

**Charles University, Faculty of Science  
Department of Biochemistry**

Doctoral study programme: Biochemistry

Summary of the Doctoral thesis



Role of phytohormones in the interaction of plant pathogens  
*Pseudomonas syringae* and *Leptosphaeria maculans* with their hosts

**M.Sc. Hana Leontovyčová**

Supervisor: Doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.

Prague 2020

## Abstract

Phytohormones are small molecules that regulate almost all aspects of plant life including defence reactions. Plant defence and immunity are mainly regulated by two hormones – salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA). Other hormones such as auxins, cytokinins brassinosteroids or gibberellins modulate plant immunity to lesser extent. It has been described that plant pathogens are able to interfere with plant hormone signalling to overcome plant defence. Some pathogens are able to produce plant hormones themselves. This thesis is focused on plant hormone signalling involved in plant immunity both from the plant side and pathogen side and possible hormonal crosstalk in this interaction.

The first part is focused on salicylic acid signalling connected with plant actin cytoskeleton roles in plant immunity. It has been described that desintegration of actin cytoskeleton leads to increased plant susceptibility to bacteria. However, it has been also shown that pharmacological desintegration of actin filaments induces transcription of salicylic acid responsive genes *PR1* (Pathogenesis related 1) and *ICS1* (Isochorismate synthase 1). In this thesis we have investigated this inconsistency using actin depolymerizing drugs latrunculin B, cytochalasin E and jasplakinolide and two different pathosystems: *Arabidopsis thaliana* x *Pseudomonas syringae* pv. *tomato DC 3000* and *Brassica napus* x *Leptosphaeria maculans*. We treated the *A. thaliana* plants with the cytoskeletal drugs and first analyzed phytohormone profile and defence gene transcription. Specific induction of salicylic acid production and salicylic acid marker genes (*ICS1*, *ICS2* (Isochorismate synthase 2), *PR1*) was observed. Subsequently we infected the drug-pretreated *A. thaliana* or *B. napus* plants with corresponding pathogens which eventually resulted in increased resistance in both pathosystems. This phenomenon is salicylic acid dependent. It also depends on treatment timing, infection duration and specific pathosystem. Since actin dynamics is vital for correct cellular trafficking and membrane formation, we investigated deeper into this mechanism and focused on the role of phospholipids. We used *A. thaliana* mutant in phosphatidylinositol-4-kinase  $\beta 1$  and  $\beta 2$  (PI4K $\beta 1\beta 2$ ), which is known to be an SA overaccumulator, and a set of mutants affected in salicylic acid signalling. First, we tested callose deposition which is a defence

mechanism requiring functional trafficking machinery. We observed that treatment with cytoskeletal drugs triggers callose deposition via the activity of callose synthase 12 and is SA independent since it was observed even in mutants with blocked SA accumulation. Defence gene transcription and SA accumulation were blocked in the SA-signalling impaired mutants and reverted or partly reverted in triple mutants impaired in SA-signalling and *pi4kβ1/β2*. Altogether the results show that relationship between the actin cytoskeleton and plant immunity is more complex than generally assumed. Salicylic acid seems to be a major regulator of the onset of actin-depolymerization- triggered defence. Correct phospholipid signalling also seems to be important in this process.

Since we have focused on the role of salicylic acid we have established a collection of *A. thaliana* mutants that are affected in SA production, accumulation or signalling. Several of these mutants show affected resistance to pathogens. We have extensively characterized this mutant collection in terms of growth, cultivation condition dependency and SA production to create a tool for future studies dealing with plant immunity. Our characterization clearly shows correlation between SA overaccumulation and rosette growth retardation.

Second part of the thesis is focused on plant pathogens infection strategies affecting hormone signalling in plants. Pathogens secrete a variety of molecules that manipulate host hormone signalling. *Leptosphaeria maculans* is an important fungal pathogen of the brassica crops. We investigated the impact of *L. maculans* effector AvrLm4-7 on virulence and host defence. We performed inoculation assay with *L. maculans* isolates possessing functional and non-functional allele of AvrLm4-7 that revealed that effector AvrLm4-7 contributes significantly to *L. maculans* virulence. Further we analyzed host defence reactions – defence gene transcription, phytohormone profile and ROS burst. Infection with AvrLm4-7 containing isolate reduced SA-dependent defence response in *B. napus* plants. ROS burst was also suppressed. The results show that effector AvrLm4-7 increases virulence of *L. maculans* by suppressing SA related defence mechanisms.

Since there is increasing evidence that pathogens are able to produce phytohormones to manipulate host plant defence, we tested whether *L. maculans* possesses such activity. We tested phytohormone production in *L. maculans* and identified a variety of auxins, particularly the bioactive form indole-3-acetic acid (IAA). The IAA production can be stimulated by supplementing *L. maculans* culture with biosynthetic precursors tryptophan and tryptamine. There are orthologues of several known

biosynthetic genes in *L. maculans* genome. The precursors induce transcription of several of those genes; mainly *LmTAM1*, *LmIPDC2* and *LmNIT1*. Transcription of *LmIPDC1*, *LmlaaM3* and *LmlaaM5* was only slightly induced. Exogenous addition of highly concentrated auxin inhibited growth of *L. maculans* while no stimulatory effect was observed even upon low concentration of IAA. Auxin profile of infected plant showed only minor changes; endogenous concentration of indole-3-acetonitrile increased upon infection with *L. maculans*. The results show that *L. maculans* is able to produce high concentration of bioactive auxin but with no significant role in virulence. Auxin might function as a regulator in *L. maculans* itself.

This thesis focuses on particular aspects of plant signalling mainly connected with salicylic acid and other hormones to lesser extent and provides new insight into phytohormone signalling during infection process.

# Research aims

## Aim 1

The first aim of the thesis was to analyze more precisely the defence-related events connected with hormone signalling observed in plants treated with cytoskeletal drugs in previous publication of our laboratory<sup>1</sup>.

- to characterize conditions that are required for the onset of resistance induced by cytoskeletal drugs
- to assess whether the resistance phenomenon is more generally valid among plant species
- to assess which phytohormone pathways are activated upon actin cytoskeleton degradation

## Aim 2

The second aim of the thesis was to assess the role of phospholipids involved in plant immunity in connection with SA-signalling and actin stability. For this purpose we use a set of *A. thaliana* mutants impaired both in SA- and phospholipid signalling.

## Aim 3

Previous results of our laboratory revealed that plant pathogen *L. maculans* is able to produce phytohormones<sup>2</sup>. The second part of the thesis was focused on the ability of *L. maculans* to produce molecules that may possibly alter host phytohormone signalling. We focused either on small secreted proteins – effectors or phytohormone-like molecules. The main aims were:

- to characterize impact of effector AvrLm4-7 on host hormone signalling, virulence and internal fungal hormone content
- to characterize the ability of *L. maculans* to produce auxins
- to characterize role of the fungal produced auxins in the interaction of *L. maculans* with its plant host

## Results and conclusion

A wide range of phytohormones is involved in plant defence reactions. This thesis deals with the role of phytohormones during plant-microbe interactions from both sides: the host side and the attacker side. First part of the thesis is focused on the role of salicylic acid in the process of actin cytoskeleton disruption and related immune reactions.

### Actin cytoskeleton disruption can lead to plant resistance

The first aim of the thesis was focused on the role of actin in plant immunity. Previous results of our laboratory suggest that actin disruption triggers certain immune responses<sup>1</sup>, but majority of published studies points to a general conclusion that actin desintegration results in reduced plant resistance. The first aim of the thesis was to investigate this apparent inconsistency.

The actin cytoskeleton is a highly dynamic structure that provides stable environment for cellular trafficking, metabolism and signalling<sup>3</sup>. Its involvement in plant defence reactions has been documented by several studies. Treatment with MAMPs leads to actin reorganization<sup>4,5,6,7</sup>. It is involved in the delivery of antimicrobial compounds or callose synthases to the site of infection, trafficking of the immune receptors or reorganization of chloroplast movement during virus infection<sup>8,9</sup>. Both plant and animal pathogens evolved specific effectors that target actin cytoskeleton<sup>10,11,12,13,14</sup>. Therefore it has been generally assumed that disruption of actin cytoskeleton would lead to plant susceptibility. Our results however show that actin desintegration can induce plant resistance upon certain conditions in at least two tested pathosystems: model plant *Arabidopsis thaliana* x model bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and *Brassica napus* x *Leptosphaeria maculans*<sup>15,16</sup>. It seems that this phenomenon is not species specific or pathogen type specific. Different cytoskeletal drugs also induce similar pattern of defence reactions. Inoculation experiment with *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 revealed that plants need sufficient time to activate immunity after the actin disruption. When the plants were first treated with cytoskeletal drugs and infected after 24 h, the infection rate was lower than in control plants. When co-inoculation was used, no resistance was observed. Enhanced susceptibility to bacterial infection upon cytoskeletal drug treatment was observed before<sup>17</sup>. The second tested pathosystem showed different infection dynamics: Surprisingly, pre-treatment and co-treatment of *B. napus* with latrunculin B and *L. maculans* resulted in resistance in both cases. Since *L. maculans* grows asymptotically for at least 5 days in our setup, it seems that the rapidity of pathogen growth is

also an important factor. In contrast, bacterial pathogen *P. syringae* pv. *tomato DC3000* strongly infected leaves within three days. The slow growth of *L. maculans* provided the host *B. napus* plants with sufficient time to establish efficient defence.

Callose deposition is another well described defence mechanism that also relies on functional actin dynamics<sup>18</sup>. We showed that cytoskeletal drugs latrunculin B and cytochalasin E induce callose deposition in seedlings via the activity of PMR4 (Callose synthase 12). The Callose synthase 12 synthesizes most of biotic stress-induced callose<sup>19</sup>. Using *A. thaliana* knock-out mutant *pmr4-1* we clearly show that cytoskeletal drug induced callose deposition fully relies on functional PMR4.

Despite the general presumption, we show that actin disruption can induce plant resistance. The majority of published studies points to the general presumption that actin desintegration would lead to enhanced susceptibility, but there is also indirect evidence of enhanced defence: Disruption of actin leads to enhanced ROS burst in *A. thaliana* which is a result of activation of the FLS2 receptor by its flagellin derived ligand flg22<sup>20</sup>. Previous study done by our team on *A. thaliana* seedlings reported induction of SA-related genes<sup>1</sup> upon cytoskeletal drug treatment. Since we used similar setup as Matoušková et al.<sup>1</sup> we further investigated whether indeed the observed resistance is based on induced SA signalling.

### **The role of salicylic acid signalling in actin-depolymerization-induced immunity**

The previous results suggest that actin depolymerization might be predominantly connected with the SA signalling pathway<sup>1</sup>. We tested whether SA concentration does actually increase in *A. thaliana* treated with cytoskeletal drugs. The phytohormone profile of *A. thaliana* Col-0 (WT) treated with latrunculin B showed about 8 times induced SA concentration. Other changes were very minor: 2 times induction of JA and 2 times reduction of indole-3-acetonitrile (IAN). The SA concentration increased also in *pmr4-1* mutant<sup>16</sup>. Further we confirmed that SA pathway is involved by analysis of phytohormone content in a set of SA pathway impaired *A. thaliana* plants: *NahG* transformed plants and *sid2* and *pad4* mutants. The *NahG* transformed plants possess a SA hydroxylase that degrades most of produced SA. The *sid2* mutants are knock-out in isochorismate synthase 1 (*ICS1*) which is a vital component of the SA biosynthesis. The *pad4* mutants lack a regulation element PAD4 involved in SA signalling pathway. The *sid2* mutants did not show elevated SA level suggesting that the *ICS1* gene is solely responsible for the previously observed SA induction. The *ICS1* pathway is responsible for the stress-induced SA in *A. thaliana* infected by

*P. syringae* pv. *tomato* DC3000<sup>21,22,23</sup>. The *pad4* mutants showed increase in SA concentration to a lesser extent than WT which suggests a signalling role of the *PAD4* gene upon latrunculin B treatment. The *NahG* transformed plants possess a SA hydroxylase that degraded most of the induced SA<sup>24</sup>. The *ICS1* transcription was induced in WT after latrunculin B treatment. No other SA biosynthetic genes showed induced transcription. *ICS1* was induced also in *NahG* and *pad4*, which confirmed that the SA increase triggered by cytoskeletal drugs occurs via induction of the *ICS* pathway<sup>15</sup>. Transcription of JA biosynthetic gene *LOX2* was not induced although we observed slight induction of JA. Transcription of the *ICS1* gene was induced also in *B. napus* treated with latrunculin B.

Further we analyzed defence gene transcription after latrunculin B treatment. Latrunculin B induced transcription of SA-related defence genes *PR1*, *WRKY38*, *PAD4* and relies on SA accumulation and functional *PAD4* protein. The *PAD4* gene was induced also in *NahG* plants since it serves as a regulation element upstream of *ICS1*<sup>25</sup>. Another defence gene *PR2* was induced in WT, *NahG* and *pad4* plants. Its induced transcription is usually connected with induction of *PR1* and *PR5*<sup>26</sup>, but we report its independent induction in SA-impaired mutants. Previously we obtained similar results using cytoskeletal drug cytochalasin E<sup>1</sup>. The *PR2* protein coding  $\beta$ -1-3-glucanase involved in callose degradation and is important for antifungal defences<sup>27,28</sup>.

Transcription of wounding marker *BAPI* was induced in WT only. *BAPI* can be induced by high temperature or ROS and its transcription is associated with SA<sup>29</sup>. It is a negative regulator of hypersensitive response in response to *P. syringae* and *Hyaloperonospora parasitica*<sup>30</sup>. Other tested defence genes did not show altered transcription which suggests that latrunculin B mimics typical response triggered by biotrophic pathogens.

The underlying signalling seems to be at least partly SA independent since we observed callose accumulation also in *NahG* and *pad4* plants. The untreated *pmr4* mutants show similar SA level as WT. They are known to have generally stronger and faster SA-dependent response<sup>19</sup>. This suggests that certain “biotic stress-like” responses can be triggered alternatively independent of the SA molecule.



## The SA accumulation activated by degraded actin is connected with phospholipid signalling

Vesicular trafficking is an important component of plant defence<sup>8</sup>. It relies on functional actin dynamics and phospholipid signalling. The signalling phospholipids interact with the cytoskeleton<sup>31</sup>.

To test whether compromised phospholipid signalling affects the latrunculin B induced defence we tested *A. thaliana* double mutant in *PI4Kβ1/β2* genes. This mutant grows smaller rosettes at 4 weeks of cultivation than WT, accumulates more callose, has constitutively elevated SA level and is more resistant to broad spectrum of pathogens<sup>32,16,33</sup>. The actin cytoskeleton of *pi4kβ1/β2* mutants displayed higher level of degradation upon latrunculin B treatment. Untreated *pi4kβ1/β2* seedlings showed similar SA level as WT. This fact suggests that *pi4kβ1/β2* double mutation compromises actin stability<sup>16</sup>. To address potential involvement of phospholipids in the latrunculin B triggered SA pathway we used a set of triple mutants affected in SA signalling in the *pi4kβ1/β2* mutant background: *NahG/pi4kβ1/β2*, *pad4/pi4kβ1/β2* and *sid2/pi4kβ1/β2*. The SA induction in *pi4kβ1/β2* background still occurs despite the mutation in *PAD4* or expression of *NahG*. No SA accumulation was observed in *sid2/pi4kβ1/β2* which suggests that no other SA biosynthetic enzymes than *ICS1* are activated by latrunculin B. We analyzed related gene transcription in the similar treatment setup using the *NahG* and *pad4* plants. The transcription of SA biosynthetic gene *ICS1* was induced in both mutants. The SA-responsive genes *PR1* and *WRKY38* that were induced by latrunculin B in WT were no longer induced in *NahG* and *pad4*. The induction of *PR2* remained in *NahG* and *pad4*. Induction of *BAP1* was weakly significant in *NahG* but not significant in *pad4*. The transcription of the *PAD4* gene was not affected in *NahG* plants. Further we tested the same set of mutants affected in *PI4Kβ1/β2* enzymes (*sid2/pi4kβ1/β2*, *NahG/pi4kβ1/β2* and *pad4/pi4kβ1/β2*) in similar setup for SA accumulation, callose deposition and defence gene transcription. SA accumulation was partly restored in *NahG/pi4kβ1/β2* and *pad4/pi4kβ1/β2* when compared to *NahG* resp. *pad4*. No SA accumulation was observed in *sid2/pi4kβ1/β2*. Callose accumulation remained induced independently of SA accumulation. Gene transcription analysis correlated with the SA accumulation levels: *ICS1* transcription was induced in *NahG/pi4kβ1/β2* but not in *pad4/pi4kβ1/β2*. The SA-responsive genes *PR1*, *PR2* and *WRKY 38* were induced in all tested lines. The *PAD4* transcription was also induced in *NahG/pi4kβ1/β2* and *sid2/pi4kβ1/β2*. Wounding marker *BAP1* was induced in *pad4/pi4kβ1/β2* but not in *NahG/pi4kβ1/β2*.

The effect of *pi4kβ1/β2* double mutation on cytoskeleton might be broader than investigated here since the double mutants also show ectopic overstabilization of phragmoplast microtubules, which guide membrane trafficking at the cell plate<sup>34</sup>.

### **Cultivation conditions highly contribute to SA-dependent growth phenotype**

We observed that the *pi4kβ1/β2* mutant shows different level of basal SA accumulation compared to WT in seedlings and adult plants and this fact may affect results of further studies. For more complex characterization of the connection between SA and growth we created a collection of 14 *A. thaliana* mutants in Col-0 background having alterations in the SA pathway. The mutants were divided into several categories according to previously described phenotypes: SA-overaccumulators connected with lipid signalling (*pi4kβ1/β2*, *fah1/fah2*), suspected SA-overaccumulators (*cpr5-1*, *acd6-1*, *pi4kβ1/β2*, *fah1/fah2*, *bon1-1*, *exo70B1-2*, *pmr4-1*, *edr2-6*), mutants associated with SA signalling based on gene transcription and pathogenicity assays (*edr2-6*, *pmr4-1*, *exo70B1-2*) and mutants with prevented SA accumulation (*sid2/pi4kβ1/β2*, *NahG/pi4kβ1/β2* and *NahG/edr2-6*). All the selected mutants exhibit altered resistance to pathogens. In terms of growth the proposed SA overaccumulators generally displayed dwarf phenotype, which has been documented before<sup>32,35</sup>. The SA content mainly confirmed proposed negative correlation with rosette size. We analyzed also transcription of SA-related genes *PRI* and *ICS1*. In this study we addressed the importance of precise characterization of cultivation conditions since some phenotypes might be only pronounced in specific environment.

### **Microbial effectors affect plant-hormone signalling**

The third aim of the thesis was focused rather on virulence factors that plant pathogens use to overcome plant defence. These virulence factors often target plant hormone signalling.

The second part of the thesis is focused rather on pathogens weapons to overcome host plant defence, particularly those dealing with phytohormone signalling. First, we studied whether *L. maculans* effector AvrLm4-7 affects host phytohormone signalling. For this purpose we used two isolates of *L. maculans* differing in the presence of the AvrLm4-7 effector. The AvrLm4-7 effector is recognized by the RLM4 receptor. This interaction is accompanied by strong induction of SA and ethylene (ET) signalling in the host<sup>36</sup>. In the compatible interaction the SA and ET signalling pathways might be primary targets of the AvrLm4-7 effector. AvrLm4-7 seems to suppress SA

signalling both on the level of SA biosynthesis and transcription of SA-responsive genes (*BnPRI*). The ET signalling is attenuated in AvrLm4-7 infected cotyledons; transcription of ET-responsive genes *ACS2* and *HEL* decreased in time during infection. We reported the first evidence of manipulation of SA signalling pathway by a haemibiotrophic fungus.

Since the effectors largely affect plant hormone signalling and we have observed that the fungus itself is able to synthesize a variety of phytohormone-like structures we speculated whether these compounds might function as effectors themselves?

### **Role of auxins during growth and infection process of *L. maculans***

Various microorganisms were documented to produce phytohormone-like molecules<sup>37,38,39,40</sup>. In this thesis we focused particularly on the ability of *L. maculans* to produce auxins<sup>41</sup>. The main auxin produced by *L. maculans in vitro* is the bioactive molecule IAA. Since it is produced in high concentration and can be also excreted from the mycelium into cultivation medium, we hypothesized it might function as an infection strategy. The hormone profile of infected plants though did not differ dramatically, although an increase in OxIAA was observed. OxIAA is a degradation product of IAA which is no longer bioactive. This fact might suggest that the plant is trying to maintain constant levels of bioactive IAA. No genes that participate in the conversion of IAA into OxIAA were identified in *B. napus* up to date, although they were identified in *A. thaliana*<sup>42,43</sup>. Exogenous IAA inhibits growth of *L. maculans* in high concentration. Conidial germination was totally blocked by 1 mM IAA. Inhibitory effect was observed in fungus *Fusarium. graminearum* that produced 50% less biomass when cultured in 1 mM IAA<sup>44</sup>. On the other hand growth of *Moniliophthora perniciosa* was stimulated by low concentration of IAA<sup>45</sup>. We have observed no stimulatory effect in *L. maculans*. In the presented thesis we have not confirmed that auxins function as a virulence trait in this fungus in a similar way effectors do, but it might serve as internal regulation molecule for the fungus itself.

Further we investigated internal biosynthesis, metabolism and putative signalling function of *L. maculans* auxins. We have tested two sister isolates (entitled JN2 and JN3) obtained in the same parent cross<sup>46</sup> and observed that both isolates are able to produce bioactive form of auxin, IAA, and a variety of other auxin forms in minor concentration. Genome analysis of *L. maculans* revealed presence of orthologues of genes previously identified as auxin biosynthetic in other microorganisms and plants. Genes participating in indole-3-pyruvate (IPyA), IAN and indole-3-

acetamide (IAM) biosynthetic pathways were identified. Precursor feeding experiments on JN2 isolate revealed that mainly genes from the IPyA pathway are active in converting tryptophan to IAA. Predominantly induced genes were *LmTAM1* (tryptophan aminotransferase), *LmIPDC1* and *LmIPDC2* (indole-3-pyruvate decarboxylases). *LmTAM1* might directly metabolize tryptophan into IPyA which would be subsequently converted to IAA by IPDC. The aldehyde dehydrogenase IAD that has also been reported to participate in the IPyA pathway mediated biosynthesis in fungi was also found in *L. maculans* genome. No induction of the the IAD orthologues was observed in our setup. Intermediates predicted in the IPyA pathway were not detected possibly due to their instability. Our study is the first to report involvement of an IPDC gene in auxin biosynthesis in a pathogenic fungus. Recent study confirmed its activity in a symbiotic fungus *Neurospora crassa*<sup>47</sup>. Functional IPDCs were previously described in several plant-associated bacteria such as *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens* or *Pantoea ananatis*<sup>48,49,50,51</sup>. There are two clear orthologues of the *P. ananatis* IPDC in the *L. maculans* genome, both were induced upon tryptophan treatment. Recently, the involvement of IPDC in IAA biosynthesis has been documented in a non-pathogenic fungus *N. crassa*<sup>52</sup>. We are the first to report the involvement of this gene in auxin biosynthesis also in a pathogenic fungus.

The levels of IAA in host plant did not significantly change upon infection with the JN3 isolate which produced high amount of IAA *in vitro*. The infection with *L. maculans* though is associated with an increase in the OxIAA metabolite in the infected tissue. Thereby the plant may aim to maintain stable levels of its endogenous IAA by converting/oxidizing the bioactive IAA. The host auxin profile remained otherwise largely the same. In some plant-microbial systems, IAA has been shown to act as an important virulence factor that impairs the defense-associated, phytohormone signalling of the host<sup>53,54</sup> in a similar way as effectors do<sup>55,36,56</sup>. Some fungi require auxin for proper colonization and infection process as documented in pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Magnaporthe oryzae* or symbiotic fungus *Piriformospora indica*<sup>57,58,38</sup>. Externally-added IAA increased the virulence of insect-pathogenic *Metarhizium robertsii* spores on *Beauveria bassiana*<sup>40</sup> and loss of auxin production lowered virulence of *M. robertsii* against *B. bassiana*<sup>40</sup>. *N. crassa* with blocked IAA biosynthesis produces less conidiospores<sup>52</sup>.

Overall this thesis deals with the role of phytohormones within plant defence. We demonstrated that actin-depolymerization triggered defence pathway that might eventually result in plant

resistance due to SA signalling. Apart from SA, phospholipids are involved in the correct onset of this particular cytoskeleton-connected immunity. Following research would be dedicated to understanding what is the molecule being sensed when the actin degradation occurs. Further we are providing evidence that auxins are produced by *L. maculans* with specific strain-dependent manner. We did not show that auxins produced by *L. maculans* are produced as virulence factors neither we have a clear clue they work as internal regulators in fungi. This would be addressed by future research.

## **Main findings of the thesis**

This thesis focuses on several aspects of plant immunity involving phytohormone signalling. The included publications deal with stress hormone signalling both from the plant side and the pathogen side. The main findings presented in this thesis are:

- Actin cytoskeleton disruption leads at certain conditions to plant resistance
- The onset of resistance triggered by actin desintegration is mediated by salicylic acid signalling
- There are also immunity effects triggered by actin depolymerization independently of the SA signalling
- Functional phospholipid signalling is important in the process of actin-depolymerization-triggered immunity response
- Mutants impaired in salicylic acid signalling pathway provide a useful tool for future studies dealing with growth and immunity
- Effector AvrLm4-7 affects SA and ET signalling pathways and ROS burst in *B. napus*
- *L. maculans* produces bioactive auxin
- *L. maculans* genes *LmTAM1* and *LmIPDC2* are associated with the auxin production

## Publications included in the dissertation thesis

Results of this thesis are summarized in six impacted publications

1. **Leontovyčová, H.**, Kalachova, T., Trdá, L., Pospíchalová, R., Lamparová L., Dobrev, P. I., Malínská, K., Burketová, L., Valentová, O. and Janda, M.: Actin depolymerization is able to increase plant resistance against pathogens via activation of salicylic acid signalling pathway. *Scientific Reports* **9**, 10397 (2019; IF 3,998) <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46465-5>
2. Kalachova, T., **Leontovyčová, H.**, Iakovenko, O., Pospíchalová, R., Maršík, P., Klouček, P., Janda, M., Valentová, O., Kocourková, D., Martinec, J., Burketová, L. and Ruelland, E.: Interplay between phosphoinositides and actin cytoskeleton in the regulation of immunity related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **167**,103867 (2019; IF 4,010); doi: 10.1016/j.envexpbot.2019.103867
3. Pluhařová, K., **Leontovyčová, H.**, Stoudková, V., Pospíchalová, R., Maršík, P., Klouček, P., Starodubtseva, A., Iakovenko, O., Krčková, Z., Valentová, O., Burketová, L., Janda, M. a Kalachova, T.: Salicylic acid mutant collection” as a tool to explore the role of salicylic acid in regulation of plant growth under a changing environment. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 6365 (2019, IF 4,183); doi:10.3390/ijms20246365
4. Nováková M., Šásek, V., Trdá, L., **Krutinová H.**, Mongin, T., Valentová, O., Balesdent, M.-H., Rouxel, T. and Burketová, L.: *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm4-7 affects salicylic acid (SA) and ethylene (ET) signalling and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation in *Brassica napus*. *Molecular Plant Pathology* (2015; IF 4,335); doi: 10.1111/mpp.12332

5. **Leontovyčová, H.,** Trdá, L., Dobrev, P. I., Šásek, V., Gay, E., Balesdent M.-H., and Burketová, L.: Auxin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* involves indole-3-pyruvate decarboxylase LmIPDC2 and tryptophan aminotransferase LmTAM1. *Research in Microbiology* (2020; IF 3,217); doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.05.001>
  
6. **Leontovyčová, H.,** Kalachova, T. and Janda, M.: Disrupted actin: a novel player in pathogen attack sensing? *New Phytologist* (2020, IF 7,690); doi: <https://doi.org/10.1111/nph.16584>

## Curriculum vitae

### HANA LEONTOVYČOVÁ (neé. KRUTINOVÁ)

Date and place of birth: 3. 8. 1990, Mělník, Czech Republic

email: hana.leontovycova@gmail.com; leontovycova@ueb.cas.cz

#### Field of interest:

Plant immunity, plant-microbe interaction, molecular biology, DNA cloning, GoldenBraid cloning, Gateway cloning, MAMP recognition, RNAi gene silencing, CRISPR-Cas9, phytohormones

#### Job history:

---

- 2018:** Research internship (2,5 months), Mycology Laboratory, University of Melbourne, Australia  
Head scientist: Dr. Alexander Idnurm
- 2017 – 2019:** PhD project related research, Laboratory of plant biochemistry, UCT Prague, Czech Republic  
Head Scientist: Prof. RNDr. Olga Valentová, CSc.
- 2016:** Erasmus internship (5 months), The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK,  
Head scientist: Prof. Cyril Zipfel
- 2014 - present:** PhD project, Laboratory of pathological plant physiology AS CR, Prague, Czech Republic  
Head scientist: Doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.
- 2012 - 2014:** Master thesis related research, Laboratory of pathological plant physiology AS CR, Prague, Czech Republic  
Head scientist: Doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.
- 2011 - 2012:** Bachelor thesis related research, Laboratory of pathological plant physiology AS CR, Prague, Czech Republic  
Head scientist: Doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.



## Education

---

- 2018**                    **TULIP Summer School 2018:** Biological interactions: from genes to ecosystems
- 2014 – present:**      **PhD programme, Biochemistry,** Faculty of Science, Charles University in Prague,  
Czech Republic
- 2012 – 2014:**        **MSc programme, Biochemistry,** Faculty of Science, Charles University in Prague,  
Czech Republic
- 2009 - 2012:**        **BSc programme, Biochemistry,** Faculty of Science, Charles University in Prague  
Czech Republic

## Publications

---

Leontovyčová, H., Trdá, L., Dobrev, P. I., Šašek, V., Gay, E., Balesdent M.-H., and Burketová, L.: Auxin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* involves indole-3-pyruvate decarboxylase LmIPDC2 and tryptophan aminotransferase LmTAM1. Res. Microbiol. (2020) doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.05.001>

Leontovyčová, H., Kalachova, T. and Janda, M.: Disrupted actin: a novel player in pathogen attack sensing? (2020) New Phytol.; doi:<https://doi.org/10.1111/nph.16584>

Pluhařová, K., Leontovyčová, H., Stoudková, V., Pospíchalová, R., Maršík, P., Klouček, P., Starodubtseva, A., Iakovenko, O., Krčková, Z., Valentová, O., Burketová, L., Janda, M. a Kalachova, T. (2019) Salicylic acid mutant collection” as a tool to explore the role of salicylic acid in regulation of plant growth under a changing environment. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6365; doi:10.3390/ijms20246365

Kalachova T, Leontovyčová H, Iakovenko O, Pospíchalová R, Maršík P, Klouček P, Janda M, Valentová O, Kocourková D, Martinec J, Burketová L, Ruelland E (2019) Interplay between phosphoinositides and actin cytoskeleton in the regulation of immunity related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environ Exper Bot* (167). <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103867>

Leontovyčová H, Kalachova T, Trdá L, Pospíchalová R, Lamparová L, Dobrev P, Malínská K, Burketová L, Valentová O, Janda M (2019) Actin depolymerization is able to increase plant resistance against pathogens via activation of salicylic acid signalling pathway, *SciRep* (9)

Krutinová H, Trdá L, Kalachova T, Lamparová L, Pospíchalová R, Dobrev P, Malínská K, Burketová L, Valentová O, Janda M (2018) Can Actin Depolymerization Actually Result In Increased Plant Resistance To Pathogens? *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/278986>

Nováková M, Šašek V, Trdá L, Krutinová H, Mongin T, Valentová O, Balesdent M, Rouxel T, Burketová L (2015) *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm4-7 affects SA- and ET-signalling and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation in *Brassica napus*. *Mol Plant Pathol.* 2015 Nov 17. doi: 10.1111/mpp.12332.

## Conferences attended

---

- 2019**      **Plant Developmental and Production Biology under Global Climate Change, Brno, Czech Republic** - Can actin depolymerization induce plant resistance? (Hana Leontovyčová, Lucie Trdá, Tetiana Kalachova, Lucie Nečasová, Petre Dobrev, Romana Pospíchalová, Kateřina Malínská, Lenka Burketová, Olga Valentová, Martin Janda)
- Plant Biology CS 2019, České Budějovice, ČR** – Can actin depolymerization lead to increased plant resistance? (Leontovyčová Hana, Trdá Lucie, Kalachova Tetiana, Nečasová Lucie, Dobrev Petre I, Pospíchalová Romana, Malínská Kateřina, Burketová Lenka, Valentová Olga and Janda Martin)
- 2018**      **6<sup>th</sup> Stromlo Molecular Plant Pathology meeting, Canberra, Australia** – Can actin depolymerisation lead to increased plant resistance? (Hana Leontovyčová, Lucie Trdá, Tetiana Kalachova, Lucie Lamparová, Petre I. Dobrev, Romana Pospíchalová, Kateřina Malínská, Lenka Burketová, Olga Valentová and Martin Janda)
- 2017**      **6<sup>th</sup> International Conference on Microbial Communication for Young Scientists, Jena, Germany** – The role of auxins in the interaction of plant and a hemibiotrophic fungal pathogen *Leptosphaeria maculans* (Hana Krutinová, Vladimír Matěj Šašek, Petre Ivanov Dobrev, Lucie Trdá and Lenka Burketová)
- 14th Student conference of experimental plant biology, Bratislava, Slovakia** –Auxins produced by fungal plant pathogen as a possible virulence factor (Hana Krutinová, Vladimír Matěj Šašek, Lucie Trdá, Petre Ivanov Dobrev, Denisa Macková and Lenka Burketová)
- 2016**      **GRC Cellular and molecular fungal biology 2016, Holderness, USA** – Auxins produced by pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* and their role in the infection process (Hana Krutinová, Vladimír Matěj Šašek, Lenka Burketová, Petre Ivanov Dobrev and Lucie Trdá)

**2015**                    **13. Student days of experimental plant biology, Brno, Czech Republic –**  
The role of auxins in the interaction of plant and a hemibiotrophic pathogen  
(Hana Krutinová, Vladimír Matěj Šašek, Petre Ivanov Dobrev, Lenka  
Burketová, Lucie Trdá)

**2014**                    **6. Days of plant methods, Seč, Czech Republic –** Gene manipulation in a  
filamentous fungus *Leptosphaeria maculans* (Lucie Trdá, Miroslava  
Nováková, Monika Barešová, Hana Krutinová, Vladimír Šašek, Lenka  
Burketová)

### Teaching

---

**2017**                    **Discover 2017 Summer School for Secondary school students, Podskalie,**  
**Slovakia -** Biology teacher

**Supervisor of Secondary school research project -** Heat and cold stress effect  
on germination and selection of heat stress genetic markers in *Raphanus sativus*  
(author Lucia Tribulová, Slovakia)

### Language skills

---

English                    CAE, grade B

## References

1. Matoušková, J. *et al.* Changes in actin dynamics are involved in salicylic acid signaling pathway. *Plant Sci.* **223**, 36–44 (2014).
2. Trdá, L. *et al.* Cytokinin metabolism of pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* Involves isopentenyltransferase, adenosine kinase and cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Front. Microbiol.* **8**, 1–20 (2017).
3. Porter, K. & Day, B. From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. *J. Integr. Plant Biol.* **58**, 299–311 (2016).
4. Li, J., Cao, L. & Staiger, C. J. Capping protein modulates actin remodeling in response to reactive oxygen species during plant innate immunity. *Plant Physiol.* **173**, 1125 LP – 1136 (2017).
5. Tang, C. *et al.* TaADF3, an actin-depolymerizing factor, negatively modulates wheat resistance against *Puccinia striiformis*. *Front. Plant Sci.* **6**, 1214 (2016).
6. Kumar, A. S. *et al.* Stromule extension along microtubules coordinated with actin-mediated anchoring guides perinuclear chloroplast movement during innate immunity. *Elife* **7**, e23625 (2018).
7. Sassmann, S. *et al.* An immune-responsive cytoskeletal-plasma membrane feedback loop in plants. *Curr. Biol.* **28**, 2136–2144 (2018).
8. Li, P. & Day, B. Battlefield cytoskeleton: Turning the tide on plant immunity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **32**, 25–34 (2018).
9. Saravana Kumar, P., Yuvaraj, P., Gabriel Paulraj, M., Ignacimuthu, S. & Abdullah Al-Dhabi, N. Bio-prospecting of soil *Streptomyces* and its bioassay-guided isolation of microbial derived auxin with antifungal properties. *J. Mycol. Med.* **28**, 462–468 (2018).
10. Jelenska, J., Kang, Y. & Greenberg, J. T. Plant pathogenic bacteria target the actin microfilament network involved in the trafficking of disease defense components.

*Bioarchitecture* **4**, 149–153 (2014).

11. Kang, Y. *et al.* HopW1 from *Pseudomonas syringae* disrupts the actin cytoskeleton to promote virulence in Arabidopsis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004232–e1004232 (2014).
12. Shimono, M. *et al.* The *Pseudomonas syringae* type III effector HopG1 induces actin remodeling to promote symptom development and susceptibility during infection. *Plant Physiol.* **171**, 2239 LP – 2255 (2016).
13. Franco, I. S., Shohdy, N. & Shuman, H. A. The *Legionella pneumophila* effector VipA is an actin nucleator that alters host cell organelle trafficking. *PLoS Pathog.* **8**, e1002546–e1002546 (2012).
14. Rosqvist, R., Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* **59**, 4562 LP – 4569 (1991).
15. Leontovyčová, H. *et al.* Actin depolymerization is able to increase plant resistance against pathogens via activation of salicylic acid signalling pathway. *Sci. Rep.* **9**, 10397 (2019).
16. Kalachova, T. *et al.* Interplay between phosphoinositides and actin cytoskeleton in the regulation of immunity related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environ. Exp. Bot.* **167**, 103867 (2019).
17. Henty-Ridilla, J. L., Li, J., Day, B. & Staiger, C. J. ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR4 regulates actin dynamics during innate immune signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 340 LP – 352 (2014).
18. Ellinger, D. & Voigt, C. A. Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Ann. Bot.* **114**, 1349–1358 (2014).
19. Nishimura, M. T. *et al.* Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science.* **301**, 969 LP – 972 (2003).
20. Sun, H. *et al.* Profilin negatively regulates formin-mediated actin assembly to modulate

PAMP-triggered plant immunity. *Curr. Biol.* **28**, 1882-1895 (2018).

21. Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. & Ausubel, F. M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562–565 (2001).
22. Zhang, Y. & Li, X. Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **50**, 29–36 (2019).
23. Zheng, X. *et al.* Spatial and temporal regulation of biosynthesis of the plant immune signal salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 9166 LP – 9173 (2015).
24. Nawrath, C. & Métraux, J.-P. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393 LP – 1404 (1999).
25. Cui, H. *et al.* A core function of EDS1 with PAD4 is to protect the salicylic acid defense sector in *Arabidopsis* immunity. *New Phytol.* **213**, 1802–1817 (2017).
26. Hamamouch, N., Li, C., Seo, P. I. L. J., Park, C.-M. & Davis, E. L. Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 355–364 (2011).
27. Ali, S. *et al.* Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol. Res.* **212–213**, 29–37 (2018).
28. Oide, S. *et al.* A novel role of *PR2* in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **200**, 1187–1199 (2013).
29. Zhu, Y., Yang, H., Mang, H.-G. & Hua, J. Induction of *BAP1* by a moderate decrease in temperature is mediated by *ICE1* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **155**, 580 LP – 588 (2011).
30. Yang, H., Li, Y. & Hua, J. The C2 domain protein *BAP1* negatively regulates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* **48**, 238–248 (2006).
31. Pleskot, R., Pejchar, P., Staiger, C. & Potocký, M. When fat is not bad: the regulation of actin dynamics by phospholipid signaling molecules. *Front. in Plant Sci.* **5**, 5 (2014).

32. Šašek, V. *et al.* Constitutive salicylic acid accumulation in *pi4kIIIβ1β2 Arabidopsis* plants stunts rosette but not root growth. *New Phytol.* **203**, 805–816 (2014).
33. Pluhařová, K. *et al.* “Salicylic Acid Mutant Collection” as a tool to explore the role of salicylic acid in regulation of plant growth under a changing environment. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 6365 (2019).
34. Lin, D. L. *et al.* Phospholipase D-derived phosphatidic acid promotes root hair development under phosphorus deficiency by suppressing vacuolar degradation of PIN-FORMED2. *New Phytol.* (2019) doi:10.1111/nph.16330.
35. Janda, M. & Ruelland, E. Magical mystery tour: Salicylic acid signalling. *Environ. Exp. Bot.* **114**, 117–128 (2015).
36. Šašek, V. *et al.* Recognition of avirulence gene AvrLm1 from hemibiotrophic ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signaling in Brassica napus. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **25**, 1238–50 (2012).
37. Chanclud, E. *et al.* Cytokinin production by the rice blast fungus is a pivotal requirement for full virulence. *PLoS Pathog.* **12**, e1005457–e1005457 (2016).
38. Tanaka, E., Koga, H., Mori, M. & Mori, M. Auxin production by the rice blast fungus and its localization in host tissue. *J. Phytopathol.* **159**, 522–530 (2011).
39. Reineke, G. *et al.* Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 339–355 (2008).
40. Liao, X., Lovett, B., Fang, W. & Leger, R. J. S. *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in *Arabidopsis* and enhances virulence to insects. *Microbiology* **163**, 980–991 (2018).
41. Leontovyčová, H. *et al.* Auxin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* is associated with enhanced transcription of indole-3-pyruvate decarboxylase *LmIPDC2* and tryptophan aminotransferase *LmTAM1*. *Res. Microbiol.* 1–11 (2020)



<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.05.001>

42. Zhang, J. *et al.* DAO1 catalyzes temporal and tissue-specific oxidative inactivation of auxin in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 11010 LP – 11015 (2016).
43. Porco, S. *et al.* Dioxygenase-encoding *AtDAO1* gene controls IAA oxidation and homeostasis in *Arabidopsis*; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 11016 LP – 11021 (2016).
44. Luo, K. *et al.* Indole-3-acetic acid in *Fusarium graminearum*: Identification of biosynthetic pathways and characterization of physiological effects. *Fungal Biol.* **120**, 1135–1145 (2016).
45. Kilaru, A., Bailey, B. a & Hasenstein, K. H. *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiol. Lett.* **274**, 238–44 (2007).
46. Balesdent, M. H., Attard, A., Kühn, M. L. & Rouxel, T. New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **92**, 1122–33 (2002).
47. Darma, R., Lutz, A., Elliott, C. E. & Idnurm, A. Identification of a gene cluster for the synthesis of the plant hormone abscisic acid in the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol.* **130**, 62–71 (2019).
48. Spaepen, S. *et al.* Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **189**, 7626–7633 (2007).
49. Somers, E., Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M. & Vanderleyden, J. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1803–1810 (2005).
50. Brandl, M. T. & Lindow, S. E. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4121–4128 (1996).
51. Brandl, M. T., Lindow, S. E., Biology, M. & Hall, K. Environmental signals modulate the

- expression of an indole-3-acetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 499–505 (1997).
52. Sardar, P. & Kempken, F. Characterization of indole-3-pyruvic acid pathway-mediated biosynthesis of auxin in *Neurospora crassa*. *PLoS One* **13**, e0192293 (2018).
  53. Cohen, B. A, Amsellem, Z., Maor, R., Sharon, A. & Gressel, J. Transgenically enhanced expression of indole-3-acetic acid confers hypervirulence to plant pathogens. *Phytopathology* **92**, 590–6 (2002).
  54. Yin, C., Park, J.-J., Gang, D. R. & Hulbert, S. H. Characterization of a tryptophan 2-monooxygenase gene from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **27**, 227–35 (2014).
  55. Nováková, M. *et al.* *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm4-7 affects salicylic acid (SA) and ethylene (ET) signalling and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation in *Brassica napus*. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 818–831 (2016).
  56. Kazan, K. & Lyons, R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *Plant Cell* **26**, 1–26 (2014).
  57. Hilbert, M. *et al.* Indole derivative production by the root endophyte *Piriformospora indica* is not required for growth promotion but for biotrophic colonization of barley roots. *New Phytol.* **196**, 520–534 (2012).
  58. Maor, R., Haskin, S., Levi-Kedmi, H. & Sharon, A. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Appl. Environ. Microbiolgy* **70**, 1852–1854 (2004).

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta  
Katedra biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



Role fytohomonů v interakci patogenů *Pseudomonas syringae* a  
*Leptosphaeria maculans* s hostitelskými rostlinami

**Mgr. Hana Leontovyčová**

Školitel: Doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.

Praha 2020

## Abstrakt

Fytohormony jsou malé molekuly podílející se na řízení téměř všech životních procesů v rostlinném organismu včetně obranných reakcí. Hlavními fytohormony, které regulují rostlinné obranné reakce, jsou kyselina salicylová (SA) a kyselina jasmonová (JA). Další hormony jako auxiny, cytokininy, brassinosteroidy nebo gibberelliny ovlivňují rostlinnou imunitu zpravidla nepřímou. Rostlinné patogeny jsou schopny narušovat hormonální signalizaci hostitele, díky čemuž úspěšně překonávají rostlinné obranné mechanismy a způsobují infekci. Některé patogeny samy produkují fytohormony. Tato práce se soustředí na rostlinnou hormonální signalizaci hrající roli v imunitní odpovědi z pohledu hostitelské rostliny i z pohledu rostlinného patogenu.

První část se zabývá rolí signální dráhy kyseliny salicylové a aktinového cytoskeletu v obranné signalizaci. Bylo popsáno, že porušení integrity aktinového cytoskeletu vede ke snížení odolnosti rostlin k bakteriální infekci. Dále je také známo, že farmakologické porušení aktinového cytoskeletu indukuje transkripci markerových genů dráhy kyseliny salicylové (*ICS1*, *PR1*). V této práci jsme se zabývali tímto rozporuplným fenoménem. K experimentům byly použity cytoskeletární drogy cytochalasin E, latrunculin B a jasplakinolid a dva patosystémy: *Arabidopsis thaliana* x *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 a *Brassica napus* x *Leptosphaeria maculans*. Nejprve byly rostliny *A. thaliana* ošetřeny cytoskeletárními drogami a byl analyzován hormonální profil a transkripce obranných genů. Došlo ke specifickému zvýšení produkce kyseliny salicylové a transkripce markerových genů dráhy kyseliny salicylové. Dále byly ošetřené rostliny *A. thaliana* a *B. napus* infikovány příslušnými patogeny a překvapivě v obou patosystémech došlo ke zvýšení odolnosti ošetřených rostlin. Tento jev je regulovaný kyselinou salicylovou a jeho navození je závislé na režimu ošetření, čase infekce a konkrétním patosystému.

Neporušená dynamika aktinového cytoskeletu je nezbytná pro vnitrobuněčný transport a syntézu membrán, proto jsme se dále zabývali rolí fosfolipidů během indukce resistance rozrušením aktinového cytoskeletu. Pro tyto experimenty byly použity rostliny *A. thaliana* s mutací v genech pro fosfatidylinositol-4-kinasu  $\beta 1$  a  $\beta 2$  (PI4K $\beta 1\beta 2$ ), u nichž byla popsána zvýšená akumulace kyseliny salicylové, a několik dalších mutantů *A. thaliana* s mutacemi v signální dráze SA. Nejprve bylo otestováno ukládání kalosy, což je obranná reakce vyžadující funkční buněčný transport. Ošetření cytoskeletárními drogami spouští ukládání kalosy díky aktivitě kalosasyntasy 12 a je nezávislé na SA, neboť bylo pozorováno i u mutantů se zablokovanou indukcí SA. Transkripce

obránných genů a akumulace SA nebyly pozorovány u mutantů defektních v signální dráze SA a byly úplně nebo částečně revertovány u trojitých mutantů defektních v SA signální dráze a zároveň v genech pro PI-4-kinasu  $\beta 1$  a  $\beta 2$ . Tyto výsledky naznačují, že role aktinového cytoskeletu v rostlinné imunitě je komplexnější než se dosud předpokládalo. Kyselina salicylová hraje významnou roli při vyvolání obranné reakce spuštěné dezintegrací aktinových vláken a zároveň je v tomto procesu významná fosfolipidová signalizace.

Jelikož se tato práce významně zabývá kyselinou salicylovou, v další části byla vytvořena kolekce mutantů *A. thaliana* ovlivněných v produkci, akumulaci nebo signalizaci kyseliny salicylové. U některých těchto mutantů byly popsány změny v odolnosti vůči patogenům. Všichni mutanti kolekce byli pěstováni v několika různých kultivačních režimech a následně byl charakterizován růst růžic a kořenů, intenzita fotosyntézy, koncentrace SA a transkripce SA markerových genů. Tato kolekce představuje užitečný nástroj pro další studie zabývající se rostlinnou imunitou. Z výsledků charakterizace vyplývá jasná korelace mezi retardací růstu růžic a zvýšenou akumulací SA.

Druhá část práce se zabývá infekčními strategiemi rostlinných patogenů ovlivňujícími hormonální signalizaci hostitele.

Patogeny sekretují také další molekuly, kterými manipulují hormonální signalizaci hostitele. Malé sekretované proteiny, tzv. efektory, jsou příkladem takových molekul. Tato práce se zabývá efekterem AvrLm4-7 a jeho významem pro virulenci a tlumení obranných reakcí hostitele. Inokulační test rostlin *B. napus* izoláty *L. maculans* exprimujícími funkční a nefunkční alelu AvrLm4-7 ukázal, že přítomnost funkčního efektoru AvrLm4-7 výrazně přispívá k virulenci *L. maculans*. Dále byly analyzovány obranné reakce – transkripce obranných genů, hormonální profil a produkce reaktivních forem kyslíku. Infekce izolátem s funkčním AvrLm4-7 vedla k redukci indukce SA a nižší transkripci SA markerových genů. Produkce reaktivních forem kyslíku byla rovněž snížena. Efektor AvrLm4-7 přispívá k virulenci *L. maculans* potlačením SA-dependentních obranných reakcí hostitele.

Některé patogeny samy produkují rostlinné hormony. V rámci této práce bylo zjištěno, že houbový patogen řepky olejky (*B. napus*) *L. maculans* také produkuje řadu rostlinných hormonů. Tato práce se soustředí především na auxiny. V myceliu *L. maculans* bylo nalezeno několik forem auxinů, v nejvyšší koncentraci se vyskytovala bioaktivní forma, indol-3-octová kyselina (IAA). Produkce

IAA může být zvýšena přidáním biosyntetických prekurozrů tryptofanu a tryptaminu k tekuté kultuře. V genomu *L. maculans* byly nalezeny orthologuey několika známých genů auxinových biosyntetických drah. Biosyntetické prekurzory indukovaly transkripci několika těchto genů; především *LmTAM1*, *LmIPDC2* a *LmNIT1*. Transkripce genů *LmIPDC1*, *LmIaaM3* a *LmIaaM5* byla zvýšena pouze mírně. Exogenní aplikace auxinu ve vysoké koncentraci inhibovala růst *L. maculans* a žádná z použitých koncentrací neměla stimulační efekt. Auxinový profil infikovaných rostlin *B. napus* se liší pouze minimálně; v rostlinách infikovaných *L. maculans* byla pozorována zvýšená koncentrace indol-3-acetonitrilu. Tyto výsledky ukazují, že *L. maculans* je schopna produkovat vysokou koncentraci bioaktivního auxinu IAA, který ale nemá výrazný vliv na průběh infekce. Mohl by ale plnit regulační funkci v samotném patogenu.

Tato práce se zabývá specifickými aspekty rostlinné signalizace, především ve spojení s kyselinou salicylovou a dalšími rostlinnými hormony.

# Cíle práce

## Cíl 1

Prvním cílem této práce byla podrobnější charakterizace obraných reakcí rostliny, vyvolaných ošetřením cytoskeletárními drogami, a jejich spojení s hormonální signalizací popsaných v dřívější publikaci naší laboratoře<sup>1</sup>. Hlavními tématy bylo:

- Charakterizovat podmínky nutné pro navození rezistence způsobené cytoskeletárními drogami
- Zjistit, zda fenomén takto navozené rezistence je pozorovatelný u více rostlinných druhů
- Zjistit, jak je během imunitní odpovědi na rozrušení aktinového cytoskeletu ovlivněn hormonální signální systém rostliny

## Cíl 2

Dalším cílem bylo popsat roli fosfolipidů zapojených v rostlinné imunitě při spuštění SA signální dráhy pomocí cytoskeletárních drog. Pro tento účel bylo použito několik mutantů *A. thaliana* s defekty v signální dráze SA a fosfolipidové signalizaci.

## Cíl 3

Předchozí výsledky laboratoře odhalily, že rostlinný patogen *L. maculans* dokáže produkovat fytohormony<sup>2</sup>. Třetím cílem práce bylo zjistit, zda *L. maculans* produkuje další molekuly (fytohormony, efekty), které mohou ovlivnit interakci s hostitelskou rostlinou. Zaměřili jsme se na malé sekretované proteiny – efekty a fytohormony či fytohormonům podobné molekuly. Hlavní náplní bylo:

- Charakterizace vlivu efektoru AvrLm4-7 na hormonální signalizaci hostitelské rostliny, virulenci patogenu a obsah hormonů v samotném patogenu
- Charakterizace produkce auxinů v *L. maculans*
- Charakterizace role auxinů při interakci *L. maculans* s hostitelskou rostlinou

## Výsledky a závěr

Rostlinných obranných reakcí se účastní široké spektrum fytohormonů. Tato práce se zabývá rolí fytohormonů během interakce rostlin a mikroorganismů jak ze strany mikroorganismu, tak ze strany hostitelské rostliny. První část práce se zabývá rolí kyseliny salicylové (SA) v procesu dezintegrace aktinového cytoskeletu a následných imunitních reakcí.

### **Rozrušení aktinového cytoskeletu může vést ke zvýšení odolnosti rostlin**

Prvním cílem této práce byla podrobná charakterizace imunitní odpovědi, vyvolané rozrušením aktinového cytoskeletu pomocí cytoskeletárních drog. Aktinový cytoskelet je dynamická struktura zajišťující stabilní prostředí pro buněčný transport, metabolismus a signalizaci<sup>3</sup>. Zapojení aktinového cytoskeletu v rostlinné imunitě bylo popsáno v několika publikacích. Ošetření MAMPs způsobuje reorganizaci aktinových vláken<sup>4,5,6,7</sup>. Dále se cytoskelet účastní transportu antimikrobiálních sloučenin nebo kalosynthas do místa infekce, transportu imunitních receptorů nebo reorganizace pohybu chloroplastů během virové infekce<sup>8,9</sup>. Rostlinné i živočišné patogeny vyvinuly specifické efekторы, které cílí na aktinový cytoskelet<sup>10,11,12,13,14</sup>. Obecně se tedy předpokládá, že rozrušení aktinového cytoskeletu povede ke snížení odolnosti rostliny. Naše výsledky ale ukazují, že rozrušení aktinových vláken může za určitých podmínek vést ke zvýšení odolnosti v nejméně dvou testovaných patosystémech: modelová rostlina *A. thaliana* x modelový bakteriální patogen *P. syringae* pv. *tomato DC3000* a *B. napus* x *L. maculans*<sup>15,16</sup>. Zdá se, že tento jev není specifický pro druh rostliny či patogenu. Použití různých cytoskeletárních drog vyvolalo podobné obranné reakce. Inokulační experiment s bakterií *P. syringae* pv. *tomato DC3000* ukázal, že rostliny potřebují dostatek času k efektivní aktivaci imunity po rozrušení aktinových vláken. Pokud byly rostliny nejprve ošetřeny cytoskeletární drogou a infikovány po 24h, byly pozorovány méně závažné příznaky infekce. V případě, že byly rostliny současně ošetřeny cytoskeletární drogou a infikovány patogenem, žádná zvýšená odolnost nebyla pozorována. Snížená odolnost k bakteriální infekci po ošetření cytoskeletární drogou byla již dříve popsána<sup>17</sup>. V druhém testovaném patosystému byla pozorována jiná dynamika infekce: překvapivě ošetření rostlin *B. napus* latrunculinem B před infekcí i současně s infekcí vedlo ke zvýšení odolnosti. Zdá se, že rychlost růstu patogenu je v tomto případě důležitým faktorem, neboť *L. maculans* v našich podmínkách roste asymptomaticky po dobu nejméně pěti dní. Naproti tomu bakterie *P. syringae*



pv. *tomato DC3000* způsobuje závažné příznaky během tří dní. Pomalý růst *L. maculans* zajistil hostitelské rostlině dostatek času pro účinnou aktivaci imunity.

Ukládání kalosy je dalším dobře popsaným mechanismem závislým na správné dynamice aktinového cytoskeletu<sup>18</sup>. Výsledky ukazují, že cytoskeletární drogy latrunculin B a cytochalasin E indukují ukládání kalosy díky aktivitě kalosasyntasy 12 PMR4. Kalosasyntasa 12 je zodpovědná za většinu kalosy indukované během biotického stresu<sup>19</sup>. Použitím knock-out mutanta *pmr4-1* jsme potvrdili, že ukládání kalosy indukované cytoskeletárními drogami plně závisí na aktivitě PMR4.

Naše výsledky ukazují, že rozrušení aktinových vláken může indukovat zvýšení odolnosti rostlin. Většina publikovaných studií poukazuje na obecný předpoklad, že rozrušení aktinového cytoskeletu povede ke snížení odolnosti, ale byly publikovány i nepřímé důkazy indukce imunity: Rozrušení aktinových vláken zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku v *A. thaliana* jako reakci na aktivaci receptoru FLS2 derivátem flagelinu flg22<sup>20</sup>. Předchozí publikace naší laboratoře ukazuje indukci transkripce SA-responsivních genů v semenáčcích *A. thaliana*<sup>1</sup>. Protože jsme použili stejné experimentální podmínky jako Matoušková et al.<sup>1</sup>, zjišťovali jsme dále, zda je pozorovaná zvýšená resistance skutečně závislá na dráze kyseliny salicylové.

### **Role signální dráhy kyseliny salicylové v imunitní reakci indukované depolymerizací aktinu**

Předchozí výsledky ukazují, že depolymerizace aktinu indukuje signální dráhu SA<sup>1</sup>. Testovali jsme, zda se skutečně zvyšuje koncentrace SA v rostlinách *A. thaliana* ošetřených cytoskeletárními drogami. Hormonální profil rostlin *A. thaliana* Col-0 ošetřených latrunculinem B ukázal osminásobné zvýšení koncentrace SA. Ostatní hormonální změny byly pouze drobné: koncentrace JA se zvýšila dvakrát a koncentrace indol-3-acetonitrilu (IAN) se dvakrát snížila. Koncentrace SA se zvýšila také v mutantu *pmr4-1*<sup>16</sup>.

Dále jsme potvrdili zapojení SA dráhy analýzou hormonálního profilu v mutantech defektních v SA dráze: *NahG*, *sid2* a *pad4*. Mutanti *sid2* nevykazovali zvýšení SA, což vede k předpokladu, že za biosyntézu SA je v tomto případě zodpovědný výlučně gen *ICS1*. Biosyntetická dráha *ICS1* je v *A. thaliana* zodpovědná za indukci SA během bakteriální infekce<sup>21,22,23</sup>. U mutantů *pad4* byla pozorována méně výrazná indukce SA, což naznačuje důležitou roli signálního elementu PAD4 po ošetření latrunculinem B. Rostliny *NahG* mají v genomu vložen gen pro SA hydroxylasu, která

degraduje většinu indukované SA<sup>24</sup>. Latrunculin B indukuje transkripci *ICSI*. Žádné další biosyntetické geny indukovány nebyly. Gen *ICSI* byl indukován také v *NahG* a *pad4*, což potvrzuje hypotézu, že indukovaná SA je syntetizována výlučně pomocí *ICSI*<sup>15</sup>. Transkripce JA biosyntetického genu *LOX2* nebyla indukována i přes mírné zvýšení koncentrace JA. Zvýšená transkripce *ICSI* byla pozorována i v rostlinách *B. napus* ošetřených latrunculinem B.

Dále jsme analyzovali transkripci obranných genů po ošetření latrunculinem B. Pozorovali jsme indukovanou transkripci genů spojených se SA drahou *PR1*, *WRKY38* a *PAD4*. Transkripce *PAD4* byla zvýšena i v mutantech *NahG* neboť *PAD4* slouží jako regulační element aktivity *ICSI*<sup>25</sup>. Další z obranných genů, *PR2*, byl indukován v rostlinách divokého typu, mutantech *NahG* a mutantech *pad4*. Zvýšená transkripce tohoto genu je obvykle spojena s indukovanou transkripcí *PR1* a *PR5*<sup>26</sup>. Zde popisujeme nezávislou indukci tohoto genu v rostlinách divokého typu a mutantech v SA dráze. Dříve jsme již získali podobné výsledky použitím cytoskeletární drogy cytoshalasin E. Gen *PR2* kóduje  $\beta$ -1-3-glukanasu zapojenou do degradace kalosy, která je významná pro obranu proti houbovým chorobám<sup>27,28</sup>.

Transkripce markeru mechanického poškození *BAPI* byla indukována pouze v rostlinách divokého typu. Transkripce *BAPI* může být indukována vysokou teplotou nebo reaktivními formami kyslíku a je spojena s indukcí SA<sup>29</sup>. Je to negativní regulátor hypersensitivní reakce odpovídající na infekci *P. syringae* a *Hyaloperonospora parasitica*<sup>30</sup>. Další testované geny nebyly ovlivněny, což ukazuje, že latrunculin B navozuje typickou odpověď spouštěnou biotrofními patogeny.

Príslušná signalizace se zdá být také alespoň částečně nezávislá na SA neboť jsme pozorovali ukládání kalosy i v *NahG* a *pad4* mutantech. Neošetření mutanti *pmr4* vykazovali stejnou koncentraci SA jako rostliny divokého typu. Tito mutanti mají silnější a rychlejší reakci indukovanou SA<sup>19</sup>. Tyto výsledky naznačují, že určité odpovědi typické pro biotický stres mohou být spuštěny alternativní cestou nezávislou na molekule SA.

### **Akumulace SA aktivovaná degradací aktinu je spojena s fosfolipidovou signalizací**

Druhým cílem této práce bylo zjistit, jakou roli hraje fosfolipidová signalizace během imunitní odpovědi spouštěné cytoskeletárními drogami. Vesikulární transport je důležitou složkou rostlinné obrany<sup>8</sup>, která závislá na funkční aktinové dynamice a fosfolipidové signalizaci. Signální fosfolipidy interagují s cytoskeletem<sup>31</sup>. Abychom zjistili, zda má poškozená fosfolipidová

signalizace vliv na indukci obranných reakcí vyvolaných latrunculinem B použili jsme k dalším experimentům dvojitého mutantu *A. thaliana* v genech pro PI-4-kinasu  $\beta 1$  a  $\beta 2$  (*PI4K $\beta 1/\beta 2$* ). U tohoto mutantu dochází k růstu menších růžic po čtyřech týdnech kultivace, akumuluje více kalosy, má konstitutivně zvýšenou hladinu SA a je více rezistentní vůči mnoha patogenům<sup>32,16,33</sup>. Aktinový cytoskelet mutantu *pi4k $\beta 1/\beta 2$*  vykazoval vyšší míru degradace oproti rostlinám divokého typu po ošetření latrunculinem B. U neošetřené semenáčků *pi4k $\beta 1/\beta 2$*  byla zjištěna stejná koncentrace SA jako v semenáčcích rostlin divokého typu. To naznačuje, že mutace v genech *pi4k $\beta 1/\beta 2$*  negativně ovlivňuje stabilitu aktinu<sup>16</sup>. Pro další studium role fosfolipidů v indukci SA dráhy pomocí latrunculinu B byli použiti mutanti s defekty v SA dráze a zároveň v genech *pi4k $\beta 1/\beta 2$* : *NahG/pi4k $\beta 1/\beta 2$* , *pad4/pi4k $\beta 1/\beta 2$*  a *sid2/pi4k $\beta 1/\beta 2$* . V mutantech *NahG/pi4k $\beta 1/\beta 2$*  a *pad4/pi4k $\beta 1/\beta 2$*  po ošetření latrunculinem B překvapivě stále dochází k indukci SA. V mutantu *sid2/pi4k $\beta 1/\beta 2$*  indukce SA pozorována nebyla, což naznačuje, že stále není aktivní jiná SA biosyntetická dráha než dráha *ICS1*.

Transkripce obranných genů korelovala s akumulací SA: transkripce *ICS1* byla indukována v *NahG/pi4k $\beta 1/\beta 2$*  ale ne v *pad4/pi4k $\beta 1/\beta 2$* . Geny odpovídající na zvýšenou koncentraci SA *PRI*, *PR2* a *WRKY 38* byly indukovány ve všech testovaných liniích. Transkripce *PAD4* byla indukována v *NahG/pi4k $\beta 1/\beta 2$*  a *sid2/pi4k $\beta 1/\beta 2$* . Marker mechanického poškození *BAP1* byl indukován v *pad4/pi4k $\beta 1/\beta 2$* , ale nikoli v *NahG/pi4k $\beta 1/\beta 2$* .

### **Kultivační podmínky výrazně přispívají k růstovému fenotypu asociovanému s SA**

U mutantů *pi4k $\beta 1/\beta 2$*  byla zjištěna různá úroveň bazální akumulace SA vzhledem k rostlinám divokého typu v semenáčcích a dospělých rostlinách. Toto zjištění může ovlivnit výsledky budoucího výzkumu. Pro detailnější charakterizaci spojení SA a růstu jsme vytvořili kolekci 14 mutantů *A. thaliana* Col-0 ekotypu majících defektní SA dráhu. Mutanti byli rozděleni do několika kategorií dle dříve popaných fenotypů: SA-overakumulující mutanti spojení s lipidovou signalizací (*pi4k $\beta 1/\beta 2$* , *fah1/fah2*), suspektní SA-overakumulující mutanti (*cpr5-1*, *acd6-1*, *pi4k $\beta 1/\beta 2$* , *fah1/fah2*, *bon1-1*, *exo70B1-2*, *pmr4-1*, *edr2-6*), mutanti spojení se SA dráhou na základě genové transkripce a testů odolnosti k patogenům (*edr2-6*, *pmr4-1*, *exo70B1-2*) a mutanti se zablokovanou akumulací SA (*sid2/pi4k $\beta 1/\beta 2$* , *NahG/pi4k $\beta 1/\beta 2$*  a *NahG/edr2-6*). Všichni tito mutanti vykazují odchylky v odolnosti vůči patogenům. U mutantů predikovaných jako SA-overakumulující jsme obecně pozorovali retardovaný růst růžic, což bylo u některých již dříve popsáno<sup>32,35</sup>. Koncentrace

SA převážně potvrdila negativní korelaci s velikostí růžic. Dále jsme analyzovali transkripci genů spojených s SA – *PR1* a *ICSI*. V této publikaci jsme se zaměřili na důležitost charakterizace kultivačních podmínek neboť některé fenotypy mohou být dobře pozorovány jen ve specifickém prostředí.

### **Mikrobiální efekторы ovlivňují rostlinnou hormonální signalizaci**

Poslední cíl práce se soustředí na prostředky rostlinných patogenů jimiž překonávají obranu hostitele, zvláště ty, které ovlivňují hormonální signalizaci. Nejprve jsme studovali zda efektor *L. maculans* AvrLm4-7 ovlivňuje hormonální signalizaci hostitele.

Pro tyto experimenty jsme použili dva izoláty *L. maculans* z nichž jeden obsahuje funkční alelu efektoru AvrLm4-7 a druhý nikoli. Efektor AvrLm4-7 je rozeznáván receptorem RLM4. Tato rozpoznávací reakce je doprovázena silnou indukcí signálních drah SA a etylénu<sup>36</sup>. Během kompatibilní interakce tak mohou být signální dráhy SA a ET primárním cílem efektoru AvrLm4-7. Tento efektor pravděpodobně potlačuje SA signalizaci na úrovni biosyntézy SA i na úrovni transkripce obranných genů (*BnPR1*). Signalizace ET je potlačena v děložních listech infikovaných AvrLm4-7 obsahujícím izolátem; transkripce ET asociovaných genů *ACS2* a *HEL* se v průběhu infekce snižovala. Tyto výsledky jsou prvním důkazem manipulace SA dráhy hemibiotrofní patogenní houbou.

### **Role auxinů během růstu a infekčního procesu *L. maculans***

Mnoho různých mikroorganismů je schopno produkovat fytohormony nebo molekuly obdobné struktury<sup>37,38,39,40</sup>. Ve studii číslo 5 jsme se zaměřili na schopnost *L. maculans* produkovat auxiny<sup>41</sup>. Hlavním auxinem produkovaným *L. maculans* *in vitro* je bioaktivní molekula IAA. Jelikož je produkována ve vysoké koncentraci a byla pozorována i v kultivačním mediu, mohla by její produkce fungovat jako infekční strategie patogenu. Hormonální profil infikovaných rostlin se ale dramaticky neliší od kontrolních rostlin, pozorovali jsme pouze zvýšení metabolitu OxIAA. OxIAA je degradační produkt IAA a není bioaktivní. Tento fakt naznačuje, že se rostlina snaží zajistit konstantní hladinu bioaktivního auxinu. V *B. napus* nebyly dosud identifikovány žádné geny účastníci se konverze IAA na OxIAA, i přesto, že v *A. thaliana* již funkčně identifikovány byly<sup>42,43</sup>. Exogenně aplikovaná IAA ve vysoké koncentraci inhibuje růst *L. maculans*. Germinace konidií byla úplně zablokována pomocí 1mM IAA. Inhibiční efekt na růst byl pozorován také u

houby *Fusarium graminearum*, která produkovala o 50% méně biomasy při kultivaci v 1 mM IAA<sup>44</sup>. Naproti tomu růst houby *Moniliophthora perniciosa* byl stimulován nízkou koncentrací IAA<sup>45</sup>. U *L. maculans* nebyl pozorován žádný stimulační efekt. V této práci jsme také nepotvrdili hypotézu, že auxin funguje jako virulenční faktor *L. maculans*. Je ale možné, že zastává interní regulační funkce. Dále jsme se zabývali biosyntézou, metabolismem a případnou signální funkcí auxinů produkovaných *L. maculans*.

K experimentům byly použity dva sesterské izoláty (označené jako JN2 a JN3) u nichž byla pozorována schopnost syntetizovat IAA a několik dalších forem auxinu v nízkých koncentracích. Analýza genomu *L. maculans* odhalila přítomnost orthologů genů dříve popsáných jako auxin-biosyntetické v jiných mikroorganismech a rostlinách. Byly identifikovány geny participující v IPyA, IAN a IAM biosyntetických drahách. Ošetření izolátu JN2 biosyntetickými prekurzory odhalilo, že na produkci IAA z tryptofanu se podílí především geny IPyA dráhy. Nejvíce zvýšená transkripce byla pozorována u genů *LmTAMI* (tryptofanaminotransferasa), *LmIPDC1* a *LmIPDC2* (indol-3-pyruvátdekarboxylasy). *LmTAMI* pravděpodobně přímo přeměňuje tryptofan na IPyA, která může být následně přeměněna na IAA pomocí IPDC. Aldehyddehydrogenasa IAD, která se v jiných houbách také účastní této biosyntetické dráhy, byla též identifikována v genomu *L. maculans*, ale nepozorovali jsme žádnou indukci transkripce. Pravděpodobné mezislučeniny nebyly indentifikovány, což může být způsobeno jejich nestabilitou. Naše výsledky jako první ukazují zapojení dekarboxylasy IPDC v biosyntéze auxinů v patogenní houbě. Nedávná studie potvrdila tuto aktivitu v symbiotické houbě *Neurospora crassa*<sup>47</sup>. Funkční IPDC dekarboxylasy byly dříve popsány u několika bakterií jako *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens* nebo *Pantoea ananatis*<sup>48,49,50,51</sup>. V genomu *L. maculans* se nachází dva orthology IPDC z *P. ananatis*, jejichž transkripce se zvýšila po ošetření kultury *L. maculans* tryptofanem. V některých interakcích mezi rostlinou a mikroorganismem byl auxin identifikován jako virulenční faktor ovlivňující hormonální signalizaci hostitele<sup>53,54</sup> podobně jako efekторы<sup>55,36,56</sup>. Některé houby potřebují auxin pro správný proces kolonizace hostitele, například *C. gloeosporioides*, *M. oryzae* nebo symbiotická houba *Piriformospora indica*<sup>57,58,38</sup>. Externí auxin zvýšil virulenci patogenu *Metarhizium robertsii* na hmyzím hostiteli *Beauveria bassiana*<sup>40</sup> a ztráta schopnosti syntetizovat auxin naopak virulenci snížila. *N. crassa* se zablokovanou syntézou IAA produkuje méně konidiospor<sup>52</sup>.

Tato práce se zabývá rolí fytohormonů během obranných reakcí rostlin. Ukázali jsme, že depolymerizace aktinu vede ke spuštění specifické obranné dráhy, která za určitých podmínek vede ke zvýšení resistance rostlin prostřednictvím aktivace SA dráhy. Kromě SA jsou v této dráze zapojeny také fosfolipidy. Navazující výzkum by se měl týkat objasnění mechanismu rozpoznání degradace aktinového cytoskeletu. Dále jsme prokázali, že *L. maculans* produkuje auxiny. Tato produkce se kvantitativně liší v jednotlivých izolátech. Neproukázali jsme, že by auxiny byly produkovány jako virulenční faktor ani jsme jasně neprokázali, že fungují jako interní signální molekula v samotné houbě. Tato otázka by měla být předmětem navazujícího výzkumu. Práce je zaměřena na několik aspektů rostlinné imunity, v nichž jsou zapojeny fytohormony. Vložené publikace se zabývají hormonální stresovou signalizací z pohledu hostitelské rostliny i rostlinného patogenu.

## Hlavní závěry

- Rozrušení aktinového cytoskeletu vede za určitých podmínek ke zvýšení resistance rostlin
- Navození resistance pomocí rozrušení aktinového cytoskeletu je zprostředkováno signální drahou kyseliny salicylové
- Některé imunitní reakce spuštěné cytoskeletárními drogami jsou spouštěny nezávisle na SA dráze
- Funkční fosfolipidová signalizace je nezbytná pro imunitní odpověď spouštěnou dezintegrací aktinového cytoskeletu
- Mutanti s defektní signální drahou SA jsou užitečným nástrojem pro budoucí výzkum týkající se růstu a imunity rostlin
- Efektor AvrLm4-7 ovlivňuje SA a ET signalizaci a produkci ROS v rostlinách *B. napus*
- *L. maculans* produkuje bioaktivní auxin
- Transkripce genů *LmTAM1* a *LmIPDC2* se významně zvyšuje během produkce auxinu v houbě *L. maculans*

## Curriculum vitae

### HANA LEONTOVYČOVÁ ( roz. KRUTINOVÁ)

Datum a místo narození: 3. 8. 1990, Mělník, Česká republika

email: hana.leontovycova@gmail.com

**Oblast zájmu:** Rostlinná imunita, interakce rostlin a mikroorganismů, molekulární biologie, klonování DNA, GoldenBraid klonování, Gateway klonování, MAMP rozpoznávání, RNAi gene silencing, CRISPR-Cas9, fytohormony

#### Praxe:

---

- 2018:** Výzkumná stáž (2,5 měsíce), Mycology Laboratory, University of Melbourne, Austrálie  
Vedoucí laboratoře: Dr. Alexander Idnurm
- 2017 – dosud:** Výzkum související s PhD projektem, Laboratoř biochemie rostlin, VŠCHT Praha, ČR  
Vedoucí laboratoře: Prof. RNDr. Olga Valentová, CSc.
- 2016:** Erasmus pracovní stáž (5 měsíců), The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK,  
Vedoucí laboratoře: Prof. Cyril Zipfel
- 2014- dosud:** PhD výzkumný projekt, Laboratoř patofyziologie rostlin AV ČR, Praha, ČR  
Vedoucí laboratoře: Doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.
- 2012 - 2014:** Praxe v rámci zpracování diplomové práce, Laboratoř patofyziologie rostlin AV ČR, Praha, ČR  
Vedoucí laboratoře: Doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.
- 2011-2012:** Praxe v rámci zpracování bakalářské práce, Laboratoř patofyziologie rostlin AV ČR, Praha, ČR  
Vedoucí laboratoře: Doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.

## Vzdělání

---

- 2018**                    **Kurz TULIP Summer School 2018:** Biological interactions: from genes to ecosystems
- 2014 – dosud:**        **Doktorský studijní program Biochemie,** Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha, ČR
- 2012 – 2014:**        **Magisterský studijní program Biochemie,** Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha, ČR
- 2009 - 2012:**        **Bakalářský studijní program Biochemie,** Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha, ČR



## Publikace

---

Leontovyčová, H., Trdá, L., Dobrev, P. I., Šašek, V., Gay, E., Balesdent M.-H., and Burketová, L.: Auxin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* involves indole-3-pyruvate decarboxylase LmIPDC2 and tryptophan aminotransferase LmTAM1. Res. Microbiol. (2020) doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.05.001>

Leontovyčová, H., Kalachova, T. and Janda, M.: Disrupted actin: a novel player in pathogen attack sensing? (2020) New Phytol.; doi:<https://doi.org/10.1111/nph.16584>

Pluhařová, K., Leontovyčová, H., Stoudková, V., Pospíchalová, R., Maršík, P., Klouček, P., Starodubtseva, A., Iakovenko, O., Krčková, Z., Valentová, O., Burketová, L., Janda, M. a Kalachova, T. (2019) Salicylic acid mutant collection” as a tool to explore the role of salicylic acid in regulation of plant growth under a changing environment. Int. J. Mol. Sci. 20, 6365; doi:10.3390/ijms20246365

Kalachova T, Leontovyčová H, Iakovenko O, Pospíchalová R, Maršík P, Klouček P, Janda M, Valentová O, Kocourková D, Martinec J, Burketová L, Ruelland E (2019) Interplay between phosphoinositides and actin cytoskeleton in the regulation of immunity related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Environ Exper Bot (167). <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103867>

Leontovyčová H, Kalachova T, Trdá L, Pospíchalová R, Lamparová L, Dobrev P, Malínská K, Burketová L, Valentová O, Janda M (2019) Actin depolymerization is able to increase plant resistance against pathogens via activation of salicylic acid signalling pathway, SciRep (9)

Krutinová H, Trdá L, Kalachova T, Lamparová L, Pospíchalová R, Dobrev P, Malínská K, Burketová L, Valentová O, Janda M (2018) Can Actin Depolymerization Actually Result In Increased Plant Resistance To Pathogens? BioRxiv, <https://doi.org/10.1101/278986>

Nováková M, Šašek V, Trdá L, Krutinová H, Mongin T, Valentová O, Balesdent M, Rouxel T, Burketová L (2015) *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm4-7 affects SA- and ET-signalling and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation in *Brassica napus*. Mol Plant Pathol. 2015 Nov 17. doi: 10.1111/mpp.12332.

## Konference

- 
- 2019** **Plant Developmental and Production Biology under Global Climate Change, Brno, Czech Republic** - Can actin depolymerization induce plant resistance? (Hana Leontovyčová, Lucie Trdá, Tetiana Kalachova, Lucie Nečasová, Petre Dobrev, Romana Pospíchalová, Kateřina Malínská, Lenka Burketová, Olga Valentová, Martin Janda)
- Plant Biology CS 2019, České Budějovice, ČR** – Can actin depolymerization lead to increased plant resistance? (Leontovyčová Hana, Trdá Lucie, Kalachova Tetiana, Nečasová Lucie, Dobrev Petre I, Pospíchalová Romana, Malínská Kateřina, Burketová Lenka, Valentová Olga and Janda Martin)
- 2018** **6<sup>th</sup> Stromlo Molecular Plant Pathology meeting, Canberra, Australia** – Can actin depolymerisation lead to increased plant resistance? (Hana Leontovyčová, Lucie Trdá, Tetiana Kalachova, Lucie Lamparová, Petre I. Dobrev, Romana Pospíchalová, Kateřina Malínská, Lenka Burketová, Olga Valentová and Martin Janda)
- 2017** **6<sup>th</sup> International Conference on Microbial Communication for Young Scientists, Jena, Germany** – The role of auxins in the interaction of plant and

a hemibiotrophic fungal pathogen *Leptosphaeria maculans* (Hana Krutinová, Vladimír Matěj Šašek, Petre Ivanov Dobrev, Lucie Trdá and Lenka Burketová)

**14th Student conference of experimental plant biology, Bratislava, Slovakia** –Auxins produced by fungal plant pathogen as a possible virulence factor (Hana Krutinová, Vladimír Matěj Šašek, Lucie Trdá, Petre Ivanov Dobrev, Denisa Macková and Lenka Burketová)

**2016** **GRC Cellular and molecular fungal biology 2016, Holderness, USA** – Auxins produced by pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* and their role in the infection process (Hana Krutinová, Vladimír Matěj Šašek, Lenka Burketová, Petre Ivanov Dobrev and Lucie Trdá)

**2015** **13. Student days of experimental plant biology, Brno, Czech Republic** – The role of auxins in the interaction of plant and a hemibiotrophic pathogen (Hana Krutinová, Vladimír Matěj Šašek, Petre Ivanov Dobrev, Lenka Burketová, Lucie Trdá)

**2014** **6. Days of plant methods, Seč, Czech Republic** – Gene manipulation in a filamentous fungus *Leptosphaeria maculans* (Lucie Trdá, Miroslava Nováková, Monika Barešová, Hana Krutinová, Vladimír Šašek, Lenka Burketová)

#### **Pedagogická činnost**

---

**2017** **Discover 2017 Letní akademie, Podskalie, Slovensko** – Lektorka kurzu biologie

**Školitelka SOČ projektu** – Vliv teplotního stresu na klíčení a vytipování genetických markerů teplotního stresu v *Raphanus sativus* (autorka Lucia Tribulová, Slovensko)

## **Jazykové znalosti**

---

Angličtina – Certifikát CAE, hodnocení B

## Použitá literatura

1. Matoušková, J. *et al.* Changes in actin dynamics are involved in salicylic acid signaling pathway. *Plant Sci.* **223**, 36–44 (2014).
2. Trdá, L. *et al.* Cytokinin metabolism of pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* Involves isopentenyltransferase, adenosine kinase and cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Front. Microbiol.* **8**, 1–20 (2017).
3. Porter, K. & Day, B. From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. *J. Integr. Plant Biol.* **58**, 299–311 (2016).
4. Li, J., Cao, L. & Staiger, C. J. Capping protein modulates actin remodeling in response to reactive oxygen species during plant innate immunity. *Plant Physiol.* **173**, 1125 LP – 1136 (2017).
5. Tang, C. *et al.* TaADF3, an actin-depolymerizing factor, negatively modulates wheat resistance against *Puccinia striiformis*. *Front. Plant Sci.* **6**, 1214 (2016).
6. Kumar, A. S. *et al.* Stromule extension along microtubules coordinated with actin-mediated anchoring guides perinuclear chloroplast movement during innate immunity. *Elife* **7**, e23625 (2018).
7. Sassmann, S. *et al.* An immune-responsive cytoskeletal-plasma membrane feedback loop in plants. *Curr. Biol.* **28**, 2136–2144 (2018).
8. Li, P. & Day, B. Battlefield cytoskeleton: Turning the tide on plant immunity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **32**, 25–34 (2018).
9. Saravana Kumar, P., Yuvaraj, P., Gabriel Paulraj, M., Ignacimuthu, S. & Abdullah Al-Dhabi, N. Bio-prospecting of soil *Streptomyces* and its bioassay-guided isolation of microbial derived auxin with antifungal properties. *J. Mycol. Med.* **28**, 462–468 (2018).
10. Jelenska, J., Kang, Y. & Greenberg, J. T. Plant pathogenic bacteria target the actin

- microfilament network involved in the trafficking of disease defense components. *Bioarchitecture* **4**, 149–153 (2014).
11. Kang, Y. *et al.* HopW1 from *Pseudomonas syringae* disrupts the actin cytoskeleton to promote virulence in Arabidopsis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004232–e1004232 (2014).
  12. Shimono, M. *et al.* The *Pseudomonas syringae* type III effector HopG1 induces actin remodeling to promote symptom development and susceptibility during infection. *Plant Physiol.* **171**, 2239 LP – 2255 (2016).
  13. Franco, I. S., Shohdy, N. & Shuman, H. A. The *Legionella pneumophila* effector VipA is an actin nucleator that alters host cell organelle trafficking. *PLoS Pathog.* **8**, e1002546–e1002546 (2012).
  14. Rosqvist, R., Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* **59**, 4562 LP – 4569 (1991).
  15. Leontovyčová, H. *et al.* Actin depolymerization is able to increase plant resistance against pathogens via activation of salicylic acid signalling pathway. *Sci. Rep.* **9**, 10397 (2019).
  16. Kalachova, T. *et al.* Interplay between phosphoinositides and actin cytoskeleton in the regulation of immunity related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environ. Exp. Bot.* **167**, 103867 (2019).
  17. Henty-Ridilla, J. L., Li, J., Day, B. & Staiger, C. J. ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR4 regulates actin dynamics during innate immune signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 340 LP – 352 (2014).
  18. Ellinger, D. & Voigt, C. A. Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Ann. Bot.* **114**, 1349–1358 (2014).
  19. Nishimura, M. T. *et al.* Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science.* **301**, 969 LP – 972 (2003).

20. Sun, H. *et al.* Profilin negatively regulates formin-mediated actin assembly to modulate PAMP-triggered plant immunity. *Curr. Biol.* **28**, 1882-1895 (2018).
21. Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. & Ausubel, F. M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562–565 (2001).
22. Zhang, Y. & Li, X. Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **50**, 29–36 (2019).
23. Zheng, X. *et al.* Spatial and temporal regulation of biosynthesis of the plant immune signal salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 9166 LP – 9173 (2015).
24. Nawrath, C. & Métraux, J.-P. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393 LP – 1404 (1999).
25. Cui, H. *et al.* A core function of EDS1 with PAD4 is to protect the salicylic acid defense sector in *Arabidopsis* immunity. *New Phytol.* **213**, 1802–1817 (2017).
26. Hamamouch, N., Li, C., Seo, P. I. L. J., Park, C.-M. & Davis, E. L. Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 355–364 (2011).
27. Ali, S. *et al.* Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol. Res.* **212–213**, 29–37 (2018).
28. Oide, S. *et al.* A novel role of *PR2* in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **200**, 1187–1199 (2013).
29. Zhu, Y., Yang, H., Mang, H.-G. & Hua, J. Induction of *BAP1* by a moderate decrease in temperature is mediated by *ICE1* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **155**, 580 LP – 588 (2011).
30. Yang, H., Li, Y. & Hua, J. The C2 domain protein BAP1 negatively regulates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* **48**, 238–248 (2006).
31. Pleskot, R., Pejchar, P., Staiger, C. & Potocký, M. When fat is not bad: the regulation of

- actin dynamics by phospholipid signaling molecules. *Front. in Plant Sci.* **5**, 5 (2014).
32. Šašek, V. *et al.* Constitutive salicylic acid accumulation in *pi4kIIIβ1β2 Arabidopsis* plants stunts rosette but not root growth. *New Phytol.* **203**, 805–816 (2014).
  33. Pluhařová, K. *et al.* “Salicylic Acid Mutant Collection” as a tool to explore the role of salicylic acid in regulation of plant growth under a changing environment. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 6365 (2019).
  34. Lin, D. L. *et al.* Phospholipase D-derived phosphatidic acid promotes root hair development under phosphorus deficiency by suppressing vacuolar degradation of PIN-FORMED2. *New Phytol.* (2019) doi:10.1111/nph.16330.
  35. Janda, M. & Ruelland, E. Magical mystery tour: Salicylic acid signalling. *Environ. Exp. Bot.* **114**, 117–128 (2015).
  36. Šašek, V. *et al.* Recognition of avirulence gene AvrLm1 from hemibiotrophic ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signaling in *Brassica napus*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **25**, 1238–50 (2012).
  37. Chanclud, E. *et al.* Cytokinin production by the rice blast fungus is a pivotal requirement for full virulence. *PLoS Pathog.* **12**, e1005457–e1005457 (2016).
  38. Tanaka, E., Koga, H., Mori, M. & Mori, M. Auxin production by the rice blast fungus and its localization in host tissue. *J. Phytopathol.* **159**, 522–530 (2011).
  39. Reineke, G. *et al.* Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 339–355 (2008).
  40. Liao, X., Lovett, B., Fang, W. & Leger, R. J. S. *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in *Arabidopsis* and enhances virulence to insects. *Microbiology* **163**, 980–991 (2018).
  41. Leontovyčová, H. *et al.* Auxin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria*



*maculans* is associated with enhanced transcription of indole-3-pyruvate decarboxylase *LmIPDC2* and tryptophan aminotransferase *LmTAM1*. *Res. Microbiol.* 1–11 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.05.001>

42. Zhang, J. *et al.* DAO1 catalyzes temporal and tissue-specific oxidative inactivation of auxin in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 11010 LP – 11015 (2016).
43. Porco, S. *et al.* Dioxygenase-encoding *AtDAO1* gene controls IAA oxidation and homeostasis in *Arabidopsis*; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 11016 LP – 11021 (2016).
44. Luo, K. *et al.* Indole-3-acetic acid in *Fusarium graminearum*: Identification of biosynthetic pathways and characterization of physiological effects. *Fungal Biol.* **120**, 1135–1145 (2016).
45. Kilaru, A., Bailey, B. a & Hasenstein, K. H. *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiol. Lett.* **274**, 238–44 (2007).
46. Balesdent, M. H., Attard, A., Kühn, M. L. & Rouxel, T. New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **92**, 1122–33 (2002).
47. Darma, R., Lutz, A., Elliott, C. E. & Idnurm, A. Identification of a gene cluster for the synthesis of the plant hormone abscisic acid in the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol.* **130**, 62–71 (2019).
48. Spaepen, S. *et al.* Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **189**, 7626–7633 (2007).
49. Somers, E., Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M. & Vanderleyden, J. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiolgy* **71**, 1803–1810 (2005).
50. Brandl, M. T. & Lindow, S. E. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microbiolgy* **62**, 4121–4128 (1996).

51. Brandl, M. T., Lindow, S. E., Biology, M. & Hall, K. Environmental signals modulate the expression of an indole-3-acetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 499–505 (1997).
52. Sardar, P. & Kempken, F. Characterization of indole-3-pyruvic acid pathway-mediated biosynthesis of auxin in *Neurospora crassa*. *PLoS One* **13**, e0192293 (2018).
53. Cohen, B. A, Amsellem, Z., Maor, R., Sharon, A. & Gressel, J. Transgenically enhanced expression of indole-3-acetic acid confers hypervirulence to plant pathogens. *Phytopathology* **92**, 590–6 (2002).
54. Yin, C., Park, J.-J., Gang, D. R. & Hulbert, S. H. Characterization of a tryptophan 2-monooxygenase gene from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **27**, 227–35 (2014).
55. Nováková, M. *et al.* *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm4-7 affects salicylic acid (SA) and ethylene (ET) signalling and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation in *Brassica napus*. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 818–831 (2016).
56. Kazan, K. & Lyons, R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *Plant Cell* **26**, 1–26 (2014).
57. Hilbert, M. *et al.* Indole derivative production by the root endophyte *Piriformospora indica* is not required for growth promotion but for biotrophic colonization of barley roots. *New Phytol.* **196**, 520–534 (2012).
58. Maor, R., Haskin, S., Levi-Kedmi, H. & Sharon, A. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Appl. Environ. Microbiolgy* **70**, 1852–1854 (2004).