

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 nepřímo. 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*, *PRI*). Tato práce se zabývá 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

obranných 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 efektozem 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 ke snížené indukci 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 prekurzorů tryptofanu a tryptaminu k tekuté kultuře. V genomu *L. maculans* byly nalezeny orthology 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.