlivněn objevem transkripčního kofaktoru NPR1, který funguje jako hlavní regulátor rostlinných imunitních odpovědí a jehož aktivita je regulována pomocí S-nitrosylace, což přispělo k dalšímu studiu signálních funkcí NO (Fu a Dong, 2013). NPR1 jsou stabilizovány v cytosolu prostřednictvím intermolekulárních disulfidových můstků do oligomerů za podpory S-nitrosylace. Působení thioredoxinů naopak umožňuje uvolnění monomerních NPR1, přičemž tento

proces usnadňuje SA, která má významnou roli při vytváření rostlinné imunity (Tada *et al.*, 2008). Rovnováha mezi monomery a oligomery NPR1 je tedy klíčovým bodem vytváření rostlinné imunity (Yu *et al.*, 2014). S-nitrosylace v pozdních fázích rostlinné imunity dále inhibuje vazebný protein SA (SABP3) a aktivitu karbonátanhydrasy (Wang *et al.*, 2009). Translokace NPR1 do jádra je inibována zvýšenou koncentrací cytosolického peroxidu vodíku. NPR1 je tak regulován komplexním působením S-nitrosylace a ROS (Peleg-Grossman *et al.*, 2010) (Obr.22).



Obr.22: S-nitrosylace cysteinu kontroluje aktivitu regulačních proteinů, které se účastní rostlinné obrany, podporou (zelené značení), nebo inhibicí (červené značení) jejich aktivity. a) Za fyziologických podmínek inhibuje S-nitrosylace prometakaspasu 9 (pMC9-cysteinoproteasa, která se účastní HR) a buněčné smrti. b) Vyvolaná produkce NO v průběhu obrany vede k S-nitrosylaci monomeru NPR1 na multimer, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy (GAPDH) (E.C.1.2.1.12), vazebného proteinu kyseliny salicylové (SABP3), peroxiredoxinu II E (PrxII E), RBOHD a glycindekarboxylasového komplexu (GDC). S-nitrosylace NPR1 umožňuje jeho translokaci do jádra a následnou expresi obranných genů. Podobně, S-nitrosylace GAPDH také umožňuje translokaci do jádra. S-nitrosylace SA-vazebného proteinu (SABP3) reguluje vazbu SA a aktivitu karbonátanhydratasy a funguje jako součást negativní zpětnovazebné smyčky v rámci rostlinné imunity. Peroxiredoxin E (PrxII E) se přemění na peroxydisitan. S-nitrosylací proteinu dochází k oslabení jeho aktivity a zvýšení tvorby peroxydisitanu, což umožňuje nitraci tyrosinu (Bellin *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014).

NPR1 se podílí také na potlačení reakcí v cytosolu, které jsou závislé na JA, čímž negativně ovlivňuje interakci mezi SA a JA. Navíc, enzym biosyntézy JA - allenoxidcyklasa (E.C.5.3.99.6) je v průběhu hypersenzitivní reakce S-nitrosylován, což představuje mechanismus regulace hladin oxylipinů (Romero-Puertas *et al.*, 2008). Yang

et al. v roce 2015 prokázal významný aspekt interakce NO a ROS, který spočívá v pozitivní regulaci cytosolické askorbátperoxidasy prostřednictvím S-nitrosylace Cys-32, což vedlo ke zvýšené rezistenci vůči oxidačnímu stresu a pozitivnímu vlivu na imunitní odezvu.

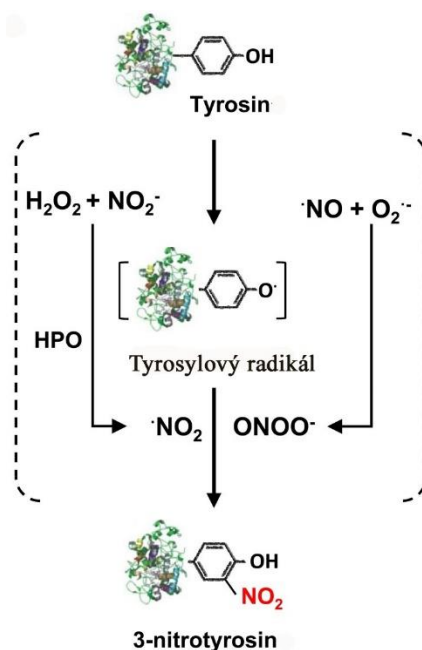
NO ovlivňuje také hormonální působení ET, kyseliny abscisové (ABA) a auxinu. Příkladem je S-nitrosylace methioninadenosyltransferasy (MAT1), jež se účastní biosyntézy ET, čímž dochází k inhibici jeho produkce. Naopak NO aktivuje odpovědi vůči působení auxinu či ABA (Correa-Aragunde, 2004; Wang *et al.*, 2009). NO zaujímá důležité postavení také v případě vzájemné interakce signálních drah JA, SA a abscisové, zejména v případě SA a ABA-dependentní regulace zavírání průduchů v průběhu infekce patogenem (Melotto *et al.*, 2006).

2.5.5.2 Nitrosylace kovů a oxidace Zn-thiolátových komplexů

NO je schopen tvořit reaktivní adukty s ionty přechodných kovů. Mezi nejvíce prostudované komplexy patří hemoproteiny s centrálními ionty železa či síry. Tyto modifikace vyvolávají změnu aktivity proteinů, jak bylo potvrzeno např. u hemoglobinu, katalasy či akonitasy (E.C.4.2.1.3) (Clark *et al.*, 2000). Dalším cílem NO jsou tzv. metalothioniny, což jsou zinek-thiolátové klastry, v tomto případě nitrosylace způsobí uvolnění zinečnatých iontů do cytoplasmy (Croix *et al.*, 2002). Díky nitrosativnímu stresu může také dojít k uvolnění zinku ze Zn-S proteinových klastrů jako jsou Zn-finger transkripční faktory, což vede k ovlivnění genové exprese (Kröncke a Carlberg, 2000).

2.5.6 Nitrace tyrosinu

V průběhu této reakce vloží ONOO⁻ nitroskupinu v ortho pozici do aromatického prstence tyrosinových reziduí (Radi, 2004) (Obr.23). Tato strukturní změna proteinu, která je řízená peroxydusitanem, vyústí také ve změnu funkce proteinu a dále dochází ke zvýšení jeho citlivosti vůči proteolýze důsledkem snížení pK fenolické skupiny nitrotyrosinu z 10,1 na 7,2. (Souza *et al.*, 2000, Abello *et al.*, 2009). Nitrace tyrosinu je považována za selektivní, ale irreverzibilní proces, který je spjatý s patologickým nitrosativním stresem (Ischiropoulos, 2003).

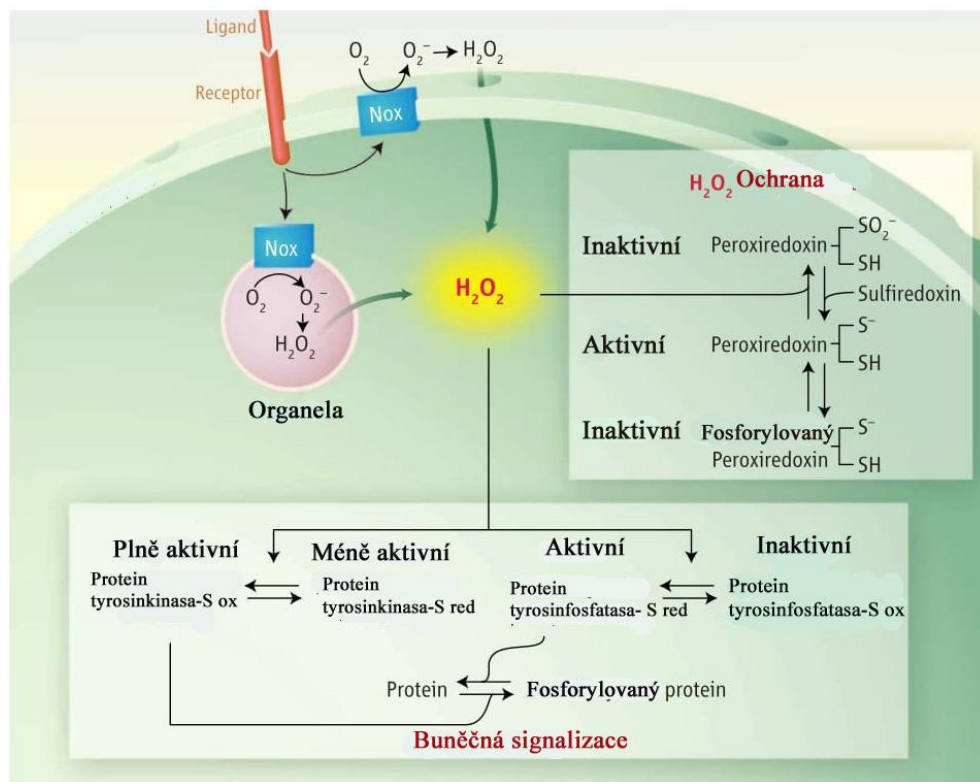


Obr.23: Nitrace tyrosinu zahrnuje dva kroky: oxidaci fenolického prstence tyrosinu na tyrosylový radikál (Tyr \cdot) a přidání NO_2 k Tyr \cdot . Tyrosylový radikál může být produkován několika jednoelektronovými oxidanty jako je NO_2^{\cdot} , OH^{\cdot} , či $CO_3^{\cdot-}$. Existují dvě hlavní nitrační reakce: 1) prostřednictvím peroxydisitanu, který je tvořen rychlou reakcí mezi NO a $O_2^{\cdot-}$; nebo 2) prostřednictvím NO_2 produkovaným reakcí H_2O_2 a NO_2^- v přítomnosti hemoperoxidasy (HPO) (převzato z Corpas *et al.*, 2013).

Tato reakce má značný význam hlavně při vystavení rostlin abiotickému/biotickému stresu, kdy nastává přechodné zvýšení koncentrace nitrovaných proteinů během obranných reakcí, jak zjistil Saito *et al.*, 2006, který detekoval nitrované proteiny o velikost 25 a 50 kDa u tabákových BY-2 buněk, které byly infikované elicitem z *P. infestans*. Monteiro *et al.* v roce 2008 prokázal, že nitrace proteinů se objevuje u rostlin také za běžných fyziologických podmínek, koncentrace těchto proteinů je ale nižší oproti jejich koncentraci ve stresových podmínkách. Chaki *et al.*, v roce 2013 zjistil, že cílem nitrace tyrosinu za vysokých teplot je β -karbonátanhydrasa (E.C.4.2.1.1), která se účastní dodávání CO_2 pro aktivitu Rubisca. Výsledkem modifikace tohoto enzymu je snížení jeho aktivity a ovlivnění fotosyntézy. Z další studie od Corpas *et al.*, z roku 2013 vyplývá, že nitrací NADH-dependentní hydroxypyruvátreduktasy (E.C.1.1.1.81) došlo ke ztrátě její funkce v peroxisomech.

Na nitraci tyrosinu má vliv také působení ROS. Enzym Nox (NADPH oxidasa, RBOHD) je aktivován v případě, kdy se ligand naváže na receptor plasmatické membrány a poté vytváří $O_2^{\cdot-}$. Prostřednictvím SOD je superoxidový anion přeměněn na peroxid vodíku a ten je následně importovaný do cytosolu, kde reaguje s dvěma enzymy. První z nich je tyrosinkinasa (E.C.2.7.10.2), která fosforyluje proteiny obsahující ve své

molekule tyrosin. Reakcí tyrosinkinasy s H_2O_2 dochází k její aktivaci. Zároveň reaguje peroxid vodíku s tyrosinfosfatou (E.C.3.1.3.48), která naopak odstraňuje fosfátovou skupinu z proteinů, které obsahují tyrosin. Touto reakcí tak dochází k inaktivaci tyrosinfosfatasy (Rhee, 2006) (Obr.24).



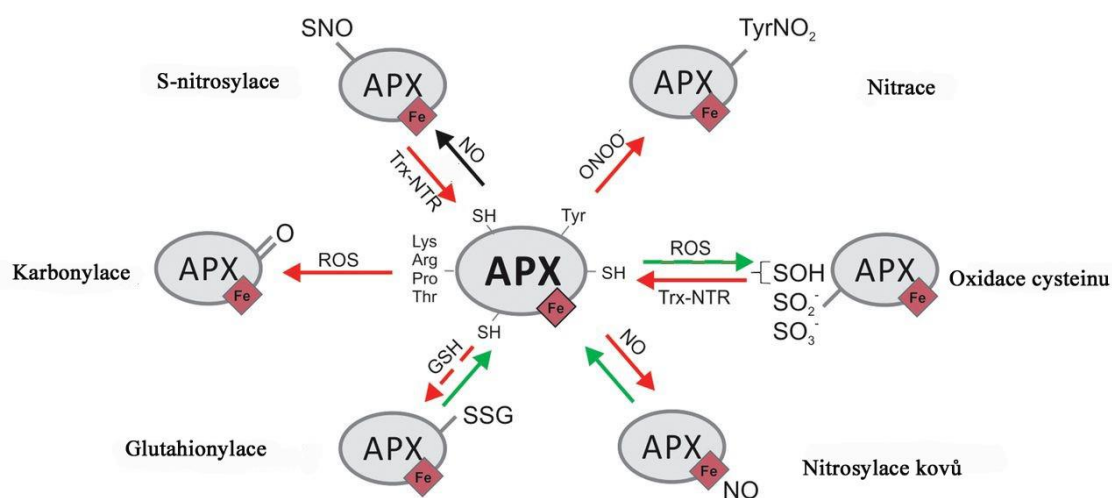
Obr.24 Produkce, ochrana a signální aktivita peroxidu vodíku. Aktivace řady buněčných receptorů aktivuje NADPH oxidasu (Nox), která je situována na plasmatické membráně nebo v membránových organelách jako jsou endosomy, kde produkuje H_2O_2 . Aby H_2O_2 mohl fungovat jako intracelulární signální molekula, musí být transportován do cytosolu. Zde zvyšuje tyrosinovou fosforylaci proteinu prostřednictvím inaktivace protein tyrosinfosfatasy, zatímco aktivuje protein tyrosinkinasy. Přečasná ochrana signálu peroxidu vodíku z bohatého cytosolického peroxiredoxinu vyústí z reverzibilní inaktivace těchto enzymů pomocí hyperoxidace či fosforylace (převzato z Rhee, 2006).

2.5.7 Vliv posttranslačních modifikací na enzymovou aktivitu

Ovlivnění enzymové aktivity posttranslačními modifikacemi bylo studováno na příkladu APX (Obr.25). Proteomická analýza ukázala, že cytosolická APX (cAPX) je cílem thioredoxinů (TRX) (Marchand *et al.*, 2004). Inkubací cAPX a TRX *in vitro* se aktivita cAPX prudce snížila, což naznačuje, že v aktivní formě cAPX je aspoň jeden cystein oxidován. Tento cystein může být dále reverzibilně redukován thioredoxiny na S-nitrosothioly (SNOs) nebo kyselinu sulfonovou (SOH), čímž dochází ke snížení enzymové aktivity. Také po ošetření APX reductanty, jako je glutathion či dithiothreitol,

byla zaznamenána snížená aktivita APX (Gelhaye *et al.*, 2006). Také karboxylace cAPX z *Antiaris toxicaria* vedla k irreverzibilnímu snížení enzymové aktivity (Bai *et al.*, 2011).

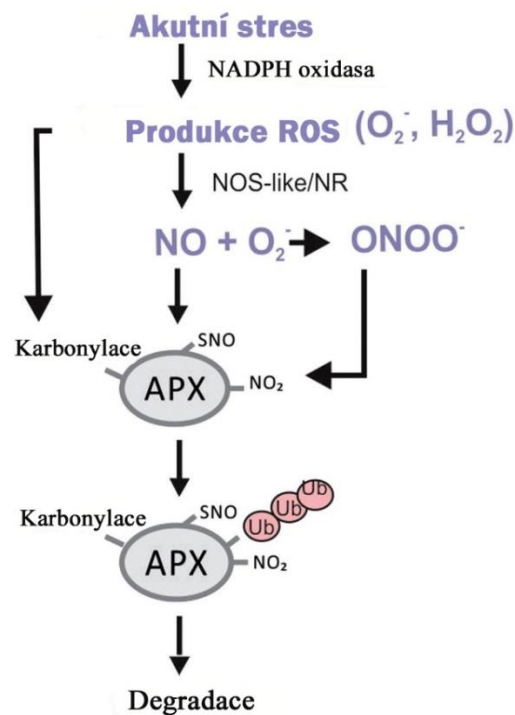
Clark *et al.* v roce 2000 detekoval sníženou aktivitu tabákové APX, ke které došlo vazbou NO na hem jako prostetickou skupinu. Podobně Lozano-Juste a León v roce 2011 potvrdil nitraci tyrosinových zbytků cAPX z *Arabidopsis*. Také Tanou *et al.* v roce 2012 detekoval nitrovanou cAPX v kořenech citrusu, který byl vystaven salinitě. Begara-Morales *et al.* v roce 2013 prokázali, že nitrace tyrosinu cytosolické askorbátperoxidasy vyvolá inhibici enzymu, což potvrzuje komplexní roli NO a ROS interakcí. Tato modifikace vzniká na Tyr5 a Tyr235, což vyústilo v inhibici aktivity hráškové cAPX (Begara-Morales *et al.*, 2013). V případě S-nitrosylace cAPX byly získány rozporuplné výsledky. In vivo S-nitrosylovaná cAPX ze semen *A. toxicaria* je díky této modifikaci chráněná před karboxylací a zároveň i aktivita enzymu je v průběhu klíčení zvýšená (Bai *et al.*, 2011). Tuto studii podporuje i výzkum Begara-Morales *et al.*, z roku 2013, který zaznamenal zvýšenou aktivitu hráškové cAPX v průběhu solného stresu.



Obr.25: Posttranslační modifikace cAPX vyústí v řadu redoxně-založených regulací enzymové aktivity. Nadbytek ROS vyústí v karboxylaci APX. NO nitrosyluje Cys-32, nebo vytváří kovové adukty s železem nebo hemem. Peroxydisitan nitruje Tyr 5 a Tyr 235 cytosolické APX z hrášku. Některé oxidativní formy cysteinových zbytků u APX jsou reverzibilní a mohou být redukovány thioredoxin-NADPH-thioredoxinreduktasou (E.C.1.8.1.9). Glutathion (GSH) může glutathionylovat cysteinové zbytky, čímž potlačí aktivitu APX. *Legenda:* Červené linie značí inhibici enzymové aktivity, zelené linie značí naopak aktivaci. Černé linie značí rozporuplné údaje o tom, zda S-nitrosylace ovlivní aktivitu APX (převzato z Correa-Aragunde *et al.*, 2015).

K S-nitrosylaci cAPX také dochází při teplotním šoku v průběhu programované buněčné smrti, jak bylo prokázáno u BY-2 tabákových buněk. Během tohoto experimentu byla popsána inhibice enzymové aktivity prostřednictvím S-nitrosylace, ubiquitinace

a degradace cAPX během teplotního šoku a aplikace H_2O_2 , které vedou k PCD či její degradaci v proteasomu (De Pinto *et al.*, 2013) (obr.27).



Obr.27: ROS a RNS produkované při akutních fyziologických stresech (sucho, teplotní šok, zasolení a PCD) vedou k degradaci APX. APX je cílem mnoha redoxních modifikací jako je S-nitrosylace, nitrace a karbonylace, které ovlivňují aktivitu enzymu. Tyto redoxně-řízené posttranslační modifikace mohou být signály určující ubikvitinaci APX a její degradaci v proteasomu (převzato z Correa-Aragunde *et al.*, 2015).

Regulace enzymové aktivity prostřednictvím NO byla dále demonstrována experimentem od Martinez *et al.* v roce 2014, kdy všechny tři isoformy SOD z různých eukaryotních organismů podléhaly enzymové inaktivaci způsobené peroxydusitanem řízenou nitrací. Sehrawat *et al.* v roce 2013 prokázal výrazné zvýšení aktivity SOD po aplikaci S-nitrosoglutathionu. Holzmeister *et al.* v roce 2015 zjišťoval změny v aktivitě isoenzymů SOD z *A. thaliana* při působení posttranslačních modifikací. Prokázal, že S-nitrosylace neovlivnila výrazně aktivitu SOD, zatímco nitrace inhibovala aktivitu Mn-SOD1, Fe-SOD3 a CuZn-SOD3, aktivita ostatních isoenzymů se nezměnila.

Při experimentech s rostlinnou katalasou bylo prokázáno, že nitrace i S-nitrosylace inhibuje enzymovou aktivitu (Clark *et al.*, 2000; Ortega-Galisteo *et al.*, 2012). Pomocí proteomické analýzy bylo zjištěno, že katalasa podléhá intenzivní nitraci v průběhu dozrávání plodů pepře, důsledkem toho se snižuje její enzymová aktivita

a schopnost odstraňovat peroxid vodíku, což odpovídá zvýšenému oxidativnímu metabolismu v tomto procesu (Chaki *et al.*, 2015).

2.5.8 Regulace askorbát-glutathionového cyklu prostřednictvím nitrace tyrosinu

Proteomické analýzy identifikovaly všechny enzymy askorbát-glutathionového cyklu jako potenciálně nitrovatelné proteiny (Tanou *et al.*, 2012) (obr.28). Begara-Morales *et al.* v roce 2015 odhalil cílové tyrosinové zbytky pro nitraci a potenciální změny v aktivitě antioxidantních enzymů v tomto cyklu, ke kterým došlo díky posttranslačním modifikacím. Prokázal, že cytosolická APX z hrášku je důsledkem nitrace inaktivovaná, což ohrožuje funkci askorbát-glutathionového cyklu při detoxifikaci ROS.

Podle dalších výzkumů Begara-Morales *et al.* z roku 2015 řídí peroxydusitan nitraci rekombinantní hráškové MDHAR v místě Tyr213, Tyr292 a Tyr345, což vyvolá inhibici enzymové aktivity. Tato inhibice může narušit regeneraci askorbátu a omezit funkci askorbát-glutathionového cyklu. Dále prokázal místně-cílenou mutagenézí že hlavním cílem nitrace u MDHAR je Tyr345, protože je umístěn ve vzdálenosti 3,3 Å od His313, který se účastní vazby NADP, což znamená, že nitrace Tyr345 může změnit pozici kofaktoru, což vede ke snížení proteinové aktivity.

Jako další cíl nitace tyrosinu byla identifikovaná glutathionreduktasa (Chaki *et al.*, 2009). U živočichů inhibuje peroxydusitan aktivitu lidské a hovězí GR nitrací Tyr106 a Tyr114, které leží v sekvenci poblíž vazebného místa pro GSSG (Savvides *et al.*, 2002). Zajímavé je, že u chloroplastových a cytosolických GR z hrášku nebyla detekovaná po nitraci žádná výrazná změna v aktivitě enzymu, což je neobvyklé vzhledem k předpokládanému snížení/ztrátě aktivity (Chaki *et al.*, 2013; Begara-Morales *et al.*, 2015).

2.5.9 Regulace askorbát-glutathionového cyklu prostřednictvím S-nitrosylace

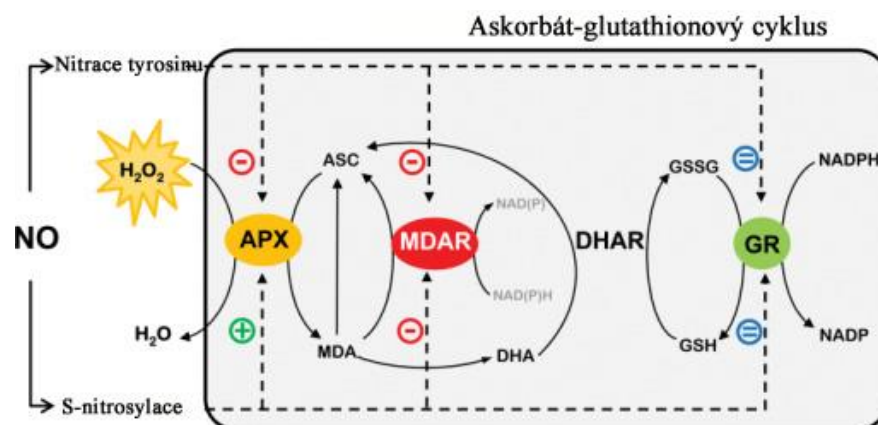
Studie Tanou *et al.* z roku 2012 a Begara-Morales *et al.* z roku 2015 prokázaly, že všechny enzymy askorbát-glutathionového cyklu mohou podléhat S-nitrosylaci, která ovlivní jejich aktivitu (obr. 27).

Nejlépe prostudovaným enzymem z hlediska regulace askorbát-glutathionového cyklu je askorbátperoxidasa. Correa-Aragunde *et al.* v roce 2013 naznačil, že APX1 z *A. thaliana* podléhá S-nitrosylaci in vivo a auxiny-řízená denitrosylace poté snižuje aktivitu enzymu; tento efekt byl potvrzen také ošetřením APX1 rekombinantním proteinem CysNO. Také De Pinto *et al.* v roce 2013 prokázal inhibici tabákové APX

vlivem S-nitrosylace pomocí GSNO. *In silico* analýzou bylo zjištěno, že cílem S-nitrosylace je Cys168. V průběhu S-nitrosylace totiž vzniká železnato-nitrosylový komplex mezi NO a hemovou skupinou železnatého iontu. Cys168 leží v blízkosti hemové skupiny a proto je schopný snadno interagovat a zároveň je tak zodpovědný za inaktivaci enzymu což ohrožuje činnost askorbát-glutathionového cyklu (De Pinto *et al.*, 2013).

Fares *et al.* v roce 2011 detekoval S-nitrosylovanou dehydroaskorbátreduktasu na Cys20 z *A. thaliana* za fyziologických podmínek. Také Kato *et al.* v roce 2013 prokázal S-nitrosylaci DHAR na Cys20 a Cys147 z bramboru, přičemž tato modifikace negativně ovlivňuje enzymovou aktivitu. Begara-Morales *et al.* v roce 2015 prokázal, že S-nitrosylace rekombinantní peroxisomální MDHAR z hrášku také inhibuje aktivitu enzymu. Během této studie bylo také prokázáno *in silico* a za pomoci evoluční analýzy že Cys68 je nejvhodnějším cílem pro S-nitrosylaci způsobenou aplikací GSNO. Inhibice DHAR a MDHAR způsobená S-nitrosylací Cys68 a Cys 197 tak může omezit regeneraci askorbátu v askorbát-glutathionovém cyklu a tím znemožnit jeho správnou funkci.

Dalším S-nitrosylovaným enzymem, jemuž byly věnované vědecké studie je glutathionreduktasa. Begara-Morales *et al.* v roce 2015 prokázal, že S-nitrosylace chloroplastové a cytosolické GR z hrášku prostřednictvím GSNO nezpůsobí výrazné změny v enzymové aktivitě, ve srovnání s nitrací tohoto enzymu. Naopak S-nitrosylace savčí GR pomocí GSNO vyústí v inhibici enzymové aktivity, jak popsali Beltrán *et al.* v roce 2000. Podobně i lidská GR je inhibovaná S-nitrosylací Cys 58 a Cys 63 prostřednictvím GSNO (Becker *et al.*, 1995).



Obr.27: Regulace askorbát-glutathionového cyklu pomocí NO. NO řídí askorbát-glutathionový cyklus prostřednictvím posttranslačních modifikací jako je nitracce tyrosinu a S-nitrosylace APX a MDHAR. Aktivita MDHAR je snížena v případě obou modifikací, aktivita APX se působením nitracce tyrosinu sníží, ale působením S-nitrosylace se zvýší. Aktivita GR se působením modifikací významně nemění. To značí, že APX a GR detoxifikují H₂O₂ a regenerují GSH, čímž udržují rezistenci cyklu vůči nitrosačnímu stresu (převzato z Begara-Morales *et al.*, 2015).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Akrylamid/bis-akrylamid (Sigma, USA); L-askorbát (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), 4-chlor-1-naftol (Sigma, USA); bromfenolová modř (Acros Organics, Belgie); diaminobenzidin (DAB), dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR); Evansova modř (Fluka, Švýcarsko); hydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR); dithiothreitol (Sigma, USA); etanol (Lach-Ner, ČR); fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Fluka, Švýcarsko); glycerol bezvodý (Sigma, USA); guajakol (Rusko), hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma, USA); hydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR); kyselina mléčná (Lach-Ner, ČR); kyselina octová (Lach-Ner, ČR); methanol (Sigma, USA); n-butanol (Sigma, USA); *N, N, N', N'*-tetramethylethyldiamin (TEMED) (Fluka, Švýcarsko); nitrotetrazoliová modř (Sigma, USA); peroxid vodíku (Lach-Ner, ČR); persíran sodný (APS) (Fluka, Švýcarsko); polyvinylpyrrolidon (PVPP) (Fluka, Švýcarsko), rekombinantní proteiny: Inf1, Inf1 V13K/A14T, Inf1 V84F, Cryβ X24, Cryβ K13V, Cryβ V84F (byly poskytnuty doc. Mgr. Janem Lochmanem, Ph.D. z Ústavu biochemie MU, Brno); Tris HCl (MP Biomedicals, Francie).

3.2 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); digitální pH metr WTW 526 (InoLab, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); dokumentační zařízení BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP, USA); elektroforetické komůrky (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka IKA (Labortechnik, Německo); exsikátor (Kavalierglass, Česká republika); EZ Imager (Bio-rad, USA); chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek instruments, USA); světelný mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko); třepačka Mixing Block MB-102 (BIOER technology, Čína); vortex (Biosan, USA); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA).

3.3 Rostlinný materiál

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

- *S. lycopersicum* cv. Amateur – citlivý genotyp

- *S. lycopersicum* cv. MicroTom – rezistence není dosud určena
- *S. chmielewskii* – středně rezistentní genotyp
- *S. habrochaites* – rezistentní genotyp

Semena jednotlivých genotypů byla zaseto do perlitu a po vyklíčení děložních listů přesazena do květináčů se zahradnickou zeminou. Ve stáří 6-8 týdnů byly rostliny použity pro experimentální zpracování. Rostliny byly pěstovány ve skleníku při 25°C.

3.4 Patogen

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

3.5. Metody

3.5.1 Příprava rostlinného materiálu – elicitace listů s následnou inokulací patogenem *Pseudoidium neolycopersici*.

V rámci přípravy rostlinného materiálu byly použity pravé listy čtvrtého rostlinného patra ze všech čtyř genotypů. Listy byly ponořeny do kádinky s roztokem 500 nM elicitinu (Cryβ, Cryβ K13V, Cryβ V84F, Inf1, Inf1 V13K, Inf1 V84F). Jako kontrola sloužil list, který byl ponořen do destilované vody. Další kontrolou byl list bez aplikace elicitinu/destilované vody. Nasávání probíhalo v exsikátoru pod vakuem po dobu 15 minut. Pro zvýšení úspěšnosti nasávání elicitinů/vody do listů bylo provedeno do každého listu 6 vpichů ostrou jehlou. Následně byly listy umístěny v Petriho miskách ve fytotronu při teplotě 18-20°C a světelném režimu 12/12 h (den/noc). Řapík listu byl obalen vlhkou vatou. 48 h po elicitaci byly na jedné třetině vzorků (kontrolních i ošetřených elicitinem) fotograficky zdokumentovány pozorované změny na listech a poté byly listy zmrazeny tekutým dusíkem a uchovány při -80°C pro následující experimenty nebo byly tyto listy použity pro histochemickou detekci produkce a lokalizace ROS. Druhá třetina vzorků byla nainokulována patogenem *P. neolycopersici* metodou listového

otisku. Tyto listy stejně jako zbývající část listů (tj. poslední třetina vzorků – neinokulovaná patogenem) byly nadále umístěny v Petriho miskách ve fytostronu při teplotě 18-20°C a světelném režimu 12/12 h (den/noc) po dobu dalších 48 h. Na závěr experimentu, tj. po 4 dnech od aplikace elicitinů, byly fotograficky zdokumentovány pozorované změny na listech. Z části listů inokulovaných patogenem *P. neolycopersici* byly připraveny listové disky, které byly následně použity pro fytopatologické vyhodnocení vývoje patogenu.

3.5.2 Příprava listových disků pro fytopatologickou studii vlivu aplikace elicitinů na vývoj patogenu *Pseudoidium neolycopersici*.

Listy jednotlivých genotypů *Solanum* spp. byly inokulované patogenem metodou listového otisku. Jako zdroj patogenu byly použity listy *S. lycopersicum* cv. Amateur, jejichž povrch byl z 90-100 % pokrytý bílým myceliem rajčatového padlí. 48 h po inokulaci byly připraveny pomocí korkovrtu listové disky o průměru 12 mm. Disky byly následně uloženy do skleněných flakonek s ledovou kyselinou octovou po dobu dvou dní. Po uplynutí této doby byly disky důkladně propláchnuty destilovanou vodou a inkubovány 10 minut s 1 % Evansovou modří. Následně byly listy přeneseny do glycerolu a postupně mikroskopicky vyhodnoceny.

3.5.3 Fytopatologické zhodnocení vývoje patogenu *Pseudoidium neolycopersici*

Připravené listové disky inokulované patogenem *P. neolycopersici* byly vyhodnoceny pomocí světelného mikroskopu (200x zvětšení). Na každém disku bylo vyhodnoceno 100 konidii. Hodnotil se procentuální počet naklíčených a nenaklíčených konidií, délka a počet klíčnicích vláken.

3.5.4 Lokalizace produkce reaktivních forem kyslíku

Po 48 h od elicítace byla jedna sada listů rajčatových genotypů ponořena do Petriho misek s čerstvým 2,5 mM roztokem DAB, zatímco druhá sada do Petriho misek s čerstvým 2 mM roztokem NBT. Jako kontrola sloužily listy ponořené do 10 mM roztoku kyseliny askorbové. Pro zvýšení infiltrace roztoků do pletiv byly Petriho misky vloženy na 5 minut do exsikátoru, kde probíhalo nasávání pod vakuem. Poté byly listy v Petriho miskách inkubovány s uvedenými roztoky po dobu 2 h. Po uplynutí inkubační doby byly listy důkladně propláchnuty destilovanou vodou a následně ponořeny do odbarvovacího roztoku (ethanol: kyselina mléčná: glycerol = 4:1:1) po dobu 20 minut při

80°C. Po odbarvení byly listy vloženy do Petriho misek a uchovány v glycerolu. Pozorované barevné změny byly fotograficky a mikroskopicky dokumentovány.

3.5.5 Příprava extraktů

Listy jednotlivých genotypů *Solanum* spp., které byly zamrazené kapalným dusíkem a uchovávané při teplotě -80°C byly homogenizovány v třecí misce v tekutém dusíku a vzniklý prášek byl rozvážen na analytických vahách na alikvoty, které byly dále uchovávány při teplotě -80°C. K jednotlivým alikvotům byl přidán 0,1 M K-fosfátový pufr, pH 7 v poměru 1:4 (w/v). Extrakty byly centrifugovány po dobu 20 minut, při 16 000 g a při teplotě 4°C. Při přípravě vzorků pro nativní elektroforézu byl supernatant smíchan s 60 % glycerolem v poměru 3:1.

Extrakční pufr: 0,1 M K-fosfátový pufr, pH 7; 1 % PVPP; 2 mM DTT; 0,5 mM pefabloc; 2 mM EDTA

3.5.6 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy

Aktivita APX byla měřena na mikrodestičkovém readeru v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. V průběhu měření byl zaznamenán při oxidaci askorbátu pokles absorbance při vlnové délce 290 nm. Reakční směs v jamce obsahovala: 125 μ l 0,1 M K-fosfátového reakčního pufru, pH 7; 72 μ l 3,5 mM askorbátu a 15 μ l rostlinného extraktu. Reakce byla odstartována přidávkem 38 μ l 10 mM peroxidu vodíku. Absorbance byla měřená při vlnové délce 290 nm po dobu 3 minut ($\epsilon = 39,4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Ve slepém vzorku byla na místo rostlinného extraktu přidána destilovaná voda. Roztok peroxidu vodíku i askorbátu byl vždy připraven čerstvý.

3.5.7 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy

Aktivita GPX byla stanovena modifikovanou guajakolovou metodou měřením na mikrodestičkovém readeru v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Byla připravena směs reakčního pufru a guajakolu. Reakční směs v jamce obsahovala: 155 μ l směsi 0,1 M K-fosfátového pufru pH 7 a 8 M guajakolu. K této směsi bylo přidáno 10 μ l 10x ředěného vzorku. Reakce byla odstartována přidáním 10 μ l 2 M peroxidu vodíku. Měření nárůstu absorbance probíhalo po dobu 2 minut při vlnové délce 436 nm ($\epsilon = 4500 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Směs reakčního pufru a guajakolu: k 9859 μl 0,1 M K-fosfátového pufru pH 7 bylo přidáno 141 μl 8 M guajakolu

3.5.8 Detekce peroxidase aktivity metodou nativní gelové elektroforézy

Aktivita peroxidase byla detekována elektroforézou na polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek. Touto metodou lze detekovat proteiny na základě jejich odlišné pohyblivosti v elektrickém poli. Byl připravený 10 % dělicí gel (pH 8,8) a 4 % zaostřovací gel (pH 6,8) dle Tab.7. Během přípravy gelů byly použity 0,75 mm spacery. Rostlinný extrakt byl smíchán s 60 % glycerolem v poměru 3:1. Do každé jamky gelu bylo vneseno 20 μl připraveného vzorku, do krajní jamky bylo aplikováno 5 μl bromfenolové modři. Elektroforéza probíhala v průběhu prvních 15 minut při napětí 120 V, po doputování zóny bromfenolové modři na rozhraní obou gelů bylo napětí na zdroji zvýšeno na 180 V (cca 50 minut). Isoenzymy peroxidase byly vizualizovány pomocí barvicí směsi s 4-chlor-1-naftolem v přítomnosti peroxidu vodíku. Poté byly výsledné gely zdokumentovány pomocí Biospectrum AC Chemi 410 (UVP, USA) a programu ImageLab.

Tab.7: Složení dělicího a zaostřovacího gelu (objemy jsou uvedeny v ml):

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

Roztok bromfenolové modři: 1 mg bromfenolové modři rozpustit v 5 ml vody, k 2 ml roztoku bromfenolové modři přidat 1 ml 60 % glycerolu

Elektrodový pufr: 0,025 M Tris/HCl, 0,192 M glycin, pH 8,3

Barvicí roztok: 12,5 ml 0,1 M K-fosfátový pufr pH 7; 3 mg 4- chlor-1- naftolu rozpustit v 2,5 ml vychlazeného metanolu; 20 μl 30 % H_2O_2

3.5.9 Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů bylo prováděno na mikrodestičkovém readeru v 96 jamkové destičce. Do jamek bylo pipetováno 45 μl destilované vody, 5 μl standardu BSA nebo vzorku a 200 μl činidla Bradfordové. Roztok činidla byl připraven ředěním

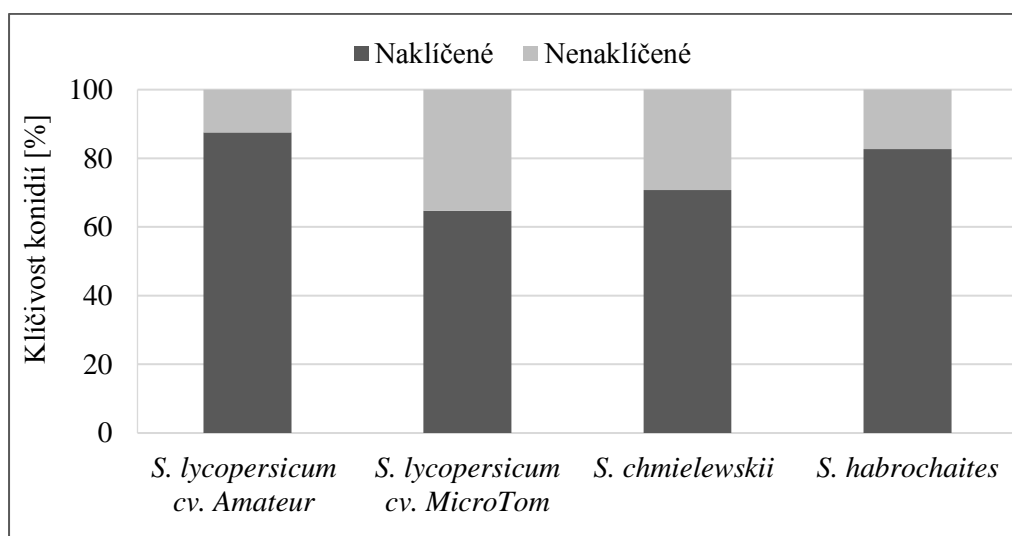
zásobního roztoku Coomassie Brilliant Blue (50 mg Coomassie Brilliant Blue G250; 25 ml 95 % metanolu a 50 ml 85 % kyseliny fosforečné). Po 10 minutách byla stanovena absorbance při vlnové délce 595 nm. Jako kalibrační standardy byly použity roztoky BSA v koncentracích 0,2-1,8 mg/ml.

4. VÝSLEDKY

4.1 Fytopatologická studie srovnání vývoje patogenu *Pseudoidium neolycopersici* na genotypech *Solanum spp.*

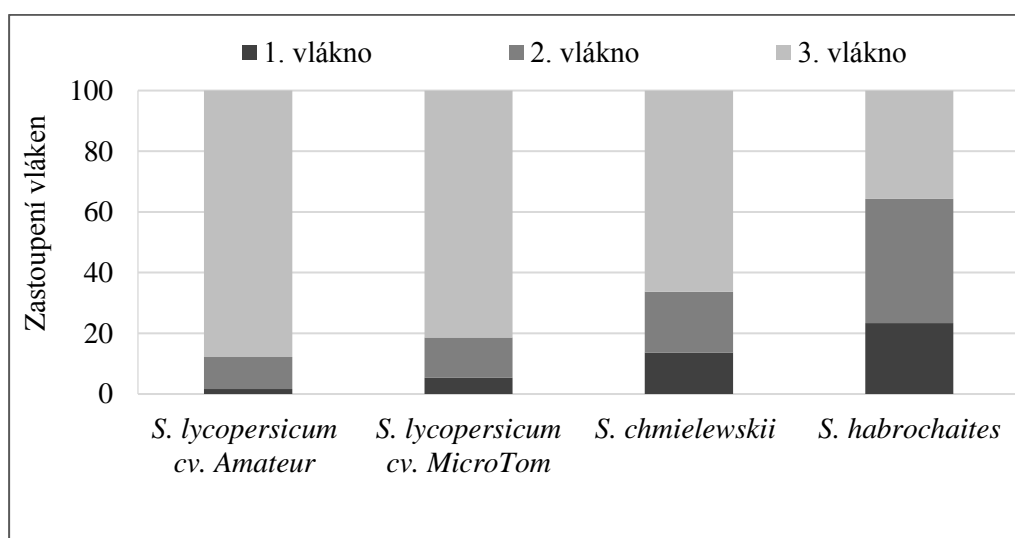
Prvním cílem experimentální části diplomové práce bylo porovnat vývoj patogenu *P. neolycopersici* na listových discích jednotlivých genotypů *Solanum spp.* Vývojový stav patogenu *P. neolycopersici* byl vyhodnocen 48 h po inokulaci listových disků na základě stanovení zastoupení konidií s jedním, dvěma a třemi vlákny, průměrné délky klíčících vláken a klíčivosti konidií. Grafické vyhodnocení stanovených parametrů je doplněno fotodokumentací konidií patogenu na listových discích.

Při procentuálním stanovení klíčivosti konidií bylo dle očekávání zjištěno nejvíce naklíčených konidií u citlivého kultivaru *S. lycopersicum* cv. Amateur (88 %), překvapivě velký počet naklíčených konidií byl zaznamenán také u rezistentního genotypu *S. habrochaites* (83 %) (Obr.28). Méně naklíčených konidií bylo detekováno u genotypu *S. chmielewskii* (71 %) a nejnižší zastoupení naklíčených konidií bylo detekováno u kultivaru *S. lycopersicum* cv. MicroTom (65 %) (Obr.28).



Obr.28: Srovnání klíčivosti konidií *P. neolycopersici* 48 hpi na listových discích jednotlivých genotypů *Solanum spp.*. Tmavá barva znázorňuje % klíčících konidií.

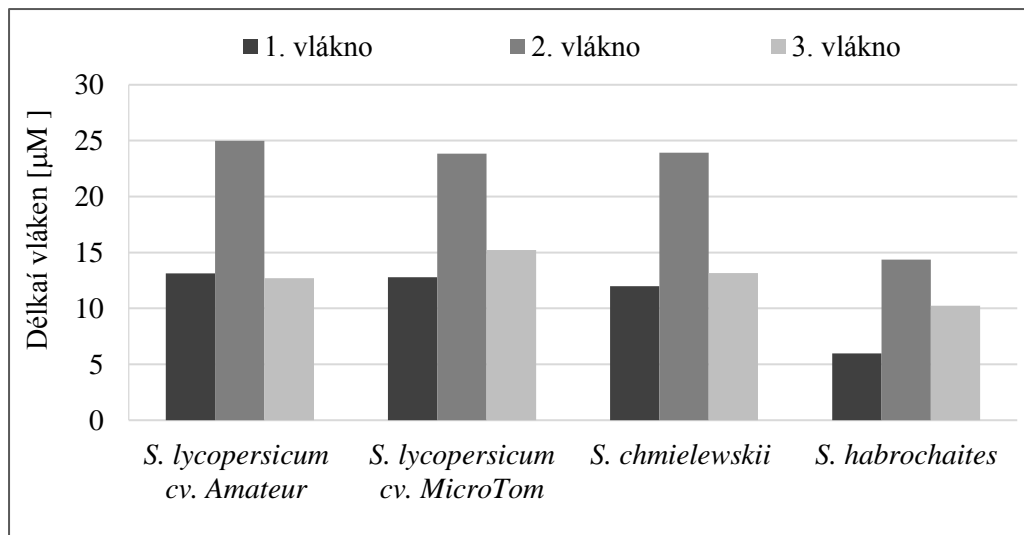
Nejnižší zastoupení konidií s třemi vlákny (36 %) ve srovnání s vývojem patogenu na ostatních genotypech *Solanum* spp., bylo detekováno na listových discích rezistentního genotypu *S. habrochaites* (Obr.29). Zároveň u tohoto genotypu mělo přibližně 23 % konidií vyvinuté pouze první klíčící vlákno a 41 % konidií mělo vyklíčená dvě vlákna. Naopak minimum konidií s 1 vláknem, tj pouze 2 %, bylo zaznamenáno u citlivého kultivaru *S. lycopersicum* cv. Amateur. V případě tohoto kultivaru bylo detekováno také největší zastoupení konidií se třemi klíčovými vlákny (88 %) a pouze 10 % konidií s dvěma vlákny (Obr.29). U kultivaru MicroTom *S. lycopersicum* v porovnání s kultivarem Amateur bylo zastoupení konidií s vyvinutými třemi klíčovými vlákny nižší (81 %) a naopak počet konidií s jedním (5 %) nebo dvěma vlákny (14 %) vyšší (Obr.29). U středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* bylo detekováno 14 % konidií, které měly vyklíčené pouze první vlákno, 20 % konidií mělo naklíčené dvě vlákna a 66 % konidií mělo vyvinutá všechna tři vlákna (Obr.29). Z těchto výsledků je zřejmé, že 48 hpi je vývoj patogenu nejrychlejší u obou kultivarů *S. lycopersicum* cv. Amateur a cv. MicroTom a nejpomalejší na rezistentním genotypu *S. habrochaites*. Vývoj patogenu u genotypu *S. chmielewskii* je oproti *S. lycopersicum* zpomalen.



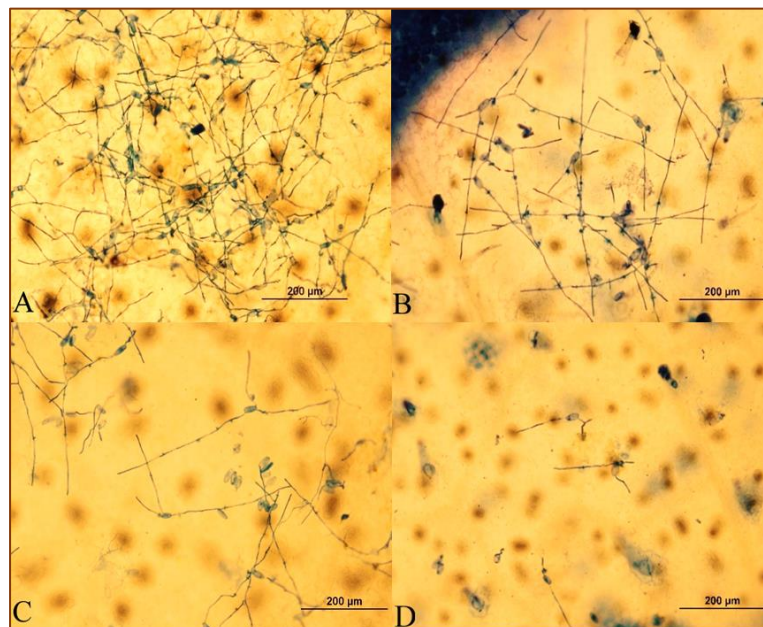
Obr. 29 Zastoupení konidií s jedním, dvěma a třemi klíčovými vlákny patogenu *P. neolycopersici* 48 hpi na listových discích jednotlivých genotypů *Solanum* spp. Procentové zastoupení konidií s 1 vláknem (černá část sloupce), s 2 vlákny (tmavě šedá část sloupce), s 3 vlákny (světle šedá část sloupce).

Průměrná délka klíčících vláken byla nejnižší na po inokulaci genotypu *S. habrochaites*, kdy dosahovala u prvního vlákna 6 μm , v případě nejdelšího vlákna 14 μm a u třetího vlákna 10 μm . Délky jednotlivých vláken konidií *P. neolycopersici*

48 hpi ostatních tří genotypů *Solanum* spp. se významně nelišily. Délka prvního klíčního vlákna byla srovnatelná (12-13 μm) (Obr.30, 31). V případě druhého (nejdelšího) klíčního vlákna byla délka 24-25 μm a průměrná délka třetího klíčního vlákna byla 13-15 μm (Obr.30, 31). U *S. lycopersicum* cv. MicroTom byla délka třetího vlákna v rámci testovaných genotypů největší (15 μm) (Obr.30, 31).



Obr.30: Průměrná délka klíčnicích vláken patogenu *P. neolycoopersici* 48 hpi na listových discích jednotlivých genotypů *Solanum* spp.. Délka 1. klíčního vlákna (černý sloupec), 2. klíčního vlákna (tmavě šedý sloupec) a 3. klíčního vlákna (světle šedý sloupec).

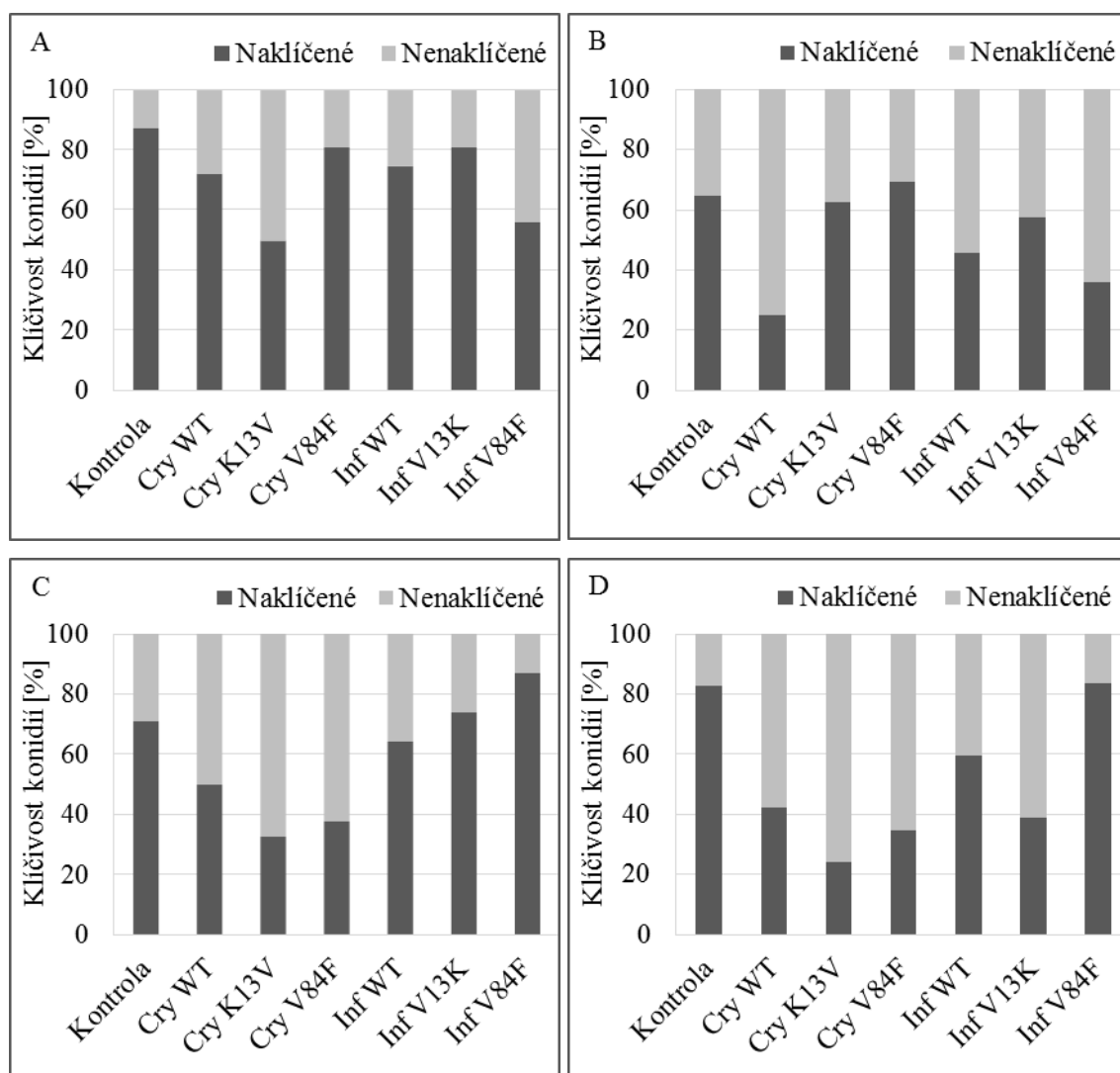


Obr.31: Konidie patogenu 48 hpi na listových discích genotypu. A) *S. lycopersicum* cv. Amateur, B) *S. lycopersicum* cv. MicroTom, C) *S. chmielewskii*, D) *S. habrochaites*.

4.2 Fyziologický efekt elicitace na vývoj patogenu – fytopatologická studie

Dalším úkolem experimentální části diplomové práce bylo studium efektu elicitace rostlin Cry β a Inf1 (pozn. dále v textu pro jsou používány zjednodušené zkratky Cry a Inf) včetně jejich mutančních forem na vývoj patogenu *P. neolyopersici* na listech vybraných genotypů *Solanum* spp.. Rostliny byly inokulované patogenem 48 h po elicitaci. Vývoj patogenu byl vyhodnocen 48 hpi. Vliv elicitinů na vývoj *P. neolyopersici* byl vyhodnocen na základě stanovení zastoupení konidií s jedním, dvěma a třemi vlákny, průměrné délky klíčících vláken a klíčivosti konidií.

Snížení klíčivosti bylo pozorováno po aplikaci všech elicitinů u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur (Obr.32A). Nejnižší klíčivost spor *P. neolyopersici* byla zaznamenána po aplikaci Cry K13V (50%) a Inf V84F (44%) ve srovnání s kontrolním experimentem (88%).



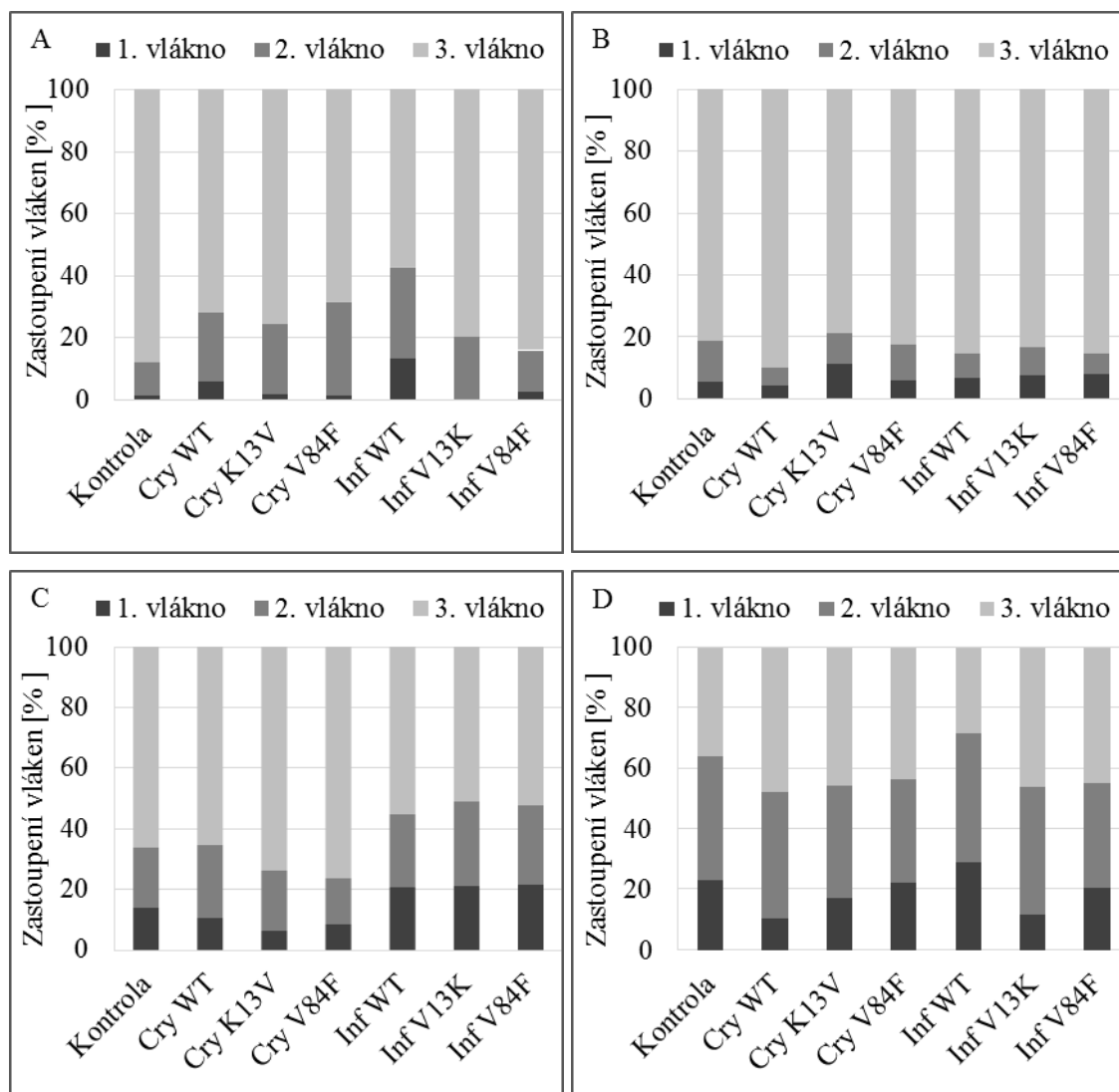
Obr.32: Srovnání klíčivosti konidií *P. neolyopersici* 48 hpi na listových discích jednotlivých genotypů *Solanum* spp. po elicitaci kryptoginem, infestinem a jejich mutančními formami.

A) *S. lycopersicum* cv. Amateur, B) *S. lycopersicum* cv. MicroTom, C) *S. chmielewskii*, D) *S. habrochaites*. Tmavá barva znázorňuje % zastoupení klíčících konidií. Plné označení mutantu Inf V13K uvedené v grafech je Inf V13K/A14T.

Podobně i u *S. lycopersicum* cv. MicroTom bylo pozorováno snížení klíčivosti konidií po aplikaci elicitinů (Obr.32B). Pouze v případě aplikace Cry V84F nebyl zaznamenán významný efekt na klíčivost spor (69%) ve srovnání s kontrolním vzorkem (65%). Velmi výrazné snížení klíčivosti způsobil Cry (25%) a Inf V84F (36%). Po elicítaci listů genotypu *S. chmielewskii* bylo detekováno významné snížení klíčivosti konidií *P. neolycopersici* po elicítaci Cry a jeho mutantními formami ve srovnání s kontrolním vzorkem (Obr.32C). Nejsilnější efekt na potlačení klíčivosti konidií měl vliv Cry K13V (32%) a Cry V84F (37%) v porovnání s kontrolním experimentem (71%). Výjimkou byla aplikace Inf V84F, který klíčivost konidií naopak podpořil (87 % naklíčených konidií). Působení Inf V13K se na klíčivosti konidií výrazně neprojevilo a Inf způsobil jen malé snížení klíčivosti (64%). Podobně jako u *S. chmielewskii* došlo i u genotypu *S. habrochaites* po elicítaci k výraznému snížení klíčivosti konidií (Obr.32D). Pouze po aplikaci Inf V84F byla klíčivost srovnatelná s kontrolním vzorkem (83 %). Aplikace Cry potlačila vývoj patogenu přibližně o polovinu vůči kontrole (42 %). Největší inhibiční efekt u tohoto genotypu podobně jako u *S. chmielewskii* a *S. lycopersicum* cv. Amateur měl Cry K13V (24 %). Efekt jednotlivých typů elicitinů na klíčení konidií je srovnatelný u genotypů s prokázanými rezistenčními vlastnostmi, tj. u *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*

Po aplikaci všech elicitinů byla prokázána inhibice vývoje patogenu především u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Jak je patrné z Obr.33A, po elicítaci došlo ke snížení procentuálního zastoupení konidií s třemi vlákny vůči kontrolnímu vzorku. Nejvýrazněji potlačil vývoj patogenu Inf a Cry včetně jeho mutantních forem. Z grafu na Obr.33B je patrné, že k mírnému potlačení vývoje patogenu u genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom došlo pouze po aplikaci Cry K13V. Ostatní elicitiny měly spíše malý aktivační nebo žádný vliv na vývoj patogenu *P. neolycopersici*. V případě středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* vlivem aplikace Inf a jeho mutantních forem byl inhibován vývoj patogenu ve srovnání s kontrolním vzorkem (Obr.33C). Po aplikaci mutantních forem Cry se zastoupení konidií s třemi klíčními vlákny v porovnání s kontrolním experimentem zvýšilo, tyto elicitiny podpořily vývoj patogenu. Po elicítaci genotypu *S. habrochaites* byl detekován inhibiční efekt na vývoj patogenu pouze

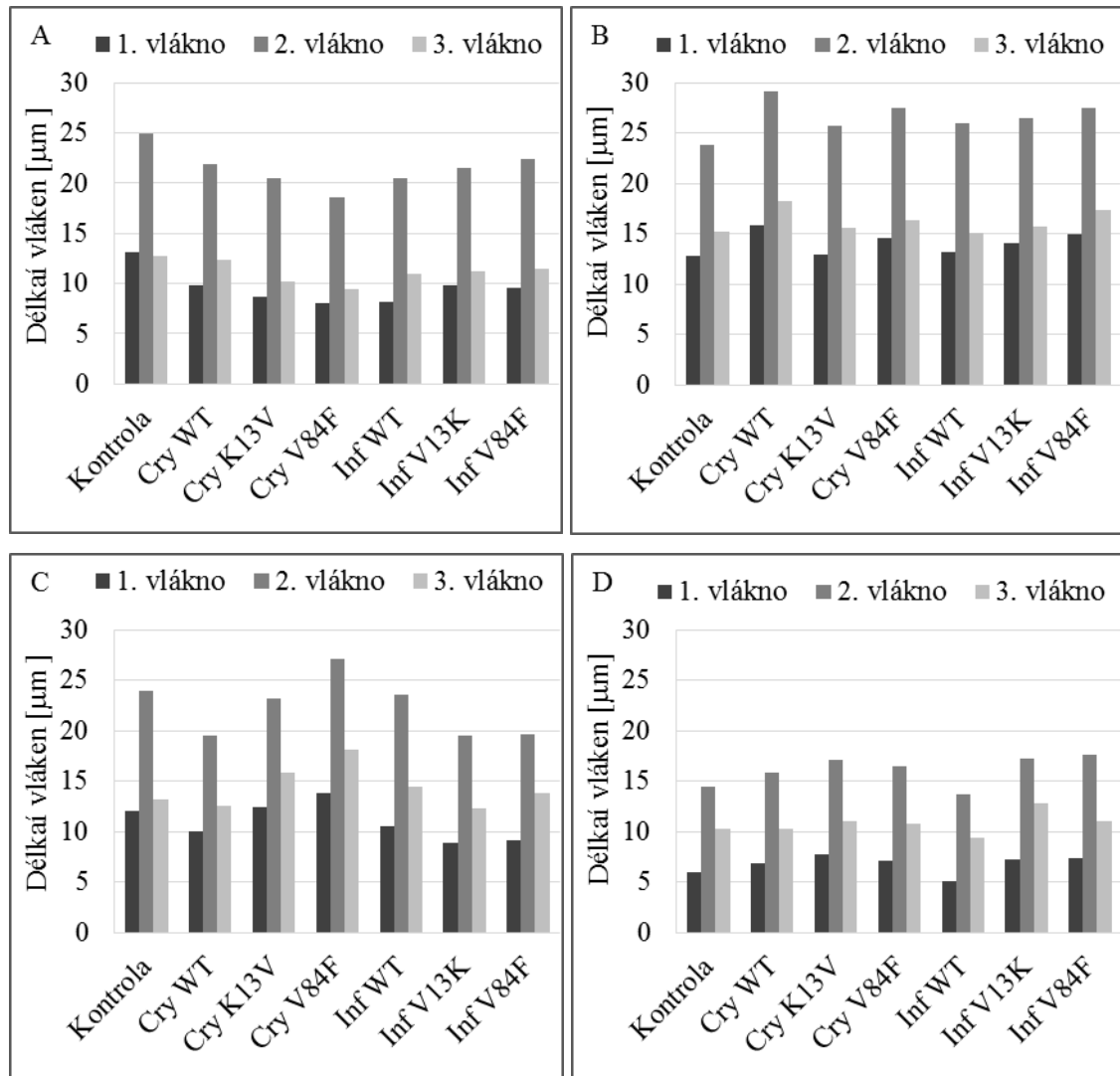
v případě Inf (Obr.33D). Ostatní elicitory naopak ve srovnání s kontrolním vzorkem stimulovaly vývoj patogenu.



Obr.33: Zastoupení konidií s jedním, dvěma a třemi klíčovými vlákny patogenu *P. neolycopersici* 48 hpi na listových discích jednotlivých genotypů *Solanum* spp. po elicítaci kryptoginem, infestinem a jejich mutantními formami. A) *S. lycopersicum* cv. Amateur, B) *S. lycopersicum* cv. MicroTom, C) *S. chmielewskii*, D) *S. habrochaites*. Plné označení mutantu Inf V13K uvedené v grafech je Inf V13K/A14T.

Aplikace elicitinů u *S. lycopersicum* cv. Amateur vedla k potlačení růstu klíčících vláken konidií patogenu *P. neolycopersici* ve srovnání s kontrolním vzorkem (Obr.34A). Nejvýraznější efekt vykazoval Cry V84F. V případě genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom, byla po elicítaci klíčící vlákna delší v porovnání s kontrolním experimentem (bez aplikace elicitinů) (Obr.34B). Největší pozitivní efekt na růst vláken vykazoval Cry. Po elicítaci listů *S. chmielewskii* bylo pozorováno výraznější snížení průměrné délky

klíčnicích vláken po aplikaci Cry kryptogeinu a mutantních forem infestinu (Obr.34C). V případě rezistentního genotypu *S. habrochaites* byl detekován pozitivní vliv aplikace elicitinů na růst klíčnicích vláken s výjimkou působení Inf, který naopak růst klíčnicích vláken mírně inhiboval (Obr.34D).



Obr.34: Průměrná délka klíčnicích vláken patogenu *P. neolycopersici* 48 hpi na listových discích jednotlivých genotypů *Solanum* spp. po elicitaci kryptogeinem, infestinem a jejich mutantními formami. A) *S. lycopersicum* cv. Amateur, B) *S. lycopersicum* cv. MicroTom, C) *S. chmielewskii*, D) *S. habrochaites*. Plně označení mutantu Inf V13K uvedené v grafech je Inf V13K/A14T.

4.3 Fyziologický efekt elicítace – detekce listových nekrot po elicítaci a inokulaci patogenem

Součástí fytopatologické studie byla detekce tvorby listových nekrot po elicítaci a následné inokulaci patogenem *P. neolycopersici*. Listy byly 48 h po aplikaci elicitinů a po dalších 48 h po inokulaci patogenem (tj. 96 od po zahájení experimentu) fotograficky zdokumentovány. Na základě detekovaných rozdílů na úrovni tvorby nekrot

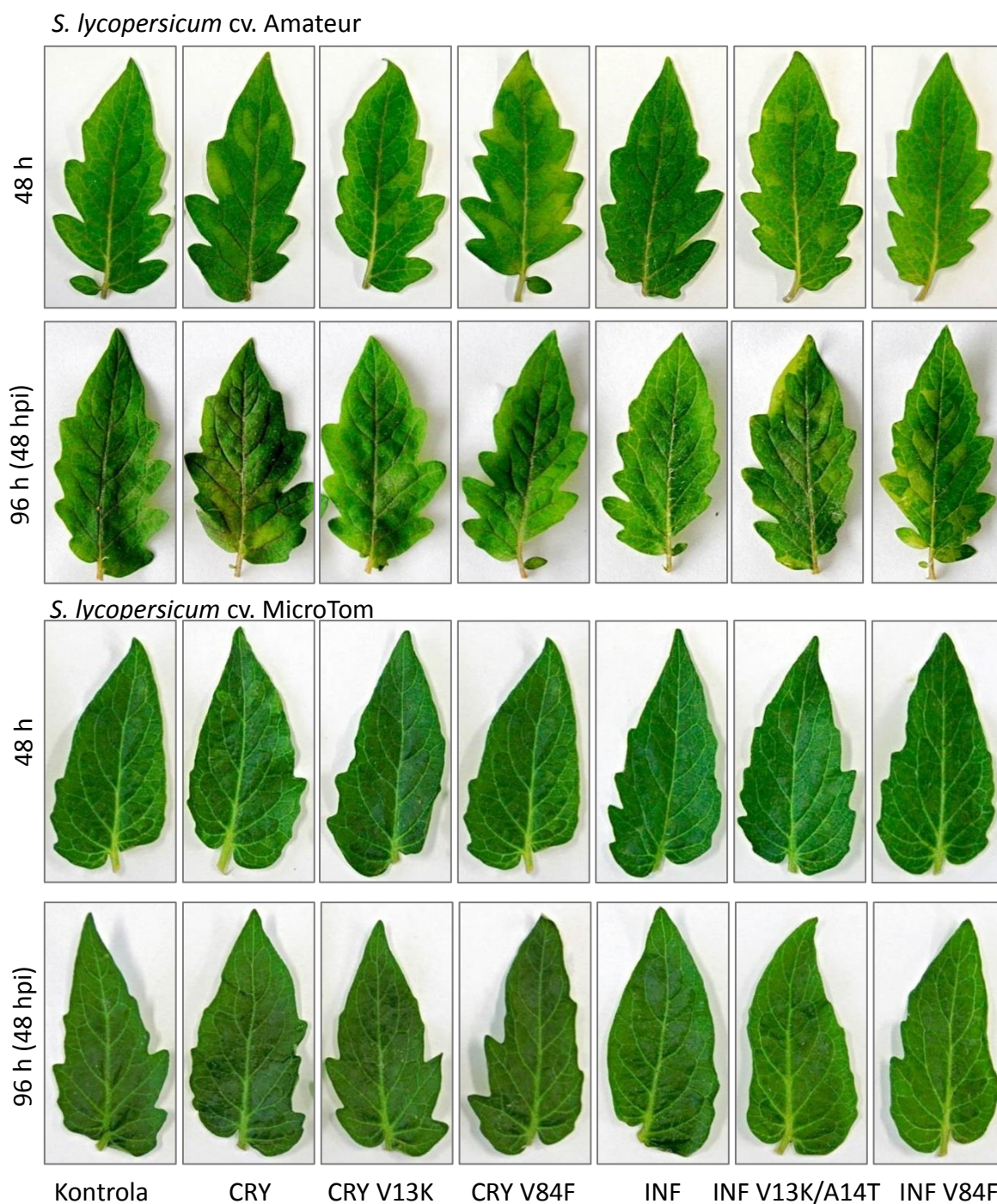
bylo možné přehledně vyhodnotit působení elicitinů na jednotlivé genotypy *Solanum* spp., tzn. zhodnotit vliv elicitinů na schopnost rostlin aktivovat hypersenzitivní reakci, která je jedním z mechanismů aktivovaných v rámci obranných reakcí rostlin v případě infekce patogenem *P. neolycopersici* (Obr.35, 36; Tab.8).

U citlivého kultivaru *S. lycopersicum* cv. Amateur 48 h po elicitaci nebyly na listech patrné tmavé nekrózy, ale spíše lokální zažloutlá místa, která byla nejvýraznější u vzorků ošetřených Cry a zejména jeho mutantní formou Cry V84F (Obr.35; Tab.8). Podobný efekt byl patrný také na listech ošetřených Inf V13K/A14T. Po následné inokulaci (tj. 96 h po elicitaci, 48 hpi) byly zaznamenány nejvýraznější změny po aplikaci Inf V84F (Obr.36; Tab.8).

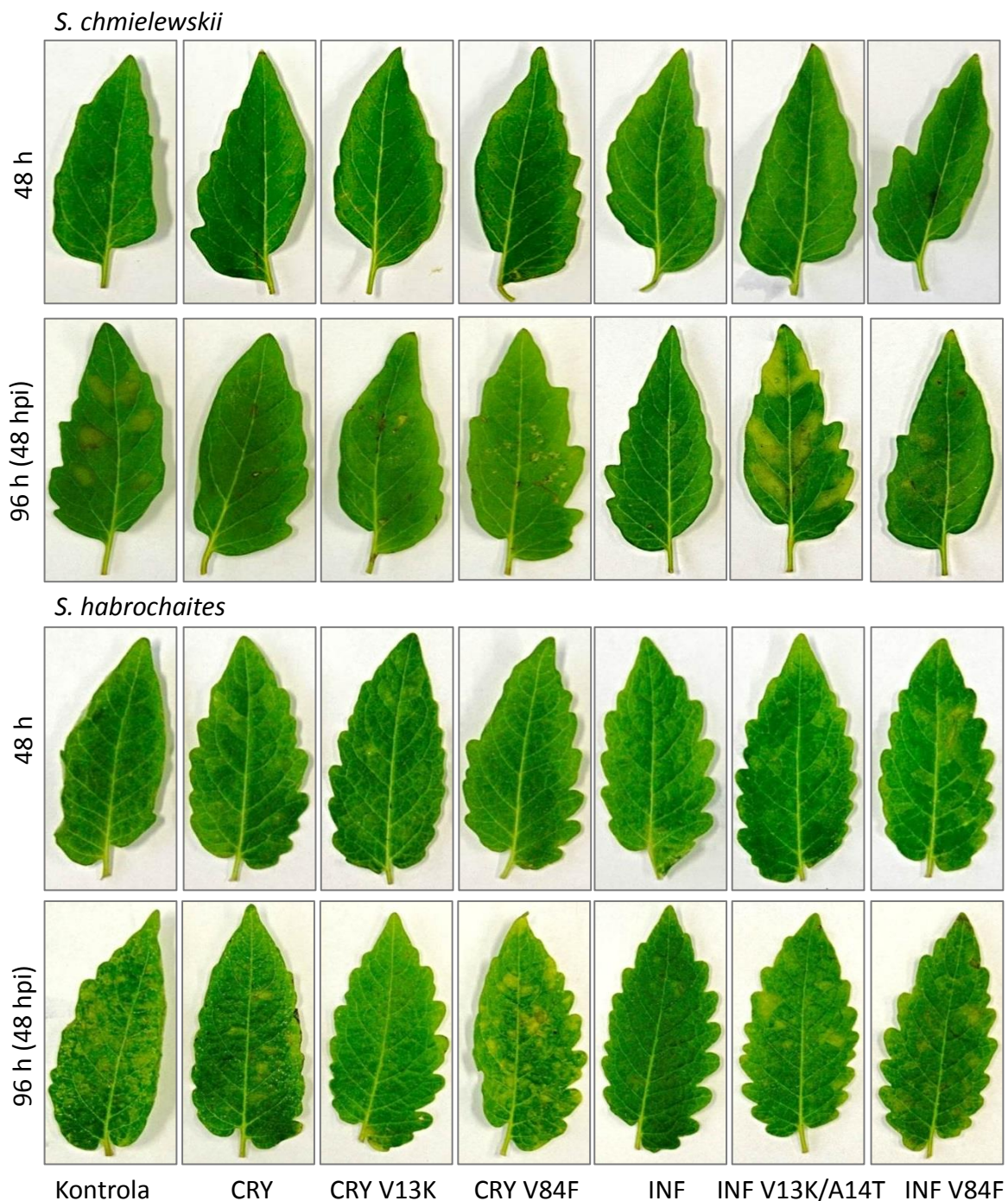
V případě genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom nebyl detekovaný žádný fyziologický efekt 48 h po aplikaci elicitinů ani po následné inokulaci (96 h), tzn. nebyla pozorována žádná změna zbarvení listové plochy ani nekrotická reakce (Obr.35, 36; Tab.8). U obou genotypů *S. lycopersicum* cv. Amateur i *S. lycopersicum* cv. MicroTom nebyla zaznamenána tvorba nekrotických oblastí u kontrolních rostlin po napadení patogenem *P. neolycopersici*.

Pro středně rezistentní genotyp *S. chmielewskii* i rezistentní genotyp *S. habrochaites* je charakteristická aktivace obranných mechanismů po napadení patogenem *P. neolycopersici*, mezi které patří intenzivní hypersenzitivní reakce vedoucí k programované buněčné smrti. Elicitace Cry, Inf a jejich mutantními formami nezpůsobila u genotypu *S. chmielewskii* žádné fyziologické změny (vyhodnoceno 48 h po aplikaci elicitinů). 48 hpi byly detekovány na kontrolních rostlinách infikovaných patogenem *P. neolycopersici* charakteristické výrazné nekrotické změny. Elicitace Cry a Inf 48 h před inokulací listů patogenem tento efekt plně potlačila. V případě použití mutantních forem elicitinů Cry K13V a Inf V84F byla nekrotická reakce rostliny potlačena částečně. Aplikace Inf V13K/A14T naopak nekrotickou reakci rostliny na patogen *P. neolycopersici* dané rostliny zesílila (Obr.36; Tab.8).

Samotná aplikace elicitinů u rezistentního genotypu *S. habrochaites* podobně jako u genotypů *S. chmielewskii* a *S. lycopersicum* cv. MicroTom neaktivovala tvorbu nekrotických oblastí. U listů genotypu *S. habrochaites* vystavených působení Cry K13V a Inf nebyla detekována charakteristická tvorba nekrotických oblastí po inokulaci patogenem *P. neolycopersici*. Cry, Inf V13K/A14T a Inf V84F tvorbu nekrotických oblastí potlačily pouze částečně (Obr.36; Tab.8). V případě elicitace Cry V84F nebyl zaznamenán vliv u genotypu *S. habrochaites* na schopnost aktivovat hypersenzitivní reakci.



Obr.35: Fyziologický efekt elicítace a následné infekce patogenem *P. neolycopersici* na listech rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. lycopersicum* cv. Microtom. Fotografie listů 48 h po aplikaci elicitinů a po 96 h od aplikace elicitinů (tj. 48 hpi).



Obr.36: Fyziologický efekt elicitace a následné infekce patogenem *P. neolycopersici* na listech rajčete *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*. Fotografie listů 48 h po aplikaci elicitinů a po 96 h od aplikace elicitinů (tj. 48 hpi).

Tab.8: Porovnání (orientační) intenzity nekrotického efektu v důsledku působení elicitinů a následné inokulace patogenem *P. neolyopersici* u jednotlivých genotypů *Solanum* spp.. V případě genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur, nebyly detekovány charakteristické projevy nekrozy, ale zežloutnutí listové plochy.

Elicitin	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur		<i>S. lycopersicum</i> cv. MicroTom		<i>S. chmielewskii</i>		<i>S. habrochaites</i>	
	Elicitin	Elicitin, patogen	Elicitin	Elicitin, patogen	Elicitin	Elicitin, patogen	Elicitin	Elicitin, patogen
Kontrola	-	-	-	-	-	++	-	+++
Cry	+	++	-	-	-	-	-	++
Cry K13V	stopy	+	-	-	-	+	-	-
Cry V84F	++	++	-	-	-	++	-	+++
Inf	-	+	-	-	-	-	-	-
Inf V13K/A14T	+	++	-	-	-	+++	-	++
Inf V84F	stopy	+++	-	-	-	+	-	++

Intenzita signálu (nekrotická reakce)	-	stopy	+	++	+++
Intenzita signálu (zežloutnutí listu)	-	stopy	+	++	+++

4.4 Lokalizace produkce reaktivních forem kyslíku

Dalším dílčím úkolem diplomové práce byla detekce produkce superoxidu metodou využívající NBT a produkce peroxidu vodíku metodou s DAB. 48 h po elicítaci byly listy inkubovány s DAB či NBT a výsledky byly následně fotograficky i mikroskopicky zdokumentovány.

4.4.1 Lokalizace produkce superoxidu

Nitrotetrazoliová modř se používá k detekci redukujících látek, jako je např. superoxid. Redukcí tetrazoliových kruhů NBT dojde k jejich otevření a přeměně na formazan. V průběhu této reakce dochází ke změně absorpčního spektra a původní světle žluté zbarvení NBT se mění na tmavěmodré, které je po odbarvení chlorofylu na listech zřetelně patrné. Přítomnost superoxidu (vznik modře zbarveného formazanu) byla zdokumentována pořízením fotografií celých listů a následně mikroskopicky.

U kontrolních vzorků (neošetřených elicítiny) nebyla produkce superoxidu zaznamenána u žádného ze studovaných genotypů *Solanum* spp.. Aplikace Cry a Inf neaktivovala detekovatelnou produkci superoxidu u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Výraznější vliv na produkci superoxidu měly u tohoto genotypu aplikace

mutantních forem obou elicitinů. Největší produkce superoxidu byla detekována po aplikaci Inf V84F (Obr.37, 38; Tab.9).

V případě genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom elicítace zvýšila produkci superoxidu. Produkce superoxidu byla po aplikaci Inf a jeho mutantních forem malá v porovnání s působením Cry a jeho mutantních forem. Mutace u Cry významně produkci superoxidu zvýšily. Nejintenzivnější produkce superoxidu byla detekována po aplikaci Cry K13V (Obr.37, 38; Tab.9).

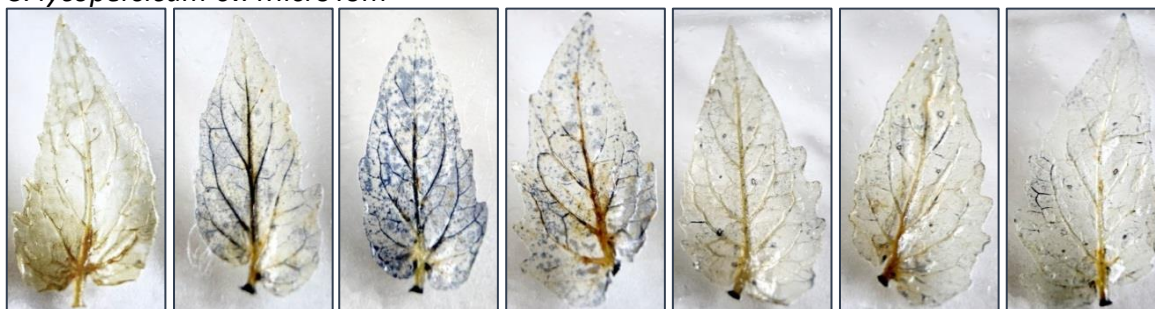
Aplikace Cry a Inf u genotypu *S. chmielewskii* měla srovnatelný efekt na produkci superoxidu jako u genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom. V případě aplikace mutantních forem elicitinu Inf byla zaznamenána nižší produkce superoxidu v porovnání s efektem, který vyvolal Inf. Srovnatelně se *S. lycopersicum* cv. MicroTom nejintenzivnější produkce superoxidu byla detekována po aplikaci Cry K13V (Obr.37, 38; Tab.9).

U rezistentního genotypu *S. habrochaites* došlo následkem elicítace při aplikaci testovaných elicitinů k nejvýraznějšímu nárůstu produkce superoxidu. Největší efekt byl zaznamenán po aplikaci Inf V84F. Zajímavé je, že produkce superoxidu u genotypu *S. habrochaites* byla pozorována v celé listové ploše na rozdíl od lokálních lokalizací v případě ostatních genotypů *Solanum* spp. (Obr.37, 38; Tab.9).

S. lycopersicum cv. Amateur



S. lycopersicum cv. MicroTom



S. chmielewskii



S. habrochaites



Kontrola

CRY

CRY V13K

CRY V84F

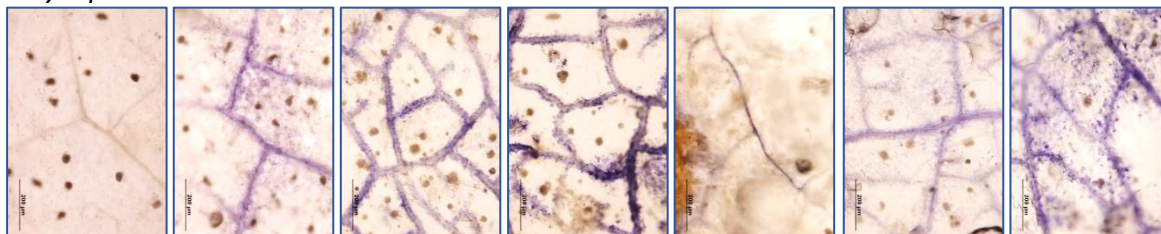
INF

INF V13K/A14T

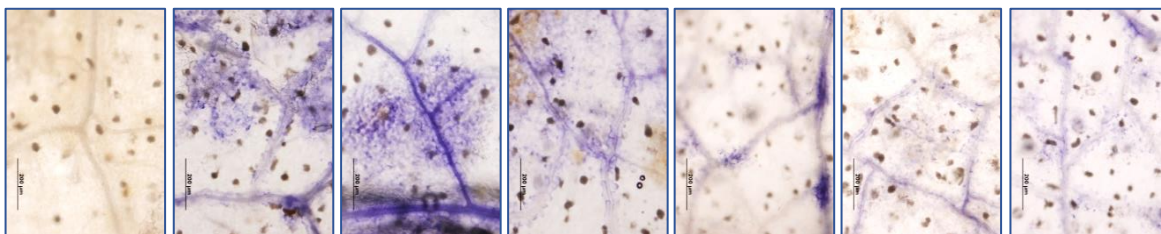
INF V84F

Obr.37: Lokalizace produkce superoxidu s využitím metody s NBT u testovaných genotypů *Solanum* spp.. Fotografie listů 48 h po aplikaci elicitinů.

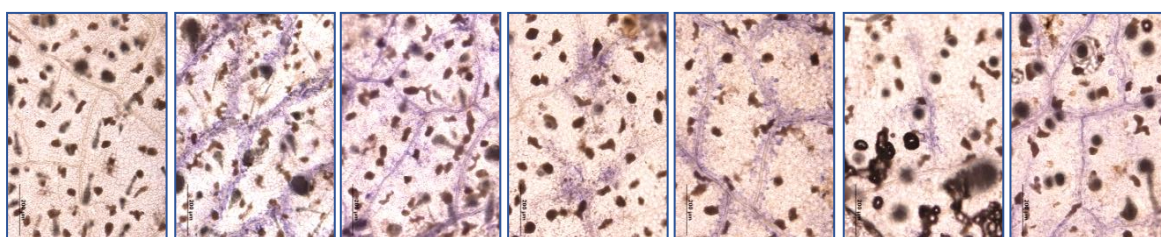
S. lycopersicum cv. Amateur



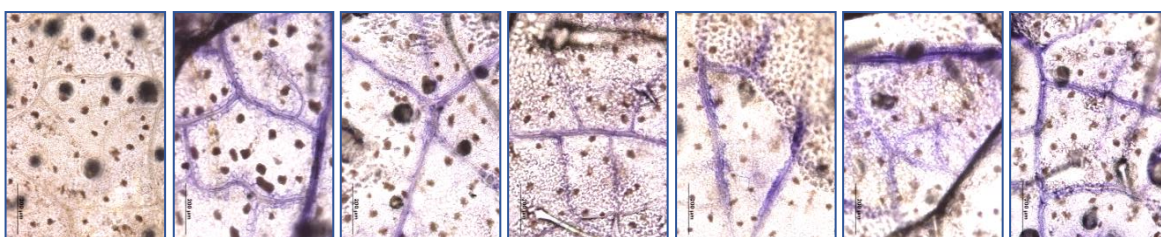
S. lycopersicum cv. MicroTom



S. chmielewskii



S. habrochaites



Kontrola CRY CRY V13K CRY V84F INF INF V13K/A14T INF V84F

Obr.38: Lokalizace produkce superoxidu s využitím metody s NBT u testovaných genotypů *Solanum* spp.. Mikroskopické pozorování vlivu elicitinů na produkci superoxidu (zvětšení 100x). Mikrofotografie listů 48 h po aplikaci elicitinů.

Tab.9: Porovnání (orientační) vlivu elicitinů na produkci superoxidu u jednotlivých genotypů *Solanum* spp.. 48 h po aplikaci elicitinů.

Elicitin	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	<i>S. lycopersicum</i> cv. MicroTom	<i>S. chmielewskii</i>	<i>S. habrochaites</i>
Kontrola	-	-	-	-
Cry	stopy	++	++	++
Cry K13V	+	++++	+++	+++
Cry V84F	+	+++	++	+++
Inf	-	+	++	+++
Inf V13K/A14T	++	+	stopy	+++
Inf V84F	+++	+	+	++++
Intenzita signálu	+	++	+++	++++

4.4.2 Lokalizace produkce peroxidu vodíku

Principem metody detekce lokalizace produkce peroxidu vodíku je reakce 3,3'-diaminobenzidinu s peroxidem vodíku, která je katalyzovaná rostlinnými peroxidasami. Polymerací oxidovaného DAB vzniká stabilní oranžovohnědý produkt, který se ukládá v rostlinných pletivech a po odbarvení chlorofylu je detekovatelný.

Z Obr.39 a 40 je patrné, že v případě genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur neměla aplikace elicitinů prakticky vliv na produkci peroxidu vodíku (Tab.10).

V případě genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom byla detekována zvýšená produkce peroxidu vodíku po aplikaci Cry K13V, Cry V84F a Inf V84F. Působením ostatních elicitinů byla zaznamenána pouze lokální produkce peroxidu vodíku v místech vpichu (viz metodika aplikace elicitinů) (Obr.39, 40; Tab.10).

Po aplikaci elicitinů na listy středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* byla detekována pouze lokální produkce peroxidu vodíku, která je patrná v místech vpichu (viz metodika aplikace elicitinů). Lokální produkce peroxidu vodíku byla potvrzena mikroskopicky (Obr. 39, 40; Tab.10).

U genotypu *S. habrochaites* došlo po aplikaci elicitinů u všech vzorků k velmi výrazné produkci peroxidu vodíku ve srovnání s ostatními genotypy. Nejvýraznější produkce peroxidu vodíku byla detekována v případě aplikace Cry V84F a Inf V84F (Obr. 39, 40; Tab.10).

S. lycopersicum cv. Amateur



S. lycopersicum cv. MicroTom



S. chmielewskii



S. habrochaites



Kontrola

CRY

CRY V13K

CRY V84F

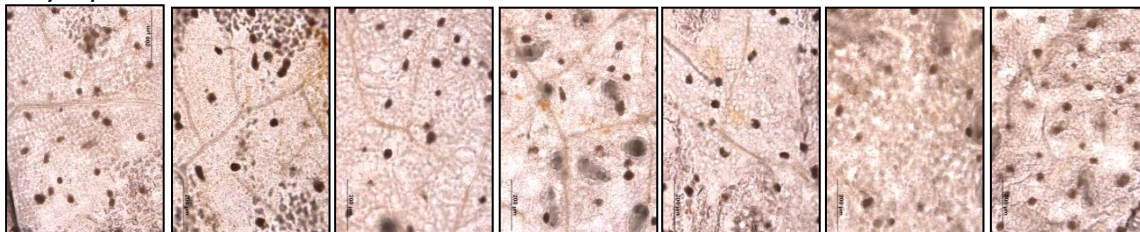
INF

INF V13K/A14T

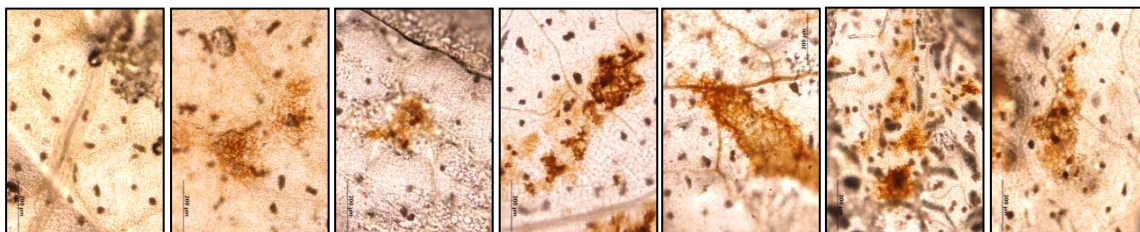
INF V84F

Obr.39: Lokalizace produkce peroxidu vodíku s využitím metody s DAB u testovaných genotypů *Solanum* spp.. Fotografie listů 48 h po aplikaci elicitinů.

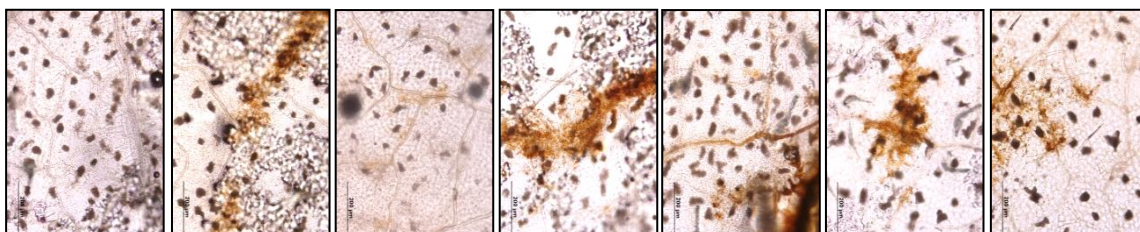
S. lycopersicum cv. Amateur



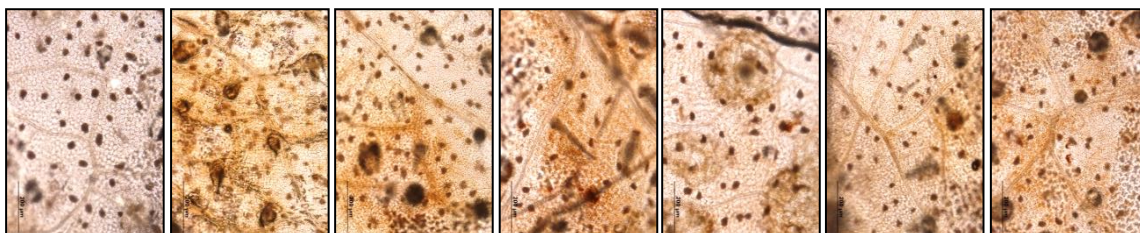
S. lycopersicum cv. MicroTom



S. chmielewskii



S. habrochaites



Kontrola CRY CRY V13K CRY V84F INF INF V13K/A14T INF V84F

Obr.40: Lokalizace produkce peroxidu vodíku s využitím metody s DAB u testovaných genotypů *Solanum* spp.. Mikroskopické pozorování vlivu elicitinů na produkci peroxidu vodíku (zvětšení 100x). Mikrofotografie listů 48 h po aplikaci elicitinů.

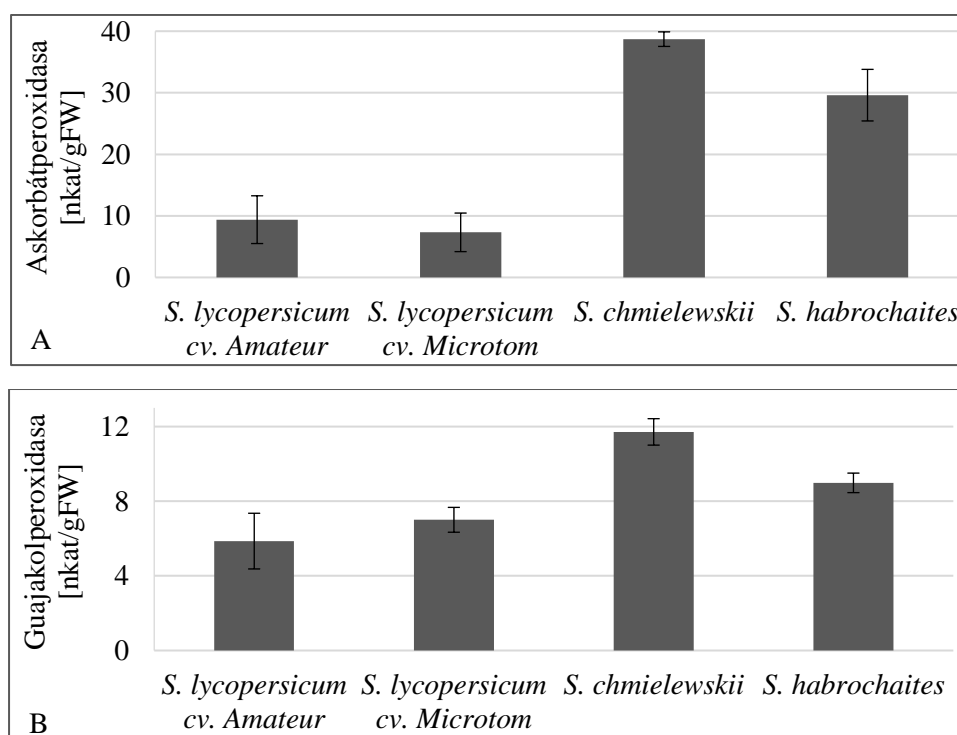
Tab.10: Porovnání (orientační) vlivu elicitinů na produkci peroxidu vodíku u jednotlivých genotypů *Solanum* spp. 48 h po aplikaci elicitinů.

Elicitin	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	<i>S. lycopersicum</i> cv. MicroTom	<i>S. chmielewskii</i>	<i>S. habrochaites</i>
Kontrola	-	-	-	-
Cry	-	stopy	stopy	++
Cry K13V	-	+	-	+++
Cry V84F	-	++	stopy	++++
Inf	-	stopy	stopy	++
Inf V13K/A14T	-	stopy	stopy	+++
Inf V84F	-	++	stopy	++++
Intenzita signálu	+	++	+++	++++

4.5 Askorbátperoxidasa a guajakolperoxidasa aktivita

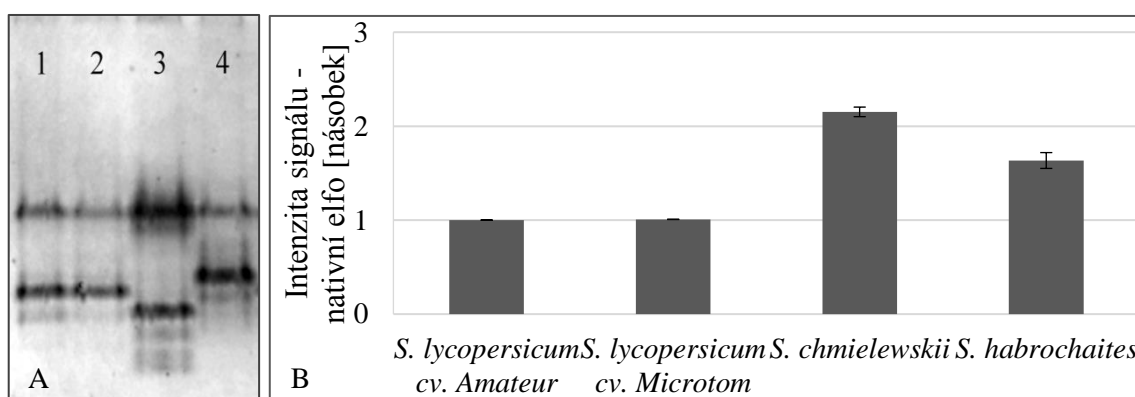
4.5.1 Porovnání aktivity askorbátperoxidasy a guajakolové peroxidasy u jednotlivých genotypů *Solanum* spp.

V diplomové práci byly porovnány enzymové aktivity APX a GPX kontrolních rostlin (bez aplikace elicitinu) studovaných genotypů *Solanum* spp. (Obr. 41). Detekovaná aktivita askorbátperoxidasy u kultivarů *S. lycopersicum* cv. Amateur (9,4 nkat/g FW) a *S. lycopersicum* cv. MicroTom (7,3 nkat/g FW) je srovnatelná (Obr. 41A). V případě genotypu *S. chmielewskii* byla detekována až čtyřnásobně vyšší aktivita APX (38,7 nkat/g FW) a u *S. habrochaites* dosahovala enzymová aktivita APX trojnásobně vyšších hodnot (29,6 nkat/g FW) v porovnání s kultivary *S. lycopersicum*. V případě GPX nebyly detekovány tak výrazné rozdíly v enzymové aktivitě u jednotlivých genotypů (Obr. 41B). U kultivarů *S. lycopersicum* cv. Amateur (5,9 nkat/g FW) a *S. lycopersicum* cv. MicroTom (7 nkat/g FW) byly stanoveny nejnižší hodnoty GPX aktivity. Jednoznačně vyšší GPX aktivita je charakteristická pro *S. habrochaites* (9 nkat/g FW) a *S. chmielewskii* (11,7 nkat/g FW).



Obr.41: Stanovení enzymové aktivity askorbátperoxidasy (A) a guajakolperoxidasy (B) u studovaných genotypů *Solanum* spp. (bez aplikace elicitinu).

Vyšší peroxidasaová aktivita, charakteristická pro genotypy *S. habrochaites* a *S. chmielewskii* v porovnání s oběma kultivary *S. lycopersicum*, stanovená spektrofotometricky byla potvrzena metodou nativní elektroforézy s využitím 1-Cl-naftolu jako substrátu (Obr. 42). Izoenzymový profil peroxidas *S. chmielewskii* se významně liší od izoenzymových profilů peroxidas ostatních studovaných genotypů *Solanum* spp. Naopak izoenzymový profil peroxidas obou kultivarů *S. lycopersicum* je srovnatelný. *S. habrochaites* má izoenzymový profil peroxidas odpovídající genotypu *S. lycopersicum*, ale s významně rozdílnou intenzitou zastoupení jednotlivých izoenzymů.

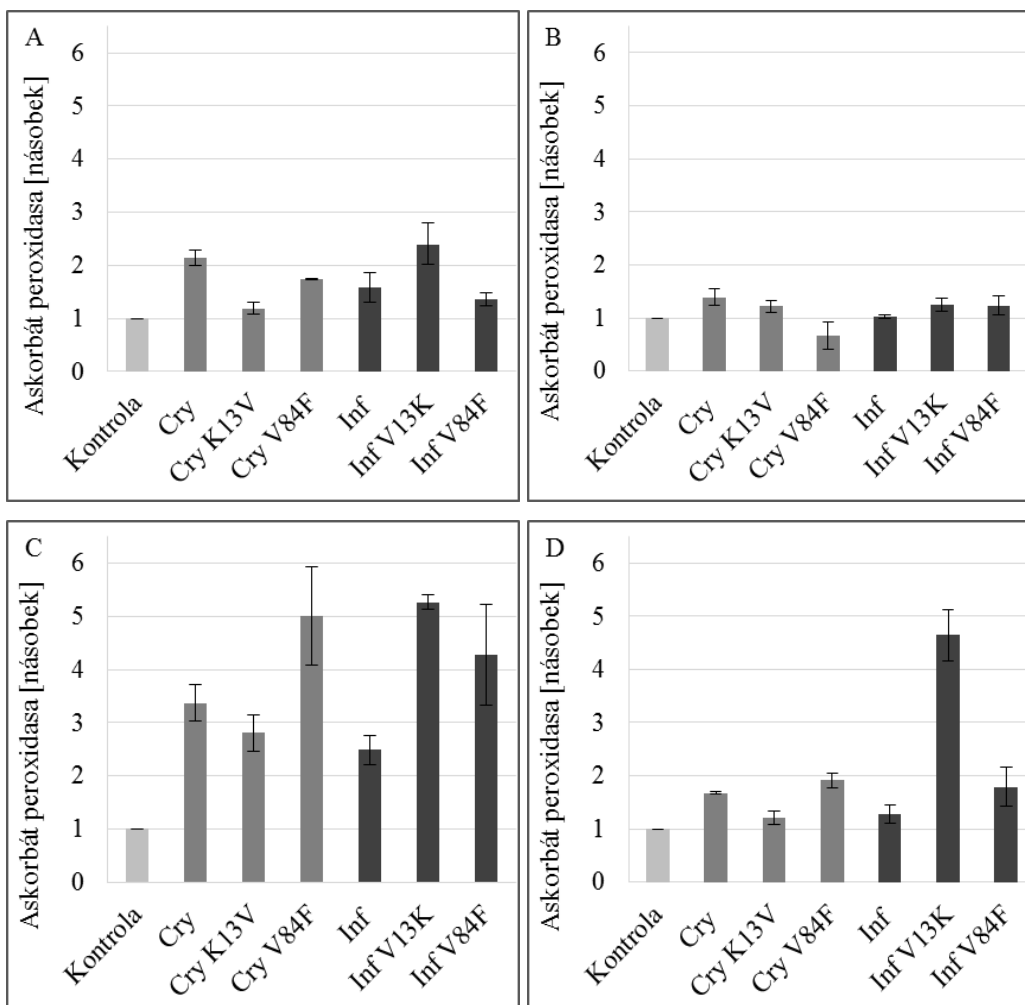


Obr.42: Detekce peroxidasové aktivity metodou nativní gelové elektroforézy: A) fotografie gelu po nativní elektroforéze (substrát 1-Cl-naftol), B) graf vyhodnocení relativní intenzity jednotlivých bandů. 1) *S. lycopersicum* cv. Amateur; 2) *S. lycopersicum* cv. Microtom; 3) *S. chmielewskii*; 4) *S. habrochaites*.

4.5.2 Stanovení aktivity askorbát peroxidasy

Elicitace vyvolala zvýšení aktivity APX v různé intenzitě u všech genotypů *Solanum* spp. (Obr.43; Tab.11). Pouze v případě Cry K13V po aplikaci na listy *S. lycopersicum* cv. MicroTom bylo detekováno naopak snížení aktivity APX. U tohoto genotypu bylo celkově zaznamenáno pouze mírné zvýšení APX aktivity po elicitaci (Obr.43B). Významnější zvýšení aktivity APX je charakteristické pro genotyp *S. lycopersicum* cv. Amateur a to zejména po aplikaci Cry a Inf V13K/A14T (Obr.43A).

V případě *S. chmielewskii* byly po aplikaci elicitinů zaznamenány největší změny v APX aktivitě v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr.43C). Největší vliv na změnu aktivity APX měla aplikace Cry V84F, Inf V13K/A14T a Inf V84F, kdy bylo detekováno více než čtyř až pětinasobné zvýšení enzymové aktivity. Největší vliv na aktivitu APX u genotypu *S. habrochaites* měla aplikace Inf V13K/A14T, kdy se aktivita zvýšila více než čtyřnásobně oproti kontrolním rostlinám (Obr. 43D).



Obr.43: Změna aktivity askorbátperoxidasy (APX) 48 h po elicitaci u testovaných genotypů *Solanum* spp.. Aktivita APX vztažená na g FW stanovená u rostlin po aplikaci elicitinů byla porovnána s aktivitou APX detekovanou u kontrolních rostlin (v grafu je uveden násobek změny). A) *S. lycopersicum* cv. Amateur, B) *S. lycopersicum* cv. MicroTom, C) *S. chmielewskii*, D) *S. habrochaites*. Plné označení mutantu Inf V13K uvedené v grafech je Inf V13K/A14T.

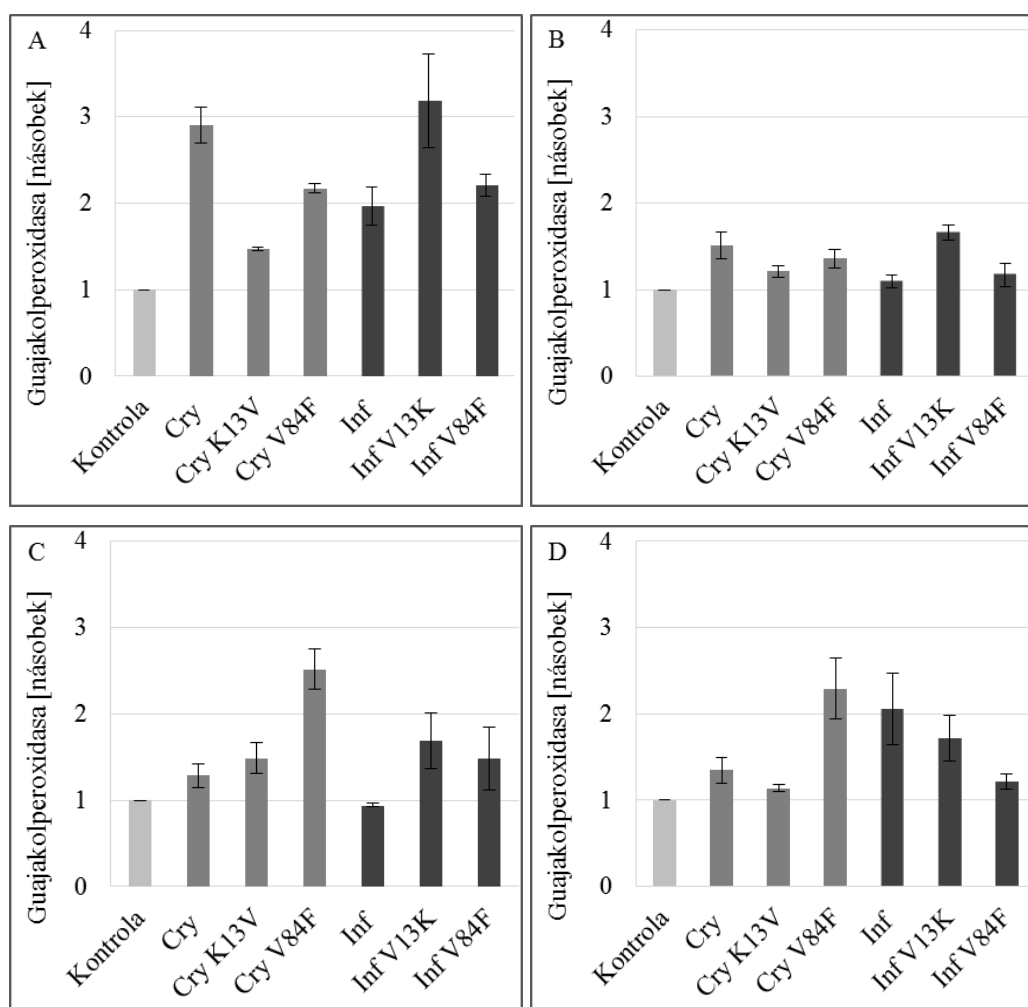
Tab.11: Porovnání vlivu elicitinů na změnu aktivity askorbátperoxidasy u jednotlivých genotypů *Solanum* spp. 48 h po aplikaci elicitinů.

Elicitin	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	<i>S. lycopersicum</i> cv. MicroTom	<i>S. chmielewskii</i>	<i>S. habrochaites</i>
Kontrola	-	-	-	-
Cry	+++	+	++++	++
Cry K13V	+	+	++++	+
Cry V84F	++	+++	++++	++
Inf	++	-	+++	+
Inf V13K/A14T	+++	+	++++	++++
Inf V84F	+	+	++++	++

Rozdíl v aktivitě (násobek)	++++	+++	++	+	-	+	++	+++	++++
	pod 0,3	od 0,5 do 0,3	od 0,7 do 0,5	od 0,9 do 0,7	od 0,9 do 1,1	od 1,1 do 1,5	od 1,5 do 2	od 2 do 2,5	nad 2,5

4.5.3 Stanovení aktivity guajakolové peroxidasy

Při aplikaci elicitinů v porovnání s kontrolními rostlinami bylo, podobně jako v případě stanovení APX, zaznamenáno zvýšení aktivity GPX u studovaných genotypů *Solanum* spp. (Obr.44; Tab.12). Pouze v případě aplikace Inf nebyl detekován u *S. lycopersicum* cv. MicroTom a *S. chmielewskii* žádný vliv na aktivitu GPX (Obr.45B,C). Největší změny v aktivitě GPX byly pozorované u *S. lycopersicum* cv. Amateur, kdy byla zaznamenána až trojnásobná stimulace enzymové aktivity po aplikaci Cry a Inf V13K/A14T ve srovnání s kontrolními rostlinami (Obr.44A). Více než dvojnásobné zvýšení aktivity způsobila elicítace Cry V84F u *S. chmielewskii* (Obr.45C). U genotypu *S. habrochaites* měla nejvýraznější vliv na stimulaci GPX aktivity aplikace Cry V84F a Inf (Obr.45D).



Obr.45: Změna aktivity guajakolperoxidasy (GPX) 48 h po elicitaci u testovaných genotypů *Solanum* spp.. Aktivita GPX vztažená na g FW stanovená u rostlin po aplikaci elicitinů byla porovnána s aktivitou GPX detekovanou u kontrolních rostlin (v grafu je uveden násobek změny). A) *S. lycopersicum* cv. Amateur, B) *S. lycopersicum* cv. MicroTom, C) *S. chmielewskii*, D) *S. habrochaites*. Plné označení mutantu Inf V13K uvedené v grafech je Inf V13K/A14T.

Tab.12: Porovnání vlivu elicitinů na změnu aktivity guajakolperoxidasy u jednotlivých genotypů *Solanum* spp. 48 h po aplikaci elicitinů.

Elicitin	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	<i>S. lycopersicum</i> cv. MicroTom	<i>S. chmielewskii</i>	<i>S. habrochaites</i>
Kontrola	-	-	-	-
Cry	++++	++	+	+
Cry K13V	+	+	+	+
Cry V84F	+++	+	++++	+++
Inf	++	-	-	+++
Inf V13K/A14T	++++	++	++	++
Inf V84F	+++	+	++	+

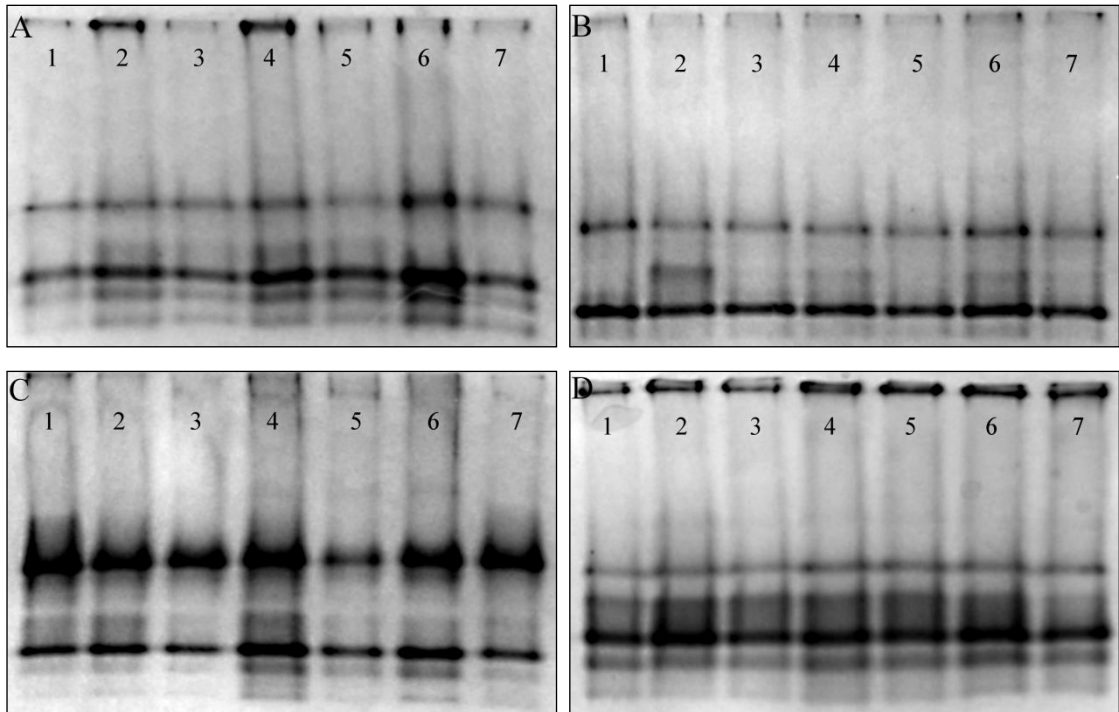
Rozdíl v aktivitě (násobek)	++++	+++	++	+	-	+	++	+++	++++
	pod 0,3	od 0,5 do 0,3	od 0,7 do 0,5	od 0,9 do 0,7	od 0,9 do 1,1	od 1,1 do 1,5	od 1,5 do 2	od 2 do 2,5	nad 2,5

4.5.4 Detekce peroxidase aktivity metodou nativní gelové elektroforézy

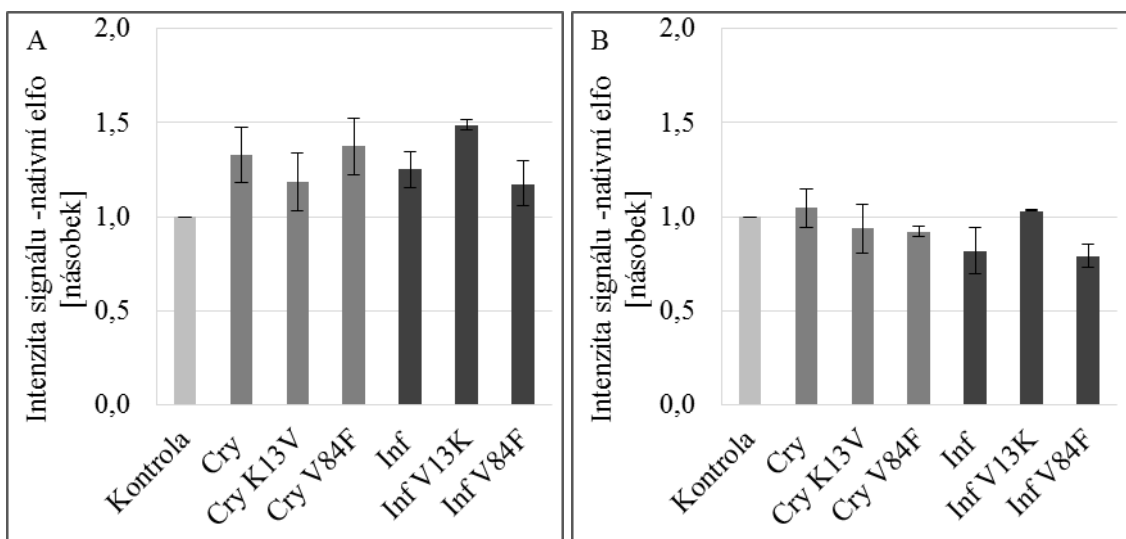
Metodou nativní elektroforézy na polyakrylamidovém gelu byly detekovány isoenzymy peroxidasy u kontrolních i elicitinovaných vzorků jednotlivých genotypů *Solanum* spp. s využitím substrátu peroxidasy 1-Cl-naftolu. Výsledné gely byly vyhodnocené na základě relativní intenzity bandů po elicitaci vztažené vůči intenzitě bandů ve vzorcích kontrolních rostlin.

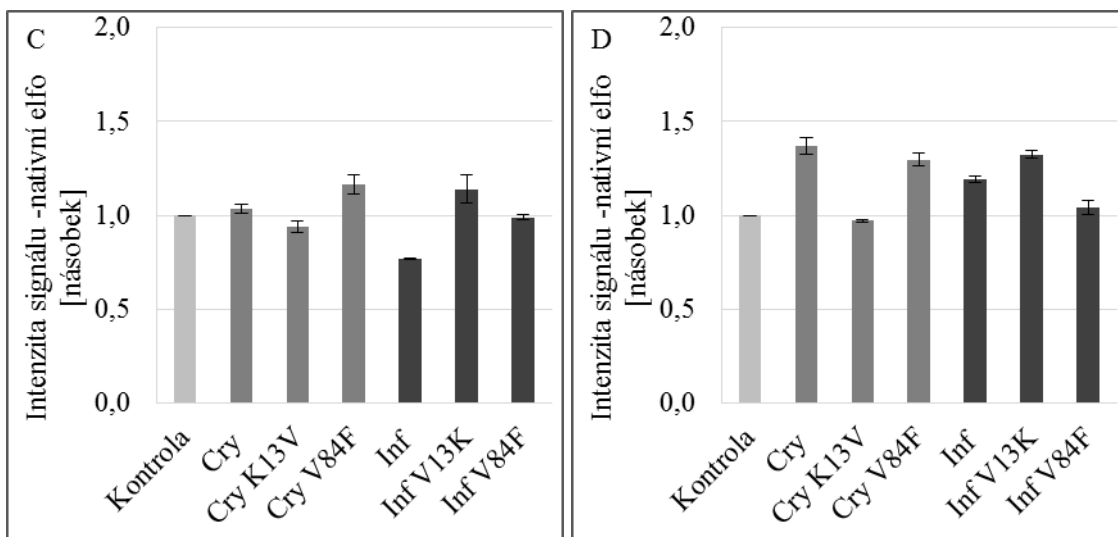
V případě genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur v souladu s výsledky detekce GPX aktivity spektrofotometrickou metodou byly zaznamenány největší změny signálu po aplikaci elicitinů. (Obr.46A, 47A). Největší vliv na stimulaci měla aplikace Cry, Cry V84F a Inf V13K. Při stanovení vlivu elicitinů na aktivitu peroxidasy u genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom nebyly detekované výrazné změny v intenzitě signálu jednotlivých isoenzymů peroxidasy v porovnání s izoenzymovým zastoupením peroxidasy u kontrolních rostlin (Obr.46B, 47A). V případě aplikace Inf a Inf V84F byla detekována snížená intenzita signálu. Získané výsledky korespondují s minimálními nebo žádnými změnami APX a GPX aktivity detekovanými spektrofotometricky. Intenzita signálu po vyhodnocení izoenzymového zastoupení peroxidasy metodou nativní elektroforézy u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* byla mírně zvýšená po aplikaci Cry V84F a Inf V13K/A14T v porovnání s intenzitou signálu u kontrolních rostlin (Obr. 46B, 47A). Po aplikaci Inf byla naopak detekovaná snížená intenzita signálu. Po elicitaci listů genotypu *S. habrochaites* došlo u všech vzorků s výjimkou Cry K13V a Inf V84F k výraznějšímu nárůstu intenzity signálu v porovnání s kontrolním experimentem

(Obr.46D, 47D). Ze získaných výsledků je zřejmé, že nejsilnější efekt měla aplikace Cry, Cry V84F a Inf V13K/A14T, podobně jako u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Tyto získané výsledky korelují s daty získanými ze spektrofotometrického stanovení enzymové aktivity.



Obr. 46: Nativní elektroforéza s detekcí peroxidasové aktivity s využitím substrátu 1.Cl-naftolu: 1) Voda, 2) Kryptogein, 3) Cry K13V, 4) Cry V84F, 5) Infestin, 6) Inf V13K/A14T, 7) Inf V84F. A) *S. lycopersicum* cv. Amateur, B) *S. lycopersicum* cv. MicroTom, C) *S. chmielewskii*, D) *S. habrochaites*.





Obr. 47: Vyhodnocení intenzity signálu bandů po nativní elektroforéze (v grafu je uveden násobek změny). A) *S. lycopersicum* cv. Amateur, B) *S. lycopersicum* cv. MicroTom, C) *S. chmielewskii*, D) *S. habrochaites*. Plné označení mutantu Inf V13K uvedené v grafech je Inf V13K/A14T.

5. DISKUZE

Cílem předložené diplomové práce bylo studium možného vlivu elicitinů na aktivaci obranných mechanismů vedoucí následně ke zvýšení rezistence *Solanum* spp. na patogen *P. neolyopersici*. Byla porovnána reakce genotypů *Solanum* spp. významně se lišících svou odolností na patogen *P. neolyopersici* a současně se testoval efekt dvou rozdílných elicitinů třídy I: β -elicitinu kryptogeinu a α -elicitinu infestinu1, které se liší svým izoelektrickým bodem. Studie byla doplněna testováním vlivu mutace v poloze 13 daných elicitinů, která právě významně ovlivňuje hodnotu pI a změnu povrchového náboje v místě mutace a mutace v poloze 84, která se projevuje vyšší schopnosti elicitinů aktivovat produkci ROS.

Na základě výsledků fytopatologické studie, tj. na základě intenzity zastoupení konidií s 1-3 vlákny, porovnáním délky jednotlivých vláken a klíčivosti spor byla porovnána citlivost studovaných genotypů *Solanum* spp. na patogen *P. neolyopersici*. Byla potvrzena citlivost/odolnost jednotlivých genotypů na daný patogen. Vývoj patogenu probíhá nejrychleji na *S. lycopersicum* cv. Amateur, jedná se o citlivý genotyp k danému patogenu. Oproti tomu nejvyšší rezistenci vůči rajčatovému padlí vykazoval genotyp *S. habrochaites*. Genotyp *S. chmielewskii* lze charakterizovat jako středně rezistentní vůči *P. neolyopersici*. Nově byla stanovena citlivost genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom, který bude patřit podobně jako *S. lycopersicum* cv. Amateur spíše k citlivým genotypům. Citlivost/odolnost vybraných genotypů *Solanum* spp. potvrdila ve fytopatologické studii Piterková *et al.* v roce 2011, kdy sledovala vývoj

patogenu *P. neolycopersici* na listových discích po dobu 24, 48 a 72 h od aplikace. Výrazné rozdíly byly zaznamenány v délce klíčících vláken, kdy u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur byla všechna tři vlákna patogenu nejdelší a to ve všech časových intervalech. Omezení růstu patogenu bylo naopak patrné u rezistentního genotypu *S. habrochaites* a středně rezistentního *S. chmielewskii*, kdy délky druhého a třetího klíčícího vlákna patogenu byly 48 a 72 h po inokulaci výrazně kratší v porovnání s vývojem patogenu na citlivém genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Také Huang *et al.* ve své studii z roku 1998 popsal významně nižší procentuální zastoupení naklíčených konidií u rezistentních druhů *S. peruvianum*, *S. parviflorum* a *S. habrochaites* 65 h po inokulaci. Stanovená klíčivost konidií na jednotlivých genotypech *Solanum* spp. byla v rozsahu 71-88 %. Nejvyšší klíčivost konidií byla detekována u citlivého *S. lycopersicum* cv. Amateur. Ve fytopatologické studii Mieslerové a Lebedy z roku 2010, byla klíčivost konidií 61-97% 48 h po inokulaci, přičemž nejvíce naklíčených konidií bylo detekováno u citlivého kultivaru *S. lycopersicum* cv. Amateur. Genotyp *S. lycopersicum* cv. MicroTom v souladu s výsledky Takahashi *et al.* z roku 2005 lze vyhodnotit jako spíše citlivý vůči *P. neolycopersici*.

Vliv elicitinů na vývoj patogena lze hodnotit z pohledu efektu elicitace na klíčivost konidií, na vývoj patogenu, tj. zastoupení konidií s 1-3 vlákny a na růst jednotlivých vláken. Aplikace elicitinů a jejich mutantních forem ve většině případů na studovaných genotypech *Solanum* spp. potlačila klíčivost konidii patogena (Tab.13).

Tab 13: Porovnání změn klíčivosti konidií *P. neolycopersici* po elicitaci na genotypech *Solanum* spp. Barevnou škálou jsou uvedeny rozdíly v klíčivosti konidií po elicitaci ve vztahu ke klíčivosti konidií u rostlin neošetřených elicitinem. (červená - snížení, zelená - zvýšení klíčivosti)

	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	<i>S. lycopersicum</i> cv. MicroTom	<i>S. chmielewskii</i>	<i>S. habrochaites</i>
Elicitin				
Cry	++	++++	++	++++
Cry K13V	++++	-	++++	++++
Cry V84F	+	-	+++	++++
Inf	+	++	+	++
Inf V13K/A14T	+	+	-	++++
Inf V84F	+++	+++	++	-

Rozdíl v klíčivosti (v %)	++++	+++	++	+	-	+	++	+++	++++
	pod -35	od -25 do -35	od -15 do -25	od -5 do -15	od -5 do 5	od 5 do 15	od 15 do 25	od 25 do 35	nad 35

Největší inhibiční efekt na klíčivost konidií byl pozorován po aplikaci Cry a jeho mutantů a to zejména u genotypů disponujících obrannými mechanismy zajišťující určitý stupeň odolnosti rostliny na daný patogen, jako je *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*. Aplikace všech testovaných elicitinů měla výrazný inhibiční účinek s různou intenzitou na vývoj patogenu na listech *S. lycopersicum* cv. Amateur. Významný inhibiční efekt na růst klíčících vláken patogenu měl Cry a mutantní formy Inf u genotypu *S. chmielewskii* (Tab.14). Inf a jeho mutantní formy na tomto genotypu potlačily vývoj 3.vláknů na konidiích patogenu (Tab.15). Zajímavé je, že elicitiny měly naopak stimulační účinek na růst patogenu na *S. lycopersicum* cv. MicroTom a *S. habrochaites* (Tab.14).

Tab. 14: Porovnání změn v délce jednotlivých vláken konidií *P. neolyopersici* po elicitaci na genotypech *Solanum* spp. Barevnou škálou jsou uvedeny rozdíly délce vláken konidií po elicitaci ve vztahu ke délce vláken konidií u rostlin neošetřených elicitiny. (červená - snížení, zelená - zvýšení délky vláken)

	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur			<i>S. lycopersicum</i> cv. MicroTom			<i>S. chmielewskii</i>			<i>S. habrochaites</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Elicitin												
Cry	+++	+++	-	+++	++++	+++	++	++++	-	-	+	-
Cry K13V	++++	++++	++	-	+	-	-	-	++	+	++	-
Cry V84F	++++	++++	+++	+	+++	+	+	+++	++++	+	++	-
Inf	++++	++++	+	-	++	-	+	-	+	-	-	-
Inf V13K/A14T	+++	+++	+	+	++	-	+++	++++	-	+	++	++
Inf V84F	+++	++	+	++	+++	++	++	++++	-	+	++	-

Rozdíl v délce vláken	++++	+++	++	+	-	+	++	+++	++++
	pod-15	od-3 do-4	od-2 do-3	od -1 do-2	od -1 do+1	od1 do2	od2do3	od3 do4	nad 4

Tab. 15: Porovnání změn v procentovém zastoupení 1-3 vláken konidií *P. neolyopersici* po elicitaci na genotypech *Solanum* spp. Barevnou škálou jsou uvedeny rozdíly v procentovém zastoupení 1-3 vláken konidií po elicitaci ve vztahu k procentovému zastoupení 1-3 vláken konidií u rostlin neošetřených elicitiny. (červená - snížení, zelená - zvýšení procentového zastoupení 1-3 vláken konidií)

	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur			<i>S. lycopersicum</i> cv. MicroTom			<i>S. chmielewskii</i>			<i>S. habrochaites</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Elicitin												
Cry	+	+++	++++	-	++	++	+	+	-	+++	-	+++
Cry K13V	-	+++	+++	++	+	+	++	-	++	++	+	++
Cry V84F	-	++++	++++	-	-	-	++	+	++	-	++	++
Inf	+	++++	++++	-	++	+	++	+	+++	++	-	++
Inf V13K/A14T	-	++	++	+	+	+	++	++	++++	+++	-	+++
Inf V84F	-	+	+	+	++	+	++	++	+++	+	++	++

Rozdíl v % zastoupení počtu vláken	++++	+++	++	+	-	+	++	+++	++++
	pod 15	od-10 do-15	od-5 do-10	od -2 do-5	od -2 do+2	od2 do5	od5 do10	od10 do15	nad 15

Kieffer *et al.* v roce 2000 ve své práci prokázal stimulační účinek purifikovaného Cry na aktivaci obranných mechanismů. Ošetření tabákové buněčné suspenze Cry způsobilo rychlou aktivaci obranných mechanismů včetně vysoké produkce ROS a RNS. Kryptogein v rámci obranných reakcí podporuje ukládání fytoalexinů, produkci ETI, aktivaci hypersenzitivní reakce a následnou tvorbu nektróz a v neposlední řadě také akumulaci obranného proteinu PR-1. Zároveň také aktivuje obranné mechanismy tabáku vůči řadě patogenů jako je *Phytophthora parasitica* var. *Nicotinae*, *Botrytis cinerea* či *Erysiphe cichoracearum* (Ricci *et al.*, 1989; Bonnet *et al.*, 1996). Také Medeira *et al.* v roce 2012 prokázal vliv Cry na stimulaci obranných reakcí *Quercus suber* vůči infekci patogenem *Phytophthora cinnamomi*. Podle studie od Dokládal *et al.* v roce 2012 má Cry i jeho mutantní forma Cry V84F srovnatelný inhibiční vliv na vývoj *P. parasitica* u tabáku. Plešková *et al.* v roce 2011 sledovala vliv elicítace tabáku Cry K13V ve srovnání s Cry na vývoj patogenu *Phytophthora parasitica*. Z výsledků předložené práce je zřejmé, že vliv elicítace na změnu odolnosti rostliny na patogen *P. neolycopersici* bude významně závislý na typu genotypu *Solanum* spp. a jeho schopnosti aktivovat obranné mechanismy tak, aby došlo k pozitivnímu efektu vedoucímu k inhibici patogenese. Je zajímavé, že potlačení vývoje patogenu po elicítaci bylo zřejmé zejména u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur, ale naopak u druhého citlivého kultivaru *S. lycopersicum* cv. MicroTom byl pozorován opačný efekt. Rozdílný efekt elicítace na vývoj patogenu u těchto dvou citlivých kultivarů lze dát do souvislosti, v rámci dat získaných v této práci, s významně rozdílnou schopností produkce ROS a aktivace antioxidantních enzymů APX a GPX po elicítaci, jak je níže diskutováno. V případě *S. habrochaites* lze dát do souvislosti možný významný inhibiční efekt elicítace na klíčivost konidií s vysokou aktivací produkce ROS po elicítaci a to jak peroxidu vodíku, tak superoxidového radikálu. Podle studie od Peng a Kuc z roku 1992 je souvislost mezi produkcí ROS a inhibicí klíčení spor patogenu zřejmá, ve své studii uvedli, že produkce ROS vyvolaná interakcí rostlinné buňky s *P. neolycopersici* inhibovala vývoj patogenu na listových discích tabáku.

V předložené práci byl studován vliv aplikace elicitinů na aktivaci hypersenzitivní reakce a následnou tvorbu nektróz. Samotná elicítace nevyvolala u studovaných genotypů *Solanum* spp. nekrotickou reakci (Tab. 5). Pouze v případě citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur byl pozorován vliv elicítace na vzhled listu, kdy bylo detekováno lokální žloutnutí. Tento efekt elicitinů byl po inokulaci patogenem *P. neolycopersici* zesílen. U tohoto genotypu byl zaznamenán inhibiční efekt elicítace na

vývoj patogenu. Souvislost mezi aktivací vývoje patogenu a potlačením nekrotické reakce po inokulaci patogenem u rostlin ošetřených elicitinem lze pozorovat u odolnějších genotypů. Z výsledků je zřejmé, že u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* a rezistentního genotypu *S. habrochaites*, pro které je charakteristická po inokulaci patogenem *P. neolyopersici* aktivace obranných mechanismů vedoucí k silné nekrotické reakci, elicitaci, s výjimkou Cry V84F, bylo pozorováno potlačení nekrotické reakce rostlinného pletiva. Pouze v případě aplikace Inf s mutací v poloze 13 byla naopak u *S. chmielewskii* detekována zesílená nekrotická reakce a současně byl potlačen vývoj patogenu. Tyto výsledky potvrzují významnou roli hypersenzitivní reakce spojenou s nekrotickou aktivitou v rámci obranných mechanismů rostlin vedoucích ke zvýšení odolnosti k biotrofním patogenům. V případě *S. lycopersicum* cv. MicroTom nedocházelo ke tvorbě nekrotických lézí po elicitaci ani po inokulaci patogenem *P. neolyopersici*. S tímto pozorováním se ztotožňuje i studie od Kawamura *et al.* z roku 2009, který nezaznamenal po elicitaci Inf žádné nekrotické efekty na tomto genotypu. Bazický Cry i kyselý elicitin Inf způsobují tvorbu nekrotických lézí v odlišné míře, která přímo koreluje s jejich aminokyselinovou sekvencí (Pernollet *et al.*, 1993). Dokládá *et al.* v roce 2012 studoval vliv mutantních forem kryptogeinu na tvorbu nekrotických lézí u *N. tabacum* L. cv. *Xanthi*, přičemž zaznamenal méně intenzivní tvorbu nekrotických lézí po aplikaci 250 nM Cry V84F ve srovnání s kryptogeinem. V případě předložené práce realizované na modelovém systému *Solanum*. spp. Cry V84F neovlivnil prokazatelně intenzitu nekrotické reakce spojené s infekcí patogenem *P. neolyopersici* (Tab 5). Během studií mutantních forem Cry byl nahrazen lysin v pozici 13 valinem. Ve studiích O'Donohue *et al.* (1995) byla na modelové rostlině tabáku detekovaná nižší nekrotická aktivita po aplikaci mutantní formy Cry K13V ve srovnání s Cry. Tomuto pozorování odpovídá reakce na úrovni fyziologických změn (žloutnutí listu) u *S. lycopersicum* cv. Amateur, kdy mutace Cry v poloze 13 měla menší efekt než samotný Cry a naopak mutace Inf v poloze 13 měla silnější efekt v porovnání s Inf a to jak u rostlin ošetřených pouze elicitem tak i v případě následné infekce patogenem *P. neolyopersici*. V případě genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*, disponujících obrannými mechanismy na základě nekrotické odpovědi v reakci na napadení biotrofními patogeny, mutanti elicitinů v poloze 13 naopak méně intenzivně potlačují nebo naopak v případě Inf u *S. chmielewskii* dokonce aktivují nekrotickou odpověď na patogen *P. neolyopersici* v porovnání s přírodními formami elicitinů. V rámci projektu zaměřeném na přípravu a studium působení mutantních forem kryptogeinu studovala Uhlíková *et al.* v roce 2016

vliv Cry s mutacemi lysinu na tvorbu nekrotických lézí na tabáku. Po aplikaci 5 nM roztoku kryptogeinu byly detekovány nekrotické léze na 60 % plochy tabákového listu. Po elicitaci 5 nM kryptogeinem K61T, K39T/K94T a K48T/K94T bylo detekováno potlačení tvorby nekrotických lézí (39, 47 a 52% plochy listu bylo pokryto nekrotickou). Po aplikaci 2,5 mg připravených proteinů na stonky seříznutých rostlin byl zaznamenán srovnatelný efekt působení Cry a jeho mutantních forem K61T a K94T (9-9,8 %). K potlačení tvorby nekrotických lézí na stoncích došlo výrazněji po aplikaci K39T/K94T a K48T/K94T (2,9-6,6 %). Po elicitaci 250 ng rekombinantního kryptogeinu na řapík listu byl zaznamenán inhibiční efekt na tvorbu nekrotických lézí vlivem Cry K39T, Cry K48T a Cry K48T/K94T (stopy nekrotických lézí). Po aplikaci mutantní formy s třemi modifikacemi Cry K39T/K48T/K94T nebyly pozorovány žádné stopy nekrotických lézí.

Huet *et al.* testoval již v roce 1993 efekt elicitinů včetně Cry a Inf (v dávkách 100 ng, 1 a 10 µg) na tabákové listy. Zjistil, že při uvedených koncentracích Inf vykazuje silnější nekrotický efekt ve srovnání s elicitem z *P. drechsleri* a *Phytophthora megasperma* var. *megasperma*. Zároveň ovšem jeho působení nebylo natolik silné, jako v případě Cry. Huet *et al.* (1993) detekoval také po aplikaci infestinu, parasiticeinu i capsiceinu na listech bramboru cv. Rosenal, silný nekrotický efekt již při dávce 1 µg. Také Polkowska-Kowalczyk *et al.* v roce 2004 studovala vliv Inf na *Solanum nigrum* var. *gigantea* (rezistentní vůči *P. infestans*) a *S. tuberosum* cv. Bzura (rezistentní) a jeho klon H-8105 (citlivý vůči *P. infestans*). Po 72 h od elicitace byly patrné pouze slabé nekrotické léze v případě rezistentních kultivarů, u citlivého klonu H-8105 byla patrná chloróza a výrazné nekrotické léze. Bariya *et al.* v roce 2011 studoval vliv elicitace Inf na systému *Solanum tuberosum* v průběhu patogeneze *P. infestans* a již po 24 h od elicitace zaznamenal chlorózu a nekrotické léze na listech rezistentních genotypů *S. tuberosum*, zatímco u citlivých genotypů se hypersenzitivní reakce vůbec neprojevila. Na základě studií od Vleeshouwers *et al.* z roku 2006 lze konstatovat, že reakce rostlin na aplikaci elicitinů se liší v závislosti na taxonu rostliny. Prokázal například, že v rámci rodu *Solanum* se mohou lišit reakce jednotlivých genotypů stejného druhu na aplikaci Inf. Tento poznatek naznačuje, že genetický základ odpovědi vůči elicitem je v rámci rostlinných taxonů velmi variabilní (Vleeshouwers *et al.*, 2006). Tyto výsledky korespondují s pozorováním v rámci předložené diplomové práce, kdy se liší významně vliv elicitinů na jednotlivé genotypy a dokonce i v případě stejného genotypu, ale rozdílného kultivaru (*S. lycopersicum* cv. MicroTom a cv. Amateur) (Tab. 5).

Pokud jsou rostliny vystavené stresové situaci, jako je např. napadení patogenem, rostlinná buňka reaguje širokou škálou obranných reakcí, v průběhu kterých dochází k otevření iontových kanálků a zvýšenému vstupu vápenatých iontů do cytosolu. Vápenaté ionty aktivují rostlinné NADPH oxidasy, jež hrají klíčovou roli v produkci ROS (Benschop *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2011). ROS poté spolu s dalšími obrannými mechanismy, jako je např. tvorba nekrotických lézí, zabezpečují rostlinám ochranu po dobu několika hodin až dní po infekci patogenem (Wi *et al.*, 2012, Dubiella *et al.*, 2013). První fáze produkce ROS nastává během několika minut po inokulaci patogenem, sekundární produkce ROS se objevuje v průběhu několika hodin až dní od napadení patogenem (Mittler *et al.*, 2011). V průběhu dalšího experimentu byl srovnán vliv aplikace elicitinů na produkci reaktivních forem kyslíku u jednotlivých rajčatových genotypů. Ze získaných výsledků je zřejmé, že po elicitaci rezistentního *S. habrochaites* došlo k nejintenzivnější produkci peroxidu vodíku i superoxidu (zejména po aplikaci Cry V84F a Inf V84F). Naopak u *S. lycopersicum* cv. Amateur nebyla detekována žádná produkce peroxidu vodíku po aplikaci elicitinů. Mutantní formy Inf způsobily u tohoto genotypu intenzivní aktivaci produkce superoxidu ve srovnání s Cry a jeho mutantními formami Cry K13V a Cry V84F, které indukovaly pouze jeho mírnou produkci. Inf neměl žádný efekt na produkci ROS. Zvýšená produkce peroxidu vodíku u *S. lycopersicum* cv. MicroTom byla aktivována zejména po aplikaci elicitinů s mutací v poloze 84 (Cry V84F a Inf V84F). Významně zvýšená produkce superoxidu byla detekována po elicitaci mutantními formami Cry (CryK13V a Cry V84F). Středně rezistentní genotyp *S. chmielewskii* reagoval na aplikaci elicitinů pouze lokální stopovou produkcí peroxidu vodíku. Aplikace Cry a jeho mutantních forem naopak u tohoto středně rezistentního genotypu výrazně podpořila produkci superoxidu. Grant a Loake v roce 2000 prokázali že Cry dvoufázově aktivuje produkci ROS V prvních minutách, kdy je rostlina vystavena působení elicitinu dochází k rychlé a přechodné produkci ROS, další fáze je specifická pro infekci patogenem, který vyvolává hypersenzitivní reakci a následuje v rámci dalších hodin. Již Lecourieux *et al.* v roce 2002 prokázal nárůst produkce ROS po elicitaci Cry u *Nicotiana plumbaginifolia*. Ashtamker *et al.* v roce 2007 detekoval po aplikaci 100 nM Cry na BY-2 buňky tabáku rychlou akumulaci peroxidu vodíku. Stimulační efekt kryptogeinu na produkci ROS u BY-2 tabákových buněk zaznamenal ve své práci i Lherminier *et al.* v roce 2009. Jak je již výše uvedeno výsledky předložené diplomové práce potvrzují, že efekt elicitace na aktivaci produkce ROS závisí na genotypu a jeho schopnostech aktivovat obranné reakce. Nejintenzivnější produkce ROS po elicitaci byla

detekována u rezistentního genotypu *S. habrochaites*. Dokládal *et al.* v roce 2012 studoval vliv elicítace Cry V84F na produkci peroxidu vodíku na modelové rostlině *N. tabacum* L. cv. *Xanthi*, přičemž stanovil, že produkce H₂O₂ byla po aplikaci mutantní formy elicitinu srovnatelná s působením Cry. V předložené práci byl zaznamenán stejný nebo zvýšený efekt na aktivaci produkce ROS elicitinu Cry i Inf s mutací v poloze 84 v porovnání s nativními formami elicitinů. Sasabe *et al.* v roce 2000 studoval vliv Inf na produkci peroxidu vodíku v BY-2 buněčné suspenzi tabáku, přičemž prokázal významnou aktivaci produkce H₂O₂. Tuto produkci téměř dvojnásobně zesílil přídavek superoxiddismutasy k elicitinu, která metabolizuje superoxid na peroxid vodíku. Na tuto studii navázal Saito *et al.* v roce 2006, který detekoval prostřednictvím luminiscenčních metod výrazně zvýšenou produkci NO a superoxidu v BY-2 tabákové buněčné suspenzi ošetřené Inf. Také Uruma *et al.* v roce 2009 prokázal již po 12 h po elicítaci Inf výrazně zvýšenou produkci ROS u *N. benthamiana*. Bariya *et al.* v roce 2011 studoval vliv aplikace Inf na produkci ROS na modelové rostlině *Solanum tuberosum*. Zaznamenal intenzivní produkci ROS u rezistentních genotypů ve srovnání s citlivými genotypy vůči *P. infestans*. Obdobných výsledků bylo dosaženo i v rámci diplomové práce, kdy u rezistentního *S. habrochaites* Inf významně aktivoval produkci ROS, zatímco u citlivého *S. lycopersicum* cv. *Amateur* Inf produkci reaktivních forem kyslíku neindukoval vůbec nebo jen stopově.

Peroxidasy reprezentují jednu z nejdůležitějších skupin antioxidačních enzymů, které se podílí na metabolismu ROS u rostlin (Hiraga *et al.*, 2001). Baysal *et al.* v roce 2005 prokázal, že peroxidasy přispívají k rezistenci rostlin vůči různým patogenům. Produkce peroxidu vodíku a superoxidu patří mezi první cytologicky a histochemicky detekovatelné reakce rostliny vůči patogenu či např. mechanickému poškození. ROS také napomáhají indukci hypersenzitivní reakce a slouží jako signální molekuly v procesu programované buněčné smrti (Hückelhoven a Kogel, 2003). Mlíčková *et al.* v roce 2004 stanovila změnu peroxidasové aktivity u rajčatových genotypů po infekci *P. neolycopersici*. Již v prvních 4-12 h po inokulaci prokázala prudký nárůst GPX aktivity u středně rezistentního *S. chmielewskii*. Další nárůst enzymové aktivity zaznamenala po 48 h od inokulace u *S. chmielewskii* i u rezistentního *S. habrochaites*. V době, kdy byl u těchto genotypů detekován nárůst peroxidasové aktivity, byl zároveň zaznamenán i výskyt prvních symptomů HR. Peroxidasová aktivita citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. *Amateur* byla ve srovnání s předchozími genotypy *S. habrochaites* a *S. chmielewskii* znatelně nižší, což korelovalo také s nízkou produkcí peroxidu vodíku,

rychlým vývojem patogenu na tomto citlivém kultivaru, přičemž nebyly detekované ani žádné nekrotické léze. Souvislost nárůstu peroxidase aktivity s intenzivní tvorbou nekrotických lézí popsal také Bestwick *et al.* ve své studii z roku 1998, kdy sledoval peroxidase aktivitu a hypersenzitivní reakci u *Lactuca sativa* L. po inokulaci *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Také Hückelhoven *et al.* v roce 1999 prokázal, že produkce peroxidu vodíku, který je substrátem peroxidasy, úzce koreluje s jejich enzymovou aktivitou a také s hypersenzitivní reakcí. První nárůst produkce peroxidu vodíku u genotypů rajčete byl detekován Mieslerovou *et al.* v roce 2004 během 3-12 h po inokulaci *P. neolycopersici*, kdy zároveň bylo pozorováno klíčení spor a tvorba appressoria patogenu. Další prudký nárůst produkce peroxidu vodíku byl zaznamenán u *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* v průběhu 48 hpi, což potvrdila i Tománková *et al.* v roce 2006, která uvedla, že sekundární nárůst produkce peroxidu vodíku i aktivity GPX je spojen s řadou reakcí, které vedou ke zvýšené obraně infikovaných rostlin projevující se jako hypersenzitivní reakce. Testované genotypy *Solanum* spp. se významně liší aktivitou APX i GPX za fyziologických podmínek (bez elicitace i bez inokulace patogenem). Vysoká bazální aktivita GPX i APX byla zjištěna u odolných genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*. Aktivita byla 3-4x vyšší v porovnání s aktivitou peroxidase u citlivých genotypů *S. lycopersicum* cv. Amateur a cv. MicroTom. Elicitace testovaných genotypů ovlivnila významně enzymovou aktivitu APX. Nejvýraznější nárůst aktivity APX byl zaznamenán po aplikaci všech elicitinů v případě genotypu *S. chmielewskii*. Naopak minimální efekt měla elicitace na aktivitu APX u *S. lycopersicum* cv. MicroTom. Aktivita APX u genotypu *S. habrochaites* byla stimulována zejména Inf s mutací v poloze 13. Celkově lze konstatovat, že mutace Cry v poloze 13 způsobila snížení enzymové aktivity APX ve srovnání s působením Cry a naopak mutace ve stejné poloze u Inf vedla ke zvýšení aktivity APX. Mutace v poloze 84 u Cry i Inf vedla ke zvýšení aktivity APX u odolných genotypů a to zejména v případě genotypu *S. chmielewskii*.

Aplikace elicitinů významně podpořila aktivitu guajakolové peroxidase u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur, nejintenzivnější nárůst aktivity nastal vlivem Cry a Inf s mutací v poloze 13. Minimální změny v aktivitě GPX způsobila elicitace *S. lycopersicum* cv. MicroTom. Enzymovou aktivitu GPX u rezistentního *S. habrochaites* významně zvýšila aplikace Inf a Cry V84F. Elicitace Cry s mutací v poloze 84 zvýšila aktivitu GPX v porovnání s efektem Cry u odolných genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*. V případě mutace Inf v poloze 84 byl zaznamenán nárůst APX aktivity v porovnání s vlivem Inf u všech testovaných genotypů s výjimkou *S. habrochaites*.

Mutantní forma Cry K13V snižovala enzymovou aktivitu ve srovnání s Cry. Naopak mutace v poloze 13 u Inf vedla ke zvýšení aktivity GPX v rámci testovaných genotypů. Bariya *et al.* se ve své práci z roku 2011 zaměřil na stanovení změny peroxidasové aktivity po aplikaci Inf u *S. tuberosum*, kdy detekoval vyšší peroxidasovou aktivitu ve srovnání s kontrolním vzorkem. Po 2-3 dnech od elicitace, kdy se objevily u *S. tuberosum* symptomy HR se enzymová aktivita peroxidas ještě zvýšila a přetrvávala po dobu následujících tří týdnů (Bariya *et al.*, 2011). Zvýšení enzymové aktivity APX i GPX po aplikaci infestinu bylo potvrzeno také v rámci experimentu diplomové práce v případě citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Inf výrazně stimuloval aktivitu APX i v případě *S. chmielewskii* a GPX u genotypu *S. habrochaites*. Sil *et al.* v roce 2015 provedl experiment s využitím kořenových vlásků *Withania somnifera* s transformovaným genem kódujícím β Cry, kdy potvrdil dvojnásobně zvýšenou aktivitu GPX ve srovnání s kontrolním vzorkem (bez transformovaného genu). Aplikace Cry v předložené diplomové práci měla pozitivní efekt na aktivitu APX i GPX u všech genotypů, nejvýrazněji v případě GPX u *S. lycopersicum* cv. Amateur a APX u genotypu *S. chmielewskii*.

Získané výsledky v rámci řešení diplomové práce poukazují na souvislost mezi efektem vyvolaným působením elicitinů (tj. aktivace/inhibice vývoje patogenu) a mechanismy obranných reakcí, kterými disponují jednotlivé genotypy *Solanum* spp.. Elicitace zvýšila odolnost citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur, naopak byla elicitací snížena odolnost rezistentního genotypu *S. habrochaites*, kdy bylo pozorováno potlačení HR, významného obranného mechanismu tohoto genotypu v reakci na patogen *P. neolycopersici*. Intenzivní produkce ROS vyvolaná elicitinu, zejména u genotypu *S. habrochaites* měla vliv na inhibici klíčení konidií patogena *P. neolycopersici*. Pro dokončení projektu by bylo vhodné dále doměřit vliv elicitace i v kombinaci s infekcí patogenem *P. neolycopersici* na aktivity APX a GPX, případně hladiny ROS. Předložená diplomová práce je součástí projektu, kde se dále stanovuje vliv elicitace na intenzitu postranlační modifikace, jako je S-nitrosylace, která může významně ovlivnit aktivitu enzymů metabolismu ROS jako je APX i NADPH oxidasa.

U citlivého genotypu *S. lycopersicum* Amateur, byla elicitací významně zvýšena odolnost rostliny na napadení patogenem *P. neolycopersici* (menší zastoupení konidií se 3 vlákny, zpomalení růstu klíčících vláken patogenu a snížení klíčivosti. Elicitiny způsobily chlorozu (lokální ztráta chlorofylu v listovém pletivu), která byla potencována po inokulaci patogenem. 48 h po elicitaci byla detekována pouze mírně zvýšená hladina superoxidu a zvýšená aktivita APX a GPX. U citlivého genotypu jednoznačně došlo elicitací k aktivaci obranných mechanismů a určitou roli budou hrát ROS a s tím spojená aktivace antioxidantních enzymů.

Druhý citlivý genotyp *S. lycopersicum* cv. MicroTom nereagoval na elicitaci v porovnání s ostatními genotypy významnými změnami sledovaných parametrů. Byl detekován vliv elicitace na snížení klíčivosti konicií, ale naopak elicitace podpořila růst a vývoj patogena, lze konstatovat, že po elicitaci byla snížena odolnost na patogen *P. neolycopersici*. U tohoto genotypu elicitace, ani patogenezise neaktivovaly obranné mechanismy na úrovni hypersenzitivní reakce.

V případě genotypu *S. chmielewskii* ovlivnila elicitace odolnost rostliny v závislosti na typu elicitinů. Cry a jeho mutantní formy snížily odolnost rostliny, naopak Inf a jeho mutantní formy odolnost rostliny zvýšily. S výjimkou Inf V13K/A14T měla elicitace vliv na potlačení nekrotické obranné reakce, která je charakteristická pro tento genotyp v reakci na infekci patogenem. Po elicitaci genotypu *S. chmielewskii* vykazoval pouze stopovou lokální produkci peroxidu vodíku. Naopak produkce superoxidu byla vlivem infestinu, kryptogeinu a jeho mutantních forem byla výrazně stimulovaná. Pro tento genotyp je charakteristická největší aktivace APX aktivity po elicitaci a naopak s výjimkou působení Cry V84F poměrně malá aktivace GPX aktivity.

Rezistentence genotypu *S. habrochaites* byla po elicitaci jednoznačně snížena, což lze dát i do souvislosti se sníženou hypersenzitivní aktivitou projevující se tvorbou nekrotických lezí jako typického projevu aktivace obranných mechanismů rostliny. Významně detekovaná hladina ROS po elicitaci může souviset i s nižší aktivací peroxidasy, v porovnání s genotypy *S. lycopersicum* Amateur a *S. chmielewskii*. Zvýšená koncentrace ROS po elicitaci může mít vliv na inhibici klíčení konidií patogena.

Při porovnání efektu Cry a Inf na produkci superoxidu a aktivaci antioxidantních enzymů byl významnější vliv Cry u většiny studovaných genotypů *Solanum* spp.. Po elicitaci Cry byl u všech genotypů pozorován větší inhibiční efekt na klíčení konidií. Oba elicitiny významně potlačily hypersenzitivní reakci na patogen *P. neolycopersici* u

odolných genotypů a v případě *S. lycopersicum* Amateur vyvolal Cry intenzivnější chlorozu v porovnání s Inf.

Mutace v poloze 13 Cry u většiny genotypů vyvolala nižší aktivaci APX i GPX a vyšší hladinu ROS a naopak mutace v poloze 13 Inf aktivaci POX zvýšila a vliv na hladinu ROS byl minimální v porovnání s efektem Inf. V případě mutace Inf v poloze 13 nebyl efekt na potlačení nekrotické reakci po infekci patogenem tak velký jako v případě Inf. Mutace v poloze 84u obou elicitinů způsobila u většiny genotypů aktivaci produkce superoxidu i tvorby peroxidu vodíku.

6. ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřená na studium vlivu aplikace elicitinů Inf a Cry včetně jejich mutantních forem s modifikacemi v poloze 13 a 84 na obranné mechanismy rostlin, které byly studovány na modelovém systému čtyř genotypů *Solanum* spp. významně se lišících svou odolností na patogen *P. neolycopersici*. Z výsledků a navazující diskuze diplomové práce vyplývají následující závěry:

1. Byla stanovena odolnost genotypu *S. lycopersicum* cv. MicroTom na patogen *P. neolycopersici* – jedná se o spíše citlivý genotyp.
2. Elicitace zvýšila odolnost na patogen *P. neolycopersici* pouze u citlivého genotypu *S. lycopersicum* Amateur. U rezistentních genotypů bylo naopak po elicítaci prokázáno snížení odolnosti, spojené s potlačením HR.
3. Zvýšená produkce ROS po elicítaci, zejména u rezistentního genotypu *S. habrochaites*, měla vliv na inhibici klíčení konidií patogenu.
4. Byl detekován výraznější vliv Cry na produkci superoxidu a aktivaci antioxidačních mechanismů ve srovnání s Inf u většiny studovaných genotypů *Solanum* spp..
5. Mutace v poloze 84 u obou elicitinů způsobila u většiny genotypů aktivaci produkce superoxidu i tvorby peroxidu vodíku.
6. Mutace v poloze 13 Cry u většiny genotypů vyvolala nižší aktivaci APX i GPX a vyšší hladinu ROS v porovnání s efektem Cry. Naopak mutace v poloze 13 Inf aktivaci POX zvýšila a vliv na hladinu ROS byl minimální v porovnání s efektem Inf.

7. LITERATURA

- Abello N., Kerstjens H. A., Postma D. S., Bischoff R. (2009): Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J. Proteome Res.* **8**, 3222–3238.
- Adachi H., Nakano T., Miyagawa N., Ishihama N., Yoshioka M., Katou Y., Yaeno T., Shirasu K., Yoshioka H. (2015): WRKY transcription factors fosforilyated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **27**, 2645-2663.
- Ahmad A., Khan I., Diwan H. (2013): Chromium toxicity and tolerance in crop plants. In: Crop improvement under adverse conditions. (Narendra T., Sarvajeet S.G.), Springer, New York, U.S.A, 309-326.
- Anderson R.G., Deb D., Fedkenheuer K., McDowell J.M. (2015): Recent progress in RXLR effector research. *Mol. Plant Microbe Interact* **28**, 1063–1072.
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Kubis J. (2009): Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in cucumber. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**, 177–186.
- Asada, K. (2006): Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* **141**, 391–396.
- Ashtamker C., Kiss V., Sagi M., Davydov O., Fluhr R. (2007): Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* **143**, 1817–1826.
- Astier J., Lindermayr C. (2012): Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *Int J Mol Sci.* **1**, 15193-15208.
- Astier J., Rasul S., Koen E., Manzoor H., Besson-Bard A., Lamotte O., Jeandroz S., Durner J., Lindermayr C., Wendehenne D. (2011): S-nitrosylation: an emerging post-traslation protein modification in plants. *Plant Science* **181**, 527-533.
- Bai X., Yang L., Tian M., Chen J., Shi J., Yang Y., Hu X. (2011): Nitric oxide enhances desiccation tolerance of recalcitrant *Antiaris toxicaria* seeds via protein S-nitrosylation and carbonylation. *Plos One* **6**, 1-11.
- Ball L., Accotto G.P., Bechtold U., Creissen G., Funck D., Jimenez A., Kular B., Leyland N., Mejia-Carranza J., Reynolds H., Karpinski S., Mullineaux P.M. (2004): Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defence gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 2448–2462.
- Barnes J., Zheng Y., Lyons T. (2002). “Plant resistance to ozone: the role of ascorbate.” In: *Air Pollution and Plant Biotechnology—Prospects for Phytomonitoring and Phytoremediation*. (Omasa K., Saji H., Youssefian S., Kondo N.), Springer-Verlag, Tokio, Japonisko, 235-252.
- Bariya S., Thakkar V. R., Thakkar A. N., Subramanian R.B. (2011): Induction of systemic resistance in different varieties of *Solanum tuberosum* by pure and crude elicitor treatment. *Indian Journal of experimental biology* **49**,151-162.
- Baxter A., Mittler R., Suzuki N. (2014): ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany* **65**,1229-1240.
- Baysal Ö., Gürsoy Y. Z., Örnek H., Duru A. (2005): Induction of oxidants in tomato leaves treated with DL-β-aminobutyric acid (BABA) and infected with *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *European Journal of Plant Pathology* **112**, 361-369.
- Beck M., Heard W., Mbengue M., Robatzek S. (2012): The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 367–374.
- Becker K., Gui M., Schirmer R. H. (1995): Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. *The FEBS Journal* **234**, 472-478.
- Beckman K. B, Ames B.N. (1998): The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**,547–581.
- Begara-Morales J. C., Chaki M., Sánchez-Calvo B., Mata-Pérez C., Leterrier M., Palma J. M., Barroso J.B., Corpas F.J. (2013): Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *J. Exp. Bot.* **64**, 1121–1134.

- 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. (2013): Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *J. Exp. Bot.* **65**, 527-538.
- Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Mata-Pérez C., Valderrama R., Padilla M. N., López-Jaramillo J., Luque F., Corpas F.J. Barroso J.B. (2015): Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *J. Exp. Bot.* **66**, 5983–5996.
- Bellin D., Asai S., Delledonne M., Yoshioka H. (2013): Nitric oxide as a mediator for defense responses. *The american phytopathological society* **26**, 271-277.
- Beltrán B., Orsi A., Clementi E., Moncada S. (2000): Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 953–960.
- Benschop J.J., Mohammed S., O’Flaherty M., Heck A.J., Slijper M., Menke F.L. (2007): Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signalling in *Arabidopsis*. *Molecular and cellular proteomics: MCP* **6**, 1198-1214.
- Besson-Bard A., Griveau S., Bedioui F., Wendehenne D. (2008): Real time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses. *Journal of Experimental Botany* **59**,3407–3414.
- Bestwick C.S. Brown I.R., Mansfield J.W. (1998): Localised changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant physiology* **118**, 1067-1078.
- Blein J. P., Milat M.L., Ricci P. (1991): Responses of cultured tobacco cells to cryptogein. a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiol.* **95**, 486-491.
- Blein J.P., Coutos-Thevenot P., Marion D., Ponchet M. (2002): From elicitors to lipid transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends in Plant Science* **7**, 293–296.
- Boissy G., de la Fortelle E., Kahn R., Huet J.C., Bricogne G., Pernollet J.C., Brunie S. (1996): Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* **4**, 1429-1439.
- Boller T., Felix G. (2009): A renaissance of elicitors: perception of microbe associated molecular patterns and danger signals by pattern recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 379–406.
- Bonardi V., Cherkis K., Nishimura M.T., Dangl J.L. (2012): A new eye on NLR proteins: focused on clarity or diffused by complexity? *Current Opinion in Immunology* **24**, 41–50.
- Bonardi V., Tang S., Stallmann A., Roberts M., Cherkis A., Dangl J.L. (2011): Expanded functions for a family of plant intracellular immune receptors beyond specific recognition of pathogen effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 16463–16468.
- 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.
- Bos J.I.B., Kanneganti T.D., Young C., Cakir C., Huitema E., Win J., Armstrong M., Birch P.R.J., Kamoun S. (2006): The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal* **48**, 165–176.
- Boscari A., Del Giudice J., Ferrarini A., Venturini L., Zaffini A.L., Delledonne M., Puppo A. (2013): Expression dynamics of the *Medicago truncatula* transcriptome during the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: which role for nitric oxide? *Plant Physiol.*, **161**, 425-439.
- Bottin A., Veronesi C., Pontier D., Esquerre-Tugayt M.T., Blein J.P., Rusterucci C., Ricci P. (1994): Differential responses of tobacco cells to elicitors from *Phytophthora* species. *Plant Physiol. Biochem.* **32**, 373-378.
- Bozkurt T. O., Schornack S., Banfield M. J., Kamoun S., (2012): Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 483-492.
- Cai J., Jones D.P. (1998): Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome *c* loss. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 11401–11404.
- Cam Y., Pierre O., Boncompagni E., Herouart D., Meilhoc E., Bruand C. (2012): Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytol.* **196**, 548-560.

- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., López-Jaramillo J., Luque F., Palma J.M., Pedrajas J.R., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Gómez-Rodríguez M.V., Corpas F.J., Barroso J.B. (2009): Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* **60**,4221–4234.
- Chaki M., Carreras A., López-Jaramillo J., Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Valderrama R., Corpas F.J., Barroso J.B. (2013): Tyrosine nitration provokes inhibition of sunflower carbonic anhydrase (β -CA) activity under high temperature stress. *Nitric Oxide* **29**, 30–33.
- Chaki M., de Morales P. Á., Ruiz C., Begara-Morales J. C., Barroso J. B., Corpas F. J., Palma J.M. (2015): Ripening of pepper (*Capsicum annuum*) fruit is characterized by an enhancement of protein tyrosine nitration. *Ann. Bot.* **116**, 637–647.
- Chaparro-García A., Wilkinson R.C., Gimenez-Ibanez S., Findlay K., Coffey M.D., Zipfel C., Rathjen J.P., Kamoun S., Shornack S. (2011): The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is required for basal resistance against the late blight pathogen *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. *Plos one* **6**, 1-10.
- Chen, Z., Gallie, D. R. (2006): Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiol.* **142**, 775–787.
- Chesnick J.M., Tuxbury K., Coleman A., Burger G., Lang F. (1996): Utility of the mitochondrial nad4L gene for algal and protistan phylogenetic analysis, *J. Phycol.* **32**, 452–456.
- Chun H.J., Park H.C., Koo S.C., Lee J.H., Park C.Y., Choi M.S., Kang C.H., Baek D., Cheong Y.H., Yun D.J., Chung W.S., Cho M.J., Chim M.Ch. (2012): Constitutive expression of mammalian nitric oxide synthase in tobacco plants triggers disease resistance to pathogens. *Mol Cells* **34**, 463-471.
- Clark D., Durner J., Navarre D.A., Klessig D.F. (2000): Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **13**,1380–1384.
- Cline E.T., Farr D.F., Rossman A.Y. (2008): A synopsis of *Phytophthora* with accurate scientific names, host range, and geographic distribution. *Plant Health Progress* **10**, 1-12.
- Corpas F.J., Alché J.D., Barroso J.B. (2013): Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in plant science* **4**, 1-3.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Quirós M., León A.M., Romero-Puertas M.C., Esteban F.J., Valderrama R., Palma J.M., Sandalio L.M., Gómez M., del Río L.A. (2004): Cellular and subcellular localisation of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology* **136**, 2722–2733.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., Leon A.M., Sandalio L.M., Río L.A. (2006): Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**, 246–254.
- Corpas F.J., Barroso J.B. (2014): Peroxisomal plant nitric oxide synthase (NOS) protein is imported by peroxisomal targeting signal type 2 (PTS2) in a process that depends on the cytosolic receptor PEX7 and calmodulin. *FEBS Lett.* **588**, 2049–2054.
- Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L. (2004): Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**, 900-905.
- Correa-Aragunde N., Foresi N., Delledonne M., Lamattina L. (2013): Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **64**, 3339–3349.
- Correa-Aragunde N., Foresi N., Lamattina L. (2015): Nitric oxide is ubiquitous signal for maintaining redox ballance in plant cells: regulation of ascorbat peroxidase as a case study. *Journal of experimental botany* **66**, 2913-2921.
- Croix C.M., Wasserloos K.J., Dineley K.E., Reynolds I.J., Levitan E.S., Pitt B.R. (2002): Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **282**, 185-192.
- Damiani I., Pauly N., Puppo A., Brouquisse R., Boscari A. (2016): Reactive oxygen species and nitric oxide control early steps of the *Legume-Rhizobium* symbiotic interaction. *Frontiers in plant science* **7**, 454.
- Dangl J.L., Horvath D.M., Staskawicz B.J. (2013): Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* **341**,746-751.

- Das K., Roychoudhury A. (2014): Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science* **2**, 1-53.
- Das P., Nutan K., Singla-Pareek S.L., Pareek A. (2015): Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles. *Frontiers in environmental science* **15**, 1-2.
- De Pinto M.C., Locato V., Sqobba A., Romero-Puertas M.C., Gadaleta C., Delledonne M., De Gara L. (2013): S-nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signalling in tobacco Bright-Yellow-2 cells. *Plant physiology* **163**, 1766-1775.
- Del Río L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gomez M. & Barroso J.B. (2002): Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1255–1272.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585–588.
- Derevnina L., Dagdas Y.F., De La Concepcion J.C., Bialas A., Kellner R., Petre B., Domazakis E., Du J., Chih-Hang W., 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.
- Dick M.W. (2001): Mycelial Peronosporomycetes: Downy Mildews and water moulds. In: *Straminipilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes Including Accounts of the Marine Straminipilous Protists, the Plasmodiophorids and Similar Organisms*. Kluwer Academic Publishers, London, Velká Británie, 123-169.
- Dobeš P., Kmunidem J., Mikei V., Damborsky J. (2004). Binding of Fatty Acids to β -Cryptogein: Quantitative structure-activity relationships and design of selective protein mutants. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **44**, 2126-2132.
- Dodds P. N., Rathjen J. P. (2010): Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Rev. Genet.* **11**, 539–548.
- Dokládál L., Obořil M., Stejskal K, Zdráhal Z., Ptáčková N., Chaloupková R., Damborský J., Kašparovský T., Jeandroz S., Žďárská M., Lochman J. (2012): Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *J. Exp. Bot.* **63**, 2203–2215.
- Dong X. (2004): NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 7547–7552.
- Drenth A., Goodwin S, Fry W., Davidse L. (1993): Genotypic Diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphisms, *Phytopathology* **83**, 1087–1092.
- Du J., Verzaux E., 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., Jacobsen E., Visser R.G., Kamoun S., Vleeshouwers V.G. (2015): Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nature Plants* **1**, 1-5.
- Dubiella U., Seybold H., Durian G., Komander E., Lassiq 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 National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 8744-8749.
- Durrant W.E., Dong X. (2004): Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 185–209.
- Egan M.J., Wang Z.Y., Jones M.A., Smirnov N., Talbot N.J. (2007): Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proc Natl Acad Sci U.S. A.* **104**, 11772-11777.
- Eltayeb A. E., Kawano N., Badawi G. H., Kaminaka H., Sanekata T., Shibahara T., Inanaga S., Tanaka K. (2007): Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* **225**, 1255–1264.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. (1996): Species description. In: *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A., 485-489
- Fabritius A.L., Shattock R.C., Judelson H.S. (1997): Genetic Analysis of metalaxyl insensitivity loci in *Phytophthora infestans* using linked DNA markers. *Phytopathology* **87**, 1034–1040.
- Fabritius A.L., Cvitanich C., Judelson H.S. (2002): Stage-specific gene expression during sexual development in *Phytophthora infestans*. *Mol. Microbiol.* **45**, 1057–1066.

- Fares A., Rossignol M., Peltier J. B. (2011): Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 331–336.
- Feechan A., Kwon E., Yun B.W., Wang Y., Pallas J.A., Loake G.J. (2005): A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **102**, 8054–8059.
- Ferrer-Sueta G., Radi R., (2009): Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol.* **4**, 161-167.
- Fini A., Brunetti C., Di Ferdinando M., Ferrini F., Tattini M. (2011): Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signal. Behav.* **6**, 709–711.
- Foresi N., Correa-Arragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L. (2010): Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *The plant cell* **22**, 3816-3830.
- Frein D., Schildknecht S., Bachschmid M., Ullrich V. (2005): Redox regulation: a new challenge for pharmacology. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 1–13.
- Fröhlich A., Durner J. (2011): The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): Is one really needed? *Plant Sci.* **181**, 401–404.
- Fry W., Goodwin S.B. (1997): Resurgence of the Irish potato famine fungus, *Bioscience* **47**, 363–371.
- Fry W.E., Grunwald N.J., Cooke D.E.L., McLeod A., Forbes G.A., Cao, K. (2009): 7. Population genetics and population diversity of *Phytophthora infestans*. In: Oomycete Genetics and Genomics. (Lamoun K., Kamoun S.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, U.S.A., 139-164.
- Fry W. E., McGrath M. T., Seaman A., Zitter T. A., McLeod A., Danies G., Small I. M., Myers K., Everts K., Gevens A. J., Gugino B. K., Johnson S. B., Judelson H., Ristaino J., Roberts P., Secor G., Seebold K., Snover-Clift K., Wyenandt A., Grünwald N. J., Smart C. D. (2013): The 2009 late blight pandemic in the eastern United States—Causes and results. *Plant Dis.* **97**, 296-306.
- Fu Z.Q., Dong X. (2013): Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annual reviews of plant biology* **64**, 839-863.
- Galatro A, Puntarulo S, Guiamet JJ, Simontacchi M (2013): Chloroplast functionality has a positive effect on nitric oxide level in soybean cotyledons. *Plant Physiol Biochem.* **66**, 26-33.
- Gallegly M.E., Galindo J. (1958): Mating types and oospore of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* **48**, 274–277.
- Gaupels F., Kuruthukulangarakoola G.T., Durner J. (2011): Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 707-714.
- Gebhardt C., Valkonen J.P. (2001): Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome, *Ann. Rev. Phytopathol.* **39**, 79-102.
- Gelhay E., Navrot N., Macdonald I.K., Rouhier N., Raven E.L., Jacquot J.P. (2006): Ascorbate peroxidase-thioredoxin interaction. *Photosynthesis Research* **89**, 193-200.
- Gilroy E.M., Taylor R.M., Hein I., Boevink P., Sadanandom A., Birch P.R.J. (2011): CMPG1-dependent cell death follows perception of diverse pathogen elicitors at the host plasma membrane and is suppressed by *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a. *New Phytologist* **190**, 653–666.
- Giraldo M., Valent B. (2013): Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature reviews. Microbiology* **11**, 800-814
- Godber B.L., Doel J.J., Sapkota G.P., Blake D.R., Stevens C.R., Eisenthal R., Harrison R. (2000): Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7757–7763.
- Grant J. J., Loake G.J. (2000): Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant physiology* **124**, 21-29.
- Gupta K.J., Stoimenova M., Kaiser W.M. (2005): In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ, *J. Exp. Bot.* **56**, 260105) B.
- Hahn M. G. (1996): Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 387-412.
- Hardham, A.R. (2005): *Phytophthora cinnamomi*. *Mol. Plant Pathol.* **6**, 589–604.

- Heller J., Tudzynski P. (2013): Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: Signalling, development and disease. *Annual review of phytopathology* **49**, 369-390.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. (2001): A large family of class III plant peroxidases. *Plant and cell physiology* **42**, 462-468.
- Ho H.H., Jong, S.C. (1991): Species concepts of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri*. *Mycotaxon* **40**, 35-39.
- Holzmeister C., Gaupels F., Geerlof A., Sarioglu H., Sattler M., Durner J., Lindermayr C. (2015): Differential inhibition of *Arabidopsis* superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *J. Exp. Bot.* **66**, 989–999.
- Horta M., Sousa N., Coelho A.C., Neves D., Cravador A. (2008): In vitro and in vivo quantification of elicitor expression in *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **73**, 48–57.
- Huang, C., Groot, T., Meijer-Dekens, F., Niks, R., & Lindhout, P. (1998): Hypersensitivity is the major mechanism of resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon* species. *European Journal of Plant Pathology*, **104**, 399–407.
- Hückelhoven R., Fodor J., Preis Ch., Koge K.H. (1999): Hypersensitive Cell Death and Papilla Formation in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus Are Associated with Hydrogen Peroxide but Not with Salicylic Acid Accumulation. *Plant Physiology* **119**, 1251–1260.
- Hückelhoven R., Kogel K.H. (2003): Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* **216**, 891–902
- Huet J.C., Sallé-Tourne M., Pernollet J.C. (1993): Amino acid sequence and toxicity of the α elicitor secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. *Phytochemistry* **34**, 1261-1264.
- Igamberdiev A. U., Seregelyes C., Manac N., Hill, R. D. (2004): NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta* **219**, 95–102.
- Ischiropoulos H. (2003): Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 776–783.
- Jamieson D.J. (1998): Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1511–27
- Jeandroz S., Lamotte O., Astier J., Rasul S., Trapet P., Besson-Bard A., Bourque S., Nicolas-Francès V., Ma W., Berkowitz G. A., Wendehenne D. (2013): There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca²⁺ signaling. *Plant Physiol.* **163**, 459-470.
- Jiang R. H. Y.; Tyler B. M.; Whisson S. C.; Hardham A. R.; Govers F. (2006): Ancient origin of elicitor gene clusters in *Phytophthora* genomes. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 338-351.
- Jones J. D. G., Dangl J. L (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Judelson H.S. (1997): Recent advances in the genetics of oomycete plant pathogens, *Mol. Plant Microb. Inter.* **9**, 443–449.
- Judelson H.S., Roberts S. (2002): Novel protein kinases induced during sporangial cleavage in the oomycete *Phytophthora infestans*. *Eukaryot. Cell*, **1**, 687–695.
- Jung H.W., Tschaplinski T.J., Wang L., Glazebrook J., Greenberg J.T. (2009): Priming in systemic plant immunity. *Science* **324**, 89–91.
- Kamoun S., Furzer O., Jones J. D., Judelson H. S., Ali G. S., Dalio R. J., Roy S. G., Schena L., Zambounis A., Panabières F., Cahill D., Ruocco M., Figueiredo A., Chen X. R., Hulvey J., Stam R., Lamour K., Gijzen M., Tyler B. M., Grünwald N. J., Mukhtar M. S., Tomé D. F., Tör M., Van Den Ackerveken G., McDowell J., Daayf F., Fry W. E., Lindqvist-Kreuzer H., Meijer H. J., Petre B., Ristaino J., Yoshida K., Birch P. R., Govers F. (2015): The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 413-434.
- Kamoun S.; Lindqvist H.; Govers F., (1997): A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 1028–1030.
- 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., van West P., Vleeshouwers V. G., de Groot K. E., Govers F. (1998): Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* **10**, 1413-1426.

- Kamoun S., Young M., Glascock C. B., Tyler B. M. (1993): Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**, 15-25.
- Kato H., Takemoto D., Kawakita K. (2013): Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in potato plant. *Physiol. Plant.* **148**, 371-386.
- 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.
- Kieffer F., Lherminier J., Simon-Plas F., Nicole M., Paynot M., Elmayan T., Blein J.P. (2000): The fungal elicitor cryptogein induces cell wall modifications on tobacco cell suspension. *Journal of experimental botany* **51**, 1799-1811.
- Kiffin R., Bandyopadhyay U., Cuervo A. M. (2006): Oxidative stress and autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 152-162.
- Kim K.S., Judelson H.S. (2003): Sporangium-specific gene expression in the oomycete phytopathogen *Phytophthora infestans*. *Eukaryot. Cell* **2**, 1376-1385.
- Ko W.H. (1998): Chemical stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* and *Phytium*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **39**,81-86.
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshioka H. (2007): Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *The Plant Cell* **19**, 1065-1080.
- Koornneef A., Pieterse C.M. (2008): Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol* **146**, 839-844.
- Kröncke K.D., Carlberg C. (2000): Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene regulatory role of nitric oxide. *FASEB Journal* **14**, 166-173.
- Kuc J. (1987): Translocated signals for plant immunization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **494**, 221-223.
- 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 Environ.* **38**, 331-348.
- Kumar A., Castellano I., Patti F.P., Palumbo A., Buia M.C. (2015): Nitric oxide in marine photosynthetic organisms. *Nitric oxide* **47**, 34-39.
- Kwon E., Feechan A., Yun B.W., Hwang B.H., Pallas J.A., Kang J.G., Loake G.J. (2012): AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*. *Planta* **236**, 887-900.
- Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R., Pugin A. (2002): Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant cell* **14**, 2627-2641.
- 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 Interaction* **22**, 921 868-881.
- Lin F., Ding H.D., Wang J.X., Zhang H., Zhang A.Y., Zhang Y., Tan M.P., Dong W., Jiang M.Y. (2009): Positive feedback regulation of maize NADPH oxidase by mitogen-activated protein kinase cascade in abscisic acid signalling. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3221-3238.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J.S. (2001): A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490-494.
- Liu P.P., von Dahl C.C., Klessig D. (2011): The extent to which methyl salicylate is required for signaling systemic acquired resistance is dependent on exposure to light after infection. *Plant Physiol* **157**, 2216-2226.
- Lozano-Juste J., León J. (2011): Nitric oxide regulates DELLA content and PIF expression to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **156**,1410-1423.
- Luna E., Bruce T.J.A., Roberts M.R., Flors V., Ton J. (2012): Next-generation systemic acquired resistance. *Plant physiology* **158**, 844-853.
- Marchand C., Le M.P., Meyer Y., Miginiac-Maslow M., Issakidis-Bourguet E., Decottignies P. (2004): New targets of *Arabidopsis* thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* **4**, 2696-2706.

- Marino D, Andrio E, Danchin EG, Oger E, Gucciardo S, Lambert A, A, Pauly N. (2011): A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol* **189**, 580-592.
- Martinez A., Peluffo G., Petruk A. A., Hugo M., Piñeyro D., Demicheli V., Moreno D.M., Lima A., Batthyány C., Durán R., Robello C., Martí M.A., Larrieux N., Buschiazza A., Trujillo M., Radi R., Piacenza L. (2014): Structural and Molecular Basis of the Peroxynitrite-mediated Nitration and Inactivation of *Trypanosoma cruzi* Iron-Superoxide Dismutases (Fe-SODs) A and B: disparate susceptibilities due to the repair of Tyr35 radical by Cys83 in Fe-SODB through intramolecular electron transfer. *J. Biol. Chem.* **289**, 12760–12778.
- Medeira C., Quartin V., Maia I., Diniz I., Matos M. C., Semedo J. N., Scotti-Campos P., Ramalho J.C., Pais I.P., Ramos P., Melo E., Leitao A.E., Cravador A. (2012): Cryptogein and capsicein promote defense responses in *Quercus suber* against *Phytophthora cinnamomi* infection. *Eur. J. Plant. Pathol.* **134**, 145-159.
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K., He S.Y. (2006): Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969-980.
- Meilhoc E., Boscarri A., Bruand C., Puppo A., Brouquisse R. (2011) Nitric oxide in *Legume-Rhizobium* symbiosis. *Plant Science* **181**, 573-581.
- Metraux J.P., Signer H., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz M., Gaudin J., Raschdorf K., Schmid E., Blum W., Inverardi B. (1990): Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**, 1004–1006.
- 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.
- Mieslerová, B., Lebeda, A., Kennedy R. (2004): Variation in *Oidium neolycopersici* development on host and non-host plant species and their tissue defence response. *Annals of Applied Biology*, **144**, 237–248.
- Mikes V., Milat M. L., Ponchet M., Ricci P., Blein J. P. (1997): The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett.* **416**, 190–192.
- Milat M.L., Ricci P., Blein J.P. (1991): Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Phytochemistry* **30**, 2171-2173.
- Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M.A., Shulaev V., Dangl J.L., Mittler R. (2009): The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* **2**, 28-45.
- Mills S.D., Förster H., Coffey M.D. (1990): Taxonomic structure of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* based on isoenzyme and mitochondrial DNA analysis. *Mycological Research* **95**, 31-48.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405–410.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., van Breusegem F. (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16**, 300–309.
- 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.
- Moche M., Stremlau S., Hecht L., Gobel C., Feussner I., Stohr C. (2010): Effect of nitrate supply and mycorrhizal inoculation on characteristics of tobacco root plasma membrane vesicles. *Planta* **231**, 425–436.
- Monteiro H.P., Arai R.J., Travassos L.R. (2008): Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling. *Antioxid Redox Signal* **10**, 843-890.
- Moreau M., Lindermayr C., Durner J., Klessig D. F. (2010): NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? *Physiol. Plant.* **138**, 372–383.
- Mullineaux P. M., Rausch T. (2005): Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosyn. Res.* **86**, 459–474.
- Noctor G., Mhamdi A, Foyer C.H. (2014): The roles of reactive oxygen metabolism in drought: Not so cut and dried. *Plant Physiology* **164**, 1636-1648.

- Noritake T., Kawakita K., Doke N. (1996): Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology* **37**, 113–116.
- O'Donohue M.J., Gousseau H., Huet J.C., Sallantin M., Tepfer D.A., Pernellet J.C. (1995): Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene coding for β -cryptogein, a *Phytophthora cryptogea* elicitor. *Plant Mol. Biol* **27**, 577-586.
- Ohtsu M., Shibata Y., Ojika M., Tamura K., Hara-Nishimura I., Mori H., Kawakita K., Takemoto D. (2014): Nucleoporin 75 is involved in the ethylene-mediated production of phytoalexin for the resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact.* **27**, 1318-1330.
- Oliva R., Win J., Raffaele S., Boutemy L., Bozkurt T. O., Chaparro-Garcia A., Segretin M. E. Stam R., Schornack S., Cano L. M., Van Damme M., Huitema E., Thines M., Banfield M. J., Kamoun S. (2010): Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell. Microbiol.* **12**, 705-715.
- Orozco-C'ardenas M.L., Narv'aez-V'asquez 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. *Plant Cell.* **13**,179–191
- Ortega-Galisteo A.P., Rodríguez-Serrano M., Pazmiño D.M., Gupta D. K., Sandalio L.M., Romero-Puertas M.C. (2012): S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **63**, 2089–2103.
- 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 E., 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.
- Peleg-Grossman S., Melamed-Book N., Cohen G., Levine A. (2010): Cytoplasmic H₂O₂ prevents translocation of NPR1 to the nucleus and inhibits the induction of PR genes in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* **5**, 1401-1406.
- Peng M., Kuc J. (1992): Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. *Phytopathology* **82**, 696–699.
- Pethybridge G. H., Lafferty H. A. (1919): A disease of tomato and other plants caused by a new species of *Phytophthora*. *Sci. Proc. R. Dublin Soc.* **15**, 487-503.
- Perazolli M., Dominici P., Romero-Puertas M.C., Zago E., Zeier J., Sonoda M., Lamb C., Delledonne M. (2004): *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin *AHb1* modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**, 2785-2794.
- Pernellet J.C., Sallantin M., Sallé-Tourne M., Huet J.C. (1993): Elicitor isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison on their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiological and molecular plant pathology* **42**,53-67.
- 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. *Enviromental and Experimental Botany* **74**, 37-44.
- Plešková V., Kašparovský T., Obořil M., Ptáčková N., Chaloupková R., Dokládál L., Damborský J., Lochman J. (2011): Elicitor-membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: Role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. *Plant physiology and biochemistry* **49**, 321-328.
- Polkowska-Kowalczyk L., Wielgat B., Maciejewska U. (2004): The elicitor-induced oxidative processes in leaves of *Solanum* species with differential polygenic resistance to *Phytophthora infestans*. *Journal of plant physiology* **161**, 913-920.
- Polverari A., Molesini B., Pezzotti M., Buonauro R., Marte M., Delledonne M. (2003): Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 10943) an.
- Ponchet M., Panabieres F., Milat M. L., Mikes V., Montillet J. L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y., Blein J. P. (1999): Are elicitors cryptograms in plant-oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 1020-1047.
- Prats E., Carver T.L., Mur L.A. (2008): Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus *Blumeria graminis*. *Res Microbiol* **159**, 476-480.

- 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. *Plant Cell* **9**, 2077-2091.
- Puppo A., Pauly N., Boscaro A., Mandon K., Brouquisse R. (2013): Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the *Legume–Rhizobium* and mycorrhizal symbioses. *Antioxid Redox Signal* **18**, 2202-2219.
- Porter S. (2013): Late Blight (*Phytophthora infestans*) found on Tomato in Illinois. *Home, Yard and garden pest* **15**, 1-6.
- Radi R. (2004): Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **101**, 4003-4008.
- Rafiqi M., Ellis J. G., Ludowici V. A., Hardham A. R., Dodds P. N. (2012): Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 477–482.
- Rahman T., Hosen I., Islam M.M.T. I, Shekhar H.U. (2012): Oxidative stress and human health. *Advances in bioscience and biotechnology* **3**, 1-23.
- Rasul S., Dubreuil-Maurizi C., Lamotte O., Koen E., Poinssot B., Alcaraz G., Wendehenne D., Jeandroz S. (2012): Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **35**, 1483-1499.
- Rhee S.G. (2006): H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* **312**, 1–2.
- Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., Siedow J.N. (2006): Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol* **141**, 357-366.
- Ribeiro E.A., Cunha F.Q., Tamashiro W.M.S.C., Martins I.S. (1999): Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett.* **445**, 283-286.
- 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. *The FEBS Journal* **183**,555-563.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M. (2002): Regulation of nitric oxide(NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro, *J. Exp. Bot.* **53**, 10302).
- Rodrigues M. L., Archer M., Martel P., Miranda S., Thomaz M., Enguita F. J., Baptista R. P., Melo E. P., Sousa N., Cravador A., Carrondo M. A. (2006): Crystal structures of the free and sterol-bound forms of beta-cinnamomin. *Biochimica et biophysica acta* **1764**, 110-121.
- Rodriguez-Serrano M., Pazmiño D.M., Sparkes I., Rochetti A., Hawes C., Romero-Puertas M.C., Sandalio L.M. (2014): 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid promotes S-nitrosylation and oxidation of actin affecting cytoskeleton and peroxisomal dynamics. *Journal of Experimental Botany* **65**, 4783-4793.
- Rojas C.M., Senthil-Kumar M., Wang K., Ryu C.M., Kaundal A., Mysore K.S. (2012): Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**, 336–352.
- Romero-Puertas M.C., Campostrini N., Matte A., Righetti P.G., Perazzolli M., Zolla L., Roepstorff P., Delledonne M. (2008): Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**, 1459–1469.
- Romero-Puertas M.C., Laxa M., Matte` A., Zaninotto F., Finkemeier I., Jones A.M.E., Perazzolli M., Vandelle E., Dietz K.J., Delledonne M. (2007): S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**, 4120-4130.
- Roychoudhury A., Pradhan S., Chaudhuri B., Das K. (2012). “Phytoremediation of toxic metals and the involvement of *Brassica* species.” In: *Phytotechnologies: Remediation of Environmental Contaminants.* (Anjum N.A., Pereira M.E., Ahmad I., Duarte A.C., Umar S., Khan N.A.), CRC press; Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, U.S.A., 219–252.
- Rumer S., Gupta K.J., Kaiser W.M. (2009): Plant cells oxidize hydroxylamines to NO, *J. Exp. Bot.* **60**, 20659) Bo.
- Ryals J. Uknes S., Ward E. (1994): Systemic acquired resistance. *Plant Physiology* **104**, 1109-1112.

- Saintenac C., Zhang W., Salcedo A., Rouse M.N., Trick H.N., Akhunov E., Dubcovsky J. (2013): Identification of wheat gene *Sr35* that confers resistance to *Ug99* stem rust race group. *Science* **341**, 783-786.
- Saito S, Yamamoto-Katou A, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (2006): Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* **47**, 689-697.
- Samalova M., Johnson J., Illes M., Kelly S., Fricker M., Gurr S. (2013): Nitric oxide generated by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* drives plant infection. *New Phytol* **197**, 207-222.
- Sasabe M., Takeuchi K., Kamoun S., Ichinose Y., Govers F., Toyoda K., Shiraishi T., Yamada T. (2000): Independent pathways leading to apoptic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *European Journal of biochemistry* **267**, 5005-5013.
- Savvides S. N., Scheiwein M., Bohme C. C., Arteel G. E., Karplus P. A., Becker K., Schirmer R.H. (2002): Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **277**, 2779–2784.
- Sehrawat A., Abat J. K., Deswal R. (2013). RuBisCO depletion improved proteome coverage of cold responsive S-nitrosylated targets in *Brassica juncea*. *Front. Plant Sci.* **4**, 342.
- Sharma P., Dubey R. S. (2004): Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Sci.* **167**, 541–550.
- Shao H. B., Liang Z. S., Shao M. A., Sun Q. (2005): Dynamic changes of anti-oxidative enzymes of 10 wheat genotypes at soil water deficits. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **42**, 187–195.
- Shi H.T., Li R.J., Cai W., Liu W., Wang C.L., Lu Y.T. (2012): Increasing nitric oxide content in *Arabidopsis thaliana* by expressing rat neuronal nitric oxide synthase resulted in enhanced stress tolerance. *Plant Cell Physiol* **53**, 344-357.
- Sil B., Mukherjee C., Jha S., Mitra A. (2015): Metabolic shift from withasteroid formation to fenylpropanoid accumulation in cryptogein-cotransformed hairy roots of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Protoplasma* **252**, 1097-1110.
- Singh, R. P., Hodson D.P., Huerta-Espino J., Jin Y., Bhavani S., Njau P., Herrera-Foessel S., Singh P.K., Singh S., Govindan V. (2011): The emergence of *Ug99* races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**, 465–481.
- Smilde W.D., Brigneti G., Jagger L., Perkins S., Jones J.D.G. (2005): *Solanum mochiquense* chromosome IX carries a novel late blight resistance gene *Rpi-moc1*. *Theor Appl Genet* **110**, 252-258.
- Souza J.M., Choi I., Chen Q., Weisse M., Daikhin E., Yudkoff M., Obin M., Ara J., Horwitz J., Ischiropoulos H. (2000): Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch Biochem Biophys* **380**, 360-366.
- Srivastava N., Gonugunta V.K., Puli M.R., Raghavendra AS. (2009): Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta* **229**, 757–765.
- Stamler J.S., Lamas S., Fang F.C. (2001): Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**, 675-683.
- Stamps D.J. (1978): *Phytophthora cryptogea*. *C.M.I. Descript. Pathog. Fungi Bact.* **592**, 1-2.
- Stevens N. (1933): The dark ages in plant pathology in America: 1830-1870, *Phytopathology* **23**, 435–446.
- Stohr C., Strube F., Marx G., Ullrich W.R., Rockel P. (2001): A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite, *Planta* **212**, 835001.
- 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 of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952-956.
- Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K., Shinozaki K. (2011): Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **41**, 649-660.
- Takahashi H., Shimizu A., Arie T., Rosmalawati S., Fukushima S., Kikuchi M., Hikichi Y., Kanda A., Takahashi A., Kiba A., Ohnishi K., Ichinose Y., Taguchi F., Yasuda C., Kodama M., Egusa

- M., Masuta C., Sawada H., Shibata D., Hori K., Watanabe Y. (2005): Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. *J Gen Plant Pathol* **71**, 8–22.
- 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.
- Tanou G., Filippou P., Belghazi M., Job D., Diamantidis G., Fotopoulos V., Molassiotis A. (2012): Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *Plant J.* **72**, 585–599.
- 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.
- 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.
- Trapet P., Kulik A., Lamotte O., Jeandroz S., Bourque S., Nicolas-Francès V., Rosnoblet C., Besson-Bard A., Wendehenne D. (2015): NO signaling in plant immunity: A tale of messengers. *Phytochemistry* **112**, 72–79.
- Truman W.M., Bennett M.H., Turnbull C.G., Grant M. (2010): *Arabidopsis* auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. *Plant Physiol* **152**, 1562–1573
- Tsukagoshi H., Busch W., Benfey P.N. (2010): Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**, 606-616.
- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E.I., Scherer G.F. (2006): Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology* **47**, 346–354.
- Turrion-Gomez J.L., Benito E.P. (2011): Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant. *Mol Plant Pathol* **12**, 606-616.
- Uhlíková H., Obořil M., Klemková J., Šedo O., Zdráhal Z., Kašparovský T., Skládal P., Lochman J. (2016): Elicitor-induced distal systemic resistance in plant sis mediated through the protein-protein interactions influenced by selected lysine residues. *Frontiers in plant science* **7**, nestránkováno.
- Uruma S., Shibata Y., Takemoto D., Kawakita K. (2009): *N, N*-dimethylsphingosine, an inhibitor of sphingosine kinase, induces phytoalexin production and hypersensitive cell death of *Solanaceae* plants without generation of reactive oxygen species. *J. Gen. Plant Pathol.* **75**, 257-266.
- Van der Vossen E.A.G., Gros J., Sikkema A., Muskens M., Wouters D., Wolters P., Pereira A., Allefs S. (2005): The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant J* **44**, 208-222.
- Vanlerberghe G.C. (2013): Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int J Mol Sci.* **14**, 6805-6847.
- Verbruggen N., Hermans C. (2008): Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **35**, 753–759.
- Vitecek J., Reinohl V., Jones R.L. (2008): Measuring NO production by plant tissues and suspension cultured cells. *Molecular Plant* **1**, 270---284.
- Vleeshouwers V.G., Driesprong J.D., Kamphuis L.G., Torto-Alalibo T., Van't Slot K.A., Govers F., Visser R.G., Jacobsen E., Kamoun S. (2006): Agroinfection-based high-throughput screening reveals specific recognition of INF elicitors in *Solanum*. *Molecular Plant Pathology* **7**, 499-510.
- Voothuluru P., Sharp R.E. (2013): Apoplastic hydrogen peroxide in the growth zone of the maize primary root under water stress. I. Increased levels are specific to the apical region of growth maintenance. *Journal of Experimental Botany* **64**, 1223–1233.
- Wang Y.Q., Feechan A., Yun B.W., Shafiei R., Hofmann A., Taylor P., Xue P., Yang F.Q., Xie Z.S., Pallas J.A., Chu C.C., Loake G.J. (2009): S-nitrosylation of *AtSABP3* antagonizes the expression of plant immunity. *J Biol Chem* **284**, 2131-2137..

- Wi S.J., Ji N.R., Park K.Y. (2012): Synergistic biosynthesis of biphasic ethylene and reactive oxygen species in response to hemibiotrophic *Phytophthora parasitica* in tobacco plants. *Plant physiology* **159**, 251-265.
- Wilson I.D., Neill S.J., Hancock J.T. (2008): Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* **31**, 622-631.
- Win J., Morgan W., Bos J., Krasileva K.V., Cano L.M., Chaparro-Garcia A., Ammar R., Staskawicz B.J., Kamoun S. (2007): Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Plant Cell* **19**, 2349-2369.
- Win J., Chaparro-Garcia A., Belhaj K., Saunders D.G., Yoshida K., Dong S., Schornack S., Zipfel C., Robatzek S., Hogenhout S.A., Kamoun S. (2012): Effector biology of plant associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **77**, 235-247.
- Wrzaczek M., Brosche M., Kangasjarvi J. (2013): ROS signaling loops—production, perception, regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 575-582.
- Xia X.J., Wang Y.J., Zhou Y.H., Tao Y., Mao W.H., Shi K., Asami T, Chen Z., Yu J.Q. (2009): Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiology* **150**, 801-814.
- Yamamoto-Katou A., Katou S., Yoshioka H., Noriyuki D., Kawakita K. (2006): Nitrate reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana benthamiana*. *Plant cell physiology* **47**, 726-735.
- 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 Physiol.* **167**, 1604-1615.
- Yoshida K, Schuenemann V.J., Cano L.M., Pais M., Mishra B., Sharma R., Lanz C., Martin F.N., Kamoun S., Krause J., Thines M., Weigel D., Burbano H.A. (2013): The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *eLife* **2**, 731.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S.H., Loake G.J. (2014): Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New phytologist* **202**, 1142-1156.
- 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.
- Zaffagnini M., De Mia M., Morisse S., Di Giacinto N., Marchand C. H., Maes A., Lemaire S.D., Trost P. (2016): Protein S-nitrosylation in photosynthetic organisms: a comprehensive overview with future perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 952-966.

7.1. Internetové zdroje:

- Helmholtz-Muenchen-German Research Center for Environmental Health homepage: <https://www.helmholtz-muenchen.de/institute-biochemical-plant-pathologie/research-groups-units/nitric-oxide-production-and-signalling/index.html> (23.7.2017).
- Ilri Research computing homepage: http://hpc.ilri.cgiar.org/beca/training/IMBB_2016/Phytophthora_CD_update/key/A%20Lucid%20Key%20to%20the%20Common%20Species%20of%20Phytophthora/Media/Html/Phytophthora_cryptogea.html (10.10.2017).
- http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:rcU-L9UQp14J:hpc.ilri.cgiar.org/beca/training/IMBB_2016/Phytophthora_CD_update/key/A%2520Lucid%2520Key%2520to%2520the%2520Common%2520Species%2520of%2520Phytophthora/Media/Html/Phytophthora_cryptogea.htm+&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz (30.3.2018).
- Forest *Phytophthoras* of the world homepage: <http://forestphytophthoras.org/gallery?species%5B%5D=2341&=Apply> (30.3.2018).
- Selman L., Andrews N., Stone A., Mosley A. (2008): What's wrong with my potato tubers? Diagnosing tuber abnormalities in western Oregon and Washington. *Oregon State University Extension Service and Western Region Sustainable Agriculture Research and Education*. <https://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/20496/em8948-e.pdf> (10.10.2017).

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA, AsA	askorbát
APS	adenosin-5-fosfosulfát
APX	askorbátperoxidasa
AVR	avirulentní efektory
BSA	hovězí sérový albumin
CAT	katalasa
Cry	kryptogein
DAB	diaminobenzidin
DHA	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EFR (EF-Tu)	elongation factor thermo unstable receptor (termolabilní elongační faktor)
ET	ethylen
ETI	effector – triggered immunity (efektorově vyvolaná imunita)
FLS2	flagellin-sensitive2 receptor (receptor citlivý na flagellin)
GPRX	glutathionperoxidasa
GPX	guajakolová peroxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion (redukováná forma)
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSSG	glutathion (oxidovaná forma)
GTP proteiny	proteiny vázající guanosintrifosfát
HR	hypersenzitivní reakce
Inf	infestin
JA	kyselina jasmonová
LRR	leucin-rich repeat (opakující sekvence bohatá na leucin)
MAMPs	microbe-associated molecular patterns (molekulární struktury asociované s mikroby)
MAPK	mitogenově-aktivovaná proteinkinasa
MDHA	monodehydroaskorbát
MDHAR	monodehydroaskorbátreduktasa
MeSA	methylsalicylát
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH oxidasa	NADPH oxidasa
NBS	nucleotide-binding site (vazebné místo pro nukleotidy)
NBS-LRR proteins	nucleotide-binding site leucine-rich repeat proteiny s opakující se sekvencí bohatou na leucin, jež tvoří vazebné místo pro nukleotidy
NBT	nitroblue tetrazolium (nitrotetrazoliová modř)
NiNOR	nitrit-NOreduktasa
NOS	syntasy oxidu dusnatého
NPR1	nonexpressor PR1 proteinů
NR	nitrátreduktasa

nsHbs	non-symbiotic hemoglobins (nesymbiotické hemoglobiny)
PAL	phenylalanine ammonia lyasa
PAMPs	pathogen – associated molecular patterns (molekulární struktury doprovázející patogen)
PCD	programmed cell death (programovaná buněčná smrt)
pI	isoelektrický bod
PLCP	papain-like cysteine protease phenylmethylsulfonylfluorid
PMSF	3- hydroxy-4- [2- sulfo-4-(sulfo-fenylazo) fenylazo] -2,7-naftalen -disulfonová kyselina
PR-proteins	pathogenesis related proteins (proteiny spojené s patogenezí)
PRRs	pattern recognition receptors (struktury receptoru rozpoznávající patogen)
PRX	peroxidasa
Prx II E	peroxiredoxin II E
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
PTI	PAMP-triggered immunity (imunitní odpovědi PAMPs)
RFLP	restriction fragment length polymorphism (jev, kdy restriční endonukleázy naštipou DNA na fragmenty o různé délce)
<i>Rpi</i> geny	druhově nespecifické R geny pro široké spektrum rezistence
SA	kyselina salicylová
SAR	systemově získaná rezistence
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti S-nitrosothioly
SNOs	dodecylsulfátu sodného
SOD	superoxiddismutasa
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethyldiamin
TF	transkripční faktor
TRX	thioredoxin
UV	ultrafialové záření
w/v	hmotnost na objem
XOR	xanthionoxidoreduktasa