

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Marie Oušková

Biochemická charakterizace rostlin rajčete infikovaných houbovými patogeny
Biochemical characterization of tomato plants infected with fungal pathogens

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Veronika Hýsková, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15.6.2020

Podpis:

Marie Oušková

Abstrakt

Houbové patogeny včetně *Verticillium longisporum*, způsobujícího verticiliové vadnutí, patří mezi závažná onemocnění hospodářských plodin snadno šířitelná po celém světě. Jednou z možností, jak se houbovým infekcím bránit je aplikace prostředku biologické ochrany již na semena. Účinná složka tohoto ochranného prostředku, nepatogenní oomyceta *Pythium oligandrum*, se tak dostává spolu se semenem do půdy, kde později působí symbioticky v kořenovém systému rostliny. Jednak stimuluje obranné mechanismy rostliny vylučováním elicitorů, jednak poskytováním tryptaminu stimuluje růst a zvyšuje zdatnost rostliny pomocí auxinu. V této práci byl sledován vliv ošetření semen rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom třemi různými izoláty rodu *Pythium* (včetně komerčně využívaného izolátu M1 a také dosud nepoužívané izoláty X42 a X48) na aktivity antioxidantních a NADP(H)-dependentních enzymů v listech rostlin infikovaných houbovým patogenem *V. longisporum*. Dva týdny po inokulaci patogenu nebyl ve studovaných enzymech nalezen významný rozdíl kromě zvýšené aktivity glukosa-6-fosfátdehydrogenasy a NADP-malátdehydrogenasy (oxalacetát-dekarboxylační) v rostlinách, jejichž semena byla ošetřena izolátem X42 a zvýšená aktivita šikimátdehydrogenasy a antioxidantní kapacity v rostlinách ošetřených izolátem M1. Antioxidantní enzymy katalasa a superoxid-dismutasa, u které bylo zjišťováno i izoenzymové složení, nebyly v době rozvinuté infekce statisticky významně indukovány.

Klíčová slova

houbové patogeny, *Verticillium longisporum*, *Pythium*, *Solanum lycopersicum* L., dehydrogenasy, oxidativní stres, ROS, SOD

Abstract

Fungal pathogens including *Verticillium longisporum* which causes verticillium wilt are among the serious diseases of crops that easily spread worldwide. One of the ways to prevent fungal infection is to use fungal biocontrol agents applied as a seed coating. This control agent, the non-pathogenic oomycete *Pythium oligandrum*, enters the soil together with the seed and acts symbiotically in the plant's root system. On the one hand, it stimulates the plant's defence mechanism by secreting elicitors, and on the other hand, by providing tryptamine, it stimulates growth and increases the plant's fitness with auxin. In this work we studied the effect of seed treatment of *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom with three different isolates of the genus *Pythium* (including the commercially used isolate M1 and two yet unused isolates X42 and X48) on the activities of antioxidant and NADP(H)-dependent enzymes in the leaves of plants infected with fungal pathogen *V. longisporum*. Two weeks after pathogen inoculation, no significant difference was found in the studied enzymes except for increased glucose-6phosphate dehydrogenase and NADP-malate dehydrogenase (oxaloacetate decarboxylation) activity in plants treated with X42 isolate and increased shikimate dehydrogenase activity and antioxidant capacity in plants treated with M1. The antioxidant enzymes catalase and superoxid dismutase, for which the isoenzyme composition was also determined, were not statistically significantly induced at the time of the infection development.

Key words

fungal pathogens, *Verticillium longisporum*, *Pythium*, *Solanum lycopersicum* L., dehydrogenases, oxidative stress, ROS, SOD

[IN CZECH]

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D. za velkou ochotu, trpělivost, cenné rady a pomoc v průběhu vypracovávání této práce a za vedení po celou dobu výzkumu. Také bych ráda poděkovala doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. a Mgr. Kateřině Bělonožníkové za konzultace a rady.

Děkuji Technologické agentuře České republiky (TA ČR) za finanční podporu v rámci projektu TJ01000451.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1. Houbové patogeny rodu <i>Verticillium</i>	10
2.2. Okruh hostitelů	10
2.2.1. Hostitelé <i>V. longisporum</i>	11
2.3. Výskyt ve světě	11
2.4. Způsob patogeneze, životní cyklus	12
2.5. Ekonomické ztráty a obrana zemědělských plodin	14
2.1. Obranné odpovědi rostlin	15
2.1.1. ROS	15
2.1.2. SOD	18
2.1.3. Fenolické sloučeniny	18
2.1.4. NADP-ME	20
2.1.5. G6PDH	20
2.1.6. SDH	21
3 Cíle práce	23
4 Materiál a metody	24
4.1. Použité chemikálie	24
4.2. Použité přístroje	25
4.3. Použité metody	25
4.3.1. Rostlinný materiál	25
4.3.2. Extrakce	26
4.3.3. Stanovení koncentrace proteinů	26
4.3.4. Stanovení enzymové aktivity dehydrogenas	26
4.3.5. Stanovení aktivity antioxidantních enzymů	27
4.3.6. Stanovení množství fenolických látek a antioxidantní kapacity	27
4.3.7. Metoda FRAP	28
4.3.8. Elektroforetické separace za nativních podmínek	29
4.3.9. Aktivita superoxiddismutasy (SOD)	29
4.3.10. Inhibice izoenzymů superoxiddismutasy	29
4.3.11. Statistická analýza	30
5 Výsledky	31
5.1. Stanovení koncentrace proteinů	31

5.2.	Aktivita dehydrogenas	32
5.3.	Stanovení aktivity antioxidačních enzymů	34
5.4.	Stanovení množství fenolických látek a antioxidační kapacity	35
5.5.	Aktivita superoxiddismutasy	36
6	Diskuse	39
7	Závěr.....	42
8	Zdroje	43

Seznam zkratek

BSA	Hovězí sérový albumin
CAM	Metabolismus kyselin u tučnolistých; z aj. Crassulacean acid metabolism
CAT	Katalasa
CPC1	Gen pro transkripční faktor v mezidráhové kontrole biosyntézy aminokyselin; z aj. Cross-pathway control protein 1
DPPH	2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl
EDTA	Etylendiamintetraoctan disodný (dihydrát)
FRAP	Redukční (antioxidační) síla schopná redukovat Fe ³⁺ ionty; z aj. Ferric reducing antioxidant power
FW	Čerstvá hmotnost; z aj. fresh weight
G6PDH	Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
GR	Glutathionreduktasa
GSSG	Oxidovaná forma glutathionu (disodná sůl)
HR	Hypersenzitivní odpověď; z aj. hypersensitive response
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkinasa; z aj. mitogen-activated protein kinase
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADP-ME	NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát-dekarboxylační)
NBT	Nitrotetrazoliová modř; z aj. Nitroblue tetrazolium
PCD	Programovaná buněčná smrt; z aj. programmed cell death
PVP	Polyvinylpolypyrrolidon
ROS	Reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
SHD	Šikimátdehydrogenasa
SOD	Superoxiddismutasa
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine

1 Úvod

Současná míra globalizace, mezinárodního pohybu lidí a zboží je hlavním důvodem rozšiřování nepůvodních druhů do jiných regionů. Jedná se především o houbové patogeny, rostliny a některé bezobratlé živočichy. Jejich nekontrolovatelné šíření má za následek invazivní chování těchto organismů v lokalitách, kde nemají přirozeného konkurenta či predátora. To má mnohdy velké hospodářské a ekologické dopady.

V rozvinutých zemích je snaha o preventivní opatření v podobě hraničních kontrol a inspekcí, kdy se zjišťuje biologická bezpečnost převážených druhů, a zabraňuje se jejich případnému vypouštění do volné přírody. Ochrana je důležitá především před novými škůdci a chorobami, které mohou napadat chovy zvířat či hospodářské plodiny. Ty pak mohou způsobovat v lokalitách závislých na zemědělské produkci velké ekonomické problémy [1].

Stálým problémem je právě také nekontrolovatelné šíření houbových patogenů, které jsou přenášeny vodou, hmyzem, infikovanými semeny, v některých případech větrem, ale také lidskou činností, ze zemí původu do jiných lokalit. Zde zůstávají po dlouhou dobu v půdě, kde může dojít k napadení dalších rostlin, případně k jejich kumulaci a následné hybridizaci patogenů nových.

V České republice se jedná jednak o zástupce oomycet (*Oomycota*), které jsou obligátní parazité, ale také o oportunní patogeny z říše hub (*Fungi*): vřeckovýtrusné (*Ascomycota*), stopkovýtrusné (*Basidiomycota*) a konidiální houby (*Deuteromycota*). Mezi oomycety patří především rody *Phytophthora* a *Pythium*. Nejčtenější houbové patogeny jsou z rodů *Thielaviopsis*, *Cylindrocarpon*, *Verticillium*, *Fusarium* a *Rhizoctonia* [2,3]. Patogeny, které jsou hrozbou pro Českou republiku jsou především houbové rody *Alternaria* a *Botrytis* (Deuteromycotina), *Peronospora* a *Bremia* (*Oomycota*) [4]. V souvislosti se zvýšenou produkcí řepky olejky v České republice jsou potenciální hrozbou také patogeny rodu *Verticillium*.

2 Teoretická část

2.1. Houbové patogeny rodu *Verticillium*

Verticillium longisporum je houbový rostlinný patogen rodu *Verticillium* z oddělení Ascomycet. Dříve byl tento druh zaměňován za druh nebo poddruh *V. dahliae*, ale již několik studií prokázalo odlišnost obou druhů v morfologických znacích, a především v rozdílné patogenezí na řepce olejce, kterou napadá pouze *Verticillium longisporum* [5]. Oba tyto druhy jsou diploidní, přestože mezi askomycety převažuje haploidní stav, avšak *V. longisporum* obsahuje téměř dvakrát více DNA. Je prokázáno, že tento druh vznikl evolučně nejméně třikrát, samostatnou hybridizací ze čtyř různých, po dlouhou dobu separovaných rodičovských druhů. Všechny linie mají společného rodiče, druh A1, který hybridizoval s druhy D1, *V. dahliae* linie D2 a *V. dahliae* linie D3 za vzniku tří různých linií *V. longisporum*. Nedostatek genetické variace a identické alely druhu A1 ukazují na nedávný původ [6].

Rod *Verticillium* je relativně malý, zahrnuje 10 druhů půdních hub, např. *V. albo-atrum*, *V. tricorpus*, *V. nubilum*, *V. lecanii*, *V. alfalfae*, *V. non-alfalfae*, *V. nigrescens* a *V. theobromae*. O druzích *V. longisporum*, *V. dahliae* a *V. albo-atrum* je známo, že způsobují chorobu rostlin zvanou verticiliové vadnutí [7–9].

2.2. Okruh hostitelů

Patogeny rodu *Verticillium* (především *V. dahliae*) napadají téměř 400 hostitelských rostlin, včetně hlavních zemědělských plodin: olejniny (řepku olejnou), obilí, kořenovou zeleninu, byliny, luštěniny, ovoce (peckovice, citrusy), ořechy i prádlné plodiny a tabák. Napadá též více než 60 rodů dřevin a bylinných okrasných rostlin a 25 rodů dvouděložných plevelů [10,11]. Mimo oblasti poznamenané lidskou činností, v přirozeném prostředí, přírodních rezervacích a chráněných přírodních oblastech byl výskyt druhů *Verticillium* zaznamenán pouze v rámci jednotek [12].

Kvůli historickému taxonomickému zaměňování rodů *V. dahliae* s *V. albo-atrum* a *V. longisporum* je obtížné určit zpětně přesné rozdělení hostitelů, které se navíc mnohdy překrývá, a je nutné podstupovat zpětně další analýzy [13]. Bylo potvrzeno, že z těchto tří druhů má největší okruh hostitelů *V. dahliae* [9,12], který je zároveň nejvíce virulentní [14]. U rodu *V. longisporum* je odlišení hostitelů zkomplikováno jeho hybridizací s rodem *V. dahliae*, během které došlo k posunu v preferencích hostitele a rozšíření patogenezí na

širší okruh hostitelů (např. na čeleď brukvovitých) [9]. Společnými hostiteli jsou artyčok, bavlna, lilek, hlávkový salát, rajče, vodní meloun, řepka olejná, křen, květák, zelí a lněná semena [14], cukrová řepa a *Arabidopsis thaliana* [9]. U jednotlivých hostitelů mohou druhy *Verticillium* vykazovat různou míru virulence, která se odvíjí právě od hostitele, a nikoliv od houbového druhu. Stejně patogenní jsou *V. longisporum* a *V. dahliae* na rostlinách vodního melounu [14]. Rozdílná patogenita se vyskytuje především u čeledi brukvovité.

2.2.1. Hostitelé *V. longisporum*

V. longisporum, bylo převážně zaznamenáno jako patogen čeledi brukvovité, která je druhem *V. dahliae* infikována relativně zřídka, díky své nízké virulenci na této čeledi. Nejvyšší virulenci projevovalo *V. longisporum* linie A1/D1 [14]. Jedná se především o řepku olejnou, květák, hlávkové zelí, polní hořčici, křen, ředkev ohnici, pekingské zelí, tuřín, cukrovou řepu, brukev řepku a růžičkovou kapustu [9,12,13]. Mezi brukvovitými ovšem existuje výjimka, kterou je brokolice. Ta nevykazuje příznaky verticiliového vadnutí ani po zasazení do zamořené půdy. *V. longisporum* kolonizuje pouze kortikální povrch kořenů brokolice, ale neprochází do vaskulárního systému [9]. Snad největší patogenitu způsobuje na řepce olejce, u které je nejčastější příčinou choroby verticiliové vadnutí [6], a v jejíž produkci působí celosvětově ekonomické ztráty.

Testy patogenity potvrzují, že *V. longisporum* má schopnost infikovat i rostliny mimo čeleď brukvovitých (viz. výše jmenovaný lilek, rajčata, salát či vodní meloun). U těchto hostitelů je *V. dahliae* rozšířenějším patogenním druhem, přesto byla u uvedených hostitelů vždy alespoň jedna z linií *V. longisporum* více nebo stejně virulentní než *V. dahliae* [14].

Verticiliové vadnutí je také jednou z nejvýznamnějších chorob rajčete [15]. Velkou roli v patogenitě tohoto hostitele kromě *V. dahliae* a *V. albo-atrum* má také *V. longisporum*, přestože jedna ze tří linií, *V. longisporum* A1/D1 rajče nenapadá [14].

2.3. Výskyt ve světě

Výskyt verticiliového vadnutí je částečně omezen zeměpisnými šířkami 60 ° s. š. a 50 ° j. š., nejvíce rozšířené je v mírných oblastech kvůli vyššímu teplotnímu rozmezí. Vlivem proměnlivého klimatu je choroba vážnější v horkých suchých letech. Její hojně rozšíření je dáno poměrným zastoupením druhu *V. dahliae*, který prospívá právě v teplejších lokalitách. Zároveň se nevyskytuje v tropických nížinných oblastech, a

v místech s přílišnou vlhkostí půd. Některé ze druhů (např. *V. albo-atrum*) se vyskytují spíše v chladnějších lokalitách [16]. Doklady výskytu rodu *Verticillium* jsou známé ve Francii, Španělsku, Itálii, Německu, Holandsku, Dánsku, Švédsku, Velké Británii, USA [10], Japonsku a také na Novém Zélandu [16].

První popis infekce *V. longisporum* u čeledi brukvovitých byl zaznamenán na růžičkové kapustě v Anglii v roce 1957. Jako patogen řepky olejky byl tento druh pozorován na jihu Švédska v roce 1969. Právě ve Švédsku způsobuje tato choroba dlouhodobě hospodářské ztráty. Toto rozsáhlé zamoření je zde pravděpodobně způsobeno intenzivním pěstováním monokultur řepky olejky v letech 1945–1955 [9,13]. Nyní je rozšířen po celé Evropě, zejména na jihu Švédska, v severním Německu, ve Francii, Polsku, Ukrajině a Velké Británii. Nedávné studie poukazují na přítomnost patogenu v Kanadě, Kalifornii a Rusku [6,9,17].

2.4. Způsob patogeneze, životní cyklus

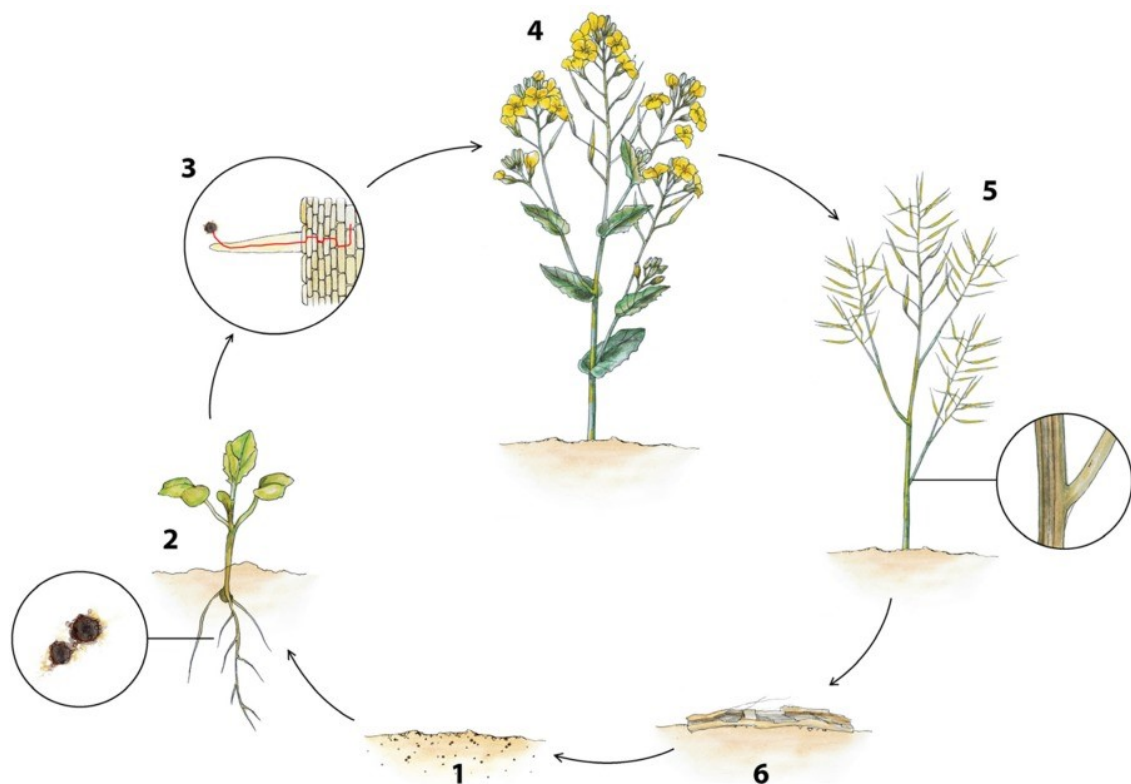
Proces infekce *V. longisporum* je velmi podobný procesu infekce *V. dahliae*, přestože jejich okruh hostitelů není totožný. Symptomy se mohou mezi hostiteli rostlin značně lišit, mezi nejčastější pozorované příznaky onemocnění patří charakteristické vadnutí rostlin, zakrnutí, chloróza, změna cév a časné zrání a stárnutí [9].

V. longisporum infikuje kořeny rostlin (Obr. 2.1, str 13). Nachází se v půdě v podobě tzv. mikrosklerotíí, což jsou klidové (latentní) shluky melanizovaných, tlustostěnných houbových buněk, vznikajících z hyf laterálním pučením. Z vnějších hyf sklerotia se vytváří pochva, vnitřek se diferencuje na tlustostěnnou kůru buněk a centrální část sestávající se z hyf s výživovou a skladovací funkcí. Z nich pak opět mohou klíčit hyfy, které rostou směrem ke kořenu rostliny [9,17].

Hyfy kolonizují povrch kořenových vlásků a rostou směrem ke kořenovým povrchům. Zde vstupují skrze kořenová poranění nebo přímým průnikem do epidermálních buněk laterálních kořenů. V kořeni již rostou hyfy směrem k centrálnímu válci, vstupují do xylému, šíří se jím směrem k výhonkům a kolonizují ho [18,19]. Xylémová tekutina poskytuje prostředí s omezenými zdroji uhlíku a nevyváženým zásobováním aminokyselinami, což vyžaduje, aby *V. longisporum* vyvolalo kontrolu biosyntézy aminokyselin [20]. Po většinu svého životního cyklu je patogen omezen na cévní systém ve stoncích, kde se nachází v latentní fázi [19]. Během této fáze infekce,

kteřá trvá po hlavní dobu vegetačního období, zůstává hostitelská rostlina bez symptomů nemoci [21].

Teprve během dozrávání rostliny začne patogen opouštět cévní svazky a začne se šířit hyfami nebo konidiosporami díky transpiračnímu proudu do horních částí rostlinného vaskulárního systému. Patogen také narušuje absorpci vody a transport rostlinou snížením průchodnosti xylému, což má za následek vadnutí – nejznámější příznak napadení rodem *Verticillium* [11]. Rostlina začíná uvadat od spodu, při delším trvání často sesychá celá. Během šíření patogenu v rostlině vzhůru xylémem dochází i částečné kolonizaci stonkového parenchymu a ke vzniku tmavého jednostranného pruhování, viditelného na stonku. V pozdější fázi se v odumírajících stoncích a listech začnou hojně tvořit černé melanizované mikrosklerotie v dřevu a pod stonkovou epidermis [21,22].



Obrázek 2.1: Životní cyklus *Verticillium longisporum* na řepce olejné (převzato z [9]). Mikrosklerotie jsou klidové struktury, které sídlí v půdě, kde čekají na dalšího hostitele a vhodné podmínky (1). Blízkost kořenů rostliny spustí klíčení hyf, které rostou směrem ke kořenům rostliny (2). Následně hyfa proniká do kořenového vlásku (3) a šíří se dál rostlinou ke xylému. Po většinu vegetačního období nejsou pozorovány žádné příznaky nemoci (4), teprve během dozrávání rostliny se na stonku objevuje tmavé jednostranné pruhování (5) a dochází k opadu listů. Nakonec se v kůře stonku začnou tvořit černé mikrosklerotie, které se při rozkladu rostliny uvolňují do půdy (6).

Mikrosklerotie se pak po odumření hostitelské rostliny a zetlení vrací zpět do půdy. Vznikají především za účelem překlenutí prostoru mezi půdními hostiteli, avšak při nepřítomnosti vhodného hostitele zůstávají mikrosklerotie v latentní formě v půdě až 14 let [11,21]. To usnadňuje šíření patogenů vodou, zemědělským zařízením a personálem [22]. Mohou přežít v celé řadě podmínek půdní vlhkosti a teploty, ale nejrychleji ztratí životaschopnost na extrémně vlhké a teplé půdě [23]. Organická dusíkatá hnojiva, typy půdy, ani hodnoty pH na výskyt verticiliového vadnutí neměly žádný vliv [24]. Míra onemocnění je úměrná hustotě mikrosklerotí v půdě. Mezní hustota, při které se již verticiliové vadnutí objevuje, je závislá na hostiteli.

2.5. Ekonomické ztráty a obrana zemědělských plodin

Tato choroba se objevuje těsně před sklizní, kdy bylo do výroby investováno mnoho a následkem bývají velké ekonomické ztráty [11,15]. V minulosti byly k dispozici mnohé fungicidy, které v různé míře inhibovaly houbové druhy rodu *Verticillium*. Patřily mezi ně např. maneb, mancozeb, oxychlorid měďnatý, dinocap, daconil 2787, prochloraz-Mn-komplex, formaldehyd, binapakryl, fluorosilikát sodný, dichlorvos a chlorpyrifos. Rezistentní byly naopak vůči fungicidům benomyl, chlortalonil, thiabendazol, diethofencarb a iprodion [25–27]. Používání většiny těchto fungicidů je již v Evropských zemích v dnešní době zakázáno. U mnoha z nich byly prokázány toxické, teratogenní a karcinogenní účinky na zvířata i na lidi. Ovšem i při použití fungicidů s menšími riziky dochází ke kumulaci jejich reziduí v půdách, ke kontaminaci podzemních vod i povrchových vodních ploch [28]. Proto je vhodné kontrolu *V. longisporum* stavět především na jiných zemědělských opatřeních. Vzhledem k dlouhému přežívání mikrosklerotí v půdě je vhodné prodloužit střídání hostitelských plodin s rezistentními plodinami na více než tři roky [24]. Dalšími opatřeními může být zpožděné setí či aplikace činidel biologické ochrany [21].

V neposlední řadě bylo částečné potlačení houbových patogenů rodu *Verticillium* dosaženo použitím hub rodů *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pythium*, *Fusarium* a *Gliocladium*, které kolonizují rhizosféru a působí jako antagonisté [15]. Mezi jejich projevy patří antibióza (*Trichoderma*, *Gliocladium*), kompetice (*Fusarium*) a parazitismus (*Pythium*, *Fusarium*). Některé z těchto druhů mohou v rostlině navodit obranné mechanismy a indukovat vznik rezistence (např. *Coletotrichum orbiculare*, *Trichoderma* sp.) [29].

Teprve nedávno byla u dvou druhů čeledi brukvovitých, brukev zelná (*B. oleracea*) a brukev řepák (*B. rapa*) nalezena zvýšená úroveň rezistence, a proto se tyto nové genotypy začlenily do šlechtitelských procesů brukve řepky (*B. napus*) s cílem zvýšit odolnost kultivarů. Tato cesta se ukázala dočasně jako nejúčinnější [21,24]. Genetická rezistence je současně nejvíce preferovanou metodou pro kontrolu nemoci [30]. Jednou z možností je např. ztlumení exprese dvou CPC1 izogenů (V1CPC1-1 a V1CPC1-2) *V. longisporum*, které kódují transkripční faktory regulující dráhy biosyntézy aminokyselin v rostlině. Takto geneticky vytvoření mutantní jedinci jsou vysoce citliví na nedostatek aminokyselin a u infikovaných rostlin vykazují méně příznaků, obzvláště u rostlin řepky olejky a rajčete, při jejichž infekci je pro *V. longisporum* tento gen stěžejní [20].

2.1. Obranné odpovědi rostlin

Rostliny reagují na změny okolního prostředí a brání se neustálému napadání patogenních hub, bakterií a virů. V rámci své ochrany rostliny vytvořily univerzální strukturální bariéry či biochemické mechanismy, které omezují infekci patogenem. Rostlinné genomy kódují stovky PR proteinů, které umožňují rychlé, nespecifické rozpoznání patogenu a vyvolání hypersenzitivní odpovědi (HR). Ta zahrnuje syntézu antimikrobiálních sekundárních metabolitů, produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a programovanou buněčnou smrt (PCD) lokalizovanou tak, že omezuje další postup patogenů [31,32].

V případě, že tyto obranné mechanismy nezabrání invazi patogenu a onemocnění, dokáží některé rostliny po rozeznání útočícího patogenu reagovat novými obrannými mechanismy, které se mohou stát specifickými pro daný druh. Je to jednak produkce sekundárních metabolitů, ale také změna metabolických cest. Takto dokáží invazi patogenu zpomalit, zastavit, či zmírnit její následky [19]. Úspěšná obrana rostlin závisí na schopnosti reagovat kaskádou specifických obranných odpovědí během systémové invaze a kolonizace patogenem.

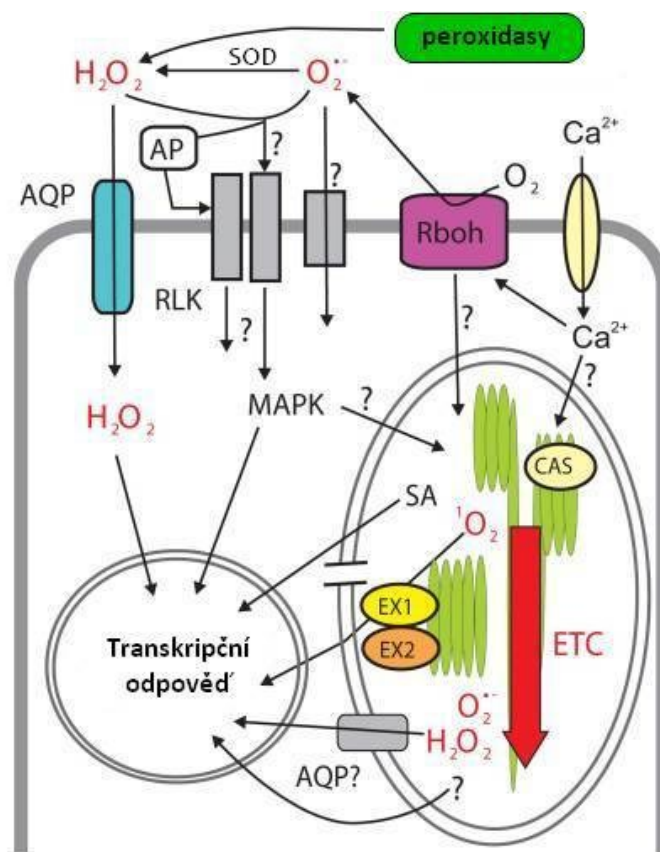
Choroby způsobené rodem *Verticillium* jsou vaskulární povahy. Úplná rezistence na vaskulární infekci je nepravděpodobná. Hostitelské rostliny mohou však i přes systémovou kolonizaci postrádat závažné příznaky, či se u nich mohou příznaky vyskytovat ve zmenšené míře [19,33].

2.1.1. ROS

Reaktivní formy kyslíku jsou v rostlinách zapojeny do mnoha signálních a regulačních drah souvisejících s růstem rostlin, vývojem, gravitropismem, hormonálními účinky,

modulací struktury polymerů buněčné stěny a dalšími fyziologickými jevy. Jsou využívány jako molekuly typu „druhý posel“ nebo signalizační meziprodukty. ROS jsou vytvářeny nepřetržitě během normálního aerobního metabolismu (oxidativní fosforylace v mitochondriích). Hlavně však hrají kritickou roli v procesech souvisejících s ochranou rostlin před biotickými a abiotickými stresy. V důsledku infekce patogenem se produkce ROS zvyšuje, výsledná nekontrolovaná oxidace vede k poškození buněk a k buněčné smrti, která zabraňuje další invazi patogenu [34,35].

ROS se začínají generovat v různých buněčných kompartmentech krátce po rozpoznání patogenu. Nejprve dochází k brzké akumulaci ROS v plastidech, způsobené

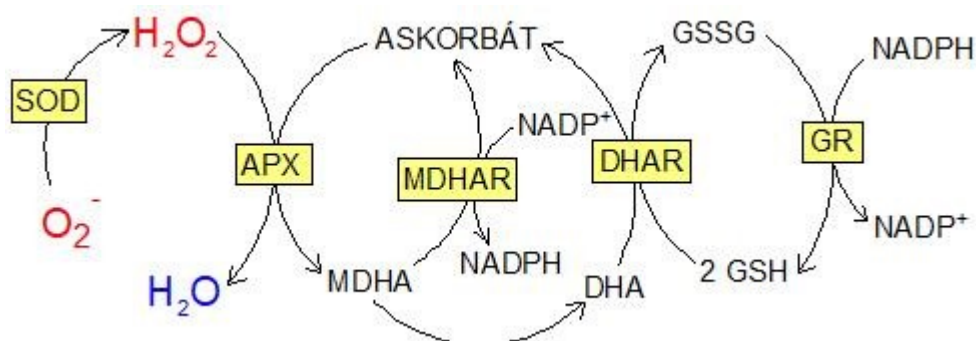


Obrázek 2.2 *Reaktivní formy kyslíku (ROS). Signální síť spojující apoplast, chloroplast a jádro. Apoplastické ROS jsou produkovány extracelulárními peroxidasami a NADPH oxidasami (Rboh) vázanými na plazmatickou membránu. Vznikající superoxid ($O_2^{\cdot-}$) je převeden na peroxid vodíku, který vstupuje do buňky akvaporinovými kanály (AQP) v plazmatické membráně nebo reaguje s extracelulárními (apoplastickými) proteiny (AP) či s transmembránovými sensorovými proteiny (RLKs), což nakonec vede ke změnám v genové expresi za využití intracelulárních signálních drah zahrnujících např. MAPK. Produkce extracelulárních ROS je zaznamenána v chloroplastu dosud neznámým mechanismem a je zde zvýšená tvorba ROS pomocí elektronového transportního řetězce (ETC). Zvýšená ROS uvnitř chloroplastu vede k přeprogramování transkripce prostřednictvím hormonální signalizace, např. zvýšení produkce kyseliny salicylové (SA). Kanálové proteiny (AQP) by mohly umožnit úniky ROS z chloroplastu do cytoplazmy. Vápenaté ionty (Ca^{2+}) se podílí na regulaci produkce ROS v apoplastech a chloroplastech. CAS...specifický protein vázající vápník, EX1 a EX2 ... singletovým kyslíkem indukované proteiny, které přenáší stresový signál z plastidu do jádra. Přeloženo z [36].*

mitogenem aktivovanými proteinkinasami (MAPK) a dysfunkcí fotosyntetického transportního řetězce elektronů. Chloroplasty jsou hlavním zdrojem ROS v rostlinách, k další produkci dochází v mitochondriích a peroxisomech. Odtud se pravděpodobně šíří signál do apoplastu, ve kterém se spouští další produkce ROS, do které jsou s největší pravděpodobností zapojeny NADPH oxidasy plazmatické membrány a peroxidasy buněčné stěny [31] (Obr. 2.2, str.16).

Z apoplastu se ROS signál šíří dále k sousedním buňkám, v nichž může vést k indukci zesílení polysacharidů a ligninu a zesilovat tak buněčné stěny. Na druhou stranu vede také k hypersenzitivní reakci v podobě oxidace lipidů a proteinů, čímž dochází k poškození membrány, což v konečném důsledku vede k buněčné smrti v oblasti počínající infekce. Regulační funkce ROS v obraně rostlin jsou spojené s dalšími signalizačními molekulami rostlin, především s kyselinou salicylovou (SA) a oxidem dusnatým (NO).

Mezi ROS patří peroxid vodíku H_2O_2 , superoxidový aniont $O_2^{\bullet-}$, hydroxylový radikál OH^{\bullet} a singletový kyslík 1O_2 . V organismech je snaha o udržování jejich hladiny v rámci udržení homeostázy v různých kompartmentech buněk. Rostliny si vyvinuly enzymatický i neenzymatický antioxidační systém, aby se ochránily před oxidativním poškozením a pro modulaci nízkých hladin ROS pro přenos signálu. Součástí tohoto systému jsou molekuly a enzymy zachycují ROS (askorbátperoxidasy, glutathion, superoxidodismutasy (SOD, EC 1.15.1.1), kalatasy, dehydroaskorbátreduktasy, glutathionreduktasy, glutathion-S-transferasy a peroxiredoxin) (Obr. 2.3). Regulace



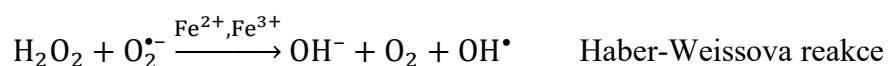
Obrázek 2.3 *Askorbát-glutathionový cyklus. Superoxidy vznikající v rostlinách jsou enzymem superoxidodismutasa (SOD) přeměněny na peroxid vodíku, který je v následujícím kroku eliminován askorbátperoxidasou (APX) za současné přeměny askorbátu na monodehydroaskorbát (MDHA). Jedním enzymem, který regeneruje MDHA na askorbát je monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR), vedlejším produktem reakce je NADPH. Druhým regeneračním enzymem je dehydroaskorbátreduktasa (DHAR), která současně oxiduje redukovanou formu glutathionu (GSH). Vzniklá oxidovaná forma glutathionu (GSSG) je redukována glutathionreduktasou (GR) za spotřeby NADPH.*

těchto enzymů bývá zprostředkována kyselinou salicylovou a v případě infekce může zvýšit produkci ROS a aktivaci obranného systému [36,37].

2.1.2. SOD

Superoxiddismutasy jsou enzymy katalyzující rozklad superoxidových radikálů na kyslík a peroxid vodíku (tzv. dismutace). SOD je nejdůležitějším enzymem, který tyto radikály v buňkách odbourává a má hlavní roli v obraně proti toxicky redukovaným formám kyslíku. Vzhledem ke zvýšené produkci ROS v průběhu infekce rostliny je SOD důležitá právě pro snášenlivost rostlinných stresů, protože pomáhá udržovat homeostázu ROS v oddělených buněčných kompartmentech [38].

Peroxid vodíku a superoxidové radikály jsou samotné relativně nereaktivní. V přítomnosti např. železitých iontů mohou reagovat Haber-Weissovou reakcí za vzniku hydroxylových radikálů.



Hydroxylové radikály mohou způsobovat peroxidaci lipidů, denaturaci proteinů a mutaci DNA. Je však možné je snadno enzymově regulovat a eliminovat tak tuto hrozbu.



Superoxiddismutasa reaguje se superoxidovými radikály za vzniku peroxidu vodíku. SOD je zpětnovazebně regulována koncentrací O_2 a H_2O_2 [39].

Existují tři izoformy tohoto enzymu, které jsou pojmenovány podle aktivního iontu kovu, který se v molekule nachází (měď/zinek, mangan a železo). Pouze v rostlinách lze nalézt všechny tři formy. Cu/Zn-SOD se nachází v cytoplasmě, jádře a lysozomech, Fe-SOD v chloroplastech a cytoplasmě, Mn-SOD se vyskytují především v mitochondriích [40].

2.1.3. Fenolické sloučeniny

Produkce fenolických sloučenin hraje důležitou roli nejen v obraně rostlin proti patogenům, ale také v normálním růstu a vývoji rostlin. Jsou produkty sekundárního metabolismu a patří mezi ně např. fenolické kyseliny (kyselina salicylová), deriváty kyseliny benzoové, kumariny, flavonoidy, anthokyaniny, taniny a ligniny. Syntéza přirozeně se vyskytujících fenolických sloučenin je zajištěna především šikimátovou, fenylypropanoidovou, a polyketidovou dráhou [41].

Rezistence rostlin proti *V. longisporum* souvisí se změnami ve fenolickém složení kořenových a stonkových tkání, se změnami v cévních buněčných stěnách a s cévními okluzemi vyskytujícími se ve vaskulární tkáni při pozdějších stádiích infekce [19].

V reakci na vniknutí patogenů dochází nejprve k smrti hostitelských buněk a k nekróze. Následně rostlina zahajuje rychlou produkci a akumulaci fenolických sloučenin v místě infekce. Tyto sloučeniny následně zpomalují nebo úplně zastavují růst patogenu a umožňují aktivaci „sekundárních“ strategií, které by důkladněji omezily patogen. Těmi jsou například modifikace buněčných stěn fenolickými substituenty nebo fyzickými bariérami jako jsou apozice nebo papily a také syntéza specifických antibiotik jako jsou např. fytoalexiny [33].

Fenylpropanoidová dráha produkuje fenolické látky, které mají důležité biologické funkce: např. jako signální molekuly v obranných reakcích, látky přímo vykazující antimikrobiální aktivitu, látky podílející zesílení buněčné stěny (lignin, suberin, konjugáty kyseliny hydroxyskořicové) nebo modulátory rostlinných hormonů v obranné signalizaci či jako antioxidanty reaktivních forem kyslíku (flavonoidy).

Nejzásadnější roli má lignin, který je hlavní strukturální složkou buněčných stěn vaskulární tkáně a vláken v rostlinách [42]. Lignin je polymer aromatických podjednotek odvozených od fenylalaninu (fenylpropanoidové estery jako např. kyselina kumarová, ferulová, sinapová). Jako matrice kolem polysacharidových složek rostlinných buněčných stěn zajišťuje tuhost, pevnost a zesílení buněčné stěny, činí stěny hydrofobními a vodě nepropustnými, hraje také roli v odolnosti vůči patogenům. Během normálního vývoje rostliny se lignin vyskytuje pouze v buňkách xylému a sklerenchymu. Nadměrné hromadění a ukládání ligninu a podobných polymerů do buněčné stěny bývá indukováno v ostatních typech buněk mechanickým poškozením, poraněním, mikrobiální infekcí či stresem [43]. Předpokladem je, že ukládání ligninu snižuje difúzi enzymů a toxinů uvolňovaných z patogenních houbových hyf do hostitele, a naopak vody a živin z hostitele do houby. Také fenolické prekurzory ligninu mají antimykotickou aktivitu. Mohou inaktivovat fungální membrány, enzymy, toxiny a elicitory. Houbové hyfy mohou být lignifikované a ztratit plasticitu nezbytnou pro růst. [44]

Velmi důležitou fenolickou sloučeninou je také kyselina salicylová, která v rostlinách vyvolává kvetení. Jedná se o důležitou signalizační molekulu, která se v reakci na napadení patogenem akumuluje v rostlině a aktivuje různé reakce na ochranu

roślin. Indukuje expresi rostlinných obranných genů a získanou systémovou rezistenci vůči další infekci spektrem patogenů [45], má vliv na aktivitu řady enzymů i jejich syntézu, amplifikuje tvorbu volných radikálů a s tím ovlivňuje i smrt hostitelských buněk [46].

2.1.4. NADP-ME

Při biotickém stresu se v některých modelových systémech rostlina-stresor zvyšuje aktivita NADP-malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40), která katalyzuje oxidační dekarboxylaci malátu za současné redukce koenzymu NADP^+ . Vznikajícími produkty jsou pyruvát, CO_2 a NADPH. Kofaktory této reakce jsou dvojmocné ionty kovů (hořečnaté nebo manganaté). NADP-ME je důležitý především v C_4 a CAM rostlinách, ve kterých uvolňuje CO_2 využívaný k fixaci uhlíku enzymem Rubisco [47,48].

NADP-ME má však velký význam i v obraně rostlin. Bylo zaznamenáno jeho zvýšené množství při stresu, poranění nebo vystavení UV záření [49]. Jeho hlavní role je v produkci NADPH, které je během infekce využíváno pro syntézu ROS a biosyntézu monoligninu a následnou syntézu ligninu nebo pro syntézu flavonoidů, mastných kyselin. Vyšší aktivita NADP-ME během biotického stresu je nejspíše spojena právě s nutností zvýšené produkce NADPH. Další produkt reakce, pyruvát, může být využit ke získání energie v mitochondriích, či jako prekurzor fosfoenolpyruvátu pro šikimátovou dráhu [47,49,50] .

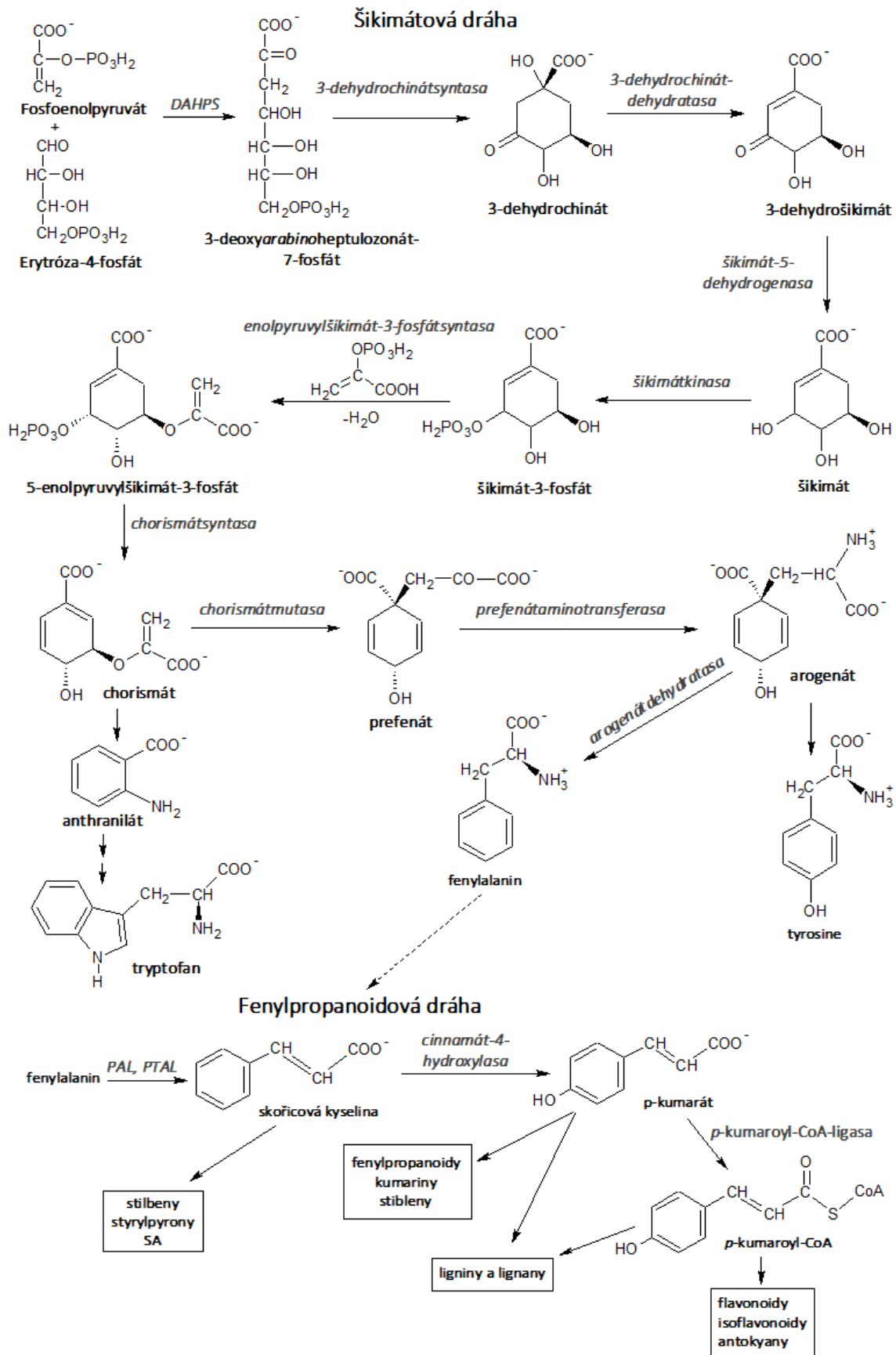
2.1.5. G6PDH

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (EC 1.1.1.49) je stěžejním enzymem pro pentosafosfátový cyklus, kde v prvním kroku katalyzuje přeměnu glukosy-6-fosfátu na 6-fosfoglukono- δ -lakton za současné redukce koenzymu NADP^+ . Hlavním produktem pentosafosfátového cyklu je NADPH a další pětiuhlíkaté meziproducty cyklu (ribulosa-5-fosfát) [48]. G6PDH se vyskytuje v několika izoformách, hlavně v cytosolu (NbG6PDH-Cyto) a plastidech (NbG6PDH-P1 a NbG6PDH-P2) [51]. V důsledku infekce patogenem dochází ke zvýšení aktivity G6PDH i k další syntéze enzymu právě pro zvýšení množství NADPH v cytosolu, které je využíváno v ochraně rostlin [52,53]. U rostlin s umlčenou izoformou NbG6PDH-P2 byla po infikování patogenem pozorována nižší HR, buněčná smrt v místě vstupu patogenu byla pozorována v menší

míře a snižena byla i produkce ROS, a proto se patogen mohl více šířit. Pro obranu rostlin je tedy stěžejní tato chloroplastová P2 izoforma G6PDH [51].

2.1.6. SDH

Šikimátdehydrogenasa (EC 1.1.1.25) je enzym vyskytující se v plastidech. Katalyzuje reverzibilní přeměnu 3-dehydrošikimátu na šikimát za spotřeby NADPH. Je enzymem šikimátové dráhy (Obr 2.4, str. 22), která vede k biosyntéze aromatických aminokyselin. Na ni navazuje fenylypropanoidová dráha, produkující sekundární metabolity rostlin, především fenolické látky, které se uplatňují v obraně rostlin [54]. Šikimátová dráha obsahuje sedm kroků, které začínají kondenzací fosfoenolpyruvátu a erytróza-4-fosfátu za vzniku 3-deoxyarabinoheptulozonát-7-fosfátu. Třetí a čtvrtý krok cyklu je katalyzován šikimátdehydrogenasou ve spojení s 3-dehydrochinátdehydratasou (EC 4.2.1.10). Tento bifunkční enzym katalyzuje dehydrataci dehydrochinátu na 3-dehydrošikimát a reverzibilní redukci 3-dehydrošikimátu na šikimát. Konečným produktem šikimátové dráhy je chorismát, který je prekurzorem aromatických aminokyselin [55].



Obrázek 2.4 Šikimátová a fenylpropanoidová dráha, které vedou k biosyntéze aromatických aminokyselin, sekundárních metabolitů rostlin, především fenolických sloučenin, které hrají velkou roli v obraně rostlin. DAHPS ... deoxyarabinoheptulozónát-7-fosfát-syntasa; PAL ... fenylalaninamoniumlyasa; PTAL ... fenylalanin/tyrosinamoniumlyasa.

3 Cíle práce

Cílem práce bylo sledovat vliv aplikace prostředku biologické ochrany (obsahující *Pythium oligandrum*) na metabolismus rostlin rajčete infikovaných houbovým patogenem *Verticillium longisporum*, jmenovitě na:

- antioxidační kapacitu a antioxidační systém infikovaných rostlin rajčete (aktivitu antioxidačních enzymů SOD, katalasy a glutathionreduktasy a na izoenzymové složení SOD)
- aktivitu NADP-dependentních enzymů infikovaných rostlin rajčete (G6PDH, NADP-ME, SDH)

4 Materiál a metody

4.1. Použité chemikálie

2,2-difenyyl-1-pikrylhydrazyl	(Sigma-Aldrich, USA)
2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin	(Sigma-Aldrich, USA)
2-amino-2-metyl-1-propanol	(Sigma-Aldrich, USA)
Akrylamid	(Sigma-Aldrich, USA)
Bisakrylamid	(Sigma-Aldrich, USA)
Bradfordovo činidlo	(Sigma-Aldrich, USA)
Bromfenolová modř	(Sigma-Aldrich, USA)
Coomassie Brilliant Blue	(Sigma-Aldrich, USA)
Dihydrogenfosforečnan draselný	(Lachema-Chemapol, ČSSR)
Ethanol 96 %	(Lach-Ner, ČR)
Etylendiamintetraoctan disodný (dihydrát)	(Sigma-Aldrich, USA)
Fenol	(Sigma-Aldrich, USA)
Fenolové činidlo Folin-Ciocalteu	(Dr. Kulich Pharma, ČR)
Glukosa-6-fosfát	(Sigma-Aldrich, USA)
Glycerol bezvodý	(Lach-Ner, ČR)
Glycin	(Lach-Ner, ČR)
Hovězí sérový albumin	(Sigma-Aldrich, USA)
Hydrogenfosforečnan sodný (dihydrát)	(Lachema-Chemapol, ČSSR)
Hydroxid sodný	(Penta, ČR)
Chlorid hořečnatý (hexahydrát)	(Sigma-Aldrich, USA)
Chlorid železitý (hexahydrát)	(Sigma-Aldrich, USA)
Kapalný dusík	(Linde Gas, ČR)
Kyanid draselný	(Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina askorbová	(Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina chlorovodíková 35 %	(Lach-Ner, ČR)
Kyselina octová 99 %	(Lach-Ner, ČR)
Kyselina šikimová	(Sigma-Aldrich, USA)
Malát sodný	(Sigma-Aldrich, USA)
N,N,N',N'-tetrametyletyldiamin	(Thermo, Japonsko)
Nikotinamidadeninindinukleotidfosfát	(Roche, Německo)
Nitroblue tetrazolium	(Sigma-Aldrich, USA)

Octan sodný krystalický	(Lachema, ČR)
Oxidovaná forma glutathionu (disodná sůl)	(Roche, Německo)
Peroxid vodíku 30 %	(Lach-Ner, ČR)
Peroxodisíran amonný	(Sigma-Aldrich, USA)
Polyvinylpolypyrrolidon	(Sigma-Aldrich, USA)
Redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát	(Sigma-Aldrich, USA)
Riboflavin	(Sigma-Aldrich, USA)
Sacharosa	(Penta, ČR)
Trolox	(Sigma-Aldrich, USA)
Uhličitan sodný bezvodý	(Lachema, ČR)

4.2. Použité přístroje

Analytické váhy: Entris	(Satorius Lab Instruments, Německo)
Analytické váhy: XE-100A	(Denver Instruments Company, USA)
Centrifuga: Univerzal 32R	(Hettlich, Německo)
Elektroforetická aparatura: Multigel	(Biometra, Německo)
pH metr: UltraBASIC UB-10	(Denver Instruments Company, USA)
Posvěcovač: Slimlite plátno	(Kaiser, Německo)
Spektrofotometr: Helios γ	(Thermo Scientific, USA)
Spektrofotometr: Multiscan go	(Thermo Scientific, USA)
Spektrofotometr: Ultrospec 2100	(Amersham Pharmacia Biotech, USA)

4.3. Použité metody

4.3.1. Rostlinný materiál

Experimentálním materiálem byly rostliny rajčete (*Solanum lycopersicum* L cv. *Micro-Tom*), které byly laskavě poskytnuty Ing. Tomášem Vaňkem Ph.D. (Biopreparáty.s.r.o). Semena byla ošetřena inokulem obsahujícím $12,0 \times 10^6$ oospor \cdot g $^{-1}$ izolátu *Pythium oligandrum*. Byly použity tři izoláty: komerčně používaný preparát M1 a dva dosud nepoužívané izoláty X42 a X48. Všechna semena společně s neošetřenými kontrolními semeny byla vyseta do květináčů s půdou a pěstována v kultivační místnosti při teplotě 20 °C, 60 % relativní vlhkosti vzduchu a osvětlení 150 μ mol fotonu \cdot m 2 \cdot s $^{-1}$. V místnosti byl režim 16 hodin světlo / 8 hodin tma. Po dvou týdnech kultivace byly listy rostlin inokulovány houbovým patogenem *Verticillium longisporum*. Každá skupina obsahovala nejméně deset rostlin, ze kterých byly po dvou týdnech od inokulace

odebrány 1 g směsné vzorky listů, které byly okamžitě zmrazeny v kapalném dusíku a uchovávány při -78 °C.

4.3.2. Extrakce

Vzorky listů zmrazené v kapalném dusíku byly převedeny do třecí misky a byly homogenizovány. Poté byl přidán pufr A v poměru 1:1 nebo 50% ethanol v poměru 3:1 a po rozetření listů byl vzorek 20 minut extrahován při laboratorní teplotě. Poté byl převeden do plastové mikrozkušavky. K extraktům v pufru A bylo přidáno přibližně 0,02 g/ml PVP, pro snížení vlivu fenolických sloučenin na enzymovou aktivitu. Extrakty byly centrifugovány při 4 °C, 16 600x g, po dobu 15 minut. Byl odebrán supernatant, který byl naším zásobním roztokem vzorku.

4.3.3. Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou podle Bradforda, při které lze pozorovat barevnou změnu z červené na modrou při navázání činidla Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein. Vznik této vazby posouvá absorpční maximum barviva z 465 na 595 nm, sleduje se zvýšení absorpce při 595 nm [56].

Do mikrotitrační destičky byl pipetován 16x zředěný extrakt po 5 μ l, nejméně v triplikátech. K tomuto objemu bylo přidáno 200 μ l Bradfordova činidla Coomassie Brilliant Blue a po 10 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla proměřena absorbance při vlnových délkách 595 a 450 nm. Od naměřených hodnot byla odečtena hodnota slepého vzorku, ve kterém byl extrakt nahrazen 5 μ l pufru A.

Pro stanovení kalibrační křivky byly místo extraktu použity roztoky BSA o koncentracích v rozmezí 0,1 – 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.3.4. Stanovení enzymové aktivity dehydrogenas

Pro měření enzymových aktivit byly použity vzorky extrahované v pufru A s přidaným PVP. V následujících třech metodách byl spektrofotometricky sledován vznik NADPH, který se projevuje absorpcí při 340 nm. Měření bylo prováděno ve standardizovaných plastových a křemenných kyvetách o tloušťce 10,0 mm. K reakční směsi bylo přidáno vždy 50 μ l extraktu a po rychlém promíchání byla změřena aktivita při 340 nm po dobu 120 s.

Pro měření aktivity NADP-ME byla reakční směs připravována v následujícím složení: 100 mM Tris-HCl pufr (pH 7,4); 10 mM malát; 2 mM roztok chloridu hořečnatého a 0,2 mM roztok NADP⁺.

Reakční směs pro měření aktivity G6PDH byla připravována o celkovém složení: 100 mM Tris-HCl (pH 7,4); 5 mM roztok glukosy-6-fosfát; 3 mM roztok chloridu hořečnatého; 0,2 mM NADP⁺.

Dále byla měřena aktivita šikimátdehydrogenasy. Reakční směs byla připravená v následujícím složení: 100 mM 2-amino-2-metyl-1-propanolový pufr (pH 9,0); 3 mM roztok šikimátu; 0,2 mM roztok NADP⁺.

4.3.5. Stanovení aktivity antioxidačních enzymů

4.3.5.1. Enzymová aktivita katalasy (CAT)

Enzymová aktivita katalasy byla měřená v křemenné kyvetě o šířce 10,0 mm. Byl sledován spektrofotometricky rozklad peroxidu vodíku po dobu 60 s a pokles absorbance při 240 nm. Pro měření byl používán extrakt v pufru A. Reakční směs o celkovém objemu 3 ml obsahovala 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0); 20 mM peroxidu vodíku, a nakonec bylo přidáno 300 μ l třikrát zředěného extraktu.

4.3.5.2. Enzymová aktivita glutathionreduktasy (GR)

K měření enzymové aktivity glutathionreduktasy byly použity vzorky extrahované v pufru A. Při spektrofotometrickém měření byl sledován úbytek množství NADPH v reakci v křemenné kyvetě o tloušťce 10,0 mm při 340 nm. Reakční směs o celkovém objemu 3 ml obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr (pH 8,0); 1 mM EDTA; 1,3 mM GSSG; 0,1 mM NADPH, a nakonec bylo přidáno 100 μ l extraktu.

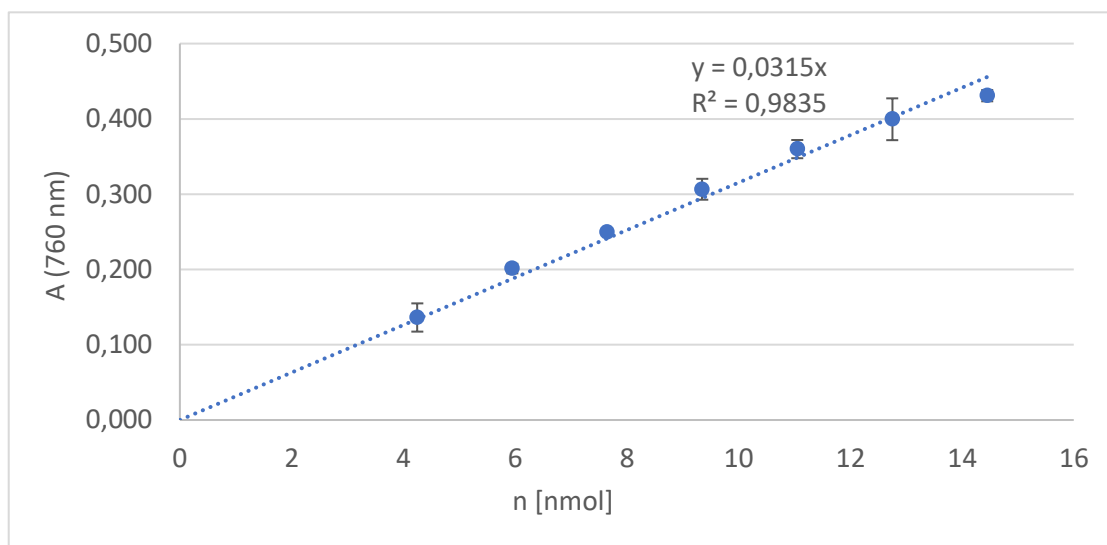
4.3.6. Stanovení množství fenolických látek a antioxidační kapacity

4.3.6.1. Stanovení obsahu fenolických látek

Ke stanovení množství fenolických látek byl využíván extrakt v 50 % ethanolu. Extrakt byl 16x a 32x ředěn. Měření bylo prováděno na mikrotitračních destičkách a byla měřena antioxidační aktivita fenolických látek za reakce fenolátového aniontu s Folin-Ciocalteuovým činidlem za vzniku sloučeniny modré barvy. Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno minimálně v triplicátech 20 μ l zředěného extraktu a 100 μ l 20 % Folin-Ciocalteuova činidla. Po 4 minutách inkubace při laboratorní teplotě bylo přidáno

80 μl roztoku $75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (w/v) Na_2CO_3 . Po dalších 30 minutách inkubace byla měřena absorbance při 760 nm. Byl sledován úbytek absorbance oproti blanku.

Při kalibraci byl extrakt nahrazen roztoky fenolu o koncentracích 250-850 $\mu\text{mol/l}$.



Obrázek 4.1: Kalibrační přímka závislosti absorbance na látkovém množství fenolu; parametry kalibrační křivky: $A=0,0315 n(\text{fenol})$ [nmol], $R^2=0,9832$.

4.3.7. Metoda FRAP

Metodou FRAP byly stanoveny antioxidační vlastnosti vzorků sledováním schopnosti redukovat tripyridyltriazin železitý ($\text{Fe}^{\text{III}+}$ -TPTZ) na jeho železnatou formu ($\text{Fe}^{\text{II}+}$ -TPTZ) za vzniku modrého zabarvení, a to za přítomnosti nízkého pH. Byla sledována absorbance při 593 nm. Bylo připraveno čerstvé FRAP činidlo, které bylo vždy chráněno před světlem, o celkovém objemu 30 ml a složení: 25 % (v/v) $700 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TPTZ rozpuštěném v 40 mM HCl, 3 ml 10 % (v/v) 20 mM FeCl_3 a 19,5 ml 65 % (v/v) 300 mM acetátový pufr (pH 3,6).

Do jednotlivých jamek mikrotitračních destiček bylo pipetováno vždy minimálně v triplicátech 40 μl 32x zředěného extraktu a 200 μl FRAP činidla. Po desetiminutové inkubaci byla změřena absorbance při 593 nm. U slepého vzorku byl extrakt nahrazen deionizovanou vodou.

U kalibrace byl extrakt nahrazen roztokem kyseliny askorbové v rozsahu 10-100 $\mu\text{mol/l}$. Roztok kyseliny askorbové byl také chráněn před světlem.

4.3.8. Elektroforetické separace za nativních podmínek

Elektroforetická separace byla vždy prováděna za nativních podmínek, aby neprobíhala denaturace proteinů, které byly následně v gelu zviditelňovány. Zaostřovací gel byl vždy připravován 5 %, separační gel byl vždy 10 %.

Složení zaostřovacího gelu zahrnovalo 5 % (w/v) 30% roztok akrylamidové směsi (28,2 % (w/v) akrylamid a 0,8 % (w/v) bisakrylamid); 1,5 M Tris-HCl pufr (pH 8,8); 0,1 % (w/v) glycerol; 0,1 % (w/v) peroxodisíran amonný a 0,1 % (v/v) TEMED. Separační gel obsahoval 10 % (w/v) akrylamidovou směs; 1,0 M Tris-HCl pufr (pH 8,8); 0,1 % (w/v) glycerol; 0,1 % (w/v) peroxodisíran amonný a 0,01 % (v/v) TEMED. Poslední dvě složky spolu reagují a spouští polymeraci akrylamidu a zesíťování biskarylamidem, proto byly přidávány až nakonec.

Používaný elektrodový pufr měl složení: 1,88 % (w/v) Tris a 0,001 % (v/v) glycerol. Extrakty byly zahuštěny pevnou sacharózou za vzniku 20 % (w/v) roztoku. U extraktů byl zjištěn obsah proteinů a ve stejných poměrech těchto obsahů byly pipetovány objemy extraktů do jamek gelů. Do elektrodového pufru v horní části aparatury bylo pipetováno 150 μ l 0,1 % (w/w) bromfenolové modři, díky které bylo zvýrazněné čelo elektroforézy. Napětí při průchodu zaostřovacím pufrem bylo na elektroforetické aparatuře nastaveno na 70 V, při příchodu bylo napětí zvýšeno na 140 V. Ve chvíli, kdy elektroforetické čelo dosáhlo kraje gelu, byla elektroforéza ukončena.

4.3.9. Aktivita superoxiddismutasy (SOD)

Superoxiddismutasa katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku a O₂. Extrakty byly elektroforeticky separované za nativních podmínek (viz. předchozí kapitola). Gely byly následně inkubovány bez přístupu světla v termostatu při 37 °C v reakční směsi: 1,5 mM EDTA; 70 mM KH₂PO₄; 6 mM riboflavin; 0,47 % (v/v) TEMED a 0,3 % (w/v) NBT. Poté byly promyty deionizovanou vodou, převrstveny tenkou vrstvou deionizované vody a 15-20 minut ponechány pod zářivkou. Gel se na místech, kde nedošlo k reakci se SOD zabarvil do modra díky fotoreakci NBT za vzniku formazanu.

4.3.10. Inhibice izoenzymů superoxiddismutasy

Byla prováděna inhibice dvou izoform SOD v gelu. Peroxid vodíku inhibuje Fe-SOD i Cu/Zn-SOD a kyanid draselný inhibuje pouze Cu/Zn-SOD.

Jeden gel byl vždy vložen na 30 minut do inhibičního roztoku obsahujícího 1 mM EDTA, 50 mM KH_2PO_4 a 5 mM H_2O_2 . Během inhibice byla reakce chráněná před světlem. Následně byl gel omyt deionizovanou vodou a vložen na 20 minut do reakční směsi (stejně jako v předešlé kapitole).

Druhý gel byl vložen na 30 minut do inhibičního roztoku o složení: 1 mM EDTA, 50 mM KH_2PO_4 , 2 mM KCN. Další postup byl totožný s inhibicí peroxidem vodíku.

4.3.11. Statistická analýza

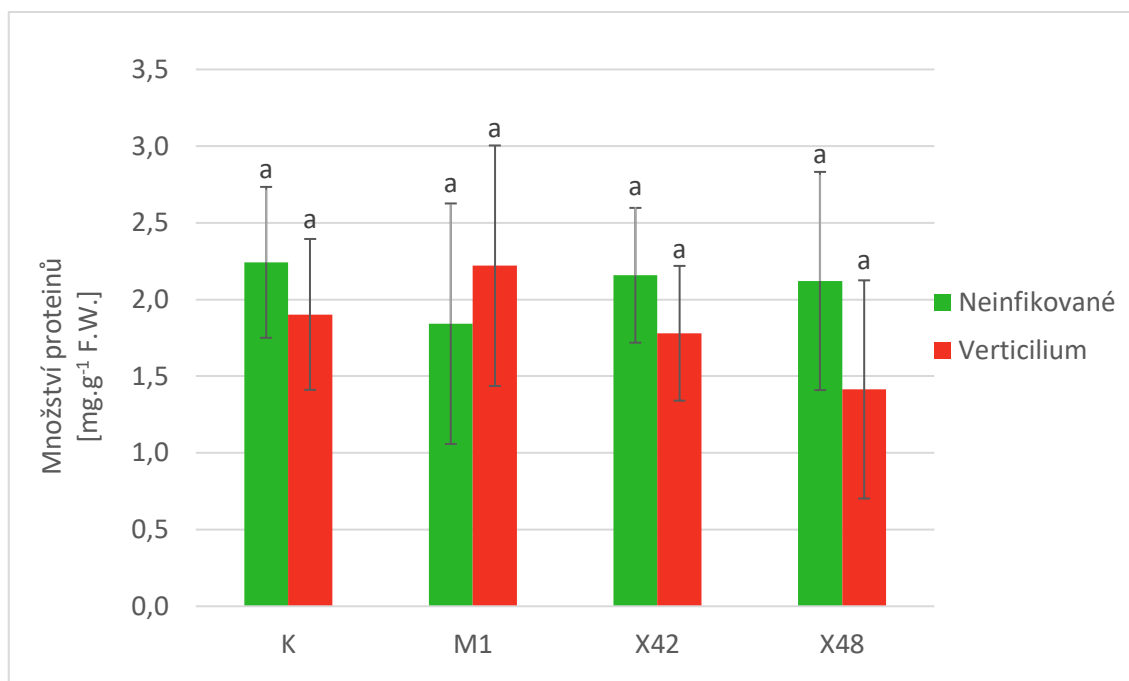
Každá biologická skupina obsahovala 10 rostlin rajčete. Všechna měření byla provedena nejméně v triplikátech. Data byla analyzována pomocí programu One Way ANOVA (Holm-Sidakova metoda), rozdíly byly považovány za významné při hodnotě $P \leq 0,05$.

5 Výsledky

Byly sledovány změny aktivit enzymů, antioxidační kapacity, množství proteinů a fenolických sloučenin u rostlin rajčete po infikování houbovým patogenem *V. longisporum*. Zároveň byl sledován vliv ošetření semen pomocí biologických preparátů *Pythium oligandrum*, konkrétně třemi izoláty M1, X42 a X48. Měřené hodnoty byly zjišťovány z extraktů listů rostlin rajčete a porovnávány s kontrolními rostlinami, neošetřenými žádným izolátem (K).

5.1. Stanovení koncentrace proteinů

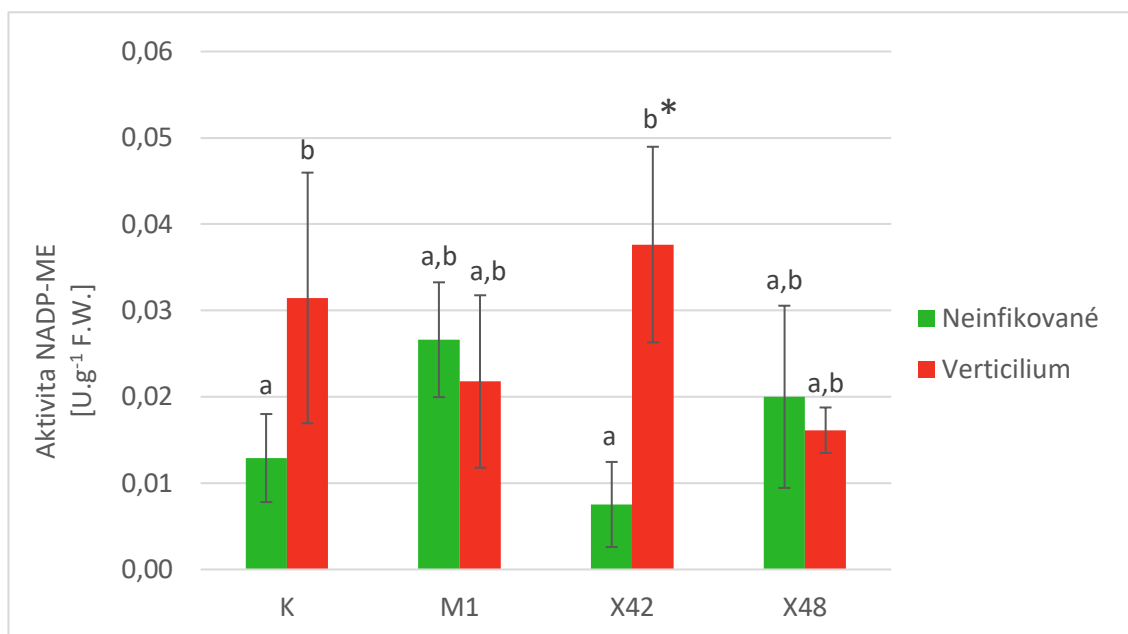
Množství rozpuštěných proteinů v extraktech bylo stanovováno metodou podle Bradforda. Hodnoty koncentrace vztažené na čerstvou hmotnost se pohybovaly kolem $2,00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (Obr. 5.1). Kontrolní rostliny napadené patogenem vykazovaly mírné snížení obsahu proteinů oproti neinfikovaným kontrolním rostlinám. U rostlin ošetřených M1 došlo naopak k mírnému zvýšení obsahu proteinů u infikovaných rostlin. Po ošetření X42 a X48 byla koncentrace proteinů podobná, avšak u infikovaných rostlin se koncentrace v obou případech snížila.



Obrázek 5.1 Vliv ošetření semen izoláty *Pythium* (M1, X42 a X48) na množství rozpustných proteinů v listech rostlin rajčete infikovaných houbovým patogenem *V. longisporum* (červená barva) a neinfikovaných (zelená barva); množství vyjádřené na 1 g čerstvé hmotnosti [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ F.W.]. K jsou kontrolní, neošetřené rostliny. Stejně písmeno nad sloupcem značí podobnou hodnotu v rámci statistického vyhodnocení One-way ANOVA, odlišné hodnoty s $P \leq 0,05$ by byly označeny jiným písmenem.

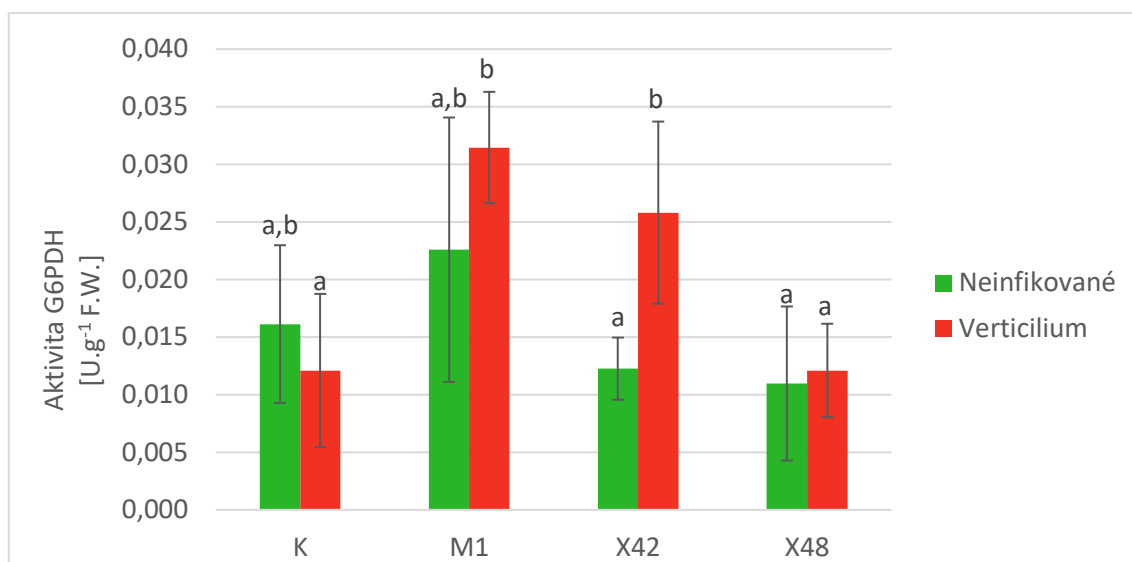
5.2. Aktivita dehydrogenas

Byla zjišťována enzymová aktivita dehydrogenas pomocí spektrofotometrického měření nárůstu NADPH při 340 nm. Prvním enzymem byl NADP-ME. Statisticky nebyl v aktivitě NADP-ME nalezen podstatnější rozdíl. Výjimkou byly rostliny, jejichž semena byla ošetřena izolátem rodu *Pythium* X42, u kterých byla aktivita v infikovaných listech 2,4x vyšší než u neinfikovaných. Náznak zvýšení aktivity NADP-ME vlivem infekce se projevil také u kontrolních rostlin. U rostlin ošetřených zbylými izoláty *Pythia* M1 a X48 už rozdíly nebyly tak významné, u obou byla zaznamenána mírně zvýšená aktivita NADP-ME, po napadení patogenem se aktivita zmenšila minimálně (Obr. 5.2).



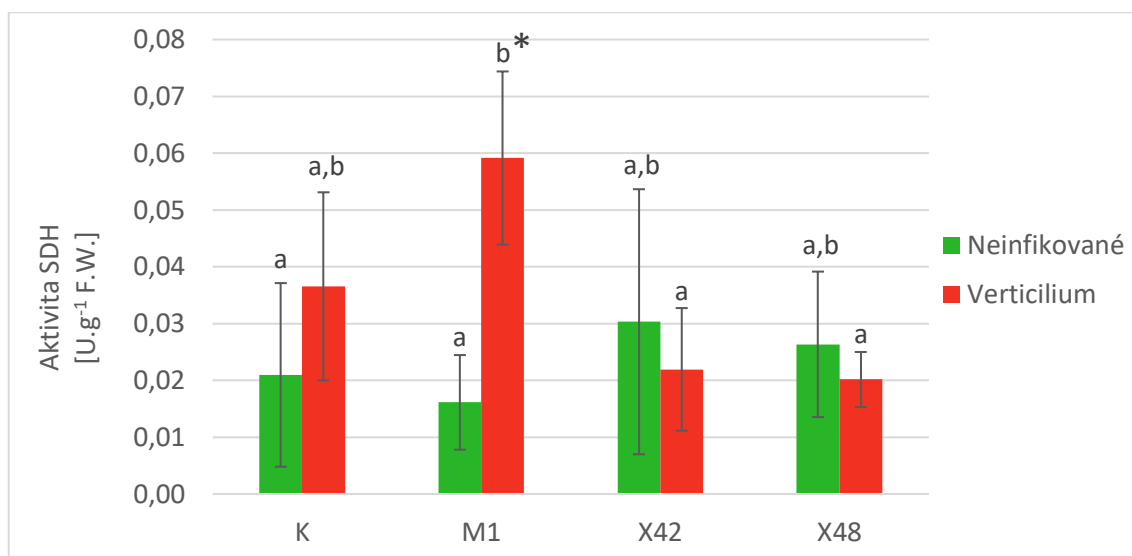
Obrázek 5.2 Aktivita NADP-ME: Vliv ošetření semen izoláty *Pythium* (M1, X42 a X48) na aktivitu NADP-ME v listech rostlin rajčete infikovaných houbovým patogenem *V. longisporum* (červené) a neinfikovaných (zelené); aktivita vyjádřená na 1 g čerstvé hmotnosti [U·g⁻¹ F.W.]. K jsou kontrolní, neošetřené rostliny. Stejně písmeno nad sloupcem značí podobnou hodnotu v rámci statistického vyhodnocení One-way ANOVA, odlišné hodnoty s $P \leq 0,05$ jsou označeny jiným písmenem. Hvězdička značí statisticky významné rozdíly s $P \leq 0,05$ infikovaných rostlin vůči neinfikovaným.

Druhým měřeným enzymem byla G6PDH (Obr. 5.3, str. 33). Jeho aktivita u kontrolních rostlin byla po napadení patogenem mírně snížena. Nejvyšší aktivita G6PDH byla zaznamenána u infikovaných rostlin ošetřených izoláty M1 a X42. U rostlin ošetřených izolátem X42 došlo po infikování patogenem dokonce ke dvojnásobnému zvýšení. Nejnižší aktivitu G6PDH vykazovaly rostliny ošetřené izolátem X48, u kterých po infikování patogenem nedošlo k téměř žádné změně.



Obrázek 5.3 Aktivita G6PDH: Vliv ošetření semen izoláty *Pythium* (M1, X42 a X48) na aktivitu G6PDH v listech rostlin rajčete infikovaných houbovým patogenem *V. longisporum* (červené) a neinfikovaných (zelené); aktivita vyjádřená na 1 g čerstvé hmotnosti [U·g⁻¹ F.W.]. K jsou kontrolní, neošetřené rostliny. Stejně písmeno nad sloupcem značí podobnou hodnotu v rámci statistického vyhodnocení One-way ANOVA, odlišné hodnoty s $P \leq 0,05$ jsou označeny jiným písmenem.

Poslední dehydrogenasou byla šikimátdehydrogenasa (Obr. 5.4). U rostlin, které nebyly infikované patogenem došlo k mírnému zvýšení aktivity pouze po ošetření X42 a X48. Co se týče rostlin napadených patogenem, k výraznému, 2,7-násobnému zvýšení aktivity SDH došlo pouze u infikovaných rostlin ošetřených izolátem M1. Naopak rostliny ošetřené izoláty X42 a X48 vykazovaly slabé snížení aktivity.

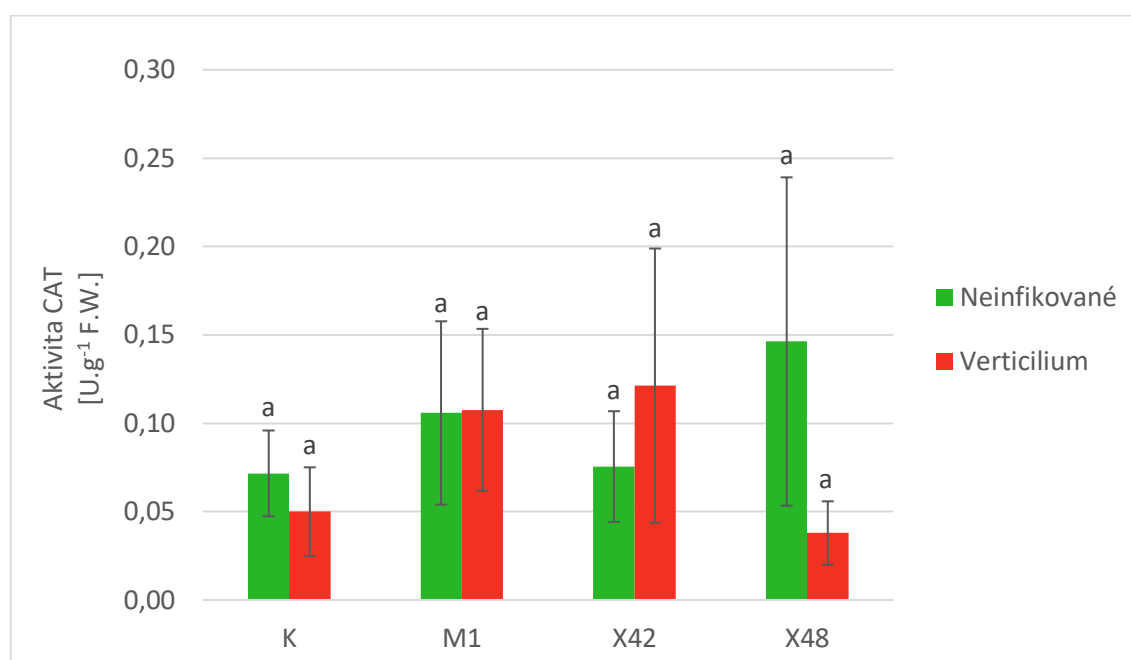


Obrázek 5.4 Aktivita SDH: Vliv ošetření semen izoláty *Pythium* (M1, X42 a X48) na aktivitu SDH v listech rostlin rajčete infikovaných houbovým patogenem *V. longisporum* (červené) a neinfikovaných (zelené); aktivita vyjádřená na 1 g čerstvé hmotnosti [U·g⁻¹ F.W.]. K jsou kontrolní, neošetřené rostliny. Stejně písmeno nad sloupcem značí podobnou hodnotu v rámci statistického vyhodnocení One-way ANOVA, odlišné hodnoty s $P \leq 0,05$ jsou označeny jiným písmenem. Hvězdička značí statisticky významné rozdíly s $P \leq 0,05$ infikovaných rostlin vůči neinfikovaným.

Aktivita dehydrogenas byla u vzorků rostlin rajčete velmi nízká, jen jednou byla přesažena průměrná hodnota $0,040 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ F.W.}$, a nebylo možné enzymy separované nativní elektroforézou na gelu zviditelnit vhodnou zobrazovací metodou.

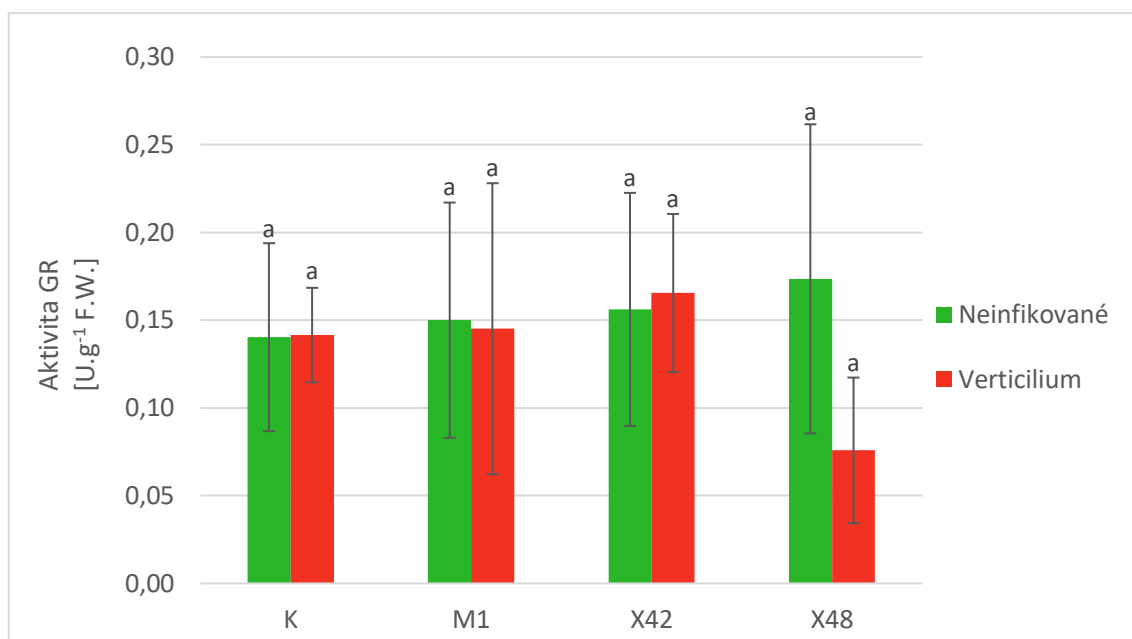
5.3. Stanovení aktivity antioxidantních enzymů

Enzymová aktivita katalasy byla měřena spektrofotometricky sledováním rozkladu peroxidu vodíku. U kontrolních rostlin se po infikování patogenem aktivita katalasy mírně snížila (Obr. 5.5). U rostlin ošetřených M1 nedošlo k žádné změně aktivity. Rostliny ošetřené X42 vykazovaly stejné hodnoty aktivity jako kontrolní rostliny, po infikování patogenem se aktivita 1,6-násobně zvýšila. Po ošetření X48 byla aktivita katalasy nejvyšší, téměř dvojnásobná oproti kontrolním rostlinám, ovšem po infekci patogenem byly zaznamenány nejnižší hodnoty aktivity CAT, a to čtvrtinové oproti neinfikovaným.



Obrázek 5.5 Aktivita CAT: Vliv ošetření semen izoláty *Pythium* (M1, X42 a X48) na aktivitu CAT v listech rostlin rajčete infikovaných houbovým patogenem *V. longisporum* (červené) a neinfikovaných (zelené); aktivita vyjádřená na 1 g čerstvé hmotnosti [$\text{U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ F.W.}$]. K jsou kontrolní. Stejné písmeno nad sloupcem značí podobnou hodnotu v rámci statistického vyhodnocení One-way ANOVA, odlišné hodnoty s $P \leq 0,05$ by byly označeny jiným písmenem.

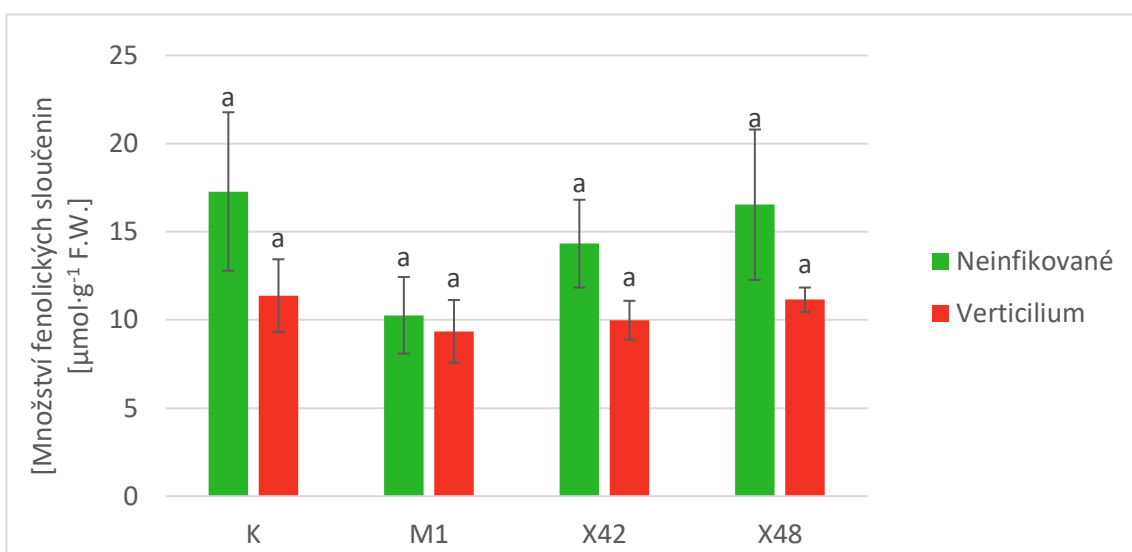
Enzymová aktivita glutathionreduktasy byla měřena na základě úbytku substrátu NADPH. Zde se aktivity statisticky příliš nelišily, v průměru oscilovaly kolem hodnoty $0,150 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ F.W.}$ (Obr. 5.6, str. 35). Pouze u rostlin ošetřených X48 došlo k mírnému zvýšení aktivity na $0,174 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ F.W.}$ a po infikování těchto rostlin patogenem se aktivita snížila na polovinu.



Obrázek 5.6 Aktivita GR: Vliv ošetření semen izoláty *Pythium* (M1, X42 a X48) na aktivitu GR v listech rostlin rajčete infikovaných houbovým patogenem *V. longisporum* (červené) a neinfikovaných (zelené); aktivita vyjádřená na 1 g čerstvé hmotnosti [U·g⁻¹ F.W.]. K jsou kontrolní, neošetřené rostliny. K jsou kontrolní, neošetřené rostliny. Stejně písmeno nad sloupcem značí podobnou hodnotu v rámci statistického vyhodnocení One-way ANOVA, odlišné hodnoty s $P \leq 0,05$ by byly označeny jiným písmenem.

5.4. Stanovení množství fenolických látek a antioxidační kapacity

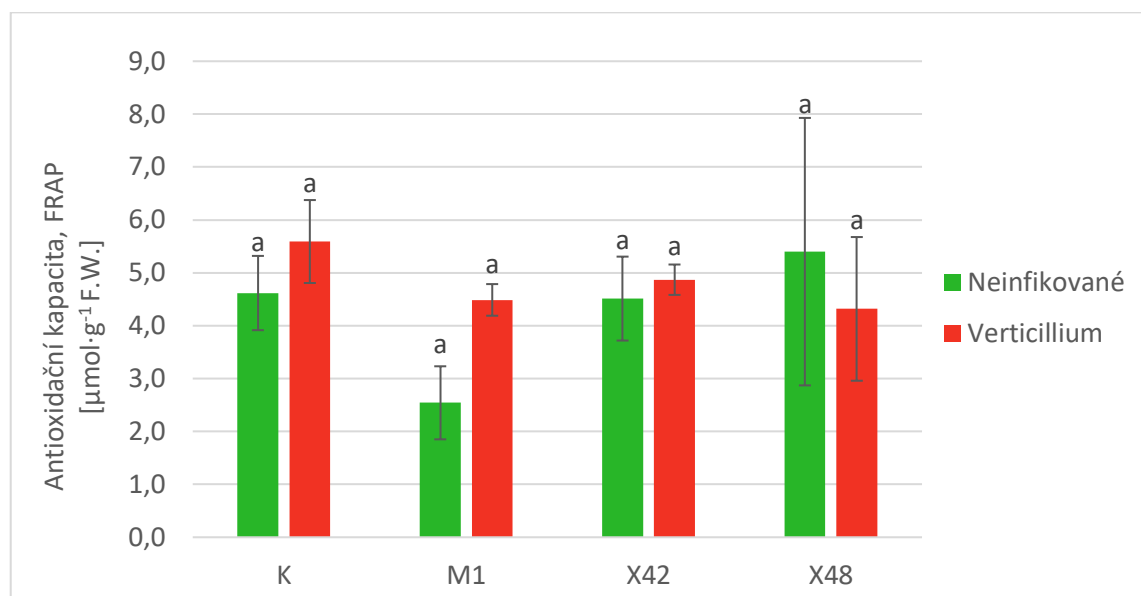
Ke stanovení množství fenolických látek byla využita reakce s Folin-Ciocalteuovým činidlem a spektrofotometrickým měřením byl sledován vznikající produkt modrého zabarvení. Byl pozorován jednoznačný pokles množství fenolických látek u rostlin



Obrázek 5.7 Množství fenolických sloučenin. Vliv ošetření semen izoláty *Pythium* (M1, X42 a X48) na množství fenolických sloučenin v listech rostlin rajčete infikovaných houbovým patogenem *V. longisporum* (červené) a neinfikovaných (zelené); množství vyjádřené na 1 g čerstvé hmotnosti [μmol·g⁻¹ F.W.]. K jsou kontrolní, neošetřené rostliny. Stejně písmeno nad sloupcem značí podobnou hodnotu v rámci statistického vyhodnocení One-way ANOVA, odlišné hodnoty s $P \leq 0,05$ by byly označeny jiným písmenem.

napadených patogenem (Obr. 5.7, str. 35). U kontrolních rostlin, rostlin ošetřených X42 a X48 byl tento rozdíl třetinový, pouze u rostlin ošetřených M1 došlo pouze k malému poklesu.

Antioxidační kapacita byla stanovována metodou FRAP (Obr. 5.8), při které se spektrofotometricky sleduje míra zredukování železité sloučeniny na železnatou formu. Pouze u rostlin ošetřených izolátem M1 bylo zaznamenáno téměř dvojnásobné zvýšení antioxidační kapacity po infekci patogenem. Ostatní izoláty nevykazovaly větší změny v antioxidační kapacitě.



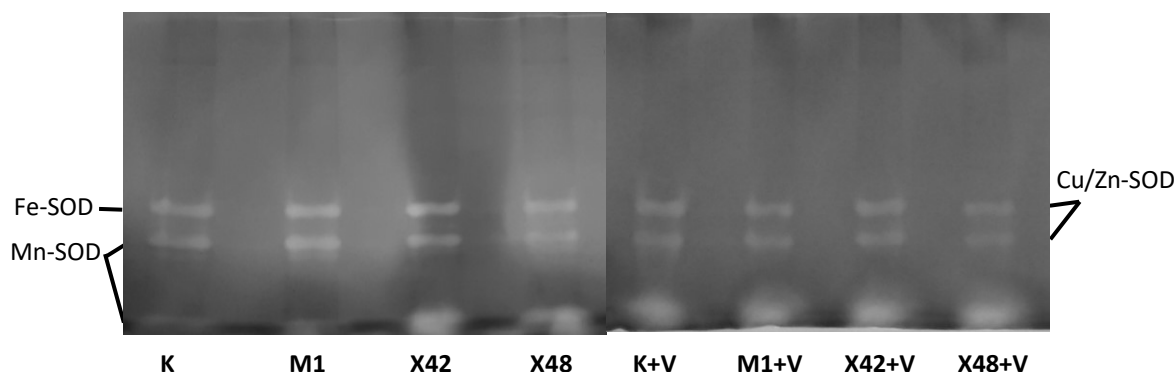
Obrázek 5.8 Antioxidační kapacita měřená metodou FRAP. Vliv ošetření semen izoláty *Pythium* (M1, X42 a X48) na antioxidační kapacitu v listech rostlin rajčete infikovaných houbovým patogenem *V. longisporum* (červeně) a neinfikovaných (zeleně); vztaheno na 1 g čerstvé hmotnosti [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ F.W.]. K jsou kontrolní, neošetřené rostliny. Stejně písmeno nad sloupcem značí podobnou hodnotu v rámci statistického vyhodnocení One-way ANOVA, odlišné hodnoty s $P \leq 0,05$ by byly označeny jiným písmenem.

5.5. Aktivita superoxiddismutasy

Existují tři druhy izoenzymů superoxiddismutasy – Cu/Zn-SOD, Fe-SOD a Mn-SOD. Peroxid vodíku inhibuje Fe-SOD a Cu/Zn-SOD; KCN inhibuje pouze Cu/Zn-SOD. Mn-SOD není inhibováno ani jednou z uvedených sloučenin.

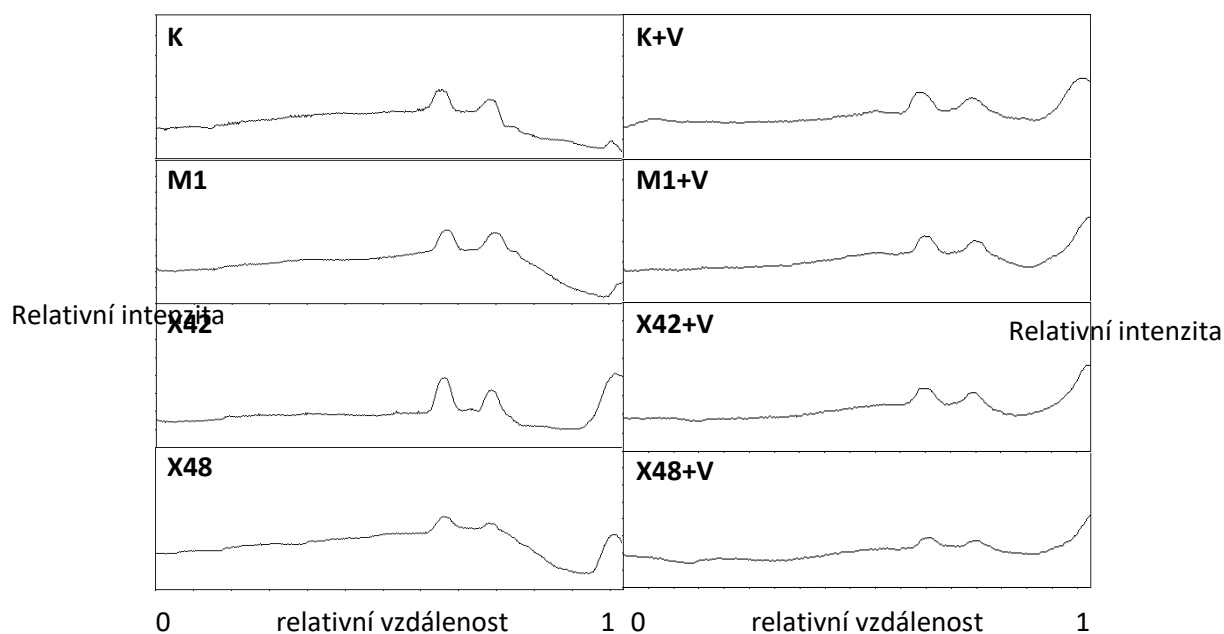
V gelech byly za nativních podmínek elektroforeticky separované extrakty, gely byly ponořeny do reakčních a inhibičních roztoků pro zviditelnění aktivních izoenzymů superoxiddismutasy. V prvním gelu (Obr. 5.9, str. 37) nebyla provedena žádná inhibice a byly zviditelněny všechny tři izoenzymy. Všechny se překrývají ve dvou prouzcích, v nejspodnější části gelu se nachází pravděpodobně ještě jedna izoforma. Souběžně s vyšší aktivitou SOD se zlepšila zřetelnost pruhů na gelu. U kontrolních rostlin,

obzvláště těch ošetřených M1 a X42 byla zaznamenaná aktivita SOD největší, extrakty rostlin infikovaných patogenem vykazovaly sníženou aktivitu SOD.



Obrázek 5.9: Extrakty rostlin separované nativní elektroforézou v 10 % gelu pro detekování SOD izoenzymů v gelu, neinhibováno. Vlevo extrakty neinfikovaných rostlin (K, M1, X42, X48), vpravo extrakty rostlin napadených *V. longisporum* (K+V, M1+V, X42+V, X48+V).

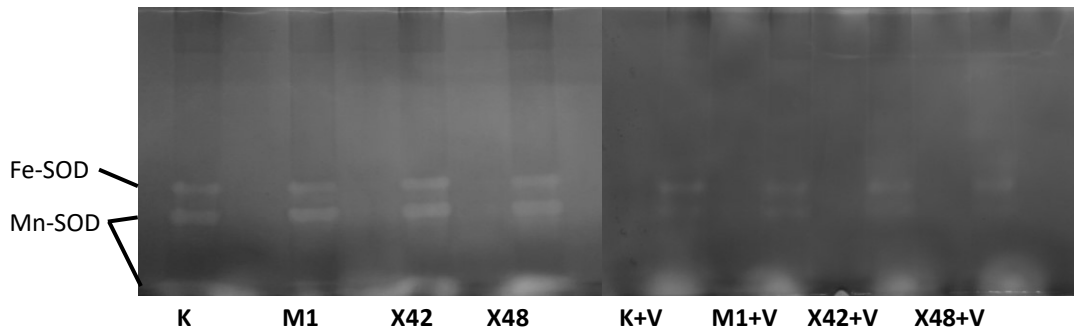
Bylo také provedeno denzitometrické vyhodnocení neinhibovaných gelů za pomoci programu GelAnalyzer 19.1 (Obr. 5.10). U neinfikovaných rostlin byly píky výraznější a jejich relativní intenzita byla mírně zvýšená oproti rostlinám infikovaných patogenem.



Obrázek 5.10 Denzitometrické vyhodnocení intenzity proužků v neinhibovaných gelech v programu GelAnalyzer 19.1. Vlevo jsou vyhodnocené proužky neinfikovaných rostlin, vpravo jsou vyhodnocené proužky extraktů rostlin napadených *V. longisporum*.

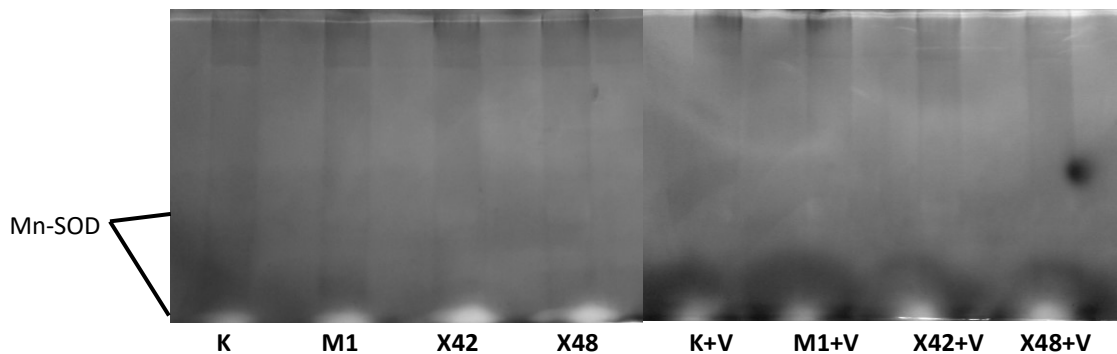
Inhibicí kyanidem draselným (Obr. 5.11, str. 38) byla deaktivována pouze izoforma Cu/Zn-SOD. Detekované byly dvě aktivní izoformy, Mn-SOD a Fe-SOD. Mn-SOD se nachází v dolním ze dvou viditelných proužků a v pruhu dole, Fe-SOD se nachází v obou dvou proužcích, její aktivita je výrazně vyšší než první zmíněné izoformy. V rostlinách

infikovaných houbovými patogeny je aktivita částečně potlačena a výraznější je pouze horní proužek.



Obrázek 5.11: Elektroforeticky separované extrakty rostlin v 10 % gelů za nativních podmínek, inhibice v roztoku KCN a následné detekování SOD izoenzymů v gelu. Vlevo extrakty neinfikovaných rostlin (K, M1, X42, X48), vpravo extrakty rostlin napadených *V. longisporum* (K+V, M1+V, X42+V, X48+V).

V inhibičním roztoku H_2O_2 byly deaktivovány dva ze tří izoenzymů, Fe-SOD a Cu/Zn-SOD. Slabě byla zviditelněna málo aktivní izoforma Mn-SOD, v podobě slabého proužku ve dvou třetinách gelu a výraznějšího pruhu v dolní části gelu.



Obrázek 5.12: Extrakty rostlin separované nativní elektroforézou v 10 % gelu pro sledování inhibice izoenzymů SOD peroxidem vodíku. Vlevo extrakty neinfikovaných rostlin (K, M1, X42, X48), vpravo extrakty rostlin napadených patogenem *V. longisporum* (K+V, M1+V, X42+V, X48+V).

6 Diskuse

Původci verticiliového vadnutí (včetně *Verticillium longisporum*) jsou celosvětově rozšířenými patogenními houbami, které každoročně způsobují významné ztráty polních plodin. Vzhledem k tomu, že pro kontrolu verticiliových chorob není k dispozici účinný a zároveň bezpečný fungicid, využívá se především křížení rezistentních rostlin [57]. Zároveň však zůstává otevřená možnost využití prostředků biologické ochrany např. na bázi mykoparazitické oomycety *Pythium oligandrum*. Tento půdní organismus nacházející se symbioticky na kořenech rostliny nejen že rostlinu chrání v rámci mykoparazitismu nebo antibiosy, ale zároveň na rostlinu působí jednak vylučováním elicitorů navozujících kaskádu obranných reakcí spojenou se syntézou obranných látek (rostlina je tedy předpřipravena pro budoucí infekci jak houbové tak bakteriální) a rovněž vylučováním tryptaminu, prekursoru růstového hormonu auxinu, který podporuje růst a celkovou zdatnost rostliny [58,59]. Výhodou prostředků biologické ochrany tohoto typu je možnost aplikovat je již na semena a chránit tak rostliny od samého počátku.

V této práci byly na semenech rostlin rajčete jedlého kromě izolátu *Pythia* M1 obsaženého v komerčním preparátu testovány i dosud nevyužívané izoláty: X42, X48 a porovnávány s kontrolní skupinou neošetřených semen (K). Ošetření semen izoláty *Pythia* nemělo vliv na vzhled a velikost rostlin ani na obsah celkových rozpustných proteinů v listech (Obr. 5.1, str. 31). Cílem práce bylo zjistit, jaké změny se odehrávají na metabolické úrovni, a to především také v rostlinách infikovaných patogenem *V. longisporum*. Byly studovány NADP(H)-dependentní enzymy (G6PDH, NADP-ME, SDH) (Obr. 5.2-5.4, str. 32-33), antioxidační kapacita (Obr. 5.8, str. 36) a antioxidační enzymy (CAT, GR, SOD) (Obr. 5.5, 5.6, str. 34-35 a Obr. 5.9, 5.11 a 5.12, str. 37-38). G6PDH a NADP-ME jsou enzymy poskytující redukční ekvivalent NADPH, který především v podmínkách stresu nabývá na důležitosti [60]. Hlavní zdroj NADPH v rostlinách, fotosyntéza, bývá oxidativním stresem většinou negativně ovlivněna, což platí i pro stres působený houbovými patogeny [61]. Tento koenzym je však nezbytný jak pro antioxidační systém, tak pro celou řadu syntetických procesů např. mastných kyselin nezbytných pro opravné mechanismy. V předchozích studiích naší laboratoře byla v rostlinách tabáku vystavených suchu [62] a rostlinách okurky vystavených solnému stresu [63] zjištěna indukce aktivity G6PDH nebo NADP-ME. Samotné ošetření semen izoláty *Pythia* nemělo vliv na aktivitu všech studovaných enzymů rostlin rajčete (Obr. 5.2-5.6, str. 32-35) podobně jako v předchozí diplomové práci zaměřené na stejné izoláty

a rostliny řepky olejky [64]. Vliv houbové infekce na aktivitu všech enzymů byl stanovován 14 dnů po inokulaci *V. longisporum* v předpokládaném plném rozvoji verticiliového vadnutí. V rostlinách, jejichž semena byla mořena izolátem *Pythia* X42 byla vlivem verticiliového vadnutí zjištěna statisticky významně zvýšená aktivita NADP-ME a vyšší aktivita G6PDH. Další dva enzymy studované v této práci v šikimátové dráze (SDH) a askorbát-glutathionovém cyklu (GR) za fyziologických podmínek NADPH naopak spotřebovávají a NADP⁺ produkují. Zatímco antioxidační enzym GR nebyl indukován ani izoláty *Pythia* ani 14. den infekce *V. longisporum*, statisticky významně zvýšená aktivita SDH vlivem verticiliové infekce tento den byla zjištěna u rostlin, jejichž semena byla mořena komerčním izolátem *Pythia* M1 (Obr. 5.4, str. 33). Aktivita SDH a šikimátové dráhy souvisí s produkcí fenolických látek (Obr. 5.7, str. 35) a také antioxidační kapacitou, která byla také vyšší u infikovaných rostlin ošetřených izolátem M1 (Obr. 5.8, str. 36).

Z antioxidačních enzymů byla kromě GR, studována také SOD, klíčový enzym detoxifikace superoxidového radikálu, vznikajícího v důsledku oxidativního stresu spojeného s infekcí houbovým patogenem. Současně byly separovány izoformy SOD experimentálních rostlin rajčete nativní elektroforézou včetně inhibičních studií umožňujících rozlišit izoformy Fe-SOD, Cu/Zn-SOD a Mn-SOD (Obr. 5.9, 5.11 a 5.12, str. 37-38). Na rozdíl od rostlin řepky, která obsahovala osm izoform [64], v listech rostlin rajčete byly detekovány pouze dva majoritní proužky a jeden minoritní proužek, a je tedy pravděpodobné, že se zde současně nachází více izoform, na jejichž oddělení bude potřeba provést další experimenty např. s využitím gradientových gelů. Zdá se, že aktivita Mn-SOD izoformy je nejnižší, ale mírně se zvyšuje verticiliovou infekcí. Z výsledků však vyplývá snížení celkové aktivity SOD v infikovaných rostlinách (Obr. 5.9 a 5.11, str. 37-38), což by odpovídalo, že rostliny již prošly jak oxidačním vzplanutím ROS, tak odpovědí v podobě aktivace antioxidačních enzymů, jejichž aktivita je 14. den infekce naopak snížena. Také aktivita CAT (enzymu eliminujícího další ROS peroxid vodíku) nevykazovala statisticky významné změny aktivity (Obr. 5.5, str. 34), proto by bylo vhodné antioxidační enzymy v následujících experimentech sledovat nejen v období rozvinuté infekce, ale také bezprostředně po inokulaci, kdy k oxidačnímu stresu dochází ve velké míře [65]. Rostliny, jejichž semena byla ošetřena kmenem X48, měly 14. den vlivem verticiliové infekce aktivitu CAT a GR sníženu (Obr. 5.5 a 5.6, str 34-35). V naší laboratoři současně probíhal analogický experiment se stejnými rostlinami i izoláty

Pythia, ale s houbovým patogenem *Alternaria brassicicola*. Vzhledem k tomu, že tento patogen více ovlivnil nejen antioxidační systém ale i indukci proteinů Hsp70 a Hsp90, je patrné, že intenzita odpovědi zřejmě odpovídá závažnosti infekce [66,67].

V současné době se prostředky biologické ochrany rostlin na bázi mykoparazitismu *Pythia* úspěšně využívají k boji proti houbovým a plísňovým rostlinným onemocněním. Nejsou však známy biochemické procesy odehrávající se v rostlině, které vedou k odolnosti vůči jinak nebezpečnému onemocnění. *Pythium oligandrum* není patogenní, izoláty aplikované na semena se dostávají do půdy, ve které se rostlina vyvíjí a stávají se symbiontem na jejích kořenech a intenzivně působí na metabolismus rostliny vylučováním různých látek typu elicitorů a tryptaminu (viz výše). Např. v rostlinách řepky izoláty *Pythia* komplexně působí na celý metabolismus od změny v zastoupení aminokyselin až po hladinu fytohormonů [68]. Předpokládá se, že kmeny *Pythia* aktivují obranné mechanismy, které umožní úspěšně čelit skutečné infekci patogenním organismem, se kterým se rostlina může setkat. Jakmile se tak stane, na rostlinu v podstatě působí dva biotické faktory a metabolické změny se tím stávají ještě složitější. Tato práce naznačuje, že NADP(H)-dependentní a antioxidační enzymy budou mít v adaptaci na infekci působenou houbovým patogenem důležitou úlohu, je však potřeba ještě specifikovat, v jakém časovém úseku po inokulaci se tyto enzymy uplatňují největší měrou.

7 Závěr

Samotné ošetření semen izoláty rodu *Pythium* nemělo vliv na aktivitu vybraných NADP(H)-dependentních a antioxidačních enzymů v listech čtyřtýdenních rostlin rajčete jedlého, *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom.

V rostlinách zároveň infikovaných *V. longiosporum* a ošetřených izolátem X42 došlo 14 dní po inokulaci ke zvýšení aktivity NADP-ME a G6PDH.

Statisticky významně zvýšená aktivita SDH v rostlinách ošetřených izolátem X48 korelovala s vyšší antioxidační kapacitou.

Aktivita antioxidačních enzymů (SOD a CAT) byla 14 dní po inokulaci *V. longiosporum* již nezměněná v porovnání s neinfikovanými rostlinami nebo dokonce snížena v případě rostlin ošetřených izolátem X48.

8 Zdroje

1. Sikes, B. A.; Bufford, J. L.; Hulme, P. E.; Cooper, J. A.; Johnston, P. R.; Duncan, R. P.: Import volumes and biosecurity interventions shape the arrival rate of fungal pathogens. *PLoS Biol.* **16**, DOI: 10.1371/journal.pbio.2006025 (2018).
2. Rosa, J.; Houbovní parazité jako faktor ovlivňující dynamiku společenstev mikrořas. Bakalářská práce. UK, Přírodovědecká fakulta (2017).
3. Jedličková, L.; Tvorba informačního a výukového materiálu s tématem „Parazitické houby“. Diplomová práce. UPOL, Přírodovědecká fakulta (2017).
4. Novotný, Č.; Koudela, M.; Svobodová, K.; Nedorost, L.; Aust, R.; Kocourek, F.: Hodnocení vlivu odrůdy a termického ošetření osiva u vybraných druhů zeleniny v ranných růstových fázích na citlivost k infekci významnými houbovými patogeny, Mikrobiologický ústav AV ČR, 2016, 31 stran. Certifikovaná metodika, číslo předpisu: UKZUZ 134981/2016. ISBN 978-80-905701-6-0. Dostupné z: <http://mbucas.cz/wp-content/uploads/2017/01/CertifMetodikaLabProOnline-Leden2017.pdf>
5. Karapapa, V. K.; Bainbridge, B. W.; Heale, J. B.: Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape, *Mycol. Res.* **101**, 1281–94 (1997).
6. Inderbitzin, P.; Davis, R. M.; Bostock, R. M.; Subbarao, K. V.: The ascomycete *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range. *PLoS Biol.* **6**, DOI: 10.1371/journal.pone.0018260 (2011).
7. Carder, J. H.; Barbara, D. J.: Molecular variation and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) within and between six species of *Verticillium*. *Mycol. Res.* **95**, 935–42 (1991).
8. Barbara, D. J.; Clewes, E.: Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Mol. Plant Pathol.* **4**, 297–305 (2003).
9. Depotter, J. R. L.; Deketelaere, S.; Inderbitzin, P.; Tiedemann, A. V.; Höfte, M.; Subbarao, K. V.; Wood, T. A.; Thomma, B. P. H. J.: *Verticillium longisporum*, the invisible threat to oilseed rape and other brassicaceous plant hosts. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1004–16 (2016).
10. Hiemstra, J. A.; Harris, D. C.: *A compendium of verticillium wilts in tree species*. Wageningen, CPRO, 1998.
11. Carroll, C. L.; Carter, C. A.; Goodhue, R. E.; Lawell, C.-Y. C. L.; Subbarao, K. V.: Review of control options and externalities for *Verticillium* Wilts. *Phytopathology* **108**, 160–71 (2017).
12. Inderbitzin, P.; Subbarao, K. V.: *Verticillium* systematics and evolution: How confusion impedes *Verticillium* Wilt management and how to resolve it. *Phytopathology* **104**, 564–74 (2014).
13. Zeise, K.; Tiedemann, A. V.: Host specialization among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *Verticillium longisporum*. *J. Phytopathol.* **150**, 112–19 (2002).
14. Novakazi, F.; Inderbitzin, P.; Sandoya, G.; Hayes, R. J.; von Tiedemann, A.; Subbarao, K. V.: The Three Lineages of the Diploid Hybrid *Verticillium longisporum* Differ in Virulence and Pathogenicity. *Phytopathology* **105**, 662–73 (2015).

15. Naraghi, L.; Heydari, A.; Rezaee, S.; Razavi, M.; Jahanifar, H.; Khaledi, E.: Biological Control of Tomato Verticillium Wilt Disease by *Talaromyces Flavus*. *J. Plant Prot. Res.* **50**, 360–365 (2010).
16. Smith, H.C: The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, and *V. tricorpus*. *N. Z. J. Agric. Res.* **8**, 450–78 (1965).
17. Deacon, J.W: *Fungal Biology*. 4th ed. Edinburgh, John Wiley & Sons, 2013.
18. Zhou, L.; Hu, Q.; Johansson, A.; Dixelius, C.: *Verticillium longisporum* and *V. dahliae*: infection and disease in *Brassica napus*. *Plant Pathol.* **55**, 137–44 (2006).
19. Eynck, C.; Koopmann, B.; Karlovsky, P.; von Tiedemann, A.: Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Phytopathology* **99**, 802–11 (2009).
20. Timpner, C.; Braus-Stromeyer, S.A.; Tran, V.T.; Braus, G.H.: The Cpc1 regulator of the cross-pathway control of amino acid biosynthesis is required for pathogenicity of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact* **26**, 1312–24 (2013).
21. Knüfer, J.; Lopisso, D. T.; Koopmann, B.; Karlovsky, P.; von Tiedemann, A.: Assessment of latent infection with *Verticillium longisporum* in field-grown oilseed rape by qPCR. *Eur. J. Plant Pathol.* **147**, 819–31 (2017).
22. Pegg, G. F.; Brady, B. L.: *Verticillium Wilts*. Wallingford, CABI, 2002.
23. Green, R.J.: Soil factors affecting survival of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **70**, 353–55 (1980).
24. Kreye, H.; Steinbach, P.; Wolf, G.: Determination of risk-factors for the occurrence of *Verticillium longisporum*. *IOBC/WPRS bulletin* **29**, 357–360 (2006).
25. Olmert, I.; Kenneth, R.G.: Sensitivity of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, and *Verticillium* sp. to fungicides and insecticides. *Environ. Entomol.* **3**, 33–38 (1974).
26. Gea, F. J.; Tello, J. C.; Honrubia, M.: In vitro sensitivity of *Verticillium fungicola* to selected fungicides. *Mycopathologia* **136**, 133–37 (1996).
27. Bonnen, A. M.; Hopkins, C.: Fungicide resistance and population variation in *Verticillium fungicola*, a pathogen of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* **101**, 89–96 (1997).
28. Haluzíková, M.: Pesticidy jejich vliv na necilové organismy a metody odstraňování. Bakalářská práce. VŠB–TUO, Hornicko-geologická fakulta (2013).
29. Bílková, J.: Monitoring přirozeného výskytu mykoparazitických a antagonistických hub v půdách na území regionu jižní Čechy. Diplomová práce. JU, Zemědělská fakulta (2013).
30. Fradin, E.F.: Functional analysis of the tomato Ve resistance locus against *Verticillium* wilt. Diplomová práce. Wageningen University, Department of Plant Sciences (2011).
31. Zurbriggen, M. D.; Carrillo, N.; Hajirezaei, M.-R.: ROS signaling in the hypersensitive response. *Plant Signaling Behav.* **5**, 393–96 (2010).
32. Spoel, S. H.; Johnson, J. S.; Dong, X.: Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18842–47 (2007).
33. Nicholson, R. L.; Hammerschmidt, R.: Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**, 369–89 (1992).

34. Hossain, M. A.; Wani, S. H.; Bhattacharjee, S.; Burritt, D. J.; Tran, L.-S. P.: *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1: Physiology and Biochemistry*. Švýcarsko, Springer, 2016.
35. Swanson, S.; Gilroy, S.: ROS in plant development. *Physiol. Plant.* **138**, 384–92 (2010).
36. Chan, Z.; Song, C.-P.; Kim, W. Y.; Yokawa, K.: ROS regulation during plant abiotic stress responses. *Front. Recent Dev. Plant Sci.* **7**, 1536 (2017).
37. Torres, M. A.; Jones, J. D. G.; Dangl, J. L.: Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* **141**, 373–78 (2006).
38. Bowler, C.; Camp, W. V.; Montagu, M. V.; Inzé, D.; Asada, P. K.: Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 199–218 (2011).
39. Bowler, C.; Van Montagu, M.; Inzé, D.: Superoxide-dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 83–116 (1992).
40. Feng, K.; Yu, J.; Cheng, Y.; Ruan, M.; Wang, R.; Ye, Q.; Zhou, G.; Li, Z.; Yao, Z.; Yang, Y.; Zheng, Q.; Wan, H.: The SOD gene family in tomato: identification, phylogenetic relationships, and expression patterns. *Front. Plant Sci.* **7**, 1279 (2016).
41. Jašková, L.: Charakterizace *in vitro* kultury *Populus × canadensis* (cv. Robusta). Bakalářská práce. UPOL, Přírodovědecká fakulta (2015).
42. Humphreys, J. M.; Chapple, C.: Rewriting the lignin roadmap. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 224–29 (2002).
43. Whetten, R.; Sederoff, R.: Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1001–13 (1995).
44. Vance, C. P.; Kirk, T. K.; Sherwood, R. T.: Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**, 259–88 (1980).
45. Verberne, M. C.; Verpoorte, R.; Bol, J. F.; Mercado-Blanco, J.; Linthorst, H. J. M.: Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotechnol.* **18**, 779–83 (2000).
46. Dempsey, D. A.; Shah, J.; Klessig, D. F.: Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, 547–75 (1999).
47. Libik-Konieczny, M.; Surówka, E.; Nosek, M.; Goraj, S.; Miszalski, Z.: Pathogen-induced changes in malate content and NADP-dependent malic enzyme activity in C3 or CAM performing *Mesembryanthemum crystallinum* L. plants. *Acta Physiol. Plant.* **34**, 1471–77 (2012).
48. Plisková, V.: Souvislost abiotického stresu s NADP-dependentními enzymy v rostlinách. Bakalářská práce. UK, Přírodovědecká fakulta (2011).
49. Casati, P.; Drincovich, M. F.; Edwards, G. E.; Andreo, C. S.: Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosynth. Res.* **61**, 99–105 (1999).
50. Doubnerová, V.; Ryšlavá, H.: What can enzymes of C4 photosynthesis do for C3 plants under stress? *Plant Science* **180**, 575–83 (2011).
51. Asai, S.; Yoshioka, M.; Nomura, H.; Tone, C.; Nakajima, K.; Nakane, E.; Doke, N.; Yoshioka, H.: A plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase is responsible for hypersensitive response cell death and reactive oxygen species production. *J. Gen. Plant Pathol.* **77**, 152–62 (2011).
52. Scharte, J.; Schön, H.; Tjaden, Z.; Weis, E.; von Schaewen, A.: Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8061–66 (2009).

53. Nemoto, Y.; Sasakuma, T.: Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* **158**, 53–60 (2000).
54. Díaz, J.; Bernal, A.; Pomar, F.; Merino, F.: Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science* **161**, 179–88 (2001).
55. Ding, L.; Hofius, D.; Hajirezaei, M.-R.; Fernie, A. R.; Börnke, F.; Sonnewald, U.: Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants. *J. Exp. Bot.* **58**, 2053–67 (2007).
56. Bradford, M. M.: 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 (1976).
57. Depotter, J. R.; Seidl, M. F.; Wood, T. A.; Thomma, B. P.: Interspecific hybridization impacts host range and pathogenicity of filamentous microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **32**, 7–13 (2016).
58. Benhamou, N.; le Floch, G.; Vallance, J.; Gerbore, J.; Grizard, D.; Rey, P.: *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology*, **158**, 2679–94 (2012).
59. Gerbore, J.; Benhamou, N.; Vallance, J.; Le Floch, G.; Grizard, D.; Regnault-Roger, C.; Rey, P.: Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 4847–60 (2014).
60. Doubnerová, V.; Ryšlavá, H.: NADP-dependent enzymes and abiotic stress, v knize *Abiotic Stress New Research* (Haryana, N., Punj, S., eds.). New York, Novascience Publishers, 57–98, 2012.
61. WeiHui, X.; FengZhi, W.; ZhiGang, W.; GuoYan, S.; HongHong, X.: Response of photosynthetic characteristics and disease resistance of watermelon to companion with wheat. *Chinese Journal of Eco-Agriculture* **22**, 655–60 (2014).
62. Doubnerová Hýsková, V.; Miedzińska, L.; Dobrá, J.; Vankova, R.; Ryšlavá, H.: Phosphoenolpyruvate carboxylase, NADP-malic enzyme, and pyruvate, phosphate dikinase are involved in the acclimation of *Nicotiana tabacum* L. to drought stress. *J. Plant Physiol.* **171**, 19–25 (2014).
63. Hýsková, V.; Plisková, V.; Červený, V.; Ryšlavá, H.: NADP-dependent enzymes are involved in response to salt and hypoosmotic stress in cucumber plants. *Gen. Physiol. Biophys.* **36**, 247–258 (2016).
64. Vaverová, K.: Vliv moření semen řepky olejně oomycetou *Pythium oligandrum* na metabolismus rostliny. Diplomová práce. UK, Přírodovědecká fakulta (2020).
65. Dong, X.: SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 316–23 (1998).
66. Dle ústního sdělení Lucie Halířové (UK) dne 9. června 2020.
67. Dle ústního sdělení Michal Chudého (UK) dne 10. června 2020.
68. Dle ústního sdělení Mgr. Kateřiny Bělonožníkové (UK) dne 9. června 2020.

