

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Kateřina Vaverová

**Vliv moření semen řepky olejné oomycetou *Pythium oligandrum*
na metabolismus rostliny**

**The effect of rape seed treatment with oomycete *Pythium oligandrum* on plant
metabolism**

Diplomová práce

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

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením své školitelky doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

Podpis:

Kateřina Vaverová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce a vedoucí laboratoře Doc. RNDr. Heleně Ryšlavé CSc. za odborné vedení práce a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Bělonožníkové za odbornou pomoc s pokusy. Také bych chtěla poděkovat Ing. Tomáši Vaňkovi PhD. za dodání rostlinného materiálu a firmě Biopreparáty, spol. s.r.o. za poskytnutí zkoumaného materiálu. Poděkování také patří Technologické agentuře ČR za podporu projektu TJ01000451.

Abstrakt

Prostředkům biologické ochrany rostlin je věnována velká pozornost, protože umožní snížit množství používaných pesticidů v zemědělství. Komerčně je již využívána oomyceta *Pythium oligandrum* ve formě zálivky a postřiku. V této práci byly charakterizovány vlastnosti dalších izolátů a sledovány metabolické změny v rostlinách řepky olejně (*Brassica napus* subsp. *oleifera*), jejichž semena byla ošetřena přípravky na bázi *Pythium oligandrum*.

V první části práce byly testovány vlastnosti sekretovaných látek izoláty *Pythium oligandrum*. Bylo měřeno množství fenolických látek a aktivity endoglykosidas endo- β -1,3-glukanasy, celulasy, chitiny a také proteas, podle kterých se hodnotila schopnost oomycety *Pythium oligandrum* mykoparaziticky chránit rostlinu. Dále byly sledovány látky, zejména oligandrin, které jsou při interakci s rostlinou zodpovědné za „priming“, který umožní rostlině při infekci patogenem rychlou odezvu prostřednictvím systémové rezistence rostliny. Odlišnosti mezi jednotlivými izoláty se projeví také při elektroforetické separaci v zastoupení proteinů.

V druhé části práce byl sledován vliv moření semen řepky izoláty *Pythium oligandrum* na metabolismus rostliny. Zatímco řada vlastností rostlin řepky ovlivněna nebyla, vliv ošetření se projevil v aktivitě NADP dependentních dehydrogenas, konkrétně šikimátdehydrogenasy, která se podílí na syntéze aromatických aminokyselin a fenolických látek. Množství fenolických látek, aktivita některých antioxidantních enzymů, jako jsou superoxidodismutasa a peroxidasy, byly zvýšeny v porovnání s kontrolními neošetřenými rostlinami.

Se zúženým výběrem izolátů byl měřen vliv moření semen na metabolismus rostlin po vystavení infekci patogenem *Verticillium longisporum*. Metabolické rozdíly se projeví v aktivitách antioxidantních enzymů i glykosidas.

Klíčová slova: biologická ochrana, *Pythium oligandrum*, řepka olejná

Abstract

Lot of attention is paid to biological control agents of plant pathogens as it will reduce the amount of pesticides used in agriculture. *Pythium oligandrum* oomycete is already used commercially in the form of watering and spraying. In this work the properties of other

isolates were characterized, and the metabolic changes were studied in plants of oilseed rape (*Brassica napus* subsp. *Oleifera*), whose seeds were treated with preparates based on *Pythium oligandrum*.

In the first part of the thesis the properties of compounds secreted by isolates of *Pythium oligandrum* were tested. The amount of phenolic substances and the activity of endoglycosidase endo- β -1,3-glucanase, cellulase, chitinase as well as proteases were measured to assess the ability of oomycete *Pythium oligandrum* mycoparasitically protect the plant. Substances, especially oligandrin, which during interaction with the plant are responsible for “priming”, have been observed, enabling the plant to respond rapidly to pathogen infection through systemic plant resistance. Differences between individual isolates also manifested themselves in electrophoretic separation in the protein representation.

In the second part of the work, the effect of rapeseed seed treatment with isolates of *Pythium oligandrum* on plant metabolism was monitored. While many properties of rapeseed plants were not affected, the effect of the treatment was manifested in the activity of NADP dependent dehydrogenases, namely shikimate dehydrogenase, which is involved in the synthesis of aromatic amino acids and phenolic substances. The number of phenolic compounds, the activity of some antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and peroxidases were increased compared to untreated plants control.

With a narrower selection of isolates, the effect of seed treatment on plant metabolism after exposure to the pathogen *Verticillium longisporum* was measured. Metabolic differences were manifested in the activity of both antioxidant enzymes and glycosidase.

(In Czech)

Key words: biological control agents, *Pythium oligandrum*, rapeseed

Obsah

1. Úvod.....	12
1.1. Řepka olejná a její produkce	12
1.2. Využití řepky	13
1.3. Patogeny a škůdci	13
1.4. Obranné mechanismy rostlin	14
1.4.1. Konstitutivní rezistence	14
1.4.2. Indukovaná rezistence.....	14
1.4.3. Priming.....	15
1.4.4. Rozpoznání přítomnosti patogenu	15
1.4.5. Aktivní obranné reakce	16
1.5. Sekundární metabolity rostlin.....	18
1.6. Sekundární metabolity řepky a kyselina eruková.....	19
1.7. Ochrana rostlin pomocí pesticidů	21
1.8. Biologická ochrana	22
1.9. <i>Pythium oligandrum</i>	23
1.9.1. Antagonismus <i>Pythium oligandrum</i> s patogeny rostlin.....	24
1.9.2. Vztah oomycety <i>Pythium oligandrum</i> s původní mikroflórou kořenů	25
1.9.3. Kolonizace kořenů oomycetou <i>Pythium oligandrum</i>	25
1.9.4. Vznik systémové rezistence vyvolané oomycetou <i>Pythium oligandrum</i>	27
1.9.4.1. Oligandrin	28
1.9.4.2. Proteiny buněčných stěn s funkcí elicitoru	29
1.9.5. Podpora růstu rostliny oomycetou <i>Pythium oligandrum</i>	29
1.10. Kombinace <i>Pythium oligandrum</i> s jinými mikroorganismy vhodnými pro biologickou ochranu rostlin	30

2.	Cíl práce.....	32
3.	Materiál a metody	33
3.1.	Přístroje.....	33
3.2.	Chemikálie.....	33
3.3.	Softwarové vybavení	35
3.4.	Izoláty <i>Pythium oligandrum</i>	35
3.5.	Rostlinný materiál	36
3.5.1.	Pěstování rostlin.....	36
3.5.2.	Odběr vzorků	36
3.6.	Extrakce.....	36
3.7.	Stanovení koncentrace proteinů	36
3.8.	Elektroforetická separace	37
3.8.1.	Elektroforetická separace za nativních podmínek	37
3.8.2.	Elektroforetická separace v prostředí SDS	38
3.8.3.	Elektroforetická separace malých proteinů v prostředí tricinu a SDS.....	39
3.8.4.	Detekce proteinů v gelu	40
3.9.	Stanovení enzymové aktivity	40
3.9.1.	Aktivita glykosidas	40
3.9.2.	Aktivita proteas	41
3.9.3.	Aktivita dehydrogenas	42
3.10.	Stanovení množství fenolických látek a antioxidační kapacity	43
3.10.1.	Měření množství fenolických látek.....	43
3.10.2.	Metoda FRAP.....	44
3.10.3.	Metoda DPPH	45
3.11.	Aktivita antioxidačních enzymů	46
3.11.1.	Aktivita glutathionreduktasy (GR).....	46
3.11.2.	Aktivita katalasy (CAT).....	46

3.11.3.	Aktivita askorbátperoxidasy (APOD).....	47
3.11.4.	Aktivita peroxidasy	47
3.11.5.	Aktivita superoxiddismutasy.....	47
3.11.6.	Inhibice izoenzymů superoxiddismutasy	48
4.	Výsledky	48
4.1.	Charakterizace izolátů oomycety <i>Pythium oligandrum</i>	48
4.1.1.	Proteiny sekretované <i>Pythium oligandrum</i> do media.....	48
4.1.2.	Fenolické látky sekretované <i>Pythium oligandrum</i> do media.....	50
4.1.3.	Aktivita glykosidas sekretovaných oomycetou <i>Pythium oligandrum</i> do media 51	
4.1.4.	Aktivita proteas sekretovaných oomycetou <i>Pythium oligandrum</i> do media	51
4.2.	Charakterizace rostlin řepky ošetřených izoláty <i>Pythium oligandrum</i>	52
4.2.1.	Obsah proteinů rostlin řepky ošetřených izoláty <i>Pythium oligandrum</i>	52
4.2.2.	Aktivita glykosidas v rostlinách řepky ošetřených oomycetou <i>Pythium oligandrum</i>	54
4.2.3.	Proteolytická aktivita v rostlinách řepky ošetřených <i>Pythium oligandrum</i> ..	55
4.2.4.	Aktivita dehydrogenas rostlin řepky ošetřených izoláty <i>Pythium oligandrum</i> 55	
4.2.5.	Obsah fenolických látek a antioxidační vlastnosti rostlin řepky	56
4.2.6.	Aktivita antioxidačních enzymů v rostlinách řepky ošetřené oomycetou <i>Pythium oligandrum</i>	57
4.2.6.1.	Aktivita peroxidasy v rostlinách ošetřených oomycetou <i>Pythium oligandrum</i> 59	
4.2.6.2.	Aktivita superoxiddismutasy.....	60
4.3.	Charakterizace rostlin řepky ošetřených izoláty <i>Pythium oligandrum</i> a infikovaných patogenem <i>Verticillium longisporum</i>	61
4.3.1.	Aktivita glykosidas rostlin řepky ošetřených izoláty <i>Pythium oligandrum</i> a infikovaných <i>Verticillium longisporum</i>	61

4.3.2.	Aktivita dehydrogenas v extraktech rostlin řepky ošetřených izoláty <i>Pythium oligandrum</i> a infikovaných <i>Verticillium longisporum</i>	62
4.3.3.	Obsah fenolických látek a antioxidační vlastnosti rostlin řepky ošetřených <i>Pythium oligandrum</i> a infikovaných <i>Verticillium longisporum</i>	64
4.3.4.	Aktivita antioxidačních enzymů v rostlinách ošetřených <i>Pythium oligandrum</i> a infikovaných <i>Verticillium longisporum</i>	65
4.3.4.1.	Aktivita peroxidas v rostlinách řepky ošetřených <i>Pythium oligandrum</i> infikovaných <i>Verticillium longisporum</i>	66
4.3.4.2.	Aktivita izoenzymů superoxiddismutasy v rostlinách řepky ošetřených <i>Pythium oligandrum</i> infikovaných <i>Verticillium longisporum</i>	67
5.	Diskuze	69
6.	Závěr	73
4.	Citace	74

Seznam použitých zkratek

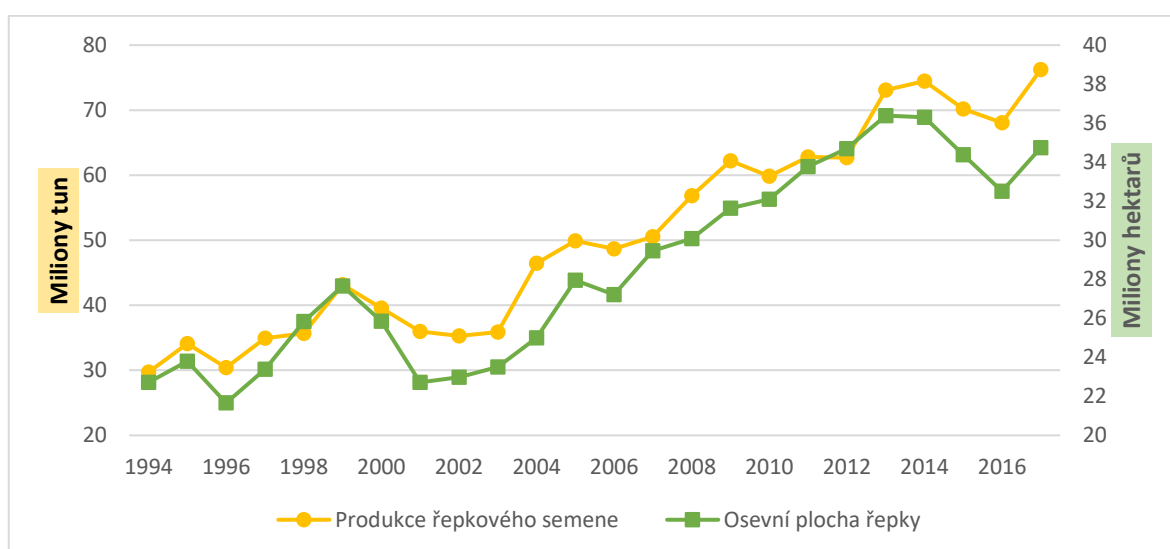
APOD	Askorbátperoxidasa
BSA	Hovězí sérový albumin
CAT	Katalasa
CWP	Cell Wall Proteins; proteiny buněčných stěn
dH ₂ O	deionizovaná voda
DPPH	2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTT	DL-dithiothreitol
EDTA	Dihydrát ethylendiamin tetraoctan disodný
ETI	Effector Triggered Immunity; efektoem vyvolaná imunita
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FRAP	Ferric reducing antioxidant power; železo redukující antioxidační síla
G6PDH	Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
GR	Glutathionreduktasa
GSSG	Disodná sůl oxidované formy glutathionu
HEAR	High Erucic Acid Rapeseed; řepka obsahující vysoké množství kyseliny erukové
HEPES	Kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová
IAA	Kyselina indol-3-octová
ISR	Induced Systemic Resistance; reindukovaná systémová rezistence
LAR	Local Acquired Resistance; lokální získaná rezistence
LEAR	Low Erucic Acid Rapeseed; řepka obsahující nízké množství kyseliny erukové
MAMPs	Microbe Associated Molecular Patterns; molekulární vzory spojené s mikroby
MBTH	3-Methyl-2,3-dihydrobenzothiazolon-2-hydrazon
MOPS	Kyselina 3-morfolinpropansulfonová
NADP	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADP-ME	Malátdehydrogenasa dekarboxylační
NBT	Nitroblue tetrazolium
PAMPs	Patogen Associated Molecular Patterns; molekulární vzory spojené s patogeny
PR protein	Protein související s patogenesisí
PR receptor	Receptor související s patogenesisí
PRRs	Pattern Recognition Receptors; receptory rozpoznávání vzorů

PTI	Pattern Triggered Immunity; vzorem spuštěná imunita
<i>P.o.</i>	<i>Pythium oligandrum</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
ROS	Reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
SAR	Systemic Acquired Resistance; systémově získaná rezistence
SDH	Šikimátdehydrogenasa
SDS	Dodecylsíran sodný
SOD	Superoxiddismutasa
TCA	Kyselina trichloroctová
TEMED	N,N,N,N-tetrametyletylenediamin
TAM	Tryptamin
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
Trp	Tryptofan

1. Úvod

1.1. Řepka olejná a její produkce

Brukev řepka olejná (*Brassica napus* subsp. *oleifera*) se pěstuje v Evropě již od 16. století, ale teprve od 60. let minulého století se stala plodinou světového významu. V současnosti je řepka druhou nejvýznamnější semennou olejninou hned po sóji [1]. Vzhledem k její schopnosti klíčení a růstu při nízkých teplotách je řepka jednou z mála olejnatých plodin, které mohou být pěstovány v mírném pásu [2]. Množství vyprodukované řepky stále narůstá (Obr. 1), podle FAO (Food and Agriculture Organization) bylo v roce 2017 vyprodukováno 76,2 milionů tun řepky (Tab. 1), největším producentem řepky je Kanada [3]. V České republice bylo v roce 2018 sklizeno 1,4 milionu tun řepky [4].



Obrázek 1: Vývoj světové produkce řepky od roku 1994 do roku 2017 [3]

Tabulka 1: Produkce řepkového semene v milionech tun [3]

Řepka olejná (2017)	miliony tun
Kanada	21,3
Čína	13,3
Indie	7,9
Francie	5,2
Austrálie	4,3
Německo	4,3
Polsko	2,7

Řepka olejná (2017)	miliony tun
Ukrajina	2,2
Velká Británie	2,2
Rumunsko	1,7
Rusko	1,5
USA	1,4
Česko	1,1
Svět celkem	76,2

1.2. Využití řepky

První kultivace řepky pro technické účely započala v Asii, kde byla využívána k výrobě lampového oleje. V Evropě se pro technické účely začala pěstovat v Holandsku od 13. století [5].

Dnes se upravený řepkový olej v největším objemu využívá jako příměs do pohonných hmot [6]. Směs se označuje jako biopalivo. Běžně se skládá z methylesterů mastných kyselin, jež mohou být připraveny z triglyceridů rostlinných olejů transesterifikací methanolem [7]. Řepkový olej je využíván také v průmyslových lubrikantech jako ekologičtější náhrada minerálních olejů [8]. Vhodným příkladem tohoto využití je biodegradovatelný řepkový mazací olej do motorových pil [9]. Kultivar HEAR (high-erucic acid rapeseed) se využívá k výrobě maziva díky vysokému obsahu kyseliny erukové (20–50 %) [10].

Pro konzumaci byl vyšlechtěn kanadský kultivar Canole (Canadian oil) a evropský LEAR (low-erucic acid rapeseed) se sníženým obsahem kyseliny erukové pod 5 % a také se sníženým množstvím glukosinolátů. Díky své bezvýrazné chuti a tepelné odolnosti je řepkový olej vhodný do kuchyně a ke smažení [11, 12]. Pokud se pokrutiny – zbytek semen řepky vylisovaný při výrobě biopaliva – využívají jako krmivo pro ryby, drůbež nebo skot, je nutné využít kultivar Canole (viz kapitola 1.6) [10, 13–15].

Řepka se také ukázala jako výhodná předplodina při pěstování obilovin, hlavně z důvodu zvýšeného obsahu živin v půdě [16, 17].

1.3. Patogeny a škůdci

Výnosy řepkových polí jsou každoročně sniženy ztrátami způsobenými rostlinnými škůdci. Například fomové černání stonku způsobené houbou *Leptosphaeria maculans* (Obr. 2, str. 14) je v Čechách příčinou ztráty výnosu okolo 10 %, v některých letech se udávají až 50% ztráty [18].

K nejvýznamnějším chorobám řepky olejné v mírném pásu dále patří bílá hniloba řepky (původce *Sclerotinia sclerotiorum*), verticiliové vadnutí řepky (*Verticillium longisporum* a *Verticillium albo-album*) a nádorovitost kořenů brukvovitých (*Plasmodiophora brassicae*) [10].



Obrázek 2: Fomové černání stonku způsobené *Leptosphaeria maculans* [19]

1.4. Obranné mechanismy rostlin

Interakce patogenu s rostlinou může vést buď k úspěšné infekci, nebo k rezistenci [20]. Rezistence je schopnost organismu vyloučit nebo překonat zcela nebo částečně účinek patogenu nebo jiného škodlivého faktoru, kterým může být stres ze sucha nebo z mrazu [21]. Rezistenci dělíme na konstitutivní nebo indukovanou [22].

1.4.1. Konstitutivní rezistence

Konstitutivní rezistence, takzvaná pasivní obrana, chrání rostliny před většinou útoků patogenů, které se na konkrétní rostlinu jako hostitele nespécializují. Je tvořena obrannými prvky rostliny neustále přítomných v rostlině i bez patogenu, a proto je energeticky náročná a navýšení jejího rozsahu je na úkor růstu rostliny. Rostliny brání vrstva voskové kutikuly tvořené syntézou polymerního kutinu a kutinových vosků, a předem připravených antimikrobiálních sloučenin [22–24]. Mezi antimikrobiální sloučeniny patří fenolické látky, terpenoidy, esenciální oleje, alkaloidy, lektiny, polypeptidy a polyacetyleny [25].

1.4.2. Indukovaná rezistence

Indukovaná rezistence je stav zvýšené obranné kapacity vyvolaný v rostlině, pokud je správně stimulována. Přítom obrana rostlin je podmíněna předchozí infekcí nebo ošetřením, které vede k rezistenci proti následnému napadení patogenem nebo parazitem [26].

Výhodou indukované rezistence je její schopnost bránit se široké škále chorob, proti nimž rostlina získá obranné schopnosti. Navíc elicitory nejsou specifické vůči rostlinným druhům [27].

Rozlišují se dva druhy systémové rezistence, systémově získaná rezistence (SAR) a indukovaná systémová rezistence (ISR). Po napadení patogenem následuje hypersenzitivní reakce a spustí se signální dráha kyseliny salicylové, jež vede ke vzniku SAR. Během SAR

dochází ke tvorbě PR (pathogenesis-related) proteinů [28]. K indukci ISR dochází prostřednictvím signálních drah kyseliny jasmonové a ethylenu. ISR není závislá na signalizaci kyselinou salicylovou. Tento jev typicky vyvolávají nepatogenní mikroorganismy (například rhizobakterie) vhodné k využití jako biologická ochrana rostlin [28, 29].

Příkladem látek schopných vyvolat systémovou rezistenci jsou elicitory. Označují rodinu malých proteinů, které jsou produkovány oomycetami rodu *Phytophthora* a *Pythium* [30, 31].

Jiným druhem rezistence je jev označovaný jako lokálně získaná rezistence. Rezistence se projevuje pouze v místě aplikace induktoru, proto se v tomto případě indukční ošetření aplikuje právě na pletiva přímo ohrožená napadením patogenem, přičemž zbylé části rostliny rezistenci nezískají [32].

1.4.3. Priming

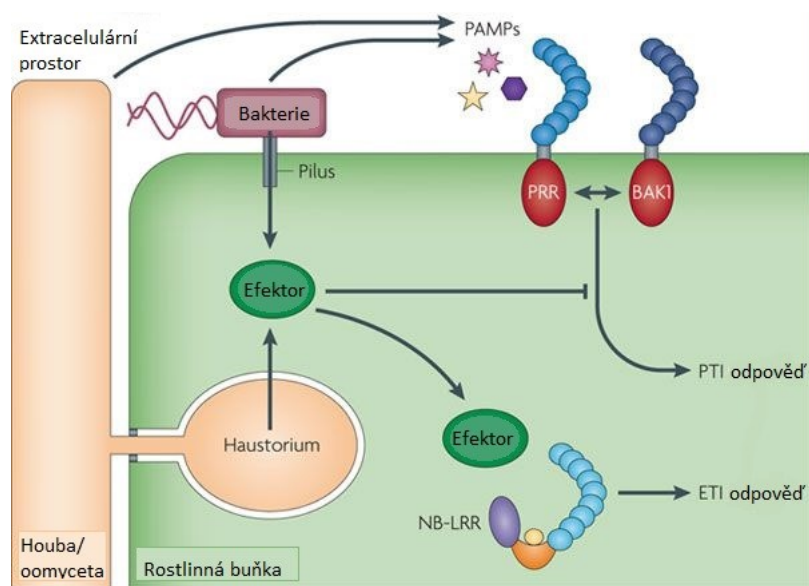
Pro úspěšnou obranu před patogeny je klíčové načasování obranných reakcí rostliny [28]. Fyziologický proces, pomocí kterého lze v rostlině dosáhnout rychlejší a intenzivnější obranné odpovědi vůči stresu se označuje „priming“ [33]. K primingu nedochází pouze po napadení patogenem, ale i při kolonizaci kořenů prospěšnými mikroby nebo aplikací rozličných chemikálií, jako je například kyselina β -aminobutanová [34]. Stav připravenosti dosažený primingem se označuje jako primovaný stav [33].

Rostlina v primovaném stavu je schopná odolat útoku virulentních patogenů a jiných škůdců díky získané schopnosti rychle vyvolat a zesílit obranou reakci proti infekci. Rostlině obranné schopnosti nechybí, potřebné vybavení má uložené v genomu, ale před indukčním ošetřením neumí infekci dostatečně rychle rozeznat, nebo nemá dostatečnou kapacitu na expresi obranných genů [35].

1.4.4. Rozpoznání přítomnosti patogenu

Rozpoznání přítomnosti patogenu zajišťují receptory lokalizované na plasmatické membráně, nazývané receptory rozpoznávání vzorů (Pattern Recognition Receptors, PRRs), které detekují cizí (nevlastní) molekulární vzory spojené s patogeny nebo s mikroby (Pathogen or Microbe Associated Molecular Patterns, PAMPs / MAMPs) [36]. Rostliny, aby odolaly infekci patogenem, vyvinuly dva mechanismy svého vrozeného imunitního systému. Prvním mechanismem je vzorem spuštěná imunita (Pattern Triggered Immunity, PTI), která

je aktivována membránově vázanými PR receptory rozpoznáním molekulárních vzorů (PAMPs/MAMPs) společnými pro mnoho typů mikrobů. Obranné mechanismy vedou k inhibici růstu patogenu. V koevoluci k rostlinné imunitě virulentní patogeny vyvinuly efekторы, které uvolňují uvnitř rostlinné buňky za účelem potlačit PTI. Rostlina reaguje druhým mechanismem, kterým je efektořem vyvolaná imunita (Effector Triggered Immunity, ETI) aktivovaná rozpoznáním patogenních efektořů intracelulárními receptory (Obr. 3). Následně jsou aktivovány geny avirulence, které mají za následek aktivaci hypersenzitivní reakce obvykle následované řízenou buněčnou smrtí [37, 38].



Obrázek 3: Na povrchu buněk jsou PRRs, které rozpoznávají PAMPs a uvnitř buněk jsou efektoři patogenů rozpoznávány intracelulárními receptory (NB-LRR proteiny). Aktivaci receptorů je vyvolána PTI nebo ETI odpověď [39].

1.4.5. Aktivní obranné reakce

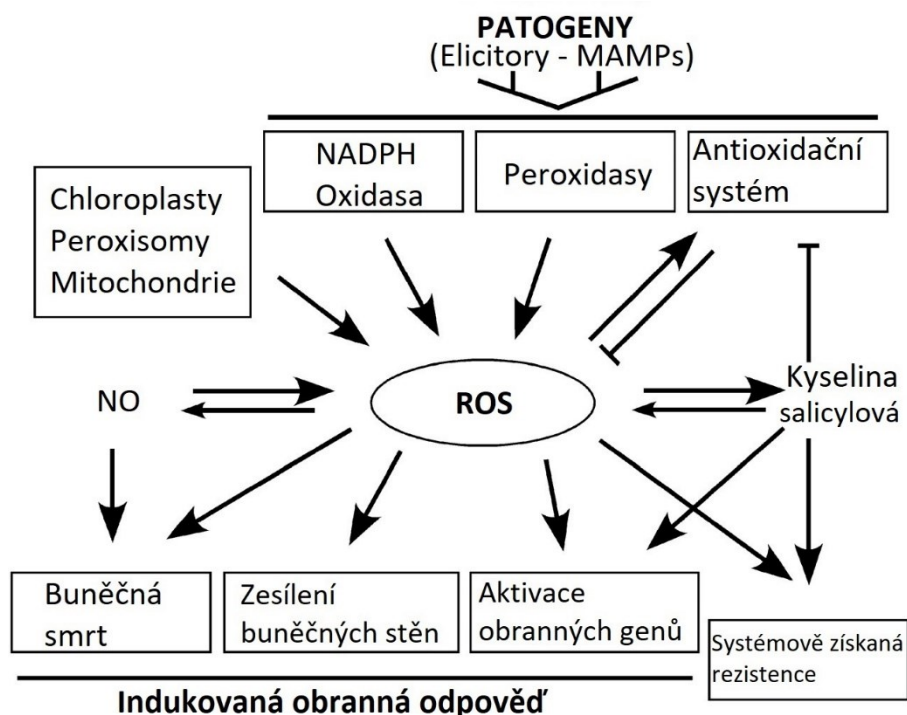
Při rozpoznání patogenu začne v místě infekce hypersenzitivní reakce (Obr. 4, str. 18) [40]. Prvním charakteristickým znakem hypersenzitivní reakce je tvorba superoxidových radikálů ($\cdot\text{O}_2^-$) v apoplastu prostřednictvím enzymu NADPH-oxidasy, z nichž dismutací superoxidid-dismutasou (SOD) vniká H_2O_2 . Látky se souhrnně označují jako reaktivní formy kyslíku (ROS). Peroxidasy prostřednictvím H_2O_2 přeměňují různé sloučeniny na jejich oxidovanou formu nebo je polymerizují skrze radikálový mechanismus [41–44].

ROS mají v rostlinách dvě hlavní role. V nízkých koncentracích fungují jako signální molekuly. Rozhodují o různých reakcích rostliny v odpovědi na stres rostlinných buněk. Jejich prostřednictvím vznikají další signální molekuly jako jsou reaktivní forma dusíku

oxid dusnatý (NO), který signalizuje řízenou buněčnou smrt napadených buněk, a kyselina salicylová podílejí se na vzniku SAR. Avšak ve vysokých koncentracích ROS způsobují poškození různých buněčných komponent. Zvýšená hladina ROS způsobuje oxidační poškození DNA, proteinů a lipidů, což nakonec vede k apoptóze buňky [42, 45].

K udržení redoxní rovnováhy využívá rostlina na ROS antioxidační systém, který zahrnuje enzymy askorbátperoxidasu, glutathionperoxidasu, glutathionreduktasu, superoxid-dismutasu, katalasy a antioxidy kyseliny askorbovou, glutathion, karotenoidy a tokoferol. Při redukci aktivity antioxidačních enzymů v tabáku byla pozorována hypersenzitivní reakce rostlin na patogeny, zatímco přílišná exprese těchto enzymů vedla ke zvýšené citlivosti rostlin k patogenu [42, 45].

Sousední buňky provedou změny ve složení buněčných stěn, aby zastavily šíření patogenu [20]. Dochází mimo jiné k rychlé tvorbě kalosy, která je tvořena syntetizovaným polymerem β -1,3-glukanu [46]. Stěna může být také posílena tvorbou fenolického polymeru ligninu, který vzniká polymerací ligninových monomerů, alkoholů syntetizovaných fenylnanlaninovou/tyrosinovou metabolickou cestou - koniferyl, p-kumaryl a synapil, pomocí enzymů lakasy a peroxidasy [47, 48]. V sousedních buňkách dojde k transkripční aktivaci obranných genů, která je následována biosyntézou sekundárních metabolitů a inhibičních proteinů v okolí místa infekce za účelem zadržení patogenu [49]. Syntetizují se antimikrobiální látky jako fytoalexiny [50] nebo PR proteiny [51]. Fytoalexiny jsou fenolické a terpenoidní látky [52]. PR proteiny se neakumulují pouze v místě infekce, ale šíří se po celé rostlině. Jsou to například chitinasy a β -1,3-glukanasy. Mají za úkol a inhibovat růst, množení a šíření patogenů [51].



Obrázek 4: Úloha ROS při napadení rostliny patogeny [42]

1.5. Sekundární metabolity rostlin

Sekundární metabolity rostlin nemají roli v primárním metabolismu. Jejich přítomnost přináší rostlině určité výhody, působí jako atraktanty pro hmyz či obratlovce za účelem opylení květů nebo distribuci semen, a zejména působí jako přirozené pesticidy [53].

Obranné látky mohou být nejedlé či dokonce toxické pro člověka, proto byly z rostlin během šlechtění z větší části odstraněny. Tím se však rostliny staly náchylnější k napadení patogeny [54].

Velkou skupinu sekundárních metabolitů tvoří fenolické látky, které mají hlavně obrannou funkci, jako antibiotika a pesticidy, a signální funkci. Fenolické látky jsou syntetizované z fenylalaninu a v některých rostlinách i tyrosinu, které vnikají šikimátovou drahou. [55]. Existuje mnoho podskupin, jako jsou flavonoidy, taniny, kumariny, ligniny, chinony, stilbeny, fenolické kyseliny a další [56].

Další velkou skupinu sekundárních metabolitů tvoří terpeny, které se skládají z izoprenových podjednotek, a terpenoidy, látky od nich odvozené. Rostliny produkují těkavé terpeny za účelem přilákat či odpudit živočichy. Méně těkavé terpeny mají silnou hořkou chuť nebo jsou dokonce toxické, aby zabránily požití rostlin živočichy. Mají i roli

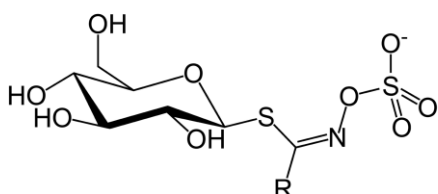
fytohormonů, jako je například seskviterpen kyselina abscisová nebo diterpenoidní kyseliny gibbereliny [57, 58].

Poslední velkou skupinou sekundárních metabolitů s obrannou funkcí jsou alkaloidy, především heterocyklické uhlovodíky obsahující atom dusíku [59].

1.6. Sekundární metabolity řepky a kyselina eruková

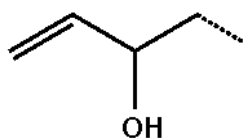
V této kapitole jsou uvedeny pouze sekundární metabolity, jejichž množství se šlechtitelé snaží snížit kvůli nutriční kvalitě semen [60].

Velkou skupinu sekundárních metabolitů obsahujících síru a dusík tvoří glukosinoláty. Bylo identifikováno přes 120 různých glukosinolátů (Obr. 5) [60].

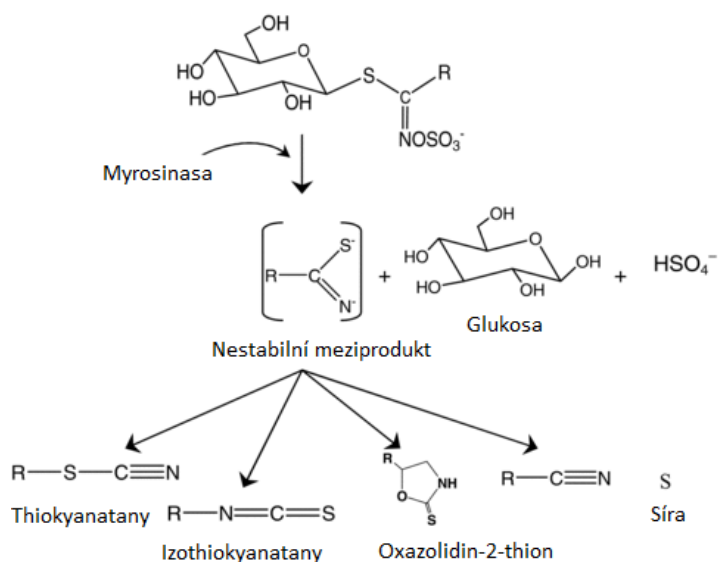


Obrázek 5: Glukosinolát, skupina -R je variabilní

Ve všech svých orgánech řepka obsahuje glukosinoláty [61], které působí jako účinné přírodní pesticidy [62]. Převažujícím glukosinolátem v řepce je 2-hydroxy-3-butenyl-glukosinolát (Obr. 6). β -thioglukosidasový enzym myrosinasa (EC 3.2.3.1) hydrolyticky štěpí glukosinoláty, S-glukosidy, na D-glukosu a aglykon, který je nestabilní a přemění se na sulfát a nestabilní oxazolidin-2-thion, thiokyanatany, izothiokyanatany a oxazolidin-2-thion (Obr. 7, str. 20) [63, 64].



Obrázek 6: skupina -R 2-hydroxy-3-butenyl-glukosinolátu

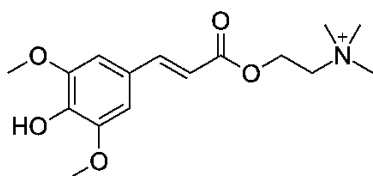


Obrázek 7: Hydrolýza enzymem myrosinasou, jejíž konečné produkty, oxazolidin-2-thion, thiokyanatany, izothiokyanatany, jsou goitrogenní látky [64].

Toxické produkty reakce mají sloužit při ochraně řepky proti patogenům a škůdcům, avšak produkty mají škodlivé účinky i na zvířata a lidi a způsobují jim strumu [65, 66]. Nejdůležitějším mechanismem je interference oxazolidinu s organickou jodací thyroxinu při biosyntéze tyreoidálních hormonů. V případě thiokyanatanového iontu dojde k nahrazení jódu ve štítné žláze, a tak nízká dostupnost jódu ve stravě může vyvolat goitrogenní příznaky [67].

Produkty hydrolýzy glukosinolatů myrosinasou mají i pozitivní účinky. Sulforan a další izothiokyanáty mohou zabránit růstu nádoru blokováním buněčného cyklu a podporou apoptózy [65]. Vzhledem k tomu, že glukosinoláty ochraňují rostliny a jsou potencionálními anti-karcinogeny, neměli by se jich šlechtitelé úplně zbavovat [67]. Ti však zatím v rostlinách drasticky snížili obsah glukosinolatů v semenech, aby se na proteiny bohatý semenný koláč (zbytek po lisování oleje), ve kterém lisováním dojde ke zkoncentrování těchto látek, mohl prodávat jako doplněk stravy pro zvířata [65].

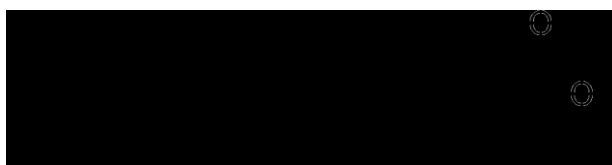
Hlavní fenolickou látkou v semenech řepky je sinapin (Obr. 8, str. 21), který tvoří 1-2 % hmotnosti (w/w) semene [68]. Estery kyseliny sinapové jsou však těžko stravitelné a mají hořkou chuť. Navíc fenolické látky mohou tvořit nerozpustné komplexy s proteiny řepky, proto je tendence zejména ester sinapin odstranit, aby mohla být řepka využívána jako zdroj proteinů [69].



Obrázek 8: Sinapin, ester kyseliny sinapové

Dalšími diskutovanými složkami semen, které mají své klady a zápory jsou taniny a kyselina fytolová [60].

Mezi diskutované látky obsažené v semenech řepky patří kyselina eruková, ačkoliv nepatří mezi sekundární metabolity. Olej nešlechtěné řepky olejný je tvořen z 50 % kyselinou erukovou (Obr. 9) [70]. Bylo však vyzorováno, že zvýšená konzumace řepky jak zvířaty, tak i lidmi způsobuje ukládání tuků v srdeční svalovině [71]. Byl stanoven tolerovaný denní příjem kyseliny erukové na 7 mg.kg^{-1} tělesné hmotnosti na den [71] a byly vyšlechtěny kultivary se sníženým obsahem kyseliny erukové vhodné pro konzumaci [72]. Mechanismus škodlivého působení kyseliny erukové se stále zkoumá. Jedním z posledních předmětů studia byl způsob vázání kyseliny erukové na hovězí albumin (BSA), přičemž byly pozorovány změny v sekundární struktuře tohoto proteinu [73].



Obrázek 9: Kyselina eruková, jednou nenasycená mastná kyselina

1.7. Ochrana rostlin pomocí pesticidů

Pro ochranu plodin je na pole ročně aplikováno velké množství pesticidů [74]. Náchylnost rostlin ke škůdcům a patogenům navyšuje monokulturní pěstování plodin, nedodržování jejich střídání na poli a také zvýšená citlivost některých odrůd. V důsledku je potřeba aplikovat stále větší množství pesticidů [75, 76].

Vůči používaným pesticidům vzniká při opakované aplikaci rezistence, proto je nutné je neustále obměňovat za pesticidy s rozdílným biochemickým mechanismem [77]. Pesticidy ničí přirozenou rovnováhu organismů v ekosystému a tím může dojít k přemnožení škůdců rostlin [78].

Kvůli přílišné spotřebě pesticidů byla pozorována řada nepříznivých vlivů na životní prostředí [75, 76, 78]. Pesticidy znečišťují půdu [79], vodu [80] a vzduch v ošetřované oblasti i do velkých vzdáleností od místa aplikace [81]. Pesticidy ohrožují populace včel [82] a způsobují otravy domestikovaných zvířat [83], v důsledku mohou být kontaminovány i živočišné produkty jako maso, mléko a vejce, které pak nemohou být uvedeny na trh [84].

Většina plodin na trhu má na svém povrchu detekovatelné množství reziduí z pesticidů, většinou však nepřesahuje hranici stanovenou Evropskou unií [85]. Problém však představuje jejich bioakumulace [86]. Některé pesticidy způsobují lidem chronické dermatitidy, neurologické, dýchací a reprodukční poškození a další chronická onemocnění [87] a jsou potencionálními karcinogeny [88]. Tyto skutečnosti vedly ke zpřísnění předpisů pro používání pesticidů, EU vydala v roce 2009 směrnici o používání pesticidů [89]. V ČR byl ve Sbírce zákonů publikován zákon č. 299/2017 Sb., kterým se mění zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči [4].

Dokud však nebude nalezena ekologická cesta pro ochranu plodin, je nutné využívat chemické pesticidy, kvůli zamezení velkých ztrát na výnosu a zachování kosmeticky dokonalých plodin umožňujících jejich delší skladování a samozřejmě jejich přitažlivosti pro spotřebitele [90].

1.8. Biologická ochrana

Z důvodů, které jsou uvedeny v předchozí kapitole, se hledají možnosti šetrnější ochrany polí. Manipulací jednoho organismu nebo aspektu životního prostředí lze kontrolovat jiný organismus [91].

Příkladem biologické ochrany je používání sekundárních metabolitů rostlin ve formě nanočástic, čímž se zvýší jejich účinek proti šíření rostlinných chorob, zatímco nezpůsobí žádné znečištění, protože jsou biodegradovatelné [92]. V případě hmyzích škůdců se například používají pasti s atraktanty [93]. K indukci lokální či systémové rezistence rostliny k patogenům se mohou používat samotné elicitory - produkty hub či bakterií a růst rostlin podporující rhizobakterie [94].

Činiteli biologické ochrany mohou být živí přírodní nepřátelé škůdce, kteří snižují jeho nepříznivý dopad [95]. Tyto organizmy se označují pojmem biologická ochrana [27, 96–99].

Za biologickou ochranu rostlin se může považovat i omezování hlodavců na polích pomocí ptačích dravců [100]. Obdobně dravý roztoč *Typhlodromus pyri* účinně reguluje populace roztočů rodiny *Tetranychidae* ohrožujících ovocné sady a vinice [101].

Biologickou ochranou rostlin využívající benefiční bakterie je například *Bacillus megaterium* a *B. subtilis* sloužící k ochraně řepky před houbou *Sclerotinia sclerotiorum* [96].

Organismem pro biologickou ochranu rostlin může být i houba, které několik mechanismů účinku umožní omezit patogeny. Jedná se o mykoparazitismus, produkci antibiotik nebo enzymů, kompetici o živiny a indukce obranných schopností hostitelské rostliny [102].

Trichoderma harzianum je saprofytická houba obývající rhizosféru. Chrání rostliny před patogeny a podporuje růst rostlin. *T. harzianum* se využívá již i komerčně [103, 104].

Nepatogenní kmeny *Fusarium oxysporum* chrání před patogenními kmeny *Fusarium* způsobující vadnutí rostlin [97].

Dále se k ochraně rostlin využívá oomyceta *Pythium oligandrum* [99].

1.9. *Pythium oligandrum*

Rod *Pythium* sestává z více než 120 druhů obývajících suchozemské ekosystémy i slané vody moří [105]. Druhy rodu *Pythium* se vyskytují jako saprofyty nebo parazité [106]. Mnohé druhy jsou patogeny vyšších rostlin [105, 107, 108], dále mohou být parazity hmyzu [109], savců [110], řas [111] a ryb [112]. Některé nefytopatogenní druhy rodu *Pythium* se ukazují jako slibná biologická ochrana vyšších rostlin před napadením patogenními druhy [105].

V současnosti se v zemědělství využívá oomyceta *Pythium oligandrum* [113], která se odlišuje od patogenních druhů svou schopností chránit rostliny od biotických stresů a navíc podporuje růst rostliny [114].

Pythium oligandrum (*P.o.*) bylo poprvé představeno Drechslerem v USA, který jej nesprávně určil jako původce kořenové hniloby hrachu [115]. Později bylo izolováno z rhizosféry mnoha dalších rostlin [116]. *P.o.* je popisováno jako nespécializovaný parazit útočící s různou účinností na širokou škálu druhů, bylo však potvrzeno, že není patogenní pro rostliny [117, 118].

P.o. spolu s ještě několika druhy rodu *Pythium* jsou neobvyklé mezi oomycetami tím, že mají parazitické interakce s hostiteli, kteří patří do odlišných říší. Jsou to parazitické interakce s oomycetami, houbami, ale i vzájemné komenzální interakce s rostlinami [119].

Na rozdíl od patogenních druhů rodu *Pythium* má *P.o.* menší schopnost kolonizovat kořeny rostlin. *P.o.* je schopné žít v kořenech rostliny i ve sterilním prostředí, ale jako mykoparazit lépe prospívá pokud jsou v kořenech rostliny přítomny kolonie hub z nichž získává potřebné živiny k růstu [118].

1.9.1. Antagonismus *Pythium oligandrum* s patogeny rostlin

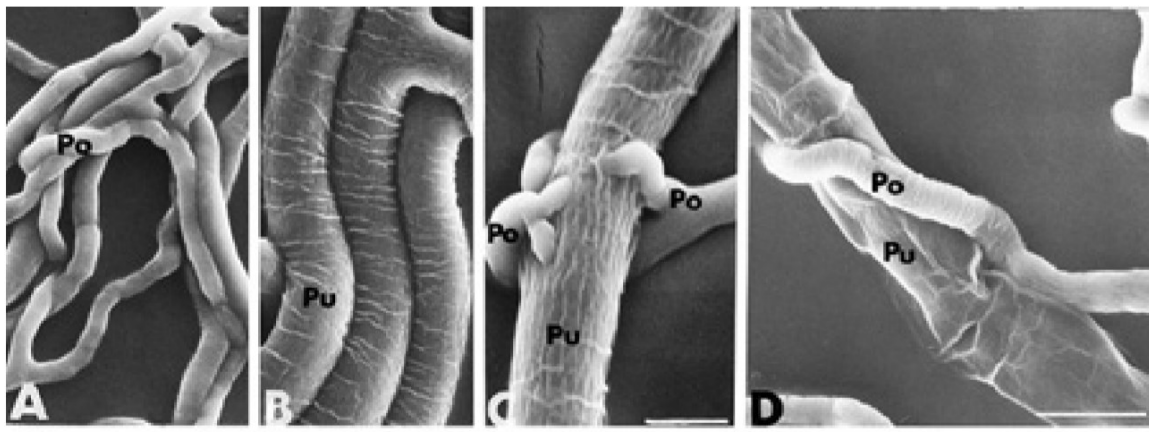
Vzájemné soupeření *P.o.* s rostlinnými parazity je ovlivněno složením media, ve kterém se nacházejí, tedy jde o přístup k výživě i kompetici o ni [120].

Jedním ze způsobů ochrany rostlin pomocí *P.o.* je parazitismus na rostlinných patogenech. Tento způsob má však různou účinnost dle konkrétních parazitů. Příkladem mohou být patogeny hrachu působící kořenovou hnilobu, u kterých *Phoma medicaginis* zcela podlehne parazitismu *P.o.*, zatímco patogeny *Mycosphaerella pinodes* a *Fusarium solani* f. sp. *pisi* podléhají parazitismu sice významně, ne však zcela [120]. Vzácnou situací při biologické ochraně je, když *P.o.* patří ke stejnému rodu jako patogen před kterým rostlinu chrání, jako jsou například *P. ultimum* a *P. aphanidermatum* [121]. Byl prokázán antagonistický účinek *P.o.* vůči patogenním druhům *Pythium* pomocí mykoparazitismu a antibiocy [122].

Během útoku oomycety *P.o.* na houbu dochází ke dvěma odlišným procesům. Děj, během kterého dojde ke změně hyf hostitele ještě před kontaktem s hyfami *P.o.*, se označuje jako antibióza. Druhým dějem je mykoparazitismus zprostředkovaný kontaktem hyf [122].

Způsob parazitismu *P.o.* je podobný všem mykoparazitickým druhům rodu *Pythium* [123]. *P.o.* k narušení buněčných stěn hostitele využívá mimo jiné hydrolytické enzymy chitinasu a celulasu [124]. Brzy po kontaktu hyf *P.o.* a hostitele dochází k úplné ztrátě protoplazmy hyfy hostitele, tudíž i jejího turgoru, která vede ke kolapsu této hyfy (Obr. 10, str. 25). Ukázalo se, že kromě místa průniku hyfy *P.o.*, zůstala chitinová struktura ve stěnách buněk hub *Fusarium oxysporum* neporušena, proto typicky po útoku *P.o.* zůstávají z hyf hostitele prázdné skořápky [122, 125].

Antibióza je způsob antagonismu organismů, při kterém jeden mikroorganismus produkuje a sekretuje sekundární metabolity toxické pro jiný mikroorganismus. Antibióza je velmi běžným jevem při ochraně rostlin prostřednictvím biologické ochrany rostlin [126].



Obrázek 10: Skenovací elektronové mikrografie zachycují hyfy *P.o. interagující s* hyfami patogenu *P. ultimum* během 2. až 3. dne po inokulaci. A) zachycuje hyfy *P.o.*; B) zachycuje hyfy *P. ultimum*; C) zachycuje obtáčení hyf *P.o.* okolo hyf *P. ultimum*; D) ztráta turgoru hyf *P. ultimum* [122].

1.9.2. Vztah oomycety *Pythium oligandrum* s původní mikroflórou kořenů

Klíčem k úspěchu biologické ochrany pomocí *P.o.* je jeho schopnost kolonizovat a přetrvat ve rhizosféře, i když je tento ekosystém již hustě obsazen původní komplexní mikroflórou, která je odolná vůči narušení nově zavedenými mikroorganismy nebo abiotickému stresu a je řízena hlavně rostlinou [127–129]. Po inokulaci *P.o.* je pozorován pouze přechodný posun. *P.o.* neovlivňuje původní bakteriální komunity, i když kolonizuje rhizosféru během doby sklizně [128]. Na přetrvání *P.o.* ve rhizosféře nemají negativní vliv ani změny struktury původních bakteriálních komunit, ke kterým přirozeně dochází v průběhu sezony [128].

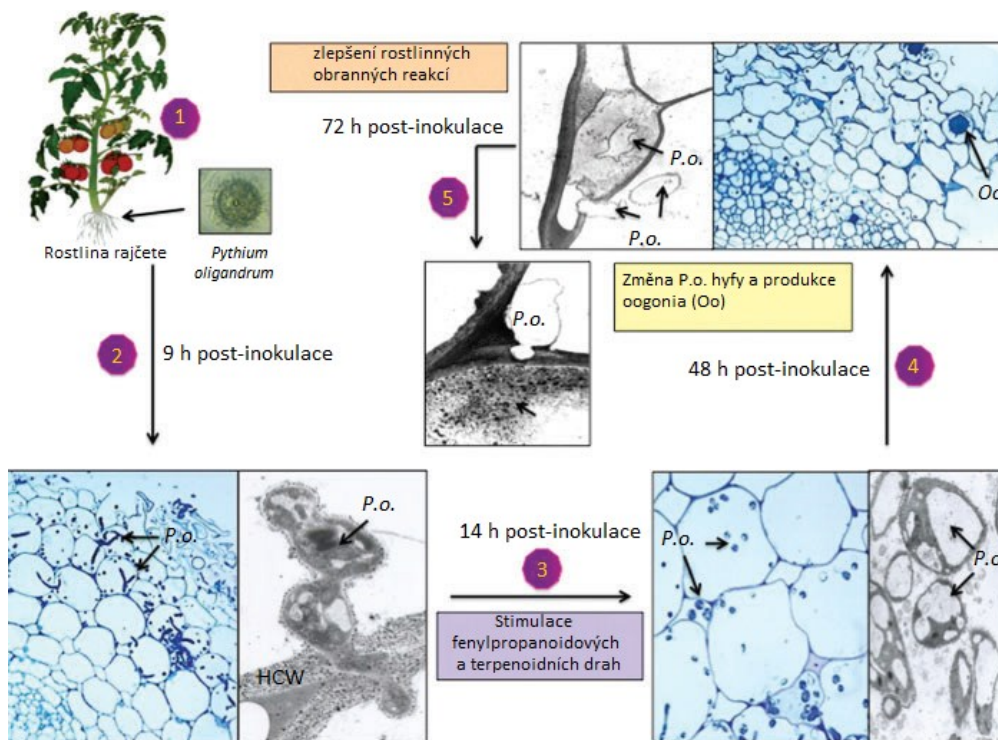
1.9.3. Kolonizace kořenů oomycetou *Pythium oligandrum*

Schopnost *P.o.* kolonizovat kořeny závisí na druhu ošetřované rostliny i jejím stavu a stáří, zejména na jejích kořenových exudátech, zvláště těch rozpustných ve vodě. Dále závisí na způsobu omezování plevelů zemědělcem a na způsobu aplikace oospor [114, 130].

P.o. zaujalo svou pozoruhodnou vlastností, že poté, co rychle kolonizuje kořenový systém a penetruje kořenová pletiva – vlastnost typická spíše pro patogenní oomycety a houby, rychle degeneruje, protože nesnese obrannou imunní opověď rostliny. Díky této rychlé degeneraci nepůsobí rostlině významné poškození pletiv [99, 118, 131–134].

Vztahy *P.o.* s kořeny rostlin byly zkoumány zejména u rajčete [118, 125, 131, 132].

Vztah vzniklý mezi *P.o.* a rostlinou rajčete během 48 h od inokulace *P.o.* na kořeny je nejvýznamnějším důvodem pro zkoumání *P.o.* jako biologické ochrany rostlin (Obr. 11) [132]. Hyfy *P.o.* se většinou vyvíjejí na povrchu kořenů, některé posléze penetrují epidermis, kortex a cévní svazky [131, 134]. Uvnitř buněk rostliny se akumulují obranné látky, jako jsou fenolické látky. Nedochází ke vzniku nekrotických buněk. Znásobení hyf *P.o.* zanechá pouze malé poškození rostlinných buněčných stěn v místech průniku [132, 134].



Obrázek 11: Kolonizace kořenů oomycetou *P.o.*; prvních 9 hodin od inokulace *P.o.* penetruje a kolonizuje kortex. Přibližně 14 hod po inokulaci začne *P.o.* ovlivňovat metabolismus rostliny, při čemž dochází ke tvorbě sekundárních metabolitů fenylypropanoidovou a terpenoidní dráhou. 48 hod od inokulace dochází ke změně hyf *P.o.* na oogonia a po 72 hod od inokulace lze již díky vzniku indukované systémové rezistence pozorovat účinnější rostlinné obranné reakce [99].

9 až 12 hodin od inokulace začnou hyfy *P.o.* degenerovat, protože podlehnou vlivu obranných reakcí hostitelské rostliny [114, 132]. Reakce buněk rostliny jsou rychlé, ale vztahují se pouze na kolonizované buňky a s nimi sousedící buňky. Kolonizované rostlinné buňky získávají podobu cytoplasmatických sítí složených z amorfního materiálu nebo fibril, které obklopí invazní hyfy. Na místech, kde se oomyceta pokusila vstoupit, se často vytvářejí stěny a papily [134]. Po 14 hodinách od inokulace dojde v rostlině k indukované obranné

reakci. Začíná syntézou fytoalexinů. Během následujících 34 hodin se v infikovaných buňkách nahromadí heterogenní osmofilní materiály nebo materiály s vysokou elektronovou hustotou [132], které mechanicky posilují stěny hostitele a vytváří prostředí fungitoxické houbám, tedy nejen pro *P.o.*, ale i pro patogeny rajčete [134].

Typickým znakem kolonizace kořenů oomycetou *P.o.* je ztráta vnitřních cytoplasmatických struktur v invazních hyfách *P.o.* a jejich postupná vakuolizace. Po 48 hodinách je rozpad buněk oomycety doprovázen tvorbou oogonií, samičích haploidních buněk. Po 72 hodinách zbydou z hyf jen prázdné skořápky. V kořenových pletivech zůstávají už jen oospory vniklé splynutím samčích a samičích pohlavních buněk, ale i tyto struktury odumřou. Začíná se projevovat indukovaná rezistence rostliny zvýšenou účinností obranných reakcí ([99, 114, 132, 134]).

Lze říci, že dlouhodobá ochrana pomocí *P.o.* nezahrnuje přímou kompetici o místo a živiny v rhizosféře s patogeny rostlin, ale že hlavním způsobem ochrany je indukovaná systémová rezistence rostliny [131].

1.9.4. Vznik systémové rezistence vyvolané oomycetou *Pythium oligandrum*

Rostliny, jejichž kořeny byly kolonizovány *P.o.*, mají zvýšenou rezistenci vůči patogenům [125]. Zvýšená rezistence rostliny ošetřené *P.o.* se projeví až po napadení patogenem. Spočívá v intenzivnějším prepisu některých genů spojených s obranou před patogeny a s nimi spojenou mobilizací mechanismů obranné reakce [135].

Yacoub a kol. pozoroval u rostlin vinné révy ošetřených *P.o.* potlačení většiny genů ovlivňujících redoxní aktivitu, zatímco exprese několika genů v rostlině naznačovala tvorbu obranných látek proti oomycetě. K největší indukci dochází v oblasti sekundárního metabolismu (terpenoidní a flavonoidní cesty), metabolismu kyseliny abscisové, genů rezistence a některých transkripčních faktorů [136].

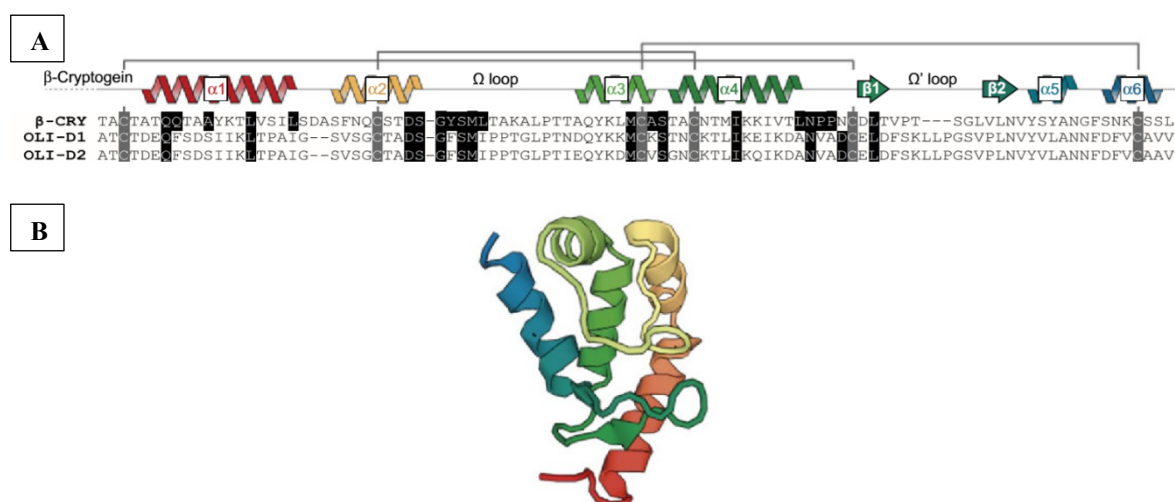
Míra indukce rostlinné rezistence závisí na typu izolátu *P.o.* [27].

Indukovaná systémová rezistence byla indukována po ošetření hyfami *P.o.* nebo elicitory jimi tvořenými, oligandrinem a proteiny buněčných stěn (Cell Wall Proteins, CWP) [137–139].

1.9.4.1. Oligandrin

P.o. produkuje protein oligandrin, který se podobá elicitinům, avšak oligandrin nemusí vždy vyvolat hypersenzitivní reakci [140, 141]. Oligandrin je schopný vyvolat v rostlině indukovanou resistenci [139]. U rostlin ošetřených oligandrinem je pozorován významný pokles onemocnění, dosažený omezením růstu hub ve vnějších pletivech a snížením životaschopnosti patogenů. Dochází k významnému poškození celulosové složky buněčných stěn patogenů. Reakce hostitelské rostliny zahrnují i ucpání intracelulárního prostoru a vytváření stěn v místě možného vstupu patogenu. Za nepřítomnosti patogenu však nejsou žádné změny v hostiteli pozorovány [140].

Molekulová hmotnost oligandrinu je 10 kDa [140]. Masunaka a kol. při zkoumání genomu izolátů *P.o.* D-typu a S-typu objevily 3 geny kódující oligandrin, které označili oli-d1, oli-d2 a oli-s1 [138]. Ukázalo se, že exprimují proteiny Oli-D1, Oli-D2 a Oli-S1 s řetězcem o délce 120 aminokyselin. Sekundární struktura se velmi podobá β -kryptogeinu, elicitinu se šesti α -helixy, dvěma antiparalelními β -listy tvořícími strukturu podobnou zobáku a dvěma Ω -smyčkami, které vážou steroly rostlin (Obr. 12). Oligandrin je účinný elicitor schopný indukovat imunitní reakce v rostlině prostřednictvím signální dráhy kyseliny jasmonové nebo etylenu. Při aplikaci na listy *Nicotiana benthamiana* způsobuje hypersenzitivní reakci a akumulaci reaktivních forem kyslíku, při aplikaci na seříznutý vrchol rajčete k hypersenzitivní reakci nedošlo. Oligandrin cílí na plazmatickou membránu buněk rostliny [140–143].

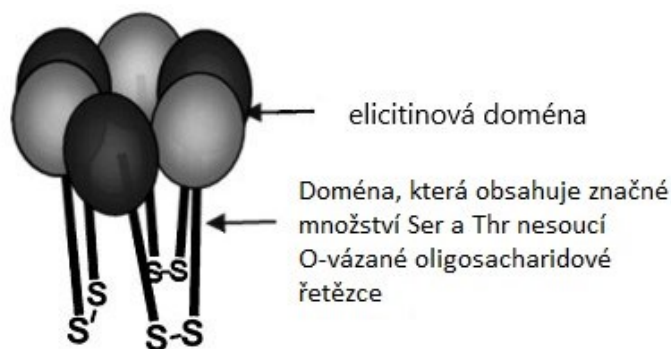


Obrázek 12: A) Sekundární struktura β -kryptogeinu a porovnání primární struktury β -kryptogeinu s oligandrinem - D1 a D2; B) model terciální struktury β -kryptogeinu [143]

1.9.4.2. Proteiny buněčných stěn s funkcí elicitoru

Při aplikaci proteinů buněčných stěn (Cell Wall Proteins, CWP) *P.o.* na listy cukrové řepy došlo k indukci genů rezistence vůči patogenům řepy [144].

CWP zahrnují tři elicitinům podobné proteiny: POD-1 a POD-2 [145] a POS-1 [138]. POD-1 a POD-2 proteiny obsahují sedm cysteinů tvořících cysteinové můstky. POD-1 a POD-2 jsou podjednotkami tvořícími komplex tří heterodimerů, které tvoří hexadimerní kruh prostřednictvím nekovalentních vazeb (Obr. 13). Struktura je esenciální pro stimulaci obranných reakcí rajčete. Při aplikaci CWP na kořeny rajčete jsou aktivovány tři geny související s obranou (*PR-6* reagující na kyselinu jasmonovou, *LeCAS* a *PR-2b* reagující na ethylen), které se pojí s obranyschopností rajčete. CWP indukují akumulaci etylenu v rajčeti [145].



Obrázek 13: Model heterohexameru POD-1 a POD-2, který je hypoteticky tvořen kruhovou strukturou složenou ze tří heterodimerů POD-1 a POD-2; elicitinová doména má sekundární strukturu podobnou β -kryptogeinu [145]

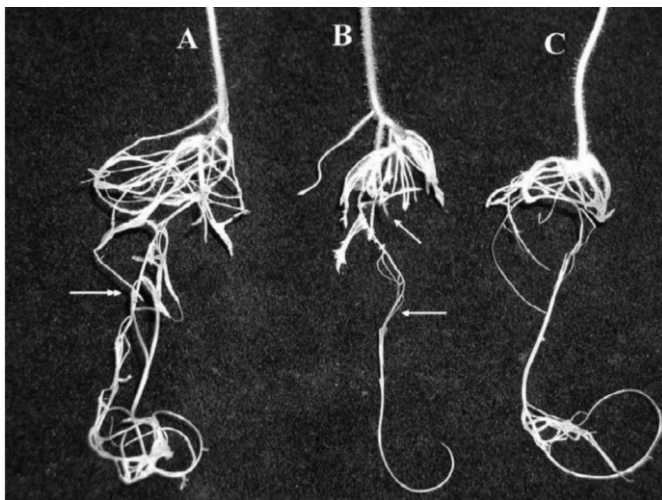
1.9.5. Podpora růstu rostliny oomycetou *Pythium oligandrum*

Aplikace *P.o.* na rostlinu zpočátku způsobí stejně jako napadení patogenními členy rodu *Pythium* redukci růstu kořenů. Redukce kořenů je způsobena výdejem energie rostliny na obranu před penetrací kořenových pletiv hyfami *P.o.* Na rozdíl od patogenních rodů *Pythium* však rostliny ošetřené *P.o.* po ukončení této periody rychle dosáhnou stejné délky kořenů, jakou mají kontrolní rostliny. Následně je pozorována stimulace prodlužování kořene. Jev má většinou dobrý vliv na sklizeň ošetřené plodiny. Ačkoliv byl někdy pozorován snížený počet rostlin, neměl tento stav vážný dopad na výnos [118, 134, 146].

Mikroorganismům podporujícím růst rostlin se věnují mnohé studie. Zabývají se zejména rhizobakteriemi a houbami podporujícími růst [103, 147, 148]. Podpora růstu je způsobena tím, že mikroorganismy produkují a sekretují různé regulační látky v blízkosti rhizosféry.

Jedná se o přímou podporu růstu zprostředkováním zdrojů (dusík, fosfor a základní minerály) či modulací hladin fytohormonů, nebo o nepřímou podporu růstu snížením inhibičního vlivu různých patogenů na růst [149].

Podpora růstu rostlin oomycetou *P.o.* je zprostředkována přímým působením látek produkovaných oomycetou (Obr. 14). *P.o.* tryptaminovou cestou metabolizuje exudáty kořenů rostliny, například indolové deriváty tryptofan (Trp) a indol-3-acetaldehyd, a přemění je na tryptamin a jiné auxinu podobné látky, které dodává rostlině. Nízký obsah Trp v exudátech rostliny je limitujícím faktorem podpory růstu oomycetou *P.o.* [150].



Obrázek 14: Na obrázku jsou vyfoceny 3 týdny staré kořeny rostlin rajčete. A) rostlina ošetřená *P.o.*; B) rostlina ošetřená *Pythium* ze skupiny F, minoritního patogenu známého pro svou schopnost produkce auxinových látek, který však způsobil nepravidelný růst kořenů. Produkce auxinových látek u těchto dvou druhů působí opačné účinky; C) kontrolní rostlina [150].

Tryptaminová cesta je známá i u jiných mikroorganismů obývajících rhizosféru. *P.o.* se od nich liší tím, že nedokáže tryptamin transformovat na fytohormon auxin (kyselinu indol-3-ocetovou) [150, 151]. Příjem tryptaminu může podpořit syntézu auxinu v rostlině rajčete, i když tryptamin není jejím hlavním endogenním prekursorem. [152, 153].

1.10. Kombinace *Pythium oligandrum* s jinými mikroorganismy vhodnými pro biologickou ochranu rostlin

Výzkum se v posledních letech zaměřuje na využití potencionálního synergického efektu při použití kombinace mikroorganismů vhodných pro biologickou ochranu rostlin [154–159]. Pouze malé množství zkoušených kombinací bylo úspěšné, většinou došlo k redukované nebo stejné účinnosti biologické ochrany [160].

Jeden z pokusů na biologickou ochranu rostlin kombinací různých mikroorganismů s oomycetou *P.o.* provedl Le Floch. Předpokládal, že spuštění různých obranných reakčních cest v rostlině povede k větší konzistenci ve vyvolání systémové rezistence rostliny a tím bude zvýšena účinnost biologické ochrany. Kombinoval oomycetu s antagonistickými houbami jako jsou *Fusarium oxysporum* a/nebo *Trichoderma harzianum*. Aplikované mikroorganismy byly po několika dnech zničeny elicitovanými obrannými reakcemi rostliny v kořenech. Obranná reakce rostliny však stačila, aby byla vyvolána systémová rezistence celé rostliny proti patogenům na listech. Úroveň vyvolané ochrany a tvorba PR-proteinů v listech rostliny nebyla ovlivněna druhem ani kombinací aplikovaných mikroorganismů [161].

2. Cíl práce

- 1) Charakterizovat látky sekretované do média izoláty oomycety *Pythium oligandrum* a porovnat s komerčně dostupným izolátem M1.
- 2) Porovnat metabolismus rostlin řepky, jejíž semena byla ošetřena několika izoláty oomycety *Pythium oligandrum* s kontrolními neošetřenými rostlinami.

3. Materiál a metody

3.1. Přístroje

- Vertikální elektroforetická aparatura: Multigel (Biometra, Německo)
- Spektrofotometr: Helios γ (Thermo Scientific, USA)
- Spektrofotometr: Ultrospec 2100 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)
- Spektrofotometr: Sunrise (Tecan, Švýcarsko)
- Spektrofotometr: Multiscan go (Thermo Scientific, USA)
- Centrifuga: Univerzal 32R (Hettich, Německo)
- pH metr: UltraBASIC (Denver Instruments Company, USA)
- Váhy analytické: Model 100A (Denver Instruments Company, USA)
- Váhy analytické: Entris® (Sartorius Lab Instruments, Německo)
- Prosvěcovač: Slimlite plátno (Kaiser, Německo)
- Nechlazený inkubátor (Schoeller Instruments, Česko)

3.2. Chemikálie

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, USA)
- 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin (Sigma-Aldrich, USA)
- 2-amino-2-methyl-1-propanol (Sigma-Aldrich, USA)
- 3,3'-diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, USA)
- 3-Methyl-2,3-dihydrobenzothiazolon-2-hydrazon (Sigma-Aldrich, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich, USA)
- Askorbát sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- Azokasein (Sigma-Aldrich, USA)
- Bisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Bradfordovo činidlo (Sigma-Aldrich, USA)
- Bromfenolová modř 0,1% (Sigma-Aldrich, USA)
- Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich, USA)
- Činidlo fenolové Folin-Ciocalteu (Dr. Kulich Pharma, Česko)
- Dihydrát ethylendiamin tetraoctan disodný (Sigma-Aldrich, USA)

- Dihydrát hydrogenfoforečnanu sodného (Lachema-Chemapol, ČSSR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema-Chemapol, ČSSR)
- Disodná sůl oxidované formy glutathionu (Roche, Německo)
- DL-dithiothreitol (Sigma-Aldrich, USA)
- Dodecylsíran sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- Dusičnan stříbrný (Lachema-Chemapol, ČSSR)
- Ethanol 96% (Lach-Ner, Česko)
- Fenazin metosulfát (Sigma-Aldrich, USA)
- Fenol (Sigma-Aldrich, USA)
- Formaldehyd 36-38% (Lach-Ner, Česko)
- D-Glukosa-6-fosfát (Sigma-Aldrich, USA)
- Glycerol bezvodý (Lach-Ner, Česko)
- HEPES (Sigma-Aldrich, USA)
- Hexahydrát chloridu hořečnatého (Sigma-Aldrich, USA)
- Hexahydrát chloridu železitého (Sigma-Aldrich, USA)
- Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydrát dihydrogenfoforečnan sodný (Lachema-chemapol ČSSR)
- Hydroxid sodný pecky p.a. (Penta, Česko)
- Chitin z krunýřů krevet (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyanid draselný (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina 3-morfolinpropansulfonová (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, Česko)
- Kyselina octová 99% (Lach-Ner, Česko)
- Kyselina amidosulfonová (Lachema, Československo)
- Kyselina šikimová (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina trichloroctová (Lach-Ner, Česko)
- Laminarin z *Laminaria digitata* (Sigma-Aldrich, USA)
- L-malát sodný (Sigma-Aldrich, USA)

- β -Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Methylcelulosa (Sigma-Aldrich, USA)
- N,N,N,N-tetrametyletylendiamin (Thermo, Japonsko)
- Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (Roche, Německo)
- Nitroblue tetrazolium (Sigma-Aldrich, USA)
- Octan sodný krystalický (Lachema, Česko)
- Pentahydrát síranu sodného (Lachema, Česko)
- Peroxid vodíku 30% (Lach-Ner, Česko)
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo, Japonsko)
- Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (BioRad, USA)
- Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard (BioRad, USA)
- Redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát (Sigma-Aldrich, USA)
- Riboflavin (Sigma-Aldrich, USA)
- Sacharosa (Penta, Česko)
- Síran železitoamonný (Lachema, Československo)
- Tricine (Serva, USA)
- Trisma®base (Tris) (Sigma-Aldrich, USA)
- Trolox (Sigma-Aldrich, USA)
- Uhličitan sodný bezvodý (Lachema, Česko)

3.3. Softwarové vybavení

- GelAnalyzer
- Excel (Office 365)

3.4. Izoláty *Pythium oligandrum*

Tekuté médium po kultivaci izolátů oomycety *P.o.* bylo dodáno firmou Biopreparáty. Jednalo se o izoláty 00x5, 00x11, 00x23, 00x30, 00x34, 00x40, x40, 00x42, x42, 00x48 a komerční izolát M1 (*Polyversum*).

3.5. Rostlinný materiál

3.5.1. Pěstování rostlin

Semena rostlin řepky byly před vysetím mořeny přípravkem na bázi oomycety *P.o.*, a to izolátem M1 a dalšími novými izoláty 00x5, 00x11, 00x23, 00x30, 00x34, 00x40, 00x42, x42 a 00x48. Rostliny jsem dostala vždy vypěstované pracovníky firmy Biopreparáty.

Rostliny ošetřené *P.o.* byly pěstovány v organickém substrátu při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ s fotoperiodou 12 hodin. Rostliny byly sklizeny 3 týdny po vysetí.

Rostliny ošetřené *P.o.* a infikované patogenem *Verticillium longisporum* byly pěstovány v organickém substrátu při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ s fotoperiodou 12 hodin. Rostliny byly sklizeny 4 týdny po vysetí.

3.5.2. Odběr vzorků

Byly odebrány listy od každé skupiny rostlin do směsných nádob. Odebrané listy byly z nádob rozděleny na vzorky po cca 0,5 a 1,0 g. Byla zvážena čerstvá hmotnost každého vzorku na analytických vahách. Vzorky byly zabaleny do alobalu, zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6. Extrakce

Vzorek listů byl homogenizován ve třecí misce pomocí tekutého dusíku. K nadrcené rostlině byla přidána extrakční kapalina dle následného způsobu měření a byla dokončena homogenizace. Poté probíhala extrakce po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Následná centrifugace probíhala 20 minut při 16 600 g a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

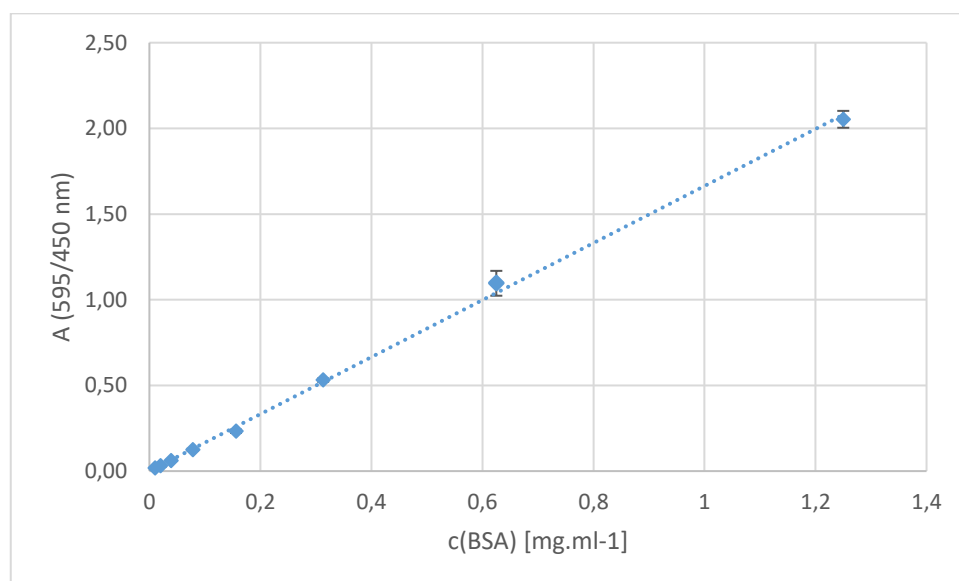
Pro potřeby měření fenolických látek a antioxidační kapacity byla extrakce prováděna pomocí 96% ethanolu o trojnásobném objemu vůči čerstvé hmotnosti vzorku (v:w). Pokud následovalo měření aktivity enzymů byl použit pufr A (100mM Tris – HCl pH 7,8; 1mM DTT; 1mM EDTA; 5mM MgCl₂; pH 7,8) vyjma případu glykosidas a proteas, kdy byl použit pufr B (100mM MOPS – NaOH; pH 5,0). Objemy pufrů byly přidávány v poměru 1:1 (v:w) k čerstvé hmotnosti vzorku. Do homogenizátu s pufrem byla přidána špetka PVP (1 mg.ml⁻¹).

3.7. Stanovení koncentrace proteinů

Kvantitativní stanovení proteinů podle Bradforda je rychlá a citlivá metoda. Vazba barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein způsobuje posun absorpčního maxima barviva ze 465 nm na 595 nm [162].

Měření bylo prováděno na mikrotitrační destičce v triplicátech, do které bylo pipetováno 10 μl vhodně zředěného vzorku a 200 μl Bradfordova činidla. Reakční směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byla na spektrofotometru měřena absorbance při 450 nm a 595 nm proti blanku. V blanku byl vzorek nahrazen vodou v případě izolátů *P.o.* nebo pufrem A v případě vzorků řepky.

Při kalibraci metody byl vzorek nahrazen proteinem BSA o koncentraci v rozsahu 0,01 – 1,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, který byl ředěn dvojkovou ředící řadou (Obr. 15).



Obrázek 15: Závislost absorbance (595/450 nm) na koncentraci hovězího sérového albuminu (Kalibrace pro stanovení proteinů podle Bradforda); Kalibrační křivka: $A = 1,663 c(\text{BSA}) [\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$, $R^2 = 0,999$

3.8. Elektroforetická separace

3.8.1. Elektroforetická separace za nativních podmínek

Elektroforetické separace za nativních podmínek bylo využito v případě detekce enzymů, při které musí být proteiny nedenaturované. Při této separaci závisí na náboji jednotlivých proteinů ovlivněnému primární aminokyselinovou sekvencí proteinů, tedy izoelektrickém bodu proteinů, a pH během elektroforézy i na velikosti proteinů [163].

Při elektroforetické separaci za nativních podmínek byly použity 5% zaostřovací gel a 6%, 8% nebo 10% separační gely. 30% zásobní roztok akrylamidové směsi obsahoval 28,2 % (w/v) akrylamidu a 0,8 % (w/v) bisakrylamidu.

Složení 5% zaostřovacího gelu sestávalo z 5% (w/v) akrylamidové směsi; 125mM pufru Tris-HCl o pH 6,8; 0,1% (w/v) glycerolu; 0,1% (w/v) peroxodisíranu amonného a 0,1% (v/v)

TEMED. Složení separačního gelu sestávalo z 6%, 8% nebo 10% (w/v) akrylamidové směsi; 380mM pufru Tris-HCl o pH 8,8; 0,1% (w/v) glycerolu; 0,1% (w/v) peroxodisíranu amonného a 0,04% (v/v) TEMED.

TEMED a peroxodisíran amonný byly do roztoku přidány vždy jako poslední, protože spustily polymeraci akrylamidu a síťování bisakrylamidem. Gely byly připravovány do vertikálních skel o ploše 11 x 7 cm (šířka x délka) s hřebenem na 12 jamek.

Elektrokový pufr obsahoval 1,88% (w/v) glycin; 0,3% (w/v) Tris a 0,001% (v/v) glycerol. Ke vzorkům byla přidána pevná sacharosa tak, aby vznikl 20% (w/v) roztok. Upravené extrakty byly nanášeny do jamek gelů po 25 μ l. Do elektrodového pufru ve vrchní části elektroforetické aparatury bylo přidáno 150 μ l 0,1% (w/w) bromfenolové modři, která umožnila sledování postupu čela elektroforézy. Počáteční napětí bylo nastaveno na 70 V, po přechodu čela do separačního gelu bylo napětí navýšeno na 140 V.

3.8.2. Elektroforetická separace v prostředí SDS

Při elektroforetické separaci v prostředí SDS byly použity 5% zaostřovací gel (5% (w/v) akrylamidová směs; 125mM pufr Tris-HCl o pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) peroxodisíran amonný a 0,1% (v/v) TEMED) a 15% separační gel (15% (w/v) akrylamidová směs; 380mM Tris-HCl o pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) peroxodisíran amonný; 0,04% (v/v) TEMED). Elektrokový pufr obsahoval 1,88 % (w/v) glycinu; 0,3 % (w/v) Tris a 0,001 % (v/v) SDS.

Extrakty vzorků v pufru A byly smíšeny s redukčním vzorkovým pufrem (130mM Tris-HCl, pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 2% SDS; 0,005% (w/v) bromfenolová modř; 100mM DTT) v poměru 1:1. Vzorková směs byla povařena 10 minut. Jako standardy byly použity Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard (10 – 250 kDa; BioRad) a PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 – 250 kDa; Thermo) a lysozym (14,3 kDa) a jeho oligomery. Do každé dráhy bylo aplikováno stejné množství proteinů. Počáteční napětí bylo nastaveno na 70 V, po přechodu čela do separačního gelu bylo napětí navýšeno na 140 V.

Vizualisace proteinů v gelu po elektroforéze byla provedena pomocí barvení v Coomassie Brilliant Blue přes noc. Odbarvení gelu bylo provedeno v odbarvovacím roztoku (40% (v/v) methanol, 10% (v/v) ledová kyselina octová) přes noc. Druhým způsobem vizualizace byla detekce pomocí stříbra (viz kapitola 3.8.4).

3.8.3. Elektroforetická separace malých proteinů v prostředí tricinu a SDS

Použití metody je preferováno pro rozlišení proteinů s molekulovou hmotností menší než 30 kDa. V této práci bylo postupováno dle protokolu podle Schäggera [164].

Do mikrozkušavek bylo pipetováno 50 μ l vzorkového pufru (12% (w/v) SDS; 6% (v/v) merkaptoethanol; 0,05% Coomassie Brilliant blue; 150mM Tris-HCl pH 7,0) a 150 μ l vzorku. Standard byl připraven z 5 μ l komerční směsi proteinů o známé molekulové hmotnosti (Tabulka 2), 25 μ l vzorkového pufru a 70 μ l destilované vody. Všechny zkumavky byly inkubovány 5 minut při teplotě 90° C.

Tabulka 2: Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (BioRad)

Protein	Molekulová hmotnost [Da]
Triosafosfátizomeráza	26 625
Myoglobin	16 950
α -Lactalbumin	14 437
Aprotinin	6 512
Oxidovaná forma insulinového b řetězce	3 496
Bacitracin	1 423

Byly použity 4% zaostřovací gel a 16% separační gel. Zásobní roztok akrylamidové směsi obsahoval 49,5 % (w/v) akrylamidu a 3 % (w/v) bisakrylamidu (49,5% T, 3% C). Složení 4% zaostřovacího gelu sestávalo z 4% (w/v) akrylamidové směsi; 0,75M Tris-HCl, pH 8,45; 0,075% (w/v) SDS; 0,08% (w/v) peroxidisíranu amonného; 0,08% (v/v) TEMED. Složení 16% separačního gelu sestávalo z 16% (w/v) akrylamidové směsi; 1M Tris-HCl, pH 8,45; 0,1% (w/v) SDS; 10% (w/v) glycerolu; 0,03 % (w/v) peroxidisíranu amonného; 0,03 % (v/v) TEMED.

V dolní části vertikální elektroforézové aparatury byl anodový pufr (1M Tris-HCl, pH 8,9) a ve vrchní části aparatury byl katodový pufr (1M Tris, 1M Tricin, 1% (w/v) SDS, pH 8,25).

Do jamek gelů bylo nanášeno 20 μ l standardu a vzorky o stejném množství proteinů v každé dráze o maximálním objemu 25 μ l. Elektroforéza byla spuštěna na 30 V po dobu 1,25 hodiny, po přechodu do separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 90 V na 1,5 hodiny.

3.8.4. Detekce proteinů v gelu

K vizualizaci proteinů v gelu po elektroforéze bylo využito detekce pomocí stříbra. Jedná se o velmi citlivou metodu schopnou zaznamenat i velmi malá množství proteinů v řádu nanogramů. Proteiny na sebe váží stříbrné ionty, které jsou za vhodných podmínek redukovány a tím se tyto proteiny vizualizují. Navazování stříbrných iontů však může snížit reaktivitu iontů, proto v místě s vyšším množstvím proteinů vznikají „prázdná“ místa nebo „donutové“ pruhy [165].

Separční gel byl ponořen do fixačního roztoku (50% (v/v) ethanol, 12% (v/v) kyselina octová, 0,05% formaldehyd) na 20 minut. Poté byl během 20 minut třikrát promyt v promývacím roztoku (20% (v/v) ethanol). Následně byl gel ponořen na 2 minuty do senzitivizujícího roztoku (0,02% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Poté byl gel dvakrát promytý dH_2O (deionizovaná) pokaždé na 1 minutu. Dále byl gel vložen na 20 minut do barvicího roztoku (0,2% (w/v) AgNO_3 , 0,076% formaldehyd). Poté byl gel promytý ve větším objemu dH_2O po dobu kratší 60 s. Gel byl vložen do vyvíjecího roztoku (6% (w/v) Na_2CO_3 , 0,0004% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,05% formaldehyd), který byl rychle nahrazen nepoužitým vyvíjecím roztokem, ve kterém byl gel ponechán do doby než se dostatečně zobrazily pruhy proteinů. Reakce byla ukončena přidáním terminačního roztoku (12% (v/v) kyselina octová) ve stejném objemu jaký měl vyvíjecí roztok. Gel byl ponechán v roztoku, dokud unikaly bublinky značící probíhající reakci. Poté byl gel promyt a ponechán v dH_2O .

3.9. Stanovení enzymové aktivity

3.9.1. Aktivita glykosidas

Byly měřeny aktivity endoglykosidas endo- β -1,3-glukanasy (EC 3.2.1.6), celulasy (EC 3.2.1.4) a chitinasy (EC 3.2.1.14) za použití substrátů koloidního laminarinu (L), methylcelulosity (M) a chitinu (CH).

Použitá metoda se zakládá na kvantifikaci redukujících cukrů, které vznikly štěpením polysacharidů.

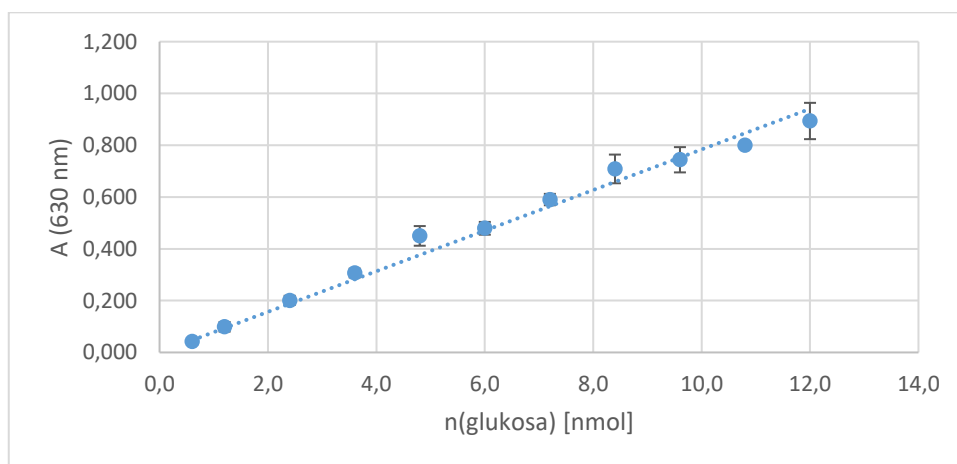
K 20 μl 100mM pufru MOPS - NaOH (pH 5,0) bylo přidáno 12 μl 1,6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ substrátu (L, CH, M). Reakční roztok byl temperován v inkubátoru na 37° C. Přidáním 8 μl vhodně ředěného vzorku započala reakce.

Reakční směs byla inkubována v termostatu po 10 minut při 37 °C. Poté byla reakce ukončena přidavkem 40 μl 0,5M NaOH a 40 μl MBTH činidla (3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ MBTH, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ DDT). Poté byl reakční směs opět inkubována v termostatu na 15 minut při 80 °C.

Do mikrotitrační destičky bylo nanášeno 80 μl činidla, obsahujícího železité ionty (0,5% (w/v) $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 0,5% (w/v) kyselina amidosulfonová; 0,25M HCl), do kterého bylo přidáno 120 μl reakčního roztoku. Absorbance byla měřena při 630 nm na spektrofotometru.

Při slepém pokusu bylo nejprve inkubováno 8 μl vzorku se 40 μl 0,5M NaOH při 80 °C na 30 minut. Poté byly přidány další složky reakční směsi.

Kalibrace metody byla provedena pomocí roztoků glukosy v koncentračním rozsahu 0,5 – 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. 16). Roztoky glukosy nahradily přidávaný substrát, vzorek nahradilo stejné množství dH_2O . Po přidání zbývajících složek reakčního roztoku byl roztok inkubován na 15 minut při 80 °C. Poté bylo přidáno 80 μl železitého činidla.



Obrázek 16: Závislost absorbance redukovaného Fe komplexu na látkovém množství redukujícího sacharidu – glukosy; Kalibrační křivka: $A = 0,078 n(\text{glukosa}) [\text{nmol}]$, $R^2 = 0,984$

3.9.2. Aktivita proteas

Aktivita proteas ve vzorku byla stanovena hydrolyzou barevného substrátu azokaseinu. Štěpením vzniknou oranžové peptidy rozpustné v kyselině trichloroctové (TCA), zatímco azokasein se přidavkem TCA precipituje [166].

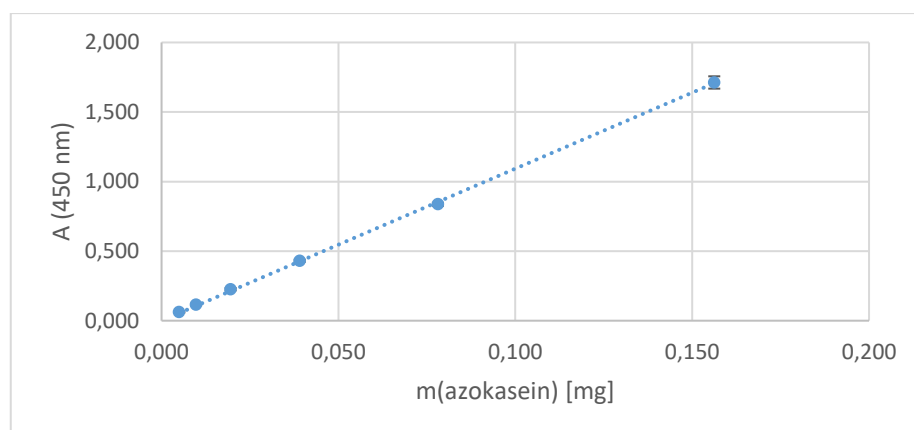
Do mikrozkušavek umístěných v termostatu bylo pipetováno 50 μl 2,5% (w/v) azokaseinu, 25 μl 100mM pufru MOPS-NaOH o pH 5,0. Reakční směs byla temperována při 37 °C.

Přídavkem 25 μl vzorku započala reakce. Reakce probíhala po dobu 15 minut při 37 $^{\circ}\text{C}$. Reakce byla zastavena přídavkem 250 μl 5% TCA, která precipitovala nehydrolyzovaný azokasein. Mikrozkušavky s precipitovaným azokaseinem byly centrifugovány 10 minut při 7 370 g a teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$.

Příprava slepého vzorku se lišila přidáním 250 μl 5% TCA ještě před přídavkem vzorku.

Do mikrotitrační destičky byly pipetovány triplikáty obsahující 100 μl 2M NaOH a 100 μl supernatantu, který obsahoval naštěpené peptidy oranžové barvy. Absorbance byla měřena při 450 nm.

Kalibrace metody byla provedena pomocí substrátu azokaseinu, ředěného dvojkovou ředící řadou v rozsahu 0,05 – 3,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do jamek mikrotitrační destičky byly připraveny triplikáty 100 μl roztoku azokaseinu, v posledním triplikátu bylo po 100 μl dH_2O . Poté bylo přidáno 100 μl 2M NaOH (Obr. 17).



Obrázek 17: Závislost absorbance na množství azokaseinu; Kalibrační křivka: $A = 10,93 m(\text{azokasein})$ [mg ve 100 μl vzorku]

3.9.3. Aktivita dehydrogenas

Aktivita dehydrogenas byla sledována pomocí vzniku redukované formy nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH) s absorpčním maximem při 260 nm a 340 nm. Protože při 260 nm absorbuje i oxidovaná forma využívá se k měření vlnová délka 340 nm [167].

Do kyvety o tloušťce 10,0 mm byly pipetovány složky reakce. Celkový objem reakčního roztoku činil 1 ml. Přídavkem 50 μl extraktu započala enzymové reakce. Byla měřena absorbance při 340 nm ($\epsilon_{[340]}(\text{NADPH}) = 6\,220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) po dobu 120 s.

Reakční roztok pro měření aktivity šikimátdehydrogenasy (SDH) obsahoval 100 mM pufr 2-amino-2-methyl-1-propanolu o pH 9,0; 3 mM šikimát; 0,2 mM NADP⁺.

Reakční roztok pro měření aktivity glukosa-6-fosfát-dehydrogenasy (G6PDH) obsahoval 100 mM pufru Tris-HCl o pH 7,4; 5 mM D-glukosa-6-P; 3 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP⁺.

Reakční roztok pro měření aktivity malátdehydrogenasy dekarboxylační (NADP – ME) obsahoval 100 mM pufr Tris-HCl o pH 7,4; 10 mM L-malát; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP⁺.

Při detekci aktivity dehydrogenas v gelu po elektroforetické separaci za nativních podmínek byl použit barvicí reakční roztok, který obsahoval 0,1 mg.ml⁻¹ nitroblue tetrazolium (NBT) a 0,005 mg.ml⁻¹ fenazin metosulfátu. Koncentrace zbývajících složek reakce byly stejné jako při reakci v kyvetě.

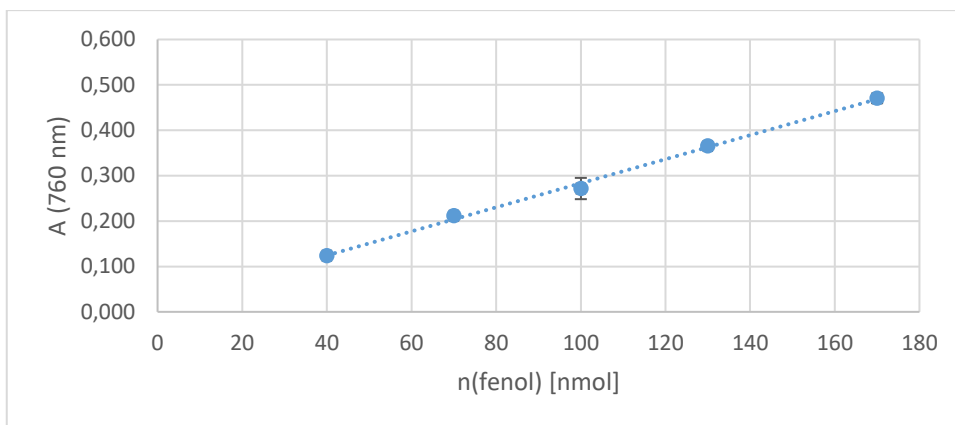
3.10. Stanovení množství fenolických látek a antioxidační kapacity

3.10.1. Měření množství fenolických látek

Antioxidační aktivitu fenolických látek je možné sledovat pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Folin-Ciocalteuovo činidlo však není specifické pouze pro fenolické látky, ale zachytí i kyselinu askorbovou a další. Metoda se zakládá na přenosu elektronů reduktanty na komplexy iontů molybdenu Mo(VI) v činidlu, které jsou redukovány na Mo(V). Fenolické látky reagují s Folin-Ciocalteuovým činidlem pouze v bazickém prostředí, ve kterém dojde k disociaci fenolického protonu a vznikne fenolátový aniont, který reaguje s Folin-Ciocalteuovým činidlem za vzniku modré sloučeniny [168].

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 20 µl vhodně zředěného vzorku, k němu bylo přidáno 100 µl 10% Folin-Ciocalteuova činidla. Po 2 minutách inkubace bylo přidáno 80 µl roztoku 75 g.l⁻¹ (w/v) Na₂CO₃. Po 28 minutách inkubace byla měřena absorbance při 760 nm.

Metoda byla kalibrována náhradou vzorku roztoky fenolu v rozsahu koncentrací 200 - 850 µmol.l⁻¹ (Obr. 18, str. 44).



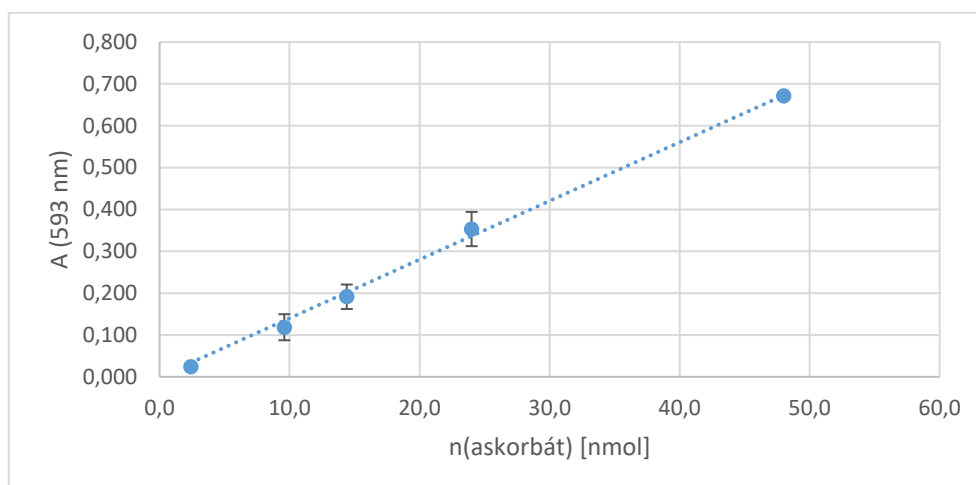
Obrázek 18: Závislost absorbance na látkovém množství fenolu; Kalibrační křivka: $A = 0,0026 n(\text{fenol}) [\text{nmol}] + 0,0184$, $R^2 = 0,997$

3.10.2. Metoda FRAP

Metoda je založena na schopnosti vzorku při nízkém pH redukovat komplex železitého iontu s 2,4,6-tripyridyl-s-triazinem (TPTZ) na železnatou formu $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$. Přeměnu doprovází vznik intenzivně modré barvy s absorpčním maximem 593 nm [169].

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 40 μl vhodně zředěného extraktu. Bylo přidáno 200 μl FRAP činidla (25% (v/v): 700 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ TPTZ rozpuštěné ve 40mM HCl; 10% (v/v) 20mM FeCl_3 ; 65% (v/v): 300 mM acetátový pufr, pH 3,6). Činidlo muselo být připraveno vždy čerstvé a chráněné před světlem. Po 10 minutové inkubaci byla změřena absorbance při vlnové délce 593 nm.

Kalibrace byla provedena pomocí kyseliny askorbové, která nahradila extrakt. Koncentrace byly v rozmezí 10 – 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Obr. 19, str. 45).



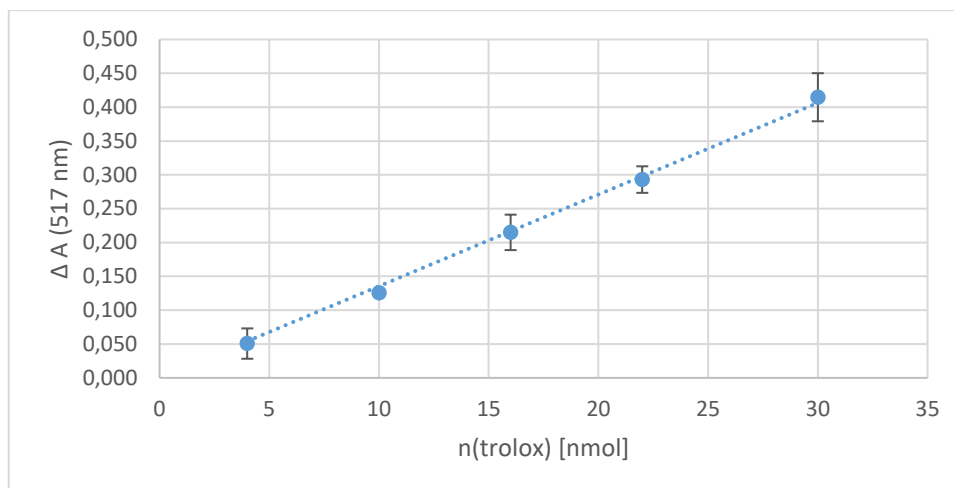
Obrázek 19: Závislost absorbance redukovaného Fe komplexu na látkovém množství askorbátu; Kalibrační křivka: $A = 0,014 n(\text{askorbát}) [\text{nmol}]$; $R^2 = 0,997$

3.10.3. Metoda DPPH

Sledovat schopnosti vzorku eliminovat volné oxidační radikály umožňuje metoda využívající eliminaci syntetického stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH·). Volný radikál DPPH, který má tmavě modrou barvu s absorpčním maximem při 517 nm, může snadno přijímat elektron nebo vodík od antioxidačních molekul, aby se stal stabilní diamagnetickou molekulou, přičemž dochází ke ztrátě zbarvení [170].

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μl 96% ethanolu, 50 μl vhodně zředěného extraktu a 50 μl roztoku DPPH (400 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ DPPH v 96% ethanolu). Roztok byl připravován vždy čerstvý a byl chráněn před světlem. Do slepého vzorku bylo pipetováno 150 μl 96% ethanolu a 50 μl destilované vody. Do referenčního vzorku bylo pipetováno 150 μl 96% ethanolu a 50 μl roztoku DPPH. Byla měřena absorbance při 517 nm, byl pozorován úbytek absorbance vzorků vůči slepému pokusu.

Kalibrace metody byla prováděna náhradou extraktů vzorku troloxem v 50% ethanolu v koncentračním rozsahu 20 – 150 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Obr. 20, str. 45).



Obrázek 20: Závislost absorbance radikálu DPPH na jeho eliminaci troloxem; Kalibrační křivka: $A = 0,0135 c(\text{trolox}) [\mu\text{mol.l}^{-1}]$; $R^2 = 0,998$

3.11. Aktivita antioxidačních enzymů

Aktivita byla stanovena dle změny absorbance způsobené změnou koncentrace jednoho z členů reakce. Aktivita byla přepočítána pomocí tabulovaných hodnot molárních extinkčních koeficientů měřených látek.

3.11.1. Aktivita glutathionreduktasy (GR)

Reakce byla měřená v kyvetě o šířce 10,0 mm a probíhala po dobu 3 minut. Byl měřen úbytek NADPH při 340 nm ($\epsilon_{[340]}(\text{NADPH}) = 6\,220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Reakční roztok obsahoval 100mM pufr Tris-HCl o pH 8,0; 1mM EDTA; 1,3mM GSSG (disodná sůl oxidované formy glutationu); 0,1mM NADPH; 100 μl extraktu ve 3 ml reakčního roztoku. Aktivita byla vyjádřena mikromoly přeměněného NADPH za 1 minutu na gram čerstvé hmotnosti listů.

3.11.2. Aktivita katalasy (CAT)

Do křemenné kyvety o šířce 10,0 mm byly pipetovány složky reakce o celkovém objemu 3 ml. Reakční roztok byl promíchán a byl měřen úbytek absorbance peroxidu vodíku během 60 s při vlnové délce 240 nm ($\epsilon_{[240]}(\text{H}_2\text{O}_2) = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Reakční roztok obsahoval 50mM fosfátový pufr pH 7,0; 20mM H_2O_2 , 100 μl vzorku. Aktivita byla vyjádřena mikromoly přeměněného H_2O_2 za 1 minutu na gram čerstvé hmotnosti listů.

3.11.3. Aktivita askorbátperoxidasy (APOD)

Do křemenné kyvety o šířce 10,0 mm byly pipetovány složky reakce o celkovém objemu 3 ml. Po dobu 3 min byl měřen úbytek redukovaného askorbátu při 298 nm ($\epsilon_{[290]}$ (redukovaný askorbát) = 2 800 M⁻¹.cm⁻¹).

Kvůli velké nestabilitě enzymu byla aktivita měřena vždy 10 minut po extrakci.

Reakční roztok obsahoval 80mM pufr HEPES-KOH pH 7,0; 80μM EDTA; 3mM askorbát sodný, který byl připravován vždy čerstvý před přidáním do reakční směsi; 100 μl extraktu; 0,7mM H₂O₂, jehož přidávkem započala reakce. Aktivita byla vyjádřena mikromoly přeměněného redukovaného askorbátu za 1 minutu na gram čerstvé hmotnosti listů.

3.11.4. Aktivita peroxidasy

Aktivita peroxidasy byla zjišťována pomocí elektroforetické separace za nativních podmínek a následné detekce činidlem. Sloučenina 3,3'-diaminobenzidin (DAB) slouží jako donor vodíku při peroxidasové aktivitě a umožňuje vizualizaci aktivity enzymu prostřednictvím vzniku tmavě hnědého precipitátu DAB. Může však docházet i interferenci s H₂O₂, kterému také může předat vodík a vzniká tím nechtěné pozadí reakce [171].

Činidlo obsahovalo 1 mg.ml⁻¹ DAB, který byl rozpouštěn v ethanolu (10 mg v 2,5 ml 96% ethanolu); 25% (v/v) ethanol; 0,074M fosfátový pufr (pH 7,0); 0,3% H₂O₂.

Činidlo bylo připraveno těsně před použitím a bylo uchováváno ve tmě.

Gel byl ponechán v detekčním činidle 3 hodiny. Poté, i přes špatně viditelné pruhy, byl gel opláchnut dH₂O, aby nedošlo ke zbarvení pozadí. Gel byl ponechán do druhého dne v dH₂O, během této doby došlo ke zlepšení viditelnosti pruhů.

3.11.5. Aktivita superoxiddismutasy

Izoenzymy superoxiddismutasy byly separované pomocí elektroforetické separace za nativních podmínek. Gel byl 20 min inkubován v reakční směs (1,5mM EDTA, 70mM KH₂PO₄, 6mM riboflavin, 0,47% (v/v) TEMED, 0,3% (w/v) NBT) při laboratorní teplotě bez přístupu světla.

Gel byl promyt dH₂O. Poté byl převrstven tenkou vrstvičkou dH₂O a byl na 15 min umístěn pod zářivku (9 W). V místě, kde neproběhla reakce s SOD, došlo k fotoreakci NBT za vzniku nerozpustného modrého formazanu.

3.11.6. Inhibice izoenzymů superoxiddismutasy

Při inhibici izoenzymů superoxiddismutasy byl gel vložen do inhibičního roztoku na 30 min bez přístupu světla při laboratorní teplotě. Poté byl gel omyt dH₂O a byl vložen do reakční směsi na 20 min a následoval postup z předchozí kapitoly bez inhibic.

H₂O₂ inhibuje Fe-SOD a inaktivuje Cu/Zn-SOD. Inhibiční roztok obsahoval 1mM EDTA, 50mM KH₂PO₄, 5mM H₂O₂. KCN inhibuje Cu/Zn-SOD. Inhibiční roztok obsahoval 1 mM EDTA, 50 mM KH₂PO₄, 2 mM KCN. Mn-SOD není inhibováno ani jednou z inhibičních molekul.

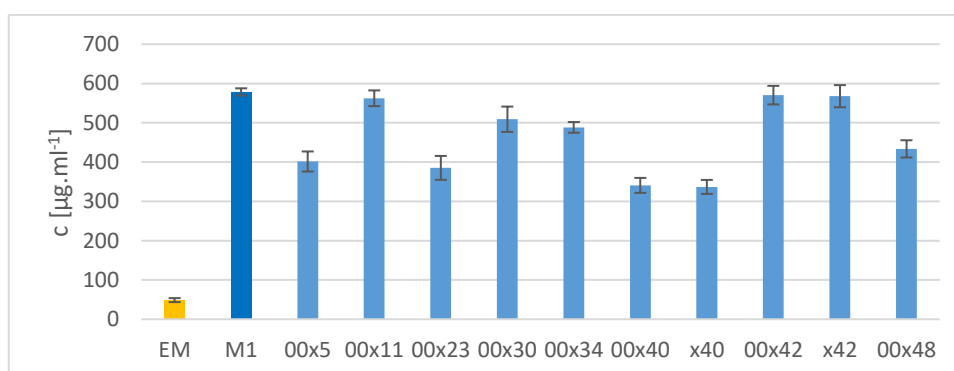
4. Výsledky

4.1. Charakterizace izolátů oomycety *Pythium oligandrum*

V první části diplomové práce jsem se zabývala charakterizací 10 izolátů oomycety *P.o.*, které jsem porovnávala s izolátem M1, který je již komerčně využíván v ochraně rostlin. Zabývala jsem se především látkami sekretovanými do média, proto také samotné medium sloužilo jako kontrola.

4.1.1. Proteiny sekretované *Pythium oligandrum* do media

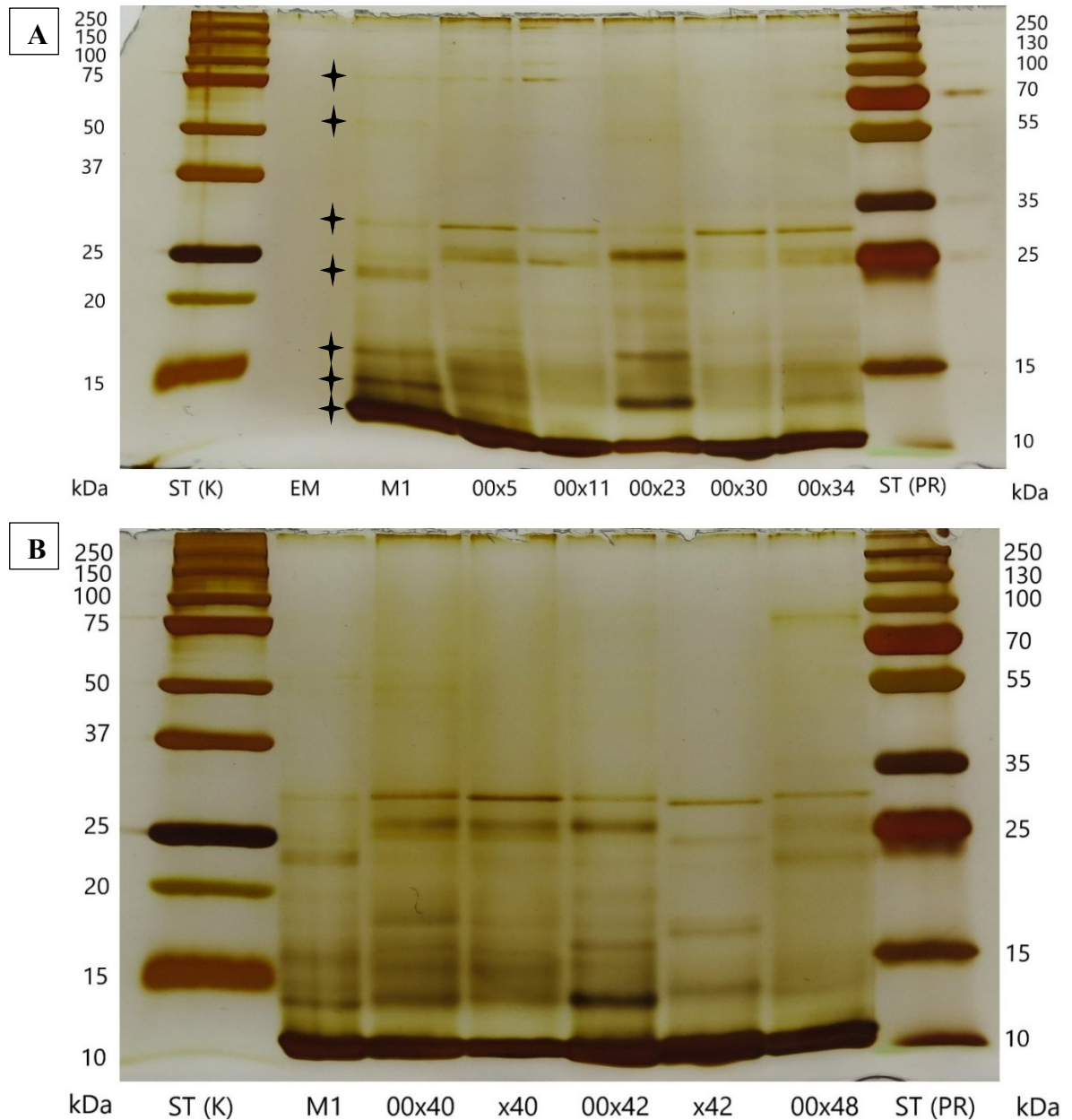
U jednotlivých izolátů oomycety *P.o.* byl měřen obsah proteinů, které byly sekretovány oomycetou *P.o.* do media. Z obrázku 21 je patrné, že nejvyšší obsah proteinů byl zjištěn v izolátech M1, 00x11, 00x42 a x42. V samotném médiu byly rovněž proteiny, ale v podstatně nižší koncentraci než v přítomnosti všech izolátů *P.o.*



Obrázek 21: Celková koncentrace proteinů sekretovaných izoláty *P.o.* do média

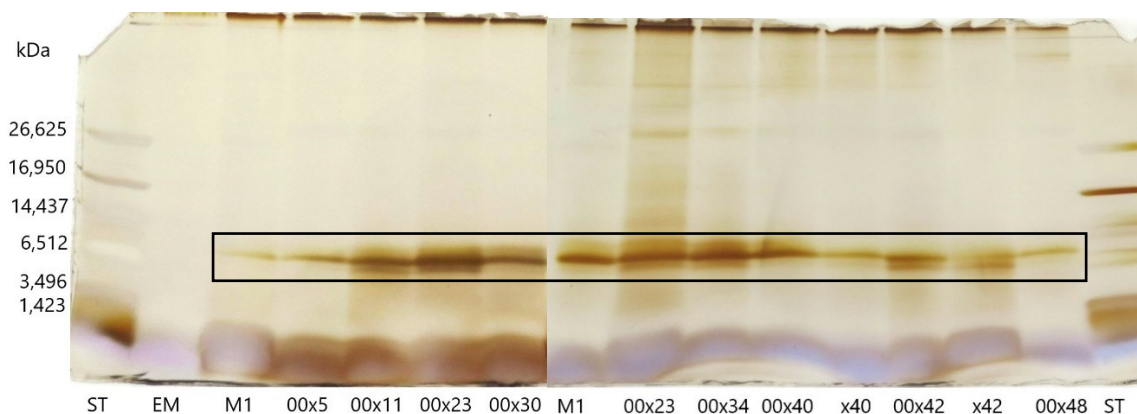
Zastoupení sekretovaných proteinů bylo sledováno elektroforézou v prostředí SDS (Obr. 22, str. 49). V každém izolátu je vidět relativně silný pruh odpovídající nízké relativní

molekulové hmotnosti. Na obrázku 22-A byla relativní molekulová hmotnost pruhů označených hvězdičkou stanovena na 84 kDa, 55 kDa, 29 kDa, 23 kDa, 16 kDa, 14 kDa a 10 kDa. Intenzita jednotlivých pruhů se mezi izoláty různí ale jejich poloha zůstává stejná (Obr. 22-A, B). Výjimkou je izolát x42 (Obr. 22-B), u něhož došlo ke zdatelnému posunu umístění pruhů proti ostatním izolátům *P.o.*



Obrázek 22: Elektroforetická separace sekretovaných proteinů izoláty oomycety *P.o.* v 15% gelu v prostředí SDS; Do jamek bylo aplikováno 3,5 μg proteinů; Použité standardy: K - Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard (BioRad) a PR - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo)

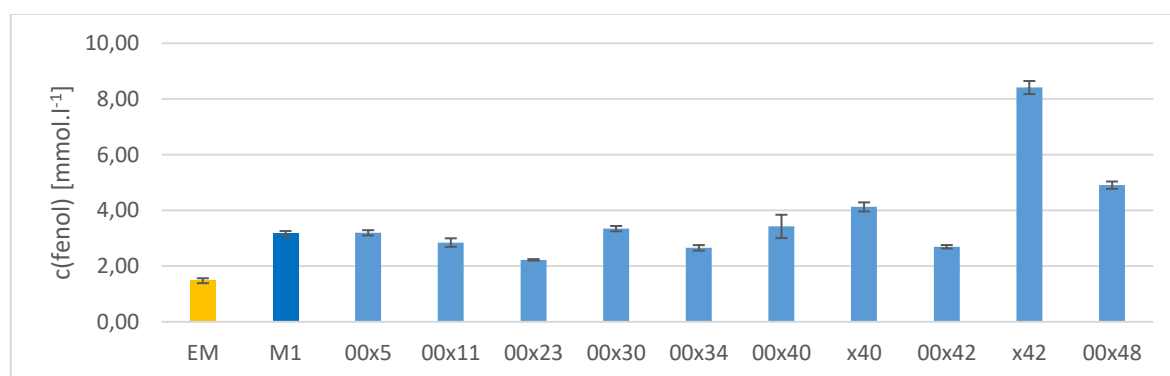
Abychom byly schopni rozlišit oblast proteinů o nízké relativní molekulové hmotnosti byla použita elektroforetická separace v prostředí tricinu a SDS (Obr. 23). V oblasti okolo 10 kDa jsem hledala protein oligandrin, tuto oblast jsem označila rámečkem. Ve vyznačeném rámečku nejvíce patrný pruh přítomný ve všech izolátech *P.o.* má 8,5 kDa, nad ním je u některých izolátů vidět pruh s 10,5 kDa, a pod ním je u některých izolátů vidět pruh s 7,3 kDa. Na konci gelu můžeme u všech izolátů pozorovat silný široký pruh odpovídající peptidům.



Obrázek 23: Elektroforetická separace proteinů sekretovaných izoláty oomycety *P.o.* v prostředí tricinu a SDS; Do každé dráhy bylo aplikováno 7,5 μg proteinů; Použitý standard: Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (BioRad)

4.1.2. Fenolické látky sekretované *Pythium oligandrum* do media

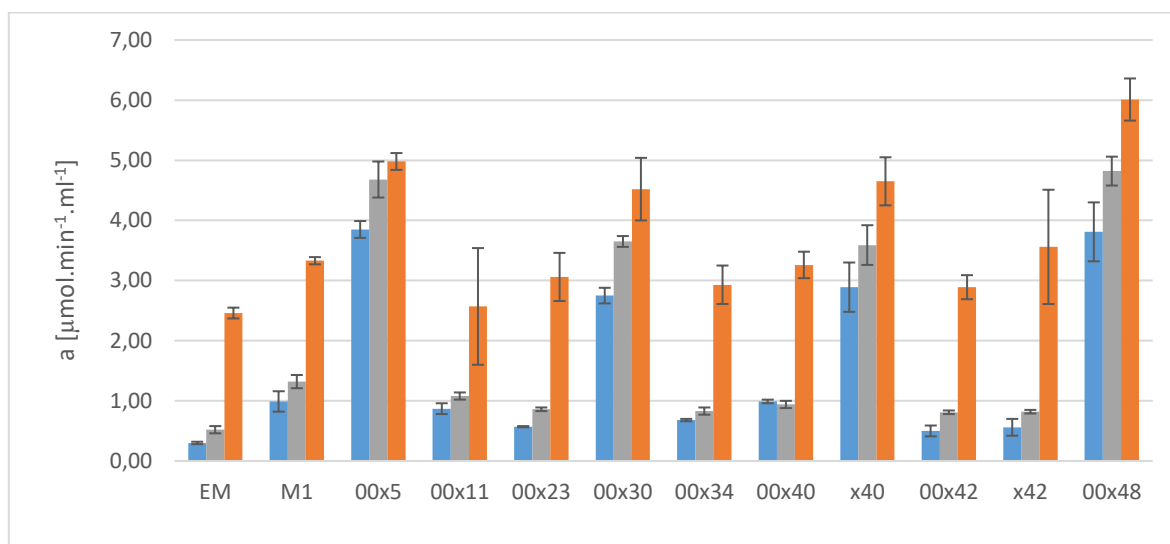
Bylo testováno, zda oomyceta *P.o.* syntetizuje, a tedy sekretuje do média fenolické látky. Množství těchto látek v médiu bylo sledováno Folin-Ciocalteuovo metodou (Obr. 24). Z grafu je patrné, že největší množství fenolických látek bylo naměřeno u izolátu x42. V samotném extrakční médiu bylo zjištěno nezanedbatelné množství fenolických látek.



Obrázek 24: Stanovení celkové koncentrace fenolických látek sekretovaných oomycetou *P.o.* do media pomocí Folin-Ciocalteuovo činidla

4.1.3. Aktivita glykosidas sekretovaných oomycetou *Pythium oligandrum* do media

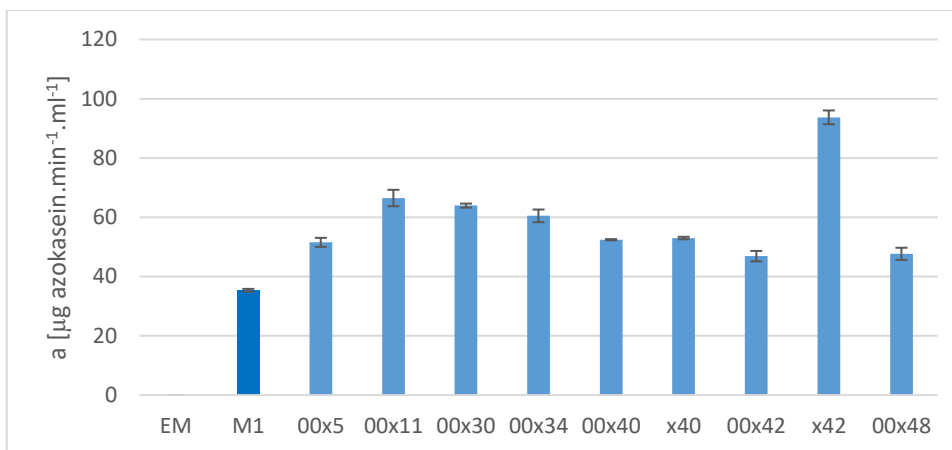
Oomycety obecně jsou známy schopností sekretovat glykosidasy, které mohou štěpit buněčné stěny svých hostitelů [124]. Proto byla testována aktivita chitinasy, endo- β -1,3-glukanasy a celulasy jednotlivých izolátů za použití substrátů chitinu, laminarinu a methylcelulosity (Obr. 25). V samotném médiu byly zaznamenány aktivity glykosidas, přičemž nejvyšší byla aktivita endo- β -1,3-glukanasy. Médium silně ovlivnilo celkovou aktivitu endo- β -1,3-glukanasy. Nejvyšší aktivita endo- β -1,3-glukanasy byla stanovena u izolátu 00x48, její aktivita byla o 80 % vyšší než u M1. Nejvyšší aktivita celulas byla stanovena u izolátů 00x5 a 00x48, jejich aktivita byla oproti M1 3,9 a 3,8 násobně větší. Nejvyšší aktivita chitinas byla naměřena u izolátů 00x5 a 00x48, u kterých aktivita vzrostla oproti M1 o 3,5 a 3,7 násobek.



Obrázek 25: Aktivita ■ celulasy, ■ chitinasy a ■ endo- β -1,3-glukanasy sekretovaných izoláty *P.o.* do media

4.1.4. Aktivita proteas sekretovaných oomycetou *Pythium oligandrum* do media

Aktivita proteas byla měřena za použití substrátu azokaseinu (Obr. 26, str. 52). V kultivačním medium nebyla detekována žádná aktivita proteas. Nejvyšší aktivita proteas byla zjištěna u izolátu x42, zatímco u komerčního izolátu M1 byla aktivita proteas nejnižší. Aktivita proteas v izolátu x42 byla 2,6krát větší než u M1.



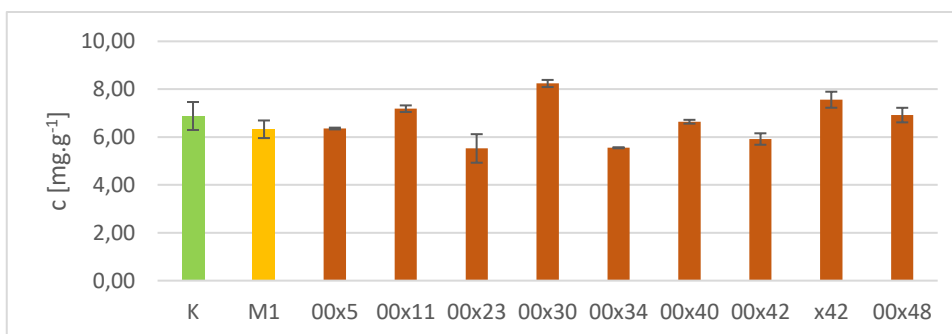
Obrázek 26: Aktivita proteas sekretovaných izoláty *P.o.* do media

4.2. Charakterizace rostlin řepky ošetřených izoláty *Pythium oligandrum*

V třítydenních rostlinách řepky byly měřeny stejné charakteristiky jako u samotných izolátů *P.o.*, abychom zjistili, zda byl metabolismus rostlin řepky přímo ovlivněn. Navíc byly sledovány také antioxidační vlastnosti a aktivita antioxidačních enzymů, které souvisí s obrannými reakcemi rostlin. Měření byla porovnávána s kontrolními rostlinami řepky, které nebyly ošetřeny *P.o.*

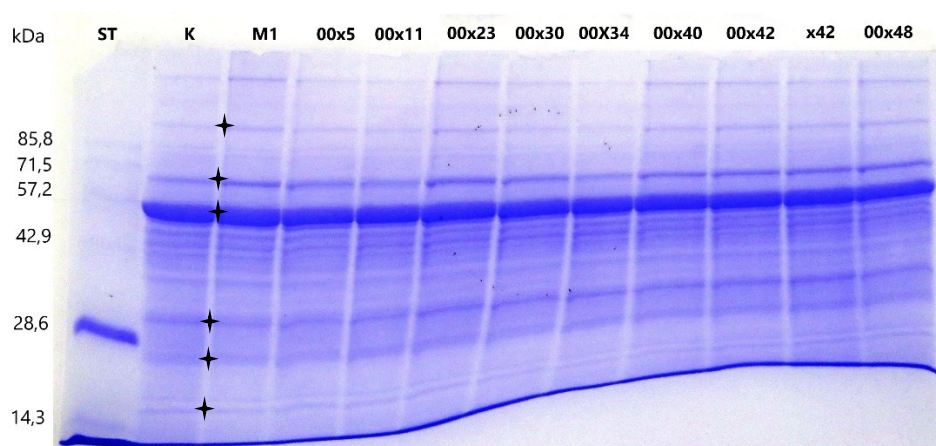
4.2.1. Obsah proteinů rostlin řepky ošetřených izoláty *Pythium oligandrum*

Byl změřen obsah rozpustných proteinů v rostlinách řepky ošetřených izoláty *P.o.* (Obr. 27). Většina izolátů *P.o.* způsobila snížený obsah rozpustných proteinů v rostlině. Mírně zvýšený obsah proteinů vůči kontrolním rostlinám o 20 % a 10 % byl zjištěn u rostlin ošetřených izoláty 00x30 a x42.



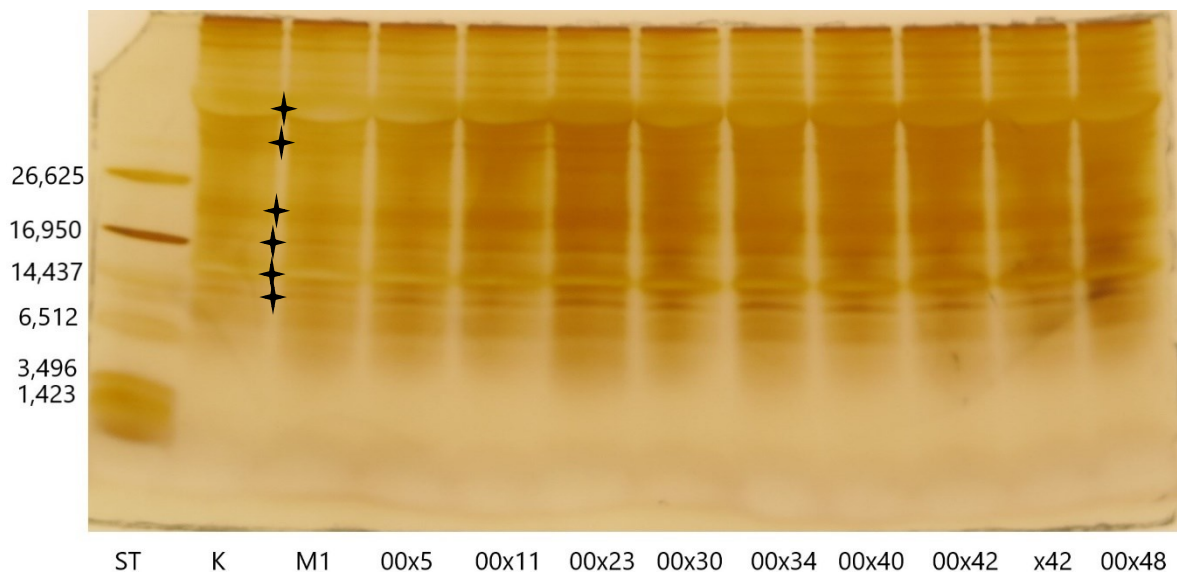
Obrázek 27: Obsah rozpustných proteinů v rostlinách řepky ošetřených izoláty *P.o.* vztahovaný na 1 g čerstvé hmotnosti listu

Elektroforetická separace extraktů v prostředí SDS ukázala, že poměrná zastoupení rozpustných proteinů v jednotlivých rostlinách se příliš nelišila (Obr. 28). Pruhům označeným hvězdičkou byly sestupně stanoveny hodnoty 96 kDa, 66 kDa, 55-50 kDa (široký pruh), 30 kDa, 24 kDa a 17 kDa. Malé proteiny vytvořily silný pruh na konci gelu.



Obrázek 28: Elektroforetická separace rozpustných proteinů v rostlinách řepky ošetřených izoláty P.o. v 15% gelu v prostředí SDS; Do každé dráhy bylo nanášeno 40 µg proteinů; Použitý standard: lysozym (14,3 kDa) a jeho oligomery

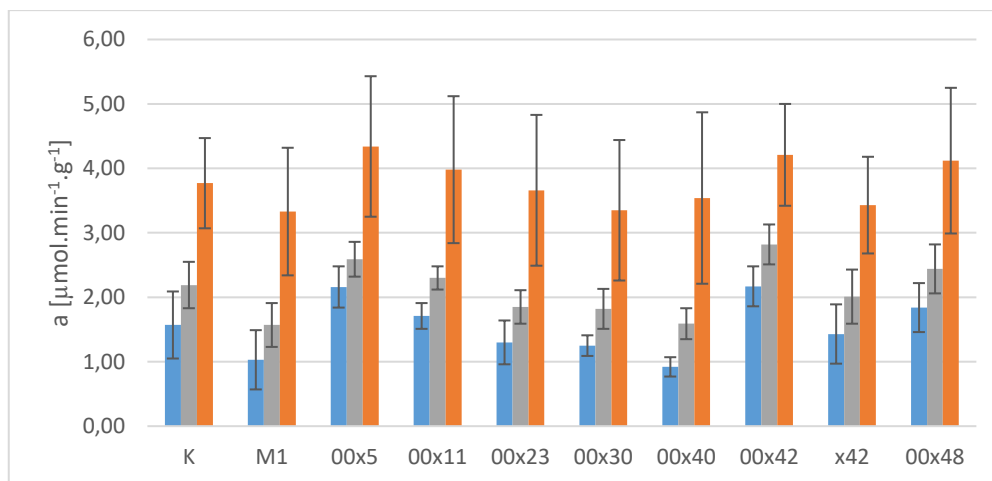
Rozpustné proteiny s nižší relativní molekulovou hmotností byly sledovány pomocí elektroforézy v prostředí tricinu a SDS (Obr. 29, str. 54). Pruhům označeným hvězdičkou byly stanoveny relativní molekulové hmotnosti. Pruhy sestupně mají 41 kDa, 33 kDa, 22 kDa, 18 kDa, 14 kDa, 11 kDa. V oblasti okolo 10 kDa, kde jsem předpokládala přítomnost oligandrinu nebyl vidět žádný pruh, který by se nenacházel i mezi rozpustnými proteiny kontrolních rostlin. Proteiny o vyšší molekulové hmotnosti tvoří výrazný pruh na začátku separačního gelu.



Obrázek 29: Elektroforetická separace rozpustných proteinů rostlin řepky ošetřených oomycetou *P.o.* v prostředí tricinu a SDS; Do každé dráhy bylo aplikováno 40 μ g proteinů; Použitý standard: Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (BioRad)

4.2.2. Aktivita glykosidas v rostlinách řepky ošetřených oomycetou *Pythium oligandrum*

Bylo testováno, zda aktivita glykosidas byla ovlivněna ošetřením rostliny pomocí oomycety *P.o.* V extraktech rostlin byla měřena aktivita chitinasy, endo- β -1,3-glukanasy a celulasy za využití substrátů chitinu, laminarinu a methylcelulosity (Obr. 30, str. 55). U rostlin ošetřených komerčním izolátem M1 byla aktivita celulasy, chitinasy a endo- β -1,3-glukanasy mírně snížena vůči kontrolním rostlinám o 35 %, 28 % a 12 %. Mírně nižší aktivita glykosidas byla například také naměřena u rostlin ošetřených izolátem 00x40, kde aktivita celulasy klesla o 40 %, aktivita chitinasy klesla o 27 %. U žádného ze vzorků nedošlo ani k příliš velkému nárůstu aktivity glykosidas, přičemž největší nárůst aktivity celulasy o 38 % a chitinasy o 29 % byl stanoven u rostlin ošetřených izolátem 00x42. Aktivita endo- β -1,3-glukanasy se při ošetření různými izoláty příliš nelišila. Nejvíce aktivní enzym byla endo- β -1,3-glukanasa, zatímco celulasy byly aktivní nejméně.



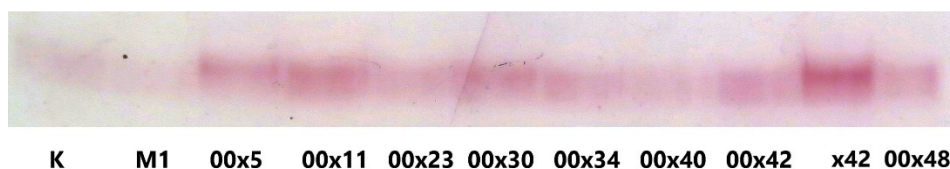
Obrázek 30: Aktivita ■ celulasy, ■ chitinasy a ■ endo-β-1,3-glukanasy v extraktech rostlin řepky ošetřených oomycetou *P.o.* vztážená na 1 g čerstvé hmotnosti listů

4.2.3. Proteolytická aktivita v rostlinách řepky ošetřených *Pythium oligandrum*

Používanou metodou nebylo možné zachytit aktivitu proteas. Bylo by nutné použít citlivější metody.

4.2.4. Aktivita dehydrogenas rostlin řepky ošetřených izoláty *Pythium oligandrum*

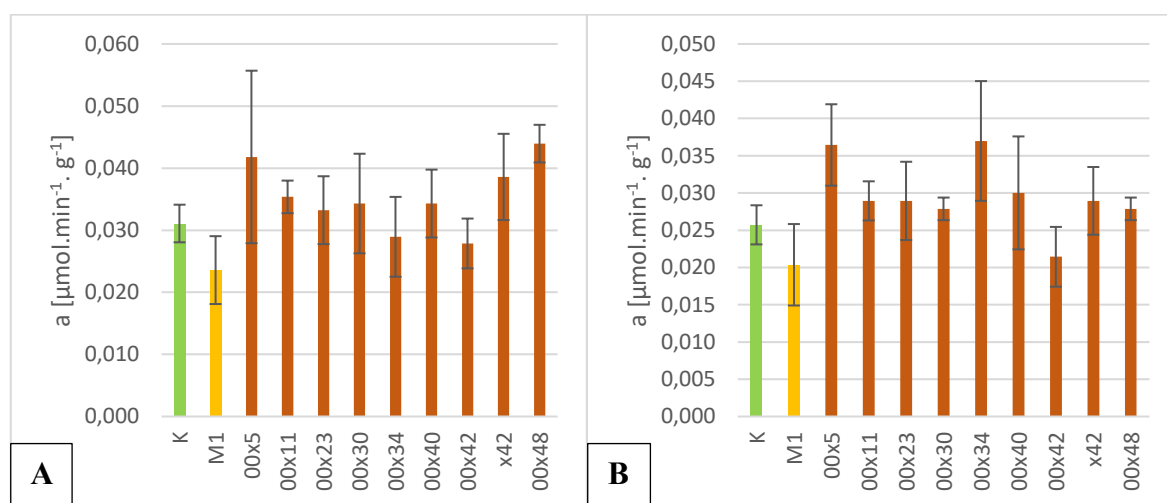
Byly měřeny aktivity některých dehydrogenas v extraktech rostlin řepky ošetřených izoláty *P.o.*, které používají jako koenzym NADP. Aktivita šikimátdehydrogenasy (SDH), která je enzymem šikimátové dráhy vedoucí k tvorbě fenylalaninu [172], byla po elektroforetické separaci v nativním prostředí následně detekována přímo v gelu na základě vznikající NADPH (Obr. 31). U rostlin ošetřených komerčním izolátem M1 byla aktivita SDH srovnatelná s kontrolními rostlinami, zatímco ostatní izoláty vykazovaly vyšší aktivitu SDH. Nejvyšší aktivita SDH byla naměřena u rostlin ošetřených izolátem x42.



Obrázek 31: Elektroforetická separace SDH v 10% gelu za nativních podmínek a následného barvení citlivé na vznik NADPH během enzymové reakce

Dále byla měřena aktivita malátdehydrogenasy dekarboxylační (NADP-ME), která katalyzuje přeměnu malátu na pyruvát za vzniku NADPH [173] a aktivita glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (G6PDH), která je klíčovým enzymem pentosového cyklu, jehož

aktivitu provází vznik NADPH [174]. Při měření aktivity dehydrogenas byl sledován vznik NADPH při 340 nm. Aktivita NADP-ME v rostlinách ošetřených M1 byla nižší než v kontrolních rostlinách o 23 %. Nejvyšší aktivita NADP-ME byla naměřena v rostlinách ošetřených izoláty 00x5, x42 a 00x48, která byla o 35 %, 26 % a 42 % vyšší než v kontrolních rostlinách (Obr. 32 A). Aktivita G6PDH byla u rostlin ošetřených M1 o 23 %, 00x42 o 19 % nižší než v kontrolních rostlinách. Nejvyšší aktivity G6PDH byly naměřeny u rostlin ošetřených izoláty 00x5 a 00x34, která byla o 38 % a 42 % vyšší než v kontrolních rostlinách (Obr. 32 B).



Obrázek 32: Aktivita dehydrogenas měřená na základě vznikající NADPH vztahena na 1 g čerstvé hmotnosti listů; Na obrázku A) je aktivita NADP-ME a na obrázku B) je aktivita G6PDH.

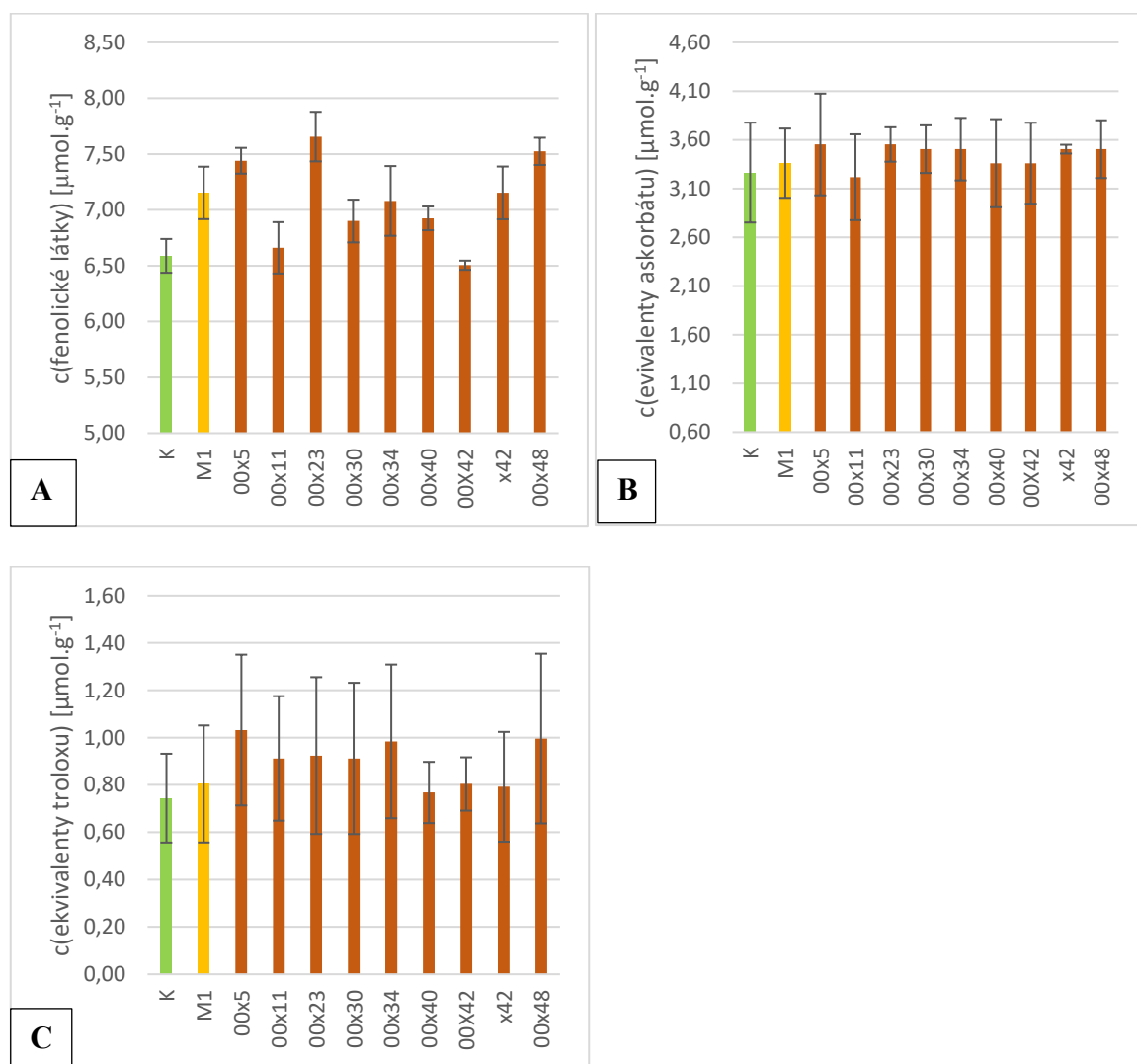
4.2.5. Obsah fenolických látek a antioxidační vlastnosti rostlin řepky

Infekce patogenem, ale i přítomnost oomycety *P.o.* v rostlinách působí aktivaci fenylpropanoidní a terpenoidní dráhy [99]. Proto bylo v extraktech rostlin řepky stanovené množství fenolických látek a také antioxidační kapacita.

Celkové množství extrahovaných fenolických látek bylo měřeno pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Zvýšené množství fenolických látek oproti jejich množství v kontrolních rostlinách bylo naměřeno ve všech extraktech rostlin ošetřených *P.o.* kromě rostlin ošetřených izoláty 00x11 a 00x42. U rostlin ošetřených M1 došlo pouze k nárůstu koncentrace vůči kontrolním rostlinám o 8 %, nejvíce fenolických látek bylo naměřeno u rostlin ošetřených izolátem 00x23 s nárůstem koncentrace vůči kontrolním rostlinám o 16 % (Obr. 33 A, str. 57).

Metodou FRAP byla změřena antioxidační kapacita extraktů prostřednictvím jejich schopnosti redukovat železité ionty (Obr. 33 B, str. 57).

Metodou DPPH byla změřena schopnost extraktů rostlin redukovat syntetické radikály DPPH na DPPH-H (Obr. 33 C). Extrakty rostlin řepky ošetřených izoláty M1, 00x40, 00x42 a x42 se příliš nelišily od kontrolních rostlin. Ostatní izoláty způsobily mírně zvýšenou kapacitu rostlin v eliminaci radikálů, přičemž největší kapacita byla u rostlin řepky ošetřených izolátem 00x5 s nárůstem kapacity o 39 % vůči kontrolním rostlinám.

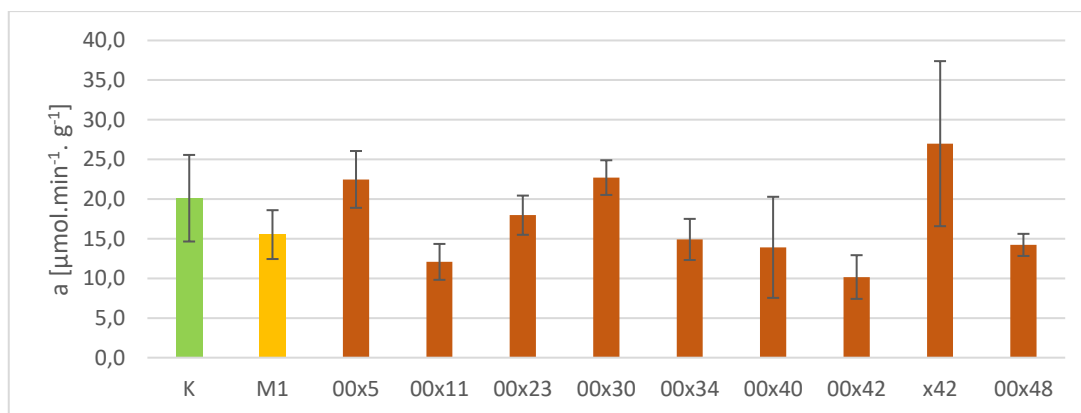


Obrázek 33: Obsah fenolických látek (A), antioxidační kapacita stanovená metodou FRAP - koncentrace odpovídá molárním ekvivalentům askorbátu (B), schopnost eliminovat radikály stanovená metodou DPPH - koncentrace odpovídá molárním ekvivalentům troloxu (C) - v extraktech řepky ošetřené izoláty *P.o.* vztažené na 1 g čerstvé hmotnosti listů

4.2.6. Aktivita antioxidačních enzymů v rostlinách řepky ošetřené oomycetou *Pythium oligandrum*.

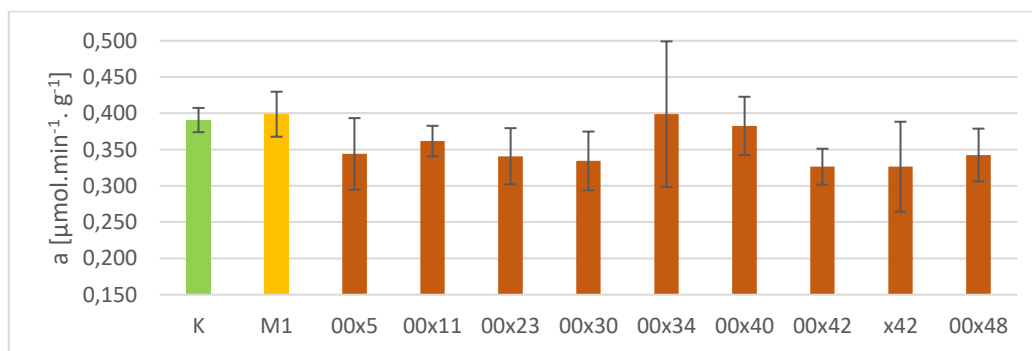
Antioxidační systém hraje důležitou roli v udržení homeostázy [175].

Jedním z těchto enzymů je katalasa, která katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Ve většině extraktů rostlin ošetřených *P.o.* včetně M1 izolátu došlo k snížené aktivitě katalasy kromě rostlin, které byly ošetřené izoláty 00x5, 00x30 a x42 (Obr. 34).



Obrázek 34: Aktivita katalasy v extraktech rostlin řepky ošetřených *P.o.* vztahovaná na 1 g čerstvé hmotnosti listů

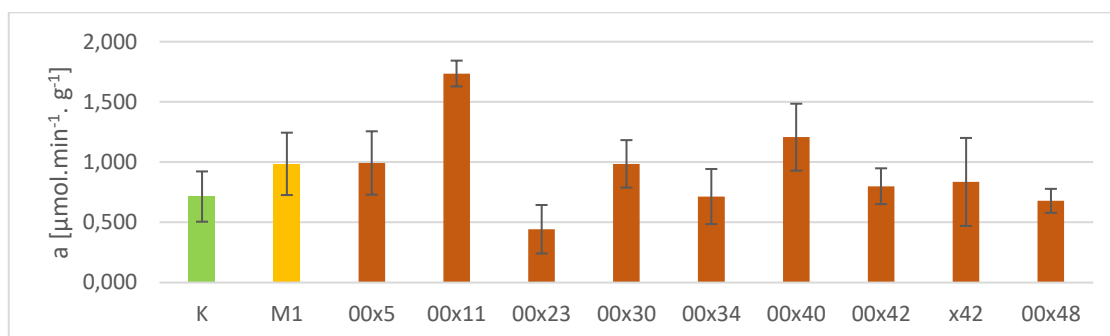
Dále byla měřena aktivita enzymu glutathionreduktasy GR, jejíž hlavní funkcí je NADPH-dependentní redukce oxidované formy glutathionu (GSSG) [176]. V extraktech rostlin ošetřených izoláty *P.o.* M1 a 00x34 došlo pouze k mírnému navýšení aktivity GR oproti kontrolním rostlinám (Obr. 35). Ostatní izoláty způsobily sníženou aktivitu GR v rostlinách. K největšímu poklesu aktivity GR vůči kontrolním rostlinám došlo u izolátů 00x42 a x42 o 17 %.



Obrázek 35: Aktivita GR v extraktech řepky ošetřených izoláty *P.o.* vztahovaná na 1 g čerstvé hmotnosti listů

Dále byla měřena aktivita askorbátperoxidasy (APOD). Ke snížení aktivity APOD vůči kontrolním rostlinám došlo pouze u rostlin ošetřených izolátem 00x23 o 40 % (Obr. 36, str. 59). K téměř trojnásobnému navýšení aktivity APOD vůči kontrolním rostlinám došlo u izolátu 00x11. Významný nárůst aktivity APOD byl naměřen u rostlin ošetřených izolátem

00x40 o 70 %. Nárůst aktivity APOD byl pozorován u rostlin ošetřených izoláty M1, 00x5 a 00x30 o 40 % a mírný nárůst aktivity APOD byl zaznamenán i u rostlin ošetřených 00x42 a x42 o 15 %. U izolátu 00x48 nebyla zaznamenána významná změna v aktivitě APOD vůči kontrolním rostlinám.

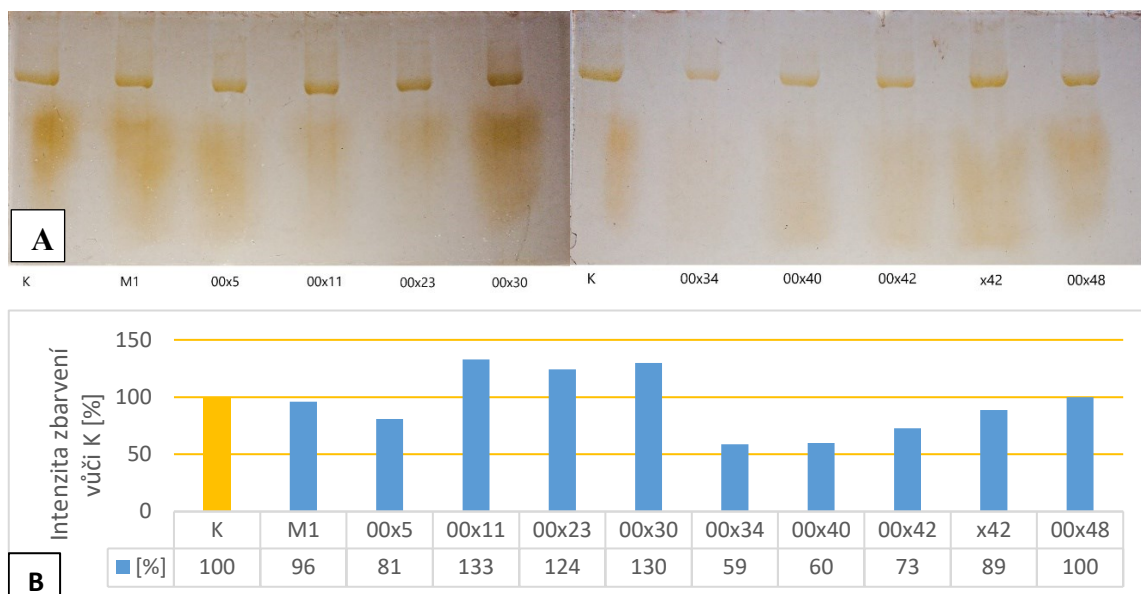


Obrázek 36: Aktivita APOD v extraktech rostlin řepky ošetřené *P.o.* vztážená na 1 g čerstvé hmotnosti listů

4.2.6.1. Aktivita peroxidas v rostlinách ošetřených oomycetou *Pythium oligandrum*

Peroxidasy redukují H_2O_2 prostřednictvím přeměny substrátů na oxidované formy za vniku vody [177]. Aktivita peroxidas byla pozorována pomocí elektroforetické separace za nativních podmínek a činidla DAB, které poskytuje peroxidasám vodík za vniku viditelné hnědé sraženiny (Obr. 37-A, str. 60). V každé dráze je vidět výrazný pruh a širší oblast, která by mohla odpovídat glykosylovaným peroxidasám.

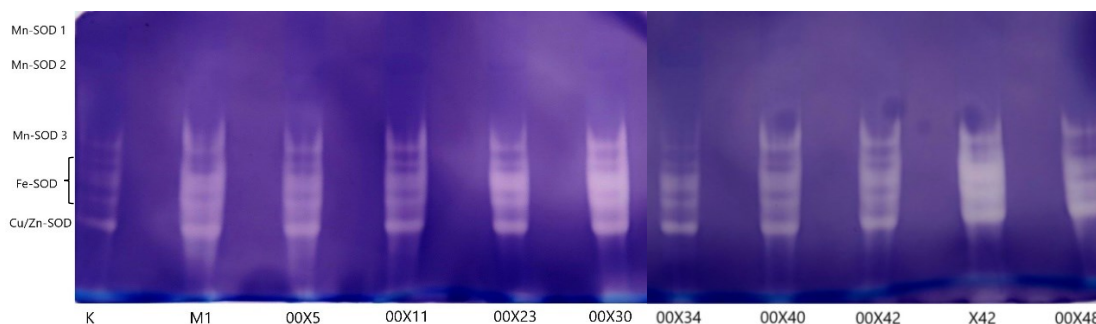
Prostřednictvím GelAnalyzeru byly měřeny pouze intenzity výrazného pruhu, kde intenzita pruhu kontrolních rostlin byla označena jako stoprocentní a intenzity ostatních pruhů se k ní vztahovaly poměrem (Obr. 37-B, str. 60). Vyšší aktivitu peroxidas vůči kontrolním rostlinám mají extrakty rostlin ošetřených izoláty 00x11, 00x23 a 00x30. Extrakty rostlin ošetřených izoláty M1 a 00x48 mají srovnatelnou aktivitu peroxidas s kontrolními rostlinami. Zbývající izoláty měly aktivitu peroxidas nižší než kontrolní rostliny.



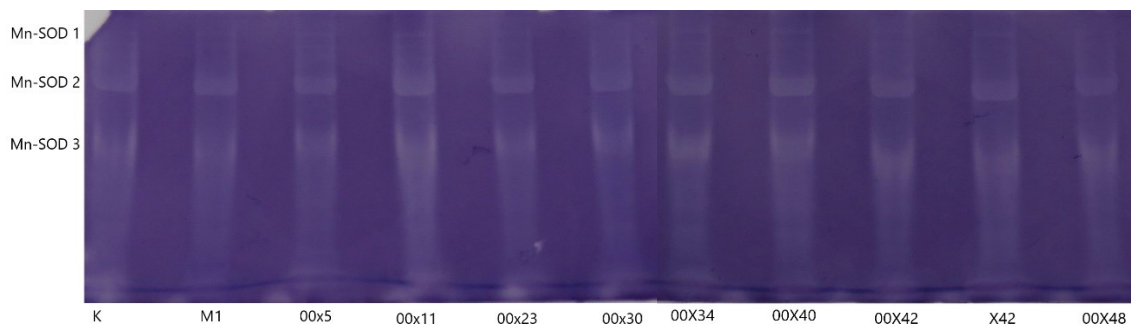
Obrázek 37: A) Elektroforetická separace peroxidas rostlin ošetřených P.o. v 8% gelu za nativních podmínek a následného využití detekčního činidla aktivity peroxidas DAB. B) Vyhodnocení intenzity výrazného pruhu ve všech drahách vztahené k intenzitě pruhu aktivity peroxidas v extraktu kontrolních rostlin (K).

4.2.6.2. Aktivita superoxididismutasy

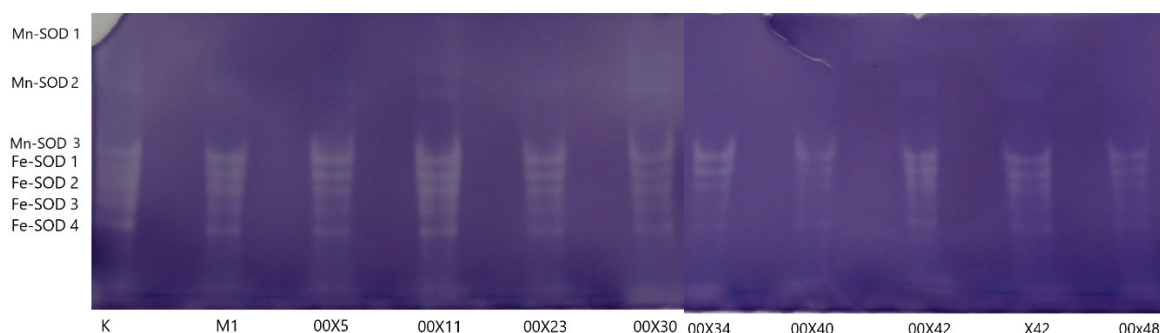
Superoxididismutasa (SOD) katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku a kyslík. Pomocí elektroforetické separace za nativních podmínek byly rozděleny SOD na izoenzymy a jejich aktivita byla detekována pomocí negativního barvení (Obr. 38). Pomocí H_2O_2 byly inhibovány izoenzymy Fe-SOD a Cu/Zn SOD a zůstal aktivní pouze izoenzym Mn-SOD (Obr. 39, str. 61). Pomocí KCN byl inhibován enzym Cu/Zn-SOD a zůstaly aktivní enzymy Mn-SOD a Fe-SOD (Obr. 40, str. 61). Všechny extrakty rostlin ošetřených izoláty P.o. vykazovaly zvýšenou aktivitu SOD vůči kontrolním rostlinám. Nejintenzivnější pruhy byly u izolátů 00x30 a x42 (Obr. 38).



Obrázek 38: Elektroforetická separace extraktů rostlin řepky ošetřených P.o. v 8% gelu za nativních podmínek a detekce aktivity SOD; Po straně jsou označeny izoenzymy stanovené na základě inhibice (viz obr. 39 a 40)



Obrázek 39: Elektroforetická separace extraktů rostlin řepky ošetřených *P.o.* v 8% gelu za nativních podmínek a detekce aktivity izoenzymů Mn-SOD; Zobrazené Mn-SOD izoenzymy nejsou inhibovány H_2O_2 . H_2O_2 inhibuje izoenzymy Fe-SOD a Cu/Zn-SOD.



Obrázek 40: Elektroforetická separace extraktů rostlin řepky ošetřených *P.o.* v 8% gelu za nativních podmínek detekce aktivity izoenzymů Mn-SOD a Fe-SOD, které nejsou inhibovány KCN. KCN inhibuje pouze Cu/Zn-SOD izoenzym.

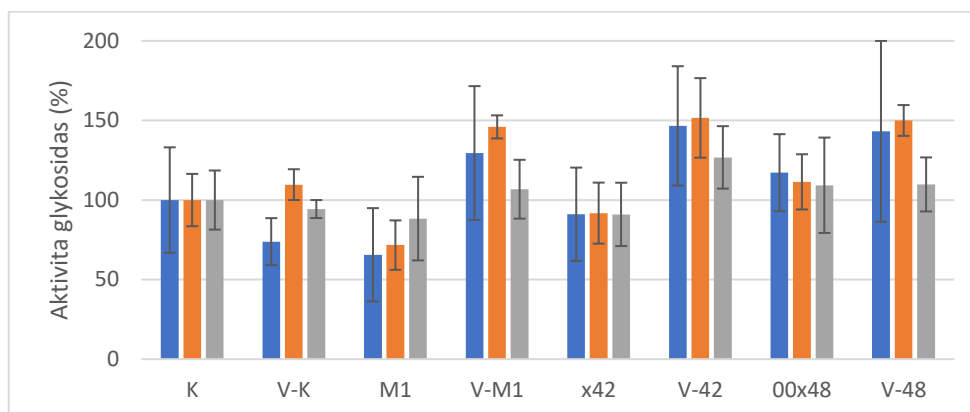
4.3. Charakterizace rostlin řepky ošetřených izoláty *Pythium oligandrum* a infikovaných patogenem *Verticillium longisporum*

Na základě zjištěných vlastností izolátů a jejich vztahu k rostlině řepky byly vybrány dva izoláty x42 a 00x48, které byly nadále porovnávány s komerčním izolátem M1. Rostliny ošetřené oomycetou *P.o.* byly vystaveny patogenu *Verticillium longisporum* (V-M1, V-42, V-48). Jako kontrola sloužily rostliny neošetřené *P.o.* bez přítomnosti patogenu (K) a za přítomnosti patogenu *Verticillium longisporum* (V-K). Byly měřeny stejné charakteristiky jako u rostlin ošetřených *P.o.*

4.3.1. Aktivita glykosidas rostlin řepky ošetřených izoláty *Pythium oligandrum* a infikovaných *Verticillium longisporum*

Při porovnání aktivity glykosidas měl největší aktivitu enzym endo- β -1,3-glukanasa, enzym chitinasa měl aktivitu menší a nejmenší aktivitu měla celulasa (Obr. 41, str. 62). Aktivita

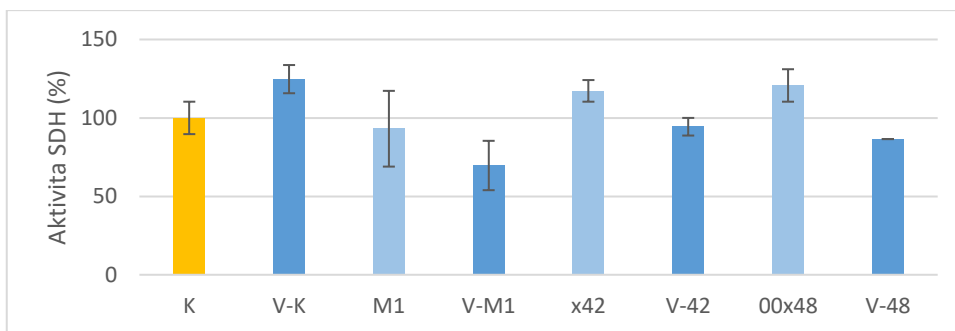
glykosidas naměřená v extraktech rostlin V-K byla nižší než u rostlin K stejně jako u rostlin pouze ošetřených izoláty *P.o.* To neplatilo pro chitinasy v rostlinách V-K, jejichž aktivita byla vyšší. Aktivita glykosidas v extraktech rostlin ošetřených izoláty *P.o.* a infikovaných patogenem vůči kontrolním rostlinám rostla v pořadí izolátů V-M1, V-48 a V-42, přičemž nárůst aktivity endo- β -1,3-glukanasy nebyl tak velký jako u celulasy a chitinasy.



Obrázek 41: Aktivita ■ celulasy, ■ chitinasy a ■ endo- β -1,3-glukanasy v extraktech rostlin ošetřených *P.o.* a rostlin ošetřených *P.o.* a infikovaných patogenem *Verticillium longisporum*; aktivita vyjádřená v procentech; aktivita glykosidas kontrolních rostlin vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti listů: ■ $a = 0,88 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, ■ $a = 1,24 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, ■ $a = 2,65 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$:

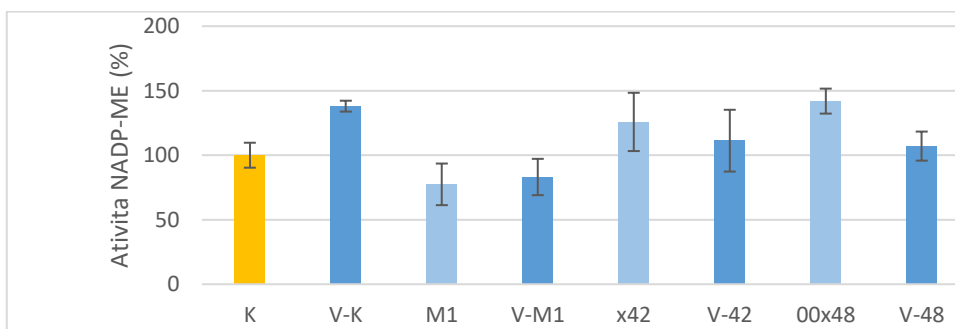
4.3.2. Aktivita dehydrogenas v extraktech rostlin řepky ošetřených izoláty *Pythium oligandrum* a infikovaných *Verticillium longisporum*

V extraktech rostlin řepky ošetřených *P.o.* a infikovaných *Verticillium longisporum* byla měřena aktivita SDH (Obr. 42, str. 63). V extraktech V-K byla aktivita zvýšená vůči kontrolním rostlinám o 25 %, k podobnému nárůstu aktivity SDH docházelo i u rostlin ošetřených pouze izoláty *P.o.* vyjma izolátu M1. Oproti tomu rostliny ošetřené *P.o.* a následně infikované *Verticillium longisporum* měly aktivitu SDH významně sniženou. V extraktu V-M1 byla významně snižená aktivita SDH vůči kontrolním rostlinám o 30 %. V extraktech V-42 a V-48 došlo k malému poklesu aktivity SDH o 6 % a 13 %.



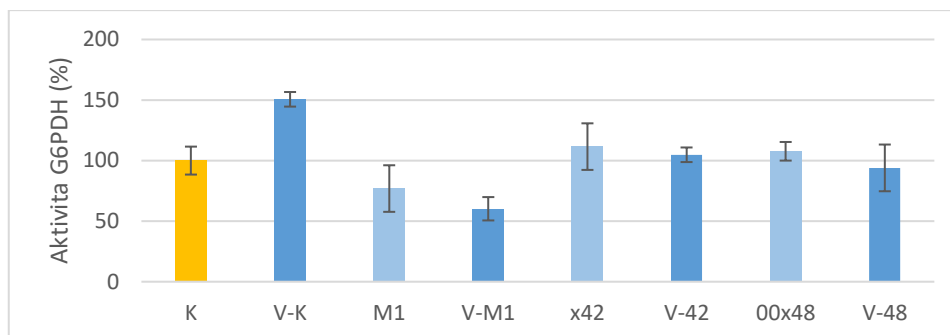
Obrázek 42: Aktivita SDH v extraktech rostlin ošetřených *P.o.* a rostlin ošetřených *P.o.* a infikovaných *Verticillium longisporum*; aktivita vyjádřená v procentech; aktivita SDH kontrolních rostlin vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti listů: $a = 0,089 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$

Dále byla měřena aktivita NADP-ME (Obr. 43). V rostlinách V-K byla oproti kontrolním rostlinám aktivita NADP-ME zvýšená o 38 %, podobně tomu bylo i u rostlin pouze ošetřených izoláty *P.o.* s výjimkou poklesu aktivitu u M1. V extraktech rostlin ošetřených *P.o.* a napadených *Verticillium longisporum* se aktivita NADP-ME více přiblížila kontrolním rostlinám.



Obrázek 43: Aktivita NADP-ME rostlin ošetřených *P.o.* a rostlin ošetřených *P.o.* a infikovaných *Verticillium longisporum*; aktivita vyjádřená v procentech; aktivita NADP-ME kontrolních rostlin vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti listů: $a = 0,071 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$

Dále byla měřena aktivita G6PDH (Obr. 44, str. 64). Při porovnání aktivity G6PDH v rostlinách ošetřených izoláty *P.o.* a rostlinách ošetřených *P.o.* infikovaných *Verticillium longisporum* nebyl pozorován významný rozdíl. Současně byly aktivity G6PDH blízké kontrolním rostlinám s výjimkou významného poklesu v aktivitě G6PDH u rostlin ošetřených M1. Pouze u rostlin infikovaných *Verticillium longisporum* bez ošetření izoláty *P.o.* došlo k nárůstu aktivity G6PDH o 51 % vůči kontrolním rostlinám.

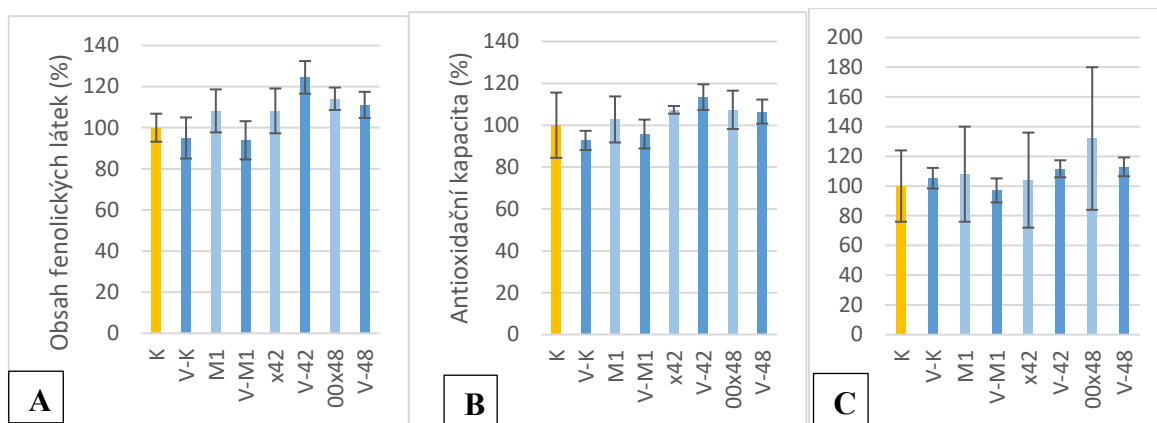


Obrázek 44: Aktivita G6PDH v extraktech rostlin ošetřených *P.o.* a rostlin ošetřených *P.o.* infikovaných *Verticillium longisporum*; aktivita vyjádřená v procentech; aktivita G6PDH kontrolních rostlin vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti listů: $a = 0,083 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$

4.3.3. Obsah fenolických látek a antioxidační vlastnosti rostlin řepky ošetřených *Pythium oligandrum* a infikovaných *Verticillium longisporum*

Obsah fenolických látek (Obr. 45-A, str. 65) v extraktech rostlin infikovaných patogenem *Verticillium longisporum* (V-K) byl snížen o 5 % vůči kontrolním rostlinám, o 6 % nižší obsah fenolických látek byl naměřen u rostlin ošetřených *P.o.* a infikovaných patogenem *Verticillium longisporum* V-M1. V extraktech V-42 a V-48 byl naměřen obsah fenolických látek o 24 % a 11 % vyšší než u kontrolních rostlin. Při měření metodou FRAP (Obr. 45-B, str. 65) byla antioxidační kapacita rostlin V-K nejnižší, s hodnotami o 7 % nižšími než u kontrolních rostlin. U rostlin V-M1 byla antioxidační kapacita menší o 4 % než u kontrolních rostlin. Rostliny V-42 a V-48 měly antioxidační kapacitu vyšší než u kontrolních rostlin o 13 % a 7 %. Metodou DPPH (Obr 45-C, str. 65) bylo zjištěno, že schopnost eliminace radikálů byla u rostlin V-M1 snížena o 3 % vůči kontrolním rostlinám. U V-K byla naměřená antioxidační kapacita vyšší o 5 % než u kontrolních rostlin. U rostlin V-42 a V-48 byla antioxidační kapacita nejvyšší s hodnotami o 12 % a 13 % vyššími než u kontrolních rostlin.

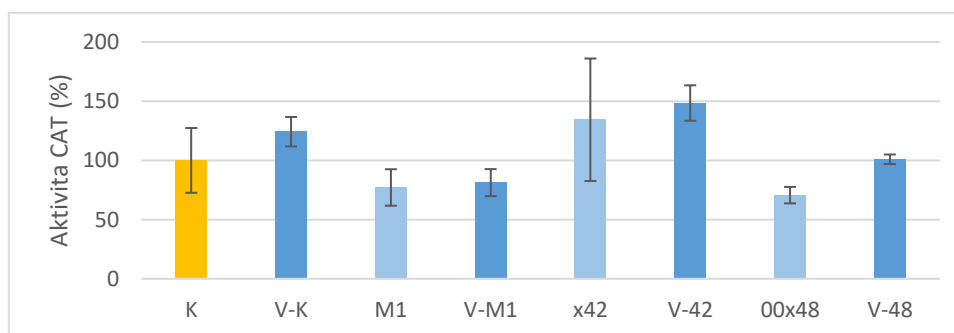
Při porovnávání antioxidační kapacity rostlin ošetřených *P.o.* a ošetřených *P.o.* infikovaných *Verticillium longisporum* nebyly pozorovány významné rozdíly (Obr. 45; str. 65). Při měření obsahu fenolických látek došlo k poklesu jejich obsahu u rostlin infikovaných *Verticillium longisporum*, kromě rostlin ošetřených izoláty x42 (Obr. 45-A, str. 65). Během měření metody DPPH byla pozorovaná zvýšená antioxidační kapacita u rostlin ošetřených izolátem 00x48 opět snížena po infekci *Verticillium longisporum* (Obr. 45-C, str. 65).



Obrázek 45: Obsah fenolických látek (A), antioxidační kapacita stanovená metodou FRAP (B), metoda DPPH (C) v extraktech rostlin řepky ošetřených *P.o.* a rostlin ošetřených *P.o.* infikovaných *Verticillium longisporum*; vyjádřeno v procentech; koncentrace v kontrolních rostlinách vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti listů: $c_A = 13,2 \mu\text{mol.g}^{-1}$; $c_B = 7,84 \mu\text{mol.g}^{-1}$ – koncentrace odpovídá molárním ekvivalentům askorbátu, $c_C = 2,04 \mu\text{mol.g}^{-1}$ – koncentrace odpovídá molárním ekvivalentům troloxu

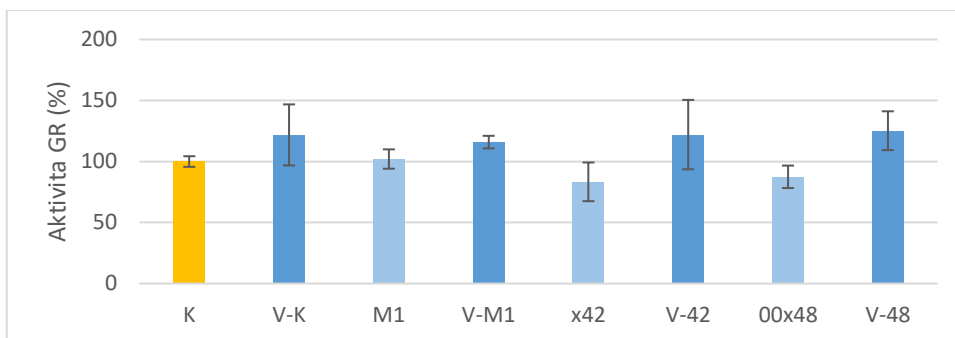
4.3.4. Aktivita antioxidačních enzymů v rostlinách ošetřených *Pythium oligandrum* a infikovaných *Verticillium longisporum*

Aktivita CAT (Obr. 46) v extraktech rostlin V-K byla vyšší o 24 % než v kontrolních rostlinách. Aktivita CAT v rostlinách V-M1 byla o 23 % nižší než u kontrolních rostlin přičemž se příliš nelišila od rostlin pouze ošetřených M1. Aktivita CAT v rostlinách V-42 byla o 48 % vyšší než v kontrolních rostlinách a opět byla srovnatelná s rostlinami pouze ošetřenými V-42. Aktivita CAT v rostlinách V-48 byla srovnatelná s kontrolními rostlinami narozdíl od rostlin pouze ošetřených *P.o.*, kde byla aktivita o 42 % nižší.



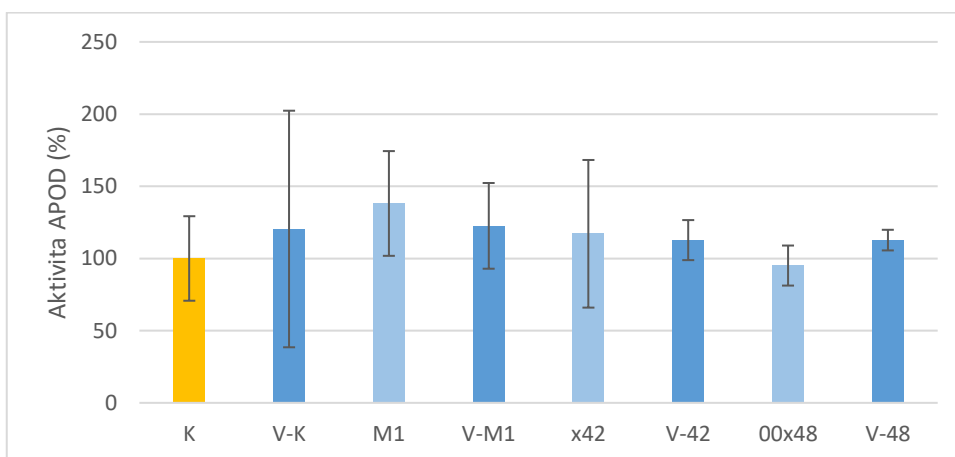
Obrázek 46: Aktivita CAT v extraktech rostlin řepky ošetřených *P.o.* a rostlin ošetřených *P.o.* a infikovaných *Verticillium longisporum*; aktivita vyjádřena v procentech; aktivita CAT kontrolních rostlin vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti listů: $a = 145 \mu\text{mol.min}^{-1}\text{g}^{-1}$

Aktivita GR byla vyšší u všech extraktů rostlin infikovaných patogenem *Verticillium longisporum* vůči kontrolním rostlinám přibližně o 25 % (Obr. 47, str. 66). U rostlin pouze ošetřených *P.o.* byl spíše pozorován pokles aktivity GR.



Obrázek 47: Aktivita GR v extraktech rostlin řepky ošetřených *P.o.* a rostlin ošetřených *P.o.* a infikovaných *Verticillium longisporum*; aktivita vyjádřená v procentech; aktivita GR kontrolních rostlin vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti listů: $a = 0,408 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$

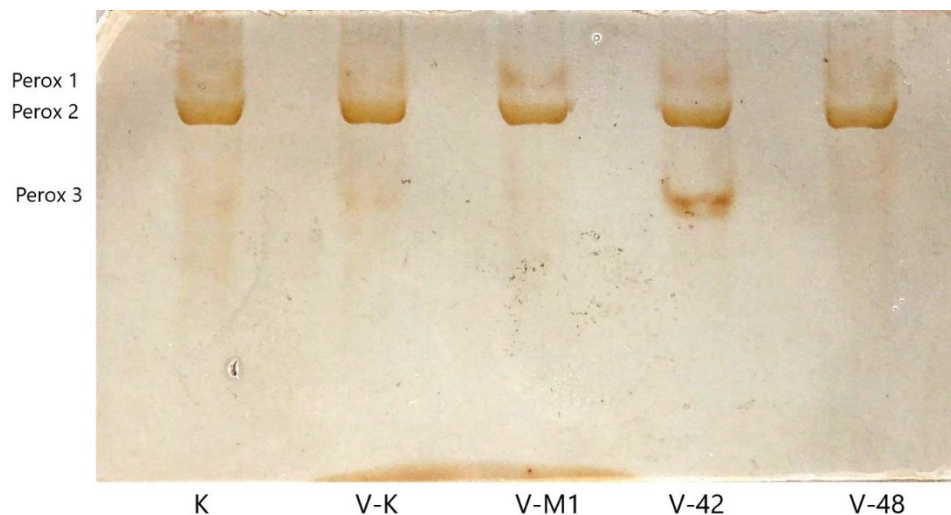
Aktivita APOD byla zvýšená u všech rostlin infikovaných patogenem *Verticillium longisporum* stejně jako u rostlin pouze ošetřených *P.o.* s výjimkou rostlin V-48, u nichž došlo k poklesu (Obr. 48). Rozdíly aktivity APOD v rostlinách ošetřených izoláty *P.o.* se po infekci *Verticillium longisporum* setřely. Byly pozorovány velké výkyvy naměřených hodnot aktivity APOD u rostlin V-K.



Obrázek 48: Aktivita APOD v extraktech rostlin řepky ošetřených *P.o.* a rostlin ošetřených *P.o.* a infikovaných *Verticillium longisporum*; aktivita vyjádřená v procentech; aktivita APOD kontrolních rostlin vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti listů: $a = 1,014 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$

4.3.4.1. Aktivita peroxidas v rostlinách řepky ošetřených *Pythium oligandrum* infikovaných *Verticillium longisporum*

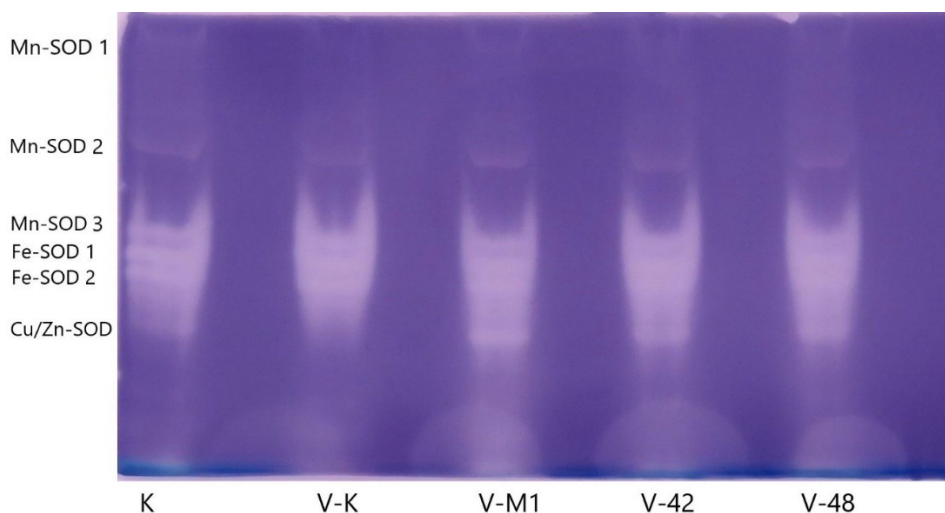
Elektroforetickou separací za nativních podmínek byly peroxidasy rozděleny na izoenzymy a jejich aktivita byla vyobrazena pomocí činidla DAB (Obr. 49, str. 67). Na gelu jsou patrné tři pruhy, přičemž druhý pruh byl nejvýraznější u všech vzorků. V extraktu V-42 se výrazně zobrazil i pruh třetí.



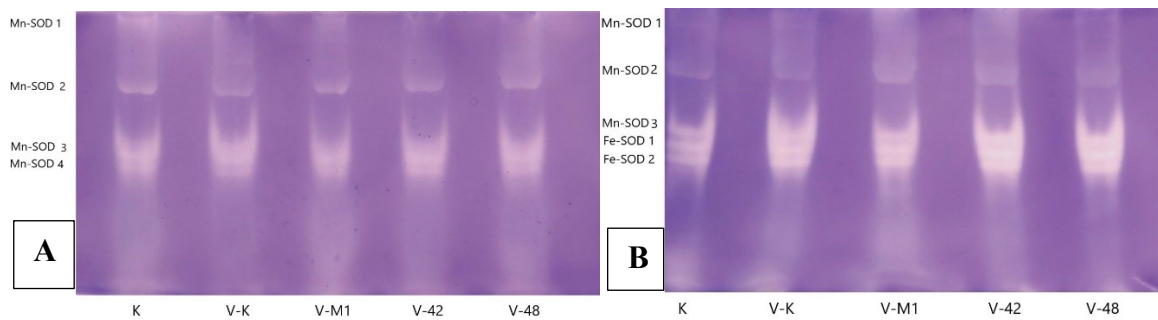
Obrázek 49: Elektroforetická separace peroxidas rostlin ošetřených *P.o.* a infikovaných patogenem *Verticillium longisporum* v 8% gelu za nativních podmínek

4.3.4.2. Aktivita izoenzymů superoxiddismutasy v rostlinách řepky ošetřených *Pythium oligandrum* infikovaných *Verticillium longisporum*

Aktivita izoenzymů superoxiddismutasy (SOD) byla zobrazena pomocí elektroforetické separace za nativních podmínek (Obr. 50). Typy izoenzymů byly rozlišeny pomocí inhibice aktivity prostřednictvím inhibitorů H_2O_2 a KCN (Obr. 51-A,B, str. 68). V extraktu V-K nebyl viditelný pruh izoenzymu Cu/Zn-SOD. V extraktech V-M1, V-42 a V-48 byl mnohem výraznější pruh izoenzymu Cu/Zn-SOD než v kontrolních rostlinách (Obr. 50).



Obrázek 50: Elektroforetická separace v 8% gelu za nativních podmínek rozdělila izoenzymy SOD extraktů rostlin řepky ošetřených *P.o.* a infikovaných patogenem *Verticillium longisporum*



Obrázek 51: Aktivita izoenzymů SOD v rostlinách řepky ošetřených P.o. a infikovaných patogenem *Verticillium longisporum*. A) Inhibice izoenzymů Fe-SOD a Zn/Cu-SOD byla provedena peroxidem vodíku, izoenzymy MnSOD zůstaly aktivní. B) Inhibice izoenzymu Zn/Cu-SOD byla provedena pomocí KCN, izoenzymy Mn-SOD a Fe-SOD zůstaly aktivní.

5. Diskuze

Organismus *Pythium oligandrum* je již několik let využíván jako prostředek biologické ochrany rostlin pro řadu zemědělských plodin [113]. V této práci byly porovnány vlastnosti nových izolátů s komerčně dostupným izolátem M1. Pro rostliny je důležitý mykoparazitismus oomycety *P.o.*, díky kterému se v okolí rostliny sníží přítomnost fytopatogenních hub. Tato vlastnost souvisí se schopností sekretovat enzymy, které rozrušují buněčné stěny dalších organismů [124]. Zjistili jsme, že v mediích všech izolátů *P.o.* byla přítomna chitinasová aktivita, tedy enzym schopný štěpit buněčné stěny hub. Nejvyšší aktivita chitinasy byla zjištěna pro izolát 00x48, komerční izolát M1 patřil spíše k izolátům s nižší aktivitou. Byla zjištěna i celulosová aktivita, tedy schopnost štěpit polymer glukosy spojené vazbou β -1,4. Tento polysacharid je součástí buněčné stěny nejen rostlin, ale také dalších oomycet, které patří mezi závažné patogeny rostlin [178]. Nejvyšší aktivita celulasy byla zjištěna pro izolát 00x5, komerční izolát M1 patřil spíše k izolátům s nižší aktivitou. Všechny izoláty *P.o.* vykazovaly rovněž aktivitu β -1,3-glukanasy, i když tato aktivita byla přítomna i v samotném médiu. Polysacharidové spojení β -1,3 vazbami se také hojně vyskytuje v buněčných stěnách oomycet, hub, ale i rostlin [179–181]. Všechny izoláty *P.o.* vykazovaly též proteolytickou aktivitu, dokonce všechny nové izoláty vyšší než izolát M1. Funkcí sekretovaných proteas je pravděpodobně štěpení proteinů buněčné stěny dalších hub a oomycet a tím rušit integritu těchto organismů. Je velmi pravděpodobné, že všechny tyto enzymy se podílí na mykoparazitismu, a lze předpokládat, že vyšší enzymová aktivita by mohla znamenat výhodu.

Tyto enzymy se pravděpodobně mohou také uplatnit při tvorbě signalizačních molekul (MAMP), které zahájí obranné reakce rostliny. Může se jednat o rozpustné oligosacharidy vzniklé štěpením buněčných stěn hub a oomycet, například β -1 \rightarrow 3 vázané glukany vznikající remodelací buněčných stěn oomycety během jejího životního cyklu [182].

V mediích všech izolátů byla také zjištěna přítomnost peptidů o relativní molekulové hmotnosti 7 300 až 10 500. Domníváme se, že se jedná o oligandrin (10 500), menší peptidy (8 500 a 7 300) již mohou být částečně proteolyticky degradované oligandriny.

Přítomnost oligandrinu při interakci oomycety *P.o.* a rostliny je pravděpodobně velmi důležitá pro stimulaci obranných reakcí rostliny. Jedná se o aktivaci imunitního systému a

metabolických drah, které rostlině při následné infekci patogenem pomohou rychleji a silněji reagovat, tzv. „priming“ [183].

V extraktech z rostlin se již tento peptid nepodařilo mezi mnoha rostlinnými peptidy a proteiny vidět. Důvodem může být velmi nízká koncentrace, ale také vazba na receptor provázená dalšími změnami, takže oligandrin již nemusí být mezi extrahovanými proteiny.

Metabolické změny, sledované v rostlinách řepky vypěstované ze semen mořených přípravkem na bázi izolátů *Pythium oligandrum*, nebyly příliš výrazné. Množství rozpustných proteinů i jejich zastoupení bylo srovnatelné s kontrolními rostlinami, podobně jako aktivita testovaných glykosidas. Mezi popsané metabolické změny v rostlinách po aplikaci *P.o.* je syntéza fenypropanoidních a terpenoidních látek [99]. V našem případě byl sledován celkový obsah fenolických látek v rostlinách řepky. V rostlinách ošetřených izolátem M1 bylo o 10 % fenolických látek více, v izolátu 00x23 o 15% více, avšak v některých izolátech bylo jejich zastoupení srovnatelné s kontrolními rostlinami (Obr. 33-A, str. 57). Při testování antioxidační kapacity extraktů rostlin řepky byly zjištěny jen statisticky nevýznamné změny.

Se syntézou fenolických látek úzce souvisí enzym šikimátdehydrogenasa, klíčový enzym šikimátové dráhy. Obr. 31 (str. 55) dokumentuje zvýšenou aktivitu tohoto enzymu v rostlinách ošetřených téměř všemi novými izoláty v porovnání s kontrolními rostlinami a M1. Zdá se tedy, že aromatické aminokyseliny, a tedy fenypropanoidní látky mohou být syntetizovány ve vyšší míře, ale jsou ve formě fenolových kyselin nebo ligninu ukládány do buněčné stěny. Zesílení buněčné stěny a také baktericidní a fungicidní vlastnosti ligninů a taninů se mohou podílet na zvýšené obranyschopnosti rostliny ošetřené oomycetou *P.o.*

Důležitým rozdílem mezi kontrolními rostlinami a rostlinami ošetřenými izoláty *P.o.* byl obsah volných aminokyselin. V ošetřených rostlinách bylo nalezeno snížené množství aromatických aminokyselin [184]. Na druhou stranu v rostlinách ošetřených některými izoláty byl zjištěn zvýšený obsah hormonu auxinu, který podporuje růst rostliny, hlavně nadzemní části [184]. Tato vlastnost tedy může být velmi výhodná při aplikaci na zemědělské plodiny.

Redukční ekvivalent NADPH potřebný k syntézám rostliny je za fyziologických podmínek v dostatečné míře dodáván fotosyntézou. Za stresových podmínek, kdy je fotosyntetický tok elektronů snížen, nebo mimo chloroplast dodávají NADPH enzymové reakce: glukosa-6-P-

dehydrogenasa a malátdehydrogenasa dekarboxylační. V rostlinách řepky ošetřených izolátem M1 byla aktivita NADP-ME i G6PDH zvýšena (Obr. 32, str. 56). Rostliny ošetřené některými izoláty, především 00x5, x42 a 00x48 vykazovaly aktivitu vyšší než kontrolní rostliny. Dostatek redukčních ekvivalentů NADPH je důležitý pro možnou hypersenzitivní reakci, jako substrát NADPH oxidasy a také jako koenzym antioxidačních enzymů glutathionreduktasy. Aktivita tohoto enzymu byla v rostlinách ošetřených M1 izolátem srovnatelná s kontrolními rostlinami, v případě většiny nových izolátů byla aktivita nižší. Jak funguje systém antioxidačních enzymů po ošetření *P.o.* nelze z dosavadních výsledků jednoznačně určit, neboť aktivita některých antioxidačních enzymů je zvýšena (APOD, SOD), některých není ovlivněna (GR, peroxidasy) a aktivita katalasy je snížena v případě ošetření rostlin řepky izolátem M1. Aktivita antioxidačních enzymů se mezi izoláty značně liší, například izolát x42 vykazuje nejvyšší aktivitu katalasy a vysokou aktivitu SOD, izolát 00x11 nejvyšší aktivitu APOD a celkových peroxidas.

Pro zhodnocení metabolických změn rostlin řepky ošetřených *P.o.* a následně infikovaných *Verticillium longisporum* je zatím málo výsledků. Lze však říci, že přítomnost patogenu v rostlinách neošetřených *P.o.* zvýšila aktivitu všech NADP-dependentních dehydrogenas. V rostlinách ošetřených *P.o.* byla při infekci patogenem aktivita NADP-dependentních dehydrogenas nižší nebo srovnatelná s kontrolními rostlinami. Podobný trend, kdy se hodnoty ošetřených infikovaných rostlin liší od samotné infekce či ošetření, můžeme vidět i v případě fenolických látek a antioxidačních vlastností. Infikované rostliny ošetřené M1 izolátem měly hodnoty fenolických látek a antioxidační vlastnosti srovnatelné s kontrolními rostlinami, izolát x42 a 00x48 vyšší. Jev, který se projevil až při kombinaci ošetření a infekce rostliny byla také zvýšená aktivita glykosidas až o 50 % oproti kontrole, zatímco aktivita rostlin pouze ošetřených *P.o.* nebo pouze infikovaných *Verticillium longisporum* byla snížena či srovnatelná s aktivitou kontrolních rostlin. Zajímavý výsledek poskytla elektroforetická separace s detekcí peroxidas v gelu. V extraktech rostlin řepky ošetřené izolátem x42 a infikované *Verticillium longisporum* byla pozorována výrazně zvýšená aktivita jedné z peroxidas (Obr. 49, str. 67). K dalšímu významnému nárůstu aktivity enzymu došlo u izoenzymu Cu/Zn-SOD, tentokrát u všech tří izolátů *P.o.* (Obr. 50, str. 67).

O vlivu oomycety *P.o.* na metabolismus rostlin bylo zatím publikováno málo studií, proto je možnost srovnání mého měření s dostupnou literaturou omezená. Mnohá měření změn metabolismu v rostlině byla prováděna jen v kořenech, nebo pouze s aplikací samotného

oligandrinu či CWP [125, 132, 137, 140]. Například Le Floch v tomto ohledu sledoval zvýšenou tvorbu fytoalexinu rishitinu a fenolické látky katecholu v kořenech rajčete [161]. Měřeními prováděnými v této práci se potvrdila skutečnost o nárůstu syntézy fenolických látek v rostlině, měřitelná i v nadzemních částech rostliny. Stejně jako v mém měření pozorovali Picard a Benhamou mnohé změny metabolismu rostlin ošetřených oomycetou *P.o.* souvisejících s tvorbou obraných látek až po útoku patogenu [125, 140]. Rozporuplnost v navyšování a snižování aktivit enzymů a látek ovlivňujících redoxní stav rostliny, například aktivitu antioxidantních enzymů, peroxidas a SOD, může souviset s Yacoubovým měřením, který po ošetření vinné révy oomycetou *P.o.* pozoroval sníženou transkripci většiny genů podílejících se na redoxním stavu rostliny. Jedním z genů, u kterých došlo k indukci, byly zejména geny kódujících chalkonsyntasu, klíčového enzymu syntetické dráhy flavonoidů [136]. Výsledků studie houby *Trichoderma harzianum*, která se také řadí mezi mikroorganismy biologické ochrany rostlin, která způsobila zvýšenou aktivitu chitinasy, β -1,3-glukanasy a celulasy v kořenech rostlin, jsem nepozorovala významný nárůst aktivity glykosidas v extraktech listů rostlin řepky ošetřených oomycetou, přičemž zvýšená aktivita těchto enzymů se projevila až po infekci patogenem. Že tato reakce rostliny se může projevit i po samotném ošetření listů bez přítomnosti infekce ukázal Takenaka, i když jen na měřeních prováděných se samotnými elicitory *P.o.*, CWP. Naproti tomu zvýšení aktivity peroxidas v rostlině také popisované při aplikaci *T. harzianum* jsem sice pozorovala, ale jen při aplikaci některých izolátů *P.o.* [104, 137].

Vzhledem ke komplexnosti problému je potřeba provést mnohem více měření, abychom byly schopni detailněji popsat vliv ošetření mořením semen oomycetou *P.o.* na metabolismus rostliny. V této studii se projevíly slibné vlastnosti některých izolátů *P.o.* a bude se i nadále pokračovat ve výzkumu jejich vlivu na metabolismus rostlin a rostlinných patogenů, aby mohly být využity v biologické ochraně rostlin.

6. Závěr

- 1) Bylo charakterizováno 10 nových izolátů oomycety *P.o.* a porovnáno s izolátem M1.
 - A) V médiu všech nových izolátů *P.o.* byly přítomny peptidy o relativní molekulové hmotnosti 7 300 – 10 500, pravděpodobně se jedná o oligandry a jejich degradační produkty. V médiu byly prokázány rovněž sekretované fenolické látky.
 - B) Ve všech izolátech *P.o.* byla prokázána chitinasová, celulasová a β -1,3-glukanasová aktivita, mezi izoláty byly značné rozdíly v aktivitě jednotlivých glykosidas. Rozdíly byly rovněž v aktivitě proteas.
- 2) Byly charakterizovány rostliny řepky, jejíž semena byla mořena přípravky na bázi různých izolátů *P.o.*
 - A) Řada vlastností rostlin řepky (obsah rozpustných bílkovin, aktivita glykosidas, antioxidační kapacita) nebyla ošetřením rostlin izoláty *P.o.* podstatným způsobem ovlivněna.
 - B) Obsah fenolických látek byl mírně zvýšen. Aktivita dehydrogenas taktéž mírně vzrostla, nejvýrazněji SDH. Aktivita antioxidačních enzymů SOD byla zvýšena, aktivita GR se neměnila a byly pozorovány značné rozdíly mezi jednotlivými izoláty v aktivitě CAT, APOD a peroxidas.
- 3) Byl sledován vliv infekce houbovým patogenem *Verticillium longisporum* na rostliny řepky ošetřené vybranými izoláty *P.o.*
 - A) V infikovaných rostlinách *Verticillium longisporum* bez ošetření izoláty *P.o.* došlo ke zvýšení aktivity SDH, NADP-ME a G6PDH i zvýšení aktivity antioxidačních enzymů.
 - B) V infikovaných rostlinách *Verticillium longisporum* ošetřených izoláty *P.o.* aktivita glykosidas vzrostla až o 50 %, zatímco aktivita dehydrogenas klesla nebo byla srovnatelná s kontrolními rostlinami. Některé antioxidační enzymy vykazovaly vyšší aktivitu. Po infekci *Verticillium longisporum* se významně zvýšila aktivita izoenzymu Cu/Zn-SOD v rostlinách ošetřených všemi izoláty *P.o.* Peroxidasy vykazovaly významný nárůst aktivity jedné z peroxidas u izolátu x42.

4. Citace

1. **Robson MC, Fowler SM, Lampkin NH, Leifert C**, et al. 2002. The agronomic and economic potential of break crops for ley/arable rotations in temperate organic agriculture. In Sparks DL. ed; *Advances in Agronomy, Vol 77*. Elsevier Academic Press Inc. p 369–427.
2. **McVetty PBE, Lukow OM**. 2004. Grain production and consumption | Oilseeds in North America. In Wrigley C. ed; *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier. p 106–16.
3. **FAO**. 2019. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. *Statistical database*. [online]. [cit. 2019-07-31]. URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
4. Postup sklizně obilovin a řepky v ČR k 20. 8. 2018 (Zemědělství, eAGRI). [online] [cit. 2019-07-15] URL: <http://eagri.cz/public/web/mze/zemedelstvi/>
5. **San José Alonso J, López Sastre JA, Romero-Ávila C, López Romero EJ**. 2006. Combustion of rapeseed oil and diesel oil mixtures for use in the production of heat energy. *Fuel Process. Technol.* **87**: 97–102.
6. **Ileri E, Atmanli A, Yilmaz N**. 2016. Comparative analyses of n-butanol–rapeseed oil–diesel blend with biodiesel, diesel and biodiesel–diesel fuels in a turbocharged direct injection diesel engine. *J. Energy Inst.* **89**: 586–93.
7. **Meher LC, Vidya Sagar D, Naik SN**. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **10**: 248–68.
8. **Schneider MP**. 2006. Plant-oil-based lubricants and hydraulic fluids. *J. Sci. Food Agric.* **86**: 1769–80.
9. **Wightman P, Eavis R, Batchelor S, Walker K**, et al. 2000. Comparison of rapeseed and mineral oils using Life-Cycle Assessment and Cost-Benefit Analysis. *OCL - Oil Corps Gras Lipides* **6**: 384–8.
10. **Vyvadilová M, Klíma M**. 2012. Současné cíle a metody ve šlechtění řepky olejky. In *Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin a zemědělského výzkumu*. Powerprint. p 146–59.
11. **Eskin NAM, Przybylski R**. 2003. Rape seed oil/Canola. In Caballero B. ed; *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Academic Press. p 4911–6.
12. **Sahasrabudhe MR**. 1977. Crismer values and erucic acid contents of rapeseed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **54**: 323–4.
13. **Lim C, Sessa DJ**. 1995. *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*. The American Oil Chemists Society.

14. **Butler EJ, Pearson AW, Fenwick GR.** 1982. Problems which limit the use of rapeseed meal as a protein source in poultry diets. *J. Sci. Food Agric.* **33**: 866–75.
15. **Vincent IC, Hill R, Campling RC.** 1990. A note on the use of rapeseed, sunflower and soyabean meals as protein sources in compound foods for milking cattle. *Anim. Sci.* **50**: 541–3.
16. **Cresswell H, Kirkegaard J.** 1995. Subsoil amelioration by plant-roots - The process and the evidence. *Aust. J. Soil Res.* **33**: 221–39.
17. **Mcewen J, Darby R, Hewitt M, Yeoman D.** 1990. Effects of field beans, fallow, lupins, oats, oilseed rape, peas, ryegrass, sunflowers and wheat on nitrogen residues in the soil and on the growth of a subsequent wheat crop. *J. Agric. Sci.* **115**: 209–19.
18. **Kazda J, Škeřík J, a kol.** 2008. Metodika integrované ochrany řepky. SPZO s.r.o
19. **Pozděna J.** Fomové černání stonku - Atlas - Agromanuál.cz. [online]. [cit. 2019-08-01]. URL: <https://www.agromanual.cz/cz/atlas/choroby/choroba/fomove-cernani-stonku>
20. **Heil M, Bostock RM.** 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann. Bot.* **89**: 503–12.
21. **Van Loon LC.** 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**: 753–65.
22. **Cipollini D, Walters D, Voelckel C.** 2017. Costs of resistance in plants: From theory to evidence. In *Annual Plant Reviews online*. American Cancer Society. p 263–307.
23. **Dangl JL, Jones JDG.** 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–33.
24. **Yeats TH, Rose JKC.** 2013. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol.* **163**: 5–20.
25. **Cowan MM.** 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 564–82.
26. **Choudhary DK, Prakash A, Johri BN.** 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol.* **47**: 289–97.
27. **Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, Le Floch G, et al.** 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**: 4847–60.
28. **Vallad G, M. Goodman R.** 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci. - CROP SCI* **44**
29. **Hase S, Takahashi S, Takenaka S, Nakaho K, et al.** 2008. Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathol.* **57**: 870–6.

30. **Yu LM.** 1995. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 4088–94.
31. **Ponchet M, Panabières F, Milat M-L, Mikes V, et al.** 1999. Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **56**: 1020–47.
32. **Ross AF.** 1961. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* **14**: 329–39.
33. **Frost CJ, Mescher MC, Carlson JE, Moraes CMD.** 2008. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiol.* **146**: 818–24.
34. **Conrath U.** 2009. Priming of induced plant defense responses. In VanLoon LC. ed; *Plant Innate Immunity*. Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd. p 361–95.
35. **Hammerschmidt R.** 2007. Introduction: Definitions and some history. In *Induced Resistance for Plant Defence*. John Wiley & Sons, Ltd. p 1–8.
36. **Huang P-Y, Zimmerli L.** 2014. Enhancing crop innate immunity: New promising trends. *Front. Plant Sci.* **5**: 624.
37. **Tsuda K, Katagiri F.** 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 459–65.
38. **Vandelle E, Ling T, Imanifard Z, Liu R, et al.** 2016. Chapter eleven - Nitric oxide signaling during the hypersensitive disease resistance response. In Wendehenne D. ed; *Advances in Botanical Research*. Academic Press. p 219–43.
39. **Dodds PN, Rathjen JP.** 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 539–48.
40. **Mehdy MC.** 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* **105**: 467–72.
41. **Lamb C, Dixon RA.** 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251–75.
42. **Torres MA, Jones JDG, Dangi JL.** 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* **141**: 373–8.
43. **Aldred EM, Buck C, Vall K.** 2009. Chapter 7 - Free radicals. In Aldred EM, Buck C, Vall K. ed; *Pharmacology*. Churchill Livingstone. p 41–52.
44. **Singh RS, Singh T, Pandey A.** 2019. Chapter 1 - Microbial enzymes—An Overview. In Singh RS, Singhania RR, Pandey A, et al. ed; *Advances in Enzyme Technology*. Elsevier. p 1–40.
45. **Kapoor D, Singh S, Kumar V, Romero R, et al.** 2019. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene* **19**: 100182.

46. **HammondKosack KE, Jones JDG.** 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**: 1773–91.
47. **Whetten R, Sederoff R.** 1995. Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1001–13.
48. **Liu Q, Luo L, Zheng L.** 2018. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **19**
49. **Kombrink E, Schmelzer E.** 2001. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**: 69–78.
50. **Kuc J.** 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**: 275–97.
51. **Van Loon LC, Van Strien EA.** 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**: 85–97.
52. **Levin DA.** 1976. The Chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **7**: 121–59.
53. **Heldt H-W, Piechulla B.** 2011. 16 - Secondary metabolites fulfill specific ecological functions in plants. In Heldt H-W, Piechulla B. ed; *Plant Biochemistry (Fourth Edition)*. Academic Press. p 399–408.
54. **Wink M.** 1988. Plant-Breeding - Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* **75**: 225–33.
55. **Heldt H-W, Piechulla B.** 2011. 18 - Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. In Heldt H-W, Piechulla B. ed; *Plant Biochemistry (Fourth Edition)*. Academic Press. p 431–49.
56. **Gan R-Y, Chan C-L, Yang Q-Q, Li H-B, et al.** 2019. 9 - Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. In Feng H, Nemzer B, DeVries JW. ed; *Sprouted Grains*. AACC International Press. p 191–246.
57. **Breitmaier E.** 2006. Terpenes: importance, general structure, and biosynthesis. In *Terpenes*. John Wiley & Sons, Ltd. p 1–9.
58. **Pichersky E, Raguso RA.** 2018. Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytol.* **220**: 692–702.
59. **Roberts MF.** 1998. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Springer US.
60. **Khajali F, Slominski B.** 2012. Factors that affect the nutritive value of canola meal for poultry. *Poult. Sci.* **91**: 2564–75.
61. **Sang J, Minchinton I, Johnstone P, Truscott R.** 1984. Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. *Can. J. Plant Sci.* **64**: 77–93.

62. **Smolinska U, Morra MJ, Knudsen GR, Brown PD.** 1997. Toxicity of glucosinolate degradation products from *Brassica napus* seed meal toward *Aphanomyces euteiches* f. sp. pisi. *Phytopathology* **87**: 77–82.
63. **Botti MG, Taylor MG, Botting NP.** 1995. Studies on the mechanism of myrosinase investigation of the effect of glycosyl acceptors on enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **270**: 20530–5.
64. **Jahangir M, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R.** 2009. Health-affecting compounds in *Brassicaceae*. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **8**: 31–43.
65. **Halkier BA, Gershenzon J.** 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 303–33.
66. **Angelino D, Dosz EB, Sun J, Hoeflinger JL, et al.** 2015. Myrosinase-dependent and -independent formation and control of isothiocyanate products of glucosinolate hydrolysis. *Front. Plant Sci.* **6**
67. **Griffiths DW, Birch ANE, Hillman JR.** 1998. Antinutritional compounds in the Brasi Analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **73**: 1–18.
68. **Bell J.** 1993. Factors affecting the nutritional-value of Canola-meal - a Review. *Can. J. Anim. Sci.* **73**: 679–97.
69. **Wolfram K, Schmidt J, Wray V, Milkowski C, et al.** 2010. Profiling of phenylpropanoids in transgenic low-sinapine oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytochemistry* **71**: 1076–84.
70. **Youngs C, Mallard T, Craig B, Sallans H.** 1951. Component fatty acids of rapeseed oil. *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* **29**: 871–6.
71. **EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, et al.** 2016. Erucic acid in feed and food. *EFSA J.* **14**: e04593.
72. **Eskin NAM, Przybylski R.** 2003. Rape seed oil/Canola. In Caballero B. ed; *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Academic Press. p 4911–6.
73. **Shu Y, Xue W, Xu X, Jia Z, et al.** 2015. Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique. *Food Chem.* **173**: 31–7.
74. **Alavanja MCR.** 2009. Introduction: pesticides use and exposure extensive worldwide. *Rev. Environ. Health* **24**: 303–9.
75. **Macintyre A.** 1987. Why pesticides received extensive use in America - a political-economy. *Nat. Resour. J.* **27**: 533–78.

76. **Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A.** 2009. Impact of Pesticides Use in Agriculture: Their Benefits and Hazards. *Interdiscip. Toxicol.* **2**: 1–12.
77. **Penaud A, Walker A-S.** 2015. Oilseed rape pathogens in France. In Ishii H, Hollomon DW. ed; *Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management.* Springer Japan. p 389–99.
78. **Pimentel D.** 2009. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. In Peshin R, Dhawan AK. ed; *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process: Volume 1.* Springer Netherlands. p 89–111.
79. **Silva V, Mol HGJ, Zomer P, Tienstra M,** et al. 2019. Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. *Sci. Total Environ.* **653**: 1532–45.
80. **Stehle S, Schulz R.** 2018. The Impact of pesticides on our freshwater resources. In Dellasala DA, Goldstein MI. ed; *Encyclopedia of the Anthropocene.* Elsevier. p 127–32.
81. **Yadav IC, Devi NL, Syed JH, Cheng Z,** et al. 2015. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Sci. Total Environ.* **511**: 123–37.
82. **Kiljanek T, Niewladowska M, Posyniak A.** 2016. Pesticide poisoning of honeybees: a review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. *J. Apic. Sci.* **60**: 5–24.
83. **Caloni F, Cortinovis C, Rivolta M, Davanzo F.** 2016. Suspected poisoning of domestic animals by pesticides. *Sci. Total Environ.* **539**: 331–6.
84. **Kan CA, Meijer GAL.** 2007. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* **133**: 84–108.
85. **Ferrer C, Lozano A, Uclés S, Valverde A,** et al. 2017. European Union proficiency tests for pesticide residues in fruit and vegetables from 2009 to 2016: Overview of the results and main achievements. *Food Control* **82**: 101–13.
86. **Gavrilescu M.** 2005. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Eng. Life Sci.* **5**: 497–526.
87. **Sanborn M, Kerr KJ, Sanin LH, Cole DC,** et al. 2007. Non-cancer health effects of pesticides: Systematic review and implications for family doctors. *Can. Fam. Physician* **53**: 1712–20.
88. **George J, Shukla Y.** 2011. Pesticides and cancer: Insights into toxicoproteomic-based findings. *J. Proteomics* **74**: 2713–22.
89. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides (Text with EEA relevance). **309 OJ L**

90. **Yadav SK.** 2010. Pesticide applications-Threat to ecosystems. *J. Hum. Ecol.* **32**: 37–45.
91. **Baker K, Cook RJ.** 1974. *Biological control of plant pathogens.* W.H. Freeman and Company.
92. **AbdulHameed M, Al-Sammarai.** 2012. Nanoparticles as alternative to pesticides in management plant diseases - A Review. *Int. J. Sci. Res. Publ.* **2**: 261–4.
93. **Bueno A, Jones O.** 2002. Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *IOBC Wprs Bull* **25**
94. **Walters D, Daniell T.** 2007. Microbial induction of resistance to pathogens. In *Induced Resistance for Plant Defence.* John Wiley & Sons, Ltd. p 143–56.
95. **Flint ML, Driestadt SH, Clark JK.** 1999. *Natural Enemies Handbook: The Illustrated Guide to Biological Pest Control.* Berkeley, Calif.; London: University of California Press.
96. **Hu X, Roberts DP, Xie L, Qin L, et al.** 2019. Seed treatment containing *Bacillus subtilis* BY-2 in combination with other *Bacillus* isolates for control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape. *Biol. Control* **133**: 50–7.
97. **Hyakumachi M, Takahashi H, Matsubara Y, Someya N, et al.** 2014. Recent studies on biological control of plant diseases in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **80**: 287–302.
98. **Mwakinyali SE, Ding X, Ming Z, Tong W, et al.** 2019. Recent development of aflatoxin contamination biocontrol in agricultural products. *Biol. Control* **128**: 31–9.
99. **Benhamou N, le Floch G, Vallance J, Gerbore J, et al.** 2012. *Pythium oligandrum*: An example of opportunistic success. *Microbiol.-Sgm* **158**: 2679–94.
100. **Labuschagne L, Swanepoel LH, Taylor PJ, Belmain SR, et al.** 2016. Are avian predators effective biological control agents for rodent pest management in agricultural systems? *Biol. Control* **101**: 94–102.
101. **Helle W, Sabelis MW.** 1985. *Spider mites: their biology, natural enemies and control: vol. 1A.* AmsterdamElsevier.
102. **Brimner TA, Boland GJ.** 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agric. Ecosyst. Environ.* **100**: 3–16.
103. **Harman GE.** 2000. Myths and dogmas of biocontrol - Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* **84**: 377–93.
104. **Yedidia I, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I.** 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem.* **38**: 863–73.

105. **Martin FN, Loper JE.** 1999. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**: 111–81.
106. **Vanderplaatsniterink A.** 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Stud. Mycol.* : 1–242.
107. **Chamswarng C, Cook R.** 1985. Identification and comparative pathogenicity of *Pythium* species from wheat roots and wheat-field soils in the Pacific northwest. *Phytopathology* **75**: 821–7.
108. **Al-Sheikh H.** 2010. Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field. *Saudi J. Biol. Sci.* **17**: 347–52.
109. **Saunders G, Washburn J, Egerter D, Anderson J.** 1988. Pathogenicity of fungi isolated from field-collected larvae of the western treehole mosquito, *Aedes-Sierrensis* (diptera, Culicidae). *J. Invertebr. Pathol.* **52**: 360–3.
110. **Lévesque CA.** 2011. Fifty years of oomycetes – From consolidation to evolutionary and genomic exploration. *Fungal Divers.* **50**: 35.
111. **Klochkova TA, Jung S, Kim GH.** 2017. Host range and salinity tolerance of *Pythium porphyrae* may indicate its terrestrial origin. *J. Appl. Phycol.* **29**: 371–9.
112. **Khulbe R, Joshi C, Bisht G.** 1995. Fungal diseases of fish in Nanak-Sagar, Naini-Tal, India. *Mycopathologia* **130**: 71–4.
113. **Prochazkova-Rulfova J.** 2009. *Polyversum - Biological Fungicide for Plants Protection*. Prague 6: Czech University Life Sciences Prague.
114. **Gerbore J, Vallance J, Yacoub A, Delmotte F, et al.** 2014. Characterization of *Pythium oligandrum* populations that colonize the rhizosphere of vines from the Bordeaux region. *Fems Microbiol. Ecol.* **90**: 153–67.
115. **Drechsler C.** 1943. Antagonism and parasitism among some oomycetes associated with root rot. *J. Wash. Acad. Sci.* **33**: 21–8.
116. **Middleton JT.** 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. *Mem. Torrey Bot. Club* **20**: 1–171.
117. **Deacon JW.** 1976. Studies on *Pythium oligandrum*, an aggressive parasite of other fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **66**: 383–91.
118. **Wulff EG, Pham ATH, Chérif M, Rey P, et al.** 1998. Inoculation of cucumber roots with zoospores of mycoparasitic and plant pathogenic *Pythium* species: Differential zoospore accumulation, colonization ability and plant growth response. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**: 69–76.
119. **Horner NR, Grenville-Briggs LJ, Van West P.** 2012. The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. *Fungal Biol.* **116**: 24–41.

120. **Bradshaw-Smith RP, Whalley WM, Craig GD.** 1991. Interactions between *Pythium oligandrum* and the fungal footrot pathogens of peas. *Mycol. Res.* **95**: 861–5.
121. **Levesque CA.** 2011. Fifty years of oomycetes – From consolidation to evolutionary and genomic exploration. *Fungal Divers.* **50**: 35–46.
122. **Benhamou N, Rey P, Picard K, Tirilly Y.** 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. *Phytopathology* **89**: 506–17.
123. **Laing SAK, Deacon JW.** 1991. Video microscopical comparison of mycoparasitism by *Pythium oligandrum*, *P. nunn* and an unnamed *Pythium* species. *Mycol. Res.* **95**: 469–79.
124. **Rey P, Le Floch G, Benhamou N, Tirilly Y.** 2008. *Pythium oligandrum* biocontrol: Its relationships with fungi and plants. In: Plant Microbe-Interactions. In p 43–67.
125. **Benhamou N, Rey P, Cherif M, Hockenull J, et al.** 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* **87**: 108–22.
126. **Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, Steinberg C.** 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* **184**: 529–44.
127. **Le Floch G, Tambong J, Vallance J, Tirilly Y, et al.** 2007. Rhizosphere persistence of three *Pythium oligandrum* strains in tomato soilless culture assessed by DNA macroarray and real-time PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* **61**: 317–26.
128. **Vallance J, Deniel F, Barbier G, Guerin-Dubrana L, et al.** 2012. Influence of *Pythium oligandrum* on the bacterial communities that colonize the nutrient solutions and the rhizosphere of tomato plants. *Can. J. Microbiol.* **58**: 1124–34.
129. **Calvo-Bado LA, Petch G, Parsons NR, Morgan J a. W, et al.** 2006. Microbial community responses associated with the development of oomycete plant pathogens on tomato roots in soilless growing systems. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 1194–207.
130. **AlRawahi AK, Hancock JG.** 1997. Rhizosphere competence of *Pythium oligandrum*. *Phytopathology* **87**: 951–9.
131. **Takenaka S, Sekiguchi H, Nakaho K, Tojo M, et al.** 2008. Colonization of *Pythium oligandrum* in the tomato rhizosphere for biological control of bacterial wilt disease analyzed by real-time PCR and confocal laser-scanning microscopy. *Phytopathology* **98**: 187–95.
132. **Le Floch G, Benhamou N, Mamaca E, Salerno MI, et al.** 2005. Characterisation of the early events in atypical tomato root colonisation by a biocontrol agent, *Pythium oligandrum*. *Plant Physiol. Biochem.* **43**: 1–11.

133. **Rey P, Benhamou N, Tirilly Y.** 1996. Ultrastructural and cytochemical studies of cucumber roots infected by two *Pythium* species with different modes of pathogenicity. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **49**: 213–31.
134. **Rey P, Benhamou N, Wulff E, Tirilly Y.** 1998. Interactions between tomato (*Lycopersicon esculentum*) root tissues and the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **53**: 105–22.
135. **Yacoub A, Gerbore J, Magnin N, Chambon P, et al.** 2016. Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeomoniella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. *Biol. Control* **92**: 7–16.
136. **Yacoub A, Gerbore J, Magnin N, Haidar R, et al.** 2018. Transcriptional analysis of the interaction between the oomycete biocontrol agent, *Pythium oligandrum*, and the roots of *Vitis vinifera* L. *Biol. Control* **120**: 26–35.
137. **Takenaka S.** 2015. Studies on biological control mechanisms of *Pythium oligandrum*. *J. Gen. Plant Pathol.* **81**: 466–9.
138. **Masunaka A, Sekiguchi H, Takahashi H, Takenaka S.** 2010. Distribution and Expression of elicitin-like protein genes of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. *J. Phytopathol.* **158**: 417–26.
139. **Benhamou N, Bélanger RR, Rey P, Tirilly Y.** 2001. Oligandrin, the elicitin-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 681–96.
140. **Picard K, Ponchet M, Blein JP, Rey P, et al.** 2000. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiol.* **124**: 379–95.
141. **Ouyang Z, Li X, Huang L, Hong Y, et al.** 2015. Elicitin-like proteins Oli-D1 and Oli-D2 from *Pythium oligandrum* trigger hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana* and induce resistance against *Botrytis cinerea* in tomato. *Mol. Plant Pathol.* **16**: 238–50.
142. **Lascombe M-B, Milat M-L, Blein J-P, Panabières F, et al.** 2000. Crystallization and preliminary X-ray studies of oligandrin, a sterol-carrier elicitor from *Pythium oligandrum*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56**: 1498–500.
143. **Derevnina L, Dagdas YF, Concepcion JCD Ia, Bialas A, et al.** 2016. Nine things to know about elicitins. *New Phytol.* **212**: 888–95.
144. **Takenaka S, Tamagake H.** 2009. Foliar spray of a cell wall protein fraction from the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induces defence-related genes and increases resistance against cercospora leaf spot in sugar beet. *J. Gen. Plant Pathol.* **75**: 340–8.
145. **Takenaka S, Yamaguchi K, Masunaka A, Hase S, et al.** 2011. Implications of oligomeric forms of POD-1 and POD-2 proteins isolated from cell walls of the

- biocontrol agent *Pythium oligandrum* in relation to their ability to induce defense reactions in tomato. *J. Plant Physiol.* **168**: 1972–9.
146. **Veselý D.** 1989. Biological control of damping-off pathogens by treating sugar-beet seed with a powdery preparation of the mycoparasite *Pythium oligandrum* in large-scale field trials. In Vančura V, Kunc F. ed; *Developments in Soil Science*. Elsevier. p 445–9.
 147. **Berg G.** 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**: 11–8.
 148. **Castro-Sowinski S, Herschkovitz Y, Okon Y, Jurkevitch E.** 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *Fems Microbiol. Lett.* **276**: 1–11.
 149. **Ahemad M, Kibret M.** 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. - Sci.* **26**: 1–20.
 150. **Le Floch G, Rey P, Benizri E, Benhamou N,** et al. 2003. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant Soil* **257**: 459–70.
 151. **Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R.** 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**: 425–48.
 152. **Mano Y, Nemoto K.** 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* **63**: 2853–72.
 153. **Cooney T, Nonhebel H.** 1991. Biosynthesis of indole-3-acetic-acid in tomato shoots - measurement, mass-spectral identification and incorporation of h-2 from h2o-h-2 into indole-3-acetic-acid, d-tryptophan and l-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. *Planta* **184**: 368–76.
 154. **Chemeltorit PP, Mutaqin KH, Widodo W.** 2017. Combining *Trichoderma hamatum* THSW13 and *Pseudomonas aeruginosa* BJ10-86: a synergistic chili pepper seed treatment for *Phytophthora capsici* infested soil. *Eur. J. Plant Pathol.* **147**: 157–66.
 155. **De Vrieze M, Germanier F, Vuille N, Weisskopf L.** 2018. Combining different potato-associated *Pseudomonas* strains for improved biocontrol of *Phytophthora infestans*. *Front. Microbiol.* **9**: 2573.
 156. **Yobo KS, Laing MD, Hunter CH.** 2010. Application of selected biological control agents in conjunction with tolclofos-methyl for the control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. *Afr. J. Biotechnol.* **9**: 1789–96.
 157. **Elliott M, Shamoun SF, Sumampong G, James D,** et al. 2009. Evaluation of several commercial biocontrol products on European and North American populations of *Phytophthora ramorum*. *Biocontrol Sci. Technol.* **19**: 1007–21.

158. **Dooley SR, Beckstead J.** 2010. Characterizing the interaction between a fungal seed pathogen and a deleterious rhizobacterium for biological control of cheatgrass. *Biol. Control* **53**: 197–203.
159. **Bora T, Ozaktan H, Gore E, Aslan E.** 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. *J. Phytopathol.* **152**: 471–5.
160. **Xu X-M, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ.** 2011. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology* **101**: 1024–31.
161. **Le Floch G, Vallance J, Benhamou N, Rey P.** 2009. Combining the oomycete *Pythium oligandrum* with two other antagonistic fungi: Root relationships and tomato grey mold biocontrol. *Biol. Control* **50**: 288–98.
162. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–54.
163. **Arndt C, Koristka S, Bartsch H, Bachmann M.** 2012. Native polyacrylamide gels. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **869**: 49–53.
164. **Schaegger H.** 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**: 16–22.
165. **Chevallet M, Luche S, Rabilloud T.** 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc.* **1**: 1852–8.
166. **Charney J, Tomarelli R.** 1947. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity. *J. Biol. Chem.* **171**: 501–5.
167. **Shah K, Imae T.** 2017. Photo-induced enzymatic conversion of CO₂ gas to solar fuel on functional cellulose nanofiber films. *J Mater Chem A* **5**
168. **Huang D, Ou B, Prior RL.** 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 1841–56.
169. **Benzie IFF, Strain JJ.** 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**: 70–6.
170. **Aksoy L, Kolay E, Ağılönü Y, Aslan Z,** et al. 2013. Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi J. Biol. Sci.* **20**: 235–9.
171. **Hernández-Barrera A, Quinto C, Johnson EA, Wu H-M,** et al. 2013. Chapter fifteen - Using hyper as a molecular probe to visualize hydrogen peroxide in living plant cells: a method with virtually unlimited potential in plant biology. In Cadenas E, Packer L. ed; *Methods in Enzymology*. Academic Press. p 275–90.

172. **Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Hernández-Carlos B, Villanueva-Cañongo C.** 2019. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. *Plant Physiol. Asp. Phenolic Compd.*
173. **Hýsková V, Potuckova L, Muller K, Ryšlavá H.** 2009. The regulation and catalytic mechanism of the NADP-malic enzyme from tobacco leaves. *J. Serbian Chem. Soc.* **74**
174. **Long X, He B, Fang Y, Tang C.** 2016. Identification and characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene family in the para rubber tree, *Hevea brasiliensis*. *Front. Plant Sci.* **7**
175. **Caverzan A, Casassola A, Brammer SP.** 2016. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. In Shanker A. ed; *Abiotic and Biotic Stress Plants - Recent Advances Future Perspect.* IntechOpen
176. **Kehrer JP, Robertson JD, Smith CV.** 2010. 1.14 - Free radicals and reactive oxygen species. In McQueen CA. ed; *Comprehensive Toxicology (Second Edition).* Elsevier. p 277–307.
177. **Christensen JH, Van Montagu M, Bauw G, Boerjan W.** 2001. Xylem peroxidases: Purification and altered expression. In Morohoshi N, Komamine A. ed; *Progress in Biotechnology.* Elsevier. p 171–6.
178. **Clavaud C, Aïmanianda V, Latge J-P.** 2009. Chapter 4.3 - Organization of fungal, oomycete and lichen (1,3)- β -Glucans. In Bacic A, Fincher GB, Stone BA. ed; *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides.* Academic Press. p 387–424.
179. **Kamoun S.** 2003. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryot. Cell* **2**: 191–9.
180. **Hayashi T.** 1989. Measuring β -Glucan deposition in plant cell walls. In Linskens H-F, Jackson JF. ed; *Plant Fibers.* Springer Berlin Heidelberg. p 138–60.
181. **Douglas CM.** 2001. Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med. Mycol.* **39 Suppl 1**: 55–66.
182. **Robinson SM, Bostock RM.** 2014. β -glucans and eicosapolyenoic acids as MAMPs in plant–oomycete interactions: past and present. *Front. Plant Sci.* **5**
183. **Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B.** 2002. Priming in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **7**: 210–6.
184. **Ryšlavá H, Bělonožníková K, Vaněk T, Vaverová K, Vaňková R, Křížek T, Hýsková V.** 2019. P12 What is the effect of seed treatment with *Pythium oligandrum* on the metabolism of rape plants? *Plant Developmental and Production Biology under Global Climate Change.* September 9-11. Brno, Czech Republic.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka