

Histochemické metody stanovení patologických změn v listech rostlin v průběhu patogenese biotrofních houbových parazitů

KATEŘINA MLÍČKOVÁ^{1,2}, MICHAELA SEDLÁŘOVÁ¹, LENKA LUHOVÁ², PAVEL PEČ² ALEŠ LEBEDA¹

Katedra botaniky¹ a Katedra biochemie² PŘF UP, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice, (tel.: 585 634 925, e-mail: katrynka@email.cz, sedlarova@prfholnt.upol.cz)

Úvod

Procesy patogenese houbových parazitů rostlin mají řadu společných znaků z hlediska mechanismů pronikání do pletiv, prvních infekčních stádií, ale i obranných reakcí rostlin (Lebeda 1988, Lebeda *et al.* 2001a, Sedlářová a Lebeda 2002). Na druhé straně však existují v těchto procesech i velmi významné rozdíly mezi hlavními trofickými skupinami fytoparazitických hub. Z tohoto pohledu reprezentují biotrofní parazitické houby vysoce specializovanou skupinu, která je charakteristická řadou odlišností (Lebeda a Schwinn 1994, Bélanger *et al.* 2002, Spencer-Phillips *et al.* 2002). Naše práce se v posledních letech zaměřuje na dvě modelové interakce hostitel - biotrofní parazit: *Lycopersicon* spp. - *Oidium neolycopersici* (Lebeda a Mieslerová 2000) a *Lactuca* spp. - *Bremia lactucae* (Lebeda *et al.* 2001b). Histochemické metodické aspekty studia těchto interakcí jsou předmětem této práce.

Oidium neolycopersici L. Kiss, původce padlí rajčat, je biotrofní patogenní houba patřící do řádu Erysiphales (Ascomycota). Její první výskyt na rajčatech byl v Evropě zaznamenán v roce 1986, doprovázený následným epidemickým šířením (Mieslerová a Lebeda 1999). V České republice byl poprvé pozorován v roce 1988 (Lebeda a Rod 1990). Studium hostitelského okruhu ukázalo, že *O. neolycopersici* napadá široké spektrum druhů rostlin nejen z čeledi Solanaceae (Lebeda a Mieslerová 1999), ale i řady dalších čeledí (Whipps *et al.* 1998). Výzkum zdrojů rezistence potvrdil, že všechny odrůdy kulturního rajčete (*Lycopersicon esculentum*) jsou vysoce náchylné, naopak účinné zdroje rezistence existují mezi planými druhy rodu *Lycopersicon* (*L. chmielewski* (LA 2663), středně rezistentní; *L. hirsutum* (LA 2128), vysoce rezistentní) (Mieslerová *et al.* 2000). Kultivace rostlin, patogenu a metodu inokulace popsali Lebeda a Mieslerová (1999).

Druhým modelovým objektem je původce plísně salátové (*Bremia lactucae* Regel, Peronosporales, Oomycota). Tyto houby jsou typické větší vazbou na vodní prostředí (vlhko) a přítomností celulosy v buněčné stěně. Penetrace probíhá přímo a mycelium roste intercelulárně (na rozdíl od padlí, který je ektoparazit a mycelium roste na povrchu rostlinných orgánů a do epidermálních buněk vysílá pouze haustoria). Vztah mezi hostitelem (*Lactuca* spp.) a patogenem (*B. lactucae*) je vysvětlován na základě teorie gen-proti-genu. V současnosti je uváděno více než 40 známých rasově specifických genů, resp. faktorů rezistence (Lebeda a Zinkernagel 2003). V obranných reakcích kulturních, ale i planých *Lactuca* spp. byly kromě rasové specifčnosti popsány nejméně tři další typy rezistence (rasově nespecifická, polní a nehostitelská) (Lebeda *et al.* 2001b). I v rámci

rasově specifické rezistence existují velké rozdíly v jejím projevu (např. hypersenzitivní reakce, reakce subepidermálních buněk, cytoskelet, fenolické látky) (Lebeda a Sedlářová 2003). Kultivace rostlin patogenu a metoda inokulace byly popsány v práci Sedlářová *et al.* (2001).

Během prvních hodin po inokulaci patogenu na listy dochází k syntéze řady nízkomolekulárních antimikrobiálních látek (chinonů, fenolů, alkaloidů) a k expresi proteinů spojených s patogenesí a obrannou reakcí rostlin (Lebeda *et al.* 2001a). Za jeden z významných faktorů v obranných reakcích rostlin je považována přítomnost aktivních forem kyslíku (AOS), které se podílejí na vzniku buněčné smrti (Bestwick *et al.* 1998). Na katabolismu peroxidu vodíku se podílí katalasa (EC 1.11.1.6) a peroxidasa (1.11.1.7), tvořící součást systému stresových reakcí spojených s patogenesí (Siegel 1993, Lebeda *et al.* 2001a). Detekce některých těchto metabolitů (O_2^- , H_2O_2 , POX, lignin) a procesů (buněčná smrt, hypersenzitivní reakce) v rostlinách v průběhu patogenese a obranných reakcích je předmětem tohoto článku.

Podstata metod

Tvorba superoxidového anionu (O_2^-) *in situ* byla detegována pomocí chloridu 2,2'-di-p-nitrofenyl-5,5'-difenyl-3,3'-[3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen]-ditetrazolia (NBT) tvořícího v přítomnosti O_2^- tmavě modrou nerozpustnou sraženinu formazanového komplexu (May *et al.* 1996). *In situ* tvorba peroxidu vodíku (H_2O_2) byla stanovena 3,3'-diaminobenzidín-4HCl (DAB), který reaguje za vzniku tmavě hnědé sraženiny (Thor dal-Christensen *et al.* 1997). Peroxidasa (POX) byla detegována 200 mM Tris-HCl pH 6,0 obsahujícím 1 mM DAB a 10 mM H_2O_2 (Dolores Alcázar *et al.* 1995). Chemikálie byly do listů infiltrovány pod vakuem po dobu 3 h (rajče), respektive 5 h (salát). Reakce byla zastavena varem v ethanolu, který zároveň sloužil k extrakci chlorofylu.

Buněčná smrt (hypersenzitivní reakce) byla lokalizována po odbarvení listu ve směsi ethanol/ledová kyselina octová (3/1) a po inkubaci 24 h v laktoglycerolu pomocí UV excitační fluorescence jako žlutě zbarvené fluoreskující nekrotizované buňky (modifikovaná metoda podle Koga *et al.* 1988).

Pro stanovení ligninu byly listy odříznuty od rostliny a přes noc inkubovány v 70 % ethanolu obsahujícím 1 % (w/v) fluoroglucinol. Po omytí destilovanou vodou listy ponořeny do koncentrované HCl. Lignin se barví oranžově-červeně (Milosevic a Slusarenko 1996).

Pomůcky a chemikálie

0,1 % DAB (3,3'-diaminobenzidín-4HCl) ve vodě; 0,5 % NBT (chlorid 2,2'-di-p-nitrofenyl-5,5'-difenyl-3,3'-[3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen]-ditetrazolia) v 10 mM K-fosfátovém pufru pH 7,8; 200 mM Tris-HCl pH 6,0; ledová kyselina octová; 96 % ethanol; 1 % fluoroglucinol v 70 % ethanolu; laktoglycerol; peroxid vodíku; askorbát; kyselina chlorovodíková; glycerol; 0,5 % Evans blue (tetrasodná sůl 6,6'-[(3,3'-dimethyl[1,1'-bifenylyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[4-amino-5-hydroxy-1,3-naftalendisulfonové kyseliny]).

Eksikátor, vodní lázeň, laboratorní sklo, mikroskop s fluorescenčním nástavcem a kamerou, PC.

Obecný postup

Intaktní tj. neinokulované listy (kontrolní) a listy inokulované padlím resp. plísní, jsou odříznuty od rostliny pod vodou a bezprostředně přeneseny do Petriho misky obsahující nasávaný roztok (NBT, DAB). Listy mohou být šetrně připevněny isolepou ke dnu. Roztok je nasáván do žilek po dobu 3 h (5 h) pod vakuem vytvořeným pomocí eksikátoru. Reakce je ukončena ponořením listu do vroucího ethanolu na cca 10 minut, který zároveň listy odbarví. Pro rehydrataci jsou pletiva ponechána delší dobu v 50 % glycerolu. Při lokalizaci peroxidu vodíku je jako kontrolní roztok použit 0,1 % DAB obsahující 10 mM askorbát, se kterým reakce neprobíhá. Pro lokalizaci buněčné smrti a ligninu jsou listy odbarveny inkubací ve směsi ethanol/ledová kyselina octová (3/1) po dobu 24 h. Pro stanovení hypersenzitivní reakce jsou listy inkubovány dále 4 h ve vodě a poté 24 h v laktoglycerolu (kyselina mléčná/glycerol/voda; 1/1/1). Ke zvýraznění struktur patogenu byla těsně před mikroskopováním přikápnuta pod krycí sklíčko 0,5 % Evans blue. Pro lokalizaci ligninu byly odbarvené listy inkubovány 12 h v roztoku 1 % fluoroglucinolu v 70 % ethanolu, poté propláchnuty destilovanou vodou a ponořeny na 5 min. do koncentrované HCl.

Vyhodnocení výsledků

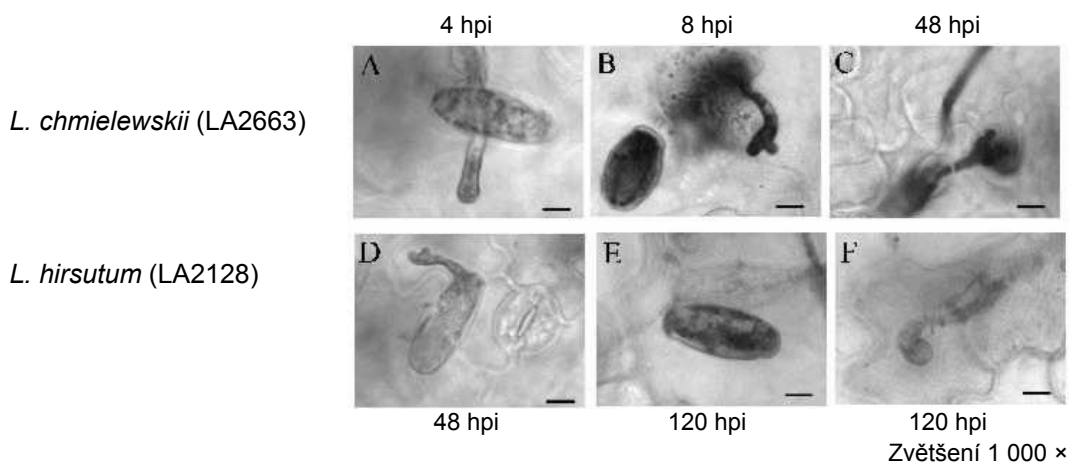
Intenzivní signál potvrzující přítomnost aktivních forem kyslíku (AOS) byl detegován během prvních hodin po inokulaci *O. neolycopersici* na listy (Tab. 1). Superoxidový anion byl prokázán hlavně ve vysoce citlivém genotypu *Lycopersicon esculentum* cv. Amateur, maximální signál 12 hpi (hodin po inokulaci). Peroxid vodíku byl naopak přítomen v listech rezistentních genotypů. Ke vzrůstu peroxidasové aktivity došlo ve dvou fázích, v prvních 4 - 12 hpi byla aktivita dokázána histochemickými metodami, 72 - 168 hpi také biochemickými (spektrofotometrické stanovení aktivity enzymů v listových extraktech) (Angelini *et al.* 1990). Prudký nárůst enzymové aktivity v rezistentních genotypech koresponduje s první expresí hypersenzitivní reakce. Peroxidasová aktivita byla také prokázána uvnitř struktur patogenu (v apikální části prvního klíčícího vlákna a uvnitř neklíčících konidií). K prvním projevům buněčné smrti dochází u *L. chmielewski* a *L. hirsutum* 48 hpi (10 - 15 % buněk), 72 hpi tvoří již mrtvé buňky 44 - 50 %. U vysoce citlivého *L. esculentum* cv. Amateur nebyla hypersenzitivní reakce pozorována. Rovněž se zde projevila velmi nízká produkce peroxidu vodíku odpovídající nízké aktivitě peroxidasy v obou časových intervalech. Tyto metabolické projevy dobře korespondují s náchylností tohoto genotypu. Význam peroxidasové aktivity uvnitř struktur patogenu může být považován za faktor hrající roli v penetraci, ale na druhou stranu může být v neklíčících konidiích spojen se smrtí patogenu. Během prvních 120 hpi nedošlo ke změnám v lignifikaci u žádného ze studovaných genotypů (Lebeda *et al.* 2002).

V žádném ze studovaných genotypů *L. sativa*, *L. serriola*, *L. saligna* a *L. virosa* nebyla detegována přítomnost superoxidu (Tab. 2). Naopak již krátce po inokulaci (6 hpi) je přítomen peroxid vodíku a POX. Byly zjištěny rozdíly v načasování, rozsahu i intenzitě oxidativních procesů, které z velké části korelovaly s dříve studovanými obrannými procesy (exprese HR, změny cytoskeletu, depozice fenolů) (Lebeda a Sedlářová 2003). U náchylných genotypů (*L. sativa*, Cobham Green a UCDM 2; *L. serriola* LSE/18) a dalších genotypů těchto dvou druhů, nedochází do 24 hpi k výraznějším změnám v hladině H₂O₂ a POX. Následuje lehké zvýšení, ale reakce v porovnání s reakcemi planých druhů *L. sa-*

ligna a *L. virosa* je středně silná. Především u posledně jmenovaného druhu je reakce velmi silná již 6 - 12 hpi (souvisí pravděpodobně se zapojením peroxidu vodíku do signalizace), poté dochází ke snížení a výrazný nárůst byl pozorován 30 hpi (počátek programovaných procesů hypersenzitivní reakce, HR). Do HR je většinou zapojena penetrovaná epidermální buňka, případně několik málo buněk sousedních. V genotypech PIVT 1309 (*L. serriola*), CGN 05147 (*L. saligna*) a NVRS 10.001602 (*L. virosa*) se na expresi HR podílí částečně i mesofyl. U těchto genotypů byla zjištěna korelace subepidermální nekrosy s časným (6 hpi) nárůstem přítomnosti POX.

Tab.1. Semikvantitativní hodnocení signálu na AOS a POX v patosystému *Lycopersicon* spp.-*Oidium neolycopersici*.

Genotyp (kultivar) rajčete	AOS	Hodiny po inokulaci							
		4	8	12	16	20	24	48	120
	O ₂ ⁻								
<i>L. esculentum</i> cv. Amateur		++++	++++	+++++	++	+	-	-	-
<i>L. chmielewskii</i> (LA 2663)		++	++	+++	-	-	-	-	-
<i>L. hirsutum</i> (LA 2128)		+	+	-	-	-	-	-	-
	H ₂ O ₂								
<i>L. esculentum</i> cv. Amateur		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. chmielewskii</i> (LA 2663)		++	+++	++	+	+	-	+	++
<i>L. hirsutum</i> (LA 2128)		++	+++	++++	++	+	-	+	+++
	POX								
<i>L. esculentum</i> cv. Amateur		+	+	+	+	-	-	-	-
<i>L. chmielewskii</i> (LA 2663)		++	+++	++++	+	-	-	+	++
<i>L. hirsutum</i> (LA 2128)		+++	+	+	-	-	-	+	+++++

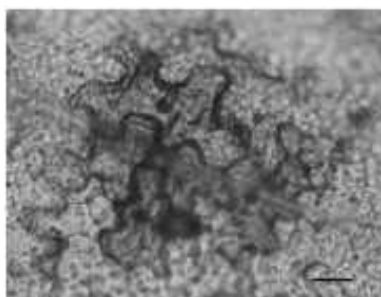


Obr. 1. *Lycopersicon* spp.-*Oidium neolycopersici*: signál potvrzující přítomnost peroxidasy v rostlinném pletivu a uvnitř struktury patogenu. Buněčná smrt u *L. hirsutum* 120 hpi.

Tab. 2. Semikvantitativní hodnocení signálu na AOS a POX v patosystému *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae*

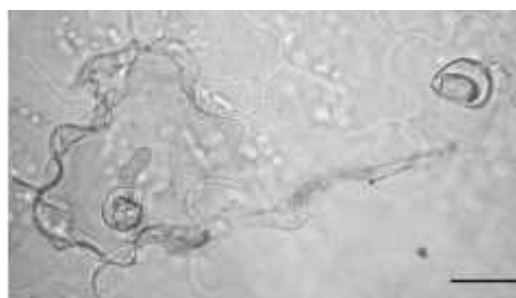
Genotyp (kultivar) lokiky	AOS	Hodiny po inokulaci							
		6	12	18	24	30	36	48	96
O ₂ ⁻									
<i>L. sativa</i> cv. Cobham Green		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. sativa</i> line UCDM 2		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. sativa</i> cv. Mariska		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. serriola</i> (LSE/18)		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. serriola</i> (PIVT 1309)		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. saligna</i> (CGN 05147)		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. saligna</i> (CGN 05271)		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. virosa</i> (NVRS10.001602)		-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ O ₂									
<i>L. sativa</i> cv. Cobham Green		+	-	+	+	-	-	-	+
<i>L. sativa</i> line UCDM 2		+	+	+	+	+	-	-	-
<i>L. sativa</i> cv. Mariska		+	+	+	+	+	+	++	++
<i>L. serriola</i> (LSE/18)		+	+	+	++	+	+	-	+
<i>L. serriola</i> (PIVT 1309)		+	++	++	+++	++	++	+++	++
<i>L. saligna</i> (CGN 05147)		++	+++	+	+	+	+	+	+
<i>L. saligna</i> (CGN 05271)		++	+++	+	+	+	+	+	+
<i>L. virosa</i> (NVRS10.001602)		++++	++++	+++	++	+++++	+++	+	-
POX									
<i>L. sativa</i> cv. Cobham Green		+	+	+	++	+	+	++	++
<i>L. sativa</i> line UCDM 2		+	+	+	++	++	++	+	+
<i>L. sativa</i> cv. Mariska		+	+	+	++	++	+	++	++
<i>L. serriola</i> (LSE/18)		+	+	+	++	+++	+++	+	+
<i>L. serriola</i> (PIVT 1309)		++	+	+	+++	+++	++	+	++
<i>L. saligna</i> (CGN 05147)		++	+	++	++++	+++	+++	+	-
<i>L. saligna</i> (CGN 05271)		+	+	++	+++	+++	++++	++++	-
<i>L. virosa</i> (NVRS10.001602)		++++	++	+++	++	++++	+++	+	-

Z hlediska lokalizace signálu, byla v raných fázích penetrace a vývoje patogenu přítomna POX v cytoplasmě a vázána na plasmatickou membránu hostitelských buněk, ale byla i lokalizována ve sporách patogenu. U H_2O_2 byl signál více difúzní, extracelulárně kolem penetrované buňky, ale i v buňkách sousedních. Tvorba ligninu nebyla studována, ale již dříve byla diskutována nepřítomnost jeho tvorby v interakcích *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae* (Bennet *et al.* 1996, Sedlářová a Lebeda 2001).

*L. virosa* NVRS 10.001 602

30 hpi

peroxid vodíku

*L. sativa* UCDM2

24 hpi

peroxidasa

Zvětšeno 600 ×

Obr. 2. *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae*: příklad lokalizace peroxidu vodíku u *L. virosa* a peroxidasy u *L. sativa*.

Náročnost

Peroxid vodíku, superoxidový radikál, peroxidasa, buněčná smrt a lignin byly prokazovány u *Lycopersicon* spp. ve třech různých genotypích, kontrolních a infikovaných rostlinách, a v desíti časových intervalech. V patosystému *Lactuca* spp. - *Bremia lactucae* bylo studováno 8 genotypů v osmi časových intervalech (nebyl sledován lignin). Metody infiltrace DAB do listů jsou nenáročné, stejně jako detekce buněčné smrti a ligninu. Jediným úskalím je tedy zpracování velkého počtu vzorků.

Úskalí, tipy, triky

Někteří autoři uvádějí metodu injekce roztoku DAB (NBT) do listů, jejíž výhodou je oddělení listu od rostliny až po průběhu reakce. Dochází však k lokální destrukci pletiva v oblasti vpichu, které u jemných pletiv locik může dosáhnout většího rozsahu (i díky nízkému pH roztoku DAB). Abychom se co nejvíce vyhnuli mechanickému poškození, které vyvolává tvorbu AOS, zvolili jsme způsob nasávání roztoků přes cévní svazky. Je výhodné odřezávat listy od stonku pod vodou, neboť do žilek nepronikne vzduch bránící infiltraci roztoků. V případě, že list plave na hladině roztoku, lze ho přilepit proužkem isolepy ke dnu Petriho misky. Pokusných listů se přitom co nejméně dotýkáme. Větší množství vzorků lze v glycerolu uchovávat do doby zpracování v lednici (v +4 °C).

Jestliže dochází k destrukci pletiva při stanovení ligninu ponořením do koncentrovaného HCl, pak lze použít pro fixaci před mikroskopováním glycerol okyselený kyselinou sírovou.

Alternativní metody

Injekce roztoků DAB a NBT do pletiv infikované rostliny (Heath 1998).

Peroxidasy:

Stanovení POX metodou otisku na nitrocelulosovou membránu s využitím 4-chloro-1-naftolu (Ray a Hammerschmidt 1998).

Histochemická lokalizace infiltrací guaiakolu a peroxidu vodíku ve fosfátovém pufru (Angelini *et al.* 1990).

Imunohistochemická detekce - sekundární protilátka značená zlatem (Olmos *et al.* 1997).

Peroxid vodíku:

Histochemické stanovení pomocí škrobu a jodidu draselného za vzniku modrofialového komplexu (Olson a Varner 1993, Řepka 1999).

Cytochemická detekce (TEM) reakcí s CeCl₃ za vzniku tmavé sraženiny perhydroxidu ceru (Bestwick *et al.* 1997).

Superoxid:

Histochemická lokalizace superoxidového radikálu pomocí NBT s využitím chlo-ralhydrátu (Vallélian-Bindschedler *et al.* 1998).

Literatura

- Angelini, R., Manes, F., Federico, R. 1990. - *Planta* **182**: 89.
- Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., Carver, T.L.W. (eds.) 2002. - *The Powdery Mildews. A Comprehensive Treatise*. APS Press, St. Paul.
- Bennett, M., Gallagher, M., Fagg, J., Bestwick, C., Paul, T., Beale, M., Mansfield, J. 1996. - *Plant J.* **9**: 851.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennett, M.H.R., Mansfield, J.W. 1997. - *Plant Cell* **9**: 209.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Mansfield, J.W. 1998. - *Plant Physiol.* **118**: 1067.
- Dolores Alcázar, M., Egea, C., Espín, A., Candela, M.E. 1995. - *Physiol. Plant.* **94**: 737.
- Heath, M.C. 1998. - *New Phytol.* **138**: 251.
- Koga, H., Zeyen, R.J., Bushnell, W.R., Ahlstrand, G.G. 1988. - *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **32**: 395.
- Lebeda, A. 1988. - *Biol. Listy* **53**: 178.
- Lebeda, A., Luhová, L., Sedlářová, M., Jančová, D. 2001a. - *J. Plant Dis. Protect.* **108**: 89.
- Lebeda, A., Mieslerová, B. 1999. - *Acta Phytopathol. Entom. Hung.* **34**: 15.
- Lebeda, A., Mieslerová, B. 2000. - *Plant Protect. Sci.* **36**: 156.
- Lebeda, A., Mieslerová, B., Luhová, L., Mlíčková, K. 2002. - *Plant Protect. Sci.* **38** (Special Issue 1): 141.
- Lebeda, A., Pink, D.A.C., Mieslerová, B. 2001b. - *J. Plant Pathol.* **83**: 25.
- Lebeda, A., Rod, J. 1990. - *Zahradnictví* **15**: 313.
- Lebeda, A., Sedlářová, M. 2003. - In: *Eucarpia Leafy Vegetables Conference 2003*. S. 55. CGN, Wageningen.
- Lebeda, A., Schwinn, F.J. 1994. - *J. Plant Dis. Protect.* **101**: 225.
- Lebeda, A., Zinkernagel, V. 2003. - *J. Phytopathol.* **151**: 274.
- May, M.J., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. 1996. - *Plant Physiol.* **110**: 1367.
- Mieslerová, B., Lebeda, A. 1999. - *J. Plant Dis. Protect.* **106**: 140.
- Mieslerová, B., Lebeda, A., Chetelat, R.T. 2000. - *J. Phytopathol.* **148**: 303.
- Milosevic, N., Slusarenko, A.J. 1996. - *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **49**: 143.
- Olmos, E., Piqueras, A., Martínez-Solano, J.R., Hellín, E. 1997. - *Plant Sci.* **130**: 97.
- Olson, P.D., Varner, J.E. 1993. - *Plant J.* **4**: 887.
- Ray, H., Hammerschmidt, R. 1998. - *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **53**: 81.
- Řepka, V. 1999. - *Biol. Plant.* **42**: 599.
- Sedlářová, M., Lebeda, A. 2001. - *J. Phytopathol.* **149**: 1.
- Sedlářová, M., Lebeda, A. 2002. - *Biol. Listy* **67**: 59.
- Sedlářová, M., Lebeda, A., Pink, D.A.C. 2001. - *J. Plant Dis. Protect.* **108**: 477.
- Siegel, B.Z. 1993. - *Plant Growth Regul.* **12**: 303.

- Spencer-Phillips, P.T.N., Gisi, U., Lebeda, A. (eds.) 2002. - *Advances in Downy Mildew Research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Thordal Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B. 1997. - *Plant J.* **11**: 1187-1194.
- Vallélian-Bindschedler, L., Schweizer, P., Mössinger, E., Métraux, J.P. 1998. - *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **52**: 185.
- Whipps, J.M., Budge, S.P., Fenlon, J.S. 1998. - *Plant Pathol.* **47**: 36.

Poděkování. Výzkum byl podporován projektem MŠMT „Stresová a patologická biologie, biochemie a bioenergetika rostlin“ (MSM 153100010) a GAČR 522/02/D011.

Porovnání metod izolace RNA pro detekci latentního viroidu chmele (HLVd) pomocí *Dot-blot* molekulární hybridizace a RT-PCR u chmele (*Humulus lupulus*)

JOSEF PATZAK

Chmelařský institut s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec, (tel.: 415 732 109, Fax: 415 732 150, e-mail: j.patzak@telecom.cz)

Úvod

Viroidy jsou nezávislou třídou rostlinných patogenů, autonomně se replikujících molekul RNA, bez proteinového pláště. Kružnicová, infekční RNA, vysoce stabilní, se sekundární strukturou podobnou tyčince o velikosti 246 až 401 nt, je plně závislá a adaptovaná na metabolismus hostitelské rostliny. Replikace probíhá mechanismem otáčející se kružnice. RNA polymerasa II syntetizuje (-) polymerní řetězce sloužící jako matrice (+) polymerům, jež jsou štěpeny na monomery a ligovány do kroužků. Syntéza je lokalizována v buněčném jádře a jadérku. U molekul viroidů podskupiny viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (PSTVd) můžeme rozlišit pět strukturních domén, charakteristických pro nativní stav: centrální konzervativní oblast (CCR), oblast patogenity, oblast s vysokou sekvenční variabilitou a dvě koncové domény. Do této podskupiny patří i chmelové viroidy (Diener 1999).

Chmel patří svou rozlohou, 80 tisíc hektarů ve světovém měřítku, k minoritním hospodářským plodinám, přesto náleží k plodinám s dlouholetou pěstitelskou minulostí. Jeho pěstování v České republice má nejméně tisíceletou historii a vždy znamenalo vysoký ekonomický podíl na celkovém hospodářství státu. Na chmelu parazitují dva viroidy: viroid zakrslosti chmele (HSVd), o velikosti 297 nukleotidů, a latentní viroid chmele (HLVd), o velikosti 256 nukleotidů. HSVd se na chmelu vyskytuje pouze v Japonsku a Jižní Korei, avšak jednotlivé kmeny HSVd parazitují celosvětově na dalších hostitelských rostlinách trvalých kultur, jako jsou ovocné stromy a réva vinná. HLVd parazituje pouze na chmelu a vyskytuje se celosvětově téměř na všech pěstitelských plochách.