

# EFFECT OF PLANT DEFENSE ELICITORS ON THE LEVEL OF PHYTOHORMONES

## VLIV ELICITORŮ OBRANNÉ REAKCE NA HLADINU FYTOHORMONŮ

**Marečková M., Havel L.**

Ústav botaniky, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: mareckova@seznam.cz, lhavel@mendelu.cz

---

### ABSTRACT

The purpose of my research was to observe the effect of elicitors on the synthesis of plant hormones cytokinins in tobacco suspension cells. Elicitors are substances that can induce defense responses when applied to plant tissues or cultured-plant cells. It was used elicitors ergosterol and cryptogein in my research. Ergosterol is elicitor from plasmatic membrane of fungi. It was add as complex with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. The effect of the ergosterol was compared with that of cholesterol, which did not activate induce defense responses. Cryptogein is small protein - elicitin, which is secreted by *Phytophthora cryptogea*. Cytokinins are plant regulators, which play a crucial role in various phases of plant growth and development. All native cytokinins are derivatives of adenine with substituent at N6 position. Cytokinins affect growth and regeneration of plants. Concentration of cytokinins was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with mass spectrometry (MS) detection. It was also observed the viability of tobacco suspension cells. The viability was measured through determination of intracellular esterase activity and through using of fluorescent colour propidium iodide (PI) and fluorescein diacetate (FDA). Experimental system was cultures of tobacco suspension cells cv. Xanthi. Added elicitor decreased the viability of tobacco suspension cells compared with control tobacco culture. The viability of the cells suspension was extremely decreased by the cryptogein. It was observed that the concentration of cytokinins increased with increasing concentration of elicitors. This effect was observed in presence of both elicitors.

**Key words:** Elicitors, tobacco, ergosterol, cryptogein, cytokinins

## ÚVOD

V mé práci byl sledován efekt elicitorů na syntézu fytohormonů cytokininů u rostlinných kalusů tabáku. Elicitory jsou biologicky aktivní sloučeniny, schopné vyvolat u rostliny obrannou reakci. Jako elicitory mohou sloužit jednak některé metabolity vylučované patogeny, tzv. exogenní elicitory, a sloučeniny, které se uvolňují narušováním buněčné stěny obou organismů, tzv. endogenní elicitory (Gloser, Prášil 1998) V práci byly použity elicitory ergosterol a cryptogein. Ergosterol je nízkomolekulární elicitor pocházející z plasmatické membrány hub. Spolu s chitinovými oligomery byl detekován ve vodném extraktu z houby václavky (*Armillaria ostoyae* a *A. mellea*) (Víteček, Kašparovský *et al.* 2005) Ergosterol byl přidáván ve formě komplexů s 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinem a jeho efekt byl srovnáván s cholesterolem, který reakci nevyvolává. Cryptogein je malý protein, který byl izolován z houby *Phytophthora cryptogea* (Zanetti *et al.* 1992).

Cytokininy jsou skupina rostlinných hormonů. Přirozené cytokininy jsou deriváty adeninu substituované na aminoskupině v poloze 6. Ovlivňují růst a vývoj rostlin, podílejí se na regulaci organogeneze a regeneraci rostlin, spolu s dalšími fytohormony zprostředkovávají odpověď rostlin na faktory vnějšího prostředí (Kamínek 1997). Koncentrace cytokininů byla stanovována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Vedle koncentrace cytokininů byla také sledována životnost kalusu tabáku pomocí stanovení aktivity intracelulárních esterás a barvením fluorescenčními barvivy propidium jodidem a fluoresceindiacetátem. K pokusům byla použita kultura buněčné suspenze tabáku varianty Xanthi.

## MATERIÁL A METODIKA

### Rostlinný materiál

Pro pokusy byla použita kultura buněčné suspenze tabáku *Nicotiana tabacum* var. Xanthi kultivovaná na médiu Murashige & Skoog. Byla umístěna v 250 ml Erlenmeyerových baňkách na třepačce při  $27 \pm 1$  °C a  $135 \text{ ot. min}^{-1}$  na světle. Pasáž byla prováděna po 3 až 4 dnech v poměru 1:6.

Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku pomocí barvení fluorescenčními barvivy propidium jodidem a fluoresceindiacetátem

Propidium jodid je propouštěn přes cytoplazmatickou membránu dovnitř buňky a způsobuje ve fluorescenčním mikroskopu v případě mrtvé buňky červené fluorescenční zbarvení. Fluoresceindiacetát je v živých buňkách štěpen na octan a fluorescein, který zeleně fluoreskuje. Pozorování bylo prováděno pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu. Celková životnost je pak daná počtem živých buněk v preparátu (Víteček *et al.* 2004).

Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteras

Stanovení esteras je založeno na fluorimetrické detekci produktů hydrolyzy fluoresceindiacetátu. Fluoresceindiacetát hydrolyzuje jak působením esteras, tak i samovolně. Aby bylo možno vypočítat „čistou enzymovou hydrolyzu“ odečtením blanku, je nutné provést všechny inkubace ve stejném čase. Protože po porušení celistvosti buněk dochází k postupné degradaci buněčného obsahu působením lytických enzymů, které snižují výtěžek esteras, musí se celá izolace provádět na ledové lázni a po co nejkratší dobu (Víteček *et al.* 2005).

Stanovení celkového obsahu cytokininů v buněčné suspenzi tabáku pomocí HPLC s MS detekcí.

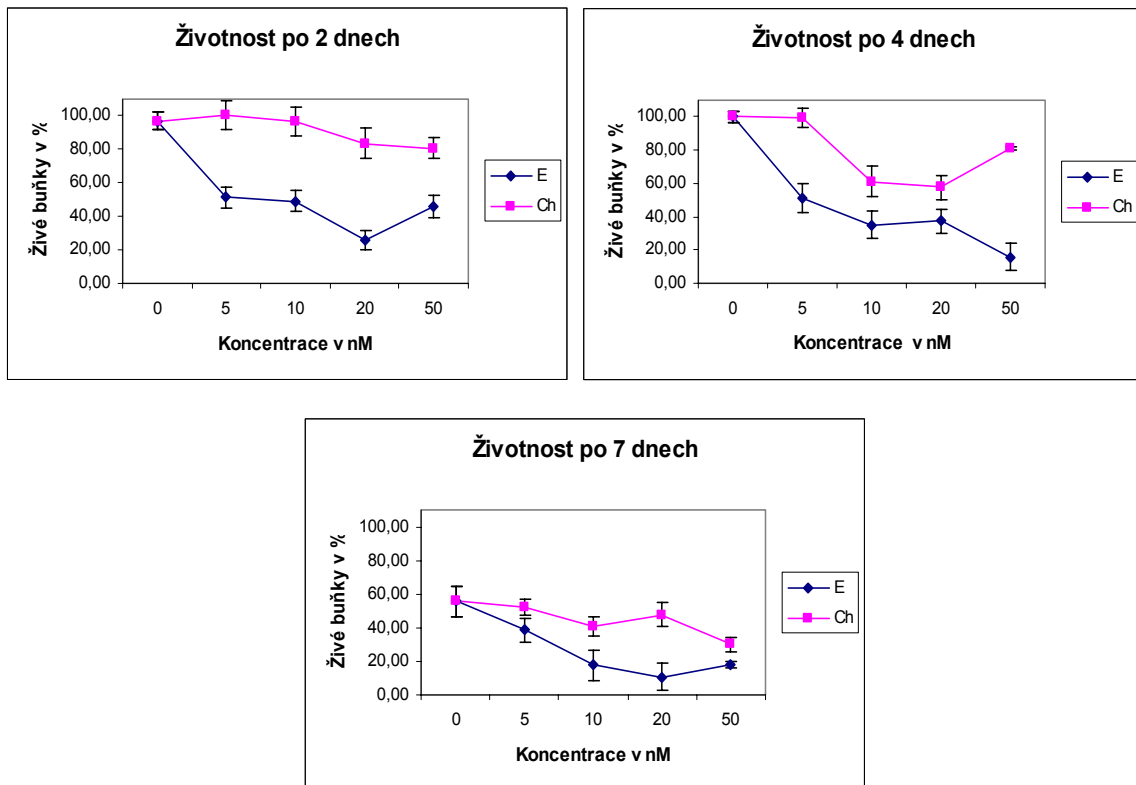
Pro izolaci cytokininů byla použita kyselá izolace cytokininů. Jedná se o extrakci 4 % kys. trichloroctovou. Jako poslední krok čištění vzorku byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi, která kromě odstranění nečistot umožňuje také separaci jednotlivých cytokininů a jejich následné stanovení. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr. V HPLC na reverzní fázi se jednotlivé látky eluují postupně v pořadí snižující se polaritu, tzn. že v tomto chromatografickém systému byly látky polární eluovány z kolony dříve než látky méně polární, případně nepolární. Byly detekovány tyto cytokininy: benzyladenin-7-glukosid, benzyladenin-9-ribosid a benzyladenosin-5-monofosfát.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

### Vliv elicitoru ergosterolu na tabák var. Xanthi

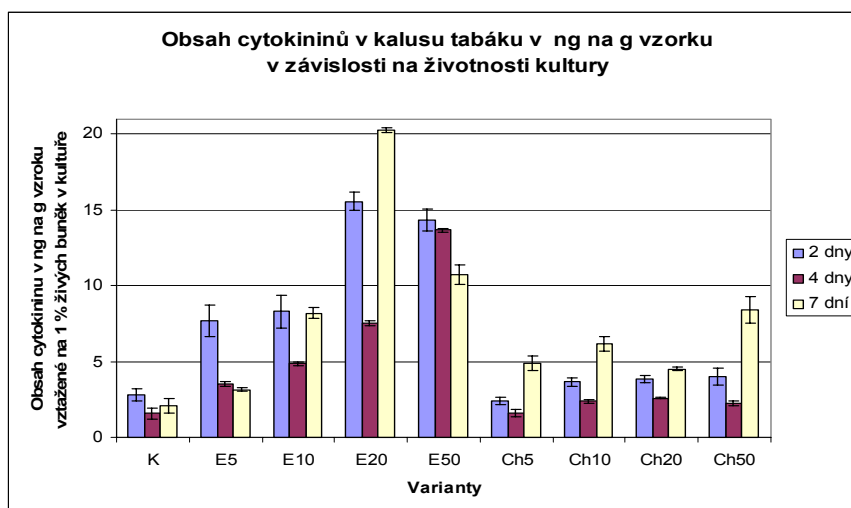
K pokusu bylo použito čtyř různých koncentrací ergosterolu a to 5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM. Jako kontrola byl použit cholesterol ve stejných koncentracích jako ergosterol. Efekt byl sledován po dobu sedmi dnů, vzorky byly odebírány po 2, 4 a 7 dnech kultivace. Vždy byla ještě současně s variantami s ergosterolem a cholesterolem kultivována kontrolní varianta bez přídavku. Byl potvrzen vliv ergosterolu na tabák var. Xanthi. Výsledky se shodovaly jak u stanovení životnosti pomocí esteras, tak i pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA (graf 1, 2 a 3). Varianty, kde byl přidán ergosterol, měly životnost nižší než varianty kontrolní. Naproti tomu v práci Kašparovského (2004), kde byla stanovována životnost kultury tabáku v závislosti na koncentraci ergosterolu, nebyl zaznamenán pokles životnosti vůči kontrole. Vliv na větší citlivost buněk tabáku vůči elicitoru ergosterolu mohly mít rozdílné podmínky kultivace, a to především rozdíl v době osvětlení. Dále mohla být kultura ovlivněna také látkou pomocí, které byl ergosterol rozpuštěn. V případě práci Kašparovského (2004) byl jako rozpouštědlo použit methanol. Je tedy možné, že 2 hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin, pomocí kterého byl ergosterol a cholesterol rozpuštěn, mohl ovlivňovat životaschopnost buněk, a v případě ergosterolu ještě násobit jeho účinek.

Graf 1, 2 a 3 : Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po dvou, čtyřech a sedmi dnech kultivace.



Stanovení cytokininů potvrdilo přítomnost derivátů benzyladeninu. Byl stanoven celkový obsah cytokininů na g vzorku. Bylo potvrzeno, že přítomnost elicitoru zvyšuje koncentraci cytokininů v tabáku var. Xanthi. Největší rozdíly byly pozorovány po dvou dnech kultivace. V následujících dnech už nebyl rozdíl obsahu cytokininů mezi variantami s ergosterolem a kontrolou tak výrazný. To může být způsobeno poklesem životnosti u variant s ergosterolem a tím snížení počtu živých buněk s cytokininy ve vzorku odebraném na stanovení cytokininů. Proto byl celkový obsah cytokininů vztažen na 1 % živých buněk v kultuře. V grafu 4 je vidět, že přítomnost ergosterolu výrazně zvyšovala koncentraci cytokininů v tabáku var. Xanthi, a to během všech sedmi dnů kultivace. Dále bylo pozorováno, že se zvyšující se koncentrací ergosterolu se zvyšovala i koncentrace cytokininů. Výrazné zvýšení obsahu cytokininů v buňkách tabáku může být pravděpodobně způsobeno tím, že buňky tabáku reagují na stres vyvolaný ergosterolem zvýšeným příjmem cytokininů z média. Cytokiny totiž mimo jiné zvyšují toleranci vůči extrémním podmínkám prostředí (Macháčková 1998).

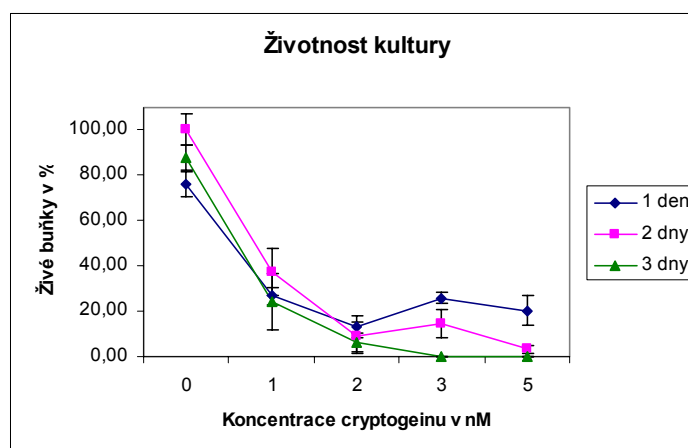
Graf 4: Obsah cytokininů v závislosti na životnosti kultury.



### Vliv elicitoru cryptogeinu na tabák var. Xanthi

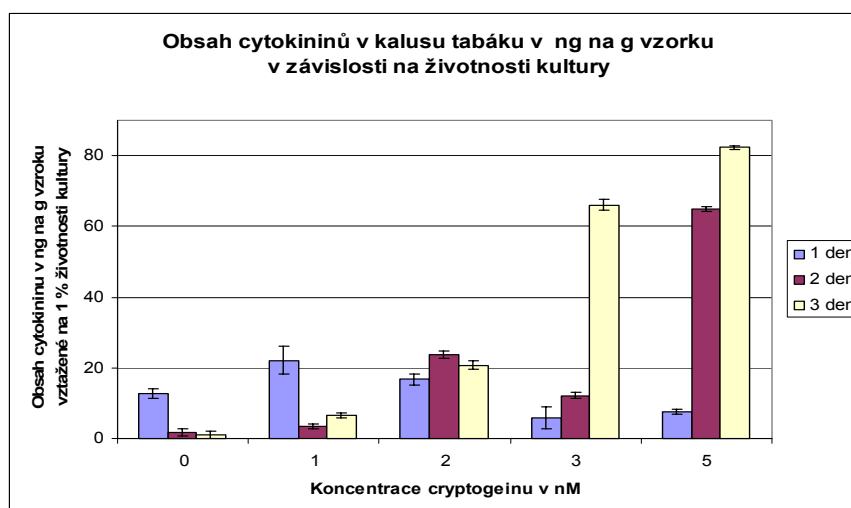
Jako další elicitor byl použit cryptogein, jako kultura byl opět použit tabák var. Xanthi. Protože cryptogein patří mezi  $\square$ -elicitiny, které jsou hodně nekrotizující (Zanetti et al.1992), byly použity nízké koncentrace 1nM, 2nM, 3nM, 5nM, a jeho efekt byl sledován pouze po dobu tří dnů po 1, 2 a 3 dnech kultivace. Vlivem přídavku cryptogeinu docházelo k výraznému snížení životnosti kultury tabáku vůči kontrole. Se zvyšující se koncentrací cryptogeinu se snižovala životnost kultury. Toto potvrdilo jak stanovení životnosti pomocí esterasy tak i pomoci barvení fluorescenčními barvivou PI a FDA. Tyto výsledky se shodují s literaturou (Kašparovský 2004). I zde bylo pozorováno snížení životnosti po přídavku cryptogeinu ke kultuře tabáku var. Xanthi.

Graf 5: Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po jednom, dvou a třech dnech kultivace.



Dále byl stanoven celkový obsah cytokininů na g vzorku. Po prvním dnu kultivace docházelo se zvyšující se koncentrací cryptogeinu k výraznému snižování obsahu cytokininů v tabáku. V dalších dnech už nebyly tak výrazné rozdíly mezi kontrolní variantou a variantami s různou koncentrací cryptogeinu. I zde byl obsah cytokininů vztažen na 1 % živých buněk v kultuře, aby byl eliminován vliv poklesu životnosti buněk tabáku ve vzorku odebraném na stanovení cytokininů (graf 6). První den byl obsah cytokininů vztažený na životnost kultury u variant s cryptogeinem o koncentraci 1 a 2 nM vyšší než u kontrolní varianty, naopak u variant s cryptogeinem o koncentraci 3 a 5 nM byl obsah cytokininů nižší než u kontrolní varianty. To může být způsobeno rozdílnou dobou adaptace na nové podmínky po přenesení buněk do nového média. U variant s cryptogeinem je pravděpodobně vlivem stresu třeba delší doba na adaptaci buněk na nové podmínky, tím je možné vysvětlit nižší příjem cytokininů z média. Po dvou a třech dnech kultivace docházelo k výraznému zvyšování obsahu cytokininů u jednotlivých variant s cryptogeinem oproti kontrole. S rostoucí koncentrací cryptogeinu v médiu se zvyšoval i obsah cytokininů, tak jak tomu bylo i v případě použití elicitoru ergosterolu. Z toho vyplývá, že přítomnost elicitoru zvyšuje koncentraci cytokininů. Nejvyšší nárůst cytokininů byl zaznamenán po dvou dnech kultivace u varianty s cryptogeinem o koncentraci 5 nM a po třech dnech kultivace u varianty s cryptogeinem o koncentraci 3 a 5 nM. Tedy u variant, kde byla životnost nenižší. Vlivem velmi nízké životnosti, a tedy velkého počtu mrtvých buněk, by mohl být v těchto případech celkový obsah cytokininů ovlivněn i cytokininy, které by mohly ještě zůstat v mrtvých buňkách v kalusu. Tím by mohlo docházet ke zvyšování jejich celkového obsahu ve vzorcích s velmi nízkou životností. To by mohlo částečně vysvětlit výrazné zvýšení obsahu cytokininů u variant s koncentracemi cryptogeinu 3 a 5 nM. Pro přesné rozlišení jaký obsah cytokininů je pouze v živých buňkách a kolik jich zůstalo v mrtvých buňkách, by se muselo pravděpodobně využít nějaké molekulárně-biologické metody.

*Graf 6: Obsah cytokininů v závislosti na životnosti kultury.*



## ZÁVĚR

Byl prokázán vliv elicitoru ergosterolu a cryptogeinu na životnost a obsah cytokininů v kultuře buněčné suspenze tabáku var. Xanthi. Vlivem přídavku elicitoru ke kultuře docházelo ke snížení životnosti kultury tabáku. To bylo potvrzeno jak stanovením životnosti pomocí esterasy tak i pomocí barvení fluorescenčními barvivy propidium jodidem a fluoresceindiacetátem. Dále byl stanoven celkový obsah cytokininů. V buněčné suspenzi tabáku var. Xanthi byly detekovány tyto cytokininy: benzyladenin-7-glukosid, benzyladenin-9-ribosid a benzyladenosin-5-monofosfát. Přítomnost elicitoru zvyšuje koncentraci cytokininů v tabáku var. Xanthi.

## LITERATURA

- Gloser J., Prášil I. (1998): Fyziologie stresu. In Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol.: Fyziologie rostlin. Academia Praha: 412 – 430.
- Kamínek M. (1997): Cytokininy. In Procházka S., Šebánek J. a kol.: Regulátory rostlinného růstu. Academia Praha: 63 – 76.
- Kašparovský T. (2004): Disertační práce. MU Brno.
- Macháčková I. (1998): Růst a vývoj: Růstové regulátory. In Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., a kol.: Fyziologie rostlin. Academia Praha: 226 – 243, 253 – 259.
- Víteček J., Adam V., Petřek J., Babula P., a kol. (2005): Aplikace spektrofluorimetrického stanovení esterasy v rostlinném materiálu. Chem. Listy, 99: 496-501.
- Víteček J., Adam V., Petřek J., Vacek J., a kol. (2004): Esterases as a marker for growth of BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of the Norway spruce. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 79: 195-201.
- Víteček J., Kašparovský T., Mikešová M., Mikeš V. (2005): Nonspecific elicitation of defense reaction in suspension tobacco cells by elicitors from *Armillaria*. Folia microbiol, 50: 128 – 132.
- Zanetti A., Beauvais F., Huet J. C., Pernollet J. C. (1992): Movement of elicitors, necrosis-inducing proteins secreted by *Phytophthora*-sp, in tobacco. Planta, 187: 163-170.