

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Iveta Zajícová

Vizualizace buněčných struktur listu *Malus domestica* pro účely studia interakce
s patogenem *Venturia inaequalis*

Visualization of cell structures in leaf cells of *Malus domestica* as a tool for study of
Malus-Venturia inaequalis interaction

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Kateřina Schwarzerová, PhD.

Praha, 2016

Prohlášení

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

V Praze dne 8. 8. 2016

Poděkování

Děkuji své školitelce Kateřině Schwarzerové za vedení mé diplomové práci, za její rady a pomoc a hlavně za přátelský přístup. Janu Petráškovi děkuji za jeho nápady a inspiraci ohledně mé práce.

Děkuji paní inženýrce Janě Kloutvorové a Pavlíně Jaklové z VŠÚO Holovousy za pomoc s infekcemi rostlin. Dále děkuji doktoru Vilému Nedělovi a inženýrce Evě Tihlaříkové z Ústavu přístrojové techniky, AV ČR v Brně za spolupráci a pořízení snímků na ESEM.

Dále děkuji všem členům laboratoře 204 za veškerou pomoc a podporu. Jmenovitě Petře Cifrové za její nadšení, pomoc a rady při barvení listů, Standovi Vosolsobě za zasvěcení do metody infiltrace, Honzovi Martinkovi za pomoc s imunolokalizací a konfokálním mikroskopem, Vaiduryovi Pratap Sahimu za pomoc s ručními řezy a metodou zalévání do Steedmanova vosku, Pepovi Šonkovi za pomoc ve skleníku. Erice Bellinvia, Pavlíně Miklánkové, Radku Lefnarovi, Judith García González, Janě Krtkové, Petru Jírovcovi a hlavně Matěji Semerákovi děkuji za vytvoření skvělé atmosféry v laboratoři. Janě Krtkové dále děkuji za veškeré komentáře k mé práci.

Také bych ráda poděkovala své rodině za podporu a snahu pochopit, co dělám. Ze všeho nejvíc musím ale poděkovat svému manželovi Zbyňkovi, který mi vždy byl oporou, podporoval mě, se vším mi pomáhal, vydržel poslouchat vše o mé práci a nikdy si nestěžoval.

Tento projekt byl podpořen Ministerstvem zemědělství České republiky (projekt QJ1510353) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt NPUI No. LO1417).

Abstrakt

Houbový patogen *Venturia inaequalis* způsobuje strupovitost jabloní, nejzávažnější chorobu těchto dřevin. Poznatky získané o odpovědi jabloně na napadení strupovitostí na buněčné a pletivové úrovni jsou nedostačující. Zavedení metod vizualizace buněčných komponent listu jabloně je klíčové pro studium interakce *Malus-Venturia* na buněčné a pletivové úrovni. V této práci byl úspěšně zaveden pokusný rostlinný materiál v *in vitro* i *ex vitro* podmínkách a optimalizována metoda infekce rostlin konidii patogeny. Pro vizualizaci buněčných struktur v listu jabloně byly využity metody vitálního značení, *in situ* imunolokalizace, transformace, environmentální skenovací elektronové mikroskopie a konfokální mikroskopie. Z buněčných struktur listu jabloně byl vizualizován cytoskelet, buněčná stěna a kutikula. Dále byly provedeny předběžné experimenty sledující změny struktur buněčné stěny indukované napadením *V. inaequalis*. Dále byly během ontogeneze listů sledovány změny kutikuly, která představuje první bariéru pro průnik patogeny během infekce.

Klíčová slova: *Malus domestica*, *Venturia inaequalis*, patogen, cytoskelet, buněčná stěna, kutikula

Abstract

Apple scab, the most serious disease of apple is caused by fungal pathogen *Venturia inaequalis*. Knowledge about the apple response to apple scab attack on the cellular and tissue level is insufficient. For studies of *Malus-Venturia* interaction on the cellular and tissue level, the establishment of methods for cell structures visualization in apple leaves is necessary. In this work, the experimental plant material grown in vitro and ex vitro was successfully established and the method of apple infection by conidia of *V. inaequalis* was optimized. Various methods of cell components visualization such as vital staining, *in situ* immunolocalization, transformation, environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy, were tested. Cell structures, such as the cytoskeleton, the cell wall and the cuticle were visualized in apple leaves. Preliminary experiments following specific the changes of cell wall structures induced by *V. inaequalis* attack were performed. Further, changes of cuticle structure, the first barrier for penetration of pathogen to plant tissues during infection, were observed during the leaf ontogenesis.

Key words: *Malus domestica*, *Venturia inaequalis*, pathogen, cytoskeleton, cell wall, cuticle

Obsah

Abstrakt

Abstract

Seznam zkratek

1. Úvod a cíle práce	11
2. Literární přehled	12
2.1. Houboví patogeni	12
2.2. Strupovitost jabloní	13
2.2.1. Původce choroby	13
2.2.2. Životní cyklus	14
2.2.2.1. Primární fáze životního cyklu	14
2.2.2.2. Sekundární fáze životního cyklu	15
2.2.3. Symptomy choroby	16
2.2.3.1. Symptomy na listech	16
2.2.3.2. Symptomy na plodech	18
2.2.4. Ochrana jabloní před strupovitostí	18
2.3. Rezistence jabloní k <i>V. inaequalis</i>	19
2.3.1. Modely hostitelské rezistence	19
2.3.2. R-geny	20
2.4. Mechanismy obrany jabloně	22
2.4.1. Kutikula	22
2.4.2. PR-proteiny	23
2.4.3. ROS a detoxifikační enzymy	24
2.4.4. Fytohormony	24
2.4.5. Fytoalexiny	25
2.4.6. Specifická depozice buněčné stěny	26
2.5. Ontogenetická rezistence jabloně	27
2.6. Povrchové struktury listu jabloně	28
2.7. Obecná buněčná odpověď na napadení patogenem	30
2.7.1. Změny aktinového cytoskeletu	31
2.7.2. Změny mikrotubulárního cytoskeletu	32
2.7.3. Lokalizace buněčného jádra	34
2.7.4. Změny endomembránového systému a organel	35
3. Materiál a metody	38
3.1. Použitá media	38
3.2. Rostlinný materiál	40

3.3. Indukce kořenění a přenos do <i>ex vitro</i> podmínek	40
3.4. Sledování rychlosti růstu rostlin	41
3.5. Inokulum a inokulace	41
3.6. Sterilizace konidií pro inokulaci <i>in vitro</i> rostlin	42
3.7. Transformace rostlinného materiálu	43
3.7.1. Stabilní transformace metodou kokultivace	43
3.7.2. Tranzientní transformace biolistickou metodou	44
3.7.3. Tranzientní transformace metodou infiltrace	47
3.8. <i>In situ</i> imunolokalizace proteinů	47
3.8.1. Fixace a zalévání do Steedmanova vosku	47
3.8.2. Fixace a mrazové drcení	50
3.9. Konfokální mikroskopie	53
3.10. Detekce povrchových struktur listu jabloně	53
3.10.1. Vitální značení kutikuly a složek buněčné stěny	53
3.10.2. Environmentální skenovací elektronová mikroskopie	55
3.11. Testování viability buněk na ručních řezech listem	55
3.12. Zkouška funkčnosti protilátek na rostlinném materiálu	56
3.12.1. Izolace proteinů z rostlinného materiálu	56
3.12.2. TCA precipitace proteinů	56
3.12.3. Elektroforéza	57
3.12.4. Western Blot	58
3.12.5. ECL - enhanced chemiluminiscence	59
4. Výsledky	61
4.1. Kořenění rostlinných explantátů a přenos do <i>ex vitro</i> podmínek	61
4.2. Rychlost růstu rostlin	63
4.3. Transformace rostlin různými metodami	64
4.4. Inokulace rostlin	66
4.5. Anatomické rozdíly listů rostlin v <i>in vitro</i> a <i>ex vitro</i> podmínkách	67
4.6. Ontogenetická variabilita povrchových struktur adaxiální strany listů	69
4.7. Změny buněčné stěny v reakci na napadení <i>V. inaequalis</i>	73
4.7.1. Depozice ligninu v místě infekce	73
4.7.2. Depozice kalózy v místě infekce	74
4.8. Vizualizace cytoskeletu pomocí protilátek	75
4.8.1. Funkčnost protilátek na rostlinném materiálu	75
4.8.2. Vizualizace cytoskeletu v pokožkových buňkách listu	76

5. Diskuze	80
5.1. Výzkumný materiál	80
5.2. Inokulace rostlin patogenem	81
5.3. Vizualizace buněčných struktur	82
5.4. Transformace jabloní	83
5.5. Odpověď na napadení na úrovni změny buněčné stěny	84
5.6. Role kutikuly v ontogenetické rezistenci	85
6. Souhrn	87
7. Seznam literatury	88

Seznam zkratek

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AB	<i>aniline blue</i> , anilinová modř
ABC	<i>ATP binding cassette</i> , kazeta vázající ATP
AF	aktinová filamnetá
AP	persulfát amonný
ASB	<i>actin stabilizing buffer</i> , pufr stabilizující aktin
ATB	antibiotika
ATP	adenosintrifosfát
<i>Avr</i> gen	gen avirulence
BAP	6-benzylaminopurin
CAD	cinamylalkoholdehydrogenáza
cMT	kortikální mikrotubuly
CW	Calcofluor White
DTT	dithiotreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
ERF	<i>ethylene response factor</i> , faktor odpovědi na etylén
ESEM	environmentální skenovací elektronový mikroskop
ETI	<i>effector-triggered immunity</i> , imunita spouštěná efektoem
FABD	<i>fimbrin actin binding domain</i> , fimbrinová doména vázající aktin
FDA	diacetát fluoresceinu
FP	fluorescenční protein
GA	Golgiho aparát
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , zelený fluorescenční protein
GM	geneticky modifikovaný
GTP	guanosintrifosfát
HDEL	sekvence histidin-kys. asparagová-kys. glutamová-leucin
HN	hvězdovitá nekróza
HR	hypersenzitivní reakce
IBA	kyselina indolyl-3-máselná
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LRR	<i>leucin-rich repeat</i> , doména bohatá na leucin
<i>M. domestica</i>	<i>Malus domestica</i>
MBS	m-maleimidobenzoyl N-hydroxysuccinimide ester
MES	2-(N-morfolino)ethansufonová kyselina
MS soli	soli Murashige a Skoog

MT	mikrotubuly
MTSB	<i>microtubule stabilising buffer</i> , pufr stabilizující mikrotubuly
NAA	<i>naftylacetic acid</i> , kyselina naftyloctová
NBS	<i>nucleotid binding site</i> , místo vážící nukleotid
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> , molekulární vzor spojený s patogenem
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBSA	<i>Albumine Bovine Fraction</i> v PBS
PCA	<i>Potato Carrot Agar</i> medium
PEN	PENETRATION
phMT	perihyální mikrotubuly
PI	propidium jodid
PIPES	piperazine-N,N'-bis(ethanesulfonová kyselina)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
pnMT	perinukleární mikrotubuly
PR proteiny	<i>pathogenesis related proteins</i> , proteiny asociované s patogenezí
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , receptor rozeznávající molekulární vzor patogena
PTI	<i>pathogene-triggered immunity</i> , imunita spouštěná patogenem
PTS	<i>peroxisome targeting signal</i> , signál cílení do peroxisomu
R-gen	gen rezistence
RM	regenerační medium
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktivní kyslíkové radikály
RT	<i>room temperature</i> , pokojová teplota
<i>Rvi</i> gen	<i>Venturia inaequalis</i> rezistentní gen
SAR	<i>systemic acquired resistance</i> , systémově získaná rezistence
SDS	dodecylsulfát sodný
SR	<i>Sudan Red</i> , sudanová červeň
TB	<i>toluidine blue</i> , toluidinová modř
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TIR	Toll/interleukin-1 receptorová doména
TNL	TIR-NBS-LRR gen
TDZ	tidiazuron
TEMED	tetramethylethyldiamin
<i>V. inaequalis</i>	<i>Venturia inaequalis</i>
YEB	<i>Yeast Extract Broth</i>

1. Úvod a cíle práce

Strupovitost jabloní, jejímž původcem je houbový patogen *Venturia inaequalis*, napadá členy rodu *Malus* a je hospodářsky nejrozšířenější a nejzávažnější chorobou jabloní celosvětově rozšířenou v oblastech pěstění tohoto ovoce. Tato choroba způsobuje velké finanční ztráty, neboť znehodnocuje plody jabloní. Hlavní metodou obrany proti strupovitosti je používání fungicidů cílených na zastavení choroby. Další metodou jsou šlechtitelské programy, které cílí na křížení citlivých odrůd s rezistentními a jsou založené na existenci genů rezistence. V poslední době se ovšem ukazují slabé stránky těchto postupů, neboť došlo k překonání genů rezistence některými kmeny *V. inaequalis* a také vytvoření rezistence patogena k používaným účinným látkám fungicidů. Proto se stále více důležitým ukazuje pochopení interakce *Malus-Venturia* a hlavně obranných mechanismů jabloně. Odpověď hostitele na napadení strupovitostí na buněčné a pletivové úrovni zatím nebyla uspokojivě studována a je prázdným místem v pochopení této interakce.

Projekt, jehož je tato práce součástí, si klade za cíl analyzovat buněčnou odpověď a obranné mechanismy jabloně na napadení strupovitostí.

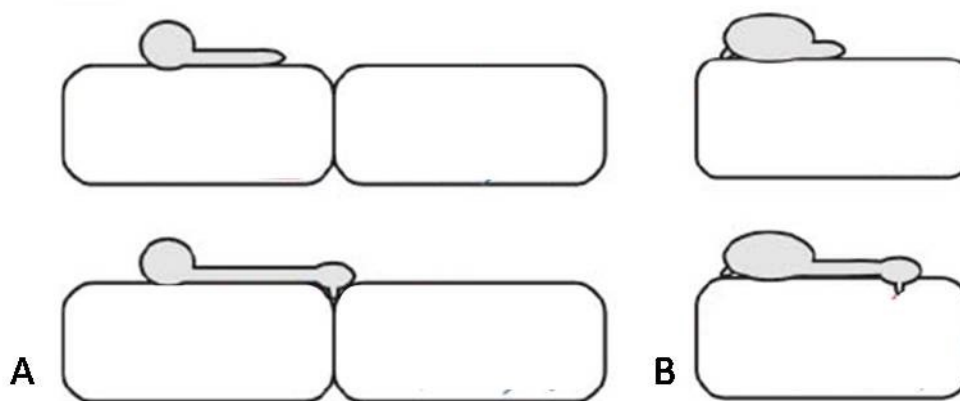
Cíle práce:

- Zavedení metodiky vizualizace buněčných komponent v buňkách listu jabloně.
- Analýza odpovědi hostitele na napadení houbovým patogenem *V. inaequalis* na buněčné a pletivové úrovni.
- Popis povrchových struktur listu jabloně v souvislosti s ontogenetickou rezistencí hostitele na strupovitost.

2. Literární přehled

2.1. Houboví patogeni

Do mnoha skupin organismů napadajících rostlinné hostitele, patří také patogeni z říše hub. Tito patogeni mohou mít různé životní strategie v závislosti na interakci s hostitelem. Pokud jsou houby schopné penetrovat do hostitelských buněk, pak se nazývají jako intracelulární patogeni (Obrázek 1B). Pokud vytvářejí síť hyf v apoplastu, tak se nazývají jako apoplastičtí patogeni (Obrázek 1A). Apoplastičtí patogeni se do mezibuněčných prostor dostávají penetrací skrz kutikulu, pod níž vytváří hyfy, nebo prostřednictvím průduchů. Mezi apoplastické houbové patogeny penetrující skrz kutikulu patří *Venturia inaequalis*, *Pyrenopeziza brassicae* či *Rhynchosporium commune*. *Cladosporium fulvum*, *Leptosphaeria maculans* nebo *Zymoseptoria tritici* jsou zástupci apoplastických houbových patogenů pronikajících do mezibuněčného prostoru mezofylových buněk skrz průduchy (Stotz *et al.*, 2014).



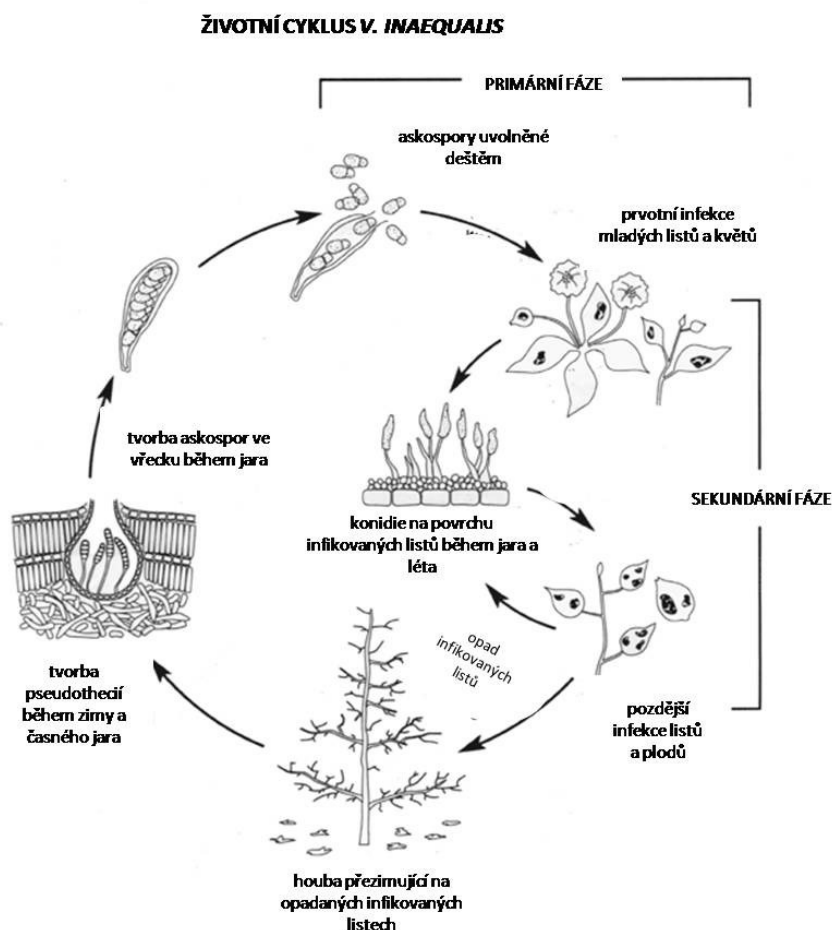
Obrázek 1 Schematický obrázek dvou typů interakcí mezi rostlinou a houbovým patogenem. A, Interakce rostliny s apoplastickým patogenem (např.: *M. domestica* a *V. inaequalis*). Růst klíční hyfy na povrchu pokožkových buněk (nahore), prorůstání patogena do prostoru apoplastu mezi dvěma pokožkovými buňkami (dole). B, Interakce rostliny s intracelulárním patogenem (např.: ječmen a *Erysiphe*). Růst klíční hyfy na povrchu pokožkové buňky (nahore), penetrace patogena do pokožkových buněk hostitele (dole). Převzato a upraveno podle (Takemoto and Hardham, 2004).

2.2. Strupovitost jabloní

2.2.1. Původce choroby

Strupovitost jabloní, způsobená houbovým patogenem *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint., který napadá členy rodu *Malus*, je nejrozšířenější a nejzávažnější chorobou jabloní na světě (MacHardy, 1996). První záznam o strupovitosti jabloní se objevil v roce 1819, kdy bylo popsáno anamorfní stadium (nepohlavně se rozmnožující stadium) *Venturia*, které bylo popsáno *Spilocaea pomii* (MacHardy et al., 2001).

Vřeckovýtrusná houba *Venturia inaequalis* je hemibiotrofním patogenem, to znamená, že neroste pouze na živých listech, ale součástí jejího životního cyklu je také nekrotrofní fáze. Životní cyklus *V. inaequalis* je dělen na primární pohlavní fázi a sekundární nepohlavní fázi (Obrázek 2).



Obrázek 2 Životní cyklus *V. inaequalis* zahrnující jak primární pohlavní fázi představovanou askosporami, tak sekundární nepohlavní fázi představovanou konidiemi. Na jaře dochází k uvolnění askospor z vřecek, spory jsou poté šířeny větrem a deštěm a způsobují primární infekci mladých listů a květů. Z hyf v subkutikulárním prostoru vzniklých z askospor vyrůstají v létě konidiofory nesoucí konidie. Konidie způsobují sekundární infekci. Houba přezimuje na spadáných listech ve formě pseudothecií. Převzato a upraveno podle (Delalieux et al. 2007).

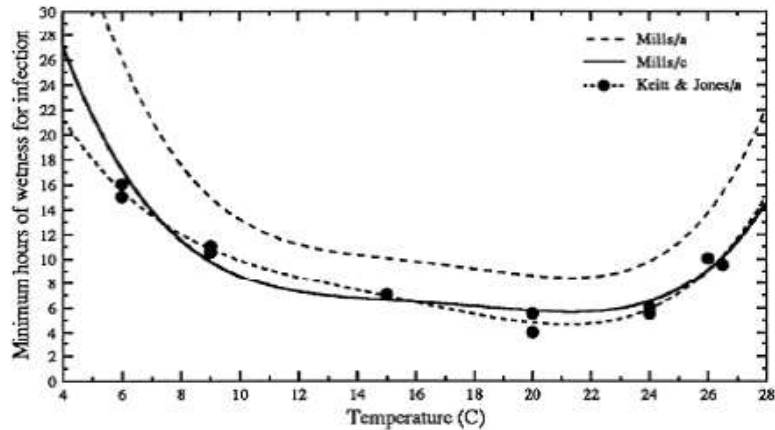
2.2.2. Životní cyklus

2.2.2.1. Primární fáze životního cyklu

Primární fáze životního cyklu *V. inaequalis* se odehrává převážně v zimě a na jaře a je představována pohlavními buňkami askosporami. Tento houbový patogen přezimuje ve formě pseudotécií (plodnice) na spadáných listech jabloně. Toto období životního cyklu patogena představuje jeho nekrotrofní fázi. Plodnice nesou vřecka, která dávají vznik pohlavním buňkám askosporám (Verma and Sharma, 1999). Pseudotécia dozrávají až ke konci zimy, kdy dochází ke zvýšení teplot a k dozrání askospor dochází na jaře. Časování těchto procesů je výsledkem adaptace patogena na fenologii hostitele a zaručuje, že se askospory uvolní z vřecek v tu nejvhodnější chvíli pro rozvoj primární infekce. To je v okamžiku, kdy dochází k rašení listových pupenů jabloně, nejmladší listy jsou nejcitlivější k strupovitosti (viz. kap. 2.5. Ontogenetická rezistence) a je tedy největší pravděpodobnost, že dojde k úspěšné infekci hostitele (MacHardy *et al.*, 2001).

Prostřednictvím jarního deště je uvolněno primární inokulum askospor z vřecek a je rozšiřováno větrem na mladé listy hostitele (Verma and Sharma, 1999). Askospory jsou tvořeny dvěma velikostně odlišnými buňkami, které mají vnitřní tlustou a elastickou buněčnou stěnu a vnější tenkou a křehkou buněčnou stěnu, které zajišťují přečkání zimního období (MacHardy, 1996).

Po dopadu askospor na list dochází k adhezi spor k mokrému hydrofobnímu povrchu listu a za příznivých podmínek ke klíčení askospor. Pro klíčení je nezbytné, aby byl povrch listu mokrý a v okolí byla vysoká relativní vzdušná vlhkost pohybující se nad 95 % (MacHardy, 1996). Další růst patogena a rozvoj infekce závisí na podmínkách prostředí jako je teplota, trvání vlhkosti listu, typu a stáří rostlinného orgánu a citlivosti k infekci. Z podmínek prostředí jsou nejdůležitější teplota a vlhkost okolí, které byly v souvislosti se strupovitostí poprvé studovány Millsem a LaPlantem a jsou známy jako Millsova křivka (Obrázek 3; MacHardy, 1996). Podmínky pro infekci jsou nejvhodnější na začátku sezóny, kdy jsou listy a květy mladé a tedy nejvíce citlivé k napadení (MacHardy *et al.*, 2001).



Obrázek 3 Millsova infekční křivka teploty a vlhkosti vhodné pro infekci jabloně patogenem *V. inaequalis*. Podmínky vhodné pro primární infekci askosporami v nekontrolovaných podmínkách sadu (Mills/a), pro sekundární infekci konidiiemi v sadu (Mills/c) a pro primární infekci v kontrolovaných podmínkách. (Keitt a Jones/a) (MacHardy, 1996).

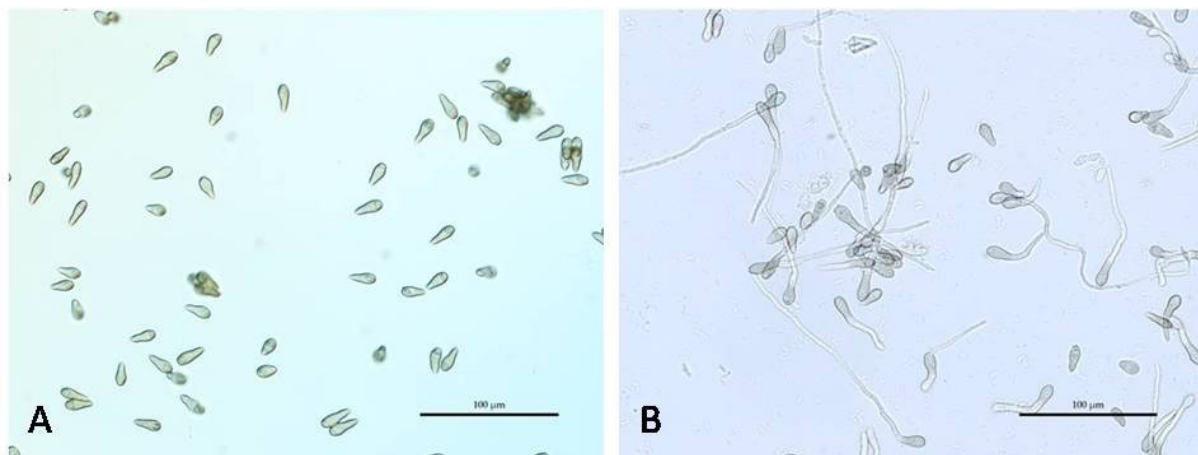
Po adhezi askospor ke kutikule dochází ke klíčení spor klíčným vláknem, které vytvoří apresorium a penetruje kutikulou do subkutikulárního prostoru, kde se vytvoří hyfální síť. Z této sítě vznikají vícevrstevné pseudoparenchymatické struktury zvané stromata, jejichž předpokládanou funkcí je příjem živin ze subkutikulárního prostoru listu. Do subkutikulárního prostoru penetruje patogen přes kutikulu, nikdy neprochází skrz průduchy a nikdy neinvaduje do epidermálních buněk hostitele (Jha *et al.*, 2009).

2.2.2.2. Sekundární fáze životního cyklu

Sekundární fáze životního cyklu *V. inaequalis* je představována nepohlavně vznikajícími konidiiemi. Nepohlavní fáze se odehrává převážně v létě a k sekundární infekci může dojít několikrát za sezónu v závislosti na podmínkách prostředí (MacHardy, 1996).

Z vrchních vrstev subkutikulárních stromat vyrůstají konidiofory, které prorážejí kutikulou a na povrchu listu či plodu vytvářejí typické černé skvrny. Na vrcholu konidioforů vznikají konidie, nepohlavní spory s hladkým povrchem a žádnou nebo 1 přepážkou (Obrázek 4), které jsou deštěm a větrem rozšiřovány do okolí a způsobují sekundární infekci (Jha *et al.*, 2009).

Po kontaktu konidií s kutikulou listu dochází k jejich adhezi (Schumacher *et al.*, 2008) a klíčení klíčným vláknem. Pro klíčení konidií a rozvoj sekundární infekce jsou nezbytné obdobné faktory jako pro klíčení askospor (Jha *et al.*, 2009).



Obrázek 4 Konidie *V. inaequalis* představující nepohlavní stadium tohoto houbového patogena. A, Konidie smyté z napadených listů kultivarů ‚Idared‘. B, Klíčící konidie po 48 hodinách ve stoprocentní vzdušné vlhkosti. Měřítka 100 µm.

2.2.3. Symptomy choroby

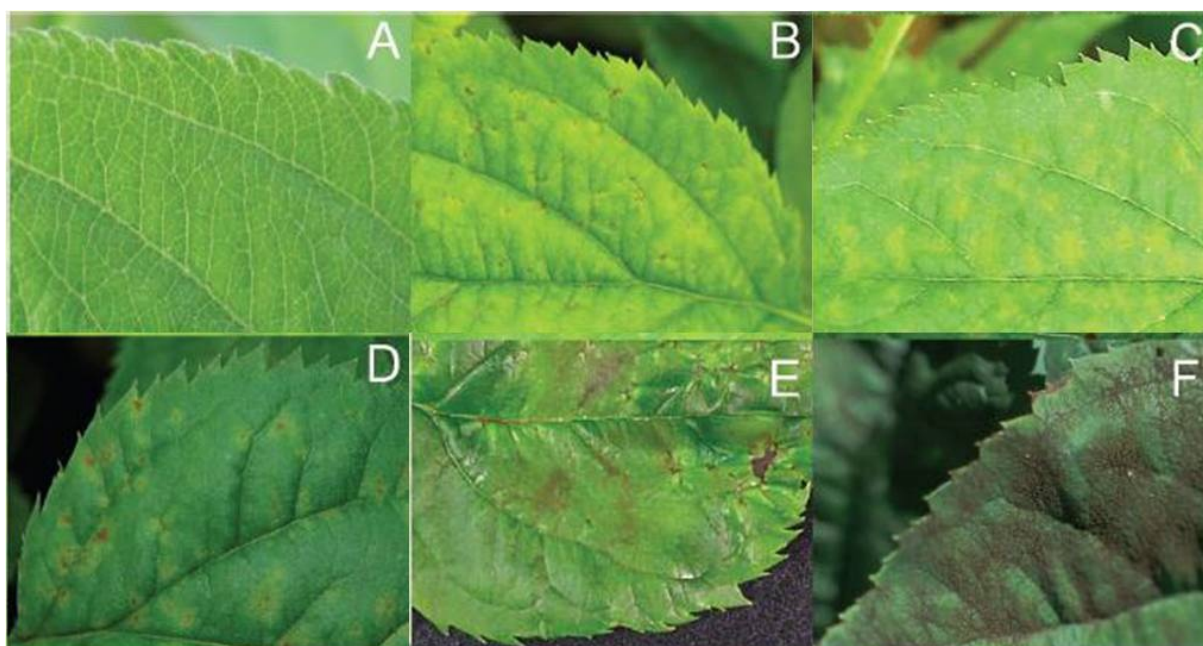
2.2.3.1. Symptomy na listech

Jeden až dva týdny po inokulaci dochází k prvním viditelným projevům infekce na listech. Vzhledem k existenci různých kultivarů jabloně s odlišnými úrovněmi rezistence k strupovitosti, mohou být na listech detekovány odlišné symptomy napadení (Chevalier *et al.*, 1991; Jha *et al.*, 2009). V roce 1953 bylo definováno 5 základních tříd symptomů: bodová reakce (pin-point pits) způsobená hypersenzitivní reakcí (HR; třída 1), chloróza (třída 2), nekróza (třída 3), symptomy mezi třídou 2 a 3 (třída M) a sporulace (třída 4). Symptomy tříd 1 až 3 jsou považovány za symptomy rezistence a třída 4 se vyskytuje u citlivých kultivarů (Chevalier *et al.*, 1991). Tyto třídy byly definovány na základě pozorování makroskopických kritérií. Novější klasifikace byla vytvořena autory Chevalier a kol. (1991), kteří definovali 6 tříd symptomů (Tabulka 1, Obrázek 5). Tato klasifikace založená na makroskopických i mikroskopických kritériích je převážně používána dodnes. Třídy se vyznačují následujícími symptomy: třída 0 (bez symptomů), třída 1

(bodová reakce), třída 2 (chloróza), třída 3a (chloróza a nekróza), třída 3b (chloróza, nekróza a sporulace) a třída 4 (sporulace).

název třídy	symptomy
třída 0	bez symptomů
třída 1	bodová reakce
třída 2	chloróza
třída 3a	chloróza a nekróza
třída 3b	chloróza, nekróza a sporulace
třída 4	sporulace

Tabulka 1 Klasifikace symptomů projevujících se na listech jabloně napadené strupovitostí. Symptomy jsou členěné do tříd, které byly definovány Chevalierem a kol. (1991).



Obrazek 5 Šest tříd symptomů na listech jabloně napadené *V. inaequalis*, definovaných Chevalier a kol. (1991). A, třída 0 (bez symptomů); B, třída 1 (bodová reakce); C, třída 2 (chloróza); D, třída 3a (chloróza a nekróza); E, třída 3b, chloróza, nekróza a sporulace); F, třída 4 (sporulace) (Gessler *et al.*, 2006).

V projevech napadení jabloně strupovitostí existuje velká variabilita, která je dána variabilitou kultivarů a jejich odlišnými genotypy, konkrétně existencí genů rezistence (R-geny; viz. kap. 2.3.2. R-geny), které dávají vznik různým symptomům napadení (Tabulka 3) (Jha *et al.*, 2009).

Podle toho, na které straně listu dojde k infekci, se symptomy objevují na abaxiální nebo adaxiální straně listu a kromě základních symptomů dochází dále ke zkroucení mladých listů, jejich vysušení a opadu.

2.2.3.2. Symptomy na plodech

Strupovitost jabloní se projevuje nejen na listech, ale také na plodech, na jejichž povrchu se objevují tmavě hnědé léze. Dále může docházet k nekróze pokožkových buněk, korkovatění a k praskání plodů. Obdobně jako u listů i u plodů byla pozorována ontogenetická rezistence (Jha *et al.*, 2009).

2.2.4. Ochrana jabloní před strupovitostí

Strupovitost jabloní se stala velkým problémem v zemědělství, ve chvíli, kdy došlo k intenzivní produkci jablek a s ní spojeným pěstováním jabloní v sadu, neboť podmínky sadu jsou pro rozvoj strupovitosti velmi vhodné. V té době začaly vznikat programy na kontrolu strupovitosti, které se již od začátku převážně spoléhaly na chemickou kontrolu, tedy aplikaci fungicidů. Problémem v používání chemické kontroly se v poslední době stává stále častější rezistence *V. inaequalis* k déle používaným fungicidům (MacHardy *et al.*, 2001).

Nejefektivnějším typem kontroly je využití přirozené rezistence jabloní k strupovitosti, kdy dochází ke křížení jabloní za účelem vzniku rezistentních kultivarů, které ve svém genotypu obsahují R-geny. Problém moderní produkce jabloní je to, že jsou stromy množeny vegetativně a nedochází tak k přirozenému vzniku nových kombinací R-genů (zaměřených převážně na lokální populaci patogena) prostřednictvím pohlavního rozmnožování. Zároveň ale dochází ke vzniku stále nových genotypů *V. inaequalis*, která se každý rok množí pohlavně a je v kontaktu se stále stejným genetickým materiálem jabloní (MacHardy *et al.*, 2001). Nové kmeny *V. inaequalis* (kmen 6 a 7) jsou schopné překonat R-geny hostitele (například gen *Rvi6*), které jsou dlouho a často využívány při křížení jabloní a tak

dochází ke vzniku citlivosti těch kultivarů, které byly dříve ke strupovitosti rezistentní (Parisi *et al.*, 1993).

Vzhledem k tomuto rychlému přizpůsobení se patogena k různým taktikám obrany jabloní se stává pochopení interakce *Malus-Venturia* stále důležitějším.

2.3. Rezistence jabloní k *V. inaequalis*

I přesto, že většina moderních kultivarů jabloní je citlivá k napadení *V. inaequalis*, existují kultivary, které jsou rezistentní a to díky genům rezistence, jež jsou využívány v křížení jabloní. Hostitel může mít jeden R-gen nebo více genů, jejichž společná exprese vede k rezistenci hostitele k patogenu. Při prvním kontaktu patogena s rezistentním hostitelem dochází k specifické interakci, založené na existenci genů rezistence. Ta vede k rezistenci hostitele k houbovému patogenu. Taková rezistence je nazývána rezistencí hostitelskou.

2.3.1. Modely hostitelské rezistence

Flor (1971) navrhl model gene-for-gene, který je založen na specifické molekulární interakci produktu jednoho genu pro rezistenci, R-genu, s produktem jednoho genu avirulence (*Avr* gen). Dochází k rozpoznání produktu *Avr* genu patogena R-genem hostitele a spuštění obranné reakce hostitele, která je základem rezistence hostitele. Tato interakce je nazývána jako nekompatibilní interakce, protože nedochází k vzniku choroby, neboť je růst patogena zastaven hostitelem. Kompatibilní interakce je naopak interakce hostitele s patogenem, při které nedochází k zastavení vzniku choroby a rostlina se stává citlivou. K tomu dochází v případě, že patogen nemá *Avr* gen nebo v případě hostitele bez R-genu (Tabulka 2; Prell and Day, 2001).

Ovšem ne ve všech případech interakce hostitel-patogen se uplatňuje takto jednoduchý model. Rozpoznání patogena hostitelem může být přímé, a to v případě, že je efektor (produkt *Avr* genu) přímo navázán na hostitelův receptor (produkt R-genu) jak to popisuje gene-for-gene hypotéza, nebo nepřímé rozpoznání, které je

popsáno hypotézou hlídače (guard hypothesis). Tato hypotéza říká, že produkt R-genu pouze „hlídá“ endogenní protein, který je cílem produktu *Avr* genu a je aktivován modifikací tohoto cílového proteinu (Van Der Biezen and Jones, 1998; Dangl and Jones, 2001; van der Hoorn and Kamoun, 2008).

Produktem *Avr* genu je většinou ligand (efektor), který se váže na receptor (produkt R-genu). Tento mechanismus rezistence je součástí imunity spouštěné efektozem (effector-triggered immunity, ETI), kdy specifický efektor vážící se na specifický receptor spouští obrannou reakci rostliny, která se často projevuje jako hypersenzitivní reakce v místě napadení (Jones and Dangl, 2006). ETI je specifickou odpovědí hostitele na konkrétního patogena, která se liší od obecné odpovědi rostliny na patogena, známé jako imunita spouštěná patogenem (pathogen-triggered immunity, PTI) (Bigeard *et al.*, 2015).

		hostitel	
		bez R-genu (citlivý)	s R-genem (rezistentní)
patogen	bez <i>Avr</i> genu	kompatibilní	kompatibilní
	s <i>Avr</i> genem	kompatibilní	nekompatibilní

Tabulka 2 Model gene-for-gene navržený Florem. Model je založen na mechanismu rozpoznání produktu *Avr* genu patogena produktem R-genu hostitele, po kterém dochází k indukci obranné odpovědi hostitele a nedochází k vzniku choroby, hostitel je tedy rezistentní (převzato a upraveno podle Prell and Day, 2001).

2.3.2. R-geny

U jabloně již bylo popsáno více jak 18 R-genů proti strupovitosti (Jha *et al.*, 2009). Sedmnáct z těchto genů bylo popsáno podle *Rvi* systému (Bus *et al.*, 2011), ve kterém byly R-geny pojmenovány *Rvik* (*R* znamená gen rezistence, *vi* znamená *Venturia inaequalis*, *k* je nahrazeno číslem, které odkazuje na hostitele). Ke každému *Rvi* genu byl přiřazen jeden gen avirulence s označením *AvrRvik* (Tabulka 3).

Nejznámějším a nejlépe prostudovaným R-genem je *Rvi6* (*Vf*; *Venturia floribunda*) gen, izolovaný z divoké jabloně *Malus floribunda*. *Rvi6* gen byl hojně využíván při křížení jabloní za účelem získání kultivarů rezistentních k strupovitosti

(Jha *et al.*, 2009). Tento gen byl identifikován jako homologní gen k R-genu rajčete, zapojeného v interakci s patogenem *Cladosporium fulvum*. Produkt tohoto genu obsahuje oblast bohatou na leucin (leucin-rich repeat, LRR), která pravděpodobně interaguje s produktem *Avr* genu *V. inaequalis*; *Rvi6* kóduje receptorovou kinázu (Vinatzer *et al.*, 2001).

číslo	R-gen		zdroj	symptom	Avr-gen
	nový název	starý název			
0	–	–	Royal Gala	citlivý	–
1	<i>Rvi1</i>	<i>Vg</i>	Golden Delicious	nekróza	<i>AvrRvi1</i>
2	<i>Rvi2</i>	<i>Vh2</i>	<i>M. pumila</i> TSR34T15	HN	<i>AvrRvi2</i>
3	<i>Rvi3</i>	<i>Vh3.1</i>	různé	HN	<i>AvrRvi3</i>
4	<i>Rvi4</i>	<i>Vh4=Vr1</i>	<i>M. pumila</i> TSR33T239	HR	<i>AvrRvi4</i>
5	<i>Rvi5</i>	<i>Vm</i>	<i>M. micromalus</i>	HR	<i>AvrRvi5</i>
6	<i>Rvi6</i>	<i>Vf</i>	Priscilla	chloróza	<i>AvrRvi6</i>
7	<i>Rvi7</i>	<i>Vfh</i>	<i>M. floribunda</i>	HR	<i>AvrRvi7</i>
8	<i>Rvi8</i>	<i>Vh8</i>	<i>M. sieversii</i>	HN	<i>AvrRvi8</i>
9	<i>Rvi9</i>	<i>Vdg</i>	různé	HN	<i>AvrRvi9</i>
10	<i>Rvi10</i>	<i>Va</i>	Antonovka	HR	<i>AvrRvi10</i>
11	<i>Rvi11</i>	<i>Vbj</i>	<i>M. baccata</i> jackii	HN	<i>AvrRvi11</i>
12	<i>Rvi12</i>	<i>Vb</i>	Hannsenova baccata	chloróza	<i>AvrRvi12</i>
13	<i>Rvi13</i>	<i>Vd</i>	Durello di Forli	HN	<i>AvrRvi13</i>
14	<i>Rvi14</i>	<i>Vdr1</i>	Dülmener Rosenapfel	chloróza	<i>AvrRvi14</i>
15	<i>Rvi15</i>	<i>Vr2</i>	GMAL 2473	HR	<i>AvrRvi15</i>
16	<i>Rvi16</i>	<i>Vmis</i>	MIS op 93.051	HR	<i>AvrRvi16</i>
17	<i>Rvi17</i>	<i>Va1</i>	Antonovka	chloróza	<i>AvrRvi17</i>

Tabulka 3 Tabulka genů rezistence (R-gen), kultivarů jableň ve kterých se nachází, symptomů na listech po infekci a genů avirulence (Avr-gen) u *V. inaequalis*. HN, hvězdicovitá nekróza; HR, hypersenzitivní reakce (převzato a upraveno podle Jha *et al.* 2009).

Kromě *Rvi6* (*Vf*) genu byly také identifikovány další z R-genů a to konkrétně *Rvi15* (*Vr2*), *Rvi5* (*Vm*) a *Rvi1* (*Vg*), které byly identifikovány jako TNL geny (TIR-

NBS-LRR), obsahující TIR doménu, místo vážící nukleotid (nukleotid-binding site, NBS) a LRR doménu (Galli *et al.*, 2010; Cova *et al.*, 2015a,b). Jako jeden z posledních byl zmapován gen rezistence V25, který byl pojmenován jako *Rvi18* (Soriano *et al.*, 2014).

2.4. Mechanismy obrany jabloně

Během dlouhé koevoluce jabloně s *V. inaequalis* se u jabloně vyvinuly účinné mechanismy obrany proti strupovitosti, které brání rozvoji infekce. Tyto mechanismy zahrnují jak mechanickou, tak chemickou obranu hostitele, která vede k zpomalení nebo zastavení růstu patogena a jeho šíření (Jha *et al.*, 2009).

2.4.1. Kutikula

Kutikula představuje spolu s buněčnou stěnou mechanické bariéry vstupu patogena do buněk. Vzhledem k faktu, že *V. inaequalis* je extracelulární patogen, nevstupující do buněk hostitele, měla by hrát kutikula důležitou roli.

Kutikula (viz. kapitola 2.6. Povrchové struktury listu jabloně) nejen brání invazi patogena do rostlinných pletiv, ale také může její narušení spouštět obranné buněčné reakce rostlinného hostitele během patogeneze (Serrano *et al.*, 2014). V rámci systému *Malus-Venturia* je kutikula důležitá svým hydrofobním charakterem, který brání udržování vody na listech, neboť pro vyklíčení askospor i konidií *V. inaequalis* je vysoká vlhkost nezbytná. Kutikula je důležitá jako mechanická bariéra, neboť *V. inaequalis* musí pro její narušení produkovat kutinázy (enzymy, hydrolyzující kutikulu) a teprve následně invadovat do subkutikulárního prostoru (Köller *et al.*, 1991).

Kromě složení kutikuly, které determinuje její vlastnosti, tedy i hydrofobicitu, může být důležitým faktorem v interakci s patogenem i tloušťka této povrchové vrstvy. Tloušťka kutikuly určuje rychlost, jakou patogen pronikne do hostitelského pletiva. Složení i tloušťka kutikuly se během ontogeneze listu mění a to by mohlo

hrát roli v ontogenetické rezistenci jabloně (viz. kap. 2.5. Ontogenetická rezistence jabloně) (Köller *et al.*, 1991; Jha *et al.*, 2009).

2.4.2. PR-proteiny

Proteiny asociované s patogenezí (pathogenesis-related proteins, PR) jsou proteiny, k jejichž akumulaci dochází v rostlině po napadení patogenem a jejich funkcí je zpomalení či zastavení růstu patogena, zastavení jeho šíření a indukce mechanismů systémově získané rezistence (systemic acquired resistance, SAR). Mezi PR proteiny patří β -1,3-glukanázy, defenziny, inhibitory proteáz, proteiny podobné osmotinu, cysteinové proteázy, chitinázy, endochitinázy, PR1 nebo proteiny podobné thaumatinu (Stintzi *et al.*, 1993; van Loon and van Strien, 1999; Sels *et al.*, 2008).

Odpověď jabloně na infekci *V. inaequalis* není výjimkou a exprese PR genů je hojně studována i v této interakci. U jabloně byla po infekci patogenem zjištěna zvýšená hladina transkriptů pro PR proteiny typu β -1,3-glukanáz a endochitináz které jsou schopné hydrolyzovat buněčnou stěnu houbového patogena. Dále byly detekovány vyšší hladiny PR proteinů typu defenzinů (Paris *et al.*, 2009).

Po infekci listů jabloně patogenem *V. inaequalis* dochází v apoplastu citlivého kultivaru „Elstar“ k akumulaci β -1,3-glukanáz, chitináz, proteinu podobného thaumatinu a cysteinové proteázy. V rezistentním kultivaru „Remo“ dochází navíc ještě k akumulaci PR1 proteinu a proteinu podobného osmotinu. Zatímco u citlivého kultivaru je akumulace PR proteinů indukovaná napadením, u rezistentního kultivaru je syntéza těchto proteinů konstitutivní (Gau *et al.*, 2004). Degenhardt a kol. (2005) identifikovali další geny pro PR proteiny a geny podílející se na buněčné detoxifikaci, jejichž exprese byla vyšší v listech rezistentního kultivaru než v listech citlivé odrůdy. Mezi geny podílející se na buněčné detoxifikaci byly nalezeny metalothioneiny, které jsou zapojeny v detoxifikaci iontů kovu v rostlinných buňkách. Geny pro metalothioneiny byly konstitutivně exprimovány v rezistentním kultivaru, zatímco jejich exprese v citlivém kultivaru byla indukována infekcí (Degenhardt *et al.*, 2005).

2.4.3. ROS a detoxifikační enzymy

U rostlin je známo, že při napadení patogenem dochází k akumulaci reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS), jako jsou superoxid nebo peroxid vodíku, které mají svou roli v buněčné signalizaci a zároveň působí proti patogenu. Po napadení dochází k zvýšené akumulaci ROS, tzv. oxidativnímu vzplanutí, které je signálem pro buňku (Torres *et al.*, 2006). ROS hrají roli také v hypersenzitivní reakci buněk v místě napadení, která je příčinou vzniku symptomů třídy 1 (viz. kap. 2.2.3.1. Symptomy na listech).

ROS nepůsobí pouze jako signál v rostlinné buňce a v boji proti patogenu, ale také poškozují buněčné komponenty, proto rostliny současně produkují detoxifikační enzymy, které tyto buňce nebezpečně radikály odbourávají. Mezi tyto enzymy patří kataláza, askorbátperoxidáza, superoxidodismutáza a další (Torres *et al.*, 2006). Citlivý kultivar ‚Gala‘ transformovaný R-genem vykazuje po infekci zvýšenou expresi katalázy, reduktázy, glutation-S-transferázy a askorbátperoxidázy (Paris *et al.*, 2009). V kultivaru rezistentním k strupovitosti (‚Rewena‘) byla detekována konstitutivní zvýšená exprese askorbátperoxidázy, jejíž funkcí je kromě detoxifikace ROS také oxidativní vzplanutí (Holzapfel *et al.*, 2012).

2.4.4. Fytohormony

Hlavní roli v odpovědi rostlin na biotický stres hrají kyselina salicylová (salicylic acid, SA), kyselina jasmonová (jasmonic acid, JA), etylén a kyselina abscisová (abscisic acid, ABA), jejichž koncentrace v rostlině narůstá po napadení patogenem (Bari and Jones, 2009). SA se podílí hlavně na aktivaci buněčné odpovědi po napadení biotrofními a hemibiotrofními patogeny. Aktivace její signální dráhy vede k expresi PR-proteinů (viz. kap. 2.4.2. PR-proteiny) a její exogenní aplikace vede ke zvýšené rezistenci rostliny na napadení patogeny. SA má hlavní úlohu v SAR. Role JA a etylénu je v odpovědi na nekrotrofní patogeny a herbivory. ABA se podílí převážně v odpovědi na abiotický stres, ale účastní se také odpovědi na biotický stres vyvolaný patogeny (Bari and Jones, 2009; Verma *et al.*, 2016).

U rostlin jabloně rezistentního kultivaru ‚Florina‘ byla zjištěna zvýšená hladina transkriptu pro LRR receptorové kinázy po infekci *V. inaequalis* a také po exogenní aplikaci SA. Ovšem v citlivém kultivaru ‚Golden Delicious‘ byla tato indukce exprese po infekci patogenem menší. LRR receptorová kináza je receptorem pro signál o přítomnosti patogena a její aktivace vede k spuštění endogenní signalizace v napadené rostlině. Exprese této kinázy je pravděpodobně kontrolována akumulací SA či přítomností patogenních elicitorů (Komjanc *et al.*, 1999).

Po infekci *V. inaequalis* byla detekována zvýšená hladina proteinu obsahujícího AP2 doménu, transkripční faktor (TF)/faktor odpovědi na etylén (ERF), podílejícího se na signalizaci etylénem, a EIL2 proteinu, který se také podílí na této signalizaci (Paris *et al.*, 2009). Odpovědi jabloně na strupovitost se také účastní další ERF faktory (Girardi *et al.*, 2013) a z toho vyplývá, že v této obranné reakci hraje roli etylénová signalizační dráha.

2.4.5. Phytoalexiny

Phytoalexiny jsou nízkomolekulární sekundární metabolity rostlin, které se hromadí v místě napadení patogenem a podílí se na obranné odpovědi rostliny nejspíše zastavením růstu infekce patogena (Piasecka *et al.*, 2015).

Fenolické látky, které jsou produkovány jako odpověď na napadení *V. inaequalis* jsou známé pro svou funkci v inhibici růstu patogena. Mezi tyto látky nalezené u jabloně patří floridin a florentin, které pravděpodobně fungují jako phytoalexiny. Tyto fenolické látky jsou akumulovány v místě infekce *V. inaequalis*, kde zpomalují jeho růst (Hrazdina, 2003; Jha *et al.*, 2009).

Dále bylo nalezeno 11 typů fenolických látek, jejichž syntéza byla indukována po infekci. V místech infekce byla zjištěna zvýšená hladina těchto látek v porovnání s místy bez infekce, stejně tak byla nalezena vyšší hladina fenolických látek v napadených listech než v nenapadených. To naznačuje důležitou roli fenolických látek v odpovědi jabloně na strupovitost, což bylo potvrzeno i faktem, že v místě

rozhraní infikovaného a neinfikovaného místa byla hladina fenolických látek nejvyšší (Mikulič Petkovšek *et al.*, 2009).

2.4.6. Specifická depozice buněčné stěny

V. inaequalis je apoplastickým houbovým patogenem, to znamená, že neinvaduje do buněk hostitele, ale zůstává v mezibuněčných prostorech. V takovém případě hrají klíčovou úlohu v interakci hostitel-patogen buněčná stěna a plasmatická membrána.

Již na počátku interakce hostitel-patogen dochází prostřednictvím membránově lokalizovaných proteinů, receptorů rozeznávajících molekulární vzor patogena (pattern recognition receptor, PRR), k rozeznání molekulárních vzorů spojených s patogenem (pathogen associated molecular pattern, PAMP), přenosu signálu přes membránu do buněk hostitele a spuštění signální kaskády, která vede k iniciaci PTI (Bigeard *et al.*, 2015). Jednou z obecných odpovědí PTI je lokalizovaná depozice kalózy do místa infekce. Kalóza je β -1,3-glukan, který je syntetizován do apoplastu pomocí syntetáz kalózy lokalizovaných v plasmatické membráně. Hypotetickou funkcí kalózy je zpevnění buněčné stěny proti invazi patogena (Faulkner, 2015).

Aktivace PRR a jeho signalizace do

buňky může také vést k zesílení buněčné stěny prostřednictvím syntézy ligninu. Mimo jiné může ukládání ligninu v infikovaných pletivech zabránit šíření toxinů a

ETI: Imunita spouštěná efektozem (effector-triggered immunity) je specifická odpověď hostitele na patogena, založená na existenci *Avr* genů patogena a *R*-genů hostitele.

PTI: Imunita spouštěná patogenem (pathogen-triggered immunity) je obecná odpověď rostliny na napadení patogenem. K rozpoznání PAMP patogena dochází prostřednictvím PRR receptorů rostliny.

PRR: Receptor rozeznávající molekulární vzor patogena (pattern recognition receptor), jehož signalizace do buňky vede ke spuštění obecné buněčné odpovědi rostliny.

PAMP: Molekulárním vzorem spojeným s patogenem (pathogen associated molecular pattern) může být například flagelin nebo chitin.

SAR: Systémově získaná rezistence (systemic acquired resistance) je jev, při kterém dochází k aktivaci obranných mechanismů po napadení patogenem i v neinfikovaných částech rostliny. To vede k vyšší odolnosti rostliny při následném napadení.

enzymů z patogena do hostitele a zároveň i přenosu živin a vody z hostitelských buněk k patogenu (Miedes *et al.*, 2014).

V interakci *Malus – Venturia* zatím nebyla studována role kalózy, ale Holzapfel a kol. (2012) popsali zapojení aktivace syntézy ligninu v obranné reakci. Ve srovnání s citlivým kultivarem ‚Golden Delicious‘ byla v rezistentním kultivaru ‚Rewena‘ detekována vyšší exprese cinamylalkoholdehydrogenázy (CAD), enzymu podílejícího se na lignifikaci buněčné stěny (Holzapfel *et al.*, 2012).

2.5. Ontogenetická rezistence jabloně

Ačkoli je většina kultivovaných odrůd jabloní citlivá k napadení strupovitostí, symptomy infekce vykazují pouze mladé listy, které během inokulace aktivně rostou a expandují. Tento jev, kdy s rostoucím stářím listu klesá jeho citlivost k napadení, se označuje jako ontogenetická rezistence (MacHardy, 1996). V porovnání se staršími listy rostou houbové hyfy v mladých listech rychleji, to znamená, že první list shora prýtu je citlivý k napadení, zatímco pátý list je již plně rezistentní. Starší plně expandované listy jsou k napadení rezistentní u všech kultivarů (citlivých i rezistentních) a tato rezistence je funkční proti všem kmenům *Venturia inaequalis* (Li and Xu, 2002).

Ontogenetická rezistence rostlin k houbovým patogenům byla pozorována i v jiných systémech hostitel-patogen, například: vinná réva-padlí révové (Ficke *et al.*, 2002) nebo *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* (Kus *et al.*, 2002). Rezistencí související se stářím rostliny či orgánu se zabývalo mnoho prací, přesto stále není znám mechanismus, který za touto rezistencí stojí. V ontogenetické rezistenci rostlin před houbovými patogeny pravděpodobně bude hrát roli syntéza chemických látek jako je kyselina salicylová (Kus *et al.*, 2002) nebo fyziologické bariéry jako kutikula a buněčná stěna (Ficke *et al.*, 2002) a další mechanismy.

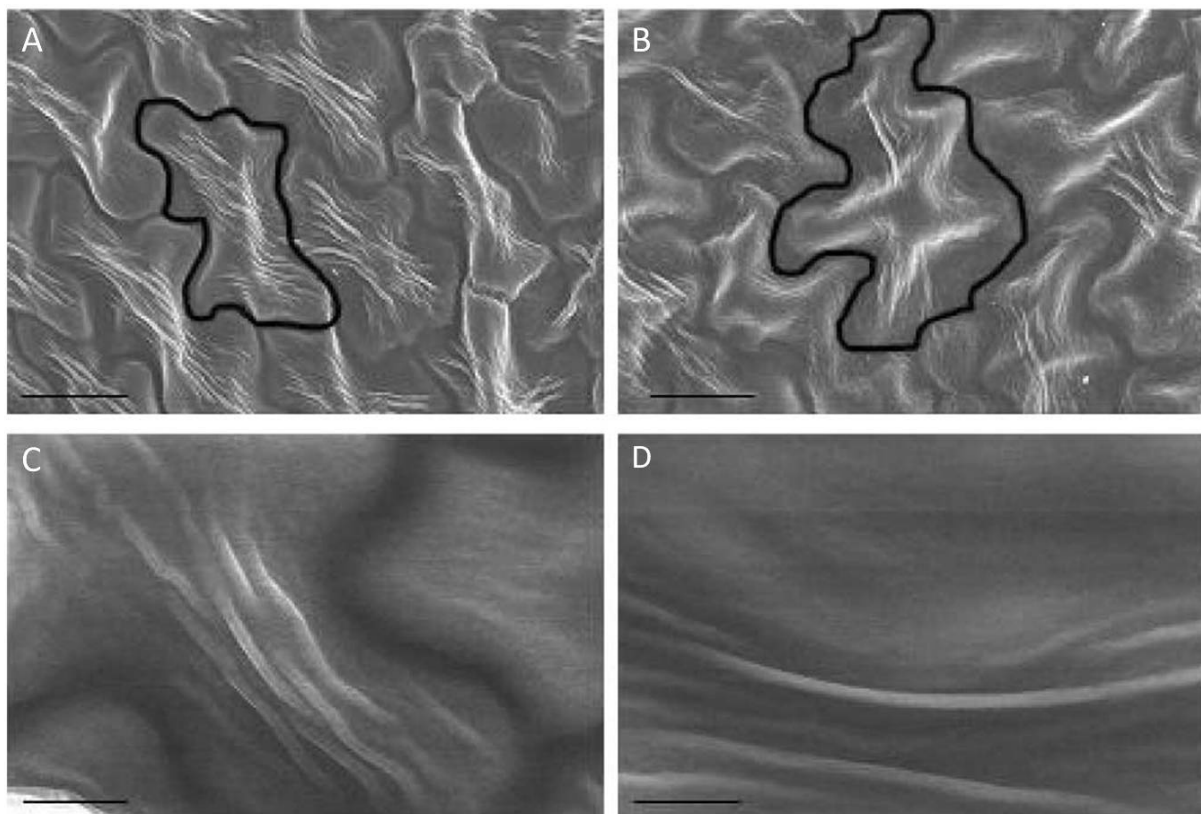
V systému *Malus-Venturia* byla jako jedna z prvních testována role fyzických bariér listu a to konkrétně kutikuly. Valsangiacomo a Gessler (1988) pozorovali, že klíčící hyfa konidie penetruje skrz kutikulu mladých i starších listů citlivého i

rezistentního kultivaru jabloně, ale k tvorbě subkutikulárních stromat dochází pouze u nejmladších listů citlivého kultivaru. Z toho vyvodili, že kutikula nehraje žádnou roli v ontogenetické rezistenci ani v rezistenci založené na existenci R-genu, protože k zastavení růstu patogena dochází v obou případech až po průniku kutikulou (Valsangiacomo and Gessler, 1988). Recentnější práce porovnávající expresi genů v mladých listech a starších listech ukázala, že exprese genů souvisejících se syntézou buněčné stěny a syntézou kutikulárních vosků (fenylalaninamoniaklyáza, PAL nebo CAD) je ve starších listech potlačena, což potvrzuje pozorování Valsangiacoma a Gesslera. Ovšem exprese genů pro proteiny přenášející lipidy (lipid transfer proteins) a peroxidázy je ve starších listech vyšší než v listech mladších. Obě tyto skupiny proteinů se podílí na biosyntéze kutinu, ligninu a suberinu a na tvorbě kutikulárních vosků. Dále byla u starších listů v porovnání s mladšími zvýšena exprese genů pro enzymy detoxifikující ROS, genů pro metalothioneiny (detoxifikace iontů kovu) a genů souvisejících s biosyntézou JA (Gusberty *et al.*, 2013).

2.6. Povrchové struktury listu jabloně

Většina terestrických rostlin vytváří na nadzemních orgánech povrchovou hydrofobní vrstvu zvanou kutikula. Kutikula zabraňuje nadměrným ztrátám vody a chrání rostlinu před abiotickým a biotickým stresem (Yeats and Rose, 2013). Kutikula plní důležitou funkci v interakci rostliny s patogeny (Serrano *et al.*, 2014). Kutikula je tvořena kutinem a kutikulárními vosky a je dle chemického složení členěna na dvě vrstvy, vrstvu bohatou na kutin a polysacharidy a na vrstvu obohacenou vosky s menším obsahem polysacharidů. Vosky jsou děleny na intrakutikulární vosky, které se nachází v kutikule a na epikutikulární vosky, které jsou deponované nad kutikulu, kde vytváří voskové krystaly nebo voskový film. Kutikula se může ve svém vzhledu a tloušťce lišit mezi jednotlivými druhy nebo v závislosti na ontogenetickém stadiu rostliny a environmentálních podmínkách. Kutin je tvořen mastnými kyselinami s přídavkem glycerolu, fenylpropanoidu a karboxylových kyselin, zatímco kutikulární vosky jsou převážně odvozeny z velmi dlouhých

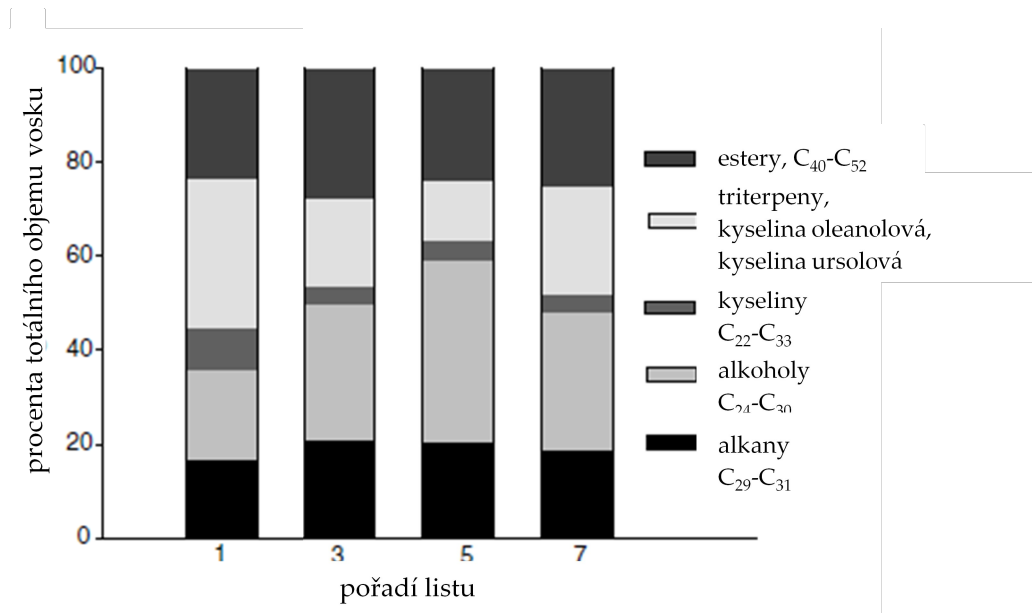
řetězců mastných kyselin. Na rozdíl od syntézy obou těchto složek kutikuly je mechanismus jejich dopravy do extracelulárního prostoru neznámý. Transport kutinu a vosků je pravděpodobně závislý na transportérech ABC typu (Yeats and Rose, 2013).



Obrázek 6 Povrch epidermálních buněk adaxiální strany listu jabloně (kultivar 'Golden Delicious') zobrazené pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. A a C, nejmladší, plně rozvinutý list; B a D, sedmý list shora (Bringe *et al.*, 2006). A a B, měřítko 20 µm.

Bringe a kol. (2006) popsali povrchové struktury listu jabloně včetně vzhledu kutikuly a jejího složení. Zjistili, že svrchní strana listu je tvořena stejně jako u ostatních dvouděložných rostlin epidermálními buňkami ve tvaru puzzle s laloky. Na adaxiální straně listu se nenachází žádné průduchy. Na povrchu listů byly pozorovány kutikulární lamely, které dávají vznik zprohýbanému tvaru pokožkových buněk. Nejmladší plně rozvinutý list byl porovnáván se starším listem a to ve vzhledu periklinálních stěn pokožkových buněk a bylo zjištěno, že počet lamel je snížen u buněk starších listů a že jsou méně vymodelované (Obrázek 6). Dále

bylo zjištěno, že složení kutikulárních vosků se liší v rámci ontogeneze listu (Obrázek 7) a dochází k variaci obsahu jednotlivých složek kutikuly (Bringe *et al.*, 2006).



Obrázek 7 Složení kutikulárních vosků je různé v rámci ontogeneze listu jabloně. Podíly jednotlivých složek kutikuly se liší u různě starých listů (první až sedmý list shora) jabloně (Bringe *et al.*, 2006).

2.7. Obecná buněčná odpověď na napadení patogenem

Buňky hostitele odpovídají na napadení patogenem nejen expresí obecných či specifických proteinů, ale také reorganizací či změnou lokalizace buněčných komponent. Specifická reorganizace cytoplazmy a buněčných struktur v reakci na napadení patogenem byla popsána u mnoha rostlin, avšak v systému *Malus-Venturia* nejsou v této oblasti k dispozici žádné informace.

Hlavním cílem hostitelské buňky je v interakci s penetrujícím (intracelulárním) patogenem zabránění jeho penetrace mechanismem penetrační rezistence. Penetrační rezistence je založena na zesílení buněčné stěny či tvorbě papily, které tvoří fyzickou bariéru před patogenem. Toto zpevnění buněčné stěny vzniká díky polarizované depozici kalózy a dalších látek. Papila je obranná struktura mezi buněčnou stěnou a plazmatickou membránou skládající se převážně z kalózy a deponovaná v místě penetrace patogena (Faulkner, 2015; Underwood, 2016). Takto řízená sekrece je závislá na cytoskeletu a s ním spojeným pohybem komponent

endomembránového systému (Hardham *et al.*, 2007). Jednou z nejčasnějších buněčných odpovědí hostitele je proto změna cytoskeletu.

Cytoskelet je dynamická vláknitá síť tvořená proteinovými podjednotkami, jejíž funkcí je polarizace buněk, umístění a pohyb organel, transport váčků, buněčné dělení, odpověď na vnější stimuly (jako je napadení patogenem) a další. Rostlinný cytoskelet je tvořen aktinovými filamenty (AF) a mikrotubuly (MT). Vlivem rostlinné vakuoly, zabírající většinu buňky, se AF i MT nachází převážně v kortikální vrstvě cytoplazmy. AF jsou velmi dynamická vlákna, jejichž reorganizace je velmi rychlý proces. AF rostlinných buněk se nachází v kortikální vrstvě cytoplazmy nebo v transvakuolárních provazcích cytoplazmy a jednou z jejich funkcí je vnitrobuněčný transport (Underwood, 2016). MT rostlinných buněk mohou v interfázi vytvářet dvě struktury: kortikální MT (cMT) přitíštěné na plazmatickou membránu nebo endoplazmatické MT (eMT) obkružující jádro. Kromě hlavní funkce v dělení buněk a jádra se MT podílí také na depozici celulósových mikrofibril v buněčné stěně (Paredes *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013).

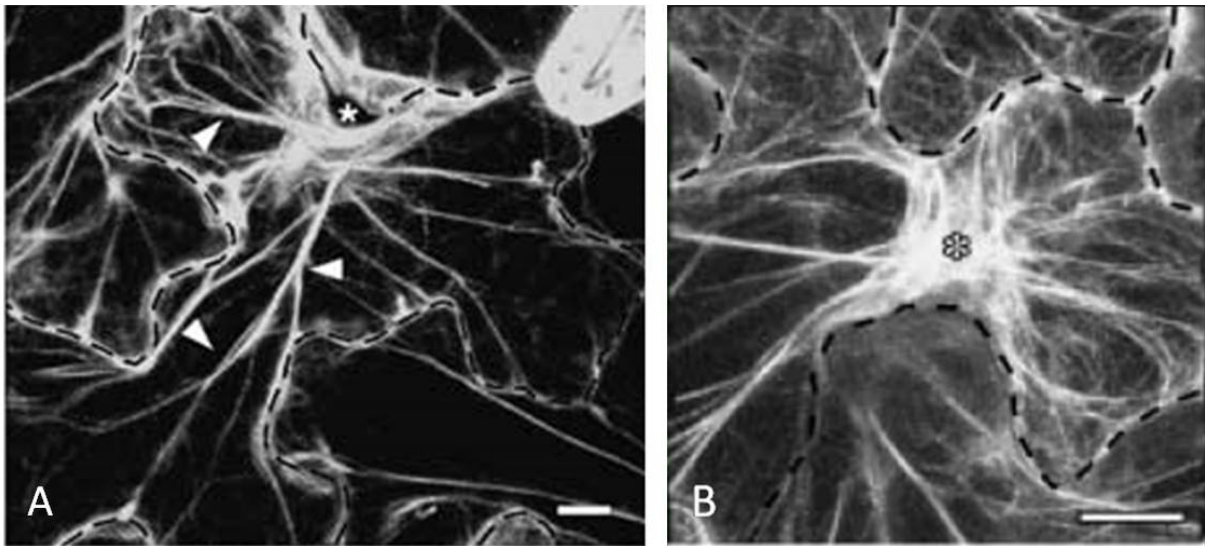
2.7.1. Změny aktinového cytoskeletu

První viditelnou reakcí rostlinných buněk na přítomnost houbového patogena je reorganizace cytoplazmy v místě kontaktu patogena s hostitelskou buňkou. Tento jev je doprovázen reorganizací AF a jejich fokusací do místa invaze (Obrázek 8). Spolu s fokusací AF dochází k akumulaci složek endomembránového systému a tím polarizované sekreci a tvorbě papily (Hardham *et al.*, 2007). Tato první obranná reakce hostitelských buněk je závislá na aktinovém cytoskeletu. Po farmakologickém narušení aktinu dochází k inhibici nahromadění cytoplazmy i tvorbě papily (Hardham, 2013).

Kobayashi a kol. (1994) ukázali, že v mezofylových buňkách lnu dochází po infekci rzi lnové k rozdílným odpovědím cytoskeletu při kompatibilní (citlivá rostlina) a nekompatibilní (rezistentní rostlina) interakci. Během kompatibilní interakce nebyla zjištěna změna AF v porovnání s AF neinfikovaných listů, zatímco

během nekompatibilní interakce došlo k fokusaci AF do místa kontaktu s patogenem ještě před penetrací hyfy do hostitelské buňky (Kobayashi *et al.*, 1994). Na druhou stranu u bobovité rostliny *Vigna unguiculata* byl detekován opačný jev, kdy akumulace AF po napadení houbovým patogenem byla v místě penetrace vyšší u citlivého kultivaru vigny než u rezistentního (Škalamera and Heath, 1998).

K akumulaci AF do místa kontaktu s klíční hyfou patogena dochází i v případě interakce ječmene, hrachu či *A. thaliana* s patogenem *Blumeria graminis*, způsobujícím padlí (Yun *et al.*, 2003; Opalski *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2016).



Obrázek 8 Reorganizace aktinových filament v pokožkových buňkách *A. thaliana* napadených patogenem. A, AF (GFP-hTalin) fokusovaná do místa penetrace *Peronospora parasitica* (Takemoto *et al.*, 2003). B, AF (GFP-hTalin) reorganizovaná po napadení patogenem *Blumeria graminis* (Takemoto *et al.*, 2006). Měřítko 10 μm .

2.7.2. Změny mikrotubulárního cytoskeletu

Zatímco AF vykazují obdobné změny organizace indukované napadením patogenem u odlišných interakcí hostitel-patogen, MT buněk hostitele vykazují různé změny organizace v rámci odlišných interakcí hostitel-patogen.

Mezofylové buňky listu lnu napadeného rzí lnovou vykazují odlišnou buněčnou odpověď při kompatibilní a nekompatibilní interakci. Během kompatibilní interakce nedošlo ke změně organizace MT, ty vykazovaly stejný charakter jako

v neinfikovaných listech. Během nekompatibilní interakce došlo k rychlé reorganizaci MT ještě před penetrací houbové hyfy do buňky, konkrétně k fokusaci radiálních MT do místa kontaktu s patogenem (Kobayashi *et al.*, 1994).

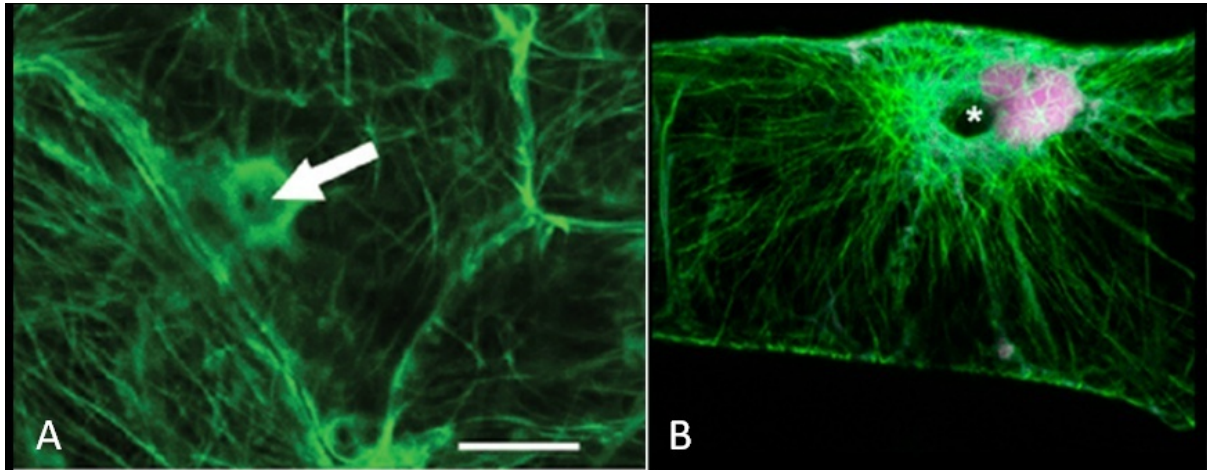
Baluška a kol. (1995) popsali reorganizaci MT v pokožkových buňkách ječmene po napadení padlím travním. Tyto změny MT se lišily v závislosti na typu interakce. V případě nekompatibilní interakce (rezistentní rostlina) došlo velmi rychle (15 minut) k dezorientaci eMT i cMT, které vytvořily jemnou síť končící v místě vzniklé papily. Během kompatibilní interakce (citlivá rostlina) došlo ke změně organizace cMT až po delší době a změna nebyla tak velká jako v případě inkompatibilní interakce. Dále došlo ke změně eMT, které se shlukly kolem jádra, jež změnilo svou lokalizaci (Baluška *et al.*, 1995).

Epidermální buňky *Vigna unguiculata* reagují na napadení intracelulárním houbovým patogenem *Uromyces vignae* reorganizací MT. MT nenapadených buněk byly lokalizovány na dvou místech, a to v kortikální vrstvě – cMT a kolem jádra – perinukleární či eMT. Napadené buňky měly navíc perihyální MT (phMT), které obklopovaly invadující houbovou hyfu. Byly pozorovány rozdíly mezi citlivými a rezistentními kultivary vigny, kdy v napadených buňkách u citlivého kultivaru došlo k minimální změně MT oproti nenapadeným buňkám - nedošlo k tvorbě phMT. V buňkách sousedících s infikovanými buňkami došlo k tvorbě agregátů MT směrem k napadené buňce (Škalamera and Heath, 1998).

I v případě interakce ječmen-padlí ječmene byla zjištěna akumulace MT do místa penetrace patogena (Obrázek 9) a také kolokalizace proteinu aktivujícího ROP GTPázu s těmito MT (Hoefle *et al.*, 2011).

Ovšem byly detekovány i další různorodé změny MT v napadených buňkách jako je lokalizovaná depolymerace MT v místě infekce nebo difúzní MT v místě penetrace u *A. thaliana* (Takemoto *et al.*, 2003). Tyto rozdíly v chování MT mohou naznačovat méně důležitou roli MT v buněčné odpovědi rostliny na napadení patogenem než je role AF (Takemoto and Hardham, 2004). Že jsou MT v této prvotní obraně méně důležité, naznačují i odlišné efekty depolymerizace MT oryzalinem.

Farmakologické narušení MT nevede ke snížené depozici papily, v některých systémech hostitel-patogen vede ke zvýšení citlivosti na napadení, jindy k zvýšení rezistence (Hardham, 2013). Možným vysvětlením je, že MT nehrají roli v polarizované sekreci vedoucí k zastavení penetrace patogena do buňky, ale že pouze reagují na mechanický tlak vyvolaný touto penetrací (Hardham *et al.*, 2008).



Obrázek 9 Reorganizace mikrotubulárního cytoskeletu v rostlinných buňkách napadených houbovým patogenem. A, Reorganizaované MT (GFP) epidermálních buněk *A. thaliana* v místě infekce *Erysiphe cruciferarum* (Quentin *et al.*, 2016). B, Fokusace MT (GFP-MAGAP1) v místě penetrace *Blumeria graminis* do buněk ječmene (Hoefle *et al.*, 2011). Měřítko 13 µm.

2.7.3. Lokalizace buněčného jádra

Pohyb jádra a změny jeho velikosti v rostlinných buňkách napadených patogenem poprvé popsal Baluška a kol. (1995), kteří pozorovali až dvojnásobné zvětšení jádra v buňkách infikovaných oproti buňkám neinfikovaným, což si vysvětlovali aktivní transkripcí a endoreduplikací (Baluška *et al.*, 1995).

Škalamera a Heath (1998) detekovali v interakci *Vigna-Uromyces* změnu lokalizace jádra v napadených buňkách. Tato lokalizace se lišila u citlivého a rezistentního kultivaru, kdy u citlivého kultivaru došlo k pohybu jádra blíže místa invadující hyfy, zatímco u rezistentního kultivaru zůstalo jádro vzdáleno od místa invaze (Škalamera and Heath, 1998).

Pokožkové buňky *A. thaliana* odpovídaly na napadení padlím rodu *Erysiphe cichoraceum* také změnou lokalizace jádra z původní pozice blízko mezofylovým buňkám do místa infekce (Koh *et al.*, 2005).

2.7.4. Změny endomembránového systému a organel

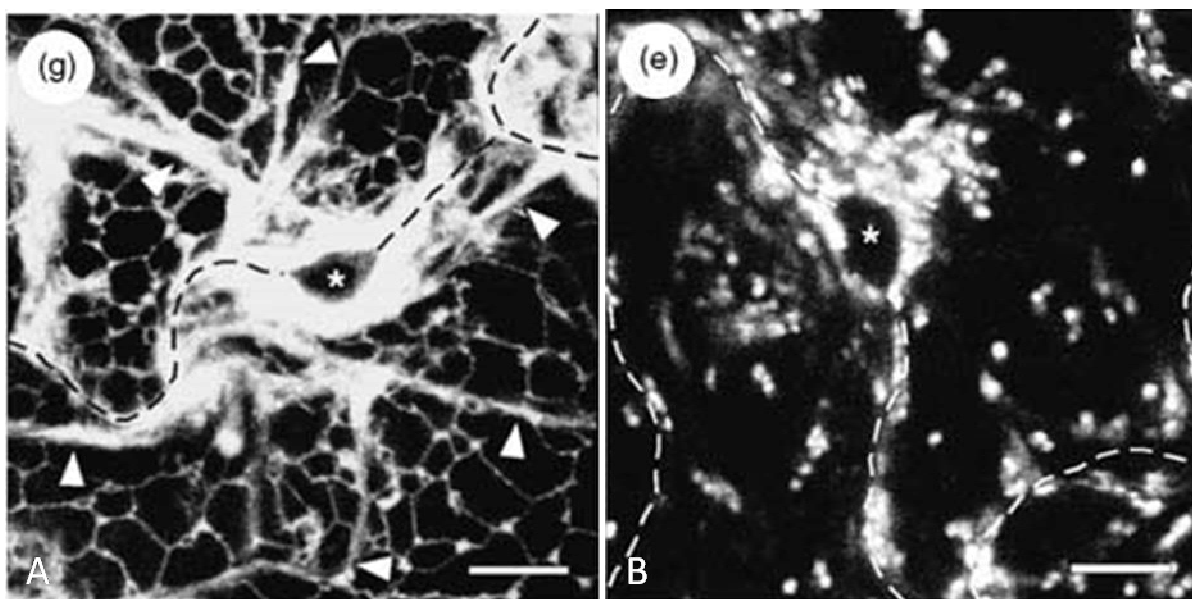
V kontaktním místě s patogenem dochází k akumulaci endoplazmatického retikula (ER), Golgiho aparátu (GA) a peroxisomů (Hardham *et al.*, 2008). Tyto buněčné kompartmenty jsou do místa penetrace dopravovány pomocí cytoskeletu (Hardham, 2013).

V *A. thaliana* byly po inokulaci oomycétními patogeny či napodobením mechanického tlaku způsobeného patogeny kromě změn cytoskeletálních struktur detekovány také změny komponent endomembránového systému, konkrétně ER a GA. Po napadení patogenem došlo v pokožkových buňkách k akumulaci ER do místa penetrace a jeho setrvání zde (Obrázek 10A). Golgiho váčky byly v místech infekce preferenčně lokalizovány to penetračního místa (Obrázek 10B), na rozdíl od cisteren ER pokračovaly váčky v pohybu po buňce a stupeň akumulace v penetračním místě se měnil v čase (Takemoto *et al.*, 2003; Hardham *et al.*, 2008).

Hardham a kol. (2008) mimikovali napadení listů *A. thaliana* patogenem tak, že pokožkové buňky vystavili mechanickému tlaku a byli schopní detekovat změny lokalizace nejen ER a GA ale také peroxisomů. V místě kontaktu mikrojechly s pokožkovou buňkou došlo k tvorbě klastru peroxisomů, které zde zůstaly po celou dobu trvání mechanického tlaku (Hardham *et al.*, 2008). Stejný efekt akumulace peroxisomů byl pozorován také v interakci *A. thaliana*-*E. cichoraceum* (Koh *et al.*, 2005).

Dále byla pozorována akumulace mitochondrií v místě penetrace houbového patogena *E. cichoraceum* do pokožkových buněk *A. thaliana* (Koh *et al.*, 2005).

V pokožkových buňkách *A. thaliana* infikovaných *E. cichoraceum* bylo také detekováno obklopení houbového haustoria tonoplastem vakuoly (Koh *et al.*, 2005).



Obrázek 10 Reorganizace ER a GA v pokožkových buňkách *A. thaliana* po inokulaci oomycétním patogenem. A, Akumulace ER (GFP-tm-KKXX) do místa penetrace patogena (hvězdička) *Peronospora parasitica*. B, Váčky GA (STmd-GFP) akumulované v místě penetrace *P. parasitica* (Takemoto *et al.*, 2003). Měřítko 10 μ m.

Pro fortifikaci buněčné stěny v místě penetrace patogena, tedy pro tvorbu papily a dopravu složek buněčné stěny, je nezbytný směrovaný transport váčků do místa penetrace. Takový transport váčků je součástí exocytózy, tedy váčkového transportu ven z buňky do prostoru apoplastu, a pozorované reorganizace endomembránového systému mají zřejmě jako hlavní cíl produkovat tyto váčky. Na exocytóze váčků se podílí poutací komplex Exocyst, který také hraje roli v interakci hostitele s bakteriálním nebo houbovým patogenem. Zpevnění buněčné stěny (tvorba papily) brání penetraci patogena do buněk hostitele. U ječmene napadeného padlím travním (*Blumeria graminis*) byla detekována vyšší účinnost penetrace v rostlinách s umlčeným genem pro podjednotku EXO70 komplexu Exocyst (Žárský *et al.*, 2013).

Dále byla zjištěna role syntaxinů, proteinů lokalizovaných na membránách a důležitých pro splývání váčků s cílovou membránou, v penetrační rezistenci. Produkt genu *PENETRATION 1* (*PEN1*) kódující syntaxin na plasmatické membráně je lokalizován v místě penetrace a v papile, vznikající mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou. *PEN1* hraje aktivní roli v polarizované sekreci,

vedoucí ke vzniku papily v místě penetrace. Mutace *pen1* má za následek zvýšenou účinnost penetrace patogena v nehostitelském systému *Arabidopsis-Blumeria* (Assaad *et al.*, 2004).

Dalším genem podílejícím se na nehostitelské rezistenci je *PENETRATION RESISTANCE 3 (PEN3)*, který kóduje ABC (ATP binding cassette, kazeta vážící ATP) transportér (Stein *et al.*, 2006). Pravděpodobnou funkcí tohoto transportéru je transport antimikrobiálních metabolitů přes plazmatickou membránu do prostoru apoplastu. Po napadení dochází k akumulaci PEN3 v místě penetrace patogena, a tato akumulace je indukována percepcí PAMP hostitelem. Transport PEN3 transportéru je závislý na AF nikoli na MT (Underwood and Somerville, 2013).

3. Materiál a metody

3.1. Použitá media

Kultivační medium pro *Malus domestica*

MS soli	4,30 g/l
agar	7,00 g/l
myo-inositol	18,02 M
sacharóza	87,64 mM
glycin	26,64 μ M
thiamin	0,38 μ M
pyridoxin	2,96 μ M
kyselina nikotinová	4,06 μ M
BAP	17,80 μ M
pH	5,8

Tabulka 4 Složení kultivačního media pro *M. domestica* (1 L). MS soli (M5524, Sigma); BAP, 6-benzylaminopurin.

Medium indukující kořenění pro *M. domestica*

MS soli	4,30 g/l
agar	7,00 g/l
myo-inositol	18,02 M
sacharóza	87,64 mM
glycin	26,64 μ M
thiamin	0,38 μ M
pyridoxin	2,96 μ M
kyselina nikotinová	4,06 μ M
IBA*	4,92 μ M
	2,46 μ M
	0,49 μ M
pH	5,8

Tabulka 5 Složení media indukujícího kořenění (1L). MS soli (M 5524, Sigma); IBA, kyselina indolyl-3-máslná.

* Tři různé koncentrace IBA; pro kořenění dále využívána nejvyšší koncentrace.

Regenerační media pro *M. domestica*

	RM1	RM2
MS soli	4,3 g/l	4,3 g/l
sacharóza	30,0 g/l	–
sorbitol	–	30,0 g/l
agar	7,0 g/l	5,0 g/l
NAA	1,1 µM	–
IBA	–	1,0 µM
BAP	17,8 µM	17,8 µM
TDZ	–	5,0 µM
pH	5,8	5,8

Tabulka 6 Složení regeneračního media 1 (RM1) a regeneračního media 2 (RM2). NAA, kyselina naftyloctová; IBA, kyselina indolyl-3-máselná; BAP, 6-benzylaminopurin; TDZ, tidiazuron.

LB medium pro *Escherichia coli*

pepton	10,0 g/l
yeast extract	5,0 g/l
NaCl	171,1 mM
agar (pro tuhé medium)	17,5 g/l

Tabulka 7 Složení LB media (1L).

YEB medium pro *Agrobacterium tumefaciens*

pepton	5,0 g/l
meat extract	5,0 g/l
yeast extract	1,0 g/l
sacharóza	14,6 mM
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	2,03 mM
agar	17,0 g/l

Tabulka 8 Složení YEB media (1 L).

SOC medium

pepton	20 g/l
yeast extract	5 g/l
glukosa	20,0 mM
NaCl	10,0 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10,0 mM
MgSO ₄	10,0 mM

Tabulka 9 Složení SOC media pro elektroporaci buněk *Escherichia coli* (1 L).

PCA medium pro *V. inaequalis*

brambory	20 g/l
mrkev	20 g/l
agar	15 g/l

Tabulka 10 Složení PCA (Potato Carrot Agar) media pro *in vitro* kultivaci konidií *V. inaequalis* (1 L). Příprava: brambory s mrkví byly vařeny v destilované vodě po dobu 30 minut, poté byl vývar přefiltrován přes látku, byl přidán agar a medium bylo klávkováno při 121°C, po dobu 15 minut.

3.2. Rostlinný materiál

V práci byly použity rostliny *Malus domestica*, citlivá odrůda ‚Idared‘ a tolerantní odrůda ‚Angold‘. Rostliny byly pěstovány ve formě explantátů v podmínkách *in vitro* ve 100ml Erlenmeyerových baňkách s kultivačním mediem (Tabulka 4). Již zavedená explantátová kultura byla poskytnuta z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy. Kultivace probíhala při fotoperiodě 16/8 a teplotě 21°C.

3.3. Indukce kořenění a přenos do *ex vitro* podmínek

Kořenění prýtových explantátů bylo indukováno v *in vitro* podmínkách přidáním tří různých koncentrací auxinu (Tabulka 5), kyseliny indolyl-3-máselné (IBA), do kultivačního media ochuzeného o benzylaminopurin (BAP). Ze tří koncentrací byla pro další experimenty zvolena nejvyšší koncentrace auxinu. Indukce kořenění probíhala po dobu 8 týdnů při fotoperiodě 16/8 a teplotě 21°C.

Přenos zakořeněných rostlin do podmínek *ex vitro* byl prováděn nesterilně přesazením rostlin do jiffy (rašelinové válečky od společnosti Jiffy Products International). Takto přesazené rostliny byly kultivovány při fotoperiodě 16/8 a teplotě 21°C, v plastových kelímcích (Sigma) překrytých saranovou folií, udržující 100% vzdušnou vlhkost po dobu 7 dní. Poté byla folie nahrazena gázou, dovolující částečnou výměnu plynů na dobu 7 dní a poté byly rostliny kultivovány nepříkryté po dobu 7 dní. Po této době došlo k prorůstání kořenů ven z rašelinových váleček a rostliny byly přesazeny do květináčů se sterilní půdou a nadále udržovány v kultivační místnosti.

3.4. Sledování rychlosti růstu rostlin

Pro tento experiment byly sledovány rostliny rostoucí v *ex vitro* podmínkách, v kultivační místnosti se světelnými podmínkami 16/8, při teplotě 21°C. Rostliny byly sledovány po jejich přesazení do květináče po dobu 4 týdnů, kdy byly přibližně každé dva dny sledovány listy a jejich pořadí na stonku. Každý týden byl označen nový list 1 (první list od shora) a u něj bylo následně zaznamenáváno pořadí.

3.5. Inokulum a inokulace

Pro inokulaci rostlin rostoucích v *in vitro* podmínkách byly použity konidie *V. inaequalis* pěstované na PCA mediu (Tabulka 10). Kultury *V. inaequalis* byly poskytnuty z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy. Pro inokulaci rostlin byly konidie sterilně smyty z media, resuspendovány ve sterilní destilované vodě a poté aplikovány na listy *in vitro* i *ex vitro* rostlin.

Pro inokulaci *ex vitro* rostlin byly použity konidie patogena *Venturia inaequalis* smyté z napadených listů jabloně ze sadu VŠÚO Holovousy. Konidie byly smývány tak, že napadené listy jabloně byly vloženy do kádinky, poté byly zality pitnou vodou a ponechány na třepačce po dobu 30 minut. Takto vzniklé inokulum bylo zamraženo a uchováváno v mrazáku při teplotě -20°C. Další namnožení konidií

probíhalo na listech citlivé odrůdy ‚Idared‘. Odkud byly konidie dále smývány a používány k přípravě dalšího inokula. Koncentrace konidií v inokulu se pohybovala kolem 2×10^5 spor ml^{-1} .

Při každé inokulaci byl prováděn *in vitro* test klíčivosti konidií. Na podložní sklíčko byla přenesena kapka inokula a sklíčko s konidiami bylo inkubováno ve vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Konidie byly pozorovány ve světelném mikroskopu (Olympus Provis AX 70) a bylo vypočítáno procento klíčivosti spor.

Pro inokulaci byly používány *ex vitro* rostliny tři týdny po přenesení do *ex vitro* podmínek. Inokulace byla prováděna postřikem inokula na rostliny. Tyto rostliny byly poté kultivovány po dobu 48 hodin ve vysoké vzdušné vlhkosti (95 – 100 %), při teplotě 21°C.

3.6. Sterilizace konidií pro inokulaci *in vitro* rostlin

Sterilizace konidií smytých z napadených listů jabloně odrůdy ‚Idared‘ byla prováděna promýváním konidií v různých koncentracích přípravku SAVO. Konidie *V. inaequalis* byly smývány z napadených listů tak, že listy byly vloženy do 12ml plastové falkony a zality přibližně 11 ml pitné vody. Falkona i s listy byla poté třepána na třepače po dobu 30 minut. Pro sterilizaci bylo vytvořeno 6 variant koncentrace SAVA (1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) a 2 časové varianty trvání sterilizace (5 a 10 minut). Voda s konidiami byla sterilně rozdělena do 13 plastových 1,5ml zkumavek (6 variant koncentrace pro obě časové varianty a kontrola představovaná smytými konidiami bez přidání SAVA) a do každé (kromě kontroly) bylo přidáno potřebné množství SAVA tak, aby bylo dosaženo všech 6 koncentrací. Mikrozkušavky byly důkladně protřepány a poté ponechány stát po dobu 5 nebo 10 minut. Během určené doby došlo k poklesu konidií na dno zkumavky a po uplynutí této doby byla odstraněna vrchní část obsahu zkumavky (900 μl z celkového objemu 1 ml). Poté byly konidie promyty 900 μl sterilní destilované vody, zkumavka byla důkladně protřepána a ponechána stát po dobu 3 minut. Toto promývání bylo

opakováno 3x. Po promytí konidií byly koncentrovány odebráním vrchní vodné části a část konidií byla sterilně přemístěna na PCA medium (Tabulka 10) pro zjištění úspěšnosti sterilizace a zbylá část byla přemístěna na sklíčko, uzavřena do vlhké komůrky na 48 hodin a poté byl proveden *in vitro* test klíčivosti konidií.

3.7. Transformace rostlinného materiálu

3.7.1. Stabilní transformace metodou kokultivace

K inkorporaci DNA do rostlinného genomu bylo využito *Agrobacterium tumefaciens*. Seznam vektorů použitých v tomto experimentu (Tabulka 11).

Nejdříve byla testována schopnost regenerace rostlinného materiálu z listových segmentů. Pro regeneraci byly použity plně expandované nejmladší listy *in vitro* rostlin, které byly za sterilních podmínek nařezány na segmenty o velikosti přibližně 3x3 mm. Tyto segmenty byly poté přeneseny na regenerační medium 1 (Tabulka 6) v plastové Petriho misce s 5ml jamkami. Indukce regenerace probíhala po dobu 3 týdnů, ve tmě, při teplotě 21°C a poté byly segmenty přeneseny na čerstvé regenerační medium 1, kde byly kultivovány na světle po dobu 60 dní (Zhang *et al.*, 2006). Tato metoda regenerace rostlin z listových segmentů nebyla úspěšná.

Dále byla vyzkoušena odlišná metoda regenerace rostlin, pro kterou byl použit stejný typ listových segmentů. Tyto segmenty byly přeneseny na regenerační medium 2 (Tabulka 6). Segmenty byly udržovány 2 týdny ve tmě a poté 2 týdny na světle při teplotě 21°C (Puite, J. and Schaart, 1996; Maximova *et al.*, 1998). Po této době došlo k indukci regenerace.

Před transformací *A. tumefaciens* byly listové segmenty předkultivovány po dobu 2 dní na regeneračním mediu 2 (RM2) na světle. Před kokultivací byly připraveny bakteriální suspenze. Bakterie byly rozčárkovány na Petriho misku o průměru 90 mm s YEB mediem (Tabulka 8) a antibiotiky a byly kultivovány po dobu 2 dnů ve 28°C. Poté byly bakterie přeneseny do 20 ml tekutého YEB media s antibiotiky a byly umístěny na třepačku, přes noc, do 28°C. Do takto připravené

bakteriální suspenze byly segmenty namáčeny po dobu 5 minut a poté osušeny na sterilním filtračním papíru. Poté byly segmenty vloženy na RM2 bez antibiotik a byly kokultivovány 3 dny ve tmě při teplotě 21°C. Po třech dnech byly segmenty opláchnuty ve sterilní vodě s cefotaximem (1 µl/ml), osušeny na sterilním filtračním papíru a vloženy na RM2 s kanamycinem (1 µl/ml) a cefotaximem (1µl/ml). Po dobu dvou týdnů byly segmenty udržovány ve tmě a poté 2 týdny na světle.

označení	protein/doména	značí	FP	selekce ATB	zdroj
GFP-HDEL	HDEL	ER	GFP	kanamycin	(Nelson <i>et al.</i> , 2007)
GFP-TUB	β-tubulin	tubulin	GFP	kanamycin	(Nakamura <i>et al.</i> , 2004)
GFP-fimbrin	FABD2	aktin	GFP	kanamycin	(Voigt <i>et al.</i> , 2005)

Tabulka 11 Vektory použité při stabilní transformaci metodou kokultivace a tranzientní transformaci metodou infiltrace. HDEL, sekvence tapetující do endoplasmatického retikula (ER); FABD, fimbrin actin binding domain; GFP, green fluorescent protein; ATB, antibiotika.

3.7.2. Tranzientní transformace biolistickou metodou

Pro biolistickou metodu tranzientní transformace byly použity tři vektory, PX-gk, ER-gk a GA-gk (Tabulka 12).

Transformace bakterií *Escherichia coli* byla prováděna metodou elektroporace do elektrokompetentních buněk linie DH5α. Elektrokompetentní buňky byly rozmrazeny na ledu a k objemu 40 µl suspenze buněk byly přidány 4 µl DNA a poté byly buňky inkubovány 1 minutu na ledu. Následně byly buňky přeneseny do vychlazené elektroporační kyvety a vloženy do elektropoátoru, kde na ně byl aplikován elektrický puls 2,5 kV (resistence 200 Ω, kapacitance 25 µF). Ihned po transformaci byl k buňkám přidán 1 ml SOC media (Tabulka 9) a celý obsah kyvety byl přenesen do mikrozkušavky, která byla umístěna do 37°C na dobu 1 hodiny za stálého třepání na třepačce (180 rpm). 20 µl suspenze buněk bylo následně ve sterilních podmínkách rozetřeno na LB medium s kanamycinem (50 mg/l) a ponecháno přes noc ve 37°C. Další den byla vybrána 1 kolonie a ta byla za sterilních podmínek přenesena sterilní špičkou do skleněné zkumavky se 3 ml tekutého LB

media (Tabulka 7) s kanamycinem (50 mg/l) a ponechána přes noc na třepačce (150 rpm) při 37°C. Druhý den byla část suspenze buněk slita do 1,5ml mikrozkušavky a následně centrifugována na maximální výkon 30 vteřin. Z mikrozkušavky byl odstraněn supernatant a byl do ní dolit zbytek bakteriální suspenze, který byl centrifugován stejným způsobem a znovu byl odstraněn supernatant. Buněčný pelet byl zmrazen na -20°C. Izolace plasmidu z transformovaných buněk byla prováděna pomocí purifikačního systému Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega). Koncentrace izolované DNA byla poté měřena pomocí spektrofotometrického přístroje NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Biolistická metoda byla prováděna s vybavením Helios Gene Gun system (BIO-RAD, kat. č. 165-2432). Nábojnice pro tuto metodu byly připravovány ze zlatých kuliček o průměru 1 μm , které byly odváženy do mikrozkušavky, resuspendovány v 70% etanolu, po 15 minutách centrifugovány na 5000 rpm, po dobu 15 sekund, poté byl z mikrozkušavky odstraněn etanol a kuličky byly 3x resuspendovány a promyty ve sterilní destilované vodě, přičemž po každém promytí následovala centrifugace (7000 rpm, 30 sekund). Poté byly resuspendovány v 500 μl 50% glycerolu, centrifugovány jako v předchozím kroku, byl odstraněn glycerol a poté byly 2x promyty vodou a po každé byly centrifugovány (7000 rpm, 30 sekund) a ze zkušavky byl odstraněn supernatant. Dále byly resuspendovány ve 100 μl 50 mM spermidinu, vortexovány po dobu 2 sekund a poté 2x 30 sekund sonikovány ve vodní lázni. Následně byl ke kuličkám přidán ekvivalent 50 μg plasmidu, suspenze byla 5 sekund vortexována, poté byl k suspenzi pomalu po kapkách (po každé kapce vortexováno) přidáno 100 μl 1M CaCl_2 a suspenze byla nechána precipitovat při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Poté byla suspenze centrifugována 15 sekund na 5000 rpm, byl odstraněn supernatant a pelet byl 3x promyt v 100% etanolu, po každém promytí byla suspenze centrifugována 5 sekund na 5000 rpm a byl odstraněn etanol. Na závěr byly kuličky resuspendovány v 5% polyvinylpyrrolidonu ve 100% etanolu, byly přeneseny do 10ml plastové falkony a buď byly ihned připraveny nábojnice, nebo byly zlaté kuličky s navázanou DNA skladovány ve

100% etanolu, překryté parafilmem v -20°C. Nábojnice byly poté připraveny naplněním nábojnicové trubičky zlatou suspenzí. Nábojnicová trubička byla vysušena dusíkem (15 minut; 0,35 l/min) v sušícím aparátu a poté pomocí plastové stříkačky naplněna zlatou suspenzí, která byla nejprve sonikována ve vodní lázni, tak, aby nedošlo k tvorbě bublin. Po 5 minutách sedimentace ve vodorovné poloze byl stříkačkou pomalu odstraněn etanol tak, aby zlato zůstalo v nábojnicové trubičce. Trubička byla opět vysušena dusíkem za stálého otáčení po dobu 5 minut a nařezána na jednotlivé nábojnice pomocí řezacího aparátu. Nábojnice byly skladovány při teplotě 7°C na silikagelu.

Biolistická transformace byla aplikována na nejmladší listy rostlin jabloně rostoucích v *in vitro* i v *ex vitro* podmínkách, dále na kořeny jabloně *ex vitro* rostlin a na kalus vznikající při *in vitro* kultivaci jabloně. Transformace byla provedena výstřelem z genového děla Helios Gene Gun z bezprostřední blízkosti za použití rozptylové mřížky. Z jedné nábojnice byly provedeny dva výstřely a na jedno místo byly použity dvě nábojnice. Tlak hnacího helia byl nastaven na 150 – 300 ψ . Listy byly transformovány po odstřížení z rostliny na adaxiální i abaxiální straně a poté byly uloženy do vlhké komůrky. Kořeny byly odstříženy z rostlin zasazených do jiffy 2 týdny po jejich přenesení do *ex vitro* podmínek a po transformaci byly uloženy do vlhké komůrky. Kalus byl odebrán z explantátů 4 týdny po přenesení na nové kultivační medium a po transformaci byl vložen na kultivační medium. Materiál po transformaci byl mikroskopován po 24 hodinách na konfokálním mikroskopu (Zeiss LSM 880).

označení	protein/doména	značí	FP	selekce ATB	výrobce
PX-gk	PTS1	peroxisom	GFP	kanamycin	(Nelson <i>et al.</i> , 2007)
ER-gk	HDEL	ER	GFP	kanamycin	(Nelson <i>et al.</i> , 2007)
GA-gk	alfa-1,2-manosidáza I	GA	GFP	kanamycin	(Nelson <i>et al.</i> , 2007)

Tabulka 12 Vektory použité při tranziční transformaci biolistickou metodou. PTS1, sekvence tapetující do peroxisomu; HDEL, sekvence tapetující do ER; GFP, green fluorescent protein.

3.7.3. Tranzientní transformace metodou infiltrace

Bakterie s vnášeným konstruktem (Tabulka 11) byly kultivovány na plotně s YEB médiem a selekčními antibiotiky, poté byly zaočkovány do 10 ml tekutého YEB media s příslušnými antibiotiky a kultivovány za stálého třepání přes noc při 28°C. Do tekutého media s antibiotiky (gentamycin, kanamycin, rifampicin) byly také zaočkovány kolonie *A. tumefaciens* transformované supresorem silencingu p19 a kultivovány za stejných podmínek jako bakterie s vnášeným konstruktem. Další den byly bakteriální suspenze přelity do 50ml plastových falkon, byly centrifugovány 5 min, při 28° a 5000 g, vrchní část tvořená médiem byla odstraněna a bakterie byly dvakrát promyty infiltračním roztokem (Tabulka 13) a mezi promytím centrifugovány jako v předešlém kroku. Po centrifugaci byl pelet resuspendován v infiltračním roztoku s acetosyringonem (200µM), inkubován 2 hodiny, při 28°C za stálého třepání. Bakteriální suspenze byly smíchány v poměru 1:1 (konstrukt:p19), suspenze byla nasáta injekční stříkačkou a opatrně vtlačena průduchy na spodní straně listu do mezibuněčných prostor mezofylu listu rostlin rostoucích v *ex vitro* podmínkách. Místo infiltrace bylo označeno lihovým fixem, rostliny byly kultivovány 2 dny v kultivační místnosti se světelnými podmínkami 16/8 a při teplotě 21°C, poté byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus Provis AX 70, excitace 460-490 nm).

MES	10mM
MgCl ₂	10mM
pH	6,5

Tabulka 13 Složení infiltračního media. MES, 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina.

3.8. *In situ* imunolokalizace proteinů

3.8.1. Fixace a zalévání do Steedmanova vosku

Pro tuto metodu byly použity první rozvinuté listy *in vitro* a *ex vitro* rostlin jabloně, které byly nařezány na proužky o velikosti přibližně 0,2 x 1 cm v závislosti na

velikosti listu. Tyto segmenty byly přeneseny do košíčku se dnem z nylonové tkaniny a poté umístěny do jamky s fixačním roztokem (Tabulka 16). K fixáži byly připipetovány různé objemy detergentu Triton X-100 kvůli vysoké nesmáčivosti listů, tak aby bylo dosaženo 0,5%, 1%, 2%, 3% nebo 5% koncentrace detergentu. Listy ve fixáži byly umístěny do vakuové vývěvy na dobu 3 hodin, při tlaku 550 HPa a pokojové teplotě. Po uplynutí této doby byly listy vyjmuty z fixáže a promyty 3x 10 minut v pufru stabilizujícím aktin (ASB; pro následnou vizualizaci aktinového cytoskeletu; Tabulka 14) nebo v pufru stabilizujícím mikrotubuly (MTSB; pro následnou vizualizaci mikrotubulů; Tabulka 14), při pokojové teplotě. Poté byly listy promyty ve fosfátovém pufru (Phosphate Buffered Saline, PBS; Tabulka 14). Listy byly po promytí v pufru vystaveny dehydratační řadě (Tabulka 17). Do plastové 12ml zkumavky byly navrstveny přibližně 3ml Steedmanova vosku (VWR International, 360704E) rozpuštěného při teplotě 38°C a 3 ml 96% etanolu (zahřátého na 38°C). Pomocí pipety byly do zkumavky přeneseny listové segmenty a zkumavka byla ponechána ve 38°C přes noc. Přes noc klesly listy ke dnu zkumavky, protože do nich postupně pronikl Steedmanův vosk. Druhý den byl pipetou odsát veškerý etanol tvořící vrchní část ve zkumavce a poté byla zkumavka umístěna do 38°C, aby se odpařil všechny etanol. Z fotografického papíru byla vyrobena vanička a do ní byl nalit rozpuštěný vosk, do kterého byl přelit i vosk ze zkumavky spolu s listovými proužky, tak aby nedošlo ke kontaktu listů se vzduchem a tím k tvorbě vzduchových bublinek na povrchu listu. Tyto listové proužky byly pinzetou urovnané na dně vaničky, tak aby se dal okolní vosk další den pohodlně oříznout na bloček. Vanička s voskem a listovými segmenty byla poté umístěna do 4°C, přes noc, tak aby vosk ztuhl. Další den byl tuhý vosk i s listovými proužky vyklopen z vaničky a horkým skalpelem nařezán na bločky o velikosti přibližně 1 x 1 cm. Tyto voskové bločky byly umístěny na dřevěný bloček tak, že na dřevěný bloček byl nalit tekutý Steedmanův vosk a do něj byl položen voskový bloček tak, aby mohl být následně nařezán. Dřevěný bloček byl poté umístěn do 4°C, alespoň na 1 hodinu. Listové objekty byly poté ve vosku nařezány na mikrotomu Leica RM2155 na řezy o tloušťce 12 - 15 μm .

Pásy vosku s nařezaným objektem byly přeneseny na čisté podložní sklíčko potřené glycerol-bílkem (glycerol:bílek, 1:1) s kapkou vody. Poté byla sklíčka s řezy ponechána do dalšího dne při pokojové teplotě, aby uschla. Sklíčka s objekty byla následně umístěna do skleněných nádob a objekty byly poté zavodněny v zavodňovací řadě (Tabulka 18). Poté byly objekty promyty 30 minut v ASB nebo MTSB. Dále byly ponořeny do metanolu po dobu 10 minut při teplotě -20°C. Následně byla sklíčka uložena do vlhké komůrky tvořené Petriho miskou s vlhkým filtračním papírem a parafilmem. V komůrce bylo na každé sklíčko pipetováno 200 μ l ASB nebo MTSB a sklíčka tak byla ponechána 30 minut. Poté byl pufr odpipetován a na sklíčka bylo na 30 minut nepipetováno 200 μ l 1% PBSA (Albumin Bovine Fraction v PBS). Po odsátí PBSA byla na sklíčka aplikována primární protilátka (Tabulka 15) v 1% PBSA, její působení trvalo 1,5 hodiny, při pokojové teplotě. Primární protilátka byla následně odpipetována a sklíčka s řezy byla promyta ASB nebo MTSB a poté byla aplikována sekundární protilátka (Tabulka 15) v 1% PBSA po dobu 1,5 hodiny, při pokojové teplotě, ve tmě. Poté byly řezy dvakrát 10 minut promyty v PBS. Po odpipetování PBS a vysušení sklíček bylo na každé sklo napipetováno 10 μ l 50% glycerolu v destilované vodě a podložní sklo bylo překryto krycím sklíčkem.

ASB		MTSB		PBS (1 l)	
PIPES	100 mM	PIPES	50 mM	NaCl	8 g
MgCl ₂	4 mM	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 mM	KCl	0,2 g
EGTA	10 mM	EGTA	5 mM	KH ₂ PO ₄	0,16 g
pH (KOH)	6,9	pH (KOH)	6,9	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,31 g

Tabulka 14 Složení pufrů použitých při imunolokalizaci cytoskeletu v listech jabloně. ASB (actin stabilizing buffer), pufr stabilizující aktin; MTSB (microtubule stabilizing buffer), pufr stabilizující mikrotubuly; PBS (Phosphate Buffered Saline), fosfátový pufr; PIPES, piperazine-N,N'-bis(ethanesulfonová kyselina); EGTA, kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová.

primární protilátka	mono/poly	zvíře	ředění	výrobce
Anti-aktin	monoklonální	myš	1:400	ICN
Anti- α -tubulin (DM1 α)	monoklonální	myš	1:1000	Sigma
sekundární protilátka	marker		ředění	výrobce
Anti-mouse	Alexa 488		1:1000	Invitrogen

Tabulka 15 Primární a sekundární protilátky použité při imunolokalizaci cytoskeletu v listech jabloně.

ASB/MTSB	1x
formaldehyd	3,7%
Triton X-100	0,5%; 1%; 2%; 3%; 5%

Tabulka 16 Fixační roztok.

koncentrace etanolu v PBS (%)	doba (min)	teplota
30	30	RT
50	30	RT
70	30	RT
90	30	38°C
96	3 x 30	38°C

Tabulka 17 Dehydratační řada. RT (room temperature), pokojová teplota.

koncentrace etanolu v PBS (%)	doba (min)
96	3 x 10
90	10
50	10
PBS	10

Tabulka 18 Zavodňovací řada použitá při imunolokalizaci cytoskeletu.

3.8.2. Fixace a mrazové drcení

Pro imunolokalizaci proteinů aktinového a mikrotubulárního cytoskeletu byly použity první rozvinuté listy *ex vitro* rostlin nebo starší listy (pátý a starší). Tyto listy byly nařezány na proužky o velikosti přibližně 0,2 x 1 cm v závislosti na velikosti

listu. Tyto segmenty byly přeneseny do košíčku se dnem z nylonové tkaniny a poté umístěny do jamky s fixačním roztokem 1 (Tabulka 19) na dobu 20 minut. Poté byly segmenty fixovány ve fixačním roztoku 2 (Tabulka 20) po dobu 120 minut, při podtlaku 550 HPa a při pokojové teplotě a dále byly promyty dvakrát 10 minut v promývacím roztoku 1 (Tabulka 21). Následně byly segmenty i s košíčkem ponořeny do tekutého dusíku a přímo v košíčku rozlámány na kousky vymraženou skleněnou trubičkou. Rozlámané listové segmenty byly na dobu 60 minut ponořeny do detergenčního roztoku (Tabulka 22) a následně na 20 minut do enzymačního roztoku (Tabulka 23). Dále byly třikrát 10 minut promyty v promývacím roztoku 2 (Tabulka 24). Po 30 minutách v blokovacím roztoku (Tabulka 25) byly inkubovány v primární protilátce (Tabulka 15) 2 hodiny při pokojové teplotě nebo přes noc v lednici. Po inkubaci byly fragmenty promyty třikrát 10 minut v promývacím roztoku 2 a následně inkubovány v sekundární protilátce (Tabulka 15) 2 hodiny při pokojové teplotě a ve tmě. Po inkubaci byly třikrát 10 minut promyty v detergenčním roztoku. Poté byly fragmenty přeneseny do plastové mikroskopické kumavky s 50% glycerolem, ve které byly skladovány maximálně po dobu 2 týdnů. Imunolokalizace cytoskeletu byla pozorována na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880 při excitaci o vlnové délce 488 nm a emisi 562 nm.

ASB/MTSB	1x
MBS	400 μ M
Triton X-100	1%

Tabulka 19 Fixační roztok 1.

ASB/MTSB	1x
MBS	400 μ M
Triton X-100	1%
formaldehyd	2%
glutaraldehyd	0,035%
leupeptin	10 mM
pepstatin	5 mM
PMSF	120 mM

Tabulka 20 Fixační roztok 2.

ASB/MTSB	1x
Triton X-100	1%

Tabulka 21 Promývací roztok 1.

PBS	1x
Triton X-100	2%

Tabulka 22 Detergenční roztok.

ASB/MTSB	1x
pektolyasa Y-23	0,1%
Triton X-100	1%

Tabulka 23 Enzymační roztok.

PBS	1x
glycin	50 mM
Triton X-100	2%

Tabulka 24 Promývací roztok 2.

PBS	1x
glycin	50 mM
Triton X-100	1%
BSA	1%

Tabulka 25 Blokovací roztok.

3.9. Konfokální mikroskopie

Pro test viability buněk na ručních řezech listem jabloně byl použit konfokální mikroskop Leica TCS SP2 (Laboratoř konfokální mikroskopie PřF UK). Použita byla excitace vlnovými délkami 488 nm a 514 nm. Byl použit objektiv 63x PlanApo, NA 1,2 s vodní imerzí.

Výsledky ostatních experimentů vyžadujících konfokální mikroskopii byly pozorovány na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880 (Laboratoř konfokální mikroskopie PřF UK). Použita byla excitace vlnovou délkou 488 nm, byl použit objektiv 40x C-Apochromat, NA 1,2 s vodní imerzí.

3.10. Detekce povrchových struktur listu jabloně

3.10.1. Vitální značení kutikuly a složek buněčné stěny

Pro vizualizaci kutikuly ve světelném mikroskopu byla použita barva Sudanová červeň VIIB (Sudan Red VIIB, SRVIIB). SRVIIB je vysoce lipofilní barva, která velmi specificky značí kutikulu. SRVIIB byla připravena rozpuštěním 0,1% sudanu v isopropylalkoholu a poté byla zředěna destilovanou vodou v poměru 3:2 (Nadiminti *et al.*, 2015). Touto metodou byl porovnáván vzhled a tloušťka kutikuly listů rostlin rostoucích v *in vitro* a v *ex vitro* podmínkách. Z listů byly pomocí břitvy připraveny ruční řezy na ručním mikrotomu o tloušťce 15-20 μm , které byly 4 hodiny barveny v SRVIIB a poté 10 minut promyty v 1% SDS. Řezy byly zamontovány do 70% etanolu a pozorovány ve světleném mikroskopu (Olympus Provis AX 70).

Dále byla pro značení kutikuly použita fluorescenční lipofilní barva Auramin O, která má vysokou afinitu ke kyselým a nenasyceným voskům,

prekurzorům kutinu a ostatním lipidickým složkám cytoplazmy. Barvicí roztok byl připraven rozpuštěním Auraminu O v 0,05M trisHCl (pH 7,2) tak, aby bylo dosaženo 0,01% roztoku (Buda *et al.*, 2009). Řezy listem o tloušťce 15-20 μm byly připraveny na ručním mikrotomu a barveny v barvě Auramin O po dobu 2,5 hodiny, poté byly promyty vodou a pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu (Olympus Provis AX 70) při excitaci vlnovou délkou 460-490 nm.

Buněčná stěna listů jabloně byla barvena třemi barvami, konkrétně floroglucinolem, toluidinovou modří (toluidine blue, TB) a fluorescenční barvou Calcofluor White (CW). Lignin v rostlinných pletivech byl vizualizován pomocí floroglucinu, který jej značí červenou barvou. Floroglucinol byl připraven rozpuštěním ve 20% HCl. V takto připraveném roztoku byly barveny ruční řezy listu jabloně po dobu 5 minut a poté byly 10 minut proplachovány v destilované vodě. Na podložním skle byly zamontovány do roztoku 50% glycerolu s 10% H_2SO_4 . Řezy byly pozorovány pod světelným mikroskopem (Olympus Provis AX 70). Pro značení kyselých komponent rostlinných pletiv byla použita TB. Byl připraven 0,05% roztok TB v destilované vodě, ve kterém byly barveny ruční řezy listem po dobu 3 minut, poté byly 5 minut propláchnuty v destilované vodě a jako vodní preparáty pozorovány pod světelným mikroskopem. Celulóza v buněčné stěně byla značena fluorescenční barvou CW (zásobní roztok: 1 mg/ml destilované vody, barvicí roztok 10 μl zásobního roztoku/1 ml vody). Ruční řezy byly barveny v roztoku CW po dobu 10 minut a poté byly propláchnuty 10 minut v destilované vodě. Preparáty byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Provis v oblasti ultrafialového světla při excitaci vlnovou délkou 330-385 nm.

Kalóza byla značena fluorescenční barvou anilinovou modří (Aniline Blue, AB). Ruční řezy listy jabloně byly namočeny do barvicího roztoku AB (0,01% AB v 150mM KH_2PO_4 , pH=9,5) na dobu 30 minut (Zhou *et al.*, 2012), poté byly promyty destilovanou vodou a pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Provis pod ultrafialovým zářením při excitaci vlnovou délkou 330-385 nm.

3.10.2. Environmentální skenovací elektronová mikroskopie

Pro pozorování povrchových struktur listu jabloně byla použita metoda environmentální skenovací elektronové mikroskopie (ESEM). Tato metoda umožňuje pozorování povrchových struktur listu *in vivo* bez pokovení materiálu nebo jeho zmrazení. V tomto experimentu byly porovnávány nejmladší listy (L1, první list od shora) a starší listy (L7, sedmý list od shora) a dále listy rostlin rostoucích v *ex vitro* podmínkách a rostlin rostoucích v *in vitro* podmínkách. Pozorování bylo prováděno Laboratoří environmentální elektronové mikroskopie (Ústav přístrojové techniky AV ČR, Brno, dr. V. Neděla).

3.11. Testování viability buněk na ručních řezech listem

Viabilita buněk na ručních řezech listem jabloně byla testována pomocí fluorescenční barvy jodid propidia (PI), která se váže na DNA a značí ji červeně. Cytoplazmatická membrána živých buněk je pro PI neprostupná, barva se dostává pouze do buněk s narušenou membránou, proto značí pouze mrtvé buňky. V tomto testu byl také využit diacetát fluoresceinu (FDA), který je substrátem pro buněčné esterázy. FDA prochází přes membránu buněk, kde je štěpen buněčnými esterázami a tím je aktivována jeho fluorescence. Aktivovaný FDA značí zeleně cytoplazmu živých buněk.

K tomuto experimentu byly použity ruční řezy mladými listy rostlin rostoucích v *ex vitro* podmínkách. Ruční řezy byly prováděny na ručním mikrotomu pomocí břitvy a měli tloušťku 15 – 20 μm . Řez byly poté vloženy do 0,27% zásobního roztoku FDA (zásobní roztok: 2mg FDA v 1 ml acetonu, skladováno v -20°C) a do 10% zásobního roztoku PI (Molecular Probes, zásobní roztok: 1 mg PI na 1 ml PBS) a byly pozorovány na konfokálním mikroskopu Leica.

3.12. Zkouška funkčnosti protilátek na rostlinném materiálu

3.12.1. Izolace proteinů z rostlinného materiálu

Rostlinný materiál (*in vitro* explantáty odrůdy ‚Idared‘) byl zvážen a poté přenesen do třech misek předchlazených v tekutém dusíku a poté zmražen tekutým dusíkem. Dále byl rozdrčen předchlazeným tloučkem na jemný prášek a ten byl přenesen do předchlazené zkumavky s extrakčním pufrům (Tabulka 26) a ponechán na ledu do roztátí. Objem extrakčního pufru (ml) byl s hmotností rostlinného materiálu (g) v poměru 1:1. Extrakt byl následně centrifugován 15 minut při teplotě 4°C na 3000g, čímž byly odstraněny zbytky buněčných stěn. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a centrifugován 1 hodinu, při teplotě 4°C na 18 000 g.

MES	50 mM
EGTA	10mM
MgCl ₂	10 mM
glycerol	2 M
GTP	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
aprotinin	1 μM
leupeptin	1 μM
pepstatin	1 μM
pH	6,9

Tabulka 26 Složení extrakčního pufru pro izolaci proteinů z rostlinného materiálu. MES, 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina; EGTA, kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová ; GTP, guanosin trifosfát ; DTT, dithiotreitol ; PMSF, fenylmethylsulfonyl fluorid.

3.12.2. TCA precipitace proteinů

Vzorek izolovaných proteinů byl smíchán s roztokem A (1,5% desoxycholát sodný a 1% azid sodný), tak aby bylo dosaženo 1% koncentrace roztoku A, zvortexován a ponechán 15 minut stát při pokojové teplotě. Poté byl přidán roztok B (72% kyselina

trichloroctová) tak, aby bylo dosaženo 10% koncentrace roztoku B a vzorek byl zvortexován. Vzorek byl centrifugován po dobu 30 minut, při pokojové teplotě na 15 000g. Supernatant byl odstraněn a k peletu byl přidán 1 ml vychlazeného acetonu (-20°C) a byl zvortexován. Extrakt byl dále centrifugován po dobu 30 minut, při pokojové teplotě, na 15 000 g. Supernatant byl opatrně odstraněn a pelet byl ponechán na stole až do vysušení.

3.12.3. Elektroforéza

Izolované proteiny byly ihned smíchány s 2D pufrem (Tabulka 27) v poměru na 1 ml acetonu použitého v předchozím kroku při precipitaci proteinů přidat 100 µl pufru. Směs pufru a izolovaných proteinů byla dále zvortexována, po dobu 1 minuty zahřáta na teplotu 95°C a poté přenesena do jamek gelu. Elektroforéza byla prováděna s použitím 10% polyakrylamidového gelu o velikosti 10,5x11 cm s 2cm vrstvou 4% zaostřovacího gelu (Tabulka 28). Jako velikostní marker byl použit Page Ruler Prestained Ladder od firmy Fermentas v objemu 3 µl na jamku.

Skla pro přípravu elektroforézy byla vyčištěna 70% etanolem, po sestavení naplněna dělicím gelem, který byl zalit destilovanou vodou a 30 minut byl ponechán na stole, kde polymeroval. Poté byla voda odstraněna a na dělicí gel byly nality 2 cm zaostřovacího gelu, do kterého byl umístěn hřebínek tak, aby se vytvořili jamky pro aplikaci vzorků. Polymerace zaostřovacího gelu trvala 30 minut. Skla s gelem byla svorkami připevněna k elektroforetické aparatuře a do vrchní i spodní komory byl nalit elektroforetický pufr (Tabulka 29). Do jamek bylo nepipetováno 30 µl směsi izolovaných proteinů a 2D pufru. Dělení proteinů trvalo přibližně 2 hodiny pod napětím 100 V a proudem 25 mA.

Tris HCl	50 mM
SDS	2 %
močovina	36 %
glycerol	30 %
merkaptoetanol	5 %
bromfenolová modř	0,5 %
pH	6,8

Tabulka 27 Složení vysoce denaturujícího 2D pufru.

složka	10% dělicí gel	4% zaostřovací gel
akrylamid	10 %	4 %
bisakrylamid	0,27 %	0,11 %
Tris/Cl	400 mM	125 mM
SDS	0,1 %	0,1 %
AP	0,08 %	0,05 %
TEMED	0,033 %	0,05 %
pH	8,8	6,8

Tabulka 28 Složení dělicího a zaostřovacího gelu pro elektroforézu. SDS, dodecylsulfát sodný; AP, persulfát amonný; TEMED, tetrametyletylendiamin.

Tris/Cl	25 mM
glycin	0,192 M
SDS	0,1 %

Tabulka 29 Složení elektroforetického pufru. SDS, dodecylsulfát sodný.

3.12.4. Western Blot

Po ukončení elektroforézy byl odříznut zaostřovací gel a dělicí gel s proteiny byl přenesen do blotovadla (Biometra B64) na PVDF membránu aktivovanou ponořením do metanolu. Membrána s gelem byly vloženy mezi 3 vrstvy filtračních papírů (Whatmann, 3 mm) namočených do transferového pufru (Tabulka 30). Skleněným válečkem byly odstraněny bubliny a po přiklopení víka blotovadla proběhl transfer proteinů na membránu. Přenos trval 1 hodinu při napětí 6 V a proudu 300 mA.

Membrána s proteiny byla ponořena do TBS pufru s 4% sušeným mlékem pro zablokování nespecifických epitopů. Blokování probíhalo při teplotě 8 °C přes noc. Po blokování byla membrána přenesena do roztoku primární protilátky (Tabulka 32) v TBS pufru (Tabulka 31), kde byla inkubována po dobu 1 hodiny, při pokojové teplotě za stálého míchání na třepačce. Poté byla membrána třikrát 10 minut promyta v TBS pufru a přenesena do směsi sekundární protilátky v TBS pufru (Tabulka 32), ve které byla inkubována 45 minut, při pokojové teplotě za stálého míchání. Následně byla membrána dvakrát 10 minut promyta v TBS pufru a poté vizualizovaná pomocí detekčního systému ECL.

Tris/Cl	100 mM
glycin	180 mM
metanol	20 %
pH	8,3

Tabulka 30 Složení transferového pufru pro Western Blot.

Tris/Cl	20 mM
NaCl	150 mM
triton X-100	1 %
pH	7,4

Tabulka 31 Složení TBS pufru pro Western Blot.

3.12.5. ECL – enhanced chemiluminiscence

Proteiny na membráně byly zobrazeny pomocí chemiluminiscenční metody (ECL). Pro vizualizaci sekundární protilátky označené peroxidázou byl použit kit ECL Western Blotting Detection Reagens and Analysis System od firmy Pierce. Membrána byla vyndána z TBS pufru a přenesena do vyvolávacího roztoku na dobu 1 minuty, poté byla vložena mezi dvě folie a spolu s rentgenovým filmem umístěna do expoziční kazety. Expozice trvala 5-10 minut, poté byl film vyvolán přenesením do vývojky pro RTG materiál na dobu 2 minut, opláchnut vodou a poté ustálen

v ustalovači po dobu 10 minut. Poloha proužků byla srovnána s polohou a velikostí proužků markeru Page Ruler.

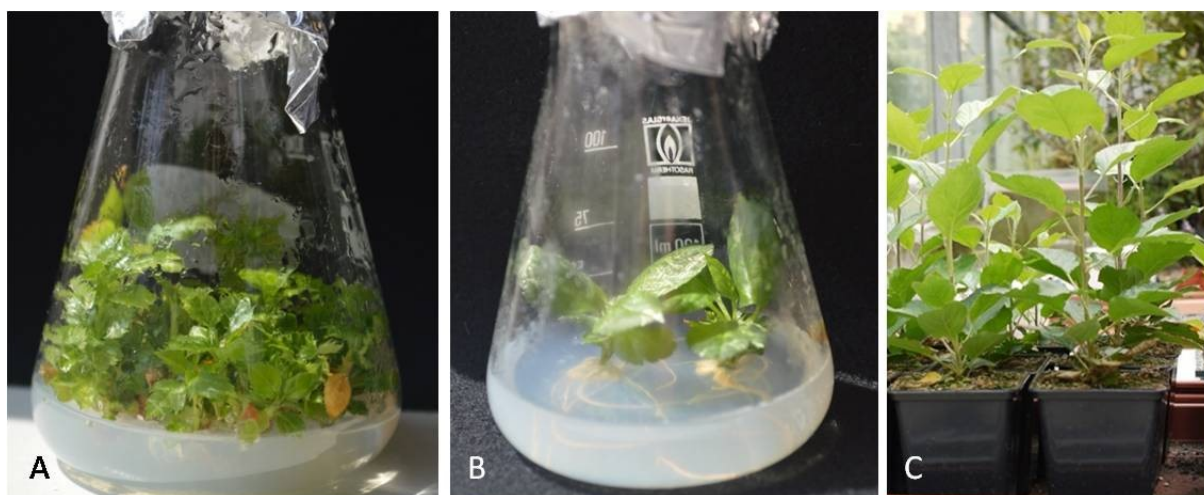
primární protilátka	mono/poly	zvíře	ředění	výrobce
Anti-aktin	monoklonální	myš	1:400	ICN
Anti- α -tubulin (DM1 α)	monoklonální	myš	1:1000	Sigma
TU-30 (γ -tubulin)	monoklonální	myš	bez ředění	Dráber
sekundární protilátka	ředění	výrobce		
Anti-mouse IgM	1:1000	Stress Gene		

Tabulka 32 Primární a sekundární protilátky použité při Western Blot.

4. Výsledky

4.1. Kořenění rostlinných explantátů a přenos do *ex vitro* podmínek

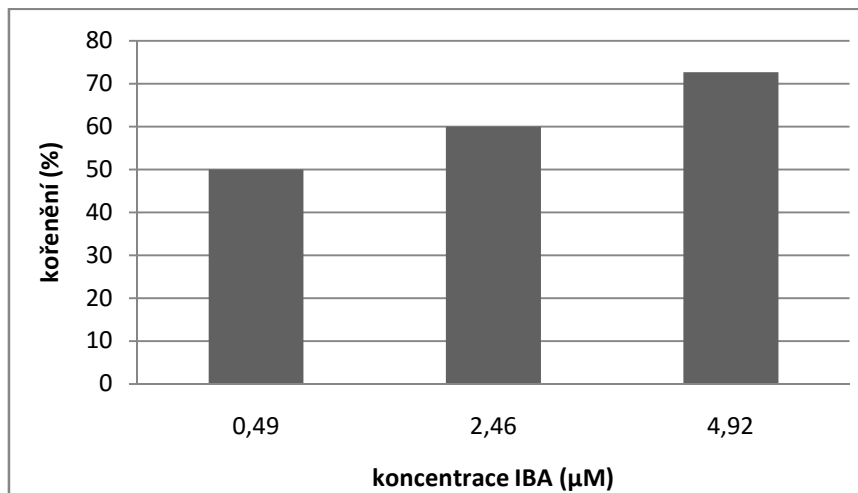
Cílem této části výzkumu bylo zavedení rostlinného materiálu do *ex vitro* podmínek, které jsou bližší přirozenému stavu rostlin v sadu. Vlivem odlišných podmínek růstu se lišil habitus rostlin z *in vitro* a *ex vitro* podmínek. Rostliny rostoucí v *in vitro* podmínkách mají velký počet malých listů a jsou bez kořenů (Obrázek 11A). Rostliny rostoucí na mediu indukujícím kořenění mají naopak méně větších listů a mají kořeny (Obrázek 11B). Tento vzhled si rostliny ponechávají i po přenesení do *ex vitro* podmínek (Obrázek 11C).



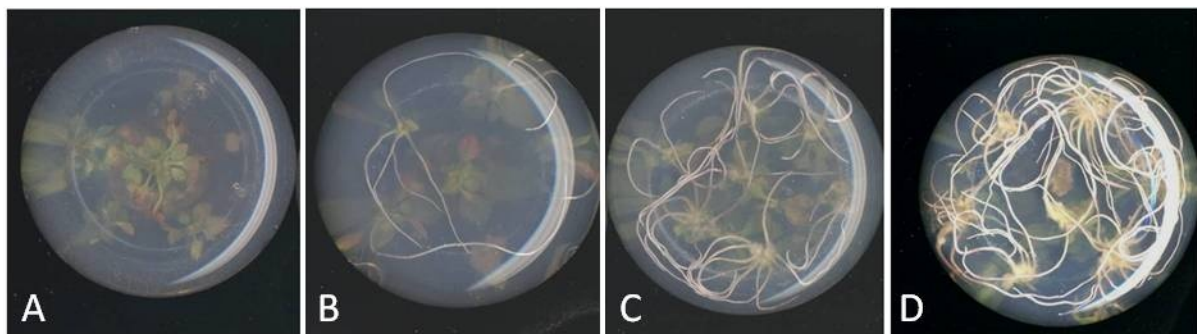
Obrázek 11 Habitus rostlin jabloně (citlivý kultivar ‚Idared‘) rostoucích v různých podmínkách. A, Rostliny v *in vitro* podmínkách s velkým počtem malých listů a bez kořenů. B, Rostliny na mediu indukujícím kořenění s menším počtem velkých listů a s kořeny. C, Rostliny přenesené do *ex vitro* podmínek.

Růst kořenů kultivarů ‚Idared‘ a ‚Angold‘ v *in vitro* podmínkách byl indukován přidáním tří koncentrací auxinu (kyselina indol-3-máselná) do kultivačního media. Jako nejvhodnější a nejúčinnější se pro indukci kořenění ukázala nejvyšší koncentrace auxinu. Nejnižší koncentrace auxinu ($0,49 \mu\text{M}$) indukovala kořenění u 50 % explantátů, střední koncentrace ($2,46 \mu\text{M}$) indukovala kořenění u 60 % explantátů a nejvyšší koncentrace auxinu ($4,92 \mu\text{M}$) indukovala kořenění explantátů v 73 % (Obrázek 12, Obrázek 13). Schopnost media obohaceného o auxin indukovat kořenění byla sledována na třech typech explantátů, kterými byly

vrcholová část prýtu, bazální část prýtu a kalus. Z těchto částí explantátu se jako nejvhodnější ukázaly vrcholová a bazální část prýtu, které kořenily v 71 % případů, zatímco kalus byl zcela nevhodný, protože nezakořenil v žádném případě. Pro kořenění kultivarů ‚Idared‘ a ‚Angold‘ byla dále používána jen nejvyšší koncentrace auxinu a kořenění bylo indukováno u vrcholových částí prýtu.



Obrázek 12 Graf ukazující vzrůstající procento zakořeněných explantátů kultivarů ‚Idared‘ spolu s rostoucí koncentrací auxinu. IBA, kyselina indolyl-3-máselná.



Obrázek 13 Kořeny rostlinných explantátů indukované přidáním tří koncentrací kyseliny indol-3-máselné (IBA) do kultivačního media, pozorováno čtyři týdny po začátku kultivace. A, V kontrole bez přidaného auxinu nezakořenil žádný z explantátů. B, Při 0,49µM koncentraci auxinu v kultivačním mediu došlo ke kořenění nejnižšího procenta explantátů. C, V mediu s 2,46µM koncentrací auxinu koření více jak polovina explantátů. D, Po přidání nejvyšší koncentrace auxinu do kultivačního media (4,92µM) koření nejvíce explantátů.

Metoda přenosu zakořeněných explantátů do *ex vitro* podmínek byla zavedena úspěšně a vykazuje téměř 100% úspěšnost.

V této práci byly veškeré experimenty prováděny na citlivém kultivaru ‚Idared‘, který byl zatím jako jediný úspěšně propagován a převeden do *ex vitro* podmínek. Kultivar ‚Angold‘ se podařilo úspěšně propagovat a první rostliny byly již přeneseny do *ex vitro* podmínek. Po získání dostatečného pokusného materiálu budou experimenty provedeny i na tomto tolerantním kultivaru.

4.2. Rychlost růstu rostlin

Růst rostlin a přibývání listů na prýtu bylo pozorováno z důvodu snahy o porovnání vlivu rychlosti růstu rostliny na depozici kutikulárních lamel na adaxiální straně listu. Znalost rychlosti formování nových listů a jejich maturace je také nutná proto, že pouze nejmladší listy jsou citlivé k infekci strupovitostí.

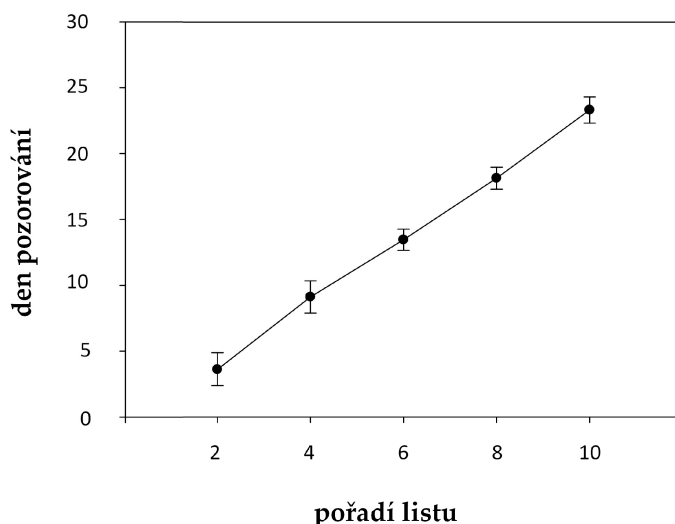
	D1		D3		D4		D7		D9		D11		D14		D16	
	1/3	1/3	1/3	1/3	7/3	1/3	7/3	1/3	7/3	1/3	7/3	14/3	1/3	7/3	14/3	
R1	1.	2.	3.	4.	1.	5.	2.	6.	3.	6.	3.	1.	7.	4.	2.	
R2	1.	2.	2.	2.	1.	3.	2.	4.	3.	6.	5.	1.	7.	6.	2.	
R3	1.	2.	2.	3.	1.	4.	2.	4.	2.	6.	4.	1.	7.	5.	2.	
R4	1.	1.	1.	2.	1.	3.	2.	3.	2.	4.	3.	1.	6.	5.	3.	
R5	1.	3.	3.	4.	1.	4.	1.	4.	1.	5.	2.	1.	6.	3.	2.	
R6	1.	1.	1.	1.	1.	1.	-	3.	2.	5.	4.	1.	6.	5.	2.	

D18			D21				D23				D25				D29			
1/3	7/3	14/3	1/3	7/3	14/3	21/3	1/3	7/3	14/3	21/3	1/3	7/3	14/3	21/3	1/3	7/3	14/3	21/3
8.	5.	3.	9.	6.	4.	1.	10.	7.	5.	2.	10.	7.	5.	2.	11.	8.	6.	3.
8.	7.	3.	9.	8.	4.	1.	10.	9.	5.	2.	11.	10.	6.	3.	12.	11.	7.	4.
8.	6.	3.	9.	7.	4.	1.	10.	8.	5.	2.	11.	9.	6.	3.	12.	10.	7.	4.
7.	6.	4.	7.	6.	4.	1.	8.	7.	5.	2.	9.	8.	6.	3.	10.	9.	7.	4.
7.	4.	3.	9.	6.	5.	1.	9.	6.	5.	1.	10.	7.	6.	2.	11.	8.	7.	3.
8.	7.	4.	9.	8.	5.	1.	10.	9.	6.	2.	10.	9.	6.	2.	12.	11.	8.	4.

Tabulka 33 Tabulka růstu rostlin a přibývání listů, zapisovaná po dobu 4 týdnů. R, číslo rostliny (R1 znamená rostlina č. 1); D, den pozorování (D1 znamená první den pozorování); 1/3, první list shora prýtu označený 1. den pozorování; 7/3, první list shora prýtu označený 7. den pozorování; 14/3, první list shora prýtu označený dne 14. den pozorování; 21/3, první list shora označený 21. den pozorování; 1., 2., 3.,..., pořadí listu na prýtu, počítáno shora.

Data z pozorování provedeného na jaře ukazují, že přibližně každé 2 až 3 dny přiroste na vrcholu prýtu 1 nový list (Tabulka 33). Dále bylo zjištěno, že přirůstání listů je lineární a u jednotlivých rostlin se rychlost přirůstání liší na začátku pozorování, zatímco ke konci pozorování byly rychlosti přirůstání nových listů vyrovnanější mezi jednotlivými rostlinami (Obrázek 14). Jedná se o data předběžná,

protože bylo provedeno pouze jedno pozorování, další biologické opakování bylo přerušeno po dvou týdnech vlivem sekundární infekce rostlin a to z důvodu, že tato infekce by mohla ovlivnit stav rostlin a tím i jejich růst. Další pozorování také umožní zjistit, zda rychlost růstu zakořeněných rostlin se liší v závislosti na roční době.



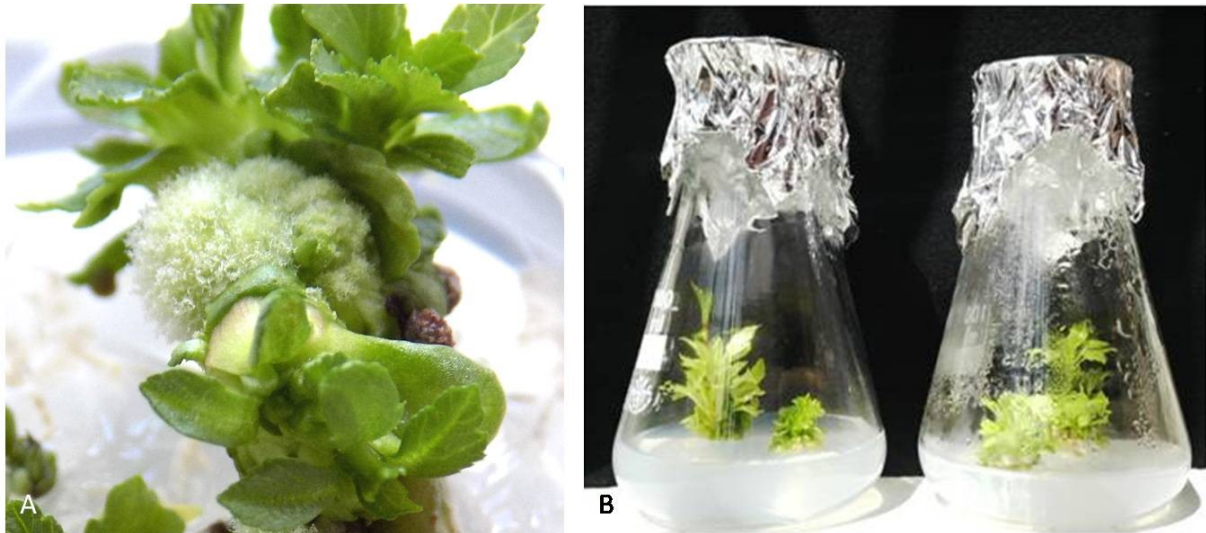
Obrázek 14 Grafické znázornění tabulky rychlosti růstu rostlin (Tabulka 32). Přirůstání listů je lineární po celou dobu pozorování. Osa Y zaznamenává dny pozorování, osa X ukazuje pořadí listu označeného první den pozorování jako první list shora prýtu. Na začátku pozorování se rostliny lišily v přirůstání listů více než na konci pozorování. n=6.

4.3. Transformace rostlin různými metodami

Pro vizualizaci buněčných komponent *in vivo* byla použita metoda exprese fluorescenčních markerů prostřednictvím stabilní transformace materiálu kokultivací s *A. tumefaciens*. Většina transformačních protokolů, dostupných v literatuře, využívá proces transformace a následné regenerace z listových segmentů. Před samotnou transformací byla proto testována schopnost listových segmentů rostlin jabloně regenerovat v nové rostliny. První metoda regenerace (Zhang *et al.*, 2006) byla neúspěšná, z listových segmentů rostliny neregenerovaly. Dále byla vyvinuta jiná metoda sloučením poznatků ze dvou různých publikací (Puite, J. and Schaart, 1996; Maximova *et al.*, 1998), která byla úspěšná. Listové segmenty vytvářely kalus a posléze tyto nediferencované buňky regenerovaly ve vzrostné vrcholy (Obrázek

15A). Takto vzniklé explantáty byly dále úspěšně propagovány v *in vitro* podmínkách (Obrázek 15B).

Bylo proto přistoupeno k samotnému transformačnímu protokolu. Po aplikaci suspenze *Agrobacteria* však nebyla na selekčním mediu pozorována žádná regenerace.



Obrázek 15 Regenerace nových rostlin z listových segmentů. A, Detail regenerace na listovém segmentu 12 týdnů po indukcii regenerace, kdy je patrný kalus a z něj vyrůstající nové rostliny. B, Rostliny regenerované z listových segmentů přenesené na kultivační medium.

Pro vnesení DNA do jader buněk listů jabloně byla dále použita biolistická metoda. Nejdříve byla vyzkoušena na listy rostlin rostoucích v *ex vitro* podmínkách a to střílením do svrchní a spodní strany listu. Tento postup se ukázal neúčinným a při důkladnějším pozorování listů, na něž byla tato metoda použita, bylo zjištěno, že kuličky zlata bombardující list zůstávají na povrchu listu a nedostanou se do buněk. Pravděpodobně je to způsobeno silnou vrstvou kutikuly na povrchu listu. Pro další pokusy byly proto zvoleny listy rostlin rostoucích v *in vitro* podmínkách, které mají pravděpodobně vlivem vyšší vzdušné vlhkosti odlišnou kutikulu. Ani na těchto listech ovšem nebyla pozorována exprese vnášených genů. Biolistická metoda nebyla úspěšná ani v případě použití kořenů a kalusu rostlin jabloně.

Další metodou transformace rostlin byla infiltrace bakteriální suspenze s vnášenými konstrukty do listů rostlin rostoucích v *ex vitro* podmínkách. Při této metodě docházelo k dostatečnému rozšíření infiltrované suspenze do rostlinných pletiv, ovšem nedošlo k transformaci rostlinného materiálu a to ani po koexpresi konstruktů vnášejícího supresor utišování genové exprese.

4.4. Inokulace rostlin

K dosažení infekce rostlin bylo využito několik přístupů.

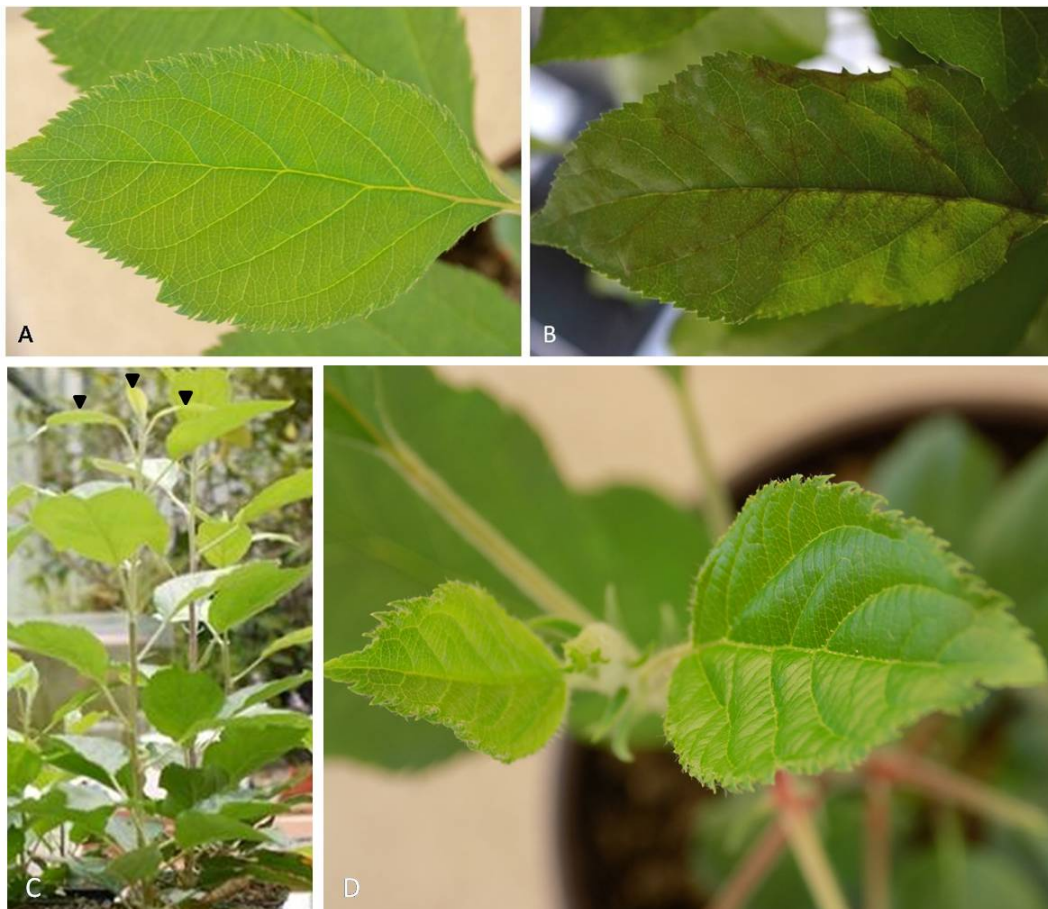
Prvním z přístupů byla infekce rostlin konidii z kultury *V. inaequalis*. Infekce rostlin sterilními konidii byla testována proto, že infekce rostlin v *in vitro* podmínkách vyžaduje využití sterilních konidií. Zdrojem sterilních konidií byly kultury *V. inaequalis* na PCA mediu. K rozvinutí infekce nedošlo pravděpodobně vlivem nízkého počtu konidií a jejich nízké klíčivosti.

Další testovanou možností byla sterilizace konidií nebo jejich přečištění pro použití v *in vitro* kulturách. Byla proto testována sterilizace konidií smytých z napadených listů jabloně pomocí přípravku SAVO. Sterilizace konidií byla úspěšná při použití všech koncentrací přípravku SAVO, sterilizované konidie přenesené na PCA medium nekontaminovaly. Konidie po ošetření přípravkem však ztratily klíčivost i při použití nejnižší koncentrace sterilizačního roztoku.

Infekce *ex vitro* jabloní pomocí inokulace konidii smytými z napadených listů jabloně bez předchozí sterilizace vedla k požadovanému rozvinutí infekce (Obrázek 16B). Bylo pozorováno, že během opakovaných infekcí za použití čerstvých konidií z infikovaných listů jsou infekce více účinné. Je tedy zřejmé, že účinnost infekce je dána především stavem konidií, a že konidie z kultury *V. inaequalis* mají malou účinnost při vyvolání infekce.

Je známo, že na rozvinutí infekce má kromě stavu konidií a vnějších faktorů prostředí také vliv stáří listu a to zda se jedná o rychle expandující list, či nikoli (MacHardy, 1996). V této práci byl tento vliv stáří listu a rychlosti růstu rostliny na účinnost infekce také pozorován. Na pomalu rostoucí rostlině s pomalu

přirůstajícími novými listy nebyla detekována úspěšná infekce, zatímco na rychle rostoucí rostlině s rychle přirůstajícími novými listy byla pozorována masivní infekce. K rozvinutí infekce došlo u listů, které byly v okamžiku inokulace nejmladší, tedy na prvním až třetím listu (Obrázek 16C a D). Rostliny rostoucí pomalu se nedařilo infikovat po inokulaci konidii ani za stejných podmínek, za jakých probíhala inokulace rostlin rychle rostoucích.



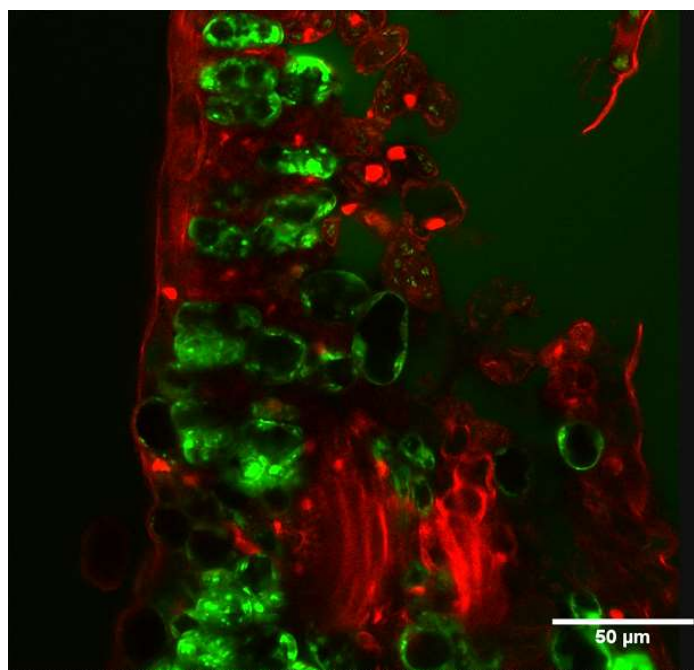
Obrázek 16 Listy jabloně citlivého kultivaru ‚Idared‘ napadené a nenapadené strupovitostí. A, Nenapadený zdravý list. B, List napadený strupovitostí přibližně týden po inokulaci konidii *V. inaequalis* smytými z napadených listů. C, Nejmladší listy jabloně (první až třetí list shora; šipka) citlivé k infekci *V. inaequalis*. D, Vzhled nejmladších listů jabloně, které jsou nejvíce citlivé k napadení strupovitostí.

4.5. Anatomické rozdíly listů rostlin v *in vitro* a *ex vitro* podmínkách

Hlavním cílem výzkumného projektu, v rámci kterého byla vypracována tato diplomová práce, je studium buněčné odpovědi na infekci *V. inaequalis* pro případné stanovení časného markeru infekce. Z tohoto důvodu bylo nutné nejprve zmapovat

vzhled listů jabloně, jeho pletiva a další charakteristiky listu, zvláště buněčné stěny. Tato pozorování byla prováděna na ručních příčných řezech listy rostlin z *in vitro* i *ex vitro* podmínek. Rostliny *in vitro* mají malé listy, na jejichž adaxiální straně byly často detekovány charakteristické výrůstky (Obrázek 18A, Obrázek 19A). Výrůstky nebyly nikdy detekovány na listech rostlin z *ex vitro*.

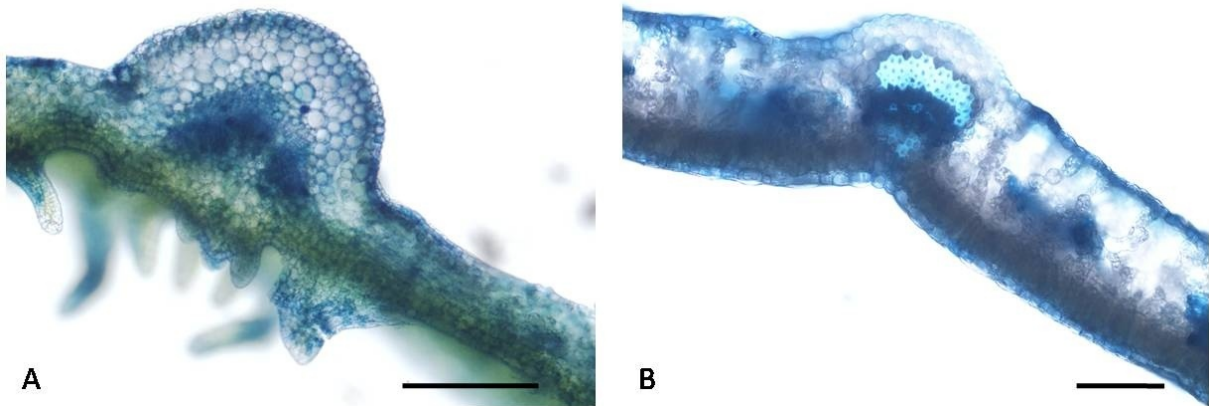
Pro případné použití metody ručních řezů pro pozorování buněčných komponent byla také sledována viabilita buněk listu bezprostředně po provedení ručního řezu pomocí fluorescenčních barev PI a FDA. PI značí červeně jádra mrtvých buněk a FDA zeleně cytoplazmu buněk živých. Bylo pozorováno, že viabilita buněk na příčném řezu je částečně zachována (Obrázek 17), což naznačuje možnost použít metodu ručních řezů i pro vizualizaci buněčných komponent.



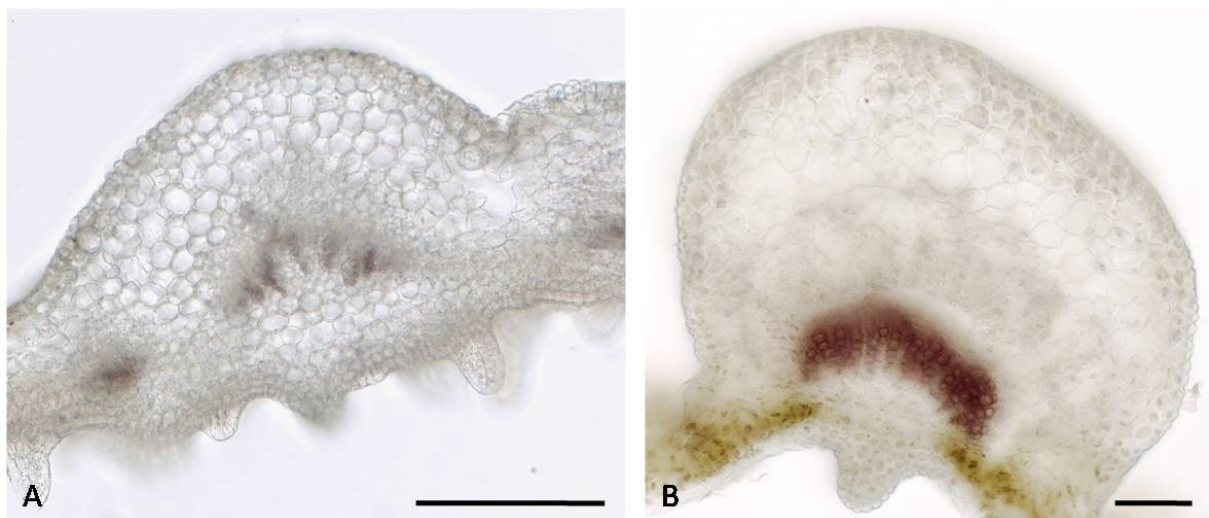
Obrázek 17 Příčný ruční řez listem jabloně pozorovaný na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2, při excitaci vlnovými délkami 488 nm a 514 nm. Viabilita buněk na ručním řezu sledována pomocí fluorescenčních barev jodidu propidia (PI) a diacetátu fluoresceinu (FDA). Cytoplazma živých buněk je značena FDA (zelená) a jádra mrtvých buněk jsou značena PI (červená). Viabilita buněk je dostatečná.

Při pozorování charakteristik listů jabloně byly použity barvy značící různé složky buněčné stěny, tedy TB, floroglucinol a CW. Floroglucinol značí v listech *in vitro* i *ex vitro* rostlin lignin v cévních svazcích střední i postranních žilek. Patrná je

hlavně silnější lignifikace vodivých pletiv střední žilky listů rostlin z *ex vitro* podmínek (Obrázek 19B).



Obrázek 18 Anatomické rozdíly listů rostlin jabloně, rostoucích v podmínkách *in vitro* a *ex vitro*. Rozdíly pozorované na příčných řezech listem v oblasti střední žilky barvené toluidinovou modří. A, List rostoucí v *in vitro* podmínkách vykazuje morfologické odlišnosti na adaxiální straně. B, List rostoucí v *ex vitro* podmínkách. Měřítko 100 μm .



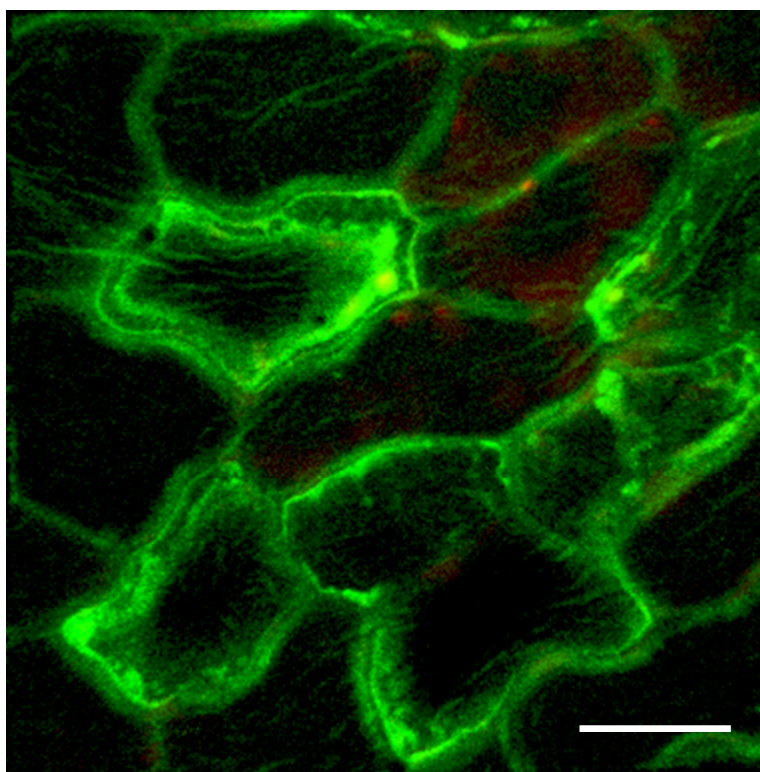
Obrázek 19 Anatomické rozdíly listů rostlin jabloně, rostoucích v podmínkách *in vitro* a *ex vitro*. Rozdíly pozorované na příčných řezech listem v oblasti střední žilky barvené floroglucinolem. A, List rostoucí v *in vitro* podmínkách vykazuje morfologické odlišnosti na adaxiální straně. B, List rostoucí v *ex vitro* podmínkách. Měřítko 100 μm .

4.6. Ontogenetická variabilita povrchových struktur adaxiální strany listů

Cílem tohoto pozorování bylo zmapovat povrchové struktury adaxiální strany listu jabloně v závislosti na ontogenetickém stáří listu a dále porovnat rozdíly těchto

struktur u rostlin v *in vitro* a *ex vitro* podmínkách a jejich možný vliv na ontogenetickou rezistenci jabloně k strupovitosti.

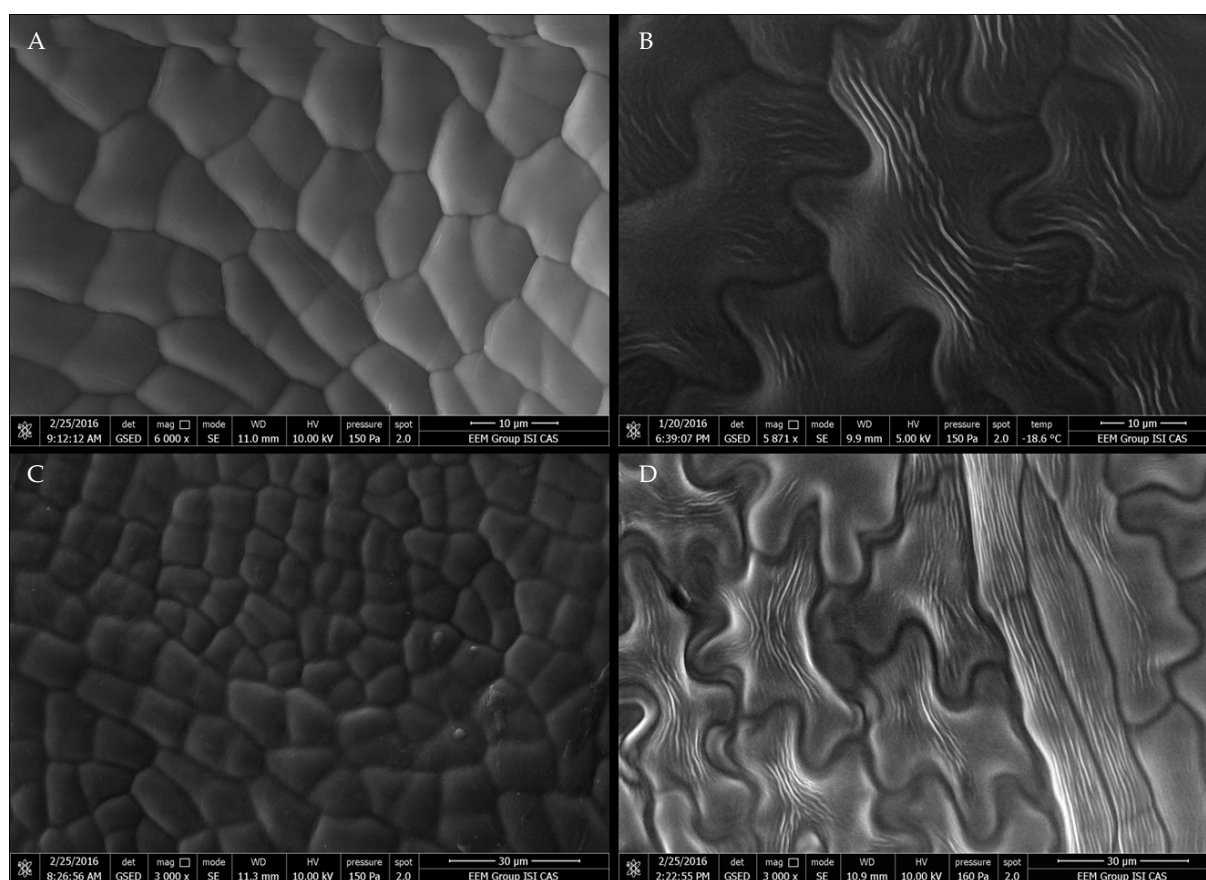
Povrch listu byl nejdříve pozorován v konfokálním mikroskopu, kde byly pomocí přirozené autofluorescence kutikuly sledovány kutikulární lamely (Obrázek 20). Pro bližší pohled a porovnání těchto lamel byl využit environmentální elektronový skenovací mikroskop (ESEM).



Obrázek 20 Autofluorescence kutikuly pokožkových buněk adaxiální strany listu jabloně. Na svrchní straně listu jabloně jsou pozorovatelné kutikulární lamely se silnou autofluorescencí. Snímek je maximální projekcí. Pořízeno na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880, při excitaci vlnovou délkou 488 nm a emisi 532 nm. Měřítka 20 μm .

Povrch pokožkových buněk adaxiální strany listu jabloně byl pozorován pomocí ESEM, kde byly porovnávány kutikulární struktury prvního a sedmého listu shora u rostlin jabloně rostoucích v *in vitro* a v *ex vitro* podmínkách. Bylo zjištěno, že stáří listu má vliv na vzhled povrchových struktur. Pokožkové buňky adaxiální strany listu jabloně se liší v závislosti na ontogenetickém stáří listu a to jak ve tvaru epidermálních buněk, tak ve vzhledu kutikuly. Pokožkové buňky nejmladšího nerozvinutého listu ještě nemají typický laločnatý tvar, starší listy (sedmý list a výše)

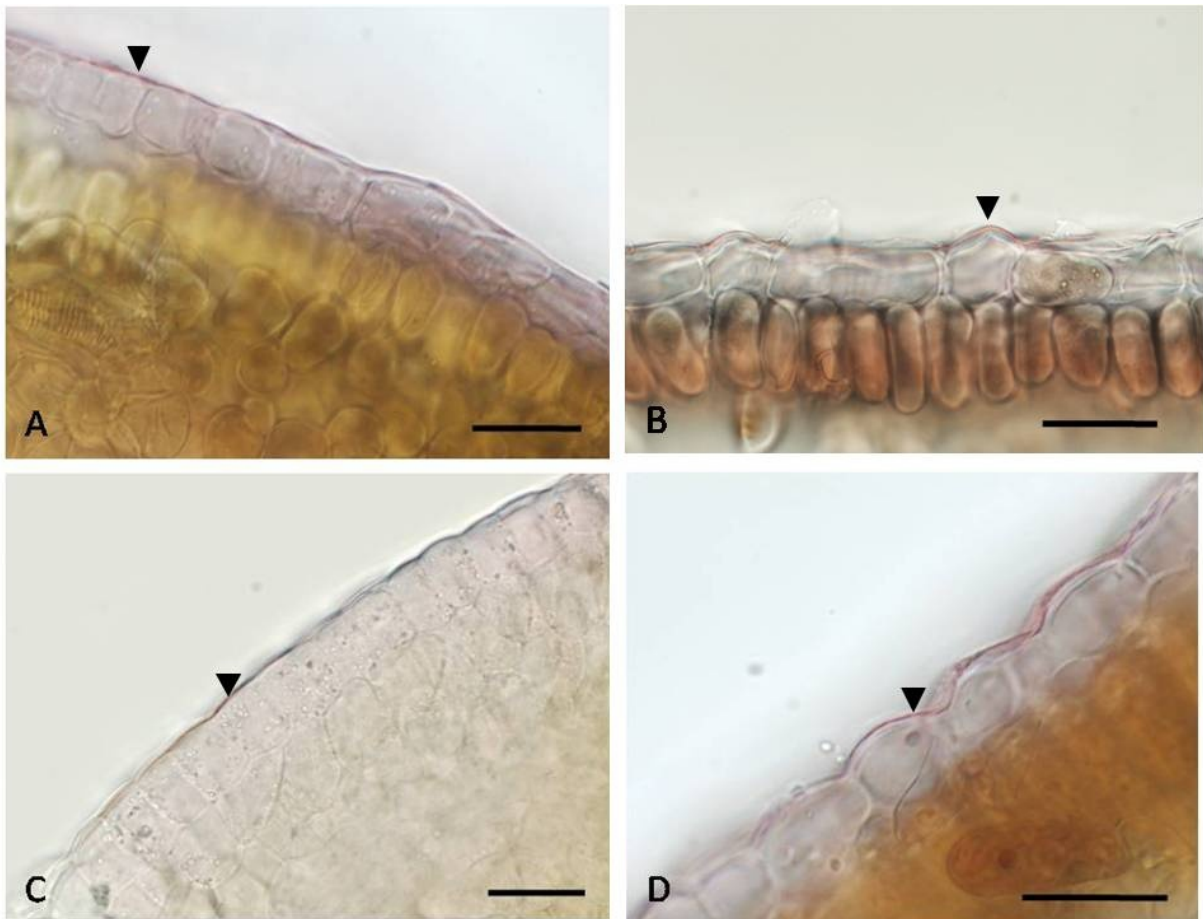
ho již mají. Zatímco povrch pokožkových buněk u nejmladšího listu je hladký (Obrázek 21 A a C), povrch starších listů (sedmý list shora) je zvlněný v kutikulární lamely (Obrázek 21 B a D) a to jak u rostlin rostoucích v *in vitro* podmínkách tak u rostlin rostoucích v *ex vitro* podmínkách. Dále bylo zjištěno, že při rychlosti růstu rostlin, kdy nový list přirůstá přibližně každé dva až tři dny, jsou kutikulární lamely detekovatelné až na pátém listu shora prýtu.



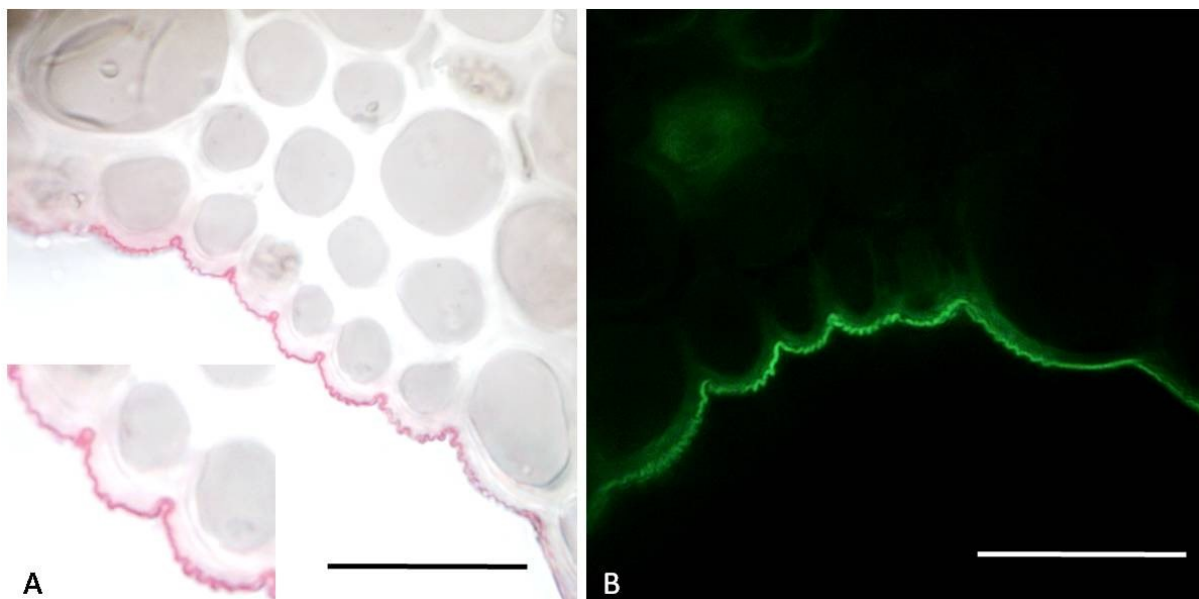
Obrázek 21 Kutikulární struktury pokožkových buněk adaxiální strany listů jabloně, odrůda Idared, pozorované na environmentálním elektronovém skenovacím mikroskopu. A, Nejmladší ještě plně nerozvinutý list *in vitro* jabloně má na povrchu vrstvu kutikuly, která není zvlněna v kutikulární lamely. Pokožkové buňky tohoto listu tohoto stáří nevykazují typický laločnatý tvar jako pokožkové buňky starších listů. B, Sedmý list *in vitro* jabloně s kutikulárními lamely na povrchu laločnatých pokožkových buněk. C, První list *ex vitro* jabloně s hladkou vrstvou kutikuly bez kutikulárních lamel. D, Sedmý list *ex vitro* jabloně s výrazným zvlněním kutikuly v kutikulární lamely.

Pro potvrzení, že zvlněný povrch buněk je tvořen kutikulou, byly připraveny ruční řezy listem, které byly dále barvené lipofilními barvami Auramin O a Sudanová červeň VIIB (SRVIIB). Obě lipofilní barvy značí kutikulu. Vzhled kutikuly

barvené SRVIB byl porovnáván u listů rostoucích v *in vitro* a *ex vitro* podmínkách a dále byly porovnávány rozdíly vzhledu kutikuly u nejmladších listů (první rozvinutý list) a starších listů (sedmý list). U *ex vitro* rostlin bylo patrné, že kutikula byla výrazněji značena u starších listů než u těch nejmladších (Obrázek 22 C a D). U rostlin z *in vitro* podmínek nebyl tento rozdíl tak výrazný (Obrázek 22 A a B). Na příčných řezech listem jabloně byly pozorovány typické kutikulární lamely (Obrázek 23), které jsou nejlépe pozorovatelné v místě střední žilky. Tyto lamely byly detekovány pouze u starších listů *in vitro* i *ex vitro* rostlin a toto pozorování odpovídá výsledkům z ESEM.



Obrázek 22 Kutikula svrchní strany listu jabloně značená lipofilní barvou Sudan Red VIB (růžová, šipka) na příčných řezech listem. A, Kutikula nejmladšího listu (první list) rostliny rostoucí v *in vitro* podmínkách je značena obdobně jako starší list rostliny ze stejných podmínek. B, Kutikula sedmého listu rostliny rostoucí v *in vitro* podmínkách. C, Kutikula nejmladšího listu rostliny rostoucí v *ex vitro* téměř není barvena. D, Kutikula sedmého listu rostliny rostoucí v *ex vitro* podmínkách vykazuje nejvýraznější barvení SR v porovnání s ostatními rostlinami stejného i odlišného stáří a ze stejných i různých podmínek kultivace. Měřítka 25 μm .



Obrázek 23 Kutikula pokožkových buněk svrchní strany listu jabloně, odrůda ‚Idared‘, na ručních řezech v oblasti střední žilky listu. A, Zvlněný charakter kutikuly pokožkových buněk na příčném řezu listem jabloně (barveno Sudan Red VIII). B, Kutikula epidermálních buněk listu zvlněná v kutikulární lamely značená fluorescenční barvou Auramin O. Snímek z fluorescenčního mikroskopu Olympus Provis AX 70, excitace při vlnové délce 460-490 nm. Měřítka 25 µm.

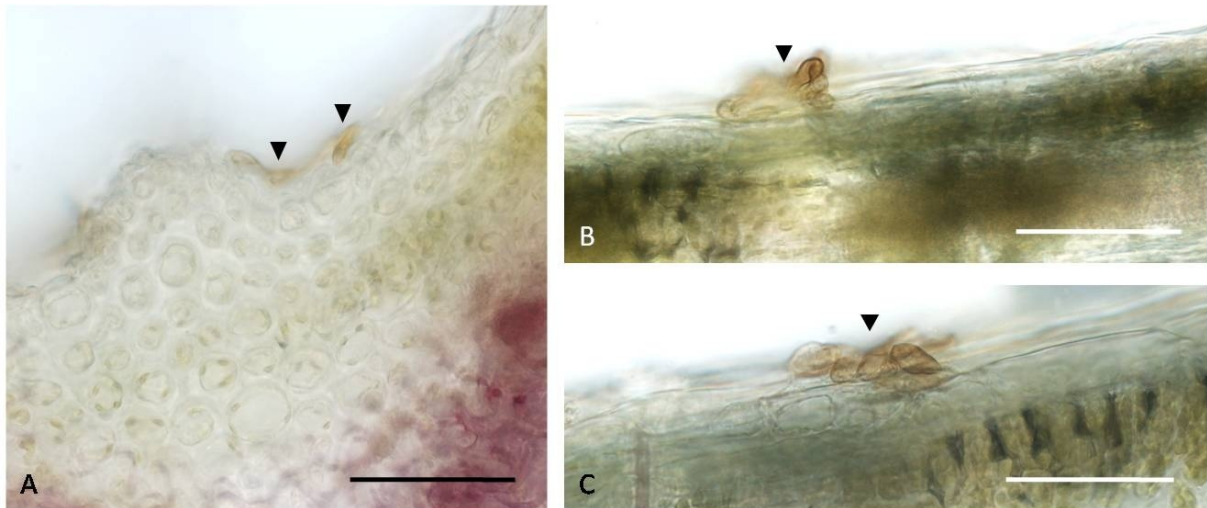
4.7. Změny buněčné stěny v reakci na napadení *V. inaequalis*

Z literatury je známá role syntézy ligninu a kalózy v rostlinách po napadení patogenem (Škalamera *et al.*, 1997; Hardham *et al.*, 2007; Faulkner, 2015). Oba polymery se podílí na tvorbě fyzické bariéry průniku patogena do buněk. Přímou interakci *Malus-Venturia* byla detekována zvýšená exprese genů pro CAD, enzymu podílejícího se na syntéze ligninu po napadení *V. inaequalis* (Holzapfel *et al.*, 2012). Proto byla v této práci sledována depozice obou polymerů v místě infekce.

4.7.1. Depozice ligninu v místě infekce

Z listů rostlin infikovaných konidii byly tři dny po inokulaci udělány ruční řezy, které byly nabarveny floroglucinolem a anilinovou modří. Tři dny po napadení strupovitostí nebyla detekována odlišná depozice ligninu v místě infekce na napadených listech oproti nenapadeným listům. Listy kontrolních rostlin vykazovaly silnou depozici ligninu pouze v xylému cévních svazků (Obrázek 19B), u napadených listů bylo nalezeno stejné umístění a lignin nebyl detekován v místě

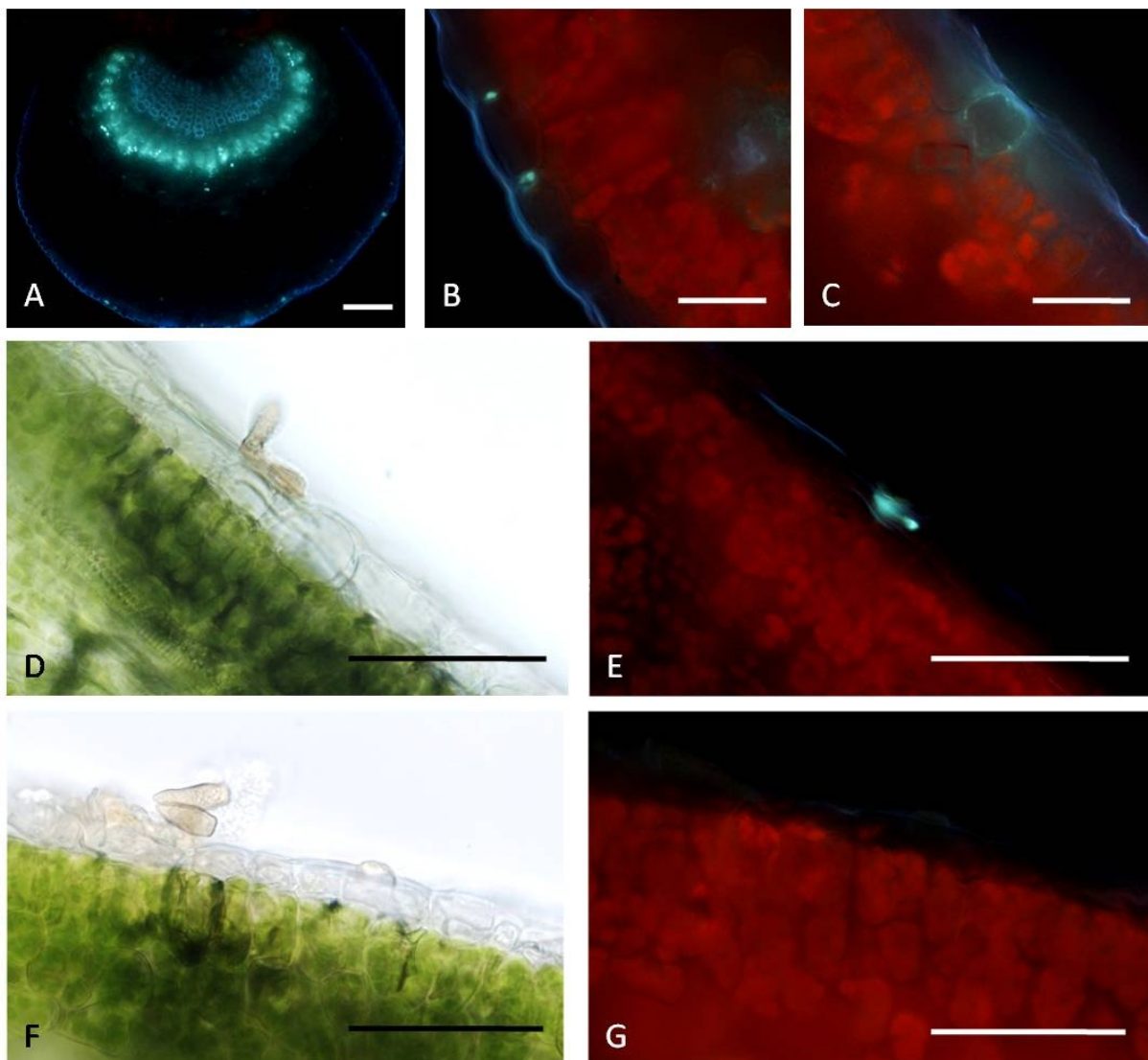
infekce, tedy v kontaktu rostlinných buněk s konidiemi ani klíčními hyfami (Obrázek 24).



Obrázek 24 Na ručních řezech listem jabloně po napadení patogenem *V. inaequalis* nebyla v místě infekce detekována depozice ligninu. A, Konidie *V. inaequalis* (šipka) na adaxiální straně listu v oblasti střední žilky. V místě infekce nebyl detekován lignin, ten je značen v xylému cévních svazků (vpravo dole). B a C, Konidie na adaxiální straně listu jabloně. Měřítka 50 μm .

4.7.2. Depozice kalózy v místě infekce

V kontrolních nenapadených listech byla kalóza detekována ve floému cévních svazků (Obrázek 25A), a někdy v buněčné stěně pokožkových buněk (Obrázek 25 B a C). V napadených lisech byla kalóza detekována na stejných místech jako v nenapadených listech a dále přibližně v 10 % případů v místě infekce (Obrázek 25).



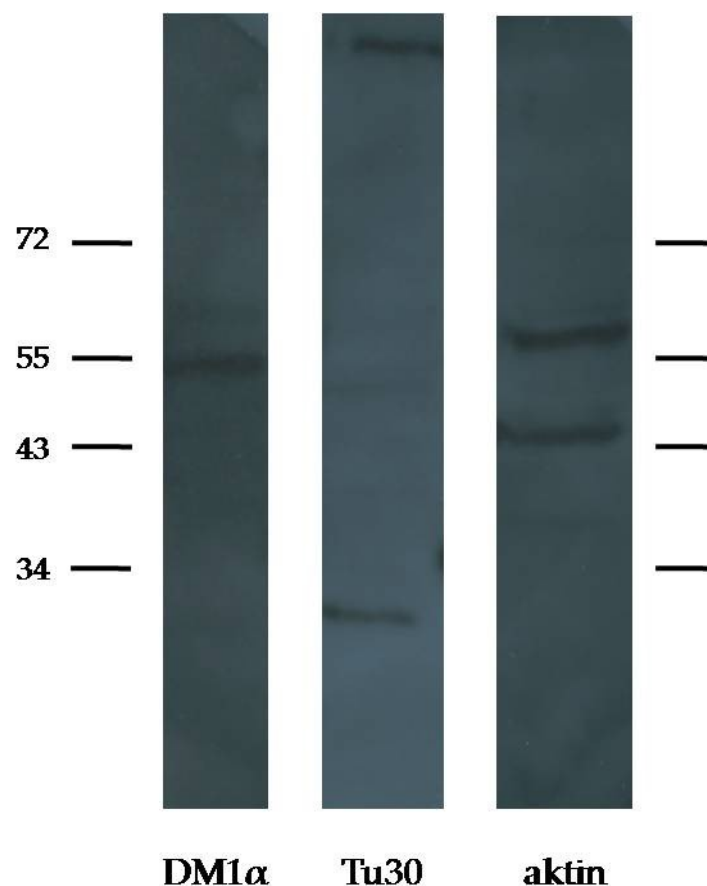
Obrázek 25 Depozice kalózy značené anilínovou modří a pozorované ve fluorescenčním mikroskopu Olympus Provis AX 70. A , B , C, V kontrolních rostlinách byla kalóza detekována ve floému cévních svazků a v buněčné stěně pokožkových buněk. D a E, Po inokulaci konidiiemi *V. inaequalis* byla v 10 % případů v místě infekce detekována kalóza. E, F a G, Ve většině pozorování nebyla po napadení pozorována depozice kalózy v místě infekce. D a F, Snímky ze světleného mikroskopu pro lokalizaci konidií na povrchu listu. A, B, C, E a G, Snímky z fluorescenčního mikroskopu Olympus Provis AX 70 při excitaci vlnovou délkou 330-385 nm. A, měřítko 100 μm ; B a C, měřítko 25 μm ; D-G, měřítko 50 μm .

4.8. Vizualizace cytoskeletu pomocí protilátek

4.8.1. Funkčnost protilátek na rostlinném materiálu

Metodou izolace proteinů, jejich separace na gelu, přenesení na membránu a následné detekci proteinů pomocí imunoznačení a ECL byla ověřena funkčnost protilátek značících aktin a mikrotubuly na rostlinném materiálu používaném v této práci, tedy na citlivém kultivaru jabloně ‚Idared‘.

V případě imunolokalizace protilátkou proti α -tubulinu byl na proteinech separovaných SDS-PAGE detekován pruh odpovídající velikostí tubulinu. V případě protilátky proti aktinu byly detekovány dva pruhy. Jeden pruh o velikosti kolem 55 kDa, který neodpovídá aktinu. Další pruh ve velikosti cca 43 kDa, který odpovídá velikostí aktinu. V případě protilátky proti γ -tubulinu (TU-30) byl detekován slabý pruh okolo 50 kDa, který velikostně odpovídá γ -tubulinu a druhý pruh kolem 30 kDa, který pravděpodobně značí degradační produkt (Obrázek 26).



Obrázek 26 Western blot zkoušky protilátek na rostlinném materiálu (citlivý kultivar ‚Idared‘). Byly použity primární protilátky DM1 α (značí α -tubulin), Tu30 (γ -tubulin) a anti-aktin. Velikosti markerů molekulových velikostí udány v kDa. Velikost tubulinu je kolem 50 kDa, velikost aktinových monomerů je 43 kDa.

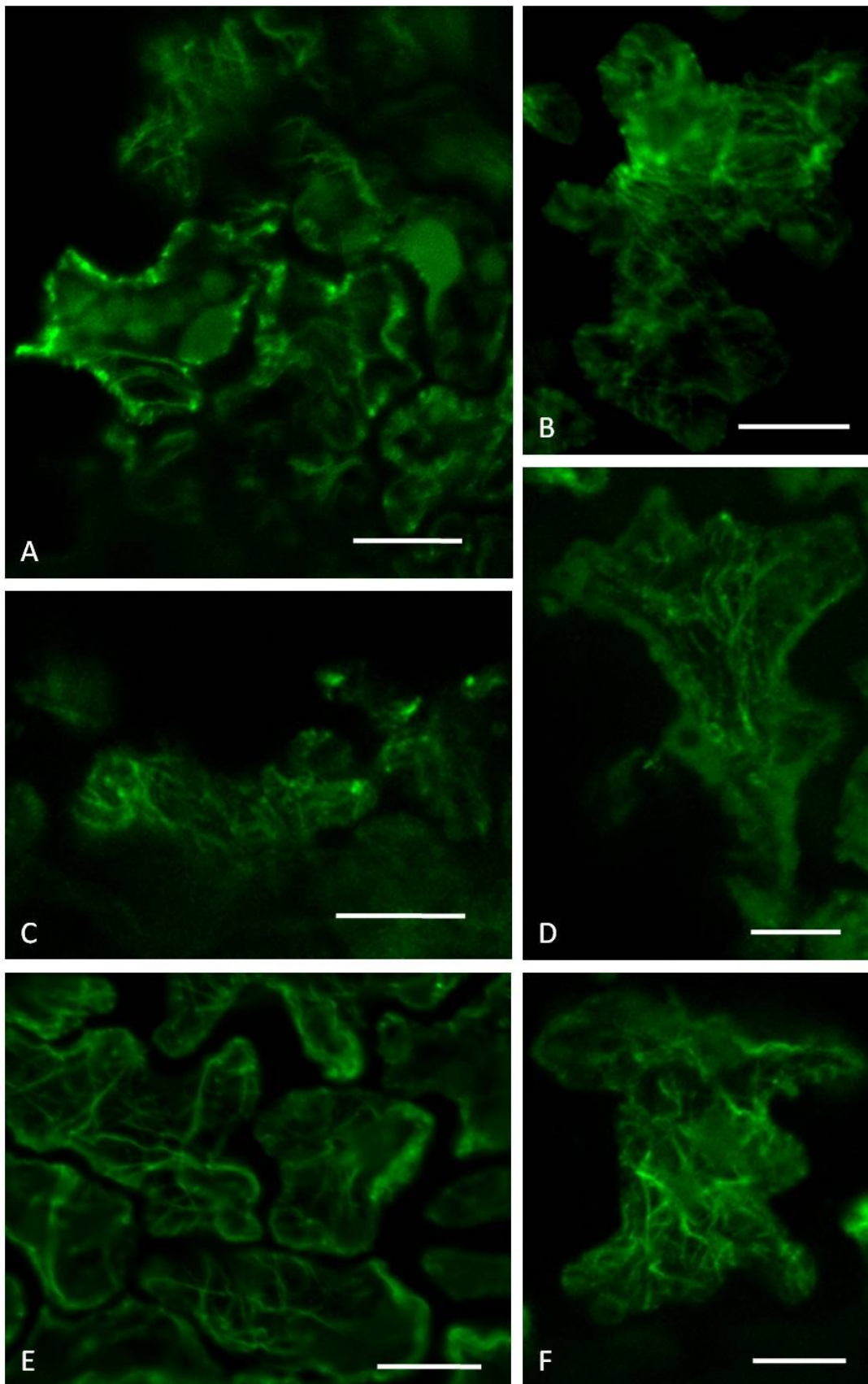
4.8.2. Vizualizace cytoskeletu v pokožkových buňkách listu

Cílem *in situ* imunolokalizace cytoskeletu byla vizualizace a lokalizace AF a MT v pokožkových či mezofylových buňkách listu jabloně pro účely porovnání změn cytoskeletu v buňkách napadených a nenapadených strupovitostí, neboť

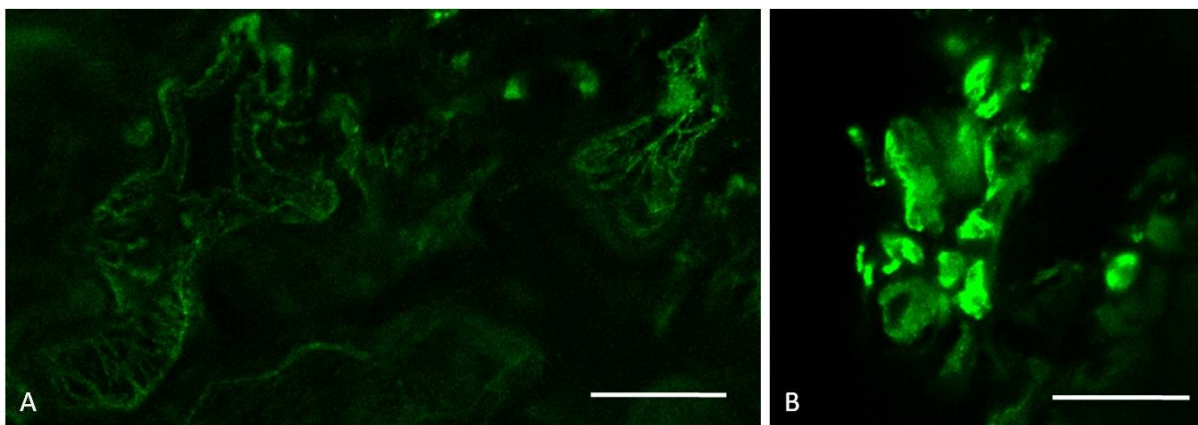
reorganizace cytoskeletu je jednou z nejranějších buněčných odpovědí hostitele na napadení patogenem (Baluška *et al.*, 1995; Hardham *et al.*, 2007; Moral *et al.*, 2016).

První metodou zvolenou pro *in situ* imunolokalizaci byla fixace rostlinného materiálu, jeho zalévání do Steedmanova vosku, řezání na tenké řezy a následné značení protilátkami na řezech. Tato metoda měla částečný úspěch, když se podařilo v listech *in vitro* rostlin lokalizovat MT. Tato lokalizace byla však úspěšná jen v okrajových částech řezu. Pravděpodobným důvodem byl nedostatečný průnik fixace do hlubších částí preparátu. Pro zlepšení penetrace fixačního roztoku do pletiv listu byl do roztoku přidán detergent, aby snížil nesmáčivost listu a umožnil tak dostatečnou fixaci ve fixačním roztoku. Pokusně byla zvyšována koncentrace detergentu a se zvyšující se koncentrací detergentu ve fixačním roztoku se zvyšoval počet lokalizovaných MT a vzdálenost, do níž penetrovala fixáž. Ovšem ani při velmi vysoké koncentraci detergentu v roztoku (5%) nebylo dosaženo lokalizace MT v dostatečném počtu buněk. Od této metody vizualizace cytoskeletu bylo proto upuštěno.

Pro imunolokalizaci cytoskeletu byla dále vyzkoušena metoda fixace rostlinného materiálu s mrazovým drcením a následné značení protilátkami. Tato metoda vizualizace cytoskeletu byla úspěšně zavedena u starších listů *ex vitro* rostlin. V pokožkových i mezofylových buňkách těchto listů byly lokalizovány obě složky rostlinného cytoskeletu, tedy MT i AF (Obrázek 27). Ovšem lokalizace touto metodou v nejmladších listech jabloně nebyla úspěšná. MT v buňkách těchto listů byly lokalizovány, ale pravděpodobně vlivem shlukování cytoplazmy nevykazovaly typickou orientaci v pokožkových buňkách starších listů (Obrázek 28). Dalším krokem pro optimalizaci této metody bude sledování buněk po každém jednotlivém kroku metody a zjištění, kdy dochází k shlukování cytoplazmy a následná snaha o řešení tohoto problému.



Obrazek 27 Imunolokalizace cytoskeletu v pokožkových buňkách listu jabloně na konfokálních snímcích (Zeiss LSM 880, excitace 488 nm, emise 562 nm). A, B, C, Mikrotubuly vizualizované pomocí protilátek lokalizované do kortikální vrstvy cytoplazmy. D, E, F, Aktinový cytoskelet v pokožkových buňkách listu jabloně. Měřítko 10 μm .



Obrázek 28 Mikrotubuly v pokožkových buňkách různě starých listů jabloně. A, Mikrotubuly lokalizované ve starším listu, jehož pokožkové buňky mají laločnatý tvar a jsou v porovnání s pokožkovými buňkami mladších listů větší. B, Mikrotubuly v prvním plně rozvinutém listu jabloně. Na snímku je patrná agregace cytoplazmy vlivem neoptimalizované metodiky detekce cytoskeletu. Buňky mladého listu jsou malé. Snímky z konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 880, excitace 488 nm, emise 562 nm. Měřítka 20 µm.

5. Diskuze

Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného projektu, jehož hlavním cílem je hledání nových metod ochrany jabloní proti houbovému patogenu *V. inaequalis*. Dílčím cílem projektu je hledání časných buněčných markerů infekce, které by byly využitelné pro časnou detekci infekce v sadech. Toto by umožnilo aplikace vhodných postřiků v nejranějších fázích infekce. Cílem této práce bylo především zavést nový výzkumný materiál na pracovišti a taktéž vyvinout základní metody pro detekci buněčných struktur v buňkách listu jabloně.

5.1. Výzkumný materiál

Výzkumným materiálem byly explantáty jabloně *Malus domestica*. Hlavním pokusným materiálem byla citlivá odrůda ‚Idared‘. Tolerantní a rezistentní kultivary byly na pracovišti zavedeny nedávno a nebyly tedy využity pro pokusy. Původním záměrem projektu bylo využít přímo explantátové kultury *in vitro* pro aplikaci patogena a hledání buněčných odpovědí. Vzhledem k tomu, že byla úspěšně zavedena metodika zakořenění *in vitro* explantátů a jejich následné přenesení do *ex vitro* podmínek, bylo rozhodnuto provádět pokusy na rostlinách v *ex vitro* podmínkách.

Výhodou rostlin rostoucích v *ex vitro* podmínkách je to, že jsou bližší přirozeným podmínkám v sadu, a proto je předpoklad, že budou vykazovat podobnější reakce na napadení jako sadové rostliny než rostliny rostoucí v *in vitro* podmínkách. Výsledky experimentů provedených na takovém materiálu mohou být na sadové jabloně lépe aplikovány než výsledky experimentů prováděných na rostlinách rostoucích v *in vitro* podmínkách, protože *in vitro* podmínky mají svá specifika jako je heterotrofní způsob výživy rostlin, živěných z kultivačního media či vysoká vzdušná vlhkost. Tyto specifické podmínky růstu vedou k odlišnostem rostlin od přirozeného stavu, jako je například změna povrchových struktur listu, kutikuly, a vůbec celkově odlišný habitus rostliny. Dalšími výhodami jsou genetická

uniformita materiálu, zajištěná pasážováním v *in vitro* podmínkách, kontrolované podmínky prostředí v kultivační místnosti a relativní zabránění vlivu jiných faktorů (patogeni, abiotický stres) na rostliny. Nesmírně důležitý je také fakt, že přísun rostlinného materiálu je víceméně nezávislý na sezóně.

Vhodnost *ex vitro* rostlin pro studium interakcí hostitel-patogen může být dokládána také pozorováními, která byla v rámci této práce provedena. Po porovnání listů rostlin z *in vitro* a *ex vitro* podmínek bylo zjištěno, že anatomie listů z *in vitro* podmínek se liší od anatomie listů z *ex vitro* podmínek, dále se u rostlin z odlišných podmínek liší charakteristiky kutikuly a rychlost růstu rostlin.

5.2. Inokulace rostlin patogenem

Pro výzkum interakce buněk pokožky jabloně a patogena *Venturia inaequalis* je nezbytné zavést metodu řízené inokulace. Úspěšnost rozvinutí infekce listů závisí v přírodě na mnoha vnějších i vnitřních vlivech (MacHardy, 1996). V rámci projektu proto bylo jedním z cílů zavést inokulaci jabloní v *in vitro* podmínkách sterilními konidiami *V. inaequalis*. Tento způsob totiž zaručuje využití jednotného genetického materiálu, umožňuje kontrolu okolních podmínek a vylučuje možnost sekundární infekce. Zdrojem sterilních konidií jsou kultury *V. inaequalis* propagované na PCA mediu. Bylo však pozorováno, že konidie pěstované na PCA mediu ztrácí během propagace na tomto médiu ve sterilních podmínkách časem svou klíčivost a posléze schopnost vyvolat dostatečnou infekci. Proto byl v rámci projektu řešen další úkol, a to možnost využití přečištěných konidií smytých z napadených listů. Zjistili jsme však, že sterilizace konidií, jejichž zdrojem jsou přímo listy ze sadu, vede ke ztrátě klíčivosti konidií.

Vzhledem k úspěšnému zakořeňování explantátů a kultivaci rostlin v *ex vitro* podmínkách byly jako rostlinný pokusný materiál používány tyto rostliny, které nevyžadovaly aplikaci sterilních konidií. Použití konidií smytých z listů a především jejich opakované použití pro kontrolované infekce na zakořeněných rostlinách se

prokázalo jako nejúspěšnější způsob kontrolované inokulace a plně nahradilo původně plánované použití sterilních kultur *in vitro*.

5.3. Vizualizace buněčných struktur

Jedním z cílů této práce bylo vizualizovat buněčné struktury listu jabloně za účelem následné analýzy odpovědi buněk listu na napadení *V. inaequalis* na buněčné a pletivové úrovni. V rámci této práce se podařilo zavést metodiku vizualizace různých buněčných komponent pomocí odlišných metod. Bylo dosaženo úspěchu ve vizualizaci cytoskeletu, buněčné stěny a kutikuly.

Změny cytoskeletu představují jednu z nejčasnějších buněčných odpovědí hostitele na napadení patogenem (Baluška *et al.*, 1995; Škalamera and Heath, 1998; Takemoto *et al.*, 2003; Hardham, 2013). V případě interakce *Malus-Venturia* však nejsou k dispozici žádné informace o reorganizaci cytoskeletu indukované napadením *V. inaequalis*.

V předběžném experimentu byla na Western blot ověřena funkčnost protilátek použitých při imunolokalizaci proteinů cytoskeletu. Při *in situ* imunolokalizaci bylo zjištěno, že protilátky jsou funkční a specificky se váží na proteiny cytoskeletu. Toto platí i pro protilátku proti aktinu, která na Western blotu kromě specifického pruhu rozeznávala i neznámý protein o vyšší molekulové hmotnosti, avšak *in situ* imunolokalizace prokázala, že tato protilátka specificky rozeznává polymery aktinu.

Cytoskelet pokožkových a mezofylových buněk listu jabloně byl vizualizován pomocí *in situ* imunolokalizace metodou mrazového drcení a na řezech materiálem zalitým do Steedmanova vosku. Výhodou metody mrazového lámání je pozorování segmentů listu jabloně svrchu, nikoli na příčném řezu. Tato forma pozorování je nejvhodnější pro vizualizaci časně buněčné odpovědi (případně reorganizace cytoskeletu) v pokožkových buňkách po napadení patogenem. Metoda bude dále optimalizována, neboť je prozatím méně úspěšná v případě vizualizace cytoskeletu v buňkách nejmladších listů jabloně. *In situ* imunolokalizace cytoskeletu metodou zalévání materiálu do Steedmanova vosku se ukázala méně úspěšnou než předchozí

diskutovaná metoda. Tato metoda by umožnila pozorovat cytoskelet i v hlubších vrstvách pletiva, neboť materiál je nařezán na tenké příčné řezy. Bohužel vysoce nesmáčivý materiál, jakým je list jabloně, neumožnil dostatečnou fixaci materiálu. Opakovaně byl cytoskelet vhodně zafixován jen v několika málo krajních buňkách řezu. Pro malou úspěšnost vizualizace bylo od této metody upuštěno.

Pro vizualizaci buněčné stěny buněk listu jabloně byla zvolena jednoduchá a rychlá metoda vitálního značení ručních řezů listem různými barvami. Výhodami této metody jsou právě její jednoduchost, rychlost a aplikovatelnost na jakýkoli rostlinný materiál. Další výhodou je využití materiálu *in vivo*, bez potřeby jeho fixace.

Kutikula pokožkových buněk adaxiální strany listu byla vizualizovaná třemi různými metodami: pozorováním autofluorescence kutikuly, barvením lipofilními barvami a metodou ESEM. Jako nejjednodušší a nejrychlejší se ukázala metoda pozorování kutikuly díky její autofluorescenci ve fluorescenčním mikroskopu. Tato metoda nevyžaduje žádnou přípravu vzorků ani jejich barvení. Listy jsou pozorovány *in vivo*, bez řezání či barvení a je tedy málo pravděpodobné, že by mohlo docházet k vzniku artefaktů. Obdobná pozorování byla provedena pomocí ESEM, jehož výhodou je též pozorování povrchových struktur listu *in vivo*.

Z časových důvodů, kdy experimenty s cílem optimalizace metod vizualizace buněčných komponent a úspěšné inokulace rostlin probíhaly souběžně, nebyly pro tuto diplomovou práci dokončeny experimenty, kde by vizualizace buněčných komponent byla provedena i na infikovaných rostlinách. K tomu došlo pouze v případě předběžných experimentů detekce změn depozice ligninu a kalózy indukovaných napadením strupovitostí. Ostatní experimenty budou náplní plánovaného navazujícího doktorského studia.

Metody transformace rostlin jsou diskutovány v následující kapitole 5.4.

5.4. Transformace jabloní

V této práci nebyla úspěšně zavedena žádná z metod tranzientní či stabilní transformace rostlinného materiálu a to i přesto, že byly použity již publikované

zavedené metody pro stabilní transformaci kokultivací s *A. tumefaciens*. V našich experimentech byly použity vektory s promotorem viru mozaiky kvěťáku CaMV (35S). Tento promotor byl použit ve vektorech, které byly úspěšně transformovány do buněk jabloně (Puite, J. and Schaart, 1996; Maximova *et al.*, 1998). V další práci by bylo vhodné použít vektory i s jinými promotory, jako například nopalin syntázový promotor (NOS) či mannopin syntázový promotor (mas 5'), které byly také úspěšně použity při transformaci jabloní (Puite, J. and Schaart, 1996). V další práci bude také testován vliv kmenů *Agrobacteria* na úspěšnost transformace. Dalším možným vysvětlením neúspěšné transformace rostlin je vliv kultivaru. Maximova a kol. (1998) popsali vliv kultivaru na schopnost transformovaných buněk regenerovat v transformované rostliny (Maximova *et al.*, 1998). Neúspěchy tranzientní transformace, ať už metodou infiltrace či biolistikou, mohou být způsobeny silným umlčováním cizorodých genů v jabloni.

Využití takto vzniklých geneticky modifikovaných (GM) rostlin je čistě pro vědecké účely a v této práci by usnadnilo výzkum interakce *Malus-Venturia*, neboť na GM jabloních by mohla být sledována buněčná odpověď (na úrovni změny struktury či lokalizace buněčných komponent) na napadení *V. inaequalis* a to *in vivo*, bez potřeby fixace materiálu, která může být zdrojem artefaktů.

5.5. Odpověď na napadení na úrovni změny buněčné stěny

Depozice polymerů buněčné stěny, například ligninu a kalózy (Škalamera *et al.*, 1997; Hardham *et al.*, 2007; Faulkner, 2015) je častou buněčnou odpovědí hostitele na napadení penetrujícího patogena (viz. 2.3.6. Specifická depozice buněčné stěny). *V. inaequalis* je sice nepenetrujícím patogenem, ale i v interakci *Malus-Venturia* byla detekována zvýšená exprese enzymů podílejících se na syntéze ligninu po napadení patogenem (Holzapfel *et al.*, 2012). Proto byla v této práci řešena otázka, zda dochází po napadení patogenem k depozici ligninu v místě infekce. Bylo zjištěno, že tři dny po inokulaci není u citlivého kultivaru v místě infekce detekovatelný žádný lignin. To může být vysvětleno tím, že tři dny po inokulaci je příliš brzy na to, aby došlo

k depozici ligninu. Proto v dalších experimentech bude lignin detekován i v pozdějších fázích infekce. Je také možné, že k depozici ligninu do místa infekce dochází u rezistentního kultivaru ale u citlivého ne. Holzapfel a kol. (2012) v expresní analýze ukázali, že exprese genů pro enzymy podílející se na syntéze ligninu je po napadení zvýšená právě u rezistentního kultivaru oproti kultivaru citlivému (Holzapfel *et al.*, 2012). Po získání dostatečného pokusného materiálu bude proto detekce ligninu po infekci provedena i u rezistentního kultivaru.

V případě kalózy, která byla v místě infekce detekována v minimu případů, může být absence depozice kalózy vysvětlena tím, že konidie nepenetrují do buněk, proto nemají tyto hostitelské buňky potřebu fortifikovat buněčnou stěnu v místě infekce a nedeponují kalózu. Jiným vysvětlením je to, že v tomto experimentu bylo pracováno s citlivým kultivarem a ten na napadení neodpovídá stejně jako v případě detekce ligninu.

5.6. Role kutikuly v ontogenetické rezistenci

O roli kutikuly v ontogenetické rezistenci jabloně k patogenu *V. inaequalis* se zatím spekuluje (Jha *et al.*, 2009). Některé práce ovšem roli kutikuly v ontogenetické rezistenci zavrhnou (Valsangiacomo and Gessler, 1988; Gusberty *et al.*, 2013). V této práci byly zjištěny rozdíly v povrchových strukturách listu v závislosti na stáří listu, a to takové, že u nejmladších listů chybí kutikulární lamely typické pro pokožkové buňky starších listů.

V této práci byly zjištěny rozdílné výsledky týkající se povrchových struktur adaxiální strany listu jabloně než v publikaci Bringe a kol. (2006). V našich experimentech pomocí zobrazování povrchových struktur v mikroskopu typu ESEM jsou patrné ontogenetické rozdíly buněk svrchní strany listu, jako je tvar a členitost buněk a existence kutikulárních lamel. V našich experimentech byly zjištěny zásadní rozdíly mezi prvním a sedmým listem nejen ve tvaru kutikuly, ale i ve tvaru pokožkových buněk. Naproti tomu Bringe a kol. neukázali žádné rozdíly ve tvaru buněk. Naše pozorování se zcela neshodují s pozorováními Bringe a kol., kde

pokožkové buňky prvního rozvinutého listu shora mají laločnatý tvar, nelišící se od tvaru epidermálních buněk starších listů, a vykazují více kutikulárních lamel než buňky starších listů. Tento rozdíl v pozorováních může být dán různou rychlostí růstu rostlin, kultivačními podmínkami nebo rozdílnými kultivary. Rostliny použité v této práci produkovaly nový list každé dva až tři dny, vykazovaly tedy vysokou růstovou rychlost. Bringe a kol. (2006) pozorovali vznik nového listu každé čtyři až pět dní (Bringe *et al.*, 2006). Je proto možné, že během vysoké růstové rychlosti dochází k diferenciaci charakteristického tvaru buněk a kutikulárních struktur později během vývoje listu, zatímco diferenciaci buněk je patrná již na mladších listech u pomaleji rostoucí rostliny.

Rychlost růstu rostlin se zdá jako zásadní faktor v interakci *Malus-Venturia*. Čím rychleji rostlina roste, tím rychleji produkuje nové mladé listy, které jsou nejcitlivější k napadení strupovitostí. Tím je dána i sezónnost infekce patogenem, která je nejsilnější na jaře, tedy v době, kdy rostliny rostou nejrychleji. Tato snižující se citlivost k napadení patogenem se zvyšujícím se stářím listu je základem ontogenetické rezistence jabloně. Pozorování, že čím rychleji rostlina roste, tím je počet mladých listů bez kutikulárních lamel vyšší a zároveň je více listů citlivých k napadení napovídá, že kutikula by mohla v ontogenetické rezistenci hrát svou roli. V rámci této práce bylo pozorováno, že na pomalu rostoucí rostlině nedochází k tak masivní infekci jako na rostlině rostoucí rychle a že rostliny mimo vegetační období jsou hůře infikovatelné nebo úplně neinfikovatelné, v kontrastu s rostlinami rostoucími v hlavní sezóně. Rostliny rostoucí pomalu se nedařilo infikovat po inokulaci konidiami ani ve stejných podmínkách za jakých probíhala inokulace rostlin rychle rostoucích. Role kutikuly v ontogenetické rezistenci rostlin bude dále studována. V budoucnosti bychom například rádi změřili tloušťku kutikuly u mladších i starších listů *in vitro* i *ex vitro* rostlin pomocí metody transmisní elektronové mikroskopie.

6. Souhrn

Z cílů této práce bylo splněno zavedení rostlinného materiálu a jeho propagace jak v *in vitro* tak v *ex vitro* podmínkách. Důležitým bodem bylo zavedení úspěšné metody inokulace a následného rozvinutí infekce *V. inaequalis* na listech citlivého kultivaru jabloně.

Dále se podařilo vizualizovat některé buněčné struktury buněk listu jabloně různými metodami. Některé metody musí být ještě optimalizovány. V rámci cíle zavést metodiku vizualizace buněčných komponent v listu jabloně se nepodařilo generovat transformovaný rostlinný materiál, který by usnadnil detekci buněčných komponent v listech. Úspěšně byla zavedena metoda regenerace rostlin, která je nezbytným krokem v transformaci materiálu. V této oblasti bude i nadále vyvíjena snaha o úspěšnou transformaci rostlinného materiálu.

Dílním cílem projektu, jehož součástí je tato práce, je detekce odpovědi jabloně na napadení strupovitostí na buněčné a pletivové úrovni. V rámci tohoto cíle byly provedeny předběžné experimenty detekce ligninu a kalózy v místě infekce, které budou zopakovány a dále provedeny na tolerantním a rezistentním kultivaru jabloně.

Byly detekovány povrchové struktury jabloně a dále byly pozorovány jejich variace v ontogenezi listu. Role těchto struktur v ontogenetické rezistenci listu jabloně bude dále studována.

Všechny cíle této práce byly plně nebo částečně splněny.

7. Seznam literatury

- Assaad FF, Qiu J-L, Youngs H, et al.** 2004. The PEN1 Syntaxin Defines a Novel Cellular Compartment Upon Fungal Attack and Is Required for the Timely Assembly of Papillae. *Molecular biology of the cell* **15**, 5118–5129.
- Baluška F, Bacigálová K, Oud JL, Hauskrecht M, Kubica Š.** 1995. Rapid reorganization of microtubular cytoskeleton accompanies early changes in nuclear ploidy and chromatin structure in postmitotic cells of barley leaves infected with powdery mildew. *Protoplasma* **185**, 140–151.
- Bari R, Jones JDG.** 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**, 473–488.
- Van Der Biezen EA, Jones JDG.** 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 454–456.
- Bigeard J, Colcombet J, Hirt H.** 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* **8**, 521–539.
- Bringe K, Schumacher CFA, Schmitz-Eiberger M, Steiner U, Oerke EC.** 2006. Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. *Phytochemistry* **67**, 161–170.
- Buda GJ, Isaacson T, Matas AJ, Paolillo DJ, Rose JKC.** 2009. Three-dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. *Plant Journal* **60**, 378–385.
- Bus VGM, Rikkerink EHA, Caffier V, Durel C-E, Plummer KM.** 2011. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annual review of phytopathology* **49**, 391–413.
- Cova V, Bandara NL, Liang W, Tartarini S, Patocchi A, Troglio M, Velasco R, Komjanc M.** 2015a. Fine mapping of the Rvi5 (Vm) apple scab resistance locus in the ‘Murray’ apple genotype. *Molecular Breeding* **35**, 1–12.
- Cova V, Lasserre-Zuber P, Piazza S, Cestaro A, Velasco R, Durel CE, Malnoy M.** 2015b. High-resolution genetic and physical map of the Rvi1 (Vg) apple scab

resistance locus. *Molecular Breeding* **35**.

Dangl JL, Jones JDG. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833.

Degenhardt J, Al-Masri AN, Kürkcüoğlu S, Szankowski I, Gau AE. 2005. Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Molecular Genetics and Genomics* **273**, 326–335.

Delalieux S, van Aardt J, Keulemans W, Schrevens E, Coppin P. 2007. Detection of biotic stress (*Venturia inaequalis*) in apple trees using hyperspectral data: Non-parametric statistical approaches and physiological implications. *European Journal of Agronomy* **27**, 130–143.

Faulkner C. 2015. A cellular backline: Specialization of host membranes for defence. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1565–1571.

Ficke A, Gadoury DM, Seem RC. 2002. Ontogenic resistance and plant disease management: a case study of grape powdery mildew. *Phytopathology* **92**, 671–675.

Galli P, Patocchi A, Brogginì GAL, Gessler C. 2010. The Rvi15 (Vr2) apple scab resistance locus contains three TIR-NBS-LRR genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 608–17.

Gau AE, Koutb M, Piotrowski M, Kloppstech K. 2004. Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 703–711.

Gessler C, Patocchi A, Sansavini S, Tartarini S, Gianfranceschi L. 2006. *Venturia inaequalis* Resistance in Apple. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**, 473–503.

Girardi CL, Rombaldi CV, Dal Cero J, Nobile PM, Laurens F, Bouzayen M, Quecini V. 2013. Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily in apple and transcriptional evidence of ERF involvement in scab pathogenesis. *Scientia Horticulturae* **151**, 112–121.

Gusberti M, Gessler C, Broggin GAL. 2013. RNA-seq analysis reveals candidate genes for ontogenic resistance in Malus-Venturia pathosystem. *PLoS ONE* **8**.

Hardham AR. 2013. Microtubules and biotic interactions. *Plant Journal* **75**, 278–289.

Hardham AR, Jones DA, Takemoto D. 2007. Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 342–348.

Hardham AR, Takemoto D, White RG. 2008. Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of Arabidopsis epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BMC plant biology* **8**.

Hoefle C, Huesmann C, Schultheiss H, Börnke F, Hensel G, Kumlehn J, Hückelhoven R. 2011. A barley ROP GTPase ACTIVATING PROTEIN associates with microtubules and regulates entry of the barley powdery mildew fungus into leaf epidermal cells. *The Plant cell* **23**, 2422–2439.

Holzapfel C, Meisel B, Thümmler F, Leser C, Treutter D. 2012. Differential gene expression in leaves of a scab susceptible and a resistant apple cultivar upon *Venturia inaequalis* inoculation. *Trees - Structure and Function* **26**, 121–129.

van der Hoorn RAL, Kamoun S. 2008. From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant cell* **20**, 2009–17.

Hrazdina G. 2003. Response of scab-susceptible (McIntosh) and scab-resistant (Liberty) apple tissues to treatment with yeast extract and *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry* **64**, 485–492.

Chevalier M, Lespinasse Y, Renaudin S. 1991. A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology* **40**, 249–256.

Jha G, Thakur K, Thakur P. 2009. The venturia apple pathosystem: Pathogenicity mechanisms and plant defense responses. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2009**.

Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.

Kobayashi I, Kobayashi Y, Hardham AR. 1994. Dynamic reorganization of microtubules and microfilaments in flax cells during the resistance response to flax

rust infection. *Planta* **195**, 237–247.

Koh S, André A, Edwards H, Ehrhardt D, Somerville S. 2005. *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections. *Plant Journal* **44**, 516–529.

Köller W, Parker DM, Becker CM. 1991. Role of cutinase in the penetration of apple leaves by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **81**, 1375–1379.

Komjanc M, S.Festi, Rizzotti L, Cattivelli L, Cervone F, Lorenzo and G De. 1999. A leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRPKm1) gene is induced in *Malus × domestica* by *Venturia inaequalis* infection and salicylic acid treatment M. *Plant Molecular Biology* **40**, 945–957.

Kus J V, Zaton K, Sarkar R, Cameron RK. 2002. Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *The Plant cell* **14**, 479–90.

Li B, Xu X. 2002. Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves. *Journal of Phytopathology* **150**, 687–691.

Liu Z, Persson S, Zhang Y. 2013. The connection of cytoskeletal network with plasma membrane and the cell wall. *Journal of Integrative Plant Biology* **57**, 330–340.

van Loon LC, van Strien E a. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 85–97.

MacHardy WE. 1996. *Apple Scab: Biology, Epidemiology and Management*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

MacHardy WE, Gadoury DM, Gessler C. 2001. Parasitic and Biological Fitness of *Venturia inaequalis*: Relationship to Disease Management Strategies. *Plant Disease* **85**.

Maximova SN, Dandekar AM, Gultinan MJ. 1998. Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: High transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Molecular Biology* **37**, 549–559.

- Miedes E, Vanholme R, Boerjan W, Molina A.** 2014. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in plant science* **5**.
- Mikulič Petkovšek M, Štampar F, Veberič R.** 2009. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **74**, 60–67.
- Moral J, Montilla-Bascon G, Canales FJ, Rubiales D, Prats E.** 2016. Cytoskeleton reorganization / disorganization is a key feature of induced inaccessibility for defence to successive pathogen attacks. *Molecular Plant Pathology*, 1–10.
- Nadiminti PP, Rookes JE, Boyd BJ, Cahill DM.** 2015. Confocal laser scanning microscopy elucidation of the micromorphology of the leaf cuticle and analysis of its chemical composition. *Protoplasma* **252**, 1475–1486.
- Nakamura M, Naoi K, Shoji T, Hashimoto T.** 2004. Low Concentrations of Propyzamide and Oryzalin Alter Microtubule Dynamics in Arabidopsis Epidermal Cells. *Plant Cell Physiology* **45**, 1330–1334.
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A.** 2007. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal* **51**, 1126–1136.
- Opalski KS, Schultheiss H, Kogel K, Huckelhoven R.** 2005. The receptor-like MLO protein and the RAC / ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *The Plant Journal* **41**, 291–303.
- Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW.** 2006. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science (New York, N.Y.)* **312**, 1491–5.
- Paris R, Cova V, Pagliarani G, Tartarini S, Komjanc M, Sansavini S.** 2009. Expression profiling in HcrVf2-transformed apple plants in response to *Venturia inaequalis*. *Tree Genetics and Genomes* **5**, 81–91.
- Parisi L, Lespinasse Y, Guillaumes J, Krüger J.** 1993. A New Race of *Venturia inaequalis* Virulent to Apples with Resistance due to the Vf Gene. *Phytopathology*

83, 533–537.

Piasecka A, Jedrzejczak-Rey N, Bednarek P. 2015. Secondary metabolites in plant innate immunity: Conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist* **206**, 948–964.

Prell H, Day P. 2001. *Plant-Fungal Pathogen Interaction: A Classical and Molecular View*. Springer, Germany.

Puite, J. K, Schaart JG. 1996. Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar via an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. *Plant Science* **119**, 125–133.

Quentin M, Baurès I, Hoefle C, Caillaud M-C, Allasia V, Panabières F, Abad P, Hückelhoven R, Keller H, Favery B. 2016. The *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65-3 supports infection by filamentous biotrophic pathogens by down-regulating salicylic acid-dependent defenses. *Journal of experimental botany* **67**, 1731–43.

Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 941–950.

Serrano M, Coluccia F, Torres M, L'Haridon F, Métraux J-P. 2014. The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in plant science* **5**.

Schumacher CF a, Steiner U, Dehne H-W, Oerke E-C. 2008. Localized adhesion of nongerminated *Venturia inaequalis* conidia to leaves and artificial surfaces. *Phytopathology* **98**, 760–768.

Soriano JM, Madduri M, Schaart JG, van der Burgh A, van Kaauwen MPW, Tomic L, Groenwold R, Velasco R, van de Weg E, Schouten HJ. 2014. Fine mapping of the gene *Rvi18* (V25) for broad-spectrum resistance to apple scab, and development of a linked SSR marker suitable for marker-assisted breeding. *Molecular Breeding* **34**, 2021–2032.

Stein M, Dittgen J, Sánchez-Rodríguez C, Hou B, Molina A, Schulze-lefert P, Lipka V, Somerville S. 2006. *Arabidopsis* PEN3 / PDR8 , an ATP Binding Cassette

Transporter , Contributes to Nonhost Resistance to Inappropriate Pathogens That Enter by Direct Penetration. *The Plant Cell* **18**, 731–746.

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B. 1993. Plant ‘pathogenesis-related’ proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **75**, 687–706.

Stotz HU, Mitrousia GK, de Wit PJGM, Fitt BDL. 2014. Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends in Plant Science* **19**, 491–500.

Škalamera D, Heath MC. 1998. Changes in the cytoskeleton accompanying infection-induced nuclear movements and the hypersensitive response in plant cells invaded by rust fungi. *Plant Journal* **16**, 191–200.

Škalamera D, Jibodh S, Heath MC. 1997. Callose deposition during the interaction between cowpea (*Vigna unguiculata*) and the monokaryotic stage of the cowpea rust fungus (*Uromyces vignae*). *New Phytologist* **136**, 511–524.

Takemoto D, Hardham AR. 2004. The Cytoskeleton as a Regulator and Target of Biotic Interactions in Plants. *Plant Physiology* **136**, 3864–3876.

Takemoto D, Jones DA, Hardham AR. 2003. GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of *Arabidopsis* by oomycete pathogens. *Plant Journal* **33**, 775–792.

Takemoto D, Jones DA, Hardham AR. 2006. Re-organization of the cytoskeleton and endoplasmic reticulum in the *Arabidopsis pen1-1* mutant inoculated with the non-adapted powdery mildew pathogen, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular Plant Pathology* **7**, 553–563.

Torres MA, Jones JDG, Dangl JL. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant physiology* **141**, 373–378.

Underwood W. 2016. Contributions of host cellular trafficking and organization to the outcomes of plant-pathogen interactions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.

Underwood W, Somerville SC. 2013. Perception of conserved pathogen elicitors at the plasma membrane leads to relocalization of the *Arabidopsis* PEN3 transporter.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**, 12492–12497.

Valsangiacomo C, Gessler. 1988. Role of the cuticular membrane in ontogenic and Vf-resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **78**, 1066–1069.

Verma LR, Sharma RC. 1999. Diseases of horticultural crops: fruits. Indus Publishing Company, New Delhi, 718p.

Verma V, Ravindran P, Kumar PP. 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology* **16**.

Vinatzer BA, Patocchi A, Gianfranceschi L, Tartarini S, Zhang HB, Gessler C, Sansavini S. 2001. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with Vf apple scab resistance. *Molecular plant-microbe interactions* **14**, 508–15.

Voigt B, Timmers ACJ, Šamaj J, Müller J, Baluška F, Menzel D. 2005. GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *European journal of cell biology* **84**, 595–608.

Yeats TH, Rose JKC. 2013. The formation and function of plant cuticles. *Plant physiology* **163**, 5–20.

Yun B, Atkinson HA, Gaborit C, Greenland A, Read ND, Pallas JA, Loake GJ. 2003. Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in *Arabidopsis* against wheat powdery mildew. *The Plant Journal* **34**, 768–777.

Zhang Z, Sun A, Cong Y, Sheng B, Yao Q, Cheng Z-M. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of the apple rootstock *Malus micromalus* Makino with the RolC gene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **42**, 491–497.

Zhou J, Spallek T, Faulkner C, Robatzek S. 2012. CalloseMeasurer: a novel software solution to measure callose deposition and recognise spreading callose patterns. *Plant Methods* **8**.

Žárský V, Kulich I, Fendrych M, Pečenková T. 2013. Exocyst complexes multiple functions in plant cells secretory pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 726–733.