



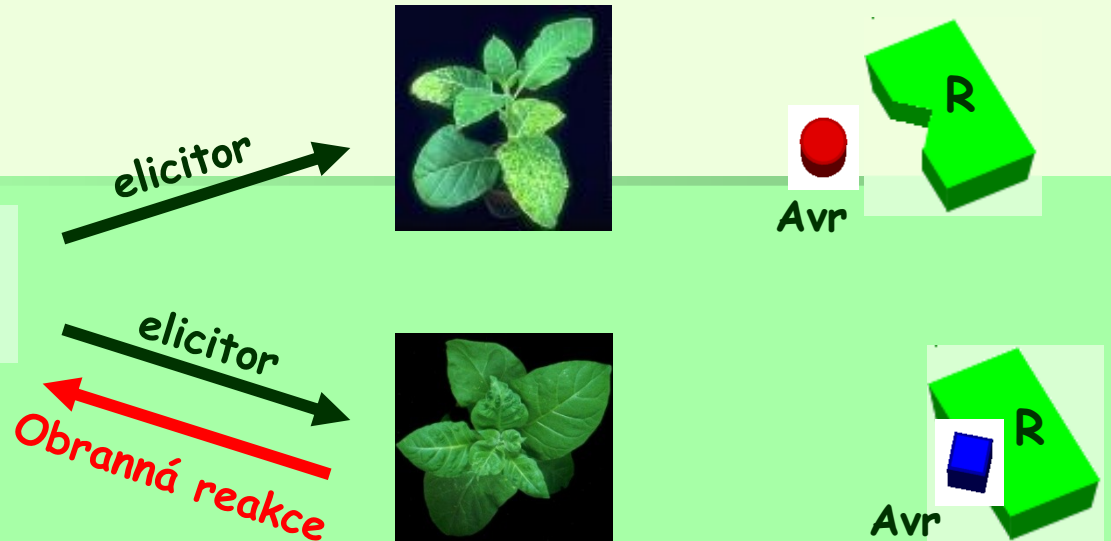
Pokročilé praktikum z Biochemie



Patogen

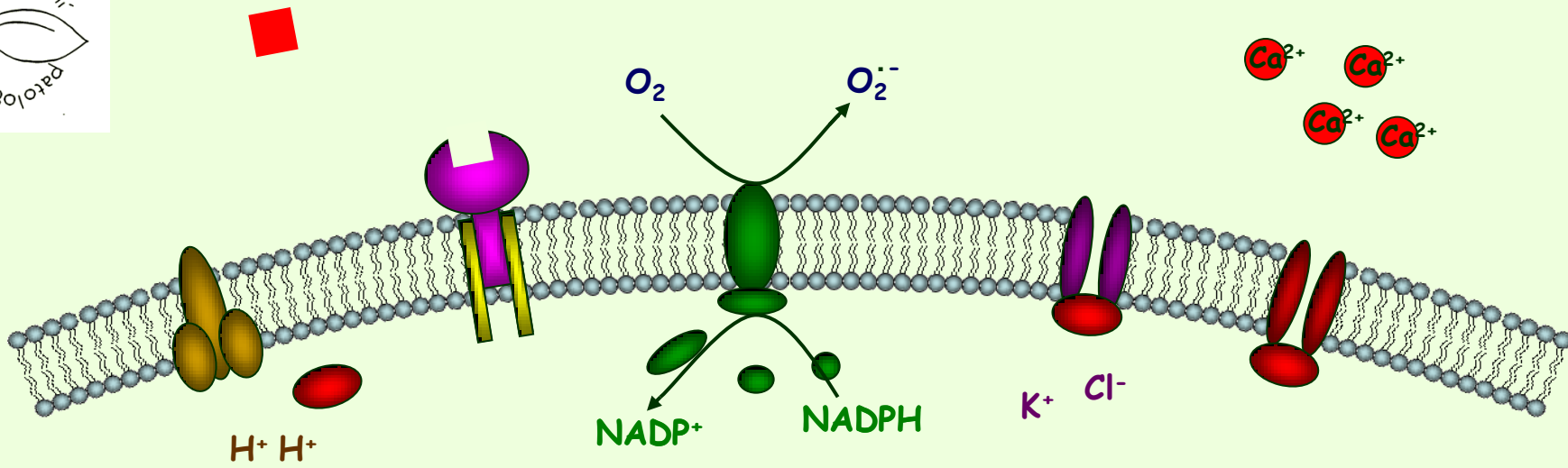
Hostitelská rostlina

Patogen obvykle nese gen **avirulence** (avr), jehož produkt (**elicitor**) je rostlinou rozpoznáván pomocí genu **rezistence** (R).

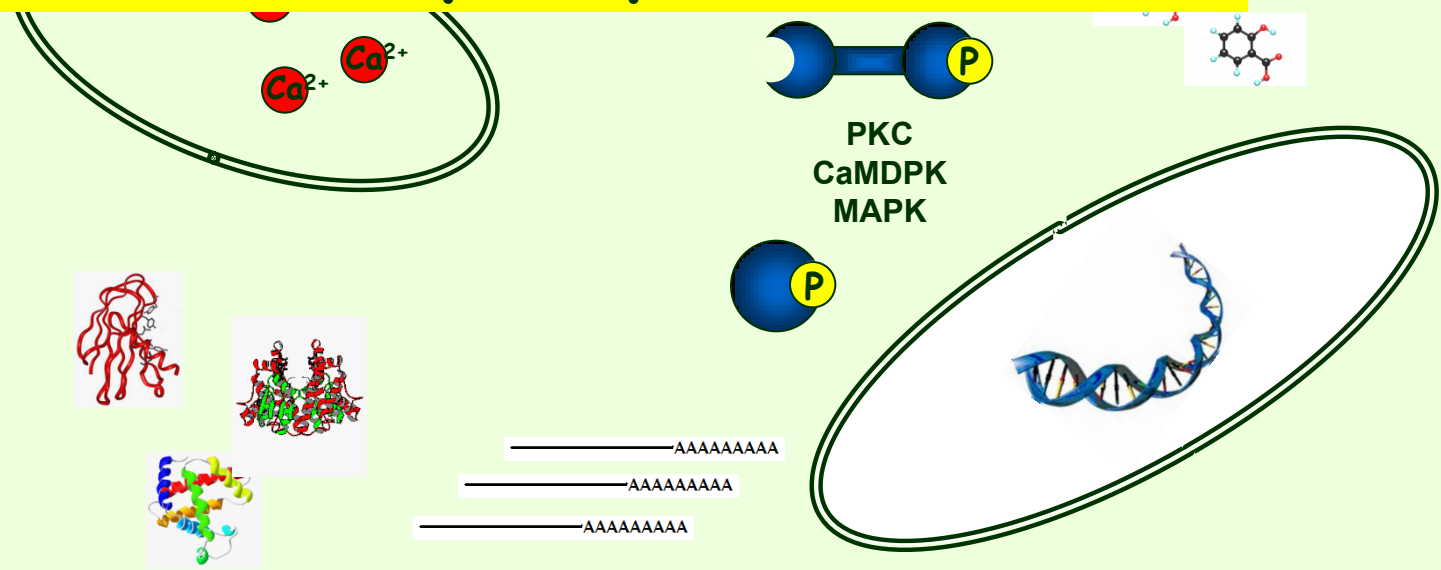


Elicitory - látky, které jsou schopné vyvolat obranou reakci u rostlin

- uvolňované patogenem do prostředí
- součást patogenu
- glykoproteiny, chitinové fragmenty, proteiny, nízkomolekulární látky, anorganické látky, atd.



Pozdní fáze obranné reakce řádově hodiny od přidání elicitoru



Obranné proteiny

- Skupina PR (pathogenesis related) proteinů
 - ▣ Syntetizovány ve velké míře při napadení nebo poškození rostliny
 - ▣ Dle funkce a účinku se dělí do tříd, v každé třídě se vyskytují dvě isoformy - kyselá a bazická
 - ▣ Kyselé isoformy jsou vylučovány do extracelulárního prostředí, bazické poté do vakuoly
 - ▣ Exprese kyselých forem bývá často spojena s tzv. systémově navozenou rezistencí (SAR)

Rozdělení PR (pathogenesis related) proteinů

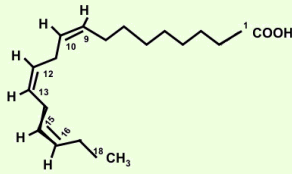
Třída	Typický zástupce	Funkce
PR-1	PR-1 (tabák)	neznámá
PR-2	PR-2 (tabák)	β -1,3-glukanasa
PR-3	P, Q (tabák)	chitinasa
PR-4	`R' (tabák)	chitinasa
PR-5	S (tabák)	podobný thaumatinu
PR-6	Inhibitor I (rajče)	proteinasový-inhibitor
PR-7	P ₆₉ (rajče)	endoproteinasa
PR-8	Chitinasa (okurka)	chitinasa
PR-9	`lignin-forming peroxidase' (tabák)	peroxidasa
PR-10	`PR1' (petržel)	podobný ribonuklease
PR-11	chitinasa třídy V (tabák)	chitinasa
PR-12	Rs-AFP3 (ředkvička)	defensin
PR-13	THI2.1 (<i>Arabidopsis</i>)	thionin
PR-14	LTP4 (ječmen)	lipid-transfer protein
PR-15	OxOa (ječmen)	oxalát oxidasa
PR-16	OxOLP (ječmen)	podobný oxalát oxidase
PR-17	PRp27 (tabák)	neznámá

van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J.(2006): Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. Annu. Rev. Phytopathol. 44, 135-162.

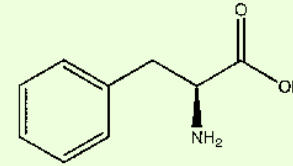
Obranné proteiny

- Skupina PR (pathogenesis related) proteinů
- Enzymy účastníci se syntézy signálních molekul, fytoalexinů, tvorby H_2O_2 , atd.
 - ▣ fenylalaninamoniak lyasa
 - ▣ lipooxygenasa
 - ▣ ACC syntasa
 - ▣ 5-epiaristolochene syntasa
 - ▣ NADPH oxidasa
 - ▣ 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA syntasa

Signální molekuly



Kys. linolenová



Fenylalanin

lipooxygenasa

PAL

13-hydroxyperoxid

trans-skořicová k.

alen oxidasa syntasa

alen oxidasa cyklasa

12-oxophytodienová kys.

kys. benzoová

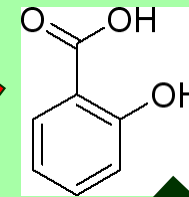
BA-2-hydroxylasa

OPDA reduktasa

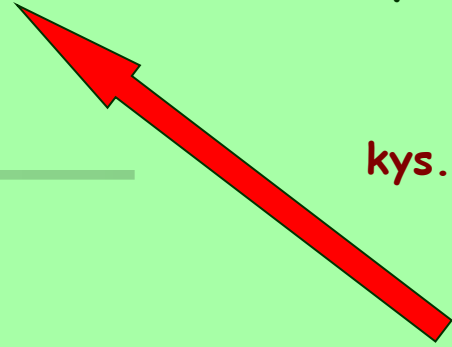
3x β -oxidace

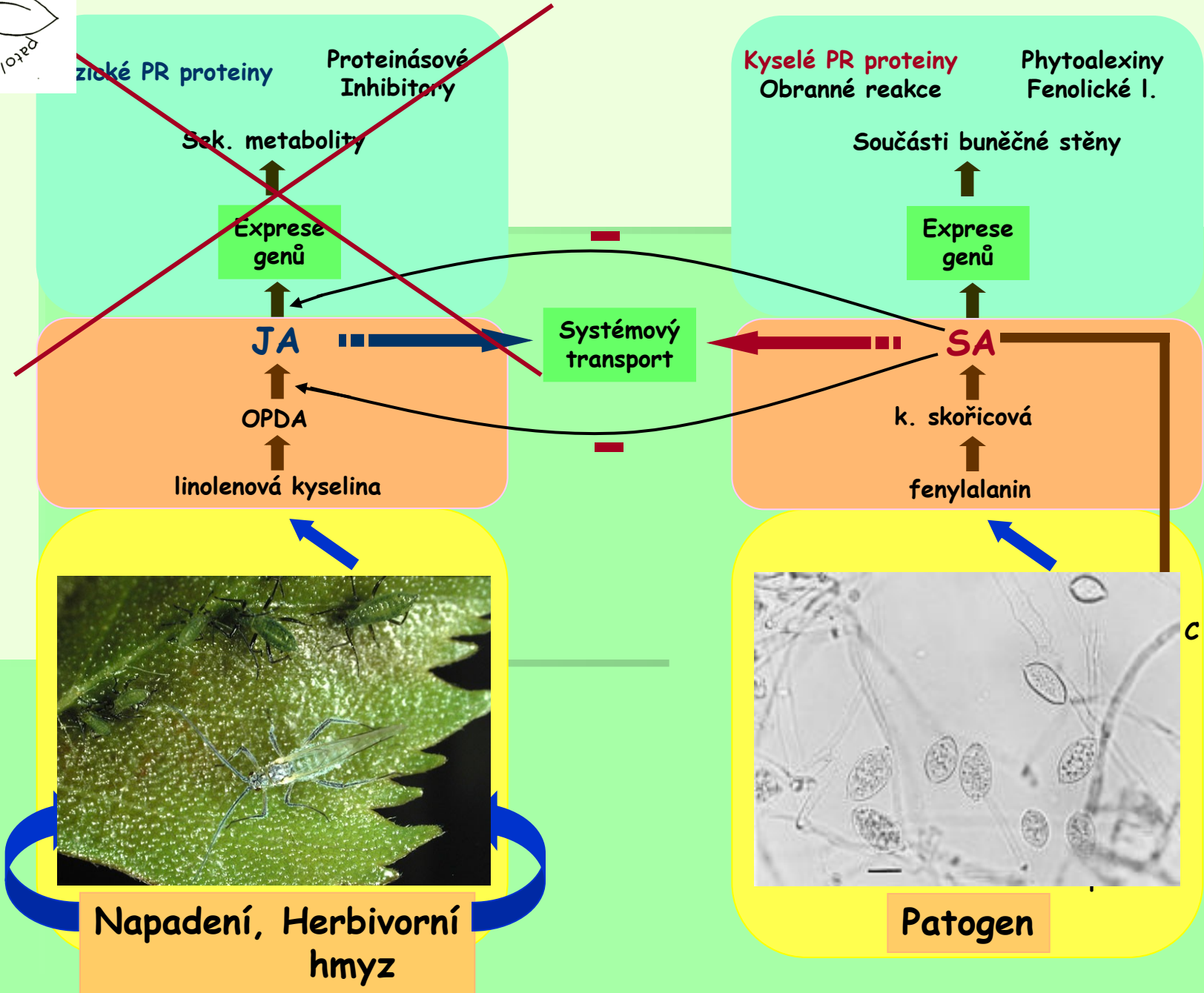
kys. salicylová

Kys. jasmonová



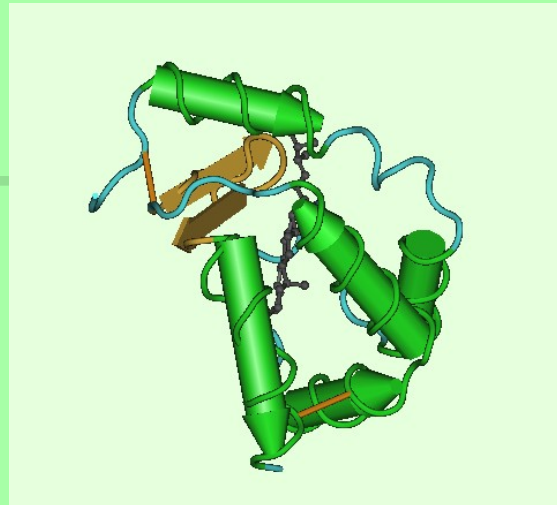
SA-glukosid



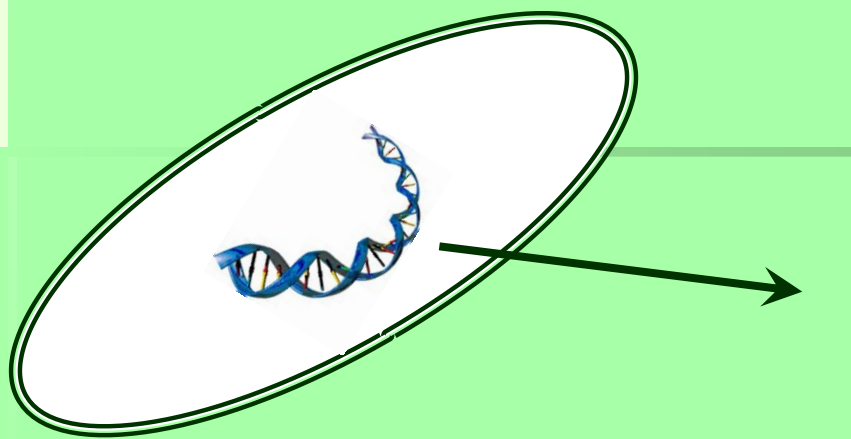
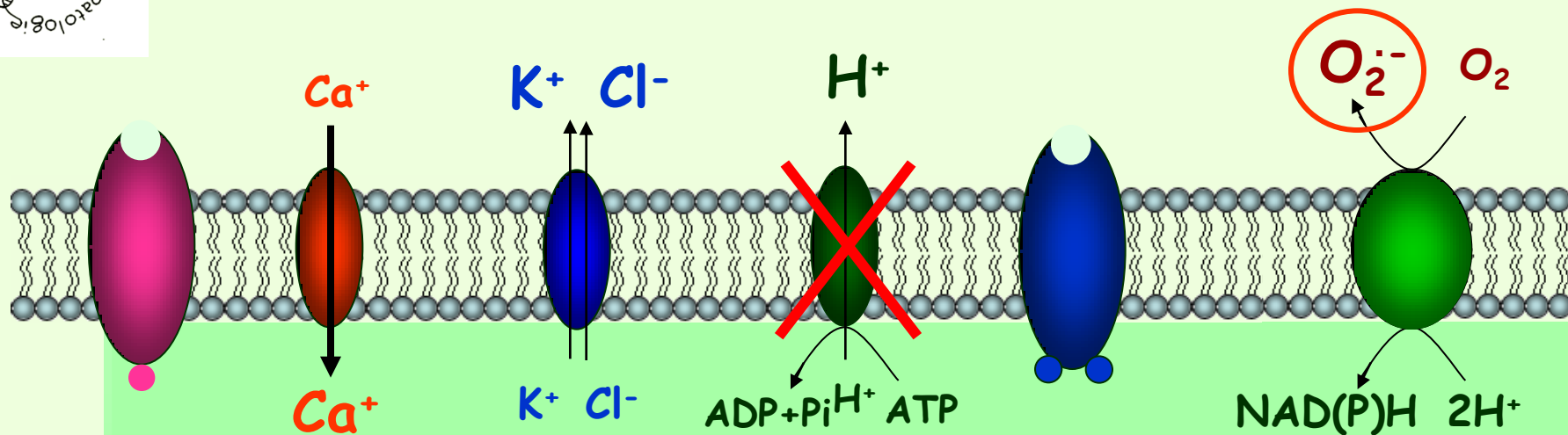


Cryptogein

- proteinový elicitor patřící do skupiny elicitinů vylučovaný houbou *Phytophthora cryptogea* vyvolávající velmi silnou obrannou reakci u rostlin tabáku vedoucí k nekróze
- obsahuje hydrofobní kavitu, do které se mohou vázat steroly a mastné kyseliny, proto je řazen mezi lipid transfer proteiny (LTP)



cryptogein.acd



Syntéza obranných proteinů
(PR1a, PR1b, PR3a)
Aktivace enzymů
(NADPH oxidasa, LOX, STR, PAL)



Identifikaci jednotlivých druhů václavek

v Evropě bylo popsáno sedm druhů václavek:

A. borealis, *A. cepistipes*, *A. ectypa*, *A. gallica*, *A. mellea*,
A. ostoyae and *A. tabescens*

Hlavní ekologická funkce:

Dekompozice dřevní hmoty, ale velmi častý přechod k nekrotrofnímu
parazitismu

druhy hodnocené jako slabí parazité

A. borealis, *A. ectypa*, *A. gallica* and *A. tabescens*

druhy hodnocené jako vážní parazité na stresovaných dřevinách

A. mellea, *A. ostoyae* and *A. cepistipes*



Identifikace jednotlivých druhů václavek

Párové testy

Založeny na kompatibilitě neznámého izolátu s testovacím druhem



Časově náročné, v případě diploidních vzorků jsou výsledky často špatně interpretovatelné

Metody založené na analýze sekvence DNA

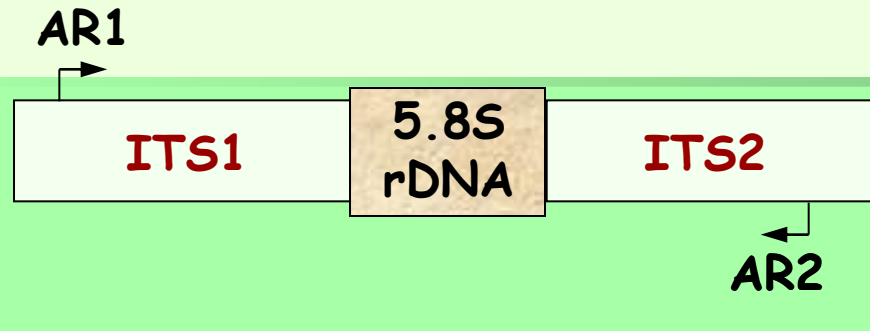
- ▣ RAPDs (random amplified polymorphic DNAs)
- ▣ RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) - IGS a ITS oblasti
- ▣ sekvenace specifických oblastí



Nutnost čistého mycelia václavky nebo plodnic



ITS oblast



Primer	Sekvence (5'→ 3')	Délka	Amplikon (bp)	T _m (C) ^b
AR1	CTGACCTGTTAAAGGGTATGTGC	23 b	690-724	59.94
AR2	AAGCTGAATCCTTCTACAAAGTCAA	25 b		59.85

^bT_m byla vypočtena programem Primer 3

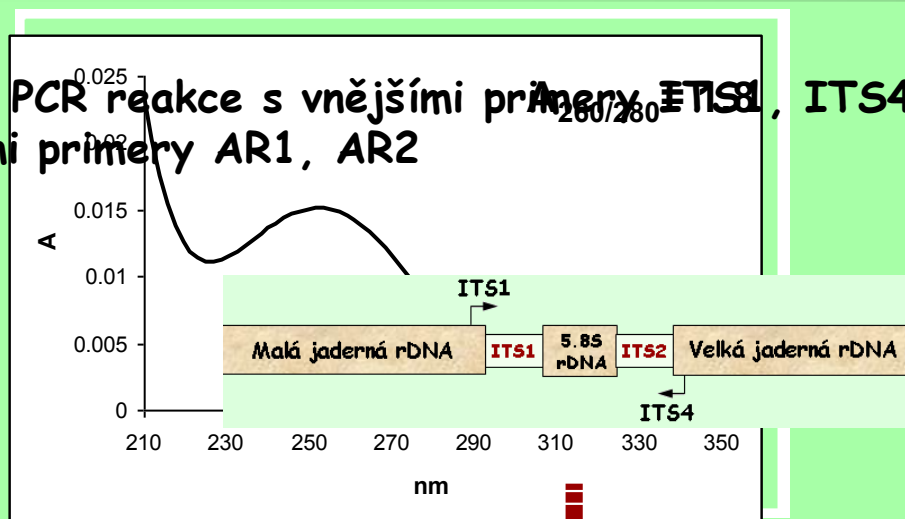


Identifikace václavek se vzorků půdy

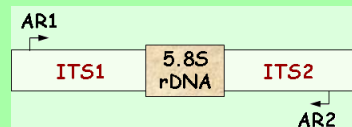
- Izolace DNA z 0.5g půdy pomocí kitu (Mobio)

- Nested PCR reakce s vnějšími primery ~~ITS1~~, ITS4 a vnitřními primery AR1, AR2

1 krok



2 krok





Délky ampliconů a restričních fragmentů

Izolát	Délka ampliconu (bp) ^d ITS/AR	Restriční fragmenty ^e <i>Hinf</i> I (bp)
<i>A. borealis</i> A1 ^a	868/711	293, 172, 56, 31, 75, 68
<i>A. cepistipes</i> 204 ^b	868/711	293, 227, 43, 132
<i>A. gallica</i> 147 ^b	868/711	294, 227, 43, 63, 69
<i>A. mellea</i> 184 ^b	882/724	148, 159, 401
<i>A. ostoyae</i> C2 ^a	870/713	294, 228, 31, 75, 69
<i>A. tabescens</i> T3 ^a	847/690	295, 125, 93, 32, 129