

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Bc. Hana Krutinová

Fytohormony produkované askomycetou *Leptosphaeria maculans* jako efektory ovlivňující signální dráhy rostlin

Phytohormones produced by *Leptosphaeria maculans* as effectors
manipulating plant signaling pathways

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a doc. RNDr. Lenky Burketové, CSc., že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne.....

Podpis.....

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat doc. Ing. Lence Burketové, CSc. za možnost pracovat v její laboratoři a doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za vedení práce.

Velice děkuji Ing. Vladimíru Matěji Šaškovi, PhD za vše, co mě naučil, a Mgr. Lucii Trdé, PhD za pečlivou revizi práce a podnětné myšlenky.

Děkuji Ing. Mirce Novákové za pomoc s kultivací *L. maculans* a izolací hormonů, Ing. Martinu Jandovi za řadu věcných a motivačních připomínek, Bc. Monice Barešové za pomoc při nekonečném vzorkování a paní Myrtě Pařízkové za udržování výborného technického zázemí.

Děkuji Ing. Petru Dobrevovi, PhD a Mgr. Danuši Tarkowské, PhD za analýzu fytohormonů.

Velice děkuji Bc. Anetě Boučkové za korekci mé angličtiny.

Velmi si cením podpory své rodiny a přátel.

ABSTRAKT

Leptosphaeria maculans je patogenní houba způsobující fómové černání stonků řepky *Brassica napus*. V rámci této práce bylo zjištěno, že *L. maculans* produkuje *in vitro* řadu fytohormonů a dále se soustředila se na auxiny a brassinosteroidy. Z auxinů byla v myceliu nejvíce zastoupena IAA a její oxidační produkt OxIAA. Složení kultivačního media významně ovlivňuje zjištěnou koncentraci IAA. Přítomnost extraktu z rostlin *Brassica napus* v kultivačním mediu zvyšuje koncentraci IAA. V rostlinách, infikovaných *L. maculans*, byla zjištěna zvýšená koncentrace OxIAA oproti kontrolním rostlinám ošetřeným vodou. Byly zjištěny významné odlišnosti v produkci IAA mezi dvěma použitými sesterskými izoláty JN2 a JN3. V chemicky definovaném mediu Gamborg JN2 neprodukuje téměř žádnou IAA, JN3 produkuje IAA v koncentraci asi 1000 pmol/g čerstvé hmotnosti. Tato odlišnost byla využita jako model pro studium exprese genů biosyntetické dráhy auxinů v *L. maculans*. Tyto geny byly nalezeny na základě homologie s geny *Arabidopsis thaliana* (*YUCCA1.1* a *NIT1.2*) a *Ustilago maydis* (*IAD1.2* a *TAM1-2.1*). Pomocí ošetření prekurzory IAA (tryptofan a tryptamin) byla v izolátu JN2 pozorována zvýšená transkripce kandidátních genů biosyntézy auxinů. Po ošetření JN2 kultury tryptofanem a tryptaminem se zvýšila produkce IAA. U JN3 nebyla pozorována zvýšená transkripce genů ani vyšší koncentrace auxinů. Překvapivě byly transkripce kandidátních genů a syntéza IAA v JN2 indukovány i ošetřením GABA, která byla použita jako kontrolní dusíkatá sloučenina, u níž nebylo předpokládáno, že by byla prekurzorem auxinů.

V další části práce byla studována schopnost *L. maculans* syntetizovat brassinosteroidy. Jako hlavní brassinosteroid *L. maculans* byl zjištěn teasteron, který se v myceliu vyskytoval v sedmkrát vyšší koncentraci než ve vegetativních částech rostlin. Ostatní brassinosteroidy byly v myceliu nalezeny v nízkých koncentracích, které byly srovnatelné s koncentrací ve vegetativních částech rostlin. Byly nalezeny geny pravděpodobně se účastnící biosyntézy brassinosteroidů v *L. maculans* *CYP90A1*, *DET2*. Pro studium vlivu brassinosteroidů na průběh infekce *L. maculans* na *B. napus* byly připraveny vektory pro posttranskripční umlčení těchto genů.

Z dlouhodobého hlediska se tato práce snaží zjistit, zda by *L. maculans* mohla používat hormonální molekuly jako efektory při infekci hostitele.

ABSTRACT

Leptosphaeria maculans is the causal agent of blackleg disease in *Brassica napus*. In this thesis the ability of *L. maculans* to produce certain phytohormones was established. The thesis focused on auxins and brassinosteroids. Most commonly occurring natural auxin, IAA, and its inactive oxidation product, OxIAA, were found in highest concentration. In plants infected with *L. maculans* the concentration of OxIAA was higher when compared to control water-treated plants. A surprising difference in IAA production between two sister isolates of *L. maculans* was discovered. In chemically defined cultivation medium Gamborg JN2 isolate did not produce any IAA. JN3 on the other hand produced IAA in concentration around 1000 pmol/g FW. This difference was used for studying *L. maculans* putative auxin synthesizing genes. The candidate genes were identified as orthologs of *Arabidopsis thaliana* genes (*YUCCA1.1*, *NIT1.2*) and *Ustilago maydis* (*IAD1.2*, *TAM1-2.1*). An increased transcription level of the auxin biosynthesis candidate genes was observed in JN2 treated *in vitro* with auxin precursors (tryptophan, tryptamine). Increased IAA concentration was observed as well. No such effect was observed in JN3. Surprisingly, an increased candidate gene transcription and IAA concentration was observed also in JN2 treated with GABA, which was used as control nitrogen containing compound not supposed to be an auxin precursor.

The ability of *L. maculans* to produce brassinosteroids was studied in the second part of the thesis. Teasteron was identified as the most commonly occurring brassinosteroid in *L. maculans*. Concentration of teasteron in mycelium was sevenfold higher than in plant vegetative tissue. Other brassinosteroids in the mycelium were found in low concentration equal to concentration in vegetative plant tissues. Putative *L. maculans* brassinosteroid biosynthesis genes were identified as orthologs of *Arabidopsis thaliana* *CYP90A1*, *CYP90A2*, *DET2a* and *DET2b* genes. For establishing the role of brassinosteroid in *L. maculans* – *B. napus* infection process gene silencing vectors of these candidate genes were prepared.

A long term purpose of this thesis is to establish whether *L. maculans* may be using hormonal molecules as effectors during the infection process. In Czech.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PAMPs	Molekulové vzory spojené s patogeny (angl. pathogen associated molecular patterns)
2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (angl. 2,4-dichlorphenoxyacetic acid)
26-S	26-S proteasom
ABA	Kyselina abscisová (angl. Abscisic acid) 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina (angl. Aminocyclopropanecarboxylic acid)
ACC	ACC-synthasa (angl. ACC-synthase)
ACS	ACC-synthasa (angl. ACC-synthase)
AFB	Protein signální dráhy auxinů (angl. Auxin signaling F-box protein)
AHK	Histidin kinasa z Arabidopsis (angl. Arabidopsis histidine kinase) protein fosfotransferující Histidin Arabidopsis (Arabidopsis histidine phosphotransfer protein)
AHPs	
AO	Aldehyd oxidasa
ARR	Protein signální dráhy cytokininů (angl. Arabidopsis response regulátor)
AUX/IAA	Proteiny signální dráhy auxinů (angl. Auxin/indole-3-acetic acid protein)
Avr gen	Gen avirulence
AvrLm1-9	Geny avirulence <i>L. maculans</i> 1-9
BAK1	Kinasa v signální dráze brassinosteroidů (angl. BRI1-associated receptor kinase 1)
BES1	Transkripční faktory v signální dráze brassinosteroidů (angl. BRI-EMS supresor 1)
BKI1	Protein signální dráhy brassinosteroidů (angl. BRI1 kinase inhibitor 1)
Bra	Brassinolid
BRI1	Membránový receptor brassinosteroidů (angl. Brassinosteroid insensitive 1)
BRS	Brassinosteroidy
BSK1	Kinasa signální dráhy brassinsoterooidů (angl. BR signaling kinase 1)
BSU1	BRI1 suppressor 1
BTH	Benzothiadiazol Transkripční faktory signální dráhy brassinosteroidů (angl. Brassinazole resistant 1)
BZR1	
Cas	Castasteron
CK	Cytokininy
COI1	Receptor signální dráhy kyseliny jasmonové (angl. Coronatine insensitive 1)
CPS	ent-copalyldifosfátsynthasa (angl. ent-copalyldiphosphate synthase)
CTR1	MAPKK kinasa v signální dráze ethylenu (angl. Constitutive triple response 1)
CYP	Cytochrom P450 Gen, jehož produkt se účastní hydroxylace steroidního skeletu BRS (angl. De-etiolated-2)
DET2	
DFW4	Hydroxylasa účastníci se biosyntézy brassinosteroidů (angl. Dwarf4)
EIL1	Transkripční faktory signální dráhy ethylenu (angl. EIN like 1)
EIL2	Transkripční faktory signální dráhy ethylenu (angl. EIN like 2)
EIN2	Protein signální dráhy ethylenu (angl. Ethylene insensitive 2)

EIN3	Transkripční faktor signální dráhy ethylenu (angl. Ethylene insensitive 3)
ERF1	Skupina genů, kódující transkripční faktory, spouštějící expresi genů odpovídajících na ethylen (angl. Ethylene response factor 1)
ET	Ethylen
ETS	Náchylnost spouštěná efektoru (angl. Effector triggered susceptibility)
GA	Gibereliny
GABA	γ -aminomáselná kyselina (angl. γ -aminobutyric acid)
GID1	Receptor v signální dráze cytokininů (angl. GA insensitive dwarf 1)
IAA	Indolyl-3-octová kyselina (angl. Indol-3-acetic acid)
iaaH	IAM hydrolasa
iaaM	Tryptofan-2-monooxygenasa
IAD1	Indol-3-acetaldehyd dehydrogenasa 1 (angl. Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase 1)
IAD2	Indol-3-acetaldehyd dehydrogenasa 2 (indole-3-acetaldehyde dehydrogenase)
IAM	Indol-3-acetamid
IAOx	Indol-3-acetaldoxim
IG	Indol glukosinoláty
ITS1	Úsek na primárním transkriptu pro vznik ribosomální RNA, zde <i>ITS1</i> použit jako referenční gen pro kvantifikaci transkripce (angl. Internal transcribed spacer region 1)
IPDC	Indol-3-pyruvátdekarboxylasa (angl. Indol-3-pyruvát decarboxylase)
IPTs	Isopentenyltransferasy (angl. Isopentenyl transferases)
IPyA	Indol-3-pyruvát (angl. Indol-3- pyruvate)
JA	Kyselina jasmonová (angl. Jasmonic acid)
JA-Ile	Jasmonylisoleucin
JAZ	Doména proteinů signální dráhy kyseliny jasmonové (angl. Jasmonate zim-domain)
KS	ent-kaurensynthasa (ent-kaurene synthase)
LOG	Hydrolasa "Lonely guy"
MOS	Membránové proteinové přenašeče v signální dráze SA (angl. Modifier of snc)
NAA	Naftyloctová kyselina (angl. Naphtylacetic acid)
NIT	Nitrilasa
NPR1	Regulační protein signální dráhy SA (angl. Nonexpressor of pathogenesis related genes 1)
NPR3	Receptor v signální dráze kyseliny salicylové (angl. Nonexpressor of pathogenesis related genes 3)
NPR4	Receptor v signální dráze kyseliny salicylové (angl. Nonexpressor of pathogenesis related genes 4)
N-TAM	N-hydroxytryptamin
OPDA	12-oxofytoeinová kyselina
PAA	Fenyloctová kyselina (angl. Phenylacetic acid)
PDF1.2	Gen indukovaný kyselinou jasmonovou (angl. Plant defensin 1.2)
PIF	Transkripční faktory ovlivňující fytochrom (angl. Phy- interacting factor)
PP2C	Proteinfosfatasa typu 2 C (Protein phosphatase 2 C)

PR proteins	Proteiny spojené s patogenezí (angl. Pathogenesis related proteins)
PR-1	Protein spojený s patogenezí 1(angl. Pathogenesis related 1)
PRR	Receptor rozeznávající patogena (angl. pathogen recognition receptor)
PTI	Imunita spouštěná PAMPs (angl. PAMP triggered imunity)
PYR/PYL/RCAR	Proteiny signální dráhy kyseliny abscisové (angl. Pyrabactin resistance 1/Pyrabactin resistance 1-like /Regulatory component of ABA receptor)
R gen	Gen rezistence
Rlm	Geny rezistence <i>L. maculans</i>
SA	Kyselina salicylová (angl. Salicylic acid)
SAR	Systémově získaná odolnost (angl. System acquired resistance)
SCF	Charakteristické domény ubikvitinligasy (angl. Skp, Cullin, F-box containing comple Kinasa signální dráhy kyseliny abscisové (angl. Snf1-related protein kinase)
SnRK2	
SSP	Malé sekretované proteiny (angl. small secreted protein)
SUR1	S-alkylthiohydroximátlyasa (angl. S-alkyl-thiohydroximate lyase)
TAA	Tryptofan aminotransferasa (angl. Tryptophan aminotransferase) Aminotransferasa účastní se biosyntézy IAA v Arabidopsis (angl. Aminotransferase of Arabidopsis 1/Tryptophan aminotransferase related)
TAA1/TAR	
TAM	Tryptamin
TAM1	Tryptofanaminotransferasa 1
TAM2	Tryptofanaminotransferasa 2
TIR1	Receptor v signální dráze auxinů (angl. Transport inhibitor response 1)
TOL	Tryptofol
Trp	Tryptofan
TRX-H3	Thioredoxin H3
TRX-H5	Thioredoxin H5
Ub	Ubikvitin
WRKY	Transkripční faktory obsahující doménu s konzervovanou sekvencí aminokyselin WRKYGQK Flavinová monooxygenasa Arabidopsis (angl. Arabidopsis flavin monooxygenase)
YUCCA	

OBSAH

Poděkování.....	2
Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Seznam použitých zkratk.....	5
Obsah.....	8
1. Úvod.....	10
1.1 Obranné mechanismy rostlin proti patogenům.....	10
1.2 Fytohormony a jejich zapojení v obraně rostliny.....	13
1.2.1 Kyselina salicylová.....	16
1.2.2 Kyselina jasmonová.....	18
1.2.3 Kyselina abscisová.....	18
1.2.4 Ethylen.....	19
1.2.5 Gibereliny.....	20
1.2.6 Cytokininy.....	20
1.2.7 Brassinosteroidy.....	21
1.2.8 Auxiny.....	24
1.2.9 Biosyntéza auxinů.....	24
1.2.10 Přenos signálu a fyziologické účinky auxinů.....	27
1.2.11 Auxiny v patogenních a symbiotických houbách.....	28
1.3 Patogen <i>Leptosphaeria maculans</i>	29
2. Cíl práce.....	33
3. Materiál a metody.....	34
3.1 Seznam použitých chemikálií.....	34
3.2 Seznam použitých přístrojů a softwaru.....	35
3.3 Kultivace rostlin <i>Brassica napus</i>	35
3.4 Kultivace <i>Leptosphaeria maculans</i>	35
3.4.1 Charakteristika použitých izolátů.....	35
3.4.2 Kultivace v tekuté kultuře.....	36
3.4.3 Příprava spor.....	37
3.5 Inokulace rostlin sporymi <i>Leptosphaeria maculans</i>	37

3.6	Ošetření rostlin fytohormony	38
3.6.1	Ošetření postřikem	38
3.6.2	Ošetření infiltrací	38
3.7	Ošetření <i>L. maculans</i> prekurzory auxinů.....	39
3.8	Příprava extraktu z rostlin pro ošetření <i>L. maculans</i>	39
3.9	Odběr vzorků rostlinného pletiva a mycelia.....	39
3.9.1	Extrakce hormonů z pletiva nebo mycelia	39
3.9.2	Analýza hormonů pomocí LC-MS	40
3.10	Analýza genové exprese	40
3.11	Metody klonování a molekulární biologie	42
3.11.1	Kultivace bakterií <i>Escherichia coli</i> a <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
3.11.2	Příprava elektrokompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	43
3.11.3	Příprava kompetentních buněk <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
3.11.4	Transformace bakteriálních buněk	44
3.11.5	Vyhledání kandidátních genů pro biosyntézu brassinosteroidů a auxinů v <i>Leptosphaeria maculans</i>	44
3.11.6	Příprava vektorů pro umlčení genů <i>L. maculans</i>	44
4.	Výsledky	49
4.1	Produkce auxinů <i>L. maculans</i> v různých kultivačních mediích	49
4.2	Růst <i>L. maculans</i> v mediu s prekurzory syntézy auxinů	53
4.3	Výběr kandidátních genů biosyntetické dráhy auxinů	56
4.4	Produkce auxinů v rostlinách <i>Brassica napus</i> infikovaných spory <i>Leptosphaeria maculans</i>	59
4.5	Vliv exogenně aplikovaných auxinů na průběh infekce rostlin <i>Brassica napus</i> <i>Leptosphaeria maculans</i>	60
4.6	Produkce brassinosteroidů v <i>Leptosphaeria maculans</i>	61
4.7	Vliv exogenně aplikovaných brassinosteroidů na průběh infekce rostlin <i>Leptosphaeria maculans</i>	62
4.8	Výběr kandidátních genů biosyntézy brassinosteroidů	63
5.	Diskuse	67
6.	Závěr	72
7.	Použitá literatura	73

1. ÚVOD

Rostliny jsou podobně jako ostatní živé organismy neustále vystaveny vlivům prostředí, v němž žijí. Zároveň se u nich podobně jako u živočichů vyvinuly signální mechanismy zprostředkované hormony. Rostlinné hormony, fytohormony, jsou méně specifické než živočišné a výsledný jimi způsobený efekt je závislý na vzájemném poměru jejich koncentrací. Oproti živočišným jsou rostlinné hormony také odlišné strukturou. Stejně jako u živočichů najdeme v rostlinách nízkomolekulární látky s hormonální aktivitou. Tyto látky jsou velmi různorodé. Jsou to organické kyseliny, steroidní látky či látky odvozené od nukleotidů nebo polycyklických uhlovodíků. Takové hormony najdeme i u živočichů. U těch se ale navíc vyskytují i hormony s vyšší molekulovou hmotností, tedy peptidy a proteiny. V rostlinách zatím žádné takto složité hormony nebyly nalezeny¹.

Fytohormony mimo jiné zprostředkovávají stresovou signalizaci rostlin při napadení patogeny. V průběhu evoluce se tedy v rostlinách vytvořily složité signální mechanismy jako reakce na neustále se zdokonalující útoky patogenů. V posledních letech se pozornost fytopatologů obrátila na látky sekretované patogeny za účelem potlačení obranných reakcí hostitelské rostliny, čímž přispívají k virulentnosti patogenu. Tyto látky jsou označovány jako efekторы. Řada z nich byla popsána včetně odpovídajících receptorů v rostlinách a lze říct, že většina z dosud popsaných efektorů je proteinové povahy. Vzhledem k tomu, že je známo, že někteří patogeni biosyntetizují stejné nebo podobné hormony jako rostliny a využívají je k manipulaci hostitele, zaměřili jsme se na tuto skupinu látek. U mnoha patogenů byla zjištěna schopnost produkce látek totožných s rostlinnými hormony. To vedlo k hypotéze, že patogeni tyto hormony využívají k manipulaci obranných mechanismů hostitele. V této práci jsme se soustředili na produkci fytohormonů patogenem řepky *Leptosphaeria maculans* a vliv těchto hormonů na průběh infekce¹.

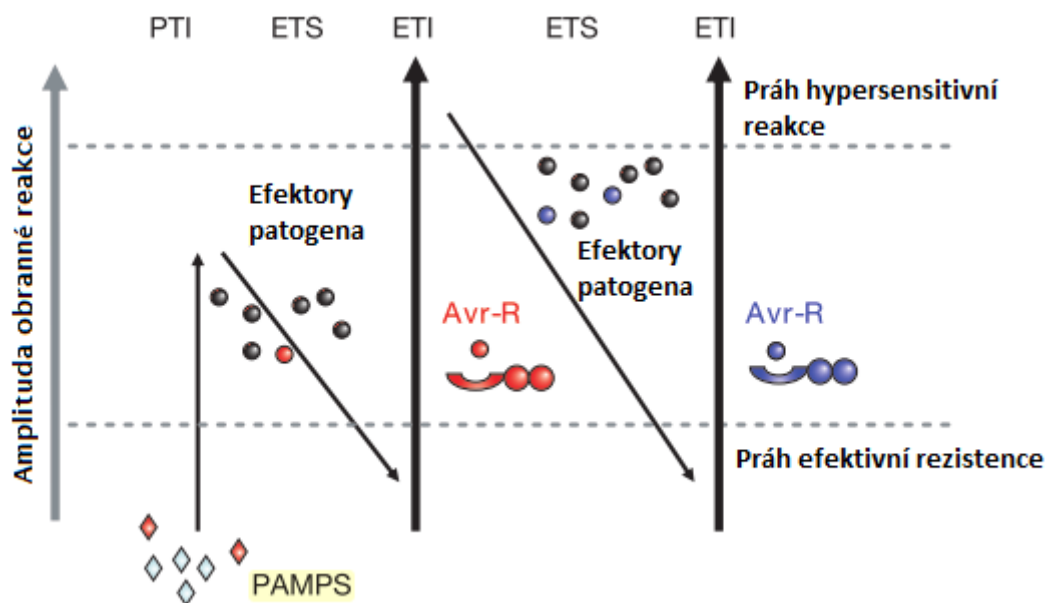
1.1 Obranné mechanismy rostlin proti patogenům

Rostliny žijí v komplexním prostředí, kde jsou neustále vystaveny útokům mnoha patogenů, mezi které patří viry, bakterie, houby, oomycety, hád'átka nebo hmyzí herbivoři. Tito patogeni používají řadu různých životních strategií k prolomení obrany svého hostitele. Všeobecně je možné je rozdělit na patogeny biotrofní a nekrotrofní. Nekrotrofní patogeni nejprve usmrtí rostlinné buňky, často pomocí fytotoxinů, a následně se živí mrtvým rostlinným pletivem. Biotrofové využívají k zisku živin metabolismus hostitele.

Často pronikají do rostlinných pletiv pomocí specializovaných útvarů, jako jsou haustoria, jimiž pronikají do buněk hostitele, aniž by je usmrtili. Mnoho patogenů může využívat obě tyto strategie v závislosti na fázi života, v níž se nacházejí, a jsou označováni jako hemibiotrofové¹.

Rostliny vyvinuly k obraně před těmito útoky řadu mechanických bariér a schopnost syntetizovat pro patogeny toxické látky. Mnoho patogenů ale tyto bariéry úspěšně překonává. Rostliny proto dále disponují mechanismy rozpoznávání útočnicka, které spouštějí rostlinnou imunitní odpověď. Nejprve jsou rostlinou rozeznány typické mikrobiální struktury, jako je flagelin, chitin, glykoproteiny nebo lipopolysacharidy². Společně jsou tyto molekuly označovány jako molekulové vzory spojené s patogenem (PAMPs – pathogen-associated molecular patterns), ale nacházejí se obecně i u ostatních mikroorganismů. PAMPs jsou rozpoznány receptory typu PRR (PRRs - pattern recognition receptors), které dále aktivují signální dráhu a skrze ni obranné reakce rostliny, označované jako imunita spouštěná PAMPs (PAMPs-triggered immunity, PTI, obrázek 1)³. Receptory PRR jsou umístěny na plazmatické membráně a jsou to zpravidla membránové kinasy (RLK -receptor-like kinase) nebo proteiny receptorového typu asociované s membránou (RLP-receptor-like protein)

Během evoluce patogeni vyvinuli molekuly, které injektují do rostlinných buněk hostitele a jimiž potlačují PTI. Tyto molekuly jsou označovány jako efekторы a výsledkem jejich interakce s hostitelem je tzv. náchylnost vyvolaná efektor (ETS – effector triggered susceptibility). Jako odpověď se u rostlin vyvinuly cytosolické receptory, které rozeznávají patogenní efekторы a spouštějí sekundární imunitní odpověď. Zda je výsledkem interakce rostlina-patogen nemoc nebo zdravá tkáň závisí na schopnosti patogena potlačit rostlinné obranné reakce a na schopnostech rostliny rozeznat patogena a aktivovat své obranné mechanismy.



Obrázek 1: Schéma rostlinné imunity, spouštěné PAMPs a efekty Rozpoznání PAMPs spouští rostlinné obranné reakce. Patogen obchází tyto obranné reakce pomocí efektorů, které snižují odolnost rostliny. Rostliny na obranu proti těmto efektorům vyvinuly geny rezistence (*R*), které reakcí se specifickými geny avirulence (*Avr*) patogena zvyšují odolnost rostliny. Výsledkem interakce je hypersensitivní reakce nebo efektivní rezistence rostliny. PTI – imunita vyvolaná patogenem, ETS – náchylnost vyvolaná efekty, ETI – imunita vyvolaná efekty. Upraveno dle².

V posledních letech bylo identifikováno mnoho signálních drah a obranných odpovědí účastnících se PTI a ETI. Patří mezi ně syntéza kalosy a ligninu a jejich ukládání do buněčné stěny, produkce antimikrobiálních sekundárních metabolitů, jako jsou fytoalexiny, a akumulace proteinů spojených s patogenezí (PR-proteins, pathogenesis-related proteins). Mezi PR proteiny se např. řadí chitinasy a glukonasy, které degradují buněčnou stěnu hub a oomycet. Rozpoznání specifických patogenních efektorů pomocí ETI je úspěšné zejména proto, že je následováno prudkým zvýšením koncentrace reaktivních forem kyslíku, které vede k hypersensitivní reakci a apoptóze buněk v místě průniku patogena rostlinným pletivem. Cílem je uzavřít patogena v napadeném místě a znemožnit mu infikovat další části rostliny⁴. Tuto obrannou strategii rostliny by mohli efektivně využívat nekrotrofní patogeni, proto je hypersensibilní reakce rostlinami používána především k obraně proti biotrofům. Imunitní odpovědi používané proti nekrotrofům jsou spouštěny spíše jako odpověď na patogenem produkované toxiny nebo molekulové vzory spojené s poškozením, jako například produkty degradace buněčné stěny. V případě, že je buněčná

stěna degradována enzymy patogena, mohou její fragmenty stimulovat obrannou odpověď rostliny¹.

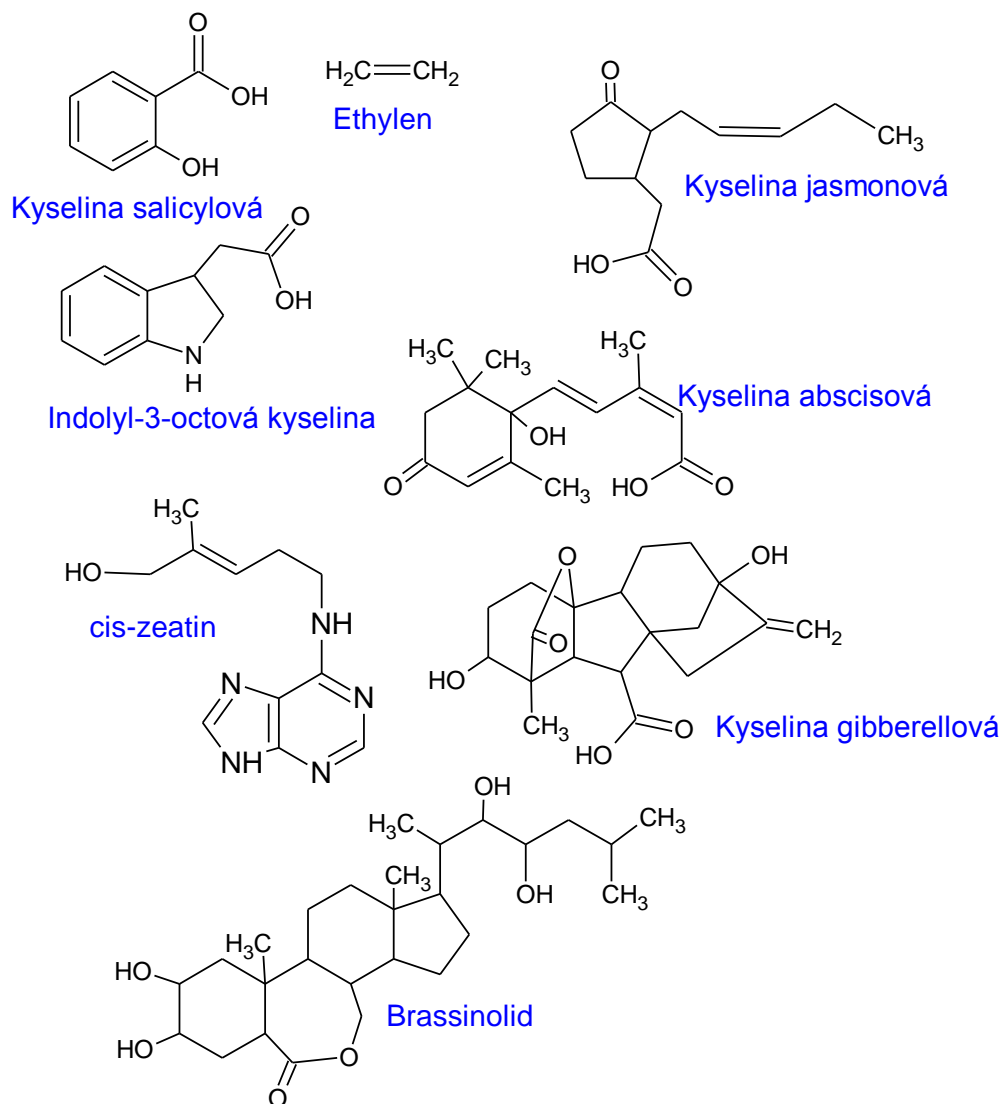
ETI a PTI vyvolávají v principu stejný typ imunitní odpovědi, pouze ETI je zpravidla silnější, rychlejší a často vede k některé z forem programované buněčné smrti. PTI je velmi účinná proti široké řadě mikroorganismů v procesu zvaném nehostitelská rezistence, zatímco ETI je účinná proti specifickým patogenům⁴.

V rostlinných patogenech se nachází řada genů určující jejich schopnost způsobit chorobu. Tyto geny jsou důležité například pro proces adheze, produkci fyto toxinů, odolnost vůči oxidačnímu stresu, degradaci buněčné stěny hostitele nebo reakci na obranné mechanismy hostitele. Exprese těchto genů bývá specificky regulována během různých fází procesu infekce. Naproti tomu určité skupiny genů omezují schopnosti rostlinných patogenů napadnout potenciální hostitele. Princip této specifity spočívá v interakci specifických genů rezistence rostliny (*R* geny) s tzv. geny avirulence (*Avr* geny) patogena. Produkty těchto *Avr* genů, *Avr* proteiny, aktivují rostlinné obranné mechanismy tak, že jsou rozpoznány proteiny, produkovanými *R* geny. Princip této interakce je tzv. gen proti genu a výsledkem absence funkce jednoho nebo obou participujících genů je rozvoj choroby⁵.

1.2 Fytohormony a jejich zapojení v obraně rostliny

Fytohormony jsou nízkomolekulární látky nezbytné pro regulaci rostlinných životních procesů. Podobně jako hormony živočichů se vyskytují v nízkých koncentracích, ale na rozdíl od živočišných hormonů jsou méně specifické a nejsou produkovány specializovanými žlázami. Jedna látka může vyvolávat řadu různých efektů a výsledná reakce záleží na konkrétním poměru koncentrací několika fytohormonů. Účastní se regulace růstu, vývoje, rozmnožování a reakce na abiotický a biotický stres způsobený patogeny.

Průběh této imunitní odpovědi na stres je modulován řadou rostlinných hormonů. Kyselina salicylová (SA) a kyselina jasmonová (JA) spolu se svými deriváty jsou hlavními obrannými fytohormony. Nicméně ostatní hormony jako etylen (ET), kyselina abscisová (ABA), gibereliny (GA), auxiny, cytokininy (CK) a brassinosteroidy (BRS) (Obrázek 2) přispívají též k modulaci imunitní odpovědi.



Obrázek 2: Příklady bioaktivních fytohormonů, které se účastní signalizace obranných reakcí rostlin. Kyselina gibberellová jako příklad giberelinu, cis-zeatin jako příklad cytokininu, brassinolid jako příklad brassinosteroidu.

Regulace hladin hormonů má vliv na řadu adaptací rostliny na stresové faktory. Změna poměru koncentrací a načasování těchto změn určuje, zda bude napadené pletivo odolnější či naopak náchylnější k útoku patogena. Nastartování imunitní odpovědi má ale zpravidla negativní vliv na růst a vývoj rostliny. Antagonistické a synergistické působení hormonů dává rostlině možnost regulovat imunitní odpověď na více úrovních a zároveň schopnost hospodařit efektivně s vlastními zdroji a neposkytovat tak patogenu své vlastní živiny⁶.

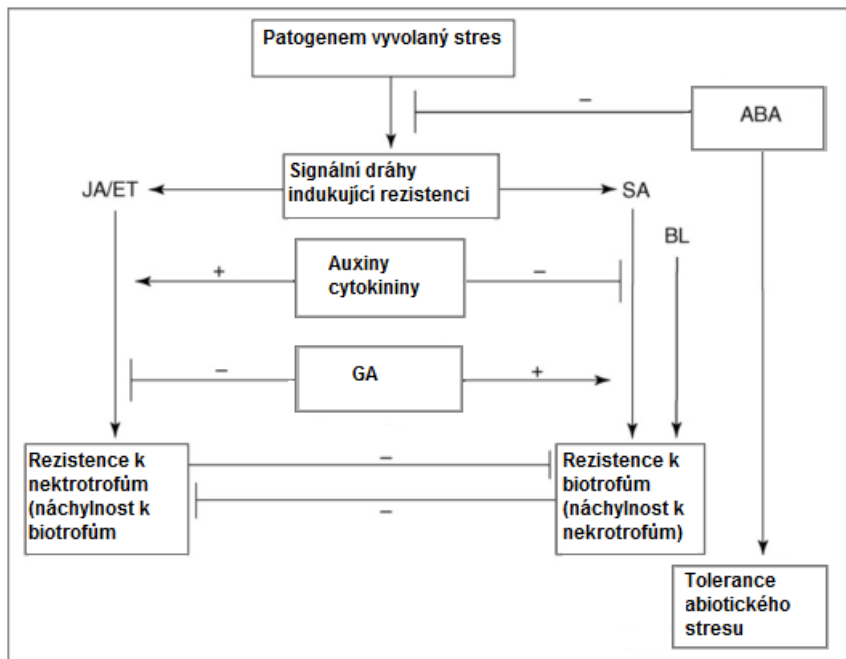
Hlavními dvěma složkami obranných hormonálních signálních drah je dráha SA a dráha JA. Dráha SA je aktivována zejména biotrofními patogeny, zatímco dráha kyseliny jasmonové a etylenu (JA/ET) vyvolává obranné reakce proti nekrotrofům. Tyto dvě dráhy

často působí antagonisticky (Obrázek 3). Poprvé byl tento antagonistický efekt popsán u rajčete. Bylo zjištěno, že SA a její derivát acetylsalicylová kyselina účinně potlačují odpověď na mechanické poranění, zprostředkované JA. Podobný efekt byl pozorován u *Arabidopsis*, kde indukce dráhy SA avirulentním kmenem biotrofního patogena *Pseudomonas syringae* potlačila signalizaci JA a rostliny byly následně více náchylné k rozvoji infekce nekrotrofem *Alternaria brassicicola*. Dalším příkladem je indukce dráhy SA inokulací biotrofem *Hyaloperonospora arabidopsidis* potlačila obranné reakce zprostředkované JA na napadení housenkami *Pieris rapae*⁶. Podobně indukce signalizace JA může potlačit dráhu SA. Tento efekt byl opět studován na *Pseudomonas syringae*. Tento patogen produkuje fytotoxin coronatin, který napodobuje bioaktivní derivát JA, jasmonyl-isoleucin a potlačuje tak signalizaci SA, čímž zvyšuje citlivost hostitele k *Pseudomonas syringae*. Přesný molekulární mechanismus antagonistického efektu JA k signalizaci SA není znám¹.

Vedle antagonistického působení obou hlavních hormonálních drah byla popsána i jejich synergistická interakce. Například ošetření *Arabidopsis* nízkou koncentrací SA a JA vyvolalo synergistický efekt u genů indukovaných JA (*PDF1.2*) a SA (*PR-1*). Ve vyšších koncentracích SA a JA byl pozorovaný antagonistický efekt, z čehož vyplývá, že výsledná reakce záleží na relativní koncentraci obou hormonů⁷.

Auxiny vyvolávají citlivost k biotrofním patogenům tak, že spouštějí dráhu JA/ET signalizace napadení nekrotrofem. Auxiny v těchto signálních drahách stimulují expresi genů účastnících se biosyntézy kyseliny jasmonové. Kyselina salicylová potlačuje expresi genů, regulovaných auxiny. Tento inhibiční efekt jasmonátové dráhy, způsobený SA stimuluje rezistenci rostliny k biotrofním a hemibiotrofním patogenům⁸.

Kyselina abscisová se účastní především signalizace abiotického stresu. Při signalizaci biotického stresu hraje roli negativního regulátoru, protože tlumí expresi genů aktivovaných JA/ET drahou. Také tlumí rezistenci, indukovanou kyselinou salicylovou¹.



Obrázek 3: Schéma interakce hlavních hormonálních drah při napadení rostliny patogenem. Patogen je rozpoznán rostlinou a jsou spuštěny signální dráhy indukující rezistenci. Navození rezistence proti nekrotrofnům je zprostředkováno drahou kyseliny jasmonové a etylenu (JA/ET). Navození rezistence proti biotrofům je způsobeno signální drahou drahou kyseliny salicylové (SA). Tyto dvě dráhy často působí antagonisticky. Auxiny a cytokininy působí synergisticky s drahou JA/ET. Gibereliny (GA) působí synergisticky s drahou SA. Kyselina abscisová (ABA) zpravidla zeslabuje obranné reakce proti patogenům, protože se účastní reakcí na abiotický stres. Upraveno dle ⁸.

1.2.1 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová (SA) byla poprvé izolována z vrbové kůry (*Salix*), odkud také pochází její název. V současnosti se SA a její deriváty využívají v medicíně. V rostlinách má vliv na fotosyntézu, indukci kvetení, transpiraci, transport iontů, anatomii listů a stavbu chloroplastů a především signalizaci spojenou se stresem, způsobeným patogenem.

Biosyntéza SA je spuštěna během PTI a ETI při rozeznání PAMPs nebo efektorů patogena a probíhá v chloroplastech⁹. Kyselina salicylová je fenolická sloučenina, která vzniká z chorismátu. Chorismát je následně přeměněn na fenylalanin, z něhož SA vzniká dvěma odlišnými drahami, které jsou spouštěny fenylalaninamoniomlyasou. Chorismát může být přeměněn v SA drahou neprobíhající přes fenylalanin, ale přes isochorismát pomocí isochorismátsynthasy a isochorismátpyruvátlyasy. V *Arabidopsis*, tabáku a rajčeti je největší část SA, která vzniká po napadení patogenem, vytvářena touto cestou. Většina

vytvořené SA je přeměněna v SA-O- β -glukosid enzymem SAglukosyltransferasou, jejíž exprese je patogenem indukovatelná. Biosyntéza SA-O- β -glukosidu probíhá v cytosolu, odkud je transportován do vakuoly. Zde je skladován a může být přeměněn zpět na SA. Dalšími endogenními neaktivními metabolity SA jsou ester SA a glukosy a methylsalicylát⁹.

Signální efekty kyseliny salicylové jsou řízeny regulačním proteinem NPR1 (non-expressor of pathogenesis related 1), který se po aktivaci kyselinou salicylovou chová jako transkripční koaktivátor velké skupiny obranných genů jako jsou transkripční faktory WRKY⁹ a geny PR (Pathogenesis related). Tato skupina genů spojených s patogenezí (PR-pathogenesis related) je velmi různorodá. Několik těchto genů kóduje proteiny s antimikrobiální aktivitou. Jedním z nejlépe charakterizovaných genů této skupiny je *PR-1* (Pathogenesis related 1), který se velmi často užívá jako referenční gen odpovědi na kyselinu salicylovou.

Důležitým krokem v signální dráze SA je přesun NPR1 do jádra. V nestresovaných buňkách se většina NPR1 nachází v cytoplazmě jako oligomer, který je vázán mezimolekulovými disulfidovými můstky, jejichž vznik je usnadněn S-nitrosylací NPR1 prostřednictvím S-nitrosoglutathionu. Během tohoto procesu je kovalentně navázán oxid dusnatý na thiolovou skupinu cysteinu. Zbývající malé množství monomerního NPR1 je ubikvitinylováno a degradováno proteasomem, aby nedocházelo k jeho transportu do jádra a aktivaci příslušných genů. Kyselina salicylová indukuje změnu redoxního stavu buňky a tím akumulaci monomeru NPR1. Oligomery jsou rozloženy thioredoxiny TRX-H3 a TRX-H5. Monomerní NPR1 se přesouvá do jádra a přes jadernou membránu přechází pomocí membránových proteinových přenašečů jako je MOS 3, 6 a 7 (Modifier of sncl). V jádře NPR1 interaguje s transkripčními faktory bohatými na leucinové zipy, konkrétně s faktory podrodiny TGA. Tyto transkripční faktory se váží na promotory genů, odpovídajících na kyselinu salicylovou, jako například *PRI*, a aktivují expresi těchto genů. Během tohoto procesu dojde k fosforylaci a následné ubikvitinylaci NPR1, který je poté degradován proteasomem. Regulace degradace probíhá pomocí NPR3 a NPR4, které jsou paralogy NPR1. NPR3 a NPR4 váží s různou afinitou SA a následně usnadňují přístup ubikvitin ligasy k NPR1 a tím stimulují jeho degradaci¹⁰. Toto odstranění NPR1 je nezbytné pro plnou indukci cílových genů, pravděpodobně proto, že je tak umožněn přístup nových monomerů NPR1 k promotorům⁶.

1.2.2 Kyselina jasmonová

Kyselina jasmonová reguluje vývojové procesy za stresových podmínek jako je napadení nekrotrofním patogenem, mechanické poškození, ozáření UV paprsky nebo vystavení ozonu¹¹.

Biosyntetická dráha JA vychází z kyseliny linolové (obsahuje dvě dvojně vazby), z níž vzniká kyselina linolenová (obsahuje tři dvojně vazby). Kyselina linolová je oxidována lipooxygenasou na (13S)-hydroperoxylinolenovou kyselinu, která je dále allenoxidsynthasou přeměněna na nestabilní allenoxidový meziprodukt. Ten je přeměněn na 12-oxofytoeinovou kyselinu (OPDA). OPDA je redukována OPDA-reduktasou a následně probíhají tři β -oxidační reakce¹². Vzniklá JA je konjugována s aminokyselinou isoleucinem do bioaktivní formy jasmonyl-isoleucinu (JA-Ile).

Pokud rostlina nečelí stresovým podmínkám je hladina jasmonátů nízká a transkripce genů, odpovídajících na JA je reprimována pomocí proteinů JAZ (Jasmonate ZIM-domain). Pokud je rostlina vystavena stresu jsou proteiny JAZ degradovány a exprese příslušných genů se zvyšuje. Signalizace začíná přechodem JA do aktivní formy JA-Ile, který se váže na receptor COI1 (Coronatine insensitive 1). Tento protein COI1 určuje substrátovou specifitu ubikvitinligasy SCF^{COI1} (SKP, Cullin, F-box containing complex). Ubikvitinligasa SCF v komplexu s COI1 interaguje s proteiny JAZ, čímž jsou označeny pro degradaci. Tento komplex je následně ubikvitinylován a degradován proteasomem. Signalizace je modulována přechodem jasmonátů z aktivní (JA-Ile) do neaktivní formy a syntézou proteinů JAZ¹³.

1.2.3 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je zapojena do procesů regulace růstu a klíčení, vývoje embrya, desikace semen, heterofylie a vývoje semenáčků. Dále má vliv především na hospodaření rostliny s vodou a je tedy zapojena především do signalizace abiotického stresu jako je sucho nebo zasolení. Exogenní aplikace kyseliny abscisové vyvolává u rostlin zavírání průduchů. Pokud je rostlina vystavena suchu, zvyšuje se systémově koncentrace kyseliny abscisové a dochází ke stimulaci růstu kořenů. V případě biotického stresu mohou zavřené průduchy bránit v průniku patogena do rostliny. Jiným popsáním efektem ABA při napadení patogenem je ovšem snížení obranných reakcí, vyvolaných jinými hormony¹⁴.

Prekurzorem pro syntézu ABA je zeaxanthin, který je syntetizován v plastidech a odtud transportován do cytosolu. V cytosolu je zeaxanthinepoxidasou přeměněn na violaxanthin. Z violaxanthinu dále vznikají dvěma souběžně probíhajícími reakcemi cis izomery violaxanthinu a neoxanthinu. Reakce katalyzují violaxanthinisomerasa a neoxanthinsynthasa. Takto vzniklé xantofyly jsou rozštěpeny a vzniká xanthoxin, který je převeden na abscisaldehyd a pomocí abscisaldehydoxidasy vzniká ABA¹⁴.

Signální dráha ABA probíhá prostřednictvím proteinů PYR/PYL/RCAR (Pyrabactin resistance 1/Pyrabactin resistance 1-like/Regulatory component of ABA receptor). V nepřítomnosti kyseliny abscisové nejsou tyto proteiny vázány na proteinfosfatasy typu 2C (PP2C). Takto aktivní PP2C zabraňují aktivaci SnRK2 (Snf1-related protein kinase). Po zvýšení koncentrace ABA dochází k inhibici PP2C pomocí PYR/PYL/RCAR a následně k akumulaci fosforylovaných SnRK2, které fosforylují příslušné transkripční faktory a spouštějí transkripci genů¹⁵.

1.2.4 Ethylen

Plynný rostlinný hormon ethylen (ET) reguluje elongaci buněk, vývoj kořenového vlášení, senescenci a opadávání květů a listů a zrání plodů. Klíční rostliny vykazují pod vlivem ethylenu charakteristickou tzv. trojí reakci (Triple response). Projevy této reakce jsou výrazně zakřivený vzrostný vrchol, stimulace radiálního růstu hypokotylu a inhibice dlouhivého růstu. Tato reakce je přirozeně pozorovatelná při překonávání mechanické bariéry pro růst, proto je intenzivně studován vliv ethylenu na signalizaci mechanického stresu. Ethylen je zapojen do signální dráhy JA. Koncentrace ethylenu a exprese synthasy ACS (Aminocyclopropanocarboxylic-acid-synthase), která syntetizuje hlavní prekurzor ethylenu, se zvyšuje po mechanickém zranění nebo okusu herbivorem¹⁶.

Biosyntéza ethylenu začíná přeměnou S-adenosylmethioninu na 1-aminocyklopropankarboxylovou kyselinu (ACC) pomocí synthasy ACS. Vedlejším produktem této reakce je methylthioadenosin. Dále je ACC oxidována ACCoxidasou. Produkty této reakce jsou ethylen, oxid uhličitý a kyanovodík¹⁷.

Ethylenové receptory jsou v jeho nepřítomnosti inhibovány pomocí MAPKK kinasy CTR 1 (Constitutive triple response 1). Po navázání ethylenu je tato aktivita CTR1 zablokována a signál je přenesen pomocí EIN2 (Ethylene insensitive 2). EIN2 následně reguluje dosud nepopsaným mechanismem transkripční faktory EIN3 (Ethylene insensitive 3) a EIL1

(Ethylene insensitive-like 1). EIN3 se naváže do příslušného vazného místa promotoru ERF1 (Ethylene response factor 1). ERF1 kóduje transkripční faktory genů, odpovídajících na ethylen. Tato signalizace je regulována degradací EIN3 a EIL1 v proteasomu¹⁸.

1.2.5 Gibereliny

Gibereliny (GA) jsou tetracyklické diterpenoidní sloučeniny zapojené do procesů regulace zrání semen, indukce kvetení a vývoje květů, trichomů a plodů.

Biosyntéza giberelinů vychází z geranylgeranyldifosfátu, který je běžným prekurzorem diterpenových a tetraterpenových sloučenin. Geranylgeranyldifosfát je přeměněn na *ent*-kauren ve dvoukrokové cyklizační reakci. Reakce je katalyzována enzymy *ent*-copalyldifosfátsynthasou (CPS) a *ent*-kaurensynthasou (KS). Následně je *ent*-kauren postupně oxidován a dochází ke zkrácení druhého uhlíkatého kruhu o jeden uhlíkový atom. Reakci katalyzuje *ent*-kaurenoxidasa a oxidasa *ent*-kaurenové kyseliny. Další sérii oxidačních reakcí vznikají bioaktivní gibereliny. Jako bioaktivní bylo z celkového počtu 126 giberelinů identifikováno pouze několik (GA₁, GA₃, GA₄ a GA₇)¹⁹.

Kyselina giberelová (GA) podporuje expresi genů potlačením aktivity represorových proteinů²⁰. Signalizace probíhá rozpoznáním GA pomocí receptoru GID1 (GA insensitive dwarf 1). V nepřítomnosti GA se proteiny DELLA váží na transkripční faktory známé jako faktory ovlivňující fytochrom (PIF – phytochrome interacting factors). V přítomnosti GA nastává konformační změna na GID1, který se váže na proteiny DELLA. Vzniklý komplex je následně ubiquitinylován a degradován. V důsledku toho tento proces uvolňuje transkripční faktory PIF a podporuje expresi odpovídajících genů⁸.

1.2.6 Cytokininy

Cytokininy (CK) stimulují zejména procesy spojené s růstem rostliny jako je specializace embryonálních buněk, výživa buněk meristémů, vývoj semenáčku a vaskularizace. Také je známo, že hrají velkou roli při interakci mezi rostlinou a mikroorganismy během vývoje hlízek a procesů patogeneze. Cytokininy jsou deriváty adeninu mající buď isoprenoidní nebo aromatický postranní řetězec. Mezi aktivní isoprenoidní cytokininy patří N⁶-(2- Δ^2 -isopentenyladenosin)-adenin, trans-zeatin, cis-zeatin a dihydrozeatin. Aromatické cytokininy pak jsou ortho-topolin, meta-topolin, jejich deriváty a benzyladenin. Aromatické cytokininy se vyskytují jen v některých rostlinných druzích²¹.

Biosyntéza isopentenylových a trans-zeatinových cytokininů začíná tvorbou isopentenyl nukleotidů pomocí adenosylfosfátisopentenyltransferas (IPTs), které mohou být převedeny na příslušné trans-zeatin nukleotidy pomocí cytochrom P450 monooxygenas. Isopentenylribosyltrifosfát a –difosfát jsou defosforylovány fosfatasami a isopentenylribosylmonofosfát a transzeatinribosylmonofosfát jsou převedeny na aktivní formu hydrolasami „Lonely guy“ (LOG). Cis-zeatinové cytokininy jsou v *Arabidopsis* syntetizovány výlučně pomocí tRNA isopentenyltransferas. Biologicky aktivní cytokininy jsou ireverzibilně inaktivovány cytokininoxidasami/dehydrogenasami. Konjugace se sacharidy za vzniku neaktivních O-glykosidů pomocí glykosyltransferas je reverzibilní²¹.

Přenos signálu začíná navázáním cytokininu na membránovou histidinkinasu AHK (*Arabidopsis* histidine kinase) a autofosforylací histidinového zbytku kinasové domény. Tato fosfátová skupina je přenesena na histidinový zbytek AHPs (*Arabidopsis* Histidine phosphotransfer proteins). AHP proteiny se přesunují do jádra, kde dochází k fosforylaci a aktivaci regulátoru ARR (*Arabidopsis* response regulator). Existují regulátory ARR dvou typů, A a B. ARR typu A fungují na principu negativní zpětné vazby. ARR typu B se váží na DNA a aktivují transkripci příslušných genů²².

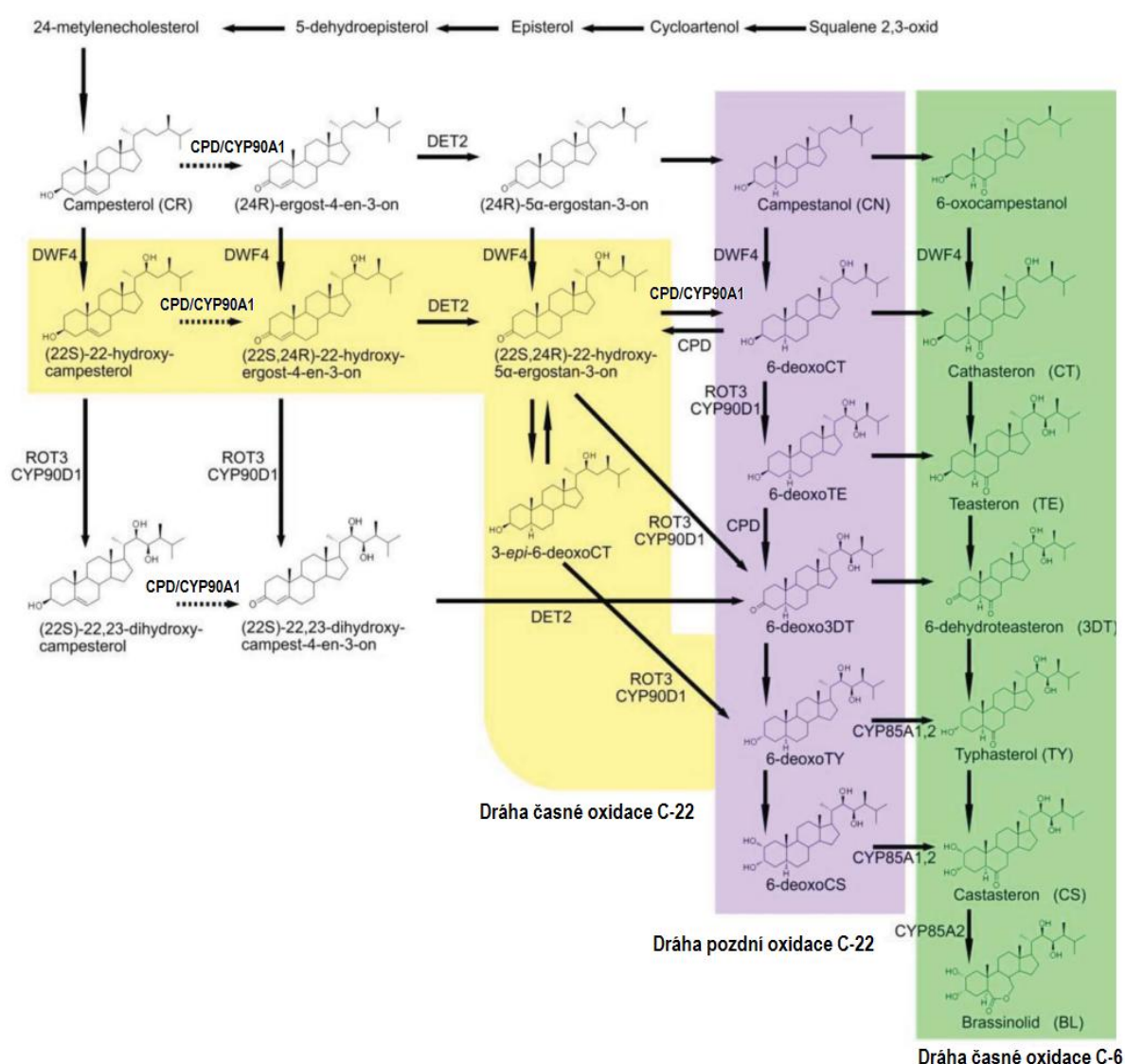
1.2.7 Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (BRS) jsou rostlinné hormony obsahující steroidní skelet s navázanými funkčními skupinami, převážně hydroxylovými. Změna v hydroxylaci steroidního skeletu modifikuje sílu odpovědi rostliny. Brassinosteroidy byly nalezeny ve všech částech testovaných rostlin, vyšší koncentrace byly zjištěny v mladém rostoucím pletivu. Nejvyšší koncentrace se pak nachází v pylu a nezralých semenech.

Podobně jako živočišné steroidní hormony jsou brassinosteroidy nezbytné pro růst, vývoj a rozmnožování rostlin. Mají vliv na dělení a růst buněk, diferenciaci cév, plodnost, regulaci kvetení a senescence a odpovědi na biotický a abiotický stres²³. Obranných reakcí rostlin se tedy BRS účastní různě. V případě vystavení rostliny oxidačnímu stresu, suchu, zasolení, teplotnímu stresu nebo těžkým kovům mají brassinosteroidy vliv na zvýšenou aktivitu enzymů jako je superoxidodismutasa, askorbátperoxidasa, katalasa a glutathionreduktasa, zvýšenou syntézu glutathionu, askorbátu, fytochelatinů, proteiny teplotního šoku a stimulaci fotosyntézy. V případě napadení patogeny mají brassinosteroidy vliv na syntézu ethylenu a kyseliny abscisové, PR proteinů ovlivněním syntézy SA, peroxidasy a polyfenoloxidas²⁴. Mutanti deficientní v syntéze nebo mající

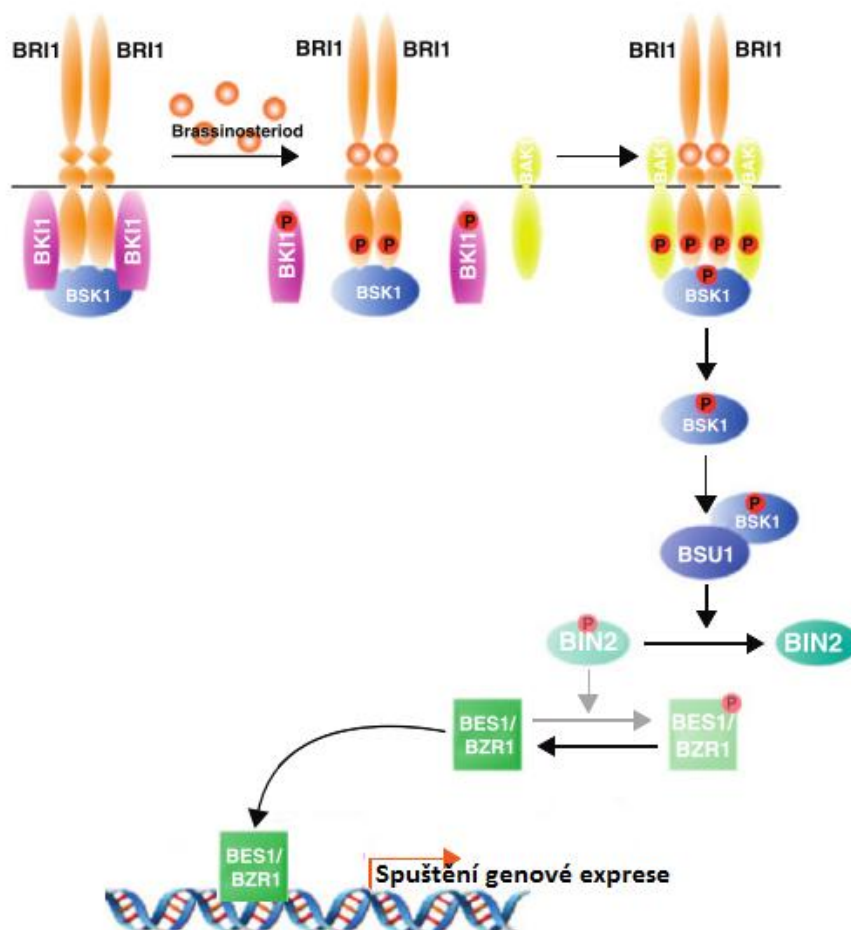
nefunkční receptory pro BRS jsou typicky malého vzrůstu s epinastickými listy a sníženou plodností. U většiny mutantů s defektní biosyntézou BRS může být navozen vzhled divokého typu exogenní aplikací brassinosteroidů.

Biosyntéza vychází z campesterolu, který je postupně hydroxylován za účasti mnoha enzymů obsahujících katalytickou skupinu cytochromu P450 na bioaktivní brassinolid. Dosud jsou známy tři hlavní biosyntetické dráhy. V dráze časně oxidace C-22 probíhá hydroxylování krok na C-22 pomocí hydroxylasy DWF4. Další dvě dráhy mají společný intermediát campestanol. Z campestanolu pokračuje dráha pozdní oxidace C-22 a nezávislá dráha časně oxidace C-6 (Obrázek 4)²⁵.



Obrázek 4: Schéma biosyntézy brassinosteroidů. Tři hlavní biosyntetické dráhy BRS. Žlutě je vyznačena dráha časně oxidace C-22, fialově pozdní oxidace C-22, zeleně dráha časně oxidace C-6. Přerušované šipky značí reakce, probíhající pravděpodobně ve více krocích. Upraveno dle²⁵.

Signální kaskáda začíná navázáním bioaktivního brassinolidu na extracelulární doménu kinasy membránového receptoru BRI1 (BR-insensitive 1), která fosforyluje negativní regulátor BKI1 (BRI1 kinase inhibitor1), který opustí membránu, čímž umožní BRI1 vytvořit komplex s BAK1 (BRI1-associated receptor kinase 1). Mezi BRI1 a BAK1 dochází k transfosforylaci, která vede k fosforylaci BSK1 (BR signaling kinase 1) a jejímu uvolnění z komplexu receptoru. Aktivní BSK1 asociuje a aktivuje BSU1 (BRI1 suppressor 1), která defosforyluje a inaktivuje kinasu BIN2 (BR insensitive 2). Poté dochází k akumulaci nefosforylovaných transkripčních faktorů BES1 (BRI1-EMS supresor 1) a BZR1 (Brassinazole resistant 1), které spouštějí transkripci příslušných genů²⁶ (Obrázek 5).



Obrázek 5: Schéma přenosu signálu pomocí brassinosteroidů. Po navázání aktivního brassinosteroidu na membránový receptor BRI1 dojde k sérii transfosforylačních kroků mezi BRI1, BKI1, BSK1 a BAK, jejichž výsledkem je uvolnění kinasy fosforylované kinasy BSK1 z komplexu receptoru. BSK1 interaguje s BSU1 a vzniklý komplex deaktivuje kinasu BIN2. Následně dochází k akumulaci nefosforylovaných aktivních transkripčních faktorů BES1/BZR1 a spuštění genové exprese. P – fosforylovaná forma. Upraveno dle²⁷.

1.2.8 Auxiny

Auxiny jsou významnou skupinou fytohormonů, podílející se zejména na stimulaci růstu a vývoje rostlin. Jako první se o endogenní látky, mající vliv na růst a pohyb rostlin zmiňují Charles Darwin a Francis Darwin v roce 1880. Tato látka byla později charakterizována jako indolyl-3-octová kyselina (IAA). Jde o nejčastěji se vyskytující aktivní auxin. Další popsané endogenní molekuly s auxinovou aktivitou jsou indolyl-3-másečná kyselina, fenyl-octová kyselina (PAA) a 4-chloroindolyl-3-octová kyselina. Syntetické molekuly s auxinovou aktivitou jsou například naftyl-1-octová kyselina nebo 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina. Souhrně lze tedy auxinové struktury popsat jako slabé organické kyseliny obsahující heterocyklus nebo aromatický kruh²⁸. Mimo rostlinnou říši byly nalezeny v některých houbách a půdních bakteriích²⁹. Některé z těchto organismů jsou rostlinnými patogeny³⁰. Fyziologické účinky auxinů byly studovány již v roce 1872 a k dnešnímu dni jich bylo popsáno značné množství. Již v roce 1937 byla objasněna struktura IAA. Naproti tomu biosyntéza auxinů je objektem zájmu v posledních letech. Hlavní biosyntetické dráhy vycházejí z tryptofanu a k dnešnímu dni jsou rozlišovány čtyři základní cesty syntézy IAA z tryptofanu (Obrázek 6). Názvy nesou podle prvního metabolického produktu tryptofanu, který v dráze následuje. Dále také pravděpodobně existuje alespoň jedna dráha nevycházející z tryptofanu, ale využívající meziprodukty syntézy tryptofanu z anthranilátu. V rostlinách je nejvýznamnější biosyntéza drahou indol-3-pyruvátu.

1.2.9 Biosyntéza auxinů

Dráha indol-3-acetaldoximu

V *Arabidopsis* je syntéza indol-3-acetaldoximu (IAOx) z tryptofanu katalyzována enzymy CYP79B2 a CYP79B3, které patří mezi enzymy obsahující cytochrom P450. Dále může IAOx vznikat z N-hydroxytryptaminu, který je hlavním meziproduktem jiné auxinové syntetické cesty. Je ale pravděpodobné, že zmíněné cytochromy jsou zodpovědné za největší část syntetizovaného IAOx v *Arabidopsis*. Expres těchto enzymů *Arabidopsis* v *Nicotiana tabacum* vedla také k syntéze IAOx. Zároveň se také zdá, že tato cesta není pro brukvovité nejvýznamnějším zdrojem IAA, ale je využívána k tvorbě indolových glukosinolátů, protože vyřazení obou zmíněných cytochromů nemělo u *Arabidopsis* výrazný vliv na koncentraci IAA³¹.

Dráha indol-3-acetamidu

V bakteriích *Agrobacterium tumefaciens* a *Pseudomonas savastanoi* je tryptofan přeměněn na indol-3-acetamid (IAM) pomocí tryptofan-2-monooxygenasy (iaaM). IAM je dále IAM hydrolasou hydrolyzován na IAA (iaaH). Přítomnost IAM byla zaznamenána i v některých rostlinách, například v kukuřici, tabáku, *Arabidopsis* nebo rýži. V *Arabidopsis* většina IAM pochází z IAOx dráhy a je metabolitem IAOx. Ostatní zmíněné rostliny ale postrádají homology cytochromů *CYP79B2/3*, zodpovědné za syntézu IAOx z tryptofanu a IAOx nesyntetizují, proto lze předpokládat, že v těchto rostlinách nalezneme enzymy podobné bakteriální tryptofan-2-monooxygenase zmíněné výše³².

Dráha tryptaminu

O syntéze IAA tryptaminovou (TAM) drahou se začalo uvažovat po zjištění účinků podobných auxinu na koleoptile ovsu, tedy již v 60. letech. Dále byl tryptamin detekován v rajčeti, rýži nebo *Arabidopsis*. Naproti tomu studie z roku 1991 uvádí na základě srovnání koncentrací IAA a TAM, značených D₂O, že TAM a IAA jsou syntetizovány z jiných zdrojů tryptofanu v dané rostlině a tedy, že TAM není hlavním prekurzorem IAA. Podobně rostliny tabáku zvýšeně exprimující Trp dekarboxylasu, která katalyzuje přeměnu Trp v TAM, akumulují vysoké množství TAM, které ale nemá vliv na množství IAA v rostlině³¹.

Zájem o tuto dráhu vzrostl po objevení rodiny genů YUCCA v *Arabidopsis*, u nichž se předpokládá hydroxylaci tryptaminu za vzniku N-hydroxytryptaminu. YUCCA homology byly nalezeny i v dalších rostlinách, například v rajčeti a kukuřici, ale zapojení do TAM dráhy je stále sporné³³.

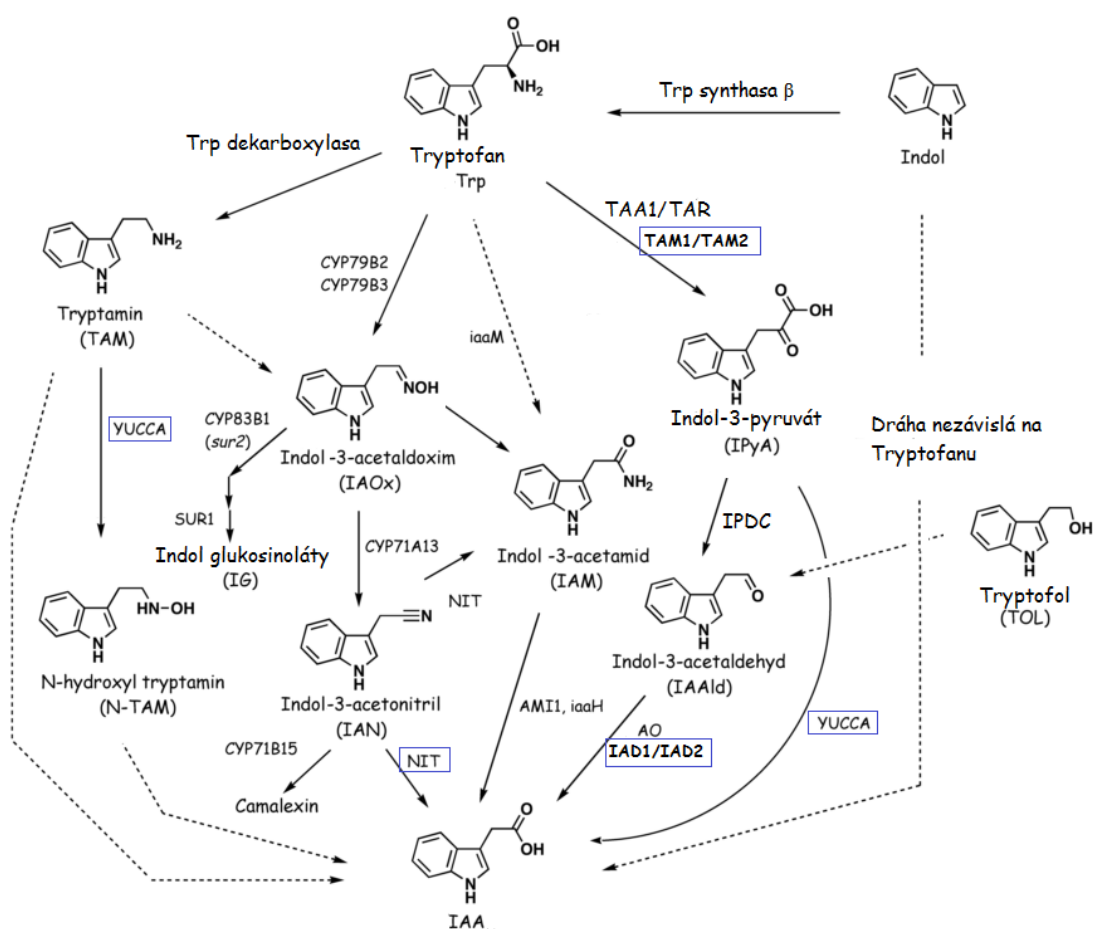
Dráha indol-3-pyruvátu

Tato dráha je velmi významná pro řadu mikroorganismů syntetizujících IAA a teprve v posledních pěti letech bylo zjištěno, že je neméně významná pro řadu druhů rostlin. Studium této dráhy komplikuje skutečnost, že indol-3-pyruvát (IPyA) snadno oxiduje a rozkládá se na IAA za laboratorní teploty. V *Arabidopsis* jsou v současnosti známy enzymy TAA1/TAR, které přeměňují tryptofan na IPyA, který je následně dekarboxylován a oxidován na IAA enzymy rodiny YUCCA. Ovšem v mutantech, exprimujících geny YUCCA v nadbytku oproti divokému typu, byly zjištěny pouze malé změny v koncentraci

IAA. Mnohem více byla zvýšena koncentrace metabolitů IAA, což vede k hypotéze, že rostlina velmi rychle odbourá přebytečnou IAA na neaktivní produkty^{34,33}.

Dráha nezávislá na tryptofanu

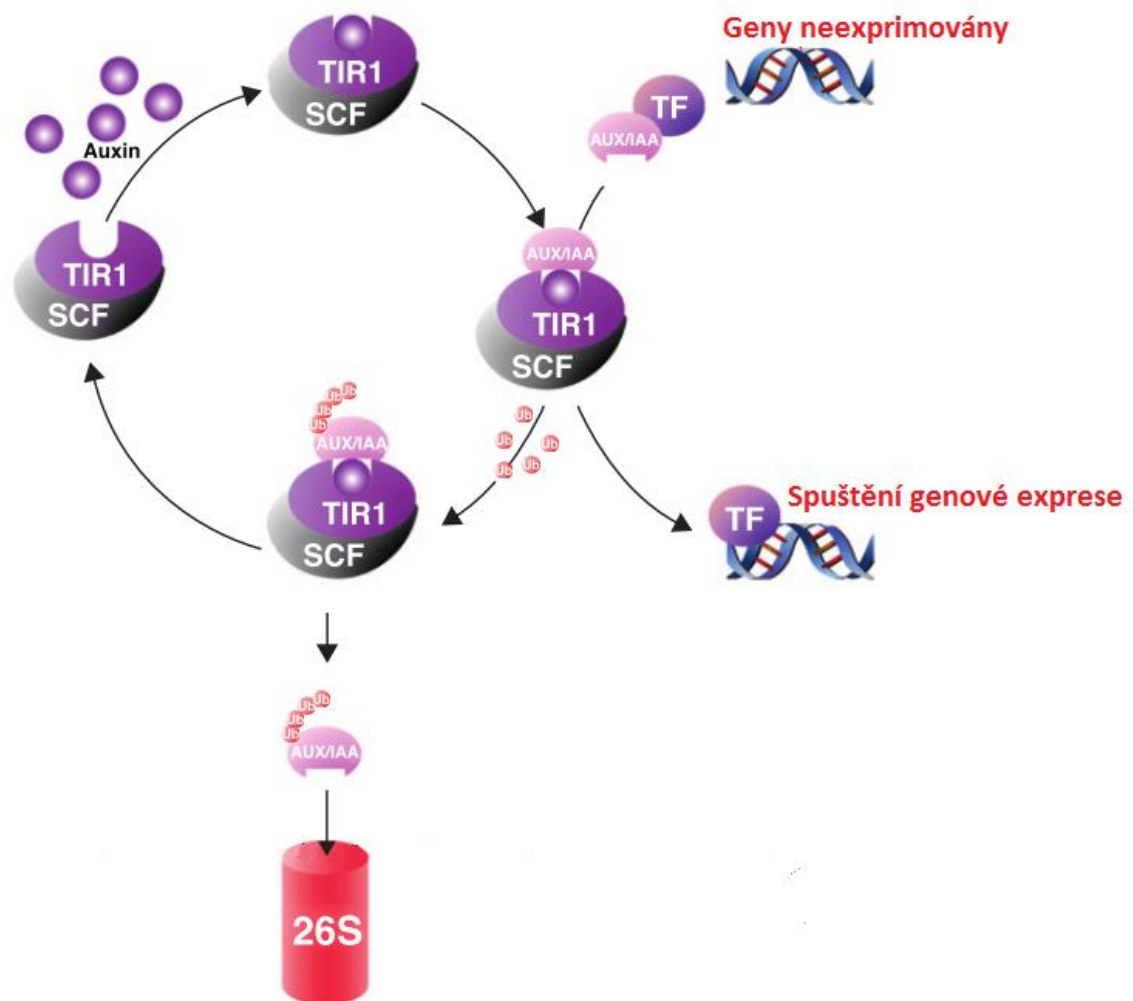
Bylo zjištěno, že syntéza IAA pomocí drah vycházejících z tryptofanu není schopna pokrýt celkovou potřebu IAA v rostlině. Toto zjištění bylo potvrzeno pomocí mutantů kukuřice a *Arabidopsis*, kteří nebyli schopni syntetizovat tryptofan, a přesto vytvářeli IAA z prekurzorů Trp³¹. Tato dráha by tedy využívala jako zdroj IAA indol či indol-3-glycerolfosfát, vznikající z chorismátu³⁵.



Obrázek 6: Biosyntetické dráhy IAA. Většina biosyntetických drah IAA vychází z tryptofanu. Označované jsou podle prvního metabolitu tryptofanu jako IAOx dráha, IAM dráha, IPyA dráha, TAM dráha. Dále pravděpodobně existuje alespoň jedna dráha nezávislá na tryptofanu. Přerušované šipky značí neprokázané mezikroky. Modře ohraničenými geny se tato práce zabývá v experimentální části. Upraveno dle ³⁶ a ³¹.

1.2.10 Přenos signálu a fyziologické účinky auxinů

Přenos signálu, zprostředkovaného auxiny probíhá u rostlin pomocí proteinů AUX/IAA (Auxin/indole-3-acetic acid protein). Tyto proteiny v nepřítomnosti auxinů reprimují transkripci příslušných genů, odpovídajících na auxin. Při zvýšené koncentraci auxinů, jsou auxiny rozpoznány receptorem TIR1 (Transport inhibitor protease 1) nebo AFB (Auxin signaling F-box protein), dojde k ubikvitinylaci a degradaci proteinů AUX/IAA a následně zahájení transkripce genů, stimulovaných auxinem³⁷ (Obrázek 7).



Obrázek 7: Schéma přenosu signálu pomocí auxinů. V nepřítomnosti auxinů proteiny AUX/IAA reprimují genovou expresi. V přítomnosti auxinů dochází k vytvoření komplexu auxinu, receptoru TIR1, ubikvitin ligasy SCF a proteinu AUX/IAA. Tento komplex je ubikvitinylován a degradován 26-S proteasomem. Ub- ubikvitin, TF – transkripční faktory, 26S – 26S proteasom. Upraveno dle ²⁷.

1.2.11 Auxiny v patogenních a symbiotických houbách

Houby jsou schopny produkovat řadu rostlinných hormonů v *in vitro* kultuře s dodanými příslušnými prekurzory. V případě auxinů bývá takovým prekurzorem tryptofan. Většina hub syntetizuje IAA z Trp drahou přes IPyA. V patogenu kukuřice *Ustilago maydis* byly identifikovány geny účastníci se této dráhy, *IAD1* a *IAD2* (indol-3-acetaldehyd dehydrogenasa 1 a 2), mající aktivitu IPyA dekarboxylas. Mutanti s vyřazenou funkcí obou těchto genů nebyli schopni produkovat IAA z tryptofanu ani z tryptaminu. Dalšími identifikovanými geny *U. maydis* v této dráze jsou geny *TAM1* a *TAM2* (tryptofan aminotransferasa 1 a 2). V mutantech s vyřazenými geny *TAM1*, *TAM2*, *IAD1* a *IAD2* bylo pozorováno další snížení koncentrace IAA, z čehož vyplývá, že *U. maydis* využívá indol-3-pyruvát jako zdroj pro tvorbu IAA. Pozoruhodné je, že v pletivu rostlin kukuřice, infikovaném těmito mutanty, byl pozorován menší nárůst endogenní IAA než při infekci *U. maydis* divokého typu³⁰.

Také u hemibiotrofního patogena rýže *Magnaporthe oryzae* byla nalezena IAA v myceliu, kultivovaném *in vitro*. Imunohistologickou analýzou s použitím protilátek proti IAA bylo zjištěno, že se IAA nachází v infekčních hyfách v pletivu hostitele. Dále bylo zjištěno, že během infekce *M. oryzae* produkuje během své biotrofní životní fáze malé množství auxinu, které spouští auxinem indukovatelné geny v napadeném rostlinném pletivu²⁹.

U rodu patogenních hub *Fusarium* zřejmě probíhá syntéza IAA z Trp drahou IAM. U několika druhů tohoto rodu byly popsány homology bakteriálních monooxygenas a hydrolas, účastnících se této dráhy³⁸. U mutantů druhu *Fusarium oxysporum* s vloženými geny pro syntézu trp-2-monooxygenasy a indol-3-acetamid hydrolasy došlo ke zvýšení syntézy IAA a také zvýšení virulence oproti divokému typu³⁹. *Colletotrichum acutatum* v mediu s tryptofanem produkuje kromě IAA i další metabolity indolu, tryptofol (který může být zapojen do syntézy IAA konverzí na indol-3-acetaldehyd³⁶), indol-3-acetaldehyd, indol-3-acetamid, indol-3-pyruvát a indol-3-laktát. Toto zjištění naznačuje, že tento patogen používá pro syntézu IAA několik různých drah. Při zvyšující se koncentraci exogenního tryptofanu byla pozorována zvyšující se koncentrace tryptofolu a indol-3-laktátu, ale nikoli IAA nebo IAM.⁴⁰ U jiného druhu rodu *Colletotrichum* bylo zjištěno, že produkuje IAA z tryptofanu během biotrofní i nekrotrofní fáze infekce rostlin⁴¹.

Původce travní rzi houba *Puccinia graminis* způsobuje akumulaci auxinu v infikovaném pletivu pšenice. V této houbě byl identifikován gen pro tryptofan-2-monooxygenasu (*Ptg-*

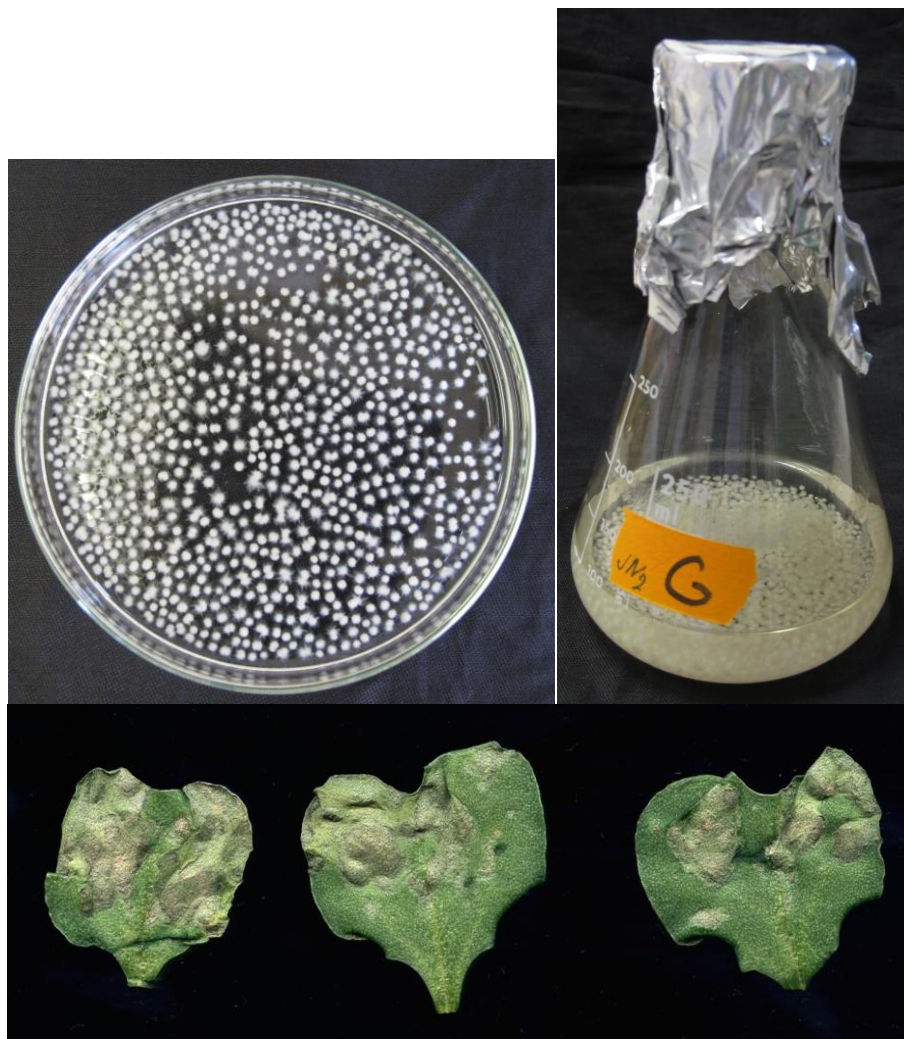
IaaM), zodpovědnou za konverzi tryptofanu na IAA. Bylo zjištěno, že tento gen je exprimován v buňkách haustorií v infikovaném hostitelském pletivu. Exprese genu *Ptg-IaaM* u *Arabidopsis* způsobuje typický fenotyp rostlin vystavených auxinu a zvyšuje náchylnost mutantů k bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*⁴².

Mutanti *Arabidopsis* defektní v některém kroku biosyntézy IAA jsou obecně více náchylní k infekci nekrotrofními patogeny *Alternaria brassicicola* a *Botrytis cinerea*⁴³. U patogena *Moniliophthora perniciosa* došlo po přidání exogenních fytohormonů (ABA, IAA, JA, SA) ke stimulaci růstu mycelia, což naznačuje schopnost patogena metabolizovat rostlinné hormony. Tyto fytohormony byly také nalezeny endogenní v myceliu (nejvíce SA) a rozmnožovacích útvarech (nejvíce IAA). Během deseti dnů infekce se zvýšila koncentrace IAA a SA v infikovaných listech hostitele⁴⁴.

Je pravděpodobné, že i mykorhizní symbiotické houby z rodu *Tuber* produkují auxiny. V myceliu hub *Tuber borchii* a *Tuber melanosporum* byl a detekována produkce etylenu a IAA. Tyto houby indukují u svého hostitele *Cistus incanus* i nehostitelské rostliny *Arabidopsis* změny v morfologii kořenů ještě před tím, než dojde k fyzickému kontaktu mycelia s rostlinou. Podobné změny lze vyvolat exogenní aplikací těchto hormonů⁴⁵.

1.3 Patogen *Leptosphaeria maculans*

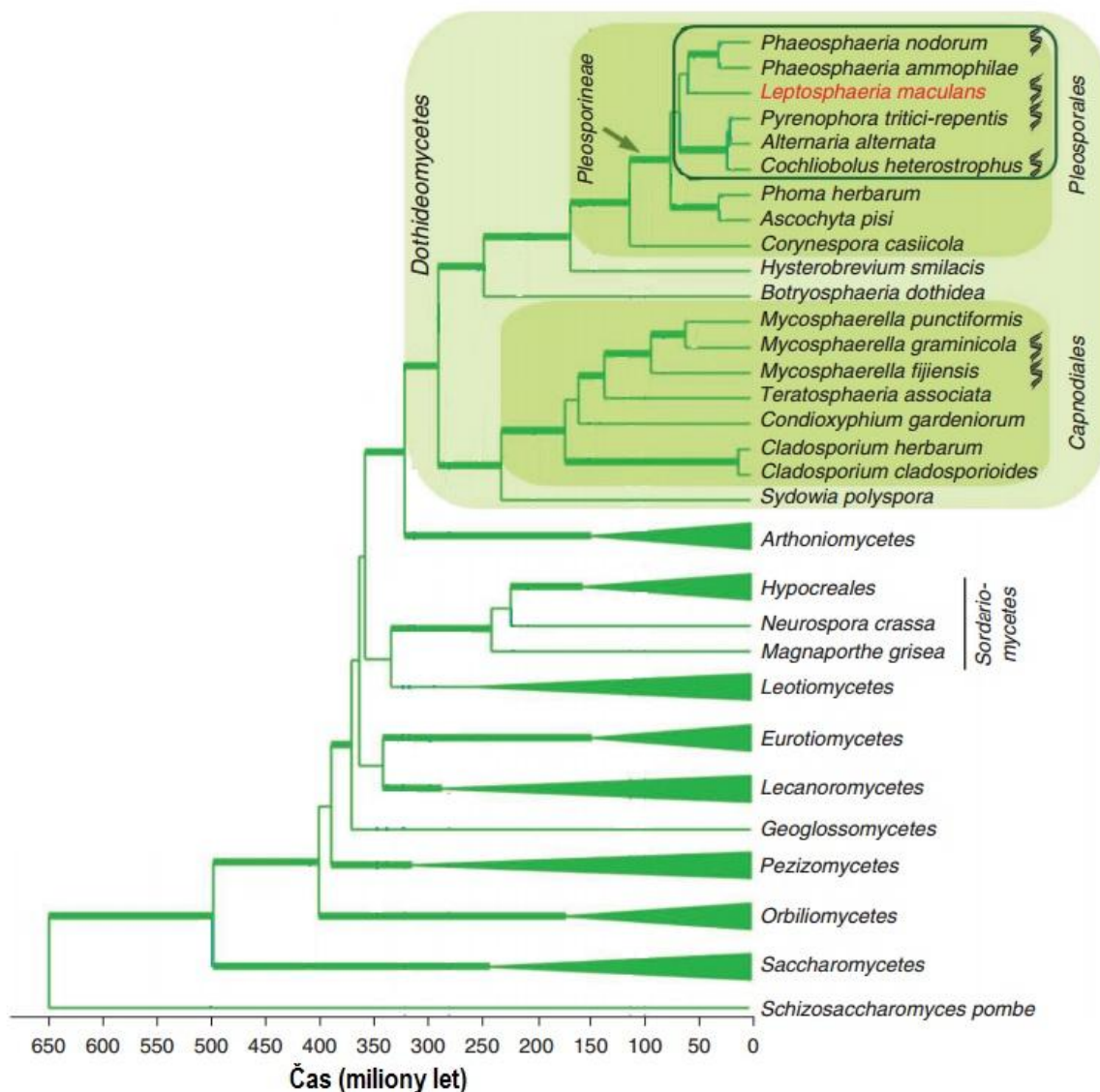
Askomyceta *Leptosphaeria maculans* (Obrázek 8), patřící do řádu *Pleosporales* třídy *Dothideomycetes*, je v současnosti nejvýznamnějším patogenem brukvovitých rostlin a původcem fómového černání stonků řepky olejky *Brassica napus*. Působí zvýšenou lámavostí stonků, charakteristické nekrotické léze listů a hnití kořenů. V 70. letech epidemie fómové hniloby vedly téměř k zániku pěstování řepky v Austrálii, Severní Americe a Evropě.



Obrázek 8: Mycelium *Leptosphaeria maculans* v 7 dní staré tekuté kultuře *in vitro* (nahore). Nekrotické léze na děložních listech řepky Eurol způsobené *L. maculans* JN2 po 10 dnech infekce (dole).

Infekční cyklus začíná na podzim, kdy dochází k pohlavnímu rozmnožování jedinců přežívajících na posklizňových zbytcích rostlin. Vznikající askospory se uchycují na děložních i pravých listech hostitelských rostlin a za dostatečné vlhkosti klíčí. Klíčící spory penetrují stomaty i skrze poranění na listech do mezibuněčných prostor v mezofylu. *L. maculans* postupně kolonizuje apoplastický prostor rostlinného pletiva. *L. maculans* je hemibiotrof. V počátečním stadiu infekce je rozrůstání hyf asymptomatické, až po několika dnech se na listech objevují nekrózy a tvoří se pyknidy. Ty jsou zdrojem sekundárního inokula v průběhu sezóny a pro postup infekce řádkem ke stonku a kořenovému krčku. I tento postup ke kořenovému krčku je asymptomatický a až na konci vegetačního období se na stonku a kořenovém krčku objevují nekrózy pletiva, které mohou vést k polehávání a předčasnému dozrání řepky.

Po sklizni *Leptosphaeria* kolonizuje zbytky rostlin a na zbytcích rostlin v půdě může přežít až několik let⁴⁶.



Obrázek 9: Fylogenetický strom oddělení Ascomycota. Patogenní houby zmiňované v kap. 1.2.11 jsou zařazeny do následujících skupin na schématu: *Sordariomycetes* – *Magnaporthe oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Colleotrichum acutatum*. *Pezizomycetes* – *Alternaria brassicicola*, *Tuber borchii*, *Tuber melanosporum*. *Leotiomyces* – *Botrytis cinerea*. Ostatní zmíněné houby patří mezi *Basidiomycety*. Upraveno dle⁴⁷.

Interakce *L. maculans* – *B. napus* je patosystémem, kde funguje rezistence gen proti genu. U *L. maculans* bylo zatím objeveno 9 genů kódujících efektorů (*AvrLm1* - *AvrLm9*), které mohou být geny avirulence, v případě, že hostitelská rostlina disponuje příslušnými geny

rezistence (*Rlm* geny), kterých bylo doposud odhaleno 11. Efektory, jako jsou např. AvrLm1 nebo AvrLm4 jsou malé proteiny sekretované z buňky (SSP, small secreted proteins), což je podmíněno N-terminální peptidovou signální sekvencí. Bazálně nejsou exprimovány nebo jen v nízkých hladinách a jejich exprese se mohutně indukuje v procesu infekce⁵.

2. CÍL PRÁCE

Tato práce se zabývala produkcí fytohormonů patogenem řepky *Brassica napus* askomycetou *Leptosphaeria maculans*. První část se soustředila na hormony auxinového typu, kde bylo cíli:

- Zjištění vlivu různých kultivačních podmínek na produkci auxinů patogenem
- Stanovení hladin auxinů při interakci *B. napus* – *L. maculans*
- Identifikace genů *L. maculans* zapojených do biosyntetické dráhy auxinů

Druhá část práce se zabývala brassinosteroidy a dílčí cíle byly následující:

- Sledování produkce brassinosteroidů v myceliu *L. maculans*
- Identifikace kandidátních genů *L. maculans* zapojených do biosyntetické dráhy brassinosteroidů
- připravit vektory pro posttranskripční umlčení genů biosyntézy brassinosteroidů v *L. maculans* s cílem objasnit roli těchto hormonů při infekci řepky olejky *B. napus*

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Seznam použitých chemikálií

Tabulka 1: Seznam použitých chemikálií

Chemikálie	Výrobce
2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina	Sigma-Aldrich (USA)
Aceton	Penta (CZE)
Agarosa	Sigma-Aldrich (USA)
Anchored primer oligo(dT) ₂₁	Metabion (DEU)
Brassinolid	Sigma-Aldrich (USA)
Castasteron	Sigma-Aldrich (USA)
Dimethylsufoxid	Penta (CZE)
dNTP mix	Finnzymes (FIN)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (USA)
Gamborg B5 medium basal salts	Duchefa (NLD)
Gamborg B5 medium s vitaminy	Duchefa (NLD)
Hydroxid draselný	Lachema (CZE)
Indolyl-3-octová kyselina	Sigma-Aldrich (USA)
Kolonky Oasis MCX columns	Waters (USA)
Kvasničný extrakt	Sigma-Aldrich (USA)
Kyselina mravenčí	Penta (CZE)
Kyselina octová	Penta (CZE)
Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich (USA)
MES	Serva (DEU)
Methanol	Penta (CZE)
Naftylactová kyselina	Sigma-Aldrich (USA)
Primery pro PCR	Metabion (DEU)
Primery pro qPCR	Metabion (DEU)
Sacharosa	Penta (CZE)
SAVO	Bochemie (CZE)
Směs enzymů BP clonase II	Invitrogen (USA)
Směs enzymů LR clonase II	Invitrogen (USA)
Taq DNA polymerasa	Fermentas (CAN)
Tryptamin	Sigma-Aldrich (USA)
Tryptofan	Sigma-Aldrich (USA)
Trypton	Sigma-Aldrich (USA)
γ-aminomáselná kyselina	Sigma-Aldrich (USA)
Zeleninová šťáva V8	Hi-media (FRA)

Tabulka 2: Seznam použitých komerčních sad

Název sady	Výrobce
Sada pro odstranění kontaminace DNA DNAFree Kit	Ambion (USA)
Sada pro qPCR Mastermix EVA1-LC	GeneON (USA)
Sada pro izolaci DNA GeneJet Plasmid midiprep	Thermo Scientific (USA)
Sada pro izolaci DNA PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega (USA)
Sada pro izolaci RNA Spektrum Plant Total RNA Kit	Sigma-Aldrich (USA)

3.2 Seznam použitých přístrojů a softwaru

Tabulka 3: Seznam použitých přístrojů a softwaru

Název přístroje	Výrobce
Homogenizátor Fast prep-24	MP Biomedicals (USA)
Třepačka Gallenkamp IO1400	Sanyo (JPN)
Centrifuga Sigma 3K30	Sigma (USA)
Program Assess 2.0	Lakhdar Lamari (USA)
Cyklér LightCycler II Carousel-Based System	Roche (FRA)
Program LightCycler Software 4.1	Roche (FRA)
Kultivační box Microclima MC1600E	Snijders Labs (NLD)
Elektroporátor GenePulser Xcell™	BioRad(USA)
Cyklér ThermalCycler C-1000	BioRad (USA)
Spektrofotometr Nanodrop ND-1000	ThermoScientific (USA)
Stolní inkubátor DRI-Block	Techne (UK)

3.3 Kultivace rostlin *Brassica napus*

Rostliny *Brassica napus* byly pěstovány hydroponicky v perlitu AGRO (Perlit Praha s.r.o) a Steinerově živném roztoku dle Steiner⁴⁸ v režimu 14 hodin den ($150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, 23 °C), 10 hodin noc (18 °C) v kultivačním boxu Microclima MC1600E (Snijders Labs) nebo kultivační místnosti. Byla použita semena odrůdy Columbus (disponuje genem rezistence *Rlm1*, poskytla firma Dekalb) a Eurol (nedisponuje genem rezistence *Rlm1*). K experimentům byly použity děložní listy z 10-ti nebo 14-ti denních rostlin.

3.4 Kultivace *Leptosphaeria maculans*

3.4.1 Charakteristika použitých izolátů

V této práci byly použity tři izoláty *Leptosphaeria maculans*: dva sesterské izoláty JN2 a JN3 a NzT4, které poskytl Dr. Thierry Rouxel (INRA, Francie). Izolát JN2 (*AvrLm1*) má

v místě genu *AvrLm1* velkou delecí, tudíž je tato alela nefunkční. Interakce *L. maculans* JN2 – *B. napus* Columbus i Eurol je kompatibilní. Izolát JN3 (*AvrLm1*⁺) nese funkční alelu genu *AvrLm1* a jeho interakce s odrůdou řepky olejky Columbus (*Rlm1*⁺), je inkompatibilní, zatímco je kompatibilní na odrůdě Eurol (*Rlm1*⁻)⁴⁹ Izolát NzT4 pochází z Nového Zélandu a je virulentní na odrůdě *B. napus* cv. Tina. K experimentům byl vybrán pro velkou genetickou odlišnost od předchozích izolátů JN2 a JN3⁵⁰.

3.4.2 Kultivace v tekuté kultuře

L. maculans byla kultivována ve 100 ml sterilního media (složení v tabulce 4) v 250 ml Erlenmeyerově baňce, do níž bylo inokulováno 100 µl suspenze spor (1×10^8 / ml) ve vodě. Složení jednotlivých medií je uvedeno v tabulce 3. Baňky byly inkubovány 10 nebo 7 dní ve tmě v třepačce Gallenkamp IO1400 (Sanyo) při teplotě 26°C a 120 otáčkách za minutu.

Tabulka 4: Složení medií pro kultivaci *L. maculans*. U všech medií bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 pomocí NaOH.

Medium							
Fries		G-MES basal salts		G-MES vitamins		V8	
složení 1 l		složení 1 l		složení 1 l		složení 1 l	
NH ₄ NO ₃	1 g	G B5 bs	3,16 g	G B5 vit	3,16 g	V8	100 ml
tartarát amonný	5 g	sacharosa	30 g	sacharosa	30 g	CaCO ₃	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g	MES	1,95 g	MES	1,95 g	MES	1,95 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	500 mg	voda do	1000 ml	voda do	1000 ml	Voda	900 ml
CaCl ₂	130 mg						
NaCl	100 mg						
sacharosa	30 g						
kvasničný extrakt	5 g						
MES	1,95 g						
voda do	1000 ml						

3.4.3 Příprava spor

Pro přípravu inokula bylo mycelium krátkodobě kultivováno na zpevněném živném mediu ze zeleninové šťávy V8 (složení v tabulce 5).

Tabulka 5: Složení zpevněného media V8

V8	
složení 1 l	
V8	100 ml
CaCO ₃	3 g
MES	1,95 g
voda	900 ml
agar	15 g

Příprava spor vychází z publikované metody dle Ansan-Melayah a kol.⁵¹. Spory byly připraveny z mladého mycelia získaného z jedné oddělené spory. Agar V8 s myceliem byl nejprve rozmačkán skleněnou lopatkou a poté rozetřen na nové misce s pevným V8 agarovým médiem v co nejtenčí vrstvě. Následně byly misky s agarovým médiem zalepeny prodyšnou chirurgickou páskou a inkubovány v kultivačním boxu při stejných podmínkách, jaké byly použity pro kultivaci řepky. Po 6 dnech byla chirurgická páska nahrazena parafilmem, aby nedošlo k úplnému vyschnutí agaru. Po 11 dnech byla media v miskách za sterilních podmínek převrstvena vodou a spory byly z pyknid uvolněny třením skleněnou lopatkou. Suspenze byla poté zfiltrována přes skelnou vatu do sterilní 50 ml zkumavky. Kvůli odstranění fytotoxických látek, produkovaných *L. maculans*, byla suspenze odstředěna 10 min při 1000 x g a supernatant byl nahrazen 20 ml sterilní vody. Spory byly spočítány v Bürkerově komůrce a suspenze byla naředěna na konečnou koncentraci 10⁸ spor/ml. Spory určené k inokulaci rostlin a tekutého media byly uchovávány při -20 °C po dobu nejdéle 6 měsíců. Spory pro dlouhodobé uchování izolátů byly zmrazeny v 20 % glycerolu a uloženy v -70 °C. Před prvním použitím spor byla vždy ověřena jejich virulence na děložních listech řepky.

3.5 Inokulace rostlin sporymi *Leptosphaeria maculans*

Děložní listy 14-denních rostlin *B. napus* byly inokulovány infiltrací suspenze spor o koncentraci 10⁵ spor/ml injekční stříkačkou (1 ml) bez jehly do každé poloviny listu mimo hlavní žilku. Čtyři dny po infekci byly z rostlin ustřiženy pravé listy, aby nedošlo

k senescenci děložních listů. Deset dní po infekci byla provedena obrazová analýza nekrotické plochy listů pomocí programu Assess 2.0.

3.6 Ošetření rostlin fytohormony

3.6.1 Ošetření postřikem

10-denní rostliny *Brassica napus* byly ošetřeny vodou nebo roztoky fytohormonů o složení a koncentraci uvedené v tabulce 6. Ošetření bylo provedeno aplikací drobných kapek roztoku na děložní listy pomocí rozprašovače.

3.6.2 Ošetření infiltrací

Roztoky fytohormonů nebo voda byly infiltrovány do obou polovin děložních listů 10-denních rostlin mimo hlavní žilku pomocí injekční stříkačky bez jehly. Pro oba způsoby ošetření byly použity roztoky indolyl-3-octové kyseliny (IAA), naftyloctové kyseliny (NAA), 2,4-dichlorofenoxyoctové kyseliny (2,4-D), brassinolidu (Bra) a castasteronu (Cas). Roztok benzothiadiazolu (BTH, analog SA, induktor resistance k *L. maculans*⁵²) byl použit jako pozitivní kontrola, voda byla použita jako negativní kontrola.

Tabulka 6: Složení roztoků hormonů použitých k exogenní aplikaci na rostliny

Látka	Koncentrace	Rozpouštědlo
BTH	30 μ M	voda
IAA	500 μ M	0,4 % EtOH
NAA	50 μ M	voda
	250 μ M	
2,4-D	5 μ M	voda
	25 μ M	
Bra	10 μ M	voda
	50 μ M	
Cas	10 μ M	voda
	50 μ M	

3.7 Ošetření *L. maculans* prekurzory auxinů

Mycelium *Leptosphaeria maculans* bylo kultivováno 7 nebo 10 dní (uvedeno dále) ve 100 ml media. Po sedmi nebo deseti dnech bylo k myceliu přidán tryptofan (Trp, 1 mM), tryptamin (TAM, 1mM) nebo GABA (1mM). Roztoky tryptofanu, tryptaminu a GABA byly připraveny jako zásobní roztoky o koncentraci 100 mM. 0,200 g tryptofanu bylo rozpuštěno v 1 ml 1M HCl a doplněno vodou na objem 10 ml. 0,1600 g tryptaminu bylo rozpuštěno v 1 ml HCl a doplněno vodou na objem 10 ml. 0,100 g GABA bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě -20 °C.

3.8 Příprava extraktu z rostlin pro ošetření *L. maculans*

Extrakt byl připraven z desetidenních rostlin *Brassica napus* odrůda Columbus, 60 g čerstvých listů bylo zmrazeno v tekutém dusíku a následně homogenizováno v 200 ml 10 mM MES v kuchyňském mixeru. Hrubé nečistoty byly odstraněny filtrací přes plátno a filtrát byl odstředěn při 22 800 x g po dobu 20 minut při 4 °C. Objem čistého supernatantu byl upraven na 240 ml. Na 1 litr kultivačního média bylo použito 160 ml připraveného extraktu.

3.9 Odběr vzorků rostlinného pletiva a mycelia

Pro stanovení hormonů a kvantifikaci transkripce v rostlinném pletivu či myceliu bylo odebráno 100-200 mg biologického materiálu do zkumavky se závitem s 1 g keramických kuliček o průměru 1,3 mm, okamžitě zmrazeno v tekutém dusíku a uchováno v -70°C. Z děložních listů *B. napus* byly odebírány disky pomocí korkovrtu Harris UniCore. Z kultury *L. maculans* bylo nejprve pomocí Büchnerovy nálevky s papírovým filtrem odfiltrováno kultivační medium a vzorky mycelia byly následně odebrány tenkou nerezovou špachtlí

3.9.1 Extrakce hormonů z pletiva nebo mycelia

K extrakci fytohormonů z pletiva bylo odebráno 100-200 mg rostlinného nebo houbového pletiva. Vzorky ve zkumavkách byly vymrazeny v tekutém dusíku a homogenizovány v přístroji FastPrep po dobu 40 s a rychlosti 6 m/s. Vzorky byly znovu zmrazeny v tekutém dusíku a ke každému bylo přidáno 500 µl extrakčního činidla pB o složení 750 ml methanolu, 200 ml vody a 50 ml 99% kyseliny mravenčí, které bylo vychlazené na teplotu

-20°C, a značené interní standardy. Vzorky ve zkumavkách byly znovu homogenizovány ve FastPrep za stejných podmínek a inkubovány 30 minut při -20°C. Dále byly vzorky centrifugovány na centrifuze Sigma 3K30 5 minut při 13 000 x g a 4°C. Supernatant byl převeden do čisté 2 ml plastové zkumavky (Treff 2.0 ClickFit microtubes). K sedimentu bylo přidáno dalších 500 µl extrakčního činidla pB, sediment byl homogenizován ve FastPrep za stejných podmínek a znovu centrifugován. Výsledný supernatant byl přidán k prvnímu supernatantu a znovu centrifugován 10 minut za stejných podmínek, poté byl převeden do nové zkumavky. Ze vzorků byl odpařen methanol pomocí rotační vakuové odparky 60 minut při teplotě 40°C a tlaku 10 mbar. Extrakční kolonky Oasis MCX extraction cartridge (Waters, #186000252) byly promyty 1 ml methanolu a 1 ml 1 M HCOOH. Poté byly na kolonky aplikovány vzorky po odpaření methanolu. Kolonky byly promyty 500 µl 1M HCOOH a 250 µl vody. Poté byly vzorky eluovány dvakrát 250 µl methanolu (frakce A) a dvakrát 250 µl 0,35 M NH₄OH v 70% MeOH (frakce B). Rozpouštědlo pro frakci B bylo připraveno vždy čerstvě pro každou extrakci hormonů. Sebrané frakce byly pomocí vakuové odparky odpařeny do sucha. Frakce A byla rozpuštěna ve 30 µl 15% acetonitrilu, frakce B v 30 µl 5% methanolu. Vzorky byly zmrazeny, rozmrazeny, a případné nečistoty odstraněny centrifugací 5 minut při 13 000 x g a 4°C. Supernatant byl podroben analýze kapalinovou chromatografií s detekcí hmotnostní spektrometrií. Ve frakci A byly stanoveny auxiny, ABA a SA. Frakce B byla použita pro paralelní stanovení cytokininů.

3.9.2 Analýza hormonů pomocí LC-MS

Analýza hormonů pomocí LC-MS byla laskavě provedena na Ústavu experimentální botaniky v Laboratoři hormonálních regulací u rostlin Ing. Petrem Dobrevem, CSc. Na kapalinovém chromatografu (Ultimate 3000, Dionex) s hmotnostní detekcí (3200 Q TRAP LC/MS/MS, Applied Biosystems) metodou dle Dobřeva a Kamínka⁹.

Stanovení brassinosteroidů pomocí LC-MS bylo laskavě provedeno v Laboratoři růstových regulátorů Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky v Olomouci Mgr. Danuší Tarkowskou PhD metodou dle Tarkowské a kol⁵⁴.

3.10 Analýza genové exprese

Genové exprese byly stanoveny z cca 170 mg vzorků listů řepky nebo mycelia *L. maculans* kultivovaného v tekuté kultuře odebranými podle postupu popsaném v kapitole 3.9.

Vzorky ve zkumavkách s kuličkami byly homogenizovány na přístroji FastPrep po dobu 20s a rychlosti 4 m/s. K izolaci RNA byla použita sada Spektrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich). Koncentrace RNA a její čistota byla vyhodnocena na spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). K výpočtu koncentrace RNA a její čistoty byla použita hodnota absorbance při 260 nm a 280 nm. Z každého vzorku byl odebrán objem, odpovídající 2,5 µg RNA, který byl pomocí soupravy DNAfree™Kit (Ambion) zbaven kontaminace genomovou DNA. Směs byla inkubována v přístroji ThermalCycler C1000™ (BioRad) 30 minut při 37°C. Po inkubaci bylo ke každému vzorku přidáno 2,5 µl Removal Reagent (součást DNAfree™Kit, Ambion) pro zastavení enzymové reakce DNAsy, Směs 1 µg RNA a 0,1 µmol Oligo dT primer (Metabion) byla inkubována 5 min při 70°C v přístroji Thermal Cycler C1000™ (BioRad) a rychle zchlazena na ledu. Poté byly přidány dNTPs v konečné koncentraci 0,5 mM (Promega), 100 jednotek reverzní transkriptasy M-MLV Rnase H(-)Point Mutant a dodaný pufr (Promega #M368A) a směs v celkovém objemu 20 µl byla inkubována 10 min při 40 °C a 50 min při 45°C. Po ukončení reakce byla cDNA naředěna 20 x a použita jako templát pro kvantitativní PCR sadou qPCR Mastermix EVA1-LC (GeneON). 2,5 µl 20x zředěné cDNA (ekvivalent 6,25 ng původní RNA) bylo amplifikováno v reakční směsi o celkovém objemu 10 µl a následujícím složení: 5 µl Mastermix EVA1-LC, 0,5 µl ddH₂O, 1 µl přímý primer (FP) (5 µM), 1 µl reverzní primer (RP) (5 µM) a 2,5 µl cDNA vzorku. Reakce probíhala v polykarbonátových kapilárách (Genaxxon BioScience GmbH) na přístroji LightCycler II® Carousel-Based System (Roche). Reakční podmínky byly zvoleny následovně: 10 minut denaturace při 95 °C, následně 45 cyklů amplifikace 10 s při 95°C, 10 s při 55°C, 10 s při 72°C. Po ukončení reakce byly změřeny křivky tání. Kvantifikace transkripce a křivky tání ampliconů byly analyzovány v programu LightCycler® Software 4.1. Relativní transkripce byla vypočtena s korekcí na účinnost, která byla stanovena z kalibrační přímky provedené se sériově ředěnou cDNA. Byla sledována míra transkripce genů *YUCCA1.1*, *NIT1.1*, *NIT1.2*, *IAD1.1*, *IAD1.2*, *TAMI-2.1* a *TAMI-2.2*. Jejich transkripce byla vztažena k míře transkripce referenčních genů pro tubulin a *ITS1*. Seznam primerů, použitých pro kvantifikaci genové exprese je uveden v tabulce 7.

Tabulka 7: Seznam primerů, použitých pro kvantifikaci transkripce

Označení	Produkt		Délka produktu
	genu	Sekvence	
referenční gen	Tubulin	TCAAGATGTCCTCCACCT GTACCAATGCAAGAAAGCC	113 bp
referenční gen	ITS1	GGTGTGGGTGTTTGTCCAC GGCTGCCAATTGTTTCAAGG	51 bp
<i>YUCCA1.1</i>	XP003837538	CTCTGTCAACATAGCCCT CTTCTGTCAACCGATACCT	276 bp
<i>NIT1.1</i>	XP003842954	CTATTGACTCCTCTCCATATCC ATTCGTCTTCCTTCTCCC	183 bp
<i>NIT1.2</i>	XP003835263	CGAAATTCTGATGAAGCGAC AGCATTGCAACCTTCAGAC	280 bp
<i>IAD1.1</i>	XP003835866	TACAACACGTTCACTGG CACTACAACCCATTCATTGCT	161 bp
<i>IAD1.2</i>	XP003837936	AATCCAAGTGATGAAAGCGA GTTCCAACAACCTCTCCC	280 bp
<i>TAM1-2.1</i>	XP003838736	TACAACATTCTCCCTTCATCAC GCTCCAAACTTTCTATCTCGT	159 bp
<i>TAM1-2.2</i>	XP003845026	GCCTCATCCCATCATACC GACTTCCAGCCACTTCC	265 bp

3.11 Metody klonování a molekulární biologie

3.11.1 Kultivace bakterií *Escherichia coli* a *Agrobacterium tumefaciens*

Bakteriální konzervy byly dlouhodobě skladovány při -70°C . Pro přípravu kultury pro transformaci bylo 5 ml sterilního LB media (Tabulka 8) inokulováno pomocí jednorázové plastové kličky. Kultura byla následně kultivována přes noc v třepačce při 250 otáčkách za minutu a teplotě 37°C (*E. coli*) nebo 28°C (*A. tumefaciens*).

Tabulka 8: Složení LB media pro kultivaci bakterií

LB medium			
složení 1l			
tekuté		zpevněné	
trypton	10g	trypton	10g
kvasničný extrakt	5g	kvasničný extrakt	5g
NaCl	5g	NaCl	5g
		agar	15g

3.11.2 Příprava elektrokompetentních buněk *Escherichia coli*

Noční kultura z jedné kolonie *E. coli* DH5 α byla inokulována do 100 ml LB media v 250 ml Erlenmeyerově baňce inkubována přes noc v třepačce při 37°C a 250 otáčkách za minutu. 50 ml přes noc narostlé kultury bylo přeneseno do 1 l LB media ve dvoulitrové Erlenmeyerově baňce a inkubováno v třepačce při 37°C asi 2 hodiny dokud kultura nenabyla optické density při 550 nm 0,5. Kultura byla přenesena do 50 ml uzavíratelných plastových centrifugačních kyvet vychlazených na ledu a inkubována 30 minut na ledu. Poté byla kultura centrifugována 20 minut při 3700 x g a 4°C. Supernatant byl odstraněn, kyvety zchlazeny na ledu a k peletám bylo přidáno 50 ml sterilní vody vychlazené na ledu, v které byly pelety resuspendovány a poté byly buňky znovu centrifugovány. Tento promývací krok byl proveden dvakrát. Po odstranění supernatantu byly buňky ze všech kyvet resuspendovány v celkovém objemu 40 ml sterilního, na ledu vychlazeného 10% glycerolu a centrifugovány za stejných podmínek 15 minut. Supernatant byl odstraněn, buňky byly resuspendovány ve 2 ml 10% vychlazeného glycerolu a v 45 μ l alikvotech zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80°C.

3.11.3 Příprava kompetentních buněk *Agrobacterium tumefaciens*

200 ml LB media bylo inokulováno 1 ml přes noc narostlé kultury *A. tumefaciens* LBA4404. Kultura byla inkubována v třepačce při 250 otáčkách za minutu a teplotě 28°C do dosažení optické density 0,5 při 550 nm. Kultura byla centrifugována při 3700 x g 15 minut. Peleta byla promyta 10 ml TE pufru (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) a buňky byly znovu centrifugovány. Buňky byly resuspendovány ve 20 ml LB media a alikvoty o objemu 100 μ l (pro 3 transformace) byly zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80°C.

3.11.4 Transformace bakteriálních buněk

Elektroporace

Objem roztoku DNA ekvivalentní 1 µg plasmidu byl přidán k 45 µl elektrokompetentních buněk, které byly následně převedeny do na ledu vychlazené 2 mm elektroporační kyvety. Pomocí elektroporátoru GenePulser XcellTM (BioRad) byly buňky podrobeny elektrickému šoku o napětí 2,5 kV. Do kyvety bylo okamžitě přidáno 500 µl LB media a kultura byla inkubována 60 minut v třepačce při 37°C (*E. coli*) nebo 28°C (*A. tumefaciens*). Poté bylo 200 µl kultury rozetřeno na plastovou kultivační misku s pevným LB mediem a příslušným antibiotikem (zeocin 50 µg/ml pro *E. coli* nebo kanamycin 50 µg/ml pro *A. tumefaciens*).

Teplotní šok *A. tumefaciens*

100 µl kompetentních buněk bylo smícháno s objemem ekvivalentním 1 µg plasmidu a zmrazeno 5 minut v tekutém dusíku. Následně byly buňky inkubovány ve stolním inkubátoru DRI Block (Techne), při 37°C. Cyklus zmražení v dusíku a inkubace při 37°C byl ještě jednou opakován. Následně bylo do směsi přidáno 500 µl LB media a buňky byly inkubovány 2 hodiny v třepačce při 28°C. Poté bylo 200 µl kultury rozetřeno na plastovou kultivační misku s pevným LB mediem.

3.11.5 Vyhledání kandidátních genů pro biosyntézu brassinosteroidů a auxinů v *Leptosphaeria maculans*

Kandidátní geny byly identifikovány na základě podobnosti s geny popsány v *Arabidopsis thaliana* a *Ustilago maydis*. Proteinové sekvence vybraných proteinů podílejících se na biosyntéze auxinů v *U. maydis* a *A. thaliana*, a brassinosteroidů v *A. thaliana* a byly použity pro vyhledání homologních sekvencí *L. maculans* v databázi NCBI pomocí nástroje blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.11.6 Příprava vektorů pro umlčení genů *L. maculans*

Pro umlčení kandidátních genů *L. maculans* CBX91803.1 a CBX92962.1 (potenciálně zapojených v biosyntéze BR) byla použita metoda posttranskripčního umlčení pomocí zavedení úseku genu do plasmidu pHYG-GS⁵⁵, který poskytla Barbara Howlett (School of Botany, The University of Melbourne, Austrálie) a následným zavedením vlásenkové struktury do genomu *L. maculans*. Po transkripci dochází k vytvoření dvouvláknové RNA, která je degradována.

Amplifikace fragmentu cíleného genu

Úseky příslušných genů byly amplifikovány pomocí PCR v přístroji ThermalCycler C1000™. Reakce byla katalyzována enzymem Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. Složení reakční směsi a podmínky reakce jsou uvedeny v tabulce 10. Primery jsou uvedeny v tabulce 9. Velikost amplifikovaných úseků, které byly po PCR smíchány s 1% 6x DNA Loading Dye (Fermentas #R0611), byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy v 1% agarosovém gelu 45 minut při napětí 90 V. Po kontrole reakce byly vzorky DNA purifikovány pomocí kitu High Pure Cleanup Micro Kit (Roche).

Tabulka 9: Seznam primerů pro klonování úseků genů biosyntézy BRS. Červeně je vyznačena část primeru nezbytná pro ligaci na rekombinační *attP* místa. FP – přímý primer, RP – reverzní primer

Označení	Sekvence	Délka produktu
<i>DET2a</i>	FP GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGAGAATTGGGAGTTTGTG	495 bp
	RP GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGTCGTGAAAGATGTTGCC	
<i>DET2b</i>	FP GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGTGGGAGAAGTAACGG	410 bp
	RP GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGAGGTAAGTAAGGAGTGG	
<i>CYP90A1a</i>	FP GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCCTTGTTCTTGAGTCCGT	519 bp
	RP GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACCCATTCTGCGAG	
<i>CYP90A1b</i>	FP GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCAATTAGTGTTCAGCCC	495 bp
	RP GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGACTTGCGTAGAGTAATGG	

Tabulka 10: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce

Složení reakční směsi		Počet cyklů	Teplota	Čas
5x HF Buffer	8 µl	1	98 °C	30 s
10 mM dNTPs	0,8 µl		98 °C	8 s
10 µM FP	2 µl	5	60 °C	20 s
10 µM RP	2 µl		72 °C	15 s
cDNA 5x	3 µl	30	98°C	8 s
voda	23,8 µl		72°C	15 s
Phusion	0,4 µl	1	72 °C	10 min

Vytvoření vstupního vektoru

Amplifikované úseky byly vloženy do vstupního vektoru Gateway pDONR (obsahuje geny rezistence k zeocinu a kanamycinu) pomocí tzv. BP reakce (Invitrogen). K 20 ng amplifikovaných fragmentů DNA bylo přidáno 150 ng vektoru pDONR o velikosti 4291 bp (Invitrogen) a objem byl doplněn vodou do 4 μ l. Dále byl do každé reakční směsi přidán 1 μ l směsi enzymů BP clonase. Reakce probíhala při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin a následně byla zastavena degradací enzymů BP clonase přidáním 0,5 μ l proteinkinasy K a inkubací při 37 °C po dobu 10 minut. Takto připravené rekombinované vektory pENTR byly vloženy do bakterie *E. coli DH5 α* pomocí teplotního šoku. Pozitivní kolonie byly rozpěstovány v 5 ml tekutého media LB (zeocin 50 μ g/ml) a následně byl z této kultury izolován plasmid pomocí sady GeneJet Plasmid miniprep. Koncentrace byla stanovena spektrofotometricky přístrojem Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific) na základě měření absorbance při 280 nm.

Ověření úspěšnosti transformace (PCR na koloniích)

Úspěšnost transformace (přítomnost plasmidu) v narostlých koloniích byla ověřena pomocí PCR a agarosové elektroforézy. Pro PCR byla použita reakční směs DreamTaq Green PCR Master Mix Fermentas K1081 o objemu 10 μ l na jednu reakci. Ke každé reakci bylo přidáno 0,5 μ l příslušných primerů (Tabulka 11) a 9 μ l vody. Vzorek z narostlých kolonií byl odebrán špičkou pro automatické pipety a přenesen do PCR zkumavky, následně byla přidána reakční směs. Reakce probíhala v přístroji ThermalCycler C1000TM za podmínek, uvedených v tabulce 12. Po PCR reakci byla provedena agarosová elektroforéza amplifikovaných úseků.

Tabulka 11: Primery pro ověření přítomnosti plasmidu v koloniích

Vektor	Název primeru	Sekvence
pDONR	M13pDONR-2012-FP	GTAAAACGACGGCCAG
	M13pDONR-2012-RP	CAGGAAACAGCTATGAC
pHYG-GS	pHYGGSgtp2INS-2012-FP	ACCTCATTGCCTGTGTCC
	pHYGGSgtp2INS-2012-RP	GACACCAACGATCTTATATCCAG

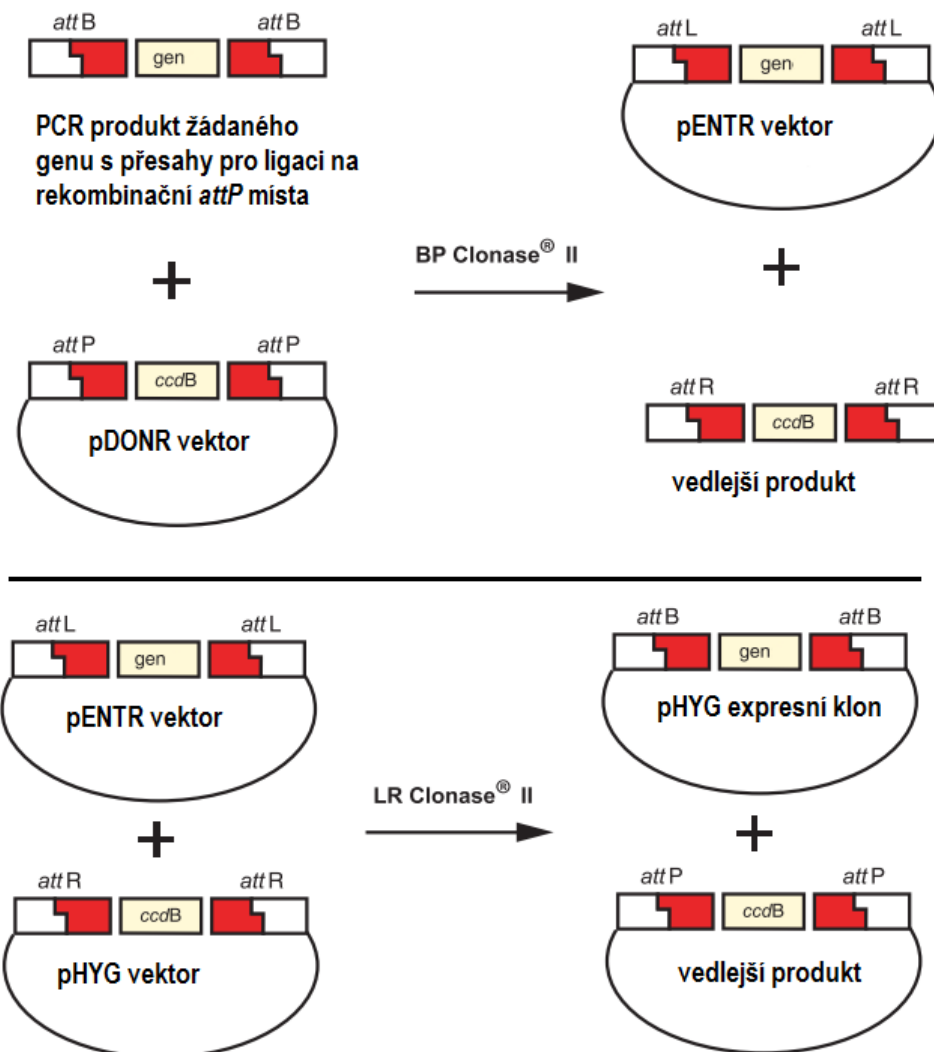
Tabulka 12: Složení reakční směsi a podmínky PCR pro ověření přítomnosti plasmidu v koloniích

Složení reakční směsi		Podmínky pro pDONR			Podmínky pro pHYG-GS		
		Počet cyklů	Teplota	Čas	Počet cyklů	Teplota	Čas
2x Master mix	10 µl	1	95 °C	2 min	1	95 °C	2 min
FP primer 10 µM	0,5 µl		95 °C	15 s		95 °C	15 s
RP primer 10 µM	0,5 µl	25	50 °C	15 s	30	55 °C	15 s
voda	9 µl		72 °C	30 s		72 °C	60 s

Vytvoření konečného vektoru pro umlčení genu

K 25 ng pENTR vektoru bylo přidáno 60 ng cílového vektoru pHYG-GS (obsahuje geny rezistence ke kanamycinu pro selekci v bakteriích a k hygromycinu pro selekci v houbách) o velikosti 13200 bp a objem byl doplněn vodou do 4 µl. Dále byl ke každé reakční směsi přidán 1 µl směsi enzymů LR clonase. Reakce probíhala při 24°C v přístroji ThermalCycler C1000TM po dobu 24 h. Reakce byla zastavena degradací komplexu enzymů LR clonase přidáním 0,5 µl proteinkinasy K a inkubací při 37 °C po dobu 10 minut.

Pro izolaci plasmidové DNA z vektoru pHYG-GS a z něj odvozených vektorů byla použita sada PureYieldTM Plasmid Midiprep System (Promega). Buněčné kultury *E. coli* byly kultivovány přes noc při 37°C a 250 RPM. 100 ml narostlé kultury bylo centrifugováno při 3700 g po dobu 10 minut. Dále se postupovalo dle přiloženého protokolu výrobce. Přítomnost plasmidu byla opět ověřena amplifikací DNA z kolonií, kultivovaných na pevném mediu s kanamycinem, a elektroforézou za výše zmíněných podmínek (kap. 3.14.6) Koncentrace byla stanovena spektrofotometricky přístrojem Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific) z měření absorbance při 260 nm. Princip metody Gateway[®] použité k přípravě vektorů popisuje obrázek 10.



Obrázek 10: Princip metody Gateway[®]. Schématické znázornění přípravy expresních klonů genů biosyntézy BRS pHYG-GS. Fragment žádaného genu obsahující sekvenční *attB* byl vložen do pDONR vektoru obsahující rekombinantní místa *attP* mezi kterými se nachází *ccdB* gen. Sekvenční *ccdB* genu se vymění za sekvenční cílového genu obsahující *attB* místa. Vzniklý konstrukt nazvaný jako pENTR, který nyní obsahuje *attL* místa, je výsledkem BP reakce. Následně probíhá rekombinace mezi místy *attL* obsažených v pENTR vektoru a *attR* místy nacházejících se v cílovém vektoru pHYG. Vzniklý expresní klon pHYG obsahuje fragment cílového genu ve dvou kopiích a vzájemně antiparalelně orientované.

4. VÝSLEDKY

4.1 Produkce auxinů *L. maculans* v různých kultivačních mediích

Prvním krokem byl screeningový test, kdy byla sledována produkce fytohormonů houbou *L. maculans in vitro* za různých kultivačních podmínek.

Byly použity dva různé izoláty *L. maculans*, JN2 a NzT4, které byly kultivovány v tekuté kultuře nebo na pevném agarovém mediu. Další podmínkou bylo přidání extraktu z rostlin řepky do kultivačního media, což mělo simulovat některé podmínky infekce hostitele. Data jsou uvedena v tabulkách 13 a 14 a zobrazují produkci auxinů v myceliu *L. maculans* po 10 dnech kultivace. Je patrné, že *Leptosphaeria maculans* produkuje auxiny odvozené od kyseliny indolyl-3-octové. Nejvyšší koncentrace byla zjištěna u indolyl-3-octové kyseliny (IAA) a oxindolyl-3-octové kyseliny (OxIAA), která je v rostlinách degradačním produktem bioaktivních auxinů a aktivní není. Dále byla zjištěna vysoká koncentrace fenyloctové kyseliny (PAA), která není odvozená od IAA a namísto indolového cyklu obsahuje aromatické jádro.

Tabulka 13: Koncentrace auxinů v *L. maculans* JN2 kultivované v různých mediích (G-Gamborg s vitaminy, Fries). Koncentrace je uvedena v jednotkách pmol/g čerstvé hmotnosti).
 IAA – indolyl-3-octová kyselina, IAA-Asp – IAA-aspartát, IA-Val – IAA-valorin, IA-Glu – IAA-glutamát, IA-Leu – IAA-leucin, IA-Ala – IAA-alanin, OxIAA – oxindolyl-3-octová kyselina, OxIAA-GE – ester OxIAA s glukosou, IAA-GE – ester IAA s glukosou, IPyA – indol-3-pyruvát, IAM – indol-3-acetamid, IAN – indol-3-acetonitril.

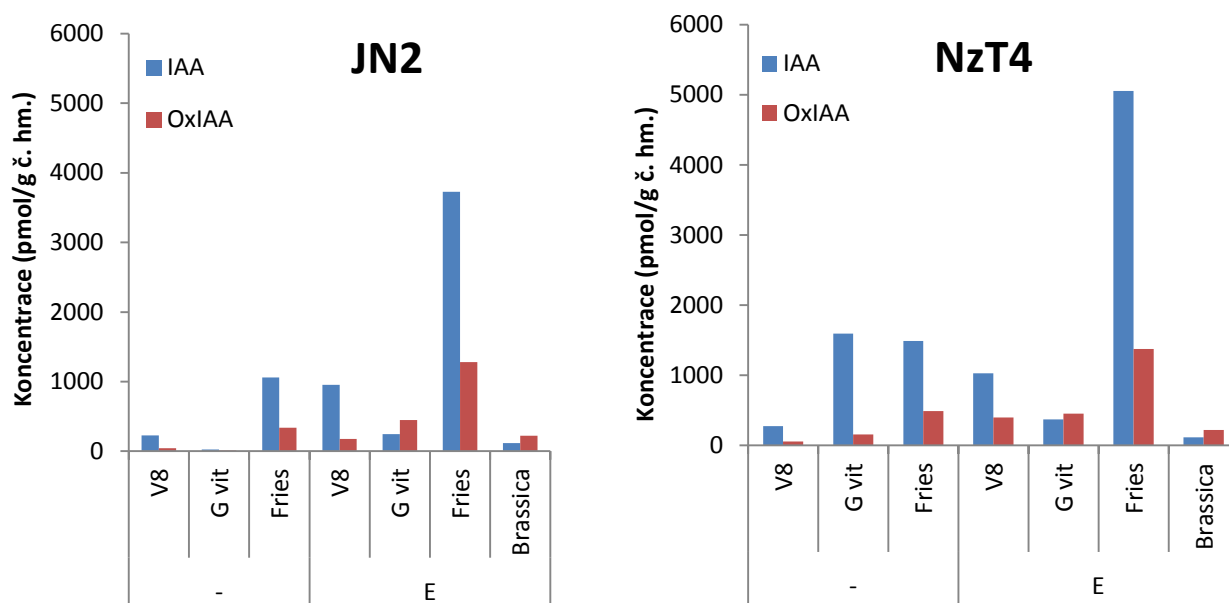
Varianta	IAA	IAA-Asp	IA-VAL	IA-GLU	IA-LEU	IA-ALA
var.1 Fries Lm A	715,65	19,7	4,79	21,27	12,63	24,94
var.4 Fries Lm B	823,22	14,57	4,37	20	9,94	17,19
var.7 Fries Lm C	761,76	24,62	3,14	22,33	10,81	23,03
var.10 Fries Lm D	652,38	21,6	3,9	18,5	9,08	16,14
Varianta	OxIAA	OxIAA-GE	IAA-GE	PAA	IPyA	IAM
var.2 G Lm A	81,11	0,69	0,03	0,03	0,13	0
var.5 G Lm B	64	0,81	0,04	0,02	0,52	0,16
var.8 G Lm C	84,36	0,69	0,02	0,39	0,21	0
var.11 G Lm D	85	0,31	0,05	0	0,19	0
var.1 Fries Lm A	566,44	0,45	0,38	1993,15	8,75	48,78
var.4 Fries Lm B	544,31	0,9	0,02	697,87	17,32	55,41
var.7 Fries Lm C	602,4	0,18	1,16	1808,19	5,65	50,53
var.10 Fries Lm D	643,98	0,74	2,94	1029,64	23,46	42,06
var.2 G Lm A	16,49	0,1	0	3162,64	37,13	0,02
var.5 G Lm B	32,59	0,02	0,1	1893,79	3,66	0,1
var.8 G Lm C	21	0,24	0	3491,77	13,85	0,67
var.11 G Lm D	22,4	0,12	0,07	2512,06	1,17	0,43

Tabulka14: Koncentrace auxinů v *L. maculans* kultivované za různých podmínek. Testovány byly kombinace následujících podmínek: Různé izoláty *L. maculans* (JN2, NzT4), různá kultivací media (G – Gamborg s vitaminy, V8, F – Fries), způsob kultivace (liq – tekutá kultura, plt – zpevněné agarové medium), přítomnost rostlinného extraktu (E). Koncentrace je uvedena v jednotkách pmol/g čerstvé hmotnosti. IAA – indolyl-3-octová kyselina, IAA-Asp – IAA-aspartát, IA-Val – IAA-valin, IA-Glu – IAA-glutamát, IA-Leu – IAA-leucin, IA-Ala – IAA-alanin, OxIAA – oxindolyl-3-octová kyselina, OxIAA-GE – ester OxIAA s glukosou, IAA-GE – ester IAA s glukosou, IPyA – indol-3-pyruvát, IAM – indol-3-acetamid, IAN – indol-3-acetonitril.

Varianta	IAA	IAA-Asp	IAA-Ala	IAA-Leu	OxIAA	OxIAA-GE	IAN
var1 liq V8 JN2	224,85	2,18	0,15	2,59	43,47	0,11	0,19
var2 liq V8 NzT4	275,11	1,06	0,03	2,11	54,73	0,11	0,08
var3 liq V8 E JN2	952,96	2,51	0,67	1,02	177,79	0,07	0,12
var4 liq V8 E NzT4	1030,18	1,38	0,63	0,94	401,34	0,64	0,13
var5 liq G JN2	22,81	0,61	0,26	0,02	9,24	0,02	0,09
var6 liq G NzT4	1594,45	0,45	0,04	0,09	157,21	0,02	0,18
var7 liq G E JN2	246,86	0,53	0,2	1,56	449,45	0,91	0,32
var8 liq G E NzT4	373,63	0,2	0,07	0,82	455,5	0,87	2,15
var9 liq F JN2	1059,94	4,54	18,07	40,82	338,68	0,13	0,37
var10 liq F NzT4	1492,2	4,49	9,08	68,59	491,6	0,27	1,82
var11 liq F E JN2	3727,36	16,89	45,13	82,27	1278,64	1,7	0,79
var12 liq F E NzT4	5058,05	4,94	53	88,44	1374,49	5,18	0,47
var13 plt V8 JN2	133,36	0,03	0	8,77	44,13	0,26	0,22
var14 plt V8 NzT4	117,82	0,11	0,25	0,49	44,36	0,18	0,53
var15 plt V8 E JN2	510,62	0,82	0,52	0,46	501,37	0,28	1,46
var16 plt V8 E NzT4	354,3	0,18	0,53	6,66	490,08	0,15	0,81
var17 plt G JN2	12,44	0,38	0	0,08	6,2	0	0,36
var18 plt G NzT4	47,76	0,34	0,16	0,28	9,9	0,01	0,09
var19 plt G E JN2	116,36	0,24	0,17	1,45	177,48	0,2	1,86
var20 plt G E NzT4	177,1	0,05	0,04	0,16	165,47	0,08	1,33
var21 plt F JN2	78,06	1,18	7,16	14,38	1328,78	0,08	0,48
var24 plt F E NzT4	339,38	2,55	8,58	21,1	2727,36	2,82	77,69
var 1 pltLf JN2	231,87	9,98	0,59	2,17	221	0,39	0,2
var 2 pltLf NzT4	226,53	8,89	1,26	0,87	198,13	0,52	0,82

L. maculans produkuje auxiny v různých mediích, přičemž nejvyšší produkce byla pozorována u medií Fries a V8. Izolát JN2 v anorganickém mediu Gamborg neprodukuje téměř žádné auxiny, zatímco v ostatních použitých mediích je produkce auxinů izoláty JN2 a NzT4 srovnatelná. Z obrázku 11 je také patrné, že přidání extraktu z rostlin *B. napus* zvyšuje produkci IAA, ale pouze v mediu V8 a Fries.

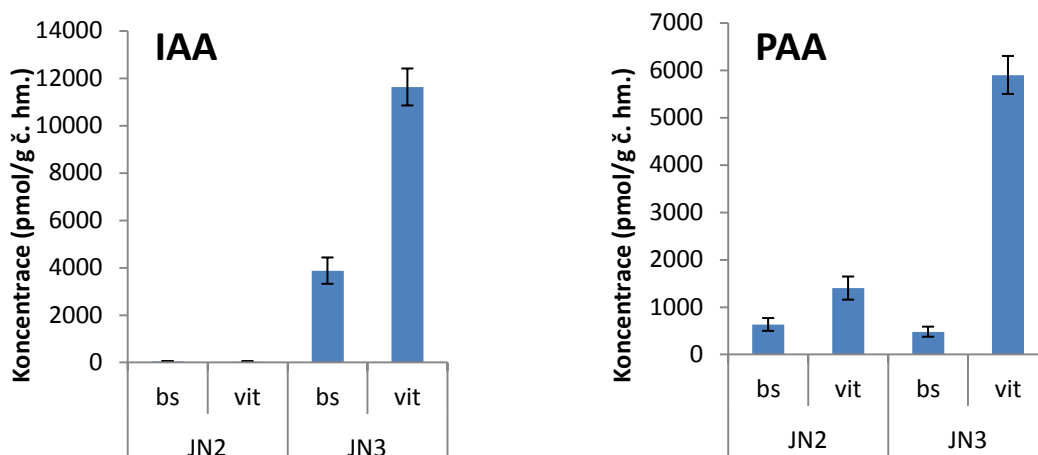
Od těchto výsledků se odvíjel další postup práce. Byla porovnána hladina identifikovaných hormonů v myceliu *L. maculans* a rostlinách *Brassica napus*.



Obrázek 11: Koncentrace hlavních auxinů v různých izolátech *L. maculans* za různých podmínek. Mycelium bylo 10 dní kultivováno v tekutém mediu, rostliny *B. napus* byly pěstovány 14 dní hydroponicky v perlitu. Následně byla stanovena koncentrace hormonů pomocí LC-MS. IAA – indolyl-3-octová kyselina, OxIAA – oxindolyl-3-octová kyselina. Data pocházejí z jednoho biologického opakování, na danou podmínku byl použit vždy jeden vzorek.

Media Fries a V8, obsahující rostlinnou šťávu (V8) nebo kvasničný extrakt (Fries), mohou obsahovat rostlinné fytohormony a tak zkreslovat sledovanou produkci hormonů houbou *L. maculans*. Proto jsme nadále vybrali pro studium hormonů přesně definované syntetické medium Gamborg.

V dalším experimentu jsme více charakterizovali produkci auxinů u dvou izolátů JN2 a JN3 v tomto mediu s přidáním vitaminů nebo bez. Výsledek zobrazuje obrázek 12.



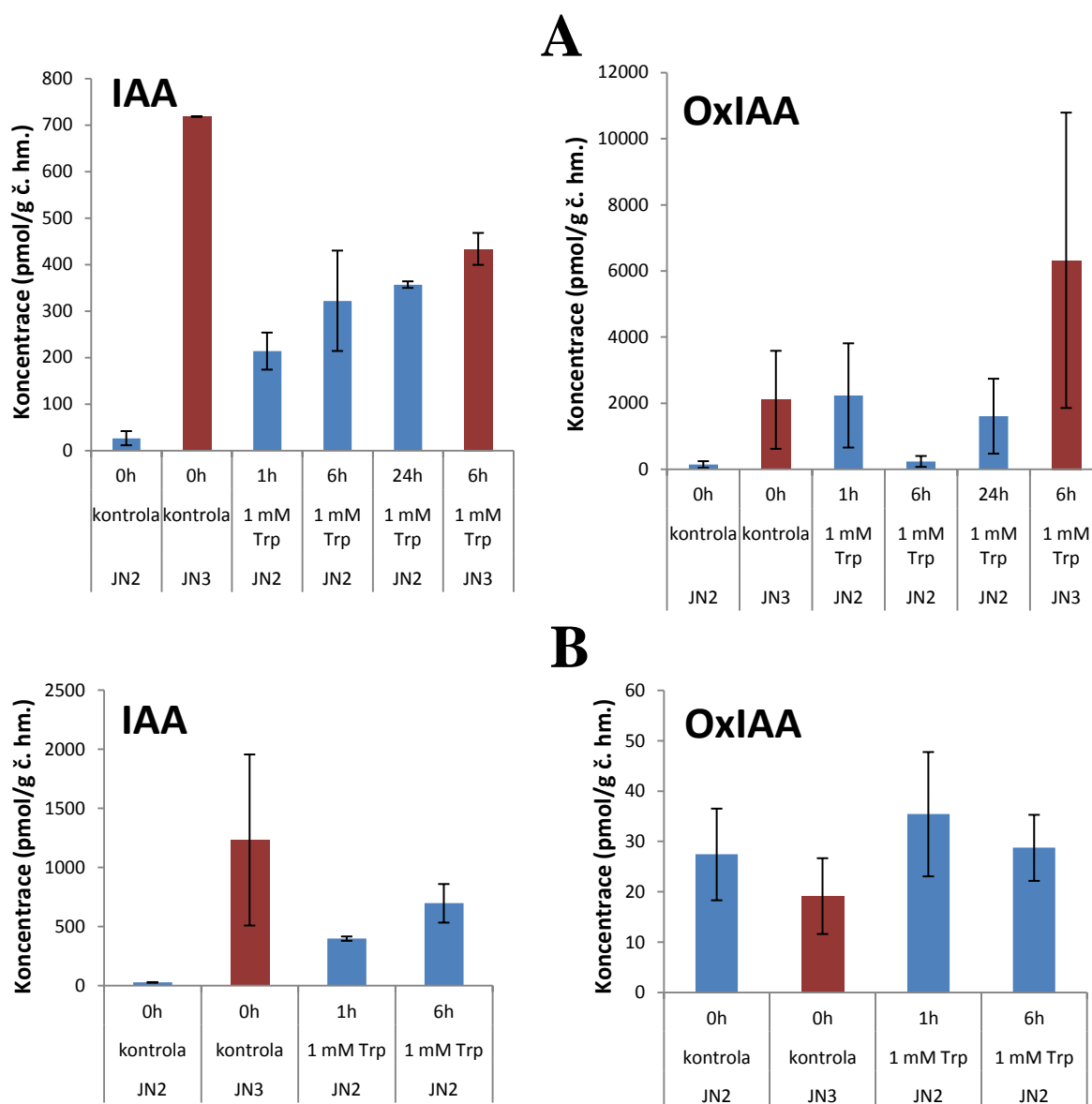
Obrázek 12: Produkce IAA a PAA v syntetickém mediu Gamborg u *L. maculans*, izolátů JN2 a JN3. *L. maculans* byla kultivována 10 dní v tekutém mediu Gamborg basal salts (bs) bez vitaminů nebo s vitaminy (vit). Chybové úsečky znázorňují SE ze dvou biologických opakování.

Je tedy patrné, že izolát JN2 v mediu Gamborg basal salts není schopen produkovat téměř žádnou IAA a ani přidavek vitaminů neindukuje produkci IAA. Naproti tomu izolát JN3 produkuje IAA v mediu Gamborg basal salts v koncentracích v intervalu 3000-4000 pmol/g čerstvé hmotnosti a po přidání vitaminů produkce IAA výrazně stoupla. JN3 v těchto mediích produkuje IAA v koncentracích o tři (bs) až čtyři (vit) řády vyšší než v JN2. Produkce PAA je v mediu basal salts u obou izolátů srovnatelná, po přidání vitaminů se její produkce JN3 výrazně zvyšuje, u JN2 byl pozorován menší nárůst produkce.

Předchozí experiment ale naznačuje, že JN2 je schopna produkovat IAA v jiných mediích jako Fries nebo V8 nebo po přidání extraktu z řepky. Proto jsme se v dalším experimentu pokusili stimulovat produkci IAA v JN2 přidáním prekurzorů pro biosyntézu auxinů.

4.2 Růst *L. maculans* v mediu s prekurzory syntézy auxinů

Je známo, že u rostlin, mikroorganismů a jiných hub několik biosyntetických drah IAA vychází z tryptofanu. Proto jsme se pokusili stimulovat produkci IAA přidáním tryptofanu do kultivačního media *L. maculans*. Byly použity izoláty JN2 a JN3, k jejichž kultuře byl po 10 dnech kultivace přidán tryptofan ve finální koncentraci 1 mM.

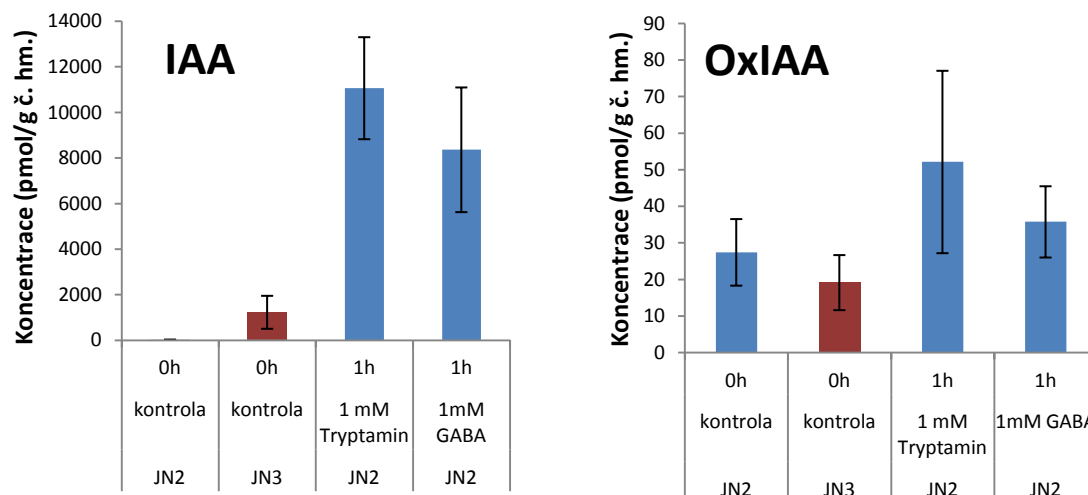


Obrázek 13: Koncentrace IAA v tekuté kultuře *L. maculans* v mediu G-MES vit po indukci tryptofanem *L. maculans* byla kultivována po dobu 10 dní (A) nebo 7 dní (B) v tekutém mediu Gamborg vit, poté byla ošetřena přidáním Trp do kultivačního media do výsledné koncentrace 1mM. Chybové úsečky značí SE ze dvou biologických opakování.

Z obrázku 13 je patrné, že JN2 již za hodinu po ošetření tryptofanem produkuje IAA. Mezi 1 h a 24h narůstá koncentrace IAA v myceliu JN2 jen zvolna. 24h po stimulaci Trp je koncentrace IAA srovnatelná s bazální koncentrací IAA u izolátu JN3. U izolátu JN3 nebyl pozorován žádný efekt na zvýšení koncentrace IAA v myceliu po přidání tryptofanu do media.

Biosyntetické dráhy auxinů nemusí vycházet pouze z tryptofanu. Pro stimulaci těchto drah nezávislých na tryptofanu byl proveden experiment ošetření mycelia tryptaminem,

prekurzorem následujícím v jedné z biosyntetických drah po tryptofanu. Dále bylo provedeno kontrolní ošetření látkou obsahující dusík, u níž nebylo předpokládáno, že by sloužila jako prekurzor auxinů. Výsledek je zobrazen v obrázku 14, z něhož vyplývá, že tryptamin i GABA stimulují produkci IAA přibližně desetkrát více než tryptofan. Produkce OxIAA není přidáním GABA ani tryptaminu ovlivněna.



Obrázek 14: Koncentrace IAA a OxIAA v *L. maculans* v tekutém mediu G-MES vit po indukci GABA a tryptaminem. *L. maculans* byla kultivována po dobu 7 dní v tekutém mediu Gamborg vit, poté byla ošetřena přidáním tryptaminu a GABA do kultivačního media do výsledné koncentrace 1mM. Chybové úsečky značí SE ze tří biologických opakování.

4.3 Výběr kandidátních genů biosyntetické dráhy auxinů

Na základě sekvenční podobnosti s již popsanými geny, účastníky se biosyntézy auxinů v jiných organismech^{56,33}, byly v *Leptosphaeria maculans* vytipovány orthology těchto genů (Tabulka15).

Tabulka 15: Kandidátní geny pro biosyntetické dráhy auxinů v *Leptosphaeria maculans* byly vytipovány na základě podobností kodované proteinové sekvence. Byly nalezeny orthology pro geny *Arabidopsis thaliana YUCCA1* (2 orthology) a *NIT1* (3 orthology) a geny *Ustilago maydis IAD1* (2 orthology), *TAM1* a *TAM2* (2 orthology). Max score je parametr, udávající podobnost sekvencí podle definice uvedené v⁵⁷.

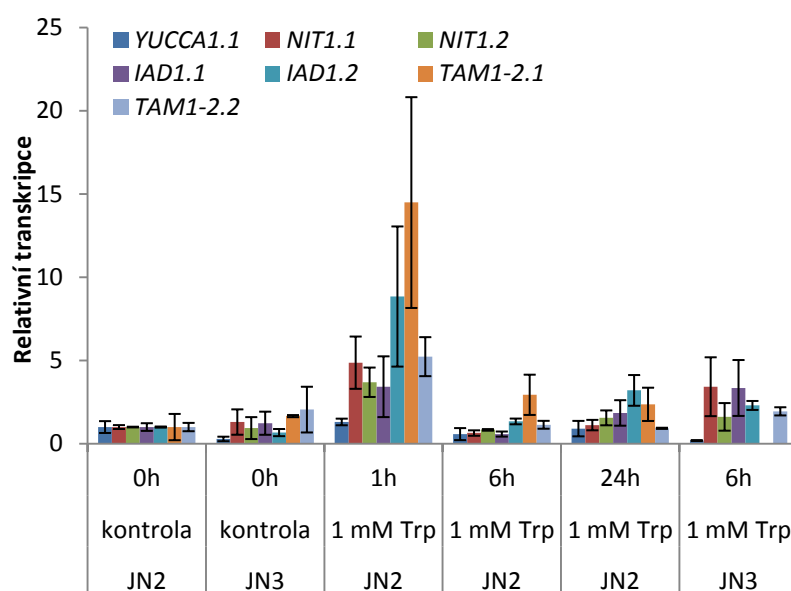
<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Leptosphaeria maculans</i>			
Název genu	Protein	Protein	Max score	Pokrytí	Podobnost
YUCCA1	AEE86075.1	XP_003837538.1	110	78%	25%
		XP_003840829.1	89.7	75%	25%
NIT1	AEE77889.1	XP_003842954.1	182	81%	41%
		XP_003835263.1	139	90%	32%
		XP_003839332.1	99.8	88%	28%
<i>Ustilago maydis</i>		<i>Leptosphaeria maculans</i>			
Název genu	Protein	Protein	Max score	Pokrytí	Podobnost
IAD1	AAC49575.1	XP_003835866.1	639	98%	64%
		XP_003837936.1	536	98%	55%
TAM1	XP_757951.1	XP_003838736.1	178	84%	27%
		XP_003845026.1	135	91%	26%
TAM2	XP_759685.1	XP_003838736.1	186	90%	30%
		XP_003845026.1	119	95%	22%

Orthology genů *Arabidopsis thaliana* pro gen *YUCCA1* byly označeny jako *YUCCA1.1* a *YUCCA1.2*, orthology pro *NIT1* byly označeny jako *NIT1.1*, *NIT1.2* a *NIT1.3*. Míra homologie je nízká, protože organismy jsou od sebe evolučně značně vzdáleny. Po navržení primerů a otestování jejich spolehlivosti byla dále stanovována exprese genů *YUCCA1.1*, *NIT1.1* a *NIT1.2*. Orthology genů *Ustilago maydis IAD1* byly označeny jako *IAD1.1* a *IAD1.2*, orthology genů *TAM1* a *TAM2* byly označeny jako *TAM1-2.1* a *TAM1-2.2*. Po navržení a otestování primerů byla stanovována exprese všech těchto kandidátních

genů. Pro *IAD1* z *Ustilaga maydis* byly proteinové sekvence nejbližších dvou homologů v *L. maculans* podobny z 55 – 64% na 98 % délky sekvence. Další kandidáti byli vybráni na základě podobnosti s geny *TAM1* a *TAM2* z *Ustilaga maydis* a geny *NIT1* a *YUCCA1* z *Arabidopsis*. Pro tyto geny porovnání proteinových sekvencí odhalilo podobnost 25 – 32 % na ~80 % délky sekvence.

Pro tyto geny byly navrženy primery a metodou kvantitativní polymerasové řetězové reakce s reverzní transkripcí byla kvantifikována míra transkripce těchto genů ve vzorcích *L. maculans* v tekuté kultuře, ošetřené tryptofanem (Obrázek 15).

Nízká bazální produkce IAA v izolátu JN2 a její indukce pomocí Trp byl ideální nástroj na testování zapojení těchto kandidátních genů v biosyntéze auxinu.

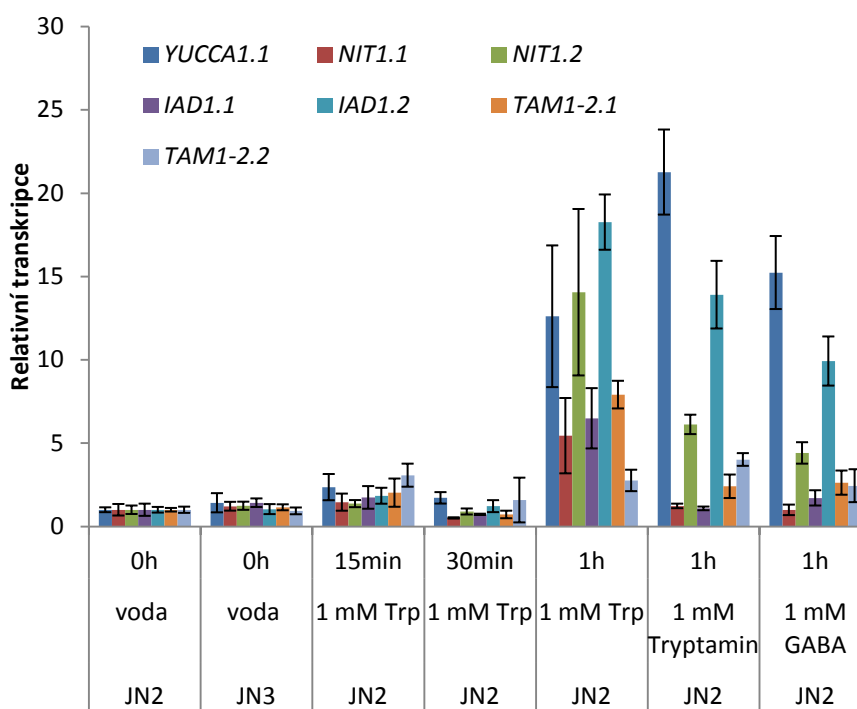


Obrázek 15: Relativní transkripce kandidátních genů pro biosyntézu auxinů v *L. maculans* po ošetření tryptofanem v různých časech. *L. maculans* byla kultivována 10 dní v tekutém mediu Gamborg vit, ošetřena přidáním tryptofanu do výsledné koncentrace 1 mM. Relativní transkripce byla stanovena v časech 0h, 1h, 6h a 24h po ošetření. Relativní exprese byla vztažena k expresi *ITS1* a tubulinu. Chybové úsečky značí SE dvou biologických opakování.

Z tohoto experimentu vyplývá, že zvýšenou transkripcí genů pozorujeme pouze po 1 hodině od ošetření, kdežto po 6h a 24h je exprese podobná té bazální v čase nula. Nejvíce jsou indukovány geny označené jako *TAM1-2.1*, *IAD1.2* a *NIT1.1* (Obrázek 14).

Mezi izoláty JN2 a JN3 není v kontrole významný rozdíl v transkripci kandidátních genů. Experiment byl zopakován s mladším myceliem (7 denním) a míra transkripce byla

pozorována v kratších časech 15 min, 30 min a 1h. Dále byly kromě tryptofanu použity tryptamin, který je také prekurzor biosyntézy auxinů (Obrázek 6 v kap. 1.2.9) a GABA jako dusíkatá sloučenina, u níž nebyla předpokládána stimulace auxinových drah (Obrázek 16).



Obrázek 16: Relativní transkripce kandidátních genů pro biosyntézu auxinů v 7 dní kultivovaném myceliu *L. maculans* po ošetření tryptofanem (Trp), tryptaminem a kyselinou γ -aminomáselnou (GABA). *L. maculans* byla kultivována 7 dní v tekutém mediu Gamborg vit, ošetřena přidáním Trp, tryptaminu a GABA do výsledné koncentrace 1 mM. Relativní transkripce byla vztažena k transkripci genů *ITS1* a tubulinu.

Bylo potvrzeno, že úroveň bazální transkripce kandidátních genů se neliší mezi neošetřenými izoláty JN2 a JN3. Podobně jako v předešlém experimentu došlo k indukci exprese některých genů 1 hodinu po ošetření. Zvýšená transkripce nebyla pozorována v 15 a 30 minutách po ošetření tryptofanem. Také bylo potvrzeno zvýšení transkripce genů *IAD1.2*, *NIT1.2* a *TAM1-2.1* po ošetření tryptofanem. Tryptofan dále stimuluje transkripci genů *YUCCA1.1* a *IAD1.1*.

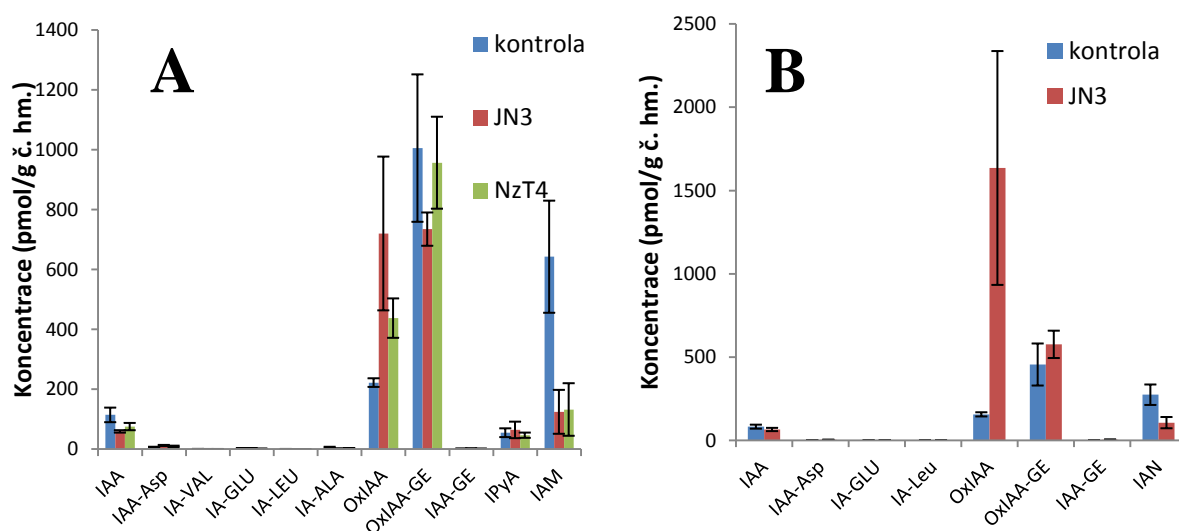
Gen *YUCCA1.1* je silně indukován i tryptaminem. Tryptamin stimuluje také transkripci některých z kandidátních genů. Je zajímavé, že profil indukovaných genů u Trp a

tryptaminu je rozdílný. Nejvíce indukované geny jsou *YUCCA1.1*, *TAMI-2.1* a *IAD1.2.*, zatímco indukce genů *NIT1.1*, *IAD1.1* a *TAMI-2.1* je nedetekovatelná.

Kyselinou γ -aminomáselnou je indukován gen *YUCCA1.1*, *NIT1.2* a *IAD1.2*. Indukce je slabší než v případě tryptaminu.

4.4 Produkce auxinů v rostlinách *Brassica napus* infikovaných sporami *Leptosphaeria maculans*

V dalším experimentu byla zjišťována hladina hormonů ve vzorcích z rostlin *B. napus* infikovaných *L. maculans* nebo kontrolní infekcí (voda). Byly použity rostliny *Brassica napus* odrůdy Euro1 a izoláty *L. maculans* JN3 a NzT4. Infekce rostlin byla provedena infiltrací suspenze spor do listu nebo aplikace kapky suspenze na list po mechanickém poranění listu jehlou.



Obrázek 17: Srovnání koncentrace auxinů v neinfikovaném rostlinném pletivu a pletivu infikovaném izoláty JN3 a NzT4. Koncentrace IAA se neliší v infikovaných a kontrolních rostlinách, koncentrace OxIAA je vyšší v infikovaných rostlinách. 14 dní staré rostliny byly infikovány infiltrací (A) nebo aplikací po vpichu jehlou (B). Koncentrace hormonů byla stanovena LC-MS čtyři dny po infekci, vzorky k LC-MS analýze byly odebrány 10 dní po infekci. Kontrola – rostliny ošetřené vodou, IAA – indolyl-3-octová kyselina, IAA-Asp – IAA-aspartát, IA-Val – IAA-valin, IA-Glu – IAA-glutamát, IA-Leu – IAA-leucin, IA-Ala – IAA-alanin, OxIAA – oxindolyl-3-octová kyselina, OxIAA-GE – glukosaester OxIAA, IAA-GE – glukosaester IAA, IPyA – indol-3-pyruvát, IAM – indol-3-acetamid, IAN – indol-3-acetonitril. Chybové úsečky značí SE ze čtyř biologických opakování.

Koncentrace IAA se ve všech variantách pohybovala okolo 150 pmol/g čerstvé hmotnosti (Obrázek 17). Podobná koncentrace byla zjištěna u indol-3-pyruvátu. Koncentrace IAA ani IPyA se zásadně neměnila v infikovaném pletivu. Dále byla v kontrolních rostlinách zjištěna OxIAA v koncentraci okolo 200 pmol/g čerstvé hmotnosti. U infikovaných rostlin bylo nalezeno OxIAA podstatně více (450 – 700 pmol/g čerstvé hmotnosti). Glukosaester OxIAA byl nalezen ve všech variantách v koncentraci 800 – 1000 pmol/g čerstvé hmotnosti a nebyl ovlivněn infekcí. Indol-3-acetamid byl nalezen v kontrolních rostlinách ve vyšší koncentraci oproti rostlinám infikovaným. Ostatní auxiny se vyskytovaly v zanedbatelných koncentracích.

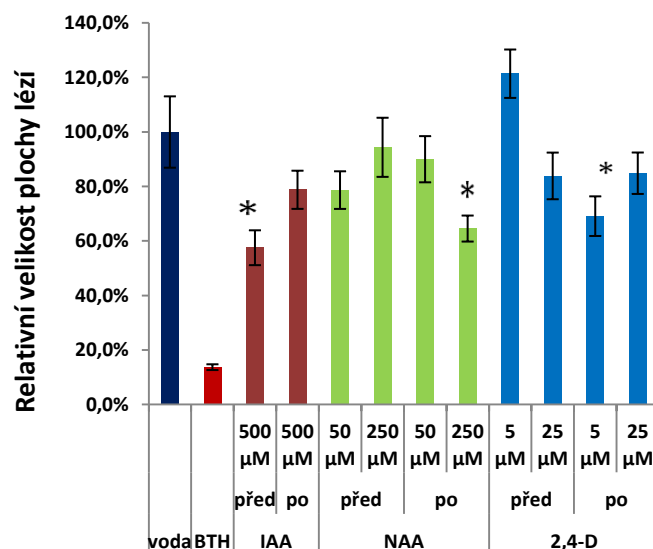
Při inokulaci *L. maculans* kapkou do poraněného pletiva byl sledován podobný vliv na koncentrace hormonů. Koncentrace IAA zůstala při infekci neměnná, zato koncentrace OxIAA se zvýšila v infikovaných rostlinách oproti kontrolním. Podobně jako při infekci infiltrací, hladina glukosaesteru OxIAA nebyla ovlivněna infekcí.

Po zopakování experimentu pomocí infekce aplikací suspenze spor na místo vpichu jehlou byla zjištěna podobná koncentrace IAA jako v prvním případě. Byla potvrzena vyšší koncentrace OxIAA v infikovaných rostlinách oproti kontrolním a glukosaester OxIAA se nacházel ve všech variantách v podobné koncentraci. V tomto experimentu nebyla zjištěna přítomnost indol-3-pyruvátu ani indol-3-acetamidu. Oproti prvnímu pokusu byl v rostlinách nalezen indol-3-acetonitril v koncentraci okolo 200 pmol/g čerstvé hmotnosti.

V infikovaných rostlinách tedy dochází k nárůstu auxinů, zejména oxIAA. Zjištěný nárůst koncentrace auxinů a vysoká koncentrace neaktivní OxIAA v infikovaných rostlinách vedla k hypotéze, že *Leptosphaeria maculans* pomocí syntézy IAA ovlivňuje hostitelskou rostlinu, která se brání oxidací a deaktivací IAA na OxIAA.

4.5 Vliv exogenně aplikovaných auxinů na průběh infekce rostlin *Brassica napus* *Leptosphaeria maculans*

Dalším zvoleným přístupem bylo testování reakce rostlin, ošetřených exogenní aplikací fytohormonů na infekci *Leptosphaeria maculans*. K experimentu byla použita IAA, NAA a 2,4-D ve dvou koncentracích.

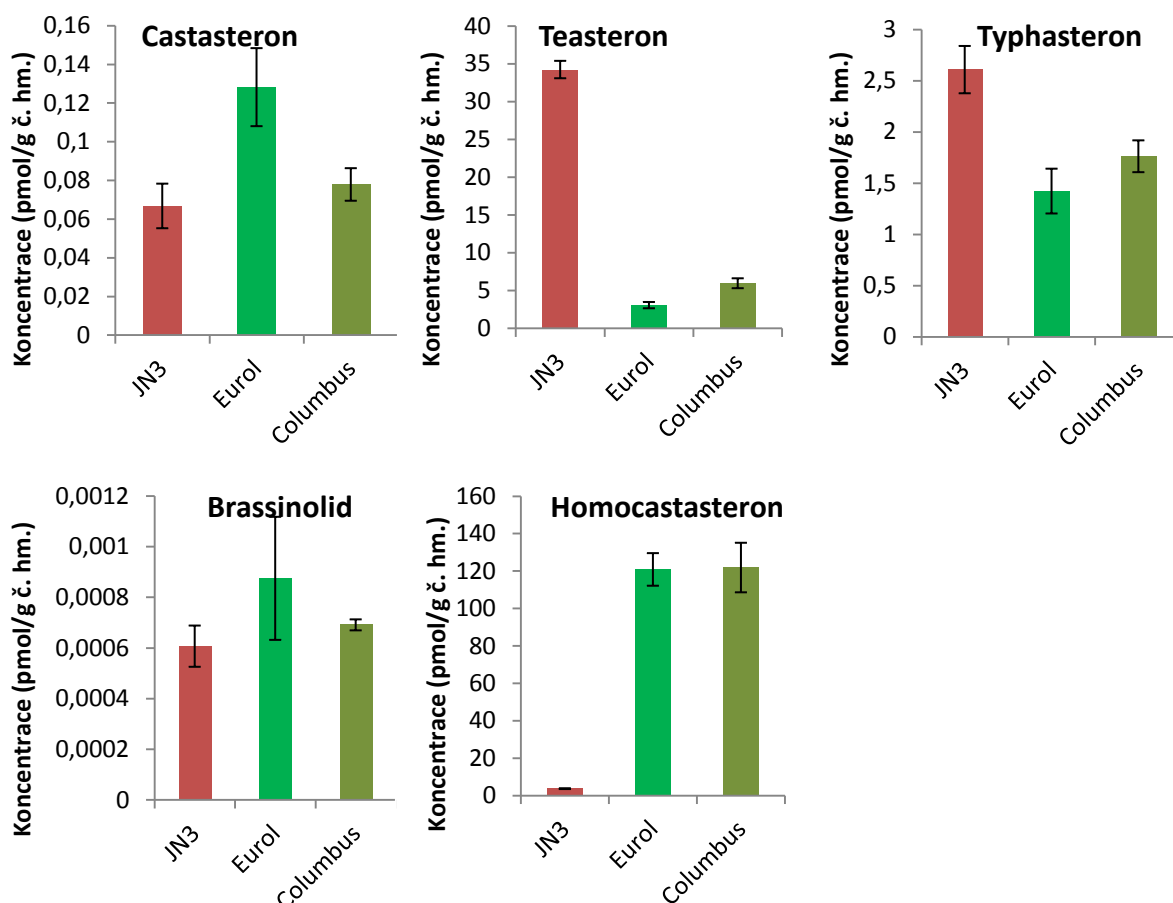


Obrázek 18: Srovnání velikosti lézí na listech *B. napus* po infekci *L. maculans*, které předcházela (před) nebo po ní následovala (po) exogenní aplikace auxinů. Desetidenní rostliny *B. napus* byly ošetřeny postřikem roztokem auxinů, čtyři dny po ošetření byla do rostlin infiltrována suspenze spor *L. maculans*. V další variantě bylo ošetření provedeno čtyři dny po infiltraci spor. Analýza plochy lézí byla provedena 10 dní po infekci. IAA – indolyl-3- octová kyselina, NAA – 1-naftyl-1-oxo-2-acetát kyselina, 2,4-D – 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (syntetické analogy auxinů), BTH – benzothiadiazol (pozitivní kontrola, indukuje rezistenci rostlin k infekci). Chybové úsečky značí SE souboru 12 infikovaných děložních listů. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na základě t-testu na hladině významnosti $p < 0,05$.

Po aplikaci IAA před infekcí a NAA a 2,4-D ve vyšší koncentraci po infekci se snížila plocha nekrotických lézí až o 40%. U ostatních variant nebylo snížení nekrotické plochy významné (Obrázek 18).

4.6 Produkce brassinosteroidů v *Leptosphaeria maculans*

Pomocí kapalinové chromatografie s detekcí hmotnostní spektrometrií byla stanovena koncentrace brassinosteroidů v myceliu *L. maculans*, pěstované v tekuté kultuře a porovnána s koncentrací těchto hormonů v děložních listech rostlin *B. napus*. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 19.



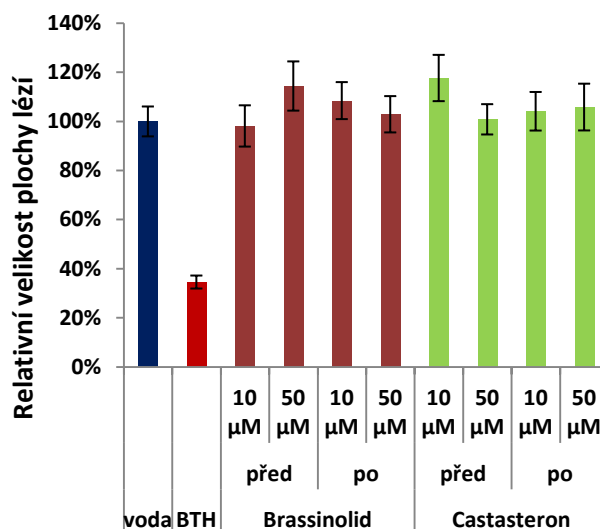
Obrázek 19: Porovnání koncentrace brassinosteroidů mezi *L. maculans* JN3 a odrůdami *B. napus* Eurol a Columbus. Vzorby byly odebrány z 10 dní starého mycelia v tekutém mediu Gamborg vit a děložních listů 14 dní starých rostlin. Chybové úsečky zobrazují SE čtyř biologických opakování.

Zjištěné koncentrace brassinosteroidů jsou v rostlinách i myceliu velmi nízké. Nejnižší koncentrace byla zjištěna u bioaktivního brassinolidu. Koncentrace se významně neliší mezi rostlinami a myceliem. V rostlinném pletivu bylo ze všech brassinosteroidů nejvíce homocasteronu, který naopak v myceliu nebyl téměř žádný. V myceliu byla zjištěna nejvyšší koncentrace teasteronu, který se vyskytoval v řepce v 7-krát nižších koncentracích.

4.7 Vliv exogenně aplikovaných brassinosteroidů na průběh infekce rostlin *Leptosphaeria maculans*

Podobně jako v předchozím experimentu týkajícím se auxinů byla v další části práce testována reakce rostlin na infekci *L. maculans*, které předcházelo nebo po ní následovalo

ošetření roztokem brassinosteroidů. Byly použity roztoky dvou aktivních hormonů, brassinolidu a castasteronu. Castasteron je v biosyntetické dráze rostlin prekurzorem brassinolidu. Výsledky jsou zobrazeny v obrázku 20.



Obrázek 20: Srovnání velikosti lézí na listech *B. napus* po infekci *L. maculans*, které předcházelo (před) nebo po ní následovalo (po) ošetření roztoky brassinolidu a castasteronu. Desetidenní rostliny *B. napus* byly ošetřeny postřikem roztoku brassinosteroidů, po čtyřech dnech následovala infiltrace suspenze spor *L. maculans* v případě varianty „před“. V případě varianty „po“ byly čtrnáctidenní rostliny infikovány *L. maculans* a ošetření hormony následovalo 4 dny po infekci. Vyhodnocení plochy nekrózy bylo provedeno 10 dní po infekci. Kontrolní rostliny byly ošetřeny vodou, jako pozitivní kontrola byl použit benzothiadiazol (BTH).

Z obrázku 20 je patrné, že exogenní aplikace brassinosteroidů nemá vliv na plochu nekrotických lézí, způsobených *L. maculans*.

4.8 Výběr kandidátních genů biosyntézy brassinosteroidů

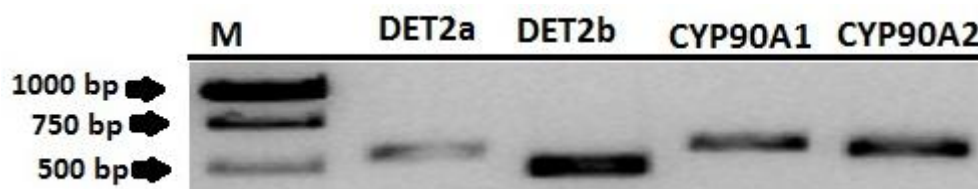
Geny zapojené do biosyntetické dráhy brassinosteroidů byly vytipovány na základě homologie s geny identifikovanými v *Arabidopsis thaliana*. Byly vybrány geny *CYP90A* a *DET2*. Funkcí genu *DET2* je hydrogenace uhlíku C4 steroidního skeletu BRS. *CYP90A* je zodpovědný za oxidaci na uhlíku C3. K oběma genům byly v *L. maculans* vybrány dvě homologní sekvence (Tabulka 16). Celková podobnost nalezených sekvencí je malá, protože evoluční vzdálenost mezi oběma organismy je velká.

Tabulka 16: Kandidátní geny pro biosyntetické dráhy brassinosteroidů v *Leptosphaeria maculans* byly vytipovány na základě podobností kodované proteinové sekvence. Byly nalezeny orthology pro geny *Arabidopsis thaliana* *CYP90A1* (2 orthology) a *DET2* (2 orthology). Max score je parametr, udávající podobnost sekvencí podle definice uvedené v ⁵⁷.

<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Leptosphaeria maculans</i>	Parametry homologie		
Název		Protein	Max score	Pokrytí	Podobnost
genu	Protein	Protein			
<i>CYP90A1</i>	NP_001078535.1	XP_003839802.1	93.2	61%	30%
		XP_003836834.1	89.4	61%	32%
<i>DET2</i>	NP_181340.1	XP_003835168.1	67.0	79%	28%
		XP_003836327.1	59.3	40%	30%

Pro přípravu konstruktů byla použita metoda Gateway[®] (Invitrogen, Obrázek 10). Tento univerzální systém umožňuje rychlý vznik expresního klonu obsahující vybraný gen. DNA segmenty jsou přenášeny mezi vektory pomocí rekombinantních specifických míst. Mezi rekombinační místa, která se využívají při Gateway[®] metodě patří *attB*, *attP*, *attL* a *attR*. Rekombinantní reakce jsou katalyzovány unikátními enzymy, které se váží na *att* místa (BP a LR clonase). Podle těchto směsí enzymů jsou probíhající reakce nazvány BP reakce a LR reakce. Jejich princip popisuje obrázek 10.

Po identifikaci kandidátních genů byly navrženy specifické primery pro tyto geny, přičemž tyto primery obsahovaly i specifickou sekvenci pro rekombinační *attB* místo. Následně byly amplifikovány úseky cDNA těchto genů pomocí PCR. Produkt PCR byl úspěšně ověřen na základě velikosti pomocí elektroforézy. (Obrázek 21).



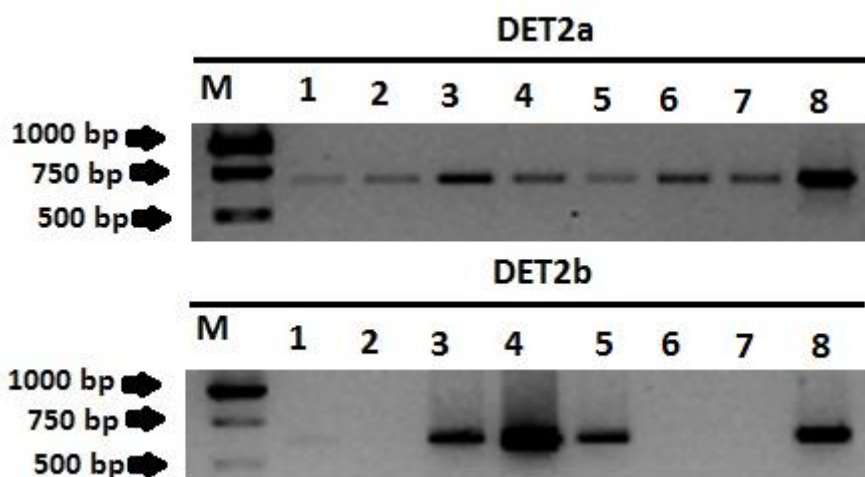
Obrázek 21: Amplifikace úseků cDNA kandidátních genů. Fragменты генů *DET2a* (553 bp), *DET2b* (468 bp), *CYP90A1* (577 bp) a *CYP90A2* (553 bp) obsahující sekvenci *attB* (29 bp) byly amplifikovány pomocí specificky navržených primerů a DNA polymerasy.

Úseky kandidátních genů, které obsahovaly *attB* sekvenci, byly klonovány do donorového vektoru pDONR-Zeo, jehož součástí jsou i dvě rekombinantní místa *attP1* a *attP2*, mezi kterými se nachází *ccdB* gen. V rámci rekombinantní BP reakce se mezi sebou vymění sekvence mezi *attB* a *attP* místy. Vektor pDONR-Zeo obsahuje gen pro rezistenci na antibiotikum zeocin, pomocí kterého byla dále provedena selekce. Vzniklými pENTR vektory, které obsahovaly kandidátní gen, byly transformovány bakterie *E. coli* DH5 α . Pro tento kmen *E. coli* je letální přítomnost *ccdB* genu, čehož je také využito k selekci kolonií, u nichž proběhla výměna inzertů. Bakterie byly kultivovány na médiu se zeocinem. Přítomnost kandidátních genů v narostlých koloniích byla ověřena pomocí PCR (Obrázek 22) s primery, uvedenými v tabulce 13.



Obrázek 22: Ověření přítomnosti inzertu v koloniích po BP reakci. Ověření přítomnosti fragmentů genů *DET2a* (784bp), *DET2b* (699 bp), *CYP90A1* (808 bp), *CYP90A2* (784 bp) v plasmidech pENTR pomocí primerů M13. Čísla označují jednotlivé kolonie vybrané k ověření. NTC – negativní kontrola, M – DNA standard.

Z pozitivních kolonií byly vzniklé pENTR vektory genů *DET2a* a *DET2b* (Obrázek 22) izolovány a použity k rekombinační LR reakci. Rekombinace probíhá mezi oblastmi *attL* pENTR klonu a *attR* pHYG-GS cílového vektoru, který nese rezistenci ke kanamycinu pro selekci v bakteriích a zároveň rezistenci k hygromycinu pro selekci v houbách. Součástí inzertu v pHYG-GS je opět *ccdB* gen. Vektory byly transformovány bakterie *E. coli* DH5 α metodou elektroporace.



Obrázek 23: Ověření přítomnosti inzertu v koloniích po LR reakci. Přítomnost fragmentů genů *DET2a* (706 bp) a *DET2b* (621 bp) byla ověřena pomocí PCR s primery pro pHYG-GS (Tabulka 13). Čísla označují jednotlivé kolonie vybrané k ověření. NTC – negativní kontrola, M – DNA standard.

Po ověření byly vzniklé pHYG vektory (Obrázek 23) izolovány a použity k transformaci bakterií *Agrobacterium tumefaciens* metodou teplotního šoku. Přítomnost plasmidu v bakteriích byla opět ověřena (Obrázek 24).



Obrázek 24: Ověření přítomnosti plasmidu v bakteriích *A. tumefaciens* po transformaci Přítomnost fragmentů genů *DET2a* (706 bp) a *DET2b* (621 bp) byla ověřena pomocí PCR s primery pro pHYG-GS (Tabulka 13). Čísla označují jednotlivé kolonie vybrané k ověření. NTC – negativní kontrola, M – DNA standard.

5. DISKUSE

V rámci této práce byla studována produkce fytohormonů patogenem *Leptosphaeria maculans* a případný vliv těchto patogenem produkovaných hormonů na průběh infekce rostlin *Brassica napus*. Práce byla zaměřena na skupiny auxinů a brassinosteroidů.

Vliv složení media na produkci auxinů *in vitro*

Bylo zjištěno, že *L. maculans* v kultuře *in vitro* produkuje několik známých auxinů. Nejvíce byla zastoupena v rostlinách bioaktivní IAA, její oxidační produkt OxIAA a PAA, jež je rovněž bioaktivním auxinem rostlin. Schopnost produkovat IAA byla již popsána u jiných askomycet jako je *Magnaporthe oryzae* nebo *Fusarium oxysporum*^{39,29}. V případě *F. oxysporum* bylo ke kultivaci použito medium PDB obsahující extrakt z brambor, které je chemicky nedefinované podobně jako námi používané medium V8. Produkce auxinů byla studována v chemicky definovaném mediu Gamborg s vitaminy. Bylo zjištěno, že právě přítomnost vitaminů má velký vliv na stimulaci produkce auxinů, protože absence vitaminů v mediu Gamborg basal salts vedla ke snížení produkce auxinů v myceliu. Medium obsahuje látky, v jejichž molekulách se nacházejí heterocykly obsahující dusíkové atomy (kyselina nikotinová, thiamin a pyridoxin). Mohly by tedy sloužit jako snadno využitelné prekurzory auxinů. V mediích obsahujících kvasničný extrakt (medium Fries) nebo zeleninovou šťávu (medium V8) byla produkce IAA i OxIAA dokonce vyšší. U těchto medií je ale velmi těžké určit, která složka způsobuje zvýšenou biosyntézu IAA nebo zda jde o kontaminaci fytohormony. Předběžná analýza hormonů v tekutém mediu Fries (výsledky neukázány) ale naznačovala, že auxiny i jiné fytohormony jsou detekovány i v mediu neinokulovaném *Leptosphaerií*. Přítomnost auxinů v neinokulovaném mediu Gamborg byla minimální. Rovněž po přidání extraktu z rostlin *B. napus* byla zjištěna vyšší koncentrace IAA. Přidání extraktu z rostlin mělo simulovat přítomnost hostitele. Je tedy možné, že *Leptosphaeria* by mohla regulovat syntézu auxinů po rozpoznání určitých hostitelsky-specifických molekul, se kterými se dostává do styku při infekci. Nemůžeme ale také vyloučit přítomnost fytohormonů pocházejících z rostlinného extraktu.

Rozdíl v produkci auxinů u různých izolátů *in vitro*

Dále bylo zjištěno, že produkce hormonů jednotlivými použitými izoláty se významně liší. V mediu Gamborg s vitaminy izolát JN2 neprodukoval téměř žádnou IAA, zatímco sesterský izolát JN3 produkoval IAA v koncentraci asi 10000 pmol/g čerstvé hmotnosti.

To je velmi pozoruhodné, protože tyto dva izoláty by se od sebe geneticky měly lišit pouze přítomností funkční alely efektorového genu *AvrLm1* u JN3⁵². Bylo by zajímavé testovat, zdali přenos *AvrLm1* do JN2 ovlivní produkci auxinů v této houbě.

Zjištěná zvýšená produkce by tedy mohla naznačovat, že *L. maculans* zvyšuje produkci IAA za účelem manipulace obrannými mechanismy hostitele. Produkce IAA během infekce a zvýšení virulence u mutantů, tvořících více IAA oproti divokému typu bylo již popsáno u patogenních hub *Magnaporthe oryzae* a *Fusarium oxysporum*^{29,39}. Dále je možné, že výsledky jsou zkresleny kontaminací fytohormony, pocházejícími z přidaného extraktu.

Indukce produkce auxinů

JN2 produkuje velmi nízké množství auxinů, ale přidáním různých auxinových prekurzorů lze nápadně stimulovat biosyntézu auxinů. Podobný efekt byl popsán u *M. oryzae*, která v mediu s obsahem tryptofanu produkuje IAA²⁹. U basidiomycety *Ustilago maydis* produkci IAA stimuluje tryptamin³⁰. Po přidání tryptofanu do media produkce IAA u JN2 vzrostla o dva řády. Podobný účinek na izolát JN3 nebyl zjištěn. To by mohlo naznačovat, že v testovaném Gamborg mediu izolát JN2 nedokáže syntetizovat tryptofan. Jak bylo pozorováno, vliv vitaminů není na tento fenotyp rozhodující. Dále byla produkce IAA zvýšena přidáním tryptaminu a GABA do kultivačního media. Tryptamin se ukázal jako lepší induktor auxinů v *L. maculans*, když stimuloval produkci IAA desetkrát více než tryptofan. V této houbě tak tryptamin může být významnější prekurzor IAA. Zároveň jde o molekulu, která se neúčastní proteosyntézy, proto je pravděpodobnější, že je z velké části využita k syntéze IAA. Podobně i v *Ustilago maydis* se tryptamin choval jako lepší induktor IAA než tryptofan³⁰. Ošetření GABA stimulovalo produkci IAA podobně jako tryptamin. GABA je neproteogenní aminokyselina a v houbách *Aspergillus nidulans*, *Coprinus cinereus* a *Agaricus bisporus* je odbourávána na sukcinát pomocí specifické deaminasy⁵⁸. Pro houbu *Stagonospora nodorum*, která je blízce fylogeneticky příbuzná *L. maculans* (třída *Dothidiomycetes*, řád *Pleosporales*), může být GABA jediným zdrojem dusíku⁵⁹. V této houbě bylo popsáno, že mutanti, mající defektní enzym sukcinylsemialdehyd dehydrogenasu katalyzující jeden z kroků přeměny GABA na sukcinát, hůře rostou v mediu, kde je GABA jediný zdroj dusíku a jsou méně virulentní. GABA by mohla sloužit jako zdroj dusíku pro tvorbu IAA prostřednictvím dosud

nepopsané na tryptofanu nezávislé biosyntetické dráhy. Deaminace GABA za vzniku glutaminu je ale velmi obecný mechanismus, proto je tato hypotéza málo pravděpodobná.

Indukce kandidátních genů zapojených v biosyntéze auxinů

Zajímalo nás, jaké geny jsou zodpovědné za biosyntézu auxinů v *L. maculans*. Genom *L. maculans* obsahuje homologní sekvence ke genům *YUCCA1*, *NIT1*, *IAD1* a *TAM1* zapojených v biosyntetické dráze auxinů v *A. thaliana* a houby *U. maydis*^{56, 31}. Pro některé z těchto genů byly nalezeny 2 podobné kandidátní geny. Sledování expresí těchto genů za podmínek, při nichž indukujeme biosyntézu IAA v *L. maculans*, mělo přinést indicie o jejich roli. Expres některých kandidátních genů byla úspěšně indukována tryptofanem, tryptaminem a GABA. Jednalo se o geny *YUCCA1.1*, *IAD1.2*, *NIT1.2* a *TAM1-2.1*. V *Arabidopsis* a ostatních rostlinách produkty genů *YUCCA* hydroxylyjí aminovou skupinu tryptaminu³³. Ve srovnání s ostatními použitými induktory tryptofanem a GABA, docházelo v našich experimentech k největší indukci tohoto genu právě tryptaminem. *YUCCA* geny jsou také zapojeny do reakcí indol-3-pyruvátu (IpyA), kdy IpyA dekarboxuluje³³. To by mohlo znamenat, že *L. maculans* dokáže syntetizovat IAA tryptaminovou dráhou se zapojením *YUCCA* genů.

Nejvyšší podobnost v *L. maculans* byla objevena pro gen *U. maydis IAD1*. Produkty genů *IAD1* a *IAD2* v *U. maydis* katalyzují přeměnu indol-3-pyruvátu na indol-3-acetaldehyd pomocí dekarboxylace^{56, 30}. V našich experimentech byl v *L. maculans* gen *IAD1.2* indukován tryptofanem. Expres genu *IAD1.1* se neměnila při stimulaci produkce IAA. Geny *TAM1* a *TAM2* u *U. maydis* katalyzují přeměnu tryptofanu na indol-3-pyruvát a jsou zapojeny ve stejné dráze jako *IAD1* a 2. V našich experimentech byl tryptofanem indukován gen *TAM1-2.1* u *L. maculans*, zatímco expres genu *TAM1-2.2* byla velmi nízká. Syntetické dráhy by se tedy mohl specificky účastnit pouze gen *TAM1-2.1*.

Produktem genu *NIT1* je nitrilasa katalyzující v rostlinách vznik IAA z indol-3-acetonitrilu³⁶. Zvýšená transkripce homologního genu *NIT1.2* v *L. maculans* byla indukována tryptofanem. Naopak, u genu *NIT1.1* nebyla žádná významná indukce pozorována. Data naznačují, že v *L. maculans* může být také přítomná biosyntetická dráha přes IAN. Analýza hormonů v myceliu odhalila jen velmi slabé koncentrace IAN.

Produkce IAA byla v našich experimentech indukována i GABA, kterou jsme použili jako kontrolní sloučeninu obsahující dusík, ale u níž jsme nepředpokládali, že bude

prekurzorem IAA. Toto zjištění je tedy velmi překvapivé, protože současně s produkcí IAA byla pomocí GABA indukována i transkripce genů *YUCCA1.1*, *NIT1.2* a *IAD1.2*. O metabolismu GABA houbami je známo, že mutanti patogenní houby *Stagonospora nodorum*, která je blízce fylogeneticky příbuzná *L. maculans*, mající defektní enzym sukcinylsemialdehyd dehydrogenasu, jsou méně virulentní. Sukcinylsemialdehyd dehydrogenasa katalyzuje jeden z kroků přeměny GABA na sukcinát. Zároveň ale tyto mutanti špatně rostli v mediu, kde GABA byla jediným zdrojem dusíku⁵⁹. O zapojení GABA do biosyntetických drah auxinů neexistují dosud žádné publikace. Je tedy možné, že GABA nehraje roli prekurzoru auxinu, ale signální molekuly v biosyntetické dráze IAA, kde spouští transkripci biosyntetických genů. Ověření této hypotézy by vyžadovalo komplexní popis signálních drah *L. maculans*, spouštějících biosyntézu auxinu a následně testovat schopnosti komponent těchto drah interagovat s GABA.

Zvýšení exprese a expresní profil kandidátních genů se mezi dvěma provedenými biologickými opakováními značně lišily. V prvním opakování byly nejvíce indukovány geny *TAMI-2.1* a *IAD1.2*. Ve druhém naopak byly nejvíce indukovány geny *YUCCA1.1* a *NIT1.2*. Oba experimenty byly provedeny na různě starém myceliu, což může mít vliv na genovou expresi.

Pomocí stimulace prekurzory biosyntézy auxinů byly nalezeny geny pravděpodobně zapojené do některých již popsanych biosyntetických drah produkce auxinů. Domníváme se, že by mohla být zapojena dráha vedoucí přes indol-3-pyruvátu, tryptamin a případně přes IAN. Velmi přínosnou informaci by zajisté přinesl expresní profil těchto genů v průběhu infekce, kdy víme, že se v infikovaném pletivu zvyšuje hladina OxIAA. Pro další ověření tohoto zapojení a vytipování klíčových enzymů by však bylo třeba vytvořit mutanty s vyřazenými nebo umlčenými kandidátními geny.

Produkce auxinů při infekci

V další části práce byla stanovena koncentrace auxinů ve vzorcích z infikovaných rostlin. Byla zjištěna přítomnost IAA, OxIAA a glukosaesteru OxIAA. Ostatní auxiny se vyskytovaly v zanedbatelných koncentracích. Koncentrace IAA a glukosaesteru OxIAA byla srovnatelná ve vzorcích kontrolních a infikovaných rostlin. Výrazně se lišila koncentrace OxIAA, které bylo v infikovaných rostlinách přibližně desetkrát více. Byly použity dva izoláty patogena, u obou docházelo ke zvýšení koncentrace OxIAA. Je známo, že auxiny zvyšují rezistenci rostlin k nekrotrofním patogenům pomocí stimulace JA/ET

dráhy a naopak zvyšují náchylnost k biotrofům¹. Toho by *L. maculans* mohla využívat během počáteční biotrofní fáze infekce. Bylo by tedy zajímavé zjistit, jak se mění koncentrace auxinů v průběhu infekce a zejména při přechodu z biotrofní fáze do nekrotrofní. U topolu *Populus nigra* je popsána zvýšená aktivita peroxidasy a IAA-oxidasy po ošetření IAA za vzniku OxIAA⁶⁰ a je známo, že ireverzibilní oxidace IAA na OxIAA působí jako regulační mechanismus auxinové signalizace⁶¹. Z tohoto zjištění vyplynula hypotéza, že by *L. maculans* pomocí sekrece IAA při infekčním procesu snižovala rezistenci rostliny. Ta by v reakci na tuto exogenní IAA reagovala její oxidací na neaktivní OxIAA. Málo se ví o genech kódujících enzymy, zodpovědné za přeměnu IAA na OxIAA. Nedávná studie v rýži ukázala zapojení 2OG-Fe (II) dioxygenas v syntéze OxIAA z IAA⁶². Dalším krokem v ověření této hypotézy bude stanovení schopnosti *L. maculans* sekretovat hormony z mycelia, tedy stanovit jejich koncentraci v kultivačním mediu. Dále je také možné, že *L. maculans* využívá IAA k regulaci vlastních životních procesů. Přenos signálu pomocí auxinů je v rostlinách velmi dobře popsán²⁷. Bylo by tedy zajímavé zjistit, zda se v genomu *L. maculans* nacházejí orthology některých komponent této signální dráhy a zda je jejich exprese ovlivnitelná IAA.

Poslední část práce s auxiny se zabývá vlivem exogenně aplikovaných roztoků studovaných hormonů na průběh infekce hostitelských rostlin. V případě auxinů byla použita IAA a syntetické analogy auxinů NAA a 2,4-D. V případě ošetření IAA před infekcí došlo ke snížení plochy lézí o 40%. V tomto případě tedy IAA působila proti infekci. Bylo popsáno, že IAA blokuje SA-dependentní dráhy⁸. SA-dependentní dráhy se podílí na aktivní obraně řepky proti *L. maculans*⁴⁹. IAA by tak mohla v řepce stimulovat obranné reakce rostliny. Zatím tedy role auxinu při interakci *B. napus* – *L. maculans* není jasná.

V druhé části práce jsme se zabývali brassinosteroidy. Byla stanovena jejich koncentrace v myceliu *L. maculans* a porovnána s koncentrací v děložních listech *B. napus*. V rostlinách i v myceliu se brassinosteroidy nachází v řádu desítek fmol/g čerstvé hmotnosti, což jsou koncentrace velmi nízké a mnohonásobně nižší než je koncentrace například auxinů. V myceliu byl v nejvyšší koncentraci zjištěn teasteron, který se v rostlinách vyskytuje v zanedbatelném množství. V biosyntetické dráze rostlin je teasteron prekurzorem pro castasteron a brassinolid²⁵. Je možné, že v *L. maculans* chybí další komponenty biosyntézy brassinosteroidů a teasteron může být konečným produktem a brassinolid a castasteron se nemusí syntetizovat. Dále byly vytipovány geny, které by se

mohly účastnit biosyntetické dráhy brassinosteroidů v *L. maculans* na základě sekvenční podobnosti s geny *Arabidopsis*. Byly vybrány geny *CYP90A* a *DET2*, které se nacházejí na začátku biosyntetické dráhy. V *L. maculans* byly pro každý gen vybrány dvě homologní sekvence. Metodou Gateway[®] (Invitrogen) byly připraveny vektory pro posttranskripční umlčení homologů genu *DET2*, označených jako *DET2a* a *DET2b*. Dalším postupem bude transformace *L. maculans* těmito vektory a ověření koncentrace brassinosteroidů, exprese cílových genů a průběhu infekce.

V případě exogenní aplikace brassinosteroidů na rostliny z výsledků vyplývá, že ošetření roztoky brassinolidu a castasteronu nemá žádný vliv na průběh infekce. Bylo by však zajímavé použít k ošetření rostlin namísto brassinolidu a castasteronu teasteron, který je v myceliu *L. maculans* hlavní brassinosteroid. Dále je také možné, že *L. maculans* nevyužívá brassinosteroidy k manipulaci hostitele, ale k regulaci vlastních životních procesů. U lysohlávek *Psilocybe cubensis* brassinosteroidy indukují sporulaci a zvyšují množství plodnic⁶³. Bylo by tedy zajímavé zjistit, zda nemají podobný vliv i na *L. maculans*. V rostlinách jsou známy vyšší koncentrace brassinosteroidů v reprodukčních orgánech⁵⁴. Bylo by tedy zajímavé stanovit koncentraci ve sporách *L. maculans*.

6. ZÁVĚR

Tato práce studovala, jaké fytohormony produkuje patogen *Leptosphaeria maculans* a případně objasnila jejich roli při průběhu infekce řepky *Brassica napus*. Soutředila se na auxiny a brassinosteroidy. Dílčí závěry práce jsou tyto:

1. Bylo zjištěno, že *L. maculans* produkuje v tekuté kultuře radu auxinů. Nejvíce byla zastoupena IAA, OxIAA, PAA a glukosaester OxIAA. Složení kultivačního media má výrazný vliv na produkci auxinů.
2. Byl zaznamenán rozdíl v produkci auxinů dvěma izoláty *L. maculans*. Izolát JN2 v mediu Gamborg neprodukovala téměř žádnou IAA, izolát JN3 produkoval IAA v koncentraci až 1000 pmol/g čerstvé hmotnosti. Tato odlišnost byla využita jako modelový systém pro stimulaci biosyntetických drah auxinů.
3. V genomu *L. maculans* byly nalezeny homology genů, účastnících se biosyntézy auxinů v jiných organismech. U některých z těchto genů byla zjištěna zvýšená míra transkripce po ošetření *L. maculans* popsánymi prekurzory auxinů (tryptofan, tryptamin) a GABA. Jednalo se o geny *YUCCA1.1*, *NIT1.2*, *IAD1.2* a *TAM1-2.1*.

4. Při infekci *L. maculans* stoupá v infikovaném pletivu *B. napus* koncentrace OxIAA. Byla formulována hypotéza, že se jedná o obranný mechanismus rostliny, která ireverzibilní oxidací deaktivuje IAA produkovanou patogenem.
5. Bylo zjištěno, že *L. maculans* v tekuté kultuře produkuje několik známých brassinosteroidů v nízkých koncentracích. Tyto koncentrace jsou u většiny stanovených BRS stejné jako v rostlinném pletivu. Vyšší koncentrace v myceliu než v rostlinném pletivu byla zjištěna u teasteronu, který je v *L. maculans* nejvíce zastoupeným brassinosteroidem a jeho koncentrace je sedmkrát vyšší než v rostlinném pletivu.
6. Pro zjištění, zda by BRS (zejména teasteron) mohly být zajímavými faktory pro virulenci *L. maculans* jsme iniciovali přípravu konstruktů pro posttranskripční umlčení genů, které byly identifikovány jako potenciální homology ke známým biosyntetickým genům v *A. thaliana*.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S. C. M. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–16.
- (2) Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444, 323–9.
- (3) Zhang, J., and Zhou, J.-M. (2010) Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Mol. Plant* 3, 783–93.
- (4) Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–48.
- (5) Gout, L., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Blaise, F., Eckert, M., Cattolico, L., Balesdent, M.-H., and Rouxel, T. (2006) Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the *Dothideomycete* *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Microbiol.* 60, 67–80.
- (6) Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S. C. M. (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521.
- (7) Mur, L. A. J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., and Wasternack, C. (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* 140, 249–262.
- (8) Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., and Jones, J. D. G. (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 372–9.

- (9) Vlot, A. C., Dempsey, D. A., and Klessig, D. F. (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 177–206.
- (10) Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S. H., Tada, Y., Zheng, N., and Dong, X. (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486, 228–232.
- (11) León, J., and Sánchez-Serrano, J. J. (1999) Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Bioch.* 37, 373–380.
- (12) Beale, M. H., and Ward, J. L. (1998) Jasmonates: key players in the plant defence. *Nat. Prod. Rep.* 15, 533–48.
- (13) Katsir, L., Chung, H. S., Koo, A. J. K., and Howe, G. a. (2008) Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 428–35.
- (14) Hauser, F., Waadt, R., and Schroeder, J. I. (2011) Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Curr. Biol.* 21, R346–55.
- (15) Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., and Abrams, S. R. (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.*, pp 651–79.
- (16) Argueso, C. T., Hansen, M., and Kieber, J. J. (2007) Regulation of ethylene biosynthesis. *J. Plant Growth Regul.* 26, 92–105.
- (17) Rzewuski, G., and Sauter, M. (2008) Ethylene biosynthesis and signaling in rice. *Plant Sci.* 175, 32–42.
- (18) Kendrick, M. D., and Chang, C. (2008) Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 479–85.
- (19) Olszewski, N., Sun, T., and Gubler, F. (2002) Gibberellin signaling : biosynthesis , catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14, 61–81.
- (20) Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M. (2007) Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* 19, 2140–55.
- (21) Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 431–49.
- (22) Werner, T., and Schmülling, T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 527–38.
- (23) Gudesblat, G. E., and Russinova, E. (2011) Plants grow on brassinosteroids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 530–537.

- (24) Bajguz, A., and Hayat, S. (2009) Plant physiology and biochemistry effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 1–8.
- (25) Chung, Y., and Choe, S. (2013) The regulation of brassinosteroid biosynthesis in Arabidopsis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 32, 396–410.
- (26) Clouse, S. D. (2011) Brassinosteroid signal transduction : from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* 23, 1219–1230.
- (27) Shan, X., Yan, J., and Xie, D. (2012) Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 84–91.
- (28) Simon, S., Kubeš, M., Baster, P., Robert, S., Dobrev, P. I., Friml, J., Petrášek, J., and Zažímalová, E. (2013) Defining the selectivity of processes along the auxin response chain: a study using auxin analogues. *New Phytol.* 200, 1034–48.
- (29) Tanaka, E., Koga, H., Mori, M., and Mori, M. (2011) Auxin production by the rice blast fungus and its localization in host tissue. *J. Phytopathol.* 159, 522–530.
- (30) Reineke, G., Heinze, B., Schirawski, J., Buettner, H., Kahmann, R. and Basse C. W. (2008) Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue. *Mol. Plant Pathol.* 9, 339–355.
- (31) Tivendale, N. D., Ross, J. J., and Cohen, J. D. (2014) The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 19, 44–51.
- (32) Jameson, P. (2000) Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview. *Plant Growth Regul.* 32, 369–380.
- (33) Zhao, Y. (2012) Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Mol. Plant* 5, 334–8.
- (34) Zhao, Y. (2008) The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 16–22.
- (35) Normanly, J., Cohen, J. D., and Fink, G. R. (1993) *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 10355–9.
- (36) Ishida, Y., Nakamura, A., Mitani, Y., Suzuki, M., Soeno, K., Asami, T., and Shimada, Y. (2013) Comparison of indole derivatives as potential intermediates of auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Biotechnol.* 30, 185–190.
- (37) Davies, P. J. (2004) Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action!(1.vydání) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers

- (38) Tsavkelova, E., Oeser, B., Oren-Young, L., Israeli, M., Sasson, Y., Tudzynski, B., and Sharon, A. (2012) Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.* 49, 48–57.
- (39) Cohen, B. a, Amsellem, Z., Maor, R., Sharon, A., and Gressel, J. (2002) Transgenically enhanced expression of indole-3-acetic acid confers hypervirulence to plant pathogens. *Phytopathology* 92, 590–6.
- (40) Chung, K.-R., Shilts, T., Ertürk, Ü., Timmer, L. W., and Ueng, P. P. (2003) Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 23–30.
- (41) Maor, R., Haskin, S., Levi-kedmi, H., and Sharon, A. (2004) In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Appl. Environ. Microb.* 70, 3–6.
- (42) Yin, C., Park, J.-J., Gang, D. R., and Hulbert, S. H. (2014) Characterization of a tryptophan 2-monooxygenase gene from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 27, 227–35.
- (43) Qi, L., Yan, J., Li, Y., Jiang, H., Sun, J., Chen, Q., Li, H., Chu, J., Yan, C., Sun, X., Yu, Y., Li, C., and Li, C. (2012) *Arabidopsis thaliana* plants differentially modulate auxin biosynthesis and transport during defense responses to the necrotrophic pathogen *Alternaria brassicicola*. *New Phytol.* 195, 872–82.
- (44) Kilaru, A., Bailey, B. a, and Hasenstein, K. H. (2007) *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiol. Lett.* 274, 238–44.
- (45) Splivallo, R., Fischer, U., Göbel, C., Feussner, I., and Karlovsky, P. (2009) Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol.* 150, 2018–29.
- (46) West, J. S., Kharbanda, P. D., Barbetti, M. J., and Fitt, B. D. L. (2001) Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathol.* 50, 10–27.
- (47) Rouxel, T., Grandaubert, J., Hane, J. K., Hoede, C., van de Wouw, A. P., Couloux, A., Dominguez, V., Anthouard, V., Bally, P., Bourras, S., Cozijnsen, A. J., Ciuffetti, L. M., Degrave, A., Dilmaghani, A., Duret, L., Fudal, I., Goodwin, S. B., Gout, L., Glaser, N., Linglin, J., Kema, G. H. J., Lapalu, N., Lawrence, C. B., May, K., Meyer, M., Ollivier, B., Poulain, J., Schoch, C. L., Simon, A., Spatafora, J. W., Stachowiak, A., Turgeon, B. G., Tyler, B. M., Vincent, D., Weissenbach, J., Amsellem, J., Quesneville, H., Oliver, R. P., Wincker, P., Balesdent, M.-H., and Howlett, B. J. (2011) Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced point mutations. *Nat. Commun.* 2, 202.

- (48) Steiner A.A. (1984) The universal nutrient solution. In: *Proceedings of the Sixth International Congress on Soilless Culture, Lunteren*: 633-650. International Society for Soilless Culture, Wageningen.
- (49) Šašek, V., Nováková, M., Jindřichová, B., Bóka, K., Valentová, O., and Burketová, L. (2012) Recognition of avirulence gene AvrLm1 from hemibiotrophic ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signaling in *Brassica napus*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 25, 1238–50.
- (50) Balesdent, M. H., Attard, a, Kühn, M. L., and Rouxel, T. (2002) New Avirulence Genes in the Phytopathogenic Fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 92, 1122–33.
- (51) Ansan-Melayah, D., Balesdent, M. H., Buée, M. and Rouxel, T., (1995) Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 85, 1525-29
- (52) Šašek, V. (2011). Kvantitativní a indukovaná rezistence řepky ozimé. *Disertační práce. ČZU*.
- (53) Dobrev, P. I., and Kamínek, M. (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction . *J. Chromatogr. A* 950, 21–9.
- (54) Tarkowská, D., Novák, O., Floková, K., Tarkowski, P., Turečková, V., Grúz, J., Rolčík, J., and Strnad, M. (2014) Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* 240, 55–76.
- (55) Fox, E. M., Gardiner, D. M., Keller, N. P., and Howlett, B. J. (2008) A Zn(II)2Cys6 DNA binding protein regulates the sirodesmin PL biosynthetic gene cluster in *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol.* 45, 671–82.
- (56) Zuther, K., Mayser, P., Hettwer, U., Wu, W., Spittler, P., Kindler, B. L. J., Karlovsky, P., Basse, C. W., and Schirawski, J. (2008) The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 68, 152–72.
- (57) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/V15N2/BLView.html>
- (58) Kumar, S. and Punekar, N. S. (1997) The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycol. Res.* 101, 403–409.
- (59) Mead, O., Thynne, E., Winterberg, B., and Solomon, P. S. (2013) Characterising the role of GABA and its metabolism in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *PLoS One* 8, e78368.
- (60) Güneş, T. (2000) Peroxidase and IAA-oxidase activities during rooting in cuttings of three poplar species. *Turk. J. Bot.* 24, 97–101.
- (61) Peer, W. A., Cheng, Y., and Murphy, A. S. (2013) Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *J. Exp. Bot.* 64, 2629–39.

(62) Zhao, Z., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, X., Liu, S., Yu, X., Ren, Y., Zheng, X., Zhou, K., Jiang, L., Guo, X., Gai, Y., Wu, C., Zhai, H., Wang, H., and Wan, J. (2013) A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Dev. Cell* 27, 113–22.

(63) Gartz, J. (1990) Growth-promoting effect of a brassinosteroid in mycelial cultures of the fungus *Psilocybe cubensis*. *Naturwissenschaften* 77, 389 -389 , 1990.

