

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Fenotypová charakterizace vybraného dvojitého mutanta MAPK v podmínkách abiotického stresu**

### **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Dominik Grebík</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Olga Šamajová, Dr.</b>
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne.....

.....

Dominik Grebík

Rád bych poděkoval své školitelce, Mgr. Olze Šamajové, Dr., za rady, připomínky a pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Také bych rád poděkoval celému oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná za možnost vypracování experimentální části a ochotu pomoci.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Dominik Grebík
Název práce	Fenotypová charakterizace vybraného dvojitého mutanta MAPK v podmínkách abiotického stresu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Teoretická část bakalářské práce se zabývá rostlinou *Arabidopsis thaliana* jako modelovým organismem. Je popsáno fungování mitogenem aktivovaných proteinkinas (MAPK), jako významné součásti rostlinné signalizace. Charakterizovaná je i úloha MAPK při různých stresových podmínkách (sucho, chlad, solný stres, těžké kovy), kterým mohou být rostliny vystaveny. Poslední část je věnována přípravě dvojitého mutanta MAPK jako vhodného nástroje na studium funkce genů kódujících MAPK.

Experimentální část se nejprve zabývá obecnou fenotypovou charakterizací vybraného dvojitého mutanta *mpk4anp3*. Fenotyp tohoto mutanta je srovnáván s příslušnými jednoduchými mutanty *mpk4* a *anp3*. Jako kontrola sloužil divoký typ Col-0. Byl sledován fenotyp kořene, měřena délka primárního kořene, vzdálenost od kořenové špičky po první kořenový vlásek a stanoven počet laterálních kořenů. Pomocí vitální fluorescenční barvičky FM4-64 byly pozorovány průduchy a anatomie kořenové špičky epifluorescenčním a také konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem.

Následně byl studován vliv solného stresu na kořenový systém *mpk4anp3* mutanta. Rostliny byly pěstovány na médiích s různou koncentrací KCl a i zde byla měřena délka kořene, vzdálenost od kořenové špičky po první kořenový vlásek a stanoven počet laterálních kořenů. Dále byl sledován dlouhodobý vliv solného stresu na nadzemní část tohoto dvojitého mutanta. Rostliny byly kultivovány horizontálně na médiích s různou koncentrací KCl a NaCl a stanovila se jejich životaschopnost.

Z našich výsledků vyplývá, že dvojitý mutant *mpk4anp3* je citlivější na solný stres než jednoduší mutanti *mpk4* a *anp3*.

Klíčová slova	dvojitý mutant, MAPK signalizace, abiotický stres, solný stres
Počet stran	72
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Dominik Grebík
Title	Phenotypic characterization of selected MAPK double mutant in abiotic stress conditions
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of cell biology CRH
Supervisor	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
The year of presentation	2018

### Abstract

The theoretical part of the bachelor thesis deals with *Arabidopsis thaliana* as a model plant. The function of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) as an important part of plant signalling and their role in the various stress conditions to which plants may be exposed (drought, cold, salt stress, heavy metals) is also characterized. The last part of this thesis focuses on MAPK double mutants as an appropriate tool for studying functions of MAPK genes.

The experimental part deals with the general phenotypic characterization of the selected double mutant *mpk4anp3*. The phenotype of this mutant is compared to the respective single mutants *mpk4* and *anp3*. Col-0 is used as a control wild type. The general phenotype of the root was studied. Next the root length and distance from the root tip to the first root hair was measured, as well as number of lateral roots were determined. The anatomy of the root tip and stomata were studied under the epifluorescence and laser scanning confocal microscope using fluorescent vital dye FM4-46.

Subsequently, the effect of salt stress on the root system of double mutant was discriminated. Plants were grown on media with different concentrations of KCl and NaCl and their viability was determined. Length of the primary root as well as distance from the root tip to the first root hair was measured. In addition, numbers of lateral roots were counted. Finally, long-term effects of salt stress on the aerial part of double mutant were studied.

Our results show that the double mutant *mpk4anp3* is more susceptible to the salt stress in comparison to the simple mutants *mpk4* and *anp3*.

Keywords double mutant, MAPK signaling, abiotic stress, salt stress

Number of pages 72

Number of appendices 0

Language Czech

## Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Současný stav řešené problematiky</b> .....	<b>12</b>
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> – Huseníček rolní .....	12
2.2 Mitogenem aktivované proteinkinasy .....	13
2.2.1 MAPK a vývoj rostlin.....	15
2.2.2 MAPK a hormony.....	16
2.2.3 MAPK a rostlinná imunita .....	17
2.2.4 MPK4 a ANP2/3 .....	18
2.3 Abiotický stres.....	21
2.3.1 Soli .....	22
2.3.2 Těžké kovy.....	22
2.3.3 Sucho .....	23
2.3.4 Reaktivní kyslíkové radikály .....	24
2.3.5 Teplota .....	24
2.4 Dvojití mutanti .....	25
2.4.1 Dvojití mutanti MAPK .....	27
<b>3 Experimentální část</b> .....	<b>29</b>
3.1 Materiál .....	29
3.1.1 Rostlinný materiál.....	29
3.1.2 Chemikálie .....	29
3.1.3 Roztoky a média .....	29
3.1.4 Přístroje.....	30
3.1.5 Software .....	30
3.2 Metody.....	30
3.2.1 Příprava médií pro kultivaci rostlin <i>in vitro</i> .....	30
3.2.2 Optimalizace podmínek kultivace rostlin <i>in vitro</i> ve stresových podmínkách .....	31
3.2.3 Měření délky průduchů na děložních a pravých listech .....	32
3.2.4 Pozorování anatomie kořenové špičky .....	33
3.2.5 Pozorování a analýza průduchů pravých listů barvených vitálním barvivem .....	33
3.2.6 Statistické metody.....	33
<b>4 Výsledky</b> .....	<b>34</b>
4.1 Fenotypová charakterizace dvojitého mutantu <i>mpk4anp3</i> .....	34
4.1.1 Pozorování fenotypu kořene .....	35
4.1.2 Pozorování anatomie kořenové špičky .....	37
4.1.3 Pozorování a měření délky průduchů u děložních a pravých listů .....	39



4.1.4 Pozorování a měření průduchů pravých listů barvených vitálním barvivem	41
4.2 Vliv solného stresu na fenotyp dvojitého mutantu <i>mpk4anp3</i>	44
4.2.1 Studium vlivu solného stresu na kořen rostlin	44
4.2.2 Míra inhibice délky kořene v podmínkách solného stresu	47
4.2.3 Vliv solného stresu na počet laterálních kořenů	48
4.2.4 Vliv solného stresu na vzdálenost kořenové špičky od kořenového vlásku	51
4.2.5 Vliv solného stresu na nadzemní část roslin	52
<b>5 Diskuze</b>	<b>56</b>
<b>6 Závěr</b>	<b>59</b>
<b>7 Literatura</b>	<b>60</b>
<b>8 Seznam použitých zkratek</b>	<b>72</b>

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

1. Zpracování literární rešerše se zaměřením na problematiku MAPK signálu v odpovědi rostlinných buněk na abiotický stres.

### **Experimentální část**

1. Fenotypová charakterizace vybraného dvojitého mutanta MAPK.
2. Testování optimálních kultivačních podmínek pro pozorování vývoje a růstu vybraného dvojitého mutanta MAPK v podmínkách abiotického stresu.
3. Charakteristika změn fenotypů vybraného dvojitého mutanta MAPK kultivovaného ve stresových podmínkách. Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení růstových parametrů.

## 1 Úvod

Kaskády mitogenem aktivovaných proteinkinás (MAPK) tvořící signální soustavy, jsou součástí všech eukaryotních organismů. U rostlin MAPK sehrávají důležitou roli v regulaci růstu a vývoje, jsou také zapojeny do imunitních a stresových odpovědí (Rodriguez *et al.*, 2010; Bigeard a Hirt, 2018; Komis *et al.*, 2018). Nástroje reverzní genetiky byly při pokusech o odhalení abnormálních fenotypů u rostlin nesoucích mutaci v genech kódujících MAPK ve většině případů neúspěšné. Reverzní genetická analýza u *Arabidopsis* obecně zahrnuje analýzu mutantní linie, ve které gen zájmu nese známou mutaci (Bolle *et al.*, 2011). Mutantní linie *Arabidopsis* je možné získat skrz veřejně dostupné T-DNA kolekce nebo tzv. TILLING populace (Alonso *et al.*, 2003; Till *et al.*, 2003). Následně dochází k pozorování mutantní linie za účelem zjištění, zda daná mutantní linie vykazuje fenotypové odlišnosti od rostliny divokého typu. Povaha abnormálního fenotypu může poskytnout důležité informace nezbytné pro pochopení funkce mutantního genu. Nicméně je poměrně běžné, že linie jednoduchých mutantů nevykazují zjevné fenotypové odlišnosti ve srovnání s rostlinami divokého typu. Provedené analýzy indikují, že pouze 2400 genů u *Arabidopsis* vykazuje abnormální fenotyp v případě, že je narušena jejich sekvence (Lloyd a Meinke, 2012), což je méně než 10 % z asi 27 000 genů kódujících proteiny v genomu *Arabidopsis* (Swarbreck *et al.*, 2008). Jednou ze strategií pro odhalení funkce genu v případech, kdy se u jednoduchého mutanta neprojevuje abnormální fenotyp, je provedení systematického screeningu případných genových interakcí, kterému předchází vytvoření dvojitých mutantů z velké sbírky linií jednoduchých mutantů (Su a Krysan, 2016). Následně se hledají možné genetické interakce, které jsou definovány jako případy, kdy dvojitý mutant nese fenotyp, který nemůže být jednoduše vysvětlen fenotypy jednoduchých mutantů, jež tvoří dvojitého mutanta (Boone *et al.*, 2007; Phillips, 2008; Gao *et al.*, 2010). Jak již bylo zmíněno, většina genů u *Arabidopsis* nevykazuje v případě mutace abnormální fenotyp. Pro takto malá množství abnormálních fenotypů existují různá vysvětlení, pravděpodobným důvodem je funkční redundance (více genů ovlivňuje stejné znaky, a tak případná nefunkčnost jednoho z genů není znát) nebo překrývající se signální dráhy (geny patřící do signálních drah regulují stejný biologický proces). Dalším důvodem může být i skutečnost, že abnormální fenotypy se projeví až v situaci, kdy je rostlina pěstována za specifických podmínek (abiotické stresy) (Lloyd a Meinke, 2012).

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 *Arabidopsis thaliana* – Huseníček rolní

*A. thaliana* je malá dvouděložná rostlina, která patří do čeledi *Brassicaceae* a je rozšířena na několika kontinentech – v Evropě, Asii a Severní Americe. Jedná se o nejvíce studovanou kvetoucí rostlinu a jednu z nejdůležitějších modelových rostlin v biologii rostlin (Meinke *et al.*, 1998).

*A. thaliana* byla původně zvolena jako modelový organismus z důvodu užitečnosti pro genetické experimenty, identifikaci genů a determinace jejich funkce. Důležitými vlastnostmi této rostliny je krátká generační doba, malá velikost, poměrně snadné podmínky pro její pěstování a produkce semen samoopylením (Koorneef a Meinke, 2010). Životní cyklus této rostliny zahrnující klíčení semen, vytvoření růžice, vybíhání hlavního stonku a zrání semen trvá asi 6 týdnů. Jedna rostlina je schopna vyprodukovat až 5000 semen. Semena jsou asi 0,5 mm dlouhá a jsou uložena v pukavých šešulích, listy rostou v přízemní růžici a jsou pokryty trichomy (Meinke *et al.*, 1998).

Sekvenování genomu *Arabidopsis* bylo ukončeno v roce 2000. Analýzou genové sekvence bylo zjištěno, že velikost genomu *Arabidopsis* činí 5 chromozomů, 125 Mb, obsahuje 25 948 genů kódujících proteiny z 11 000 různých rodin. V průběhu evoluce genomu došlo k duplikaci celého genomu, ke ztrátám genů a také k rozsáhlým lokálním genovým duplikacím (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). The Arabidopsis Information Resource (TAIR) je databáze obsahující genetická a molekulárně biologická data pro tento modelový organismus. Databáze obsahuje kompletní genomovou sekvenci společně se strukturou jednotlivých genů nebo genomové mapy (arabidopsis.org – TAIR).

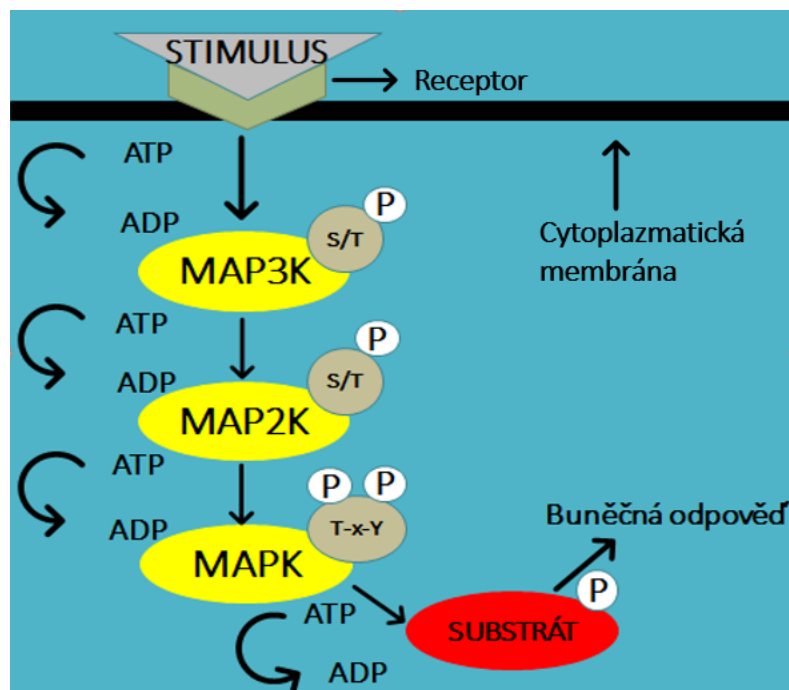
Od doby zveřejnění celého genomu *Arabidopsis* dochází k jeho podrobným, zpřesňujícím studiím (Swarbreck *et al.*, 2008). Nejnovější analýzou sekvence genomu bylo zjištěno, že obsahuje 27 655 genů kódujících proteiny (Cheng *et al.*, 2017).

## 2.2 Mitogenem aktivované proteinkinasy

Komunikace u eukaryot mezi buňkami navzájem a mezi buňkou a prostředím zahrnuje receptory na povrchu buněk. Receptorová vazba ligandů nebo vnímání podnětu z prostředí spouští fosforylaci proteinů, univerzální signální mechanismus zapojený do téměř všech fundamentálních buněčných procesů (Pawson a Scott, 2005; Wang *et al.*, 2007b).

MAPK signální dráhy jsou multienzymové komplexy, které jsou u eukaryot vysoce konzervovány. U rostlin, které jsou sesilnými organismy, hrají tyto signální dráhy důležitou roli při adaptaci (Colcombert a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010). Každá MAPK kaskáda je složena ze souboru tří sekvenčně působících proteinkin. Obecné fungování MAPK je popsáno tak, že receptory na plasmatické membráně aktivují MAP kinasy kinasy kinasy (MAP3K, MAPKKK nebo MEKK). Probíhá sekvenční fosforylace, aktivované MAP3K aktivují MAP kinasy kinasy (MAP2K, MAPKK nebo MKK), které aktivují MAP kinasy (MAPK nebo MPK). MAPK se poté zaměřují na různé efektorové proteiny v cytoplasmě nebo jádře, což mohou být další kinasy, enzymy nebo transkripční faktory (Khokhlatchev *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 2010; Šamajová *et al.*, 2013b) (Obr. 1). MAP3K jsou serinové nebo threoninové kinasy, které fosforylují MAP2K na konzervovaném S/T-X<sub>3-5</sub>-S/T (serin/threonin-X-serin/threonin; X je jakákoliv jiná aminokyselina) motivu (Chang a Karin, 2001). MAPK jsou aktivovány dvojí fosforylací threonin-X-tyrosinového (TXY) motivu v rámci svého aktivačního místa, které má dvojí specifitu (Rodriguez *et al.*, 2010). Formace a integrita specifické MAPK kaskády může být zprostředkována kosterními proteiny nebo sdílenými „docking“ doménami (Whitmarsh a Davis, 1998; Takekawa *et al.*, 2005; Šamajová *et al.*, 2013b).

Interakce mezi MAPK a MAP2K vyžaduje takzvanou D-doménu nebo kinasový interakční motiv proximální k N-konci MAP2K a komplementární CD-doménu k příbuzné MAPK (Dóczy *et al.*, 2012). D-domény je také možno nalézt u dalších interakčních partnerů MAPK jako jsou kosterní proteiny, substráty MAPK, protein tyrosinové fosfatasy a 2C fosfatasy (Bhattacharyya *et al.*, 2006).



Obrázek 1 – Schématické zobrazení MAPK kaskády tvořené MAP3K, MAP2K a MAPK. Po zachycení stimulu z extracelulárního prostoru na cytoplazmatické membráně dochází k aktivaci jednotlivých složek MAPK kaskády pomocí fosforylace (P), hydrolýzou ATP. MAP3K a MAP2K jsou fosforylovány na serinových nebo threoninových zbytcích (S/T), MAPK jsou aktivovány dvojitou fosforylací na T-X-Y motivu (threonin-X-tyrosin; X je jakákoliv jiná aminokyselina), na konci tohoto procesu je buněčná odpověď.

Deaktivace a regulace MAPK aktivity je řízena tyrosin- a serin/threonin- specifickými fosfatasy (Luan, 2003; Bartels *et al.*, 2010). Dvě třídy enzymů z první skupiny – tyrosin specifické fosfatasy (PTPs) a fosfatasy s duální specificitou (DSPs) regulují intenzitu a trvání signálů skrz MAPK kaskády (Luan, 2003). U rostlin je fosforylace threoninu nutná pro aktivaci MPK4 u *Arabidopsis* a inaktivace je řízena PTP1 (Huang *et al.*, 2000). DSP MKP1 je negativní regulátor MAPK v odpovědi na vystavení UV záření a genotoxický stres a pletiva vegetativních orgánů *mkp1* mutantů jsou více rezistentní k zasolení (Ulm *et al.*, 2002). PP2C fosfatasy jsou podskupinou serin/threonin- specifických fosfatasy (Rodriguez *et al.*, 2010).

V genomu *Arabidopsis thaliana* se nachází přibližně 80 genů kódujících MAP3K, 10 genů kódujících MAP2K a 20 genů kódujících MAPK (arabidopsis.org - TAIR). Tyto MAPK mohou potenciálně tvořit velké množství kombinací MAPK kaskád, které mohou vykonávat řadu různých funkcí. Nicméně fenotypy jednoduchých mutantů (např. *mpk4*), dvojitých mutantů (např. *mpk3mpk6*, *mkk4mkk5*) a trojitých mutantů (např. *anp1anp2anp3*) naznačují, že komponenty v každé úrovni kaskády jsou velmi specifické

a nemohou být nahrazeny jinými homology (Xu a Zhang, 2015).

MAPK kaskády jsou zapojeny do hormonálních odpovědi a odpovědi na stres (Sinha *et al.*, 2011; Liu, 2012; Smékalová *et al.*, 2014a), do regulace buněčného dělení, růstu, diferenciaci a programované buněčné smrti (Franklin-Tong a Gourlay, 2008; Müller *et al.*, 2010; Sasabe a Machida, 2012). MAPK kaskády jsou také zapojeny do gametogeneze, embryogeneze a oplodnění (Xu a Zhang, 2015; Komis *et al.*, 2018). ANP1/ANP2/ANP3 (MAP3K) – ortologové NPK1 u tabáku jsou u *Arabidopsis* vysoce exprimovaní v pletivech s probíhajícím buněčným dělením a jsou také zapojeni do cytokineze spolu s MKK6/ANQ1 a MPK4 (Krysan *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2010; Kosetsu *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011). MAPK hrají také nezbytnou roli ve vývoji prašníků (Bush a Krysan, 2007; Hord *et al.*, 2008), pylu (Chaiwongsar *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2014) a vývoji semen (Duan *et al.*, 2014; López-Bucio *et al.*, 2014). Signalizace v důsledku aktivace MAPK může vést k přímým subcelulárním změnám, jako remodelace cytoskeletu fosforylovanými substráty asociovanými s cytoskeletem (Limmongkon *et al.*, 2004; Chang a Nick, 2012; Šamajová *et al.*, 2013b). Aktivovaná MAPK může fosforylovat různé cytoplazmatické a jaderné cíle jakými jsou iontové transportéry, cytoskeletální proteiny a transkripční faktory (Beck *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2011; Sasabe *et al.*, 2011; Ishihama a Yoshioka, 2012).

Použití moderních metod molekulární biologie (např. dvouhybridní kvasinkový screening) a proteomiky (např. fosfoproteomika) umožnilo identifikovat mnoho potenciálních substrátů MAPK, z nichž mnozí hrají důležitou roli právě při růstu a vývoji rostlin (Komis *et al.*, 2018). Příkladem může být protein 65 asociovaný s mikrotubuly (MAP65), který je nezbytný pro stabilitu anafázového dělicího vřeténka v průběhu cytokineze. MAP65 je cílovým proteinem kaskády NPK1-NQK1-NRK1 u tabáku (Sasabe *et al.*, 2006b; Smertenko *et al.*, 2006).

Z detailních studií vyplynulo, že multifunkčnost a různá lokalizace MAPK signalizace umožňují MAPK interagovat s mnoha proteiny, vyměňovat MAP3K a MAP2K partnery (Mok *et al.*, 2010; Dóczi *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2012; Sörensson *et al.*, 2012) a selektivně vybírat substráty (Sörensson *et al.*, 2012; Garai *et al.*, 2012).

### **2.2.1 MAPK a vývoj rostlin**

Bylo zjištěno, že několik stresem aktivovaných MAPK a jejich aktivátorů z řad MAP2K a MAP3K je také zároveň zapojeno do regulace různých rostlinných vývojových procesů. Například SIMK (stresem indukovaná MAPK) u *Medicago sativa* je nejen aktivována

různými biotickými a abiotickými stresy (Jonak *et al.*, 1996; Bögre *et al.*, 1997), ale společně s aktinovým cytoskeletem je zapojena do formace a vývoje kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002). U *Arabidopsis* jsou MAP3K – ANP2/3 zapojeny do posledního stádia buněčného dělení, cytokineze (Krysan *et al.*, 2002). U MPK4, jejímž aktivátorem je ANP2/3 bylo zjištěno, že je esenciální pro rostlinnou cytokinezi (Kosetsu *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2011). Dobrým příkladem vývojového procesu, který je kontrolován MAPK dráhami je vývoj průduchů. U *Arabidopsis* se tato kaskáda skládá z YODA, MKK4/MKK5 a MPK3/MPK6 (Bergmann *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007a; Lampard *et al.*, 2009). YODA mutantní rostliny (*yda1*,  $\Delta$ *Nyda1*) mají zvýšenou hladinu auxinu a vykazují abnormální buněčné dělení v primárních a laterálních kořenech a také odlišnou subcelulární lokalizaci MPK6 a MAP65-1. MPK6 mutant *mpk6-4* má fenotyp kořene podobný *yda1*, což demonstruje důležitost MPK6 v napojení na YODA. YODA a MAPK6 jsou zapojeny do postembryonálního vývoje kořene skrz mechanismus regulující buněčné dělení a organizaci mitotických mikrotubulů, tento mechanismus je závislý na auxinu (Smékalová *et al.*, 2014b). Specifická aktivace rostlinných MAPK je koordinována se specifickými stádii během buněčného dělení. Například MMK3 u vojtěšky a Ntf6 u tabáku jsou lokalizovány v rovině buněčného dělení a stávají se aktivními během mitózy (Calderini *et al.*, 1998; Bogre *et al.*, 1999).

### 2.2.2 MAPK a hormony

MAPK kaskády hrají také důležitou roli nejen v odpovědích na stres a vývoj rostlin, ale také v signalizaci hormonů u rostlin (Jonak *et al.*, 2002; Nakagami *et al.*, 2005). Rostlinné hormony zprostředkovávají odpovědi na stres společně se signálními molekulami (Fujita *et al.*, 2006; Santner a Estelle, 2009). Mezi stresovými hormony jsou ethylen a kyselina jasmonová (JA) esenciální pro determinaci rostlinného obranného mechanismu proti různým stresovým podmínkám a patogenům. U *Arabidopsis* je známo, že JA aktivuje MKK3-MPK6 kaskádu. Genetická analýza využila mutanty MKK3-MPK6 kaskády a bylo zjištěno, že aktivace této dráhy JA negativně regulovala transkripční faktor *AtMYC* (pozitivní regulátor JA indukované genové exprese), tím pádem došlo k ovlivnění JA-závislé genové exprese a zároveň k inhibici růstu kořene (Takahashi *et al.*, 2007). Bylo také zjištěno, že MAPK fosfatasa AP2C1 u *Arabidopsis* reguluje aktivitu MAPK a zároveň množství JA. AP2C1 regulovala přenos signálu (vzniklého poraněním rostliny) skrz defosforylaci MPK4 a MPK6 (Schweighofer *et al.*, 2007). Studie odhalily, že auxinová signalizace je zprostředkován MAPK dráhami zahrnujícími NPK1 (MAP3K)



v tabáku (Kovtun *et al.*, 1998) a ANP1 (ortholog NPK1) u *Arabidopsis* (Kovtun *et al.*, 2000). V nedávné době byl také identifikován nový negativní regulátor auxinové signalizace – MPK12, která zároveň slouží jako substrát MAPK fosfatase zvané IBR5 (Lee *et al.*, 2009b). Etylen hraje důležitou roli nejen při odpovědi rostlin na různé biotické a abiotické stimuly, ale také v růstu a vývoji rostlin (Wang *et al.*, 2002). Je to důležitý hormon, který je rychle indukován v odpovědi na různé stresové podněty jako je ozón, poranění rostliny nebo útok býložravců. Rostliny v takovýchto případech produkují vyšší hladiny ethylenu, což ovlivňuje expresi genů, které jsou ethylenem regulovány a také je ovlivněna fyziologie rostliny (Broekaert *et al.*, 2006; van Loon *et al.*, 2006; War *et al.*, 2012; Xu a Zhang, 2014). Li *et al.* (2018) uvádí, že indukce produkce ethylenu v odpovědi na poranění je regulována MAPK a také na vápníku závislými proteinkinasami (CPK). Již dříve bylo publikováno, že MPK3/MPK6 jsou zapojeny do patogeny indukované biosyntézy ethylenu (Han *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). Z těchto experimentů vyplývá, že produkce ethylenu v reakci na poranění je závislá nejen na MPK3/MPK6, ale také na MKK4 a MKK5, protože u dvojitého mutantu *mkk4mkk5* docházelo k více než 80% redukci syntetizovaného ethylenu (Li *et al.*, 2018).

### **2.2.3 MAPK a rostlinná imunita**

Vrozený imunitní systém v rostlinách zahrnuje dvě obranné linie proti mikrobiálním patogenům (Jones a Dangl, 2006). První linie je složena z transmembránových receptorů – vzor rozeznávající receptory (PRRs), které detekují konzervované s patogenem asociované molekulární vzory (PAMPs), jenž iniciují obranné odpovědi, zahrnující změnu genové exprese a produkci antimikrobiálních sloučenin. Tato obranná linie je známá jako PAMP-spouštěná imunita (PTI). Příkladem PAMP jsou bakteriální elicitory flagellin, harpin a lipopolysacharidy (Rodriguez *et al.*, 2010). K potlačení PTI mohou patogeny přenášet efektorové proteiny do hostitelských buněk, aby potlačili aktivitu PTI signálních sloučenin (Boller a Felix, 2009). Rostliny se brání tím, že si vyvinuly mechanismus, který detekuje mikrobiální efekty skrz imunitní receptory, které se nazývají jako proteiny rezistence (R). Tyto proteiny rezistence spouštějí jednu z forem lokální smrti buněk, která se nazývá hypersenzitivní odpověď (HR). Tato obranná vrstva je označována jako efektor spouštěná imunita (ETI) (Rodriguez *et al.*, 2010). Množství studií označuje MAPK kaskády jako hlavní mechanismus v obraně vůči patogenům u *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

#### 2.2.4 MPK4 a ANP2/3

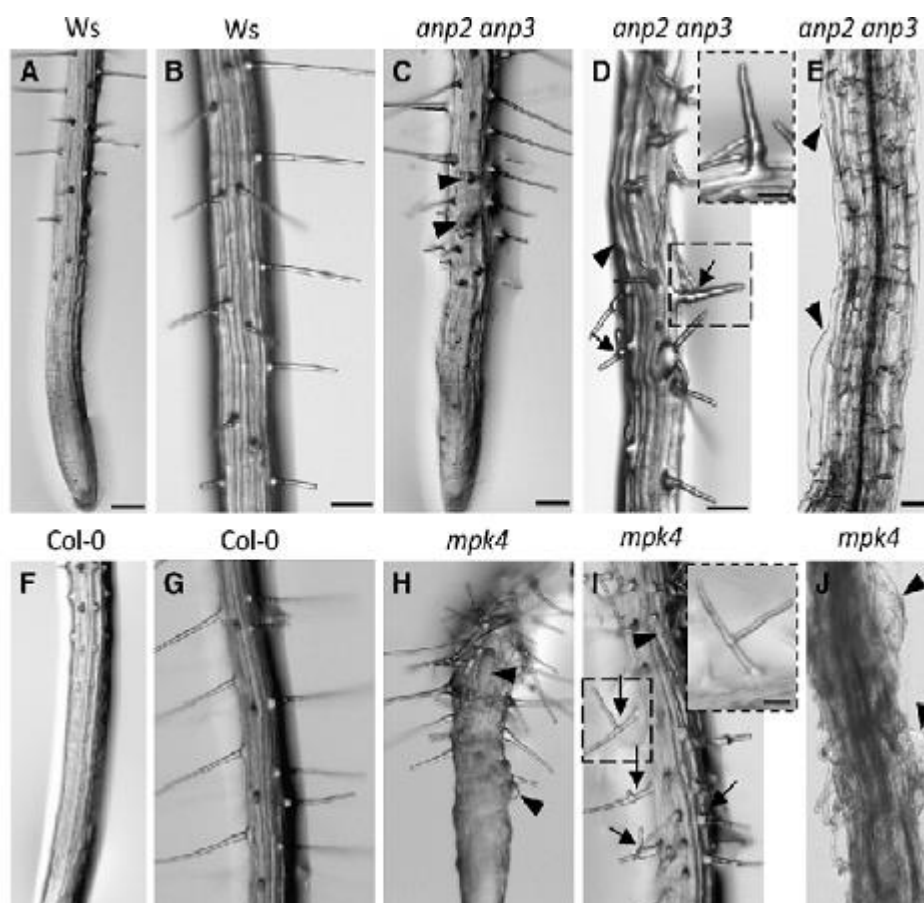
Neznámou byla v minulosti dráha, která kontrolovala cytokinezi u rostlin. Krysan *et al.* (2002) zjistili, že MAP3K hraje roli v kontrole buněčného dělení. ANP geny *Arabidopsis* byly identifikovány na základě jejich homologie s NPK1 genem tabáku (Banno *et al.*, 1993; Nishihama *et al.*, 1997; Machida *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 1998). Ve studii Nishihama *et al.* (2001) bylo demonstrováno, že *NPK1* gen je zapojen do regulace cytokineze u tabáku a NPK1 protein byl lokalizován během cytokineze ve fragmoplastu.

Krysan *et al.* (2002) studovali ANP, které měly T-DNA inzerční mutaci. U jednoduchých homozygotních mutantů ANP1, ANP2 a ANP3 nebyl pozorován abnormální fenotyp. Dále také proběhla fenotypová analýza dvojitého mutantu *anp2anp3*. Dvojitý mutant měl čerstvou váhu přibližně třikrát menší než divoký typ (wild type, WT). Čerstvá váha jednoduchých mutantů nebyla signifikantně odlišná od WT. Při měření délky hypokotylu bylo také zjištěno, že délka u dvojitého mutantu byla asi o 40 % menší ve srovnání s WT. Pomocí skenovací elektronové mikroskopie bylo odhaleno, že dvojitý mutant *anp2anp3* má ve srovnání s WT nepravidelně tvarované buňky hypokotylu, sníženou elongaci a buňky byly nafouklé. Stejně defekty buněk byly pozorovány i u květů. Tyto výsledky demonstrují, že funkční redundance není u ANP rodiny neznámým fenoménem. Například *anp1anp2* rostliny se jevíly jako normální, *anp1anp3* vykazovaly defekty u květů, ale jinak byly normální, nicméně mutant *anp2anp3* byl ovlivněn ve všech studovaných vývojových fázích. I když měl dvojitý mutant *anp2anp3* kratší hypokotyl, šířka hypokotylu byla v porovnání s WT větší. Takováto kombinace redukované délky a větší šířky byla dokumentována i pro jiné mutanty *Arabidopsis*, u genů ovlivňujících dělení buněk a jejich růst (Assaad *et al.*, 1996; Arioli *et al.*, 1998; Nicol *et al.*, 1998). V práci Krysan *et al.* (2002) byly taktéž v epidermální vrstvě pozorovány nezvykle velké nafouknuté buňky. Všechny tři zkoumané MAP3K byly shledány nepostradatelnými, protože trojitý mutant nebyl životaschopný, i když jednoduchá mutace jakéhokoliv z ANP genů neprojevovala abnormální fenotyp zřejmě jako důsledek funkční redundance a mutantní fenotypy se projevíly až u dvojitéch mutantů. Dvojitý mutant *anp2anp3* byl dále studován v dalších pracích.

Beck *et al.* (2010) provedli analýzu postcytokinetických epidermálních fenotypů a regulace organizace kortikálních mikrotubulů u *anp2anp3* a *mpk4* mutantů. Jejich výsledky indikují, že ANP2/ANP3, MPK4 a MAP-65-1 jsou zapojeny do mechanismu růstu buněk závislého na mikrotubulech.

Regulace růstu rostlin a tvar orgánů jsou úzce spojeny s růstem buněk a cytomorfogenezí (Smith, 2001). Obě tyto funkce jsou asociovány s regulací organizace a dynamiky mikrotubulů (Sieberer *et al.*, 2005; Sedbrook a Kaloriti, 2008). Mikrotubuly jsou polymery složené z dimerových jednotek alfa a beta tubulinu s vlastností se samoorganizovat do komplexních struktur (Desai a Mitchison, 1997). Na stavbě a fungování mikrotubulů se podílejí proteiny asociované s mikrotubuly a regulační proteiny, které regulují afinitu MAP k povrchu mikrotubulů (Cassimeris a Spittle, 2001) nebo dynamickou organizaci velkých populací mikrotubulů (Wasteneys, 2002; Sedbrook, 2004; Sedbrook a Kaloriti, 2008; Krtková *et al.*, 2016).

Při práci s dvojitým mutantem *anp2anp3* a mutantem *mpk4* v publikaci Beck *et al.* (2010) vyplynulo, že zakrslá velikost *mpk4* a cytokinetické defekty v epidermálních buňkách listu byly podobné s fenotypem, který byl již dříve pozorován u mutantu *anp2anp3* (Krysan *et al.*, 2002). Oba mutanti byli menšího vzrůstu a měli významně kratší kořeny ve srovnání s WT. Detailní mikroskopické zkoumání odhalilo, že na kořenech se u obou mutantů nacházely rozvětvené kořenové vlásky ve srovnání s WT (Obr. 2).



Obrázek 2 – Srovnání fenotypů kořene mezi mutanty *anp2anp3*, *mpk4* a jejich WT (A, B, F, G). Černé šipky na obrázcích (C, D, E, H, I, J) značí nafouknuté epidermální buňky a rozvětvené kořenové vlásky (převzato z Beck *et al.*, 2010).

Statistická analýza ukázala, že ektopické kořenové vlásky tvořily 48 % všech kořenových vlásků u *anp2anp3* mutanta a 75 % u *mpk4* mutanta. Epidermální buňky kořene u obou mutantů vykazovaly také radiální expanzi, což indikuje defekt v regulaci kortikálních mikrotubulů (MT). Analýza exprese MPK4 pomocí GUS reportérového genu ukázala, že promotor MPK4 byl aktivní jak v prvních stádiích vývoje kořenových vlásků, tak v rostoucích vláscích, což potvrzuje roli MPK4 ve vývoji kořene, včetně vývoje a růstu kořenových vlásků a epidermálních buněk. Analýza organizace MT ukázala, že ve srovnání s WT se MT u obou mutantů jeví silně svazkovité a vykazovaly náhodné uspořádání v nafouknutých buňkách. Kortikální mikrotubuly *mpk4* a *anp2anp3* mutantů byly také více rezistentní na Oryzalin, látku způsobující depolymerizaci mikrotubulů.

Použitím styrylových barviv FM4-64 a FM4-65 Beck *et al.* (2010) zjistili, že zatímco kořeny WT rostlin měly řádné uspořádání buněk ve sloupcích, u mutantů *mpk4* a *anp2anp3* bylo toto uspořádání buněk narušeno. Bližším pozorování bylo zjištěno, že se

v kořenech obou mutantů vyskytovaly neúplné buněčné přepážky. Dále bylo odhaleno, že většina zvětšených buněk měla dvě nebo více jader.

MAP65-1 je zapojen do sdružování mikrotubulů během expanze fragmoplastu v průběhu cytokineze (Sasabe a Machida, 2012; Smertenko *et al.*, 2006). Předešlé studie asociovaly členy MAP65 rodiny s MAPK signalizací (Sasabe *et al.*, 2006a; Smertenko *et al.*, 2006). MAP65-1 u *Arabidopsis* je fosforylována MPK4 a MPK6 (Smertenko *et al.*, 2006). Homolog MAP65-1 u tabáku je fosforylován NRK1 (Sasabe a Machida, 2006) a je zapojen do regulace MT během expanze fragmoplastu. Živá pozorování mitotických vřetének a fragmoplastů ukázala, že pozorované defekty byly závislé na organizaci a dynamice MT a ve studii bylo dokázáno, že MPK4 je zapojena do regulace mitózy a cytokineze skrz modulaci buněčné přepážky a průběhu cytokineze (Beck *et al.*, 2011).

Z dosud uveřejněných prací vyplývá, že existuje určitá funkční souhra mezi ANP proteiny a MPK4. Jak *anp2anp3* tak *mpk4* mají podobné transkriptomické profily a vykazují zvýšenou aktivitu genů reagujících na patogeny jako je chitinasa, beta-1,3-glukanasa a glutathion-S-transferasa (Petersen *et al.*, 2000; Krysan *et al.*, 2002). ANP1 a MPK4 jsou také zapojeny v reakci na oxidativní stres (Kovtun *et al.*, 2000; Nakagami *et al.*, 2006). Podle Beck *et al.* (2010) ANP2, ANP3 a MPK4 pravděpodobně fungují ve společné dráze, která reguluje morfogenezi buněk, tvar a svazkování kortikálních MT. Nicméně nemůže být vyloučena ani druhá možnost, že ANP2/ANP3 a MPK4 mohou fungovat v oddělených synergických dráhách.

### 2.3 Abiotický stres

Rostliny jsou sesilní organismy, které jsou ve venkovním prostředí neustále vystaveny množství biotických a abiotických stresů. K tomu, aby přežily, si vyvinuly mechanismy pro rychlé vnímání signálů z vnějšího prostředí, mechanismy pro přenos těchto signálů a také pro specifické adaptivní nebo obranné odpovědi. MAPK jsou esenciální a konzervovanou složkou signálních drah u eukaryot a hrají důležitou roli v různých signálních odpovědích (Šamajová *et al.*, 2013a; Smékalová *et al.*, 2014a)

Z mnoha signálních drah, které jsou zapojeny do odpovědi na abiotický stres jsou MAPK kaskády jednou z hlavních drah (Jonak *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2010; Bigeard a Hirt, 2018). MAPK dráhy jsou spouštěny různými abiotickými stresy jako je chlad, vysoká koncentrace soli, vysoké teploty, sucho, poranění, UV záření, ozón nebo intoxikace těžkými kovy (Šamajová *et al.*, 2013a). Hlavními MAPK u *Arabidopsis*, které jsou takovými abiotickými stresy aktivovány jsou MPK4 a MPK6 (Ichimura *et al.*, 2000;

Teige *et al.*, 2004).

Jednou z nejběžnějších stresových situací, které je rostlina vystavena je poranění. To může být způsobeno hmyzem nebo různými abiotickými faktory jako je chlad nebo horko. Poranění spouští produkci rostlinných hormonů (např. JA), zvyšování množství reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), přechodně také  $\text{Ca}^{2+}$  a fosforylaci proteinů (Takahashi *et al.*, 2011).  $\text{Ca}^{2+}$  interaguje přímo s některými transkripčními faktory a může regulovat aktivitu proteinkinás a fosfatás (Das a Pandey, 2010).

### 2.3.1 Soli

Solnému stresu jsou rostliny vystaveny v případě, že se v půdě vyskytují velké koncentrace NaCl. Velké množství soli může mít velmi nepříznivé účinky na růst a vývoj rostlin (Yadav *et al.*, 2011). Solný stres je primárně způsoben toxicitou sodíku, obrana rostliny spočívá v odstraňování  $\text{Na}^+$  z buněk (Munns a Tester, 2008). Vystavení většímu množství soli spouští několik signalizačních dějů, jako je formace ROS (Miller *et al.*, 2010), přechodné zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu (Laohavisit *et al.*, 2012) a akumulace oxidu dusnatého (Khan *et al.*, 2012). Tito sekundární poslové aktivují různorodé signální proteiny včetně MAPK, které hrají stěžejní roli v odpovědích rostlin (Smékalová *et al.*, 2014a). U *Arabidopsis* je aktivována MKKK20, která se nachází ve stejné signalizační kaskádě jako MPK6 (Kim *et al.*, 2012). Je zajímavé, že *mekk1* mutanti u *Arabidopsis* vykazují zlepšený růst za podmínek vyšší koncentrace soli, což naznačuje, že v kontrastu s MKKK20, může být MEKK1 negativním regulátorem v odpovědi na solný stres (Su *et al.*, 2007). Vedle již zmíněné MPK6 je aktivována také MPK4, hlavním aktivátorem těchto MAPK je MKK2. Mutanti *mkk2* s poškozenou funkcí MKK2 jsou na sůl hypersensitivní (Teige *et al.*, 2004). MKK9 aktivuje MPK3 a MPK6 (Zhao a Guo, 2011), a *mkk9* knockout mutanti vykazují sníženou citlivost na sůl (Xu *et al.*, 2008). Zvýšené hladiny NaCl slabě aktivují MKK1, která naopak fosforyluje MPK4 (Matsuoka *et al.*, 2002). MPK6 hraje u *Arabidopsis* klíčovou roli v toleranci solného stresu způsobeného NaCl. V práci Han *et al.* (2014) bylo zjištěno, že růst kořene u *mpk6* mutanta byl méně citlivý na NaCl než WT, což bylo způsobeno tím, že *mpk6* mutant zmírňoval akumulaci  $\text{Na}^+$  v kořenových buňkách.

### 2.3.2 Těžké kovy

Vodní zdroje a půdy na celém světě jsou stále více kontaminovány toxickými těžkými kovy, které mají nepříznivé účinky na růst a vývoj rostlin a představují vážné ohrožení pro zdraví lidí (Sarma *et al.*, 2011; D'Emilio *et al.*, 2013; Mahmood *et al.*, 2013). Měď,

zinek, železo, kobalt a nikl jsou esenciální pro normální růst a vývoj rostliny, nicméně při vyšších koncentracích se stávají toxickými. Již bylo prokázáno, že MAPK kaskády jsou aktivní v reakci na vysoké koncentrace těžkých kovů u několika druhů rostlin (Yeh *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2007; Huang a Huang, 2008; Wang *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2013). Použití kadmia a mědi indukovalo aktivitu *OsMAPK3* a *OsMAPK6* v rýži (Yeh *et al.*, 2007). Tento výsledek naznačuje, že MAPK kaskáda může fungovat i v takovýchto signálních dráhách. Vystavení přemíře kadmiových a měďnatých iontů aktivuje čtyři rozdílné MAPK jako SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK u *Medicago sativa* (Jonak *et al.*, 2004). U *Arabidopsis* kadmium způsobuje akumulaci ROS a tím indukuje aktivaci MPK3 a MPK6, zejména v kořenech (Liu *et al.*, 2010).

### 2.3.3 Sucho

Zvyšující se teploty po celém světě a desertifikace půd vede ke snížené hladině půdní vody v mnohých regionech, což pro rostliny v takovýchto oblastech znamená stres ze sucha. S výjimkou některých tolerantních rostlin (Maia *et al.*, 2011) je většina rostlin vysoce citlivá na dostupnost vody a jakákoliv změna ve vlhkosti půdy vyvolá řadu reaktivních a adaptačních mechanismů, které zmírňují škodlivé účinky nedostatku vody (Smékalová *et al.*, 2014a). Z množství abiotických stresů je stres ze sucha hlavním environmentálním faktorem, který limituje produktivitu a distribuci rostlin (Mahajan a Tuteja, 2005; Zhang *et al.*, 2018). Bylo identifikováno několik genů reagujících na sucho a jejich exprese hraje významnou roli v toleranci sucha (Zhu, 2002; Li *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009a). Sucho rapidně indukuje fosfolipasou D (PLD) řízenou produkci kyseliny fosfatidové (Bargmann *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010) a ROS (Choudhury *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2013). ROS jsou spojovány se zavíráním průduchů v důsledku deficitu vody (Miura *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013), což je důležitý mechanismus snižující ztrátu vody. Pohyby průduchů indukované stresem ze sucha, jsou převážně regulovány MPK9 a MPK12, které také reagují na změny v hladinách kyseliny abscisové (ABA). Tyto MAPK jsou přednostně exprimovány ve svěracích buňkách průduchů (Jammes *et al.*, 2009) a jejich aktivita je také spojena se zavíráním průduchů, které je řízeno elicitory (Salam *et al.*, 2012; Salam *et al.*, 2013) což naznačuje, že hrají významnou roli při pohybu průduchů. Další MAPK, která je aktivována u *Arabidopsis* za podmínek sucha je MPK6. V porovnání s MPK9 a MPK12 je MPK6 aktivována skrz akumulaci ROS (v reakci na sucho) a akumulaci fosfatidové kyseliny (Yu *et al.*, 2010). V minulosti bylo uvedeno, že nadexprese MKK4 se projevuje ztrátou menšího množství vody ve srovnání s WT

v podmínkách velkého sucha (Kim *et al.*, 2011). Tento výsledek naznačuje, že MPK3 – aktivována MKK4 by také mohla reagovat na sucho. U významných zemědělských plodin sucho indukuje různé MAPK – OsMPK3,4,7,14,20-4 a 20-5 v rýži (Shen *et al.*, 2012), ZmMPK3 v kukuřici (Wang *et al.*, 2010).

#### **2.3.4 Reaktivní kyslíkové radikály**

Reaktivní kyslíkové radikály jsou běžnými produkty aerobního metabolismu (Suzuki *et al.*, 2011). Produkce ROS může být také indukována abiotickým stresem – vysokými teplotami, nedostatkem/nadbytkem vody (Suzuki *et al.*, 2012), intoxikací těžkými kovy (Liu *et al.*, 2010) a osmotickým stresem (Kim *et al.*, 2011). ROS jsou rychle potlačovány antioxidantními enzymy, jakými jsou katalasa a superoxid dismutasa (SOD), které brání akumulaci škodlivého H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gill a Tuteja, 2010). Nicméně před samotnou detoxifikací hrají ROS důležitou roli v buněčné signalizaci a homeostáze, jsou také zapojeny do MAPK signalizace (Smékalová *et al.*, 2014a). Zvýšená hladina ROS způsobuje aktivaci MPK3 a MPK6 (Lumbreras *et al.*, 2010), aktivována je i MPK4 skrz MEKK1-MKK1/2 dráhu (Pitzschke *et al.*, 2009). Dalším signálním proteinem, jehož aktivita je spuštěna oxidativním stresem je MAPK fosfatasa 2 (MKP2), která interaguje s MPK3 a MPK6 u *Arabidopsis*. MKP2 defosforyluje MPK3 a MPK6 a tím podporuje toleranci vůči oxidativnímu stresu. (Lee a Ellis, 2007; Lumbreras *et al.*, 2010).

Vystavení rostlin škodlivým hladinám ozónu vyvolává aktivitu MAPK kaskády u tabáku, vystavení ozónu také spouští akumulaci ROS, superoxidových aniontů a hydroxylových radikálů, které způsobí oxidaci v buňkách (Samuel a Ellis, 2002). U *Arabidopsis* jsou ozónem aktivovány MPK3 a MPK6 a rostliny, u nichž nejsou tyto kinasy aktivní, jsou na ozón hypersenzitivní (Miles *et al.*, 2005).

#### **2.3.5 Teplota**

Většina rostlinných druhů, jejichž přirozeným místem výskytu jsou oblasti s mírným klimatem, se občas musí vypořádat s náhlou přechodnou změnou teploty, která se vymyká obvyklému rozpětí teplot. Extrémní změny teplot indukují fyziologické odpovědi, které umožňují rostlinám přežít a adaptovat se (Theocharis *et al.*, 2012). Vystavení rostlin nízkým teplotám evokuje změny genové exprese aktivací MAPK (Mishra *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2012). Mechanismy percepce chladu ještě nejsou zcela odhaleny, ale zřejmě zahrnují ztuhnutí plasmatické membrány (Sangwan *et al.*, 2002), mobilizaci Ca<sup>2+</sup> (Zhu *et al.*, 2013), aktivaci histidin kinas (Nongpiur *et al.*, 2012) a generaci bioaktivní kyseliny fosfatidové (Arisz *et al.*, 2013). Signální dráhy aktivované

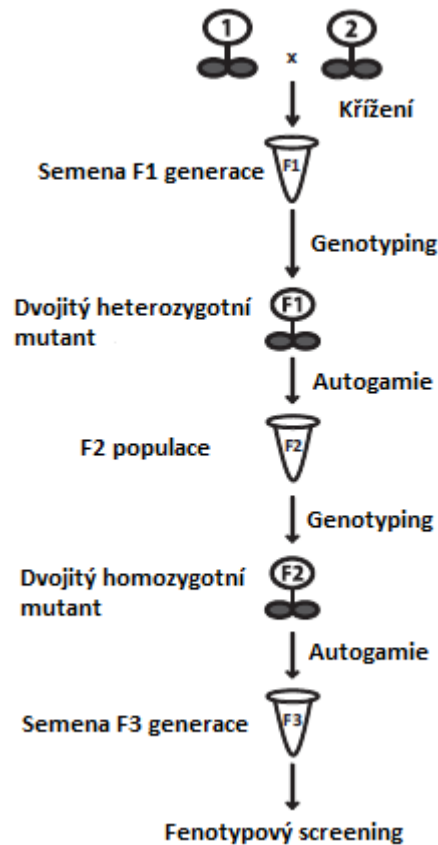


těmito různými sekundárními posly se rychle sbíhají a spouští aktivaci CPK (Ludwig *et al.*, 2004) a MAPK (Solanke a Sharma, 2008). MPK4 a MPK6 hrají důležitou roli v odpovědi na chlad u *Arabidopsis* a stávají se aktivními během 2 minut po vystavení nízké teplotě (Ichimura *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2004). K aktivaci MAPK nevede jen nízká teplota, ale také vysoké teploty. Náhlý nárůst maximální teploty během několika dní o 5-7 °C s odpovídajícím zvýšením minimální teploty způsobuje tepelné namáhání rostliny. To ovlivňuje fyziologii rostliny a zároveň je urychlen růst rostliny (Sinha *et al.*, 2011). Při vlnách horka v roce 2003 v Evropě došlo ke snížení rostlinné produkce o zhruba 30 %. (Ciais *et al.*, 2005). Kvůli globální změně klimatu se očekává zvýšení frekvence podobných situací v různých částech světa.

Ve studii Du *et al.* (2017) byl zkoumán vztah mezi sulfanem a mírou exprese MAPK za podmínek chladu u *Arabidopsis*. Bylo zjištěno, že sulfan zvyšoval expresi MAPK a byl také zapojen do regulace genové exprese v důsledku stresu z chladu. Nejvíce ovlivněnou expresi sulfanem měla MPK4 a při dalším zkoumání bylo zjištěno, že schopnost sulfanu zmírnit účinky chladu vyžadovala přítomnost MPK4. Sulfan inhiboval otevírání průduchů při chladu, což opět vyžadovalo participaci MPK4. MPK4 tedy hraje roli v rezistenci rostliny na chlad, je aktivována sulfanem a spolu s ním reguluje geny reagující na nízkou teplotu a také pohyb průduchů v reakci na chlad.

## 2.4 Dvojití mutantí

Generace kolekce dvojitých mutantů je jednou ze strategií k odhalení funkce genu v případě, kdy jednoduší mutantí nemají žádné zjevné fenotypové odlišnosti od divokého typu. Tento přístup byl použit u *Sacharomyces cerevisiae* (Tong *et al.*, 2001; Kuzmin *et al.*, 2014). Proces generace dvojitých mutantů zahrnuje práci s neletální mutací genu zájmu, takový gen se kříží s každým členem určitého souboru jednoduchých mutantů – taktéž se jedná o neletální mutace. Tímto dojde k vytvoření kolekce dvojitých mutantů, kteří jsou následně zkoumání. (Obr. 3)



Obrázek 3 - Postup při generaci dvojitých mutantů. Dva jednoduší mutanti jsou kříženi za účelem produkce F1 dvojitě mutantních heterozygotních rostlin. F1 rostliny jsou samoopylovány a vzniká F2 populace, ve které dochází k segregaci mutantní alel, dále proběhne genotyping F2 semenáčků, za účelem selekce dvojitých mutantů homozygotních v obou genech – tyto rostliny jsou přeneseny do půdy a pěstovány. Semena výsledné F3 generace dvojitě homozygotního mutantanta jsou použita pro fenotypovou analýzu. V případě, že jeden ze dvojice mutantních genů je v homozygotní konstituci sterilní (např. *mpk4*), jsou použity F2 rostliny nesoucí tento gen v heterozygotní konstituci (upraveno podle Su a Krysan, 2016).

Tvorba velkého počtu linií dvojitých mutantů je technicky realizovatelná v případě, kdy pracujeme s jednobuněčnými organismy jako je například *S.cerevisiae*, v případě mnohobuněčných organismů je tento proces obtížnější (Kuzmin *et al.*, 2014). Zjištění, že pár genů vykazuje genetickou interakci neznamena, že kódované proteiny jsou i partnery v protein-proteinových interakcích. Může se jednat o případ, kdy geny patří do paralelních drah, které regulují stejný biologický proces. I když jednoduší mutanti nemusí nutně měnit biologický proces který regulují, je možné, že dvojití mutanti částečně nebo zcela blokuji příslušné dráhy (Boone *et al.*, 2007). Dalším případem může být situace, kdy dva geny patří do stejné signální dráhy, ale vykazují funkční redundanci (Cutler a McCourt, 2005), kdy jeden gen substituuje funkci toho druhého, což znamená, že

jednodušší mutanti nebudou vykazovat abnormální fenotyp, zatímco dvojití mutanti budou mít fenotyp pozměněný. Nicméně práce s rostlinami klade technické nároky, které činí studie genových interakcí na úrovni genomu nepraktickými – regenerace rostliny, nutnost produkce desítek tisíc specifických kombinací dvojitých mutantů. Proto je dobré vybrat jen určitou skupinu genů, na kterou se zaměří pozornost. U *Arabidopsis* jsou atraktivní skupinou geny kódující MAPK, které jsou zapojeny do široké škály procesů v rostlinách (Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010; Komis *et al.*, 2011; Rasmussen *et al.*, 2012; Sasabe a Machida, 2012; Xu a Zhang, 2015).

#### 2.4.1 Dvojití mutanti MAPK

U *Arabidopsis* existuje poměrně málo abnormálních fenotypů, které by byly asociovány s MAPK (Lloyd a Meinke, 2012). Několik případů genetických interakcí mezi MAPK je však známých, většina z nich jsou páry genů v rámci jedné genové rodiny (Su a Krysan, 2016).

Například jednodušší mutanti *mpk3* a *mpk6* jsou zcela životaschopní, ale u *mpk3mpk6* dvojitého mutantu se projevuje letalita embrya (Wang *et al.*, 2007b). Jednoduchý mutant *mpk4* má silně zakrslý fenotyp, *mpk4mpk11* dvojitý mutant vykazuje ještě více zakrslý fenotyp než jednoduchý mutant *mpk4* (Kosetsu *et al.*, 2010). Dalším příkladem může být *mpk9mpk12* dvojitý mutant, který je necitlivý na ošetření ABA, zatímco oba jednodušší mutanti mají normální odezvu na tuto kyselinu (Jammes *et al.*, 2009). Dvojití mutanti *mkk1mkk2* mají silně zakrslý fenotyp, který není pozorován u jejich jednoduchých mutantů (Qiu *et al.*, 2008). Dvojití mutanti *anp1anp3* a *anp2anp3* vykazují defekty v buněčném dělení a růstu, jejich jednodušší mutanti se jeví normálními (Krysan *et al.*, 2002).

V nedávné době byla vyprodukována sbírka dvojitých mutantů MAPK, a následně byl proveden fenotypový screening ve formě měření délky kořenů a na základě toho byly identifikovány linie těch mutantních genů, které měly signifikantně rozdílné hodnoty od hodnot obou jednoduchých mutantů (Su a Krysan, 2016). Takto identifikovanými geny byly ANP2 a ANP3 v kombinaci s MPK4. Na základě předchozího výzkumu bylo zjištěno, že tyto dva MAP3K geny jsou zapojeny do cytokineze (Krysan, 2002; Takahashi *et al.*, 2010), dvojitý mutant *anp2anp3* má zakrslý fenotyp (Krysan *et al.*, 2002). Z provedených experimentů vyplynulo, že hodnoty délky kořenů *mpk4anp2* a *mpk4anp3* dvojitých mutantů vykazují 35% a 45% redukci ve srovnání s *mpk4*. Jednodušší mutanti *anp2* a *anp3* nevykázali signifikantní rozdíl v hodnotách délky kořene ve srovnání

s divokým typem Col-0. V minulosti byla navrhována signální dráha, kde ANP2 a ANP3 fungovaly jako aktivátory MPK4 za účelem regulace cytokineze (Kosetsu *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2011). Zjištění, že *anp2* a *anp3* jednoduší mutanti zvyšují růstový defekt *mpk4* naznačuje, že *mpk4* poskytuje senzibilní prostředí pro detekci fenotypových defektů, které by jinak nebyly zřetelné (Su a Krysan, 2016). Dalšími dvojitými mutanty, kteří vykazovali signifikantní rozdíl v délkách kořenů byli mutanti *mpk4mpk5* a *mpk4mpk13*.

Studium genetických interakcí je důležitým přístupem v mnoha modelových organismech, existující genetická interakce může přinést nové informace vedoucí nejen k pochopení funkce individuálních genů, ale také k pochopení vztahů mezi geny v různých signálních dráhách kontrolujících biologický proces (Tong *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2008; Costanzo *et al.*, 2010).

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 Rostlinný materiál

V provedených experimentech byla použita semena rostliny *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia-0 (Col-0, divoký typ), jednoduší mutanti *mpk4* (SALK 056245), *anp3* (SALK 081990) a dvojitý mutant *mpk4anp3* (Su a Krysan, 2016). Semena byla před samotným použitím povrchově sterilizována ve flowboxu pomocí ethanolu (etOH). Postup sterilizace byl následující:

- 1) Promytí semen v 70% ethanolu po dobu 5 min.
- 2) Promytí semen v 96% ethanolu po dobu 2-3 min.
- 3) Promytí semen 3x v destilované vodě po dobu 5 min.

Takto vysterilizovaná semena byla nanesena na filtrační papír v Petriho miskách, po vysušení byly misky uzavřeny parafilmem a semena byla skladována v chladu při 4°C.

##### 3.1.2 Chemikálie

*Alfa Aesar*: Gellan Gum

*Duchefa Biochemie*: Murashige & Skoog Medium Basal Salt Mixture

*Invitrogen*: FM<sup>TM</sup> 4-64 Dye (N-(3-ethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) fenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromid)

*Penta*: 70% a 96% ethanol

*Sigma Aldrich*: glycerol, chlorid sodný (NaCl), chlorid draselný (KCl), kyselina octová (CH<sub>3</sub>COOH), sacharóza, hydroxid draselný (KOH), MES

##### 3.1.3 Roztoky a média

Tekuté ½ MS médium

2,15 g.l <sup>-1</sup>	Murashige & Skoog Medium Basal Salt Mixture
10 g.l <sup>-1</sup>	sacharóza
1 l	dH <sub>2</sub> O
	pH 5,8; sterilizováno autoklávováním

### Pevné kultivační ½ MS médium

2,15 g.l <sup>-1</sup>	Murashige & Skoog Medium Basal Salt Mixture
10 g.l <sup>-1</sup>	sacharóza
1 g.l <sup>-1</sup>	MES
6 g.l <sup>-1</sup>	Gellan Gum
1 l	dH <sub>2</sub> O

pH 5,8; sterilizováno autoklávováním

### Fixační roztok

90 ml	96% ethanol
30 ml	CH <sub>3</sub> COOH
30 ml	glycerol

### 3.1.4 Přístroje

Sterilní laminární box (Merci), binokulární lupa M165FC s CCD kamerou (Leica), fytotronová komora (Weiss Gallenkamp), analytické váhy XA110/2X (Radwag), elektromagnetická míchačka MSH-420 (BOECO), pH metr PC 2700 (Eutech Instruments), stereolupa MSZ5000 (Krüss), laboratorní předvážky S1502 (BEL-Engineering), digestoř (Merci), Image Scanner III (Epson), epifluorescenční mikroskop Axio Imager M2 (ZEISS), konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710 (ZEISS), fotoaparát (Nikon)

### 3.1.5 Software

LAS V40 (Leica), ZEN Blue (ZEISS), ZEN Black (ZEISS), EPSON Scan, ImageJ (<https://imagej.net/Welcome>), Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Office PowerPoint 2007

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava médií pro kultivaci rostlin *in vitro*

U všech experimentů bylo použito pevné ½ MS médium, jehož příprava byla následující: v 1 l destilované vody bylo pomocí elektromagnetického míchadla rozpuštěno 2,15 g MS (makro- a mikroelementy bez vitamínů), 10 g sacharózy a 1 g MES. Následně došlo k upravení pH na 5,8 pomocí KOH (1 M KOH, 10 M KOH dle potřeby). Do 4 termolahví o objemu 500 ml bylo přidáno po 1,5 g Gellan Gum a následně došlo k přilítí 250 ml připraveného média. Médium v termoláhvích bylo následně sterilizováno

autoklávováním.

Studium vlivu solného stresu na rostliny bylo provedeno kultivací na pevném ½ MS médiu s různou koncentrací KCl nebo NaCl. K přidání příslušného množství KCl nebo NaCl do ½ MS média došlo vždy před upravením pH a autoklávováním. Navážky KCl a NaCl jsou uvedeny v Tab. 1.

Koncentrace	Množství navážené soli
25 mM KCl	1,86 g.l <sup>-1</sup> KCl
50 mM KCl	3,73 g.l <sup>-1</sup> KCl
100 mM KCl	7,46 g.l <sup>-1</sup> KCl
125 mM KCl	9,31 g.l <sup>-1</sup> KCl
50 mM NaCl	2,92 g.l <sup>-1</sup> NaCl
75 mM NaCl	4,38 g.l <sup>-1</sup> NaCl
100 mM NaCl	5,84 g.l <sup>-1</sup> NaCl

Tabulka 1 – Použité koncentrace solí a navážky pro přípravu médií.

### 3.2.2 Optimalizace podmínek kultivace rostlin *in vitro* ve stresových podmínkách

Vysterilizovaná semena *Arabidopsis thaliana* Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* byla vysazena na Petriho misky s pevným ½ MS médiem. Práce probíhala ve sterilním laminárním boxu. Petriho misky s nasazenými semeny byly následně uzavřeny pomocí parafilmu a umístěny na 48 h do lednice při 4 °C z důvodu stratifikace. Po 48 h byly misky přemístěny do fytotronové komory, kde byly kultivovány ve vertikální poloze za konstantních podmínek (21 °C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h). Po 3 dnech kultivace bylo nutné vyselektovat *mpk4* mutantní rostliny homozygotní v *MPK4* a *mpk4anp3* mutantní rostliny homozygotní v obou genech (*MPK4* a *ANP3*). Selektce probíhala pod stereomikroskopem na základě viditelného zakrslého fenotypu semenáčků.

Následně byly semenáčky přeneseny ve sterilním laminárním boxu na Petriho misky s pevným ½ MS médiem s přidavkem KCl nebo NaCl (viz Tab. 1).

#### 3.2.2.1 Studium vlivu solného stresu na kořen rostlin

Třídenní semenáčky Col-0, *mpk4*, *mpk4anp3* a *anp3* byly přeneseny na čtvercové Petriho misky obsahující pevné ½ MS médium (jako kontrola), pevné ½ MS médium obsahující 25, 50 anebo 100 mM KCl. Petriho misky byly vloženy do černých fóliových obalů tak,

aby byly zakryty kořeny semenáčků (tzv. shadow systém) a vytvořily se co nejvíce fyziologické podmínky kultivace. Misky byly poté přeneseny do fytotronové komory, kde byly kultivovány ve vertikální poloze po dobu 10 dnů za konstantních podmínek (21 °C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h). Ve dnech 0, 1, 3, 4, 7, 8, 10 došlo ke skenování misek. Na základě skenů poté došlo k vyhodnocení délky kořene v jednotlivých dnech v programu ImageJ. Třetí den po přenosu došlo k detailnímu pozorování semenáčků pod binokulární lupou se zaměřením na oblast kořenové špičky. Získaný obrazový materiál byl použit k měření vzdálenosti mezi kořenovou špičkou a prvním kořenovým vláskem v programu ImageJ. Sedmý den po přenosu došlo k analýze laterálních kořenů pod stereomikroskopem. Jednotlivé růstové parametry byly poté vyhodnoceny v programu Microsoft Excel.

### **3.2.2.2 Studium vlivu solného stresu na nadzemní část rostlin**

Semenáčky Col-0, *mpk4*, *mpk4anp3* a *anp3* byly přeneseny na kulaté Petriho misky s pevným ½ MS médiem (jako kontrola), pevné ½ MS médium obsahující 50, 100 nebo 125 mM KCl a 50, 75 anebo 100 mM NaCl. Petriho misky byly poté přeneseny do fytotronové komory, kde byly kultivovány v horizontální poloze po dobu 2 týdnů za konstantních podmínek (21 °C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h). V 0., 7. a 14. den byly Petriho misky s rostlinami ve sterilním laminárním boxu vyfoceny fotoaparátem. Získaný obrazový materiál zpracovaný v programu PowerPoint byl následně použit k hodnocení růstu a viability rostlin po působení solného stresu.

### **3.2.3 Měření délky průduchů na děložních a pravých listech**

Děložní listy byly odebrány z desetidenních semenáčků Col-0, *mpk4*, *anp3* a *mpk4anp3* kultivovaných na Petriho miskách s kontrolním médiem. Odběr pravých listů proběhl 13. den kultivace, vždy byl odebírán třetí pravý list. Po odběru byly listy ponořeny do fixačního roztoku složeného z kyseliny octové, ethanolu a glycerolu v poměru 1:3:1, který zároveň sloužil k odstranění chlorofylu z listového pletiva. Roztok byl vždy po asi 20 minutách měněn do doby, kdy došlo k úplnému odbarvení listů.

Následně byly děložní a pravé listy opatrně osušeny pomocí papírového ubrusku, položeny abaxiální stranou nahoru na podložní sklíčko s kapkou glycerolu a přikryty krycím sklíčkem. Takto připravené preparáty byly následně pozorovány pod epifluorescenčním mikroskopem. Získaný obrazový materiál byl použit k analýze průduchů. Měření jejich délky proběhlo v programu ZEN Blue, získaná data byla zpracována v programu Microsoft Excel.



### 3.2.4 Pozorování anatomie kořenové špičky

K pozorování anatomie kořenové špičky byly použity 6 dní staré semenáčky Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3*. Nejdříve byl připraven 4  $\mu$ M roztok vitálního fluorescenčního barviva FM4-64 v tekutém 1/2 MS médiu. Poté byl připraven preparát. Na podložní sklíčko bylo přidáno takové množství barviva, aby došlo k ponoření celého semenáčku a následně došlo k překrytí krycím sklíčkem. Barvivo působilo asi 20 minut ve tmě, poté byly preparáty pozorovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu LSM 710 (laser: 514 nm, filtr: 680-759 nm) s operačním systémem ZEN Black.

### 3.2.5 Pozorování a analýza průduchů pravých listů barvených vitálním barvivem

Třetí pravé listy čtrnáctidenních rostlin Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* byly odebrány a přeneseny na podložní sklíčko abaxiální stranou nahoru a následně ponořeny do 50  $\mu$ l kapky 4  $\mu$ M roztoku barviva FM4-64 v tekutém 1/2 MS médiu a překryty krycím sklíčkem. Po 10 minutách inkubace ve tmě byly preparáty pozorovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu LSM 710 (laser: 514 nm, filtr: 680-759 nm) s operačním programem ZEN Black. Ze získaného obrazového materiálu byla provedena analýza průduchů. U průduchů byla následně změřena jejich šířka a délka v programu ZEN Blue. V tomto programu došlo také k počítání počtu průduchů na plochu listu. Získaná data byla zpracována v programu Microsoft Excel.

### 3.2.6 Statistické metody

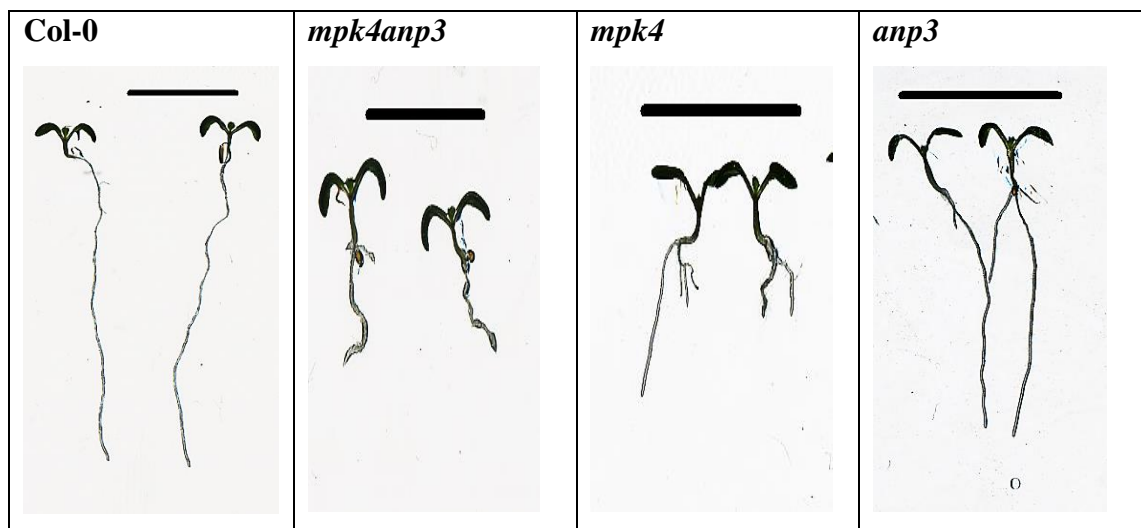
Pomocí Studentova t-testu bylo zhodnoceno, zda existují statisticky průkazné rozdíly mezi soubory dat *mpk4* a *mpk4anp3* a také mezi *anp3* a *mpk4anp3*. Tento test byl proveden při hodnocení počtu, šířky a délky průduchů, dále při počtu laterálních kořenů, vzdáleností mezi kořenovou špičkou a kořenovým vláskem a při délkách kořenů.

## 4 Výsledky

V následující kapitole jsou představeny výsledky experimentální části bakalářské práce, kterou jsou rozděleny do dvou částí. V první části je charakterizován fenotyp dvojitého mutanta *mpk4anp3* ve srovnání s divokým typem Col-0 a příslušnými jednoduchými mutanty *mpk4* a *anp3*. Druhá část je zaměřená na studium vlivu solného stresu na fenotyp dvojitého mutanta *mpk4anp3*.

### 4.1 Fenotypová charakterizace dvojitého mutanta *mpk4anp3*

Na studium fenotypu byly použity šestidenní semenáčky Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3*, které byly pozorovány pod stereomikroskopem. Fenotyp semenáčků dvojitého mutanta se výrazně odlišoval od fenotypu Col-0 a také mutanta *anp3* (Obr. 4). Dvojitý mutant *mpk4anp3* a mutant *mpk4* měli na rozdíl od Col-0 a *anp3* viditelně zakrslý fenotyp. Dvojitý mutant měl společně s *mpk4* menší listové růžice než Col-0, čím byly semenáčky starší, tím byl tento rozdíl znatelnější. Jednoduchý mutant *anp3* měl velikost listové růžice shodnou s Col-0. S postupným růstem mutantů *mpk4anp3* a *mpk4* u nich bylo možno pozorovat svinuté listy. U pozorovaných šestidenních semenáčků všech rostlin se začaly objevovat první laterální kořeny.



Obrázek 4 – Fotografie šestidenních semenáčků Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* na kontrolním médiu. Měřítka odpovídá 1 cm.

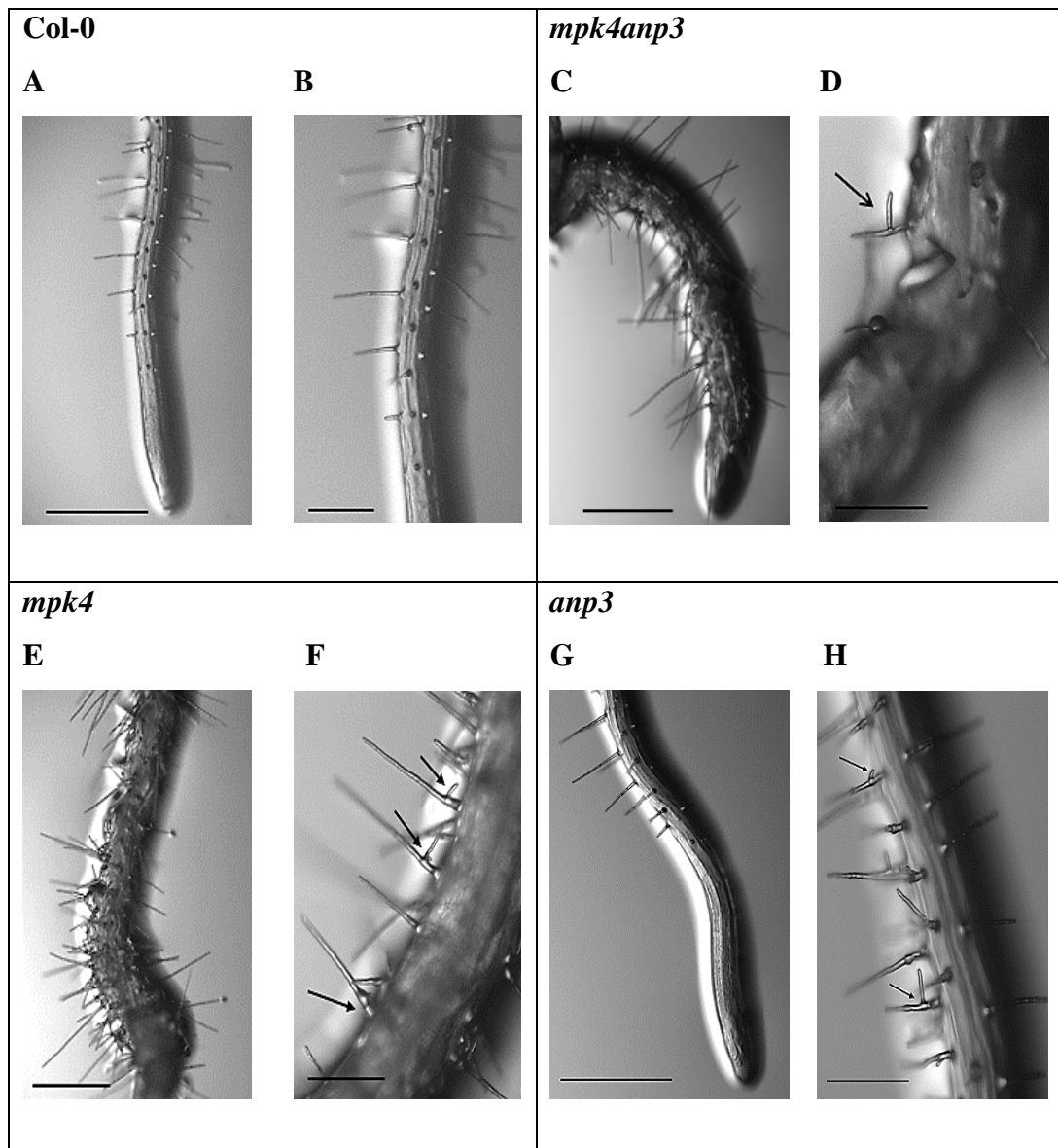
#### 4.1.1 Pozorování fenotypu kořene

Růstové parametry jsou uvedeny v další části výsledků.

Fenotyp kořene dvojitého mutanta se výrazně odlišoval od fenotypu Col-0. U dvojitého mutanta byl na rozdíl od Col-0 (Obr. 5 A) pozorován jasný zakrslý fenotyp, jeho kořen byl zduřelý (Obr. 5 C). Zatímco u Col-0 vyrůstaly kořenové vlásky ve sloupcích (Obr. 5 B), u dvojitého mutanta byl viditelný jejich ektopický růst (Obr. 5 C). Při bližším pozorování se zaměřením na kořenové vlásky bylo možno pozorovat i abnormality v jejich růstu v porovnání s divokým typem, u dvojitého mutanta docházelo k větvení kořenových vlásků (Obr. 5 D).

Při porovnání dvojitého mutanta s jednoduchým mutantem *mpk4* nebyly odhaleny žádné viditelné odlišnosti od dvojitého mutanta. Mutant *mpk4* má taktéž zakrslý fenotyp (Obr. 5 E), jeho kořenové vlásky rostou ektopicky, kořen je zduřelý a dochází k větvení kořenových vlásků, některé kořenové vlásky měly také ztloustlou bázi kořenového vlásku (Obr. 5 F).

Ve srovnání s fenotypem mutanta *anp3* vykazoval dvojitý mutant taktéž zakrslý růst (Obr. 5 C a G). Kořen jednoduchého mutanta *anp3* se jevil podobný Col-0, kořenové vlásky vyrůstaly stejně jako u Col-0 ve sloupcích (Obr. 5 A a G). Při bližším pozorování kořenových vlásků bylo odhaleno, že u mutanta *anp3* taktéž dochází k větvení kořenových vlásků (Obr. 5 H).



Obrázek 5 – Fenotypy kořenů 6 dní starých semenáčků Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* rostoucích na kontrolním médiu.

A – kořenová špička Col-0, B – detail kořene Col-0 s kořenovými vlásky; C – kořenová špička *mpk4anp3*, D – detail kořene *mpk4anp3* s kořenovými vlásky, šipka ukazuje na rozvětvený kořenový vlásek; E – kořenová špička *mpk4*, F – detail kořene *mpk4* s kořenovými vlásky, šipky ukazují na rozvětvené kořenové vlásky a ztloustou bázi vlásku; G – kořenová špička *anp3*, H – detail kořene *anp3* s kořenovými vlásky, šipky ukazují na rozvětvené kořenové vlásky  
Měřítka: 500  $\mu\text{m}$  (A, C, E a G), 200  $\mu\text{m}$  (B, D, F a H).

#### 4.1.2 Pozorování anatomie kořenové špičky

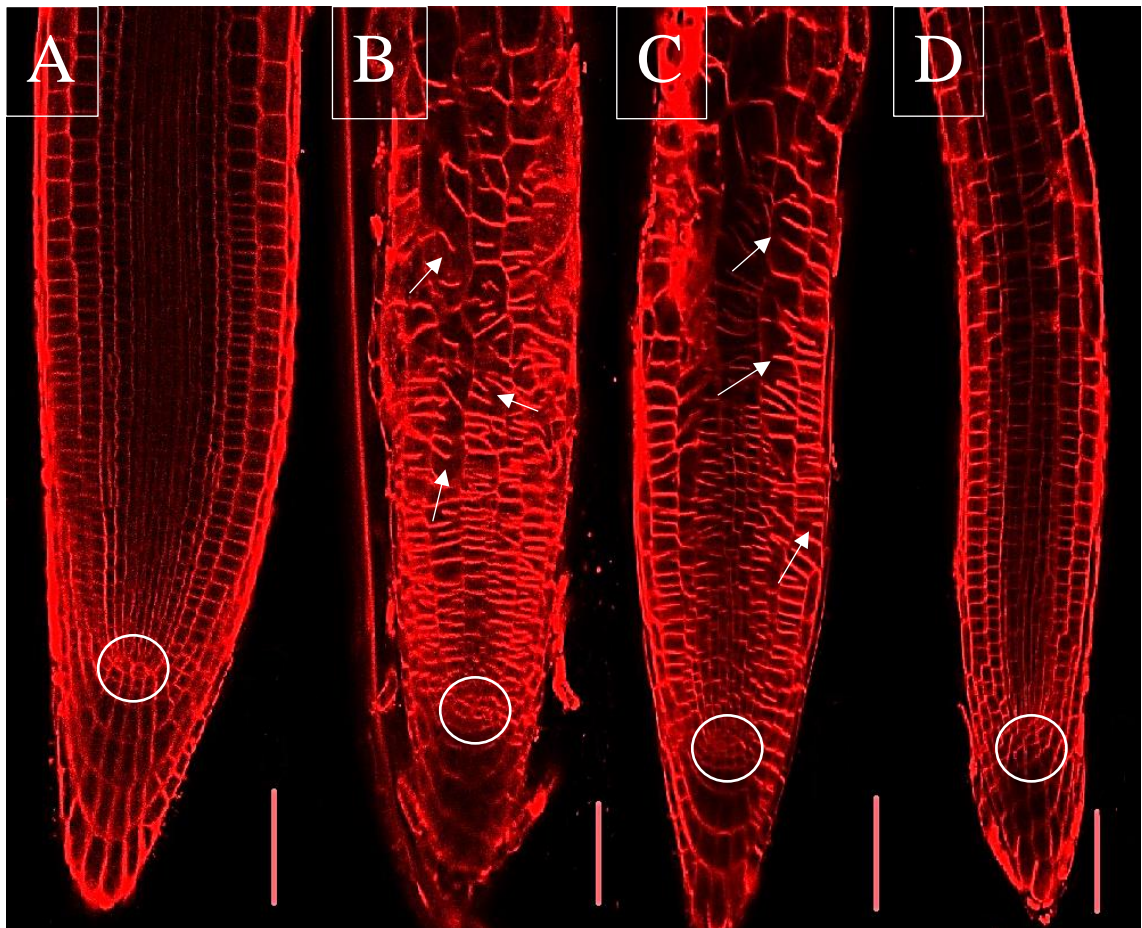
Anatomie kořenové špičky byla pozorována u všech studovaných mutantů a divokého typu. Kořeny šestidenních rostlin byly barveny vitálním fluorescenčním barvivem FM4-64 a pozorovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu.

U semenáčků Col-0 byl dobře pozorovatelný kořenový apikální meristéum včetně Q-centra, které je u *Arabidopsis* typicky tvořeno dvěma buňkami (Obr. 6 A). Buňky kořene měly pravidelné uspořádání ve sloupcích, buněčné stěny zcela oddělovaly sousedící buňky, příčné buněčné stěny byly orientovány kolmo na podélnou osu kořene. Dobře byla pozorovatelná také kořenová špička tvořená 4 vrstvami buněk (Obr. 6 A).

Kořenová špička dvojitého mutantu *mpk4anp3* se v anatomickém srovnání s divokým typem Col-0 značně odlišovala. Buňky kořenové špičky měly nepravidelný tvar, abnormálně velké buňky zejména v oblasti centrálního válce, což bylo způsobeno tím, že značná část pozorovaných buněk neměla dokončenou buněčnou stěnu. To naznačuje, že u dvojitého mutantu dochází k defektům v cytokinezi. Q-centrum bylo nepravidelné, byla rozeznatelná kořenová špička tvořená 4 vrstvami buněk (Obr. 6 B).

Anatomie kořene mutantní rostliny *mpk4* se podobala stavbě *mpk4anp3*. I zde se nacházely různě velké buňky, z nichž některé měly nedokončené příčné buněčné stěny, Q-centrum bylo organizováno podobně jako u dvojitého mutantu, byla rozeznatelná kořenová špička (Obr. 6 C).

Stavba kořenové špičky mutantu *anp3* byla podobná jako u divokého typu Col-0. Buňky měly pravidelný tvar a uspořádání, Q-centrum a kořenová špička byly organizovány shodně s Col-0 (Obr. 6 D).



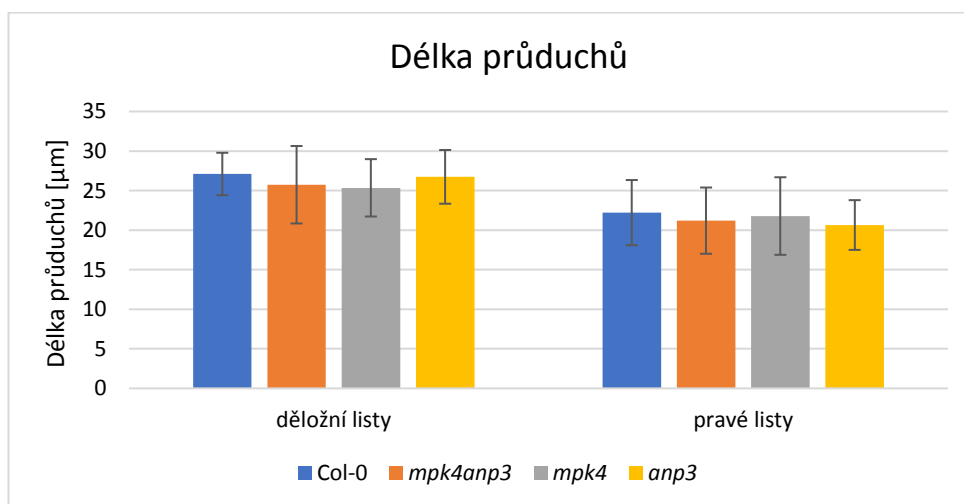
Obrázek 6 – Anatomie kořenové špičky, barveno FM4-46. A – Col-0, kruh značí Q-centrum; B – *mpk4anp3*, kruh značí Q-centrum a šipky ukazují na nedokončené buněčné stěny; C – *mpk4*, kruh značí Q-centrum a šipky ukazují na nedokončené buněčné stěny; D – *anp3*, kruh značí Q-centrum. Měřítko odpovídá 50  $\mu$ m.

### 4.1.3 Pozorování a měření délky průduchů u děložních a pravých listů

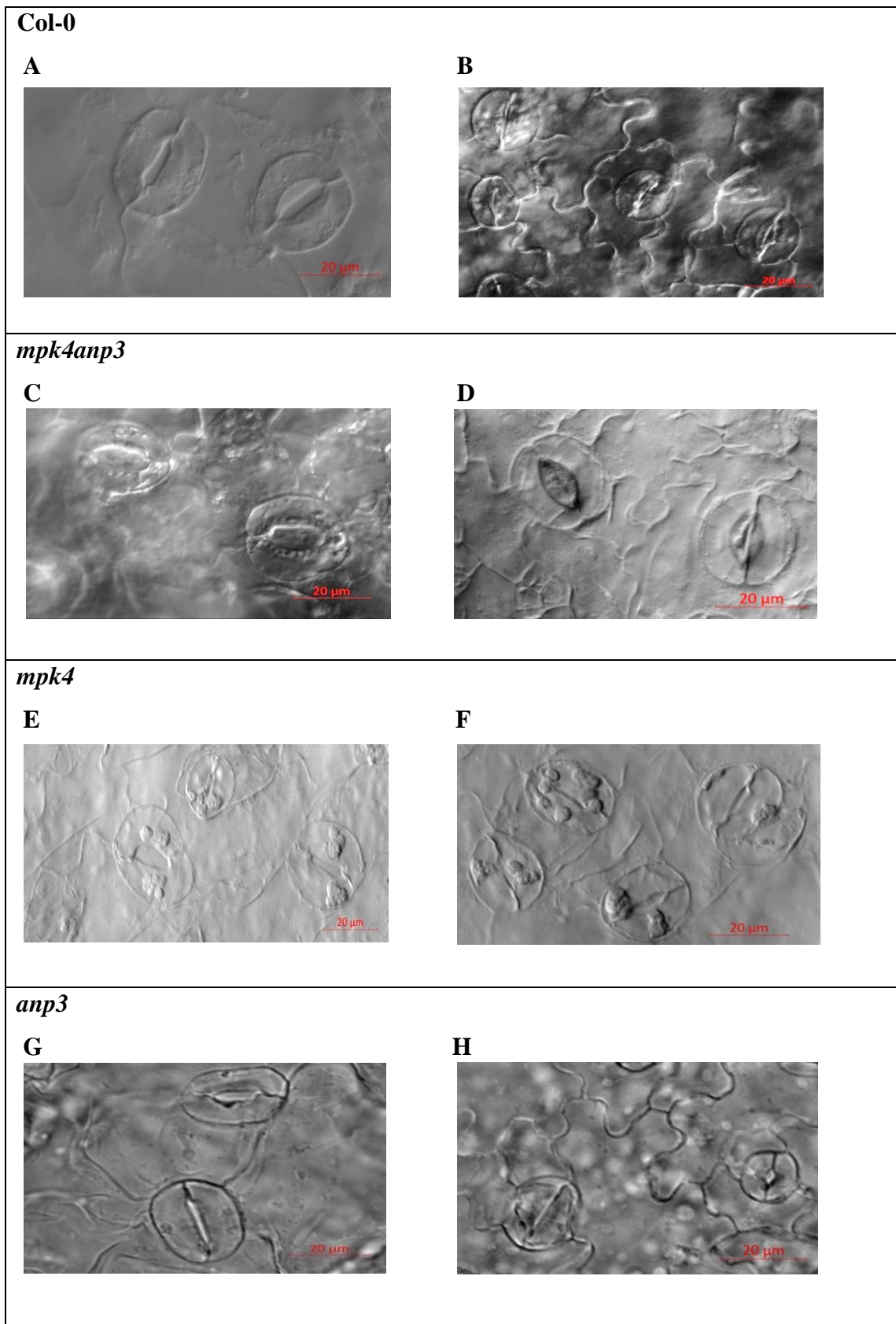
V rámci fenotypové charakterizace došlo také k pozorování a následnému měření délky průduchů u Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* v kontrolních podmínkách. K odebrání děložních listů došlo 10. den kultivace, třetí pravý list byl odebrán 13. den kultivace. Na Obrázku 8 jsou reprezentativní fotografie průduchů děložních a pravých listů hodnocených rostlin.

Z provedených experimentů vyplynulo, že průměrné hodnoty délky průduchů děložních listů byly u všech analyzovaných rostlin větší než délky průduchů u pravých listů (Obr. 7). U děložních listů Col-0 byla průměrná délka průduchů 27,10  $\mu\text{m}$  (Obr. 7 a Obr. 8 A), u dvojitého mutantu *mpk4anp3* to bylo 25,74  $\mu\text{m}$  (Obr. 7 a 8 C), rostliny *mpk4* měly průměrnou délku průduchů 25,35  $\mu\text{m}$  (Obr. 7 a 8 E) a *anp3* 26,74  $\mu\text{m}$  (Obr. 7 a 8 G). Provedený Studentův t-test neodhalil statisticky průkazné rozdíly mezi naměřenými soubory dat *mpk4* ve srovnání s *mpk4anp3* a *anp3* ve srovnání s *mpk4anp3*.

Jak bylo již zmíněno, průduchy pravých listů dosahovaly průměrně menší délky než průduchy děložních listů. Rostliny Col-0 měly průměrnou délku 22,22  $\mu\text{m}$  (Obr. 7 a 8 B), *mpk4anp3* 21,20  $\mu\text{m}$  (Obr. 7 a 8 D), u rostlin *mpk4* to bylo 21,78  $\mu\text{m}$  (Obr. 7 a 8 F) a u *anp3* 20,65  $\mu\text{m}$  (Obr. 7 a 8 H). Ani v tomto případě neodhalil Studentův t-test statisticky průkazné rozdíly mezi hodnocenými daty.



Obrázek 7 – Délka průduchů děložních a pravých listů rostlin Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* v kontrolních podmínkách. Děložní listy byly odebrány 10. den, třetí pravé listy 13. den kultivace.



Obrázek 8 – Průduchy na děložních a pravých listech rostlin Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3*: A – děložní list Col-0, B – pravý list Col-0; C – děložní list *mpk4anp3*, D – pravý list *mpk4anp3*; E – děložní list *mpk4*, F – pravý list *mpk4*; G – děložní list *anp3*, H – pravý list *anp3* Měřítko odpovídá 20  $\mu\text{m}$ .



#### 4.1.4 Pozorování a měření průduchů pravých listů barvených vitálním barvivem

K pozorování byly odebrány 14 dní staré třetí pravé listy rostlin Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3*. Po přípravě nativního preparátu byly pozorovány průduchy na listech a epidermální buňky listu. U průduchů byla také měřena jejich délka a šířka. Dále byl vypočítán průměrný počet průduchů na plochu listu. Pro každý z těchto parametrů byl také proveden Studentův t-test, byly srovnány soubory dat *mpk4* s *mpk4anp3* a *anp3* s *mpk4anp3*.

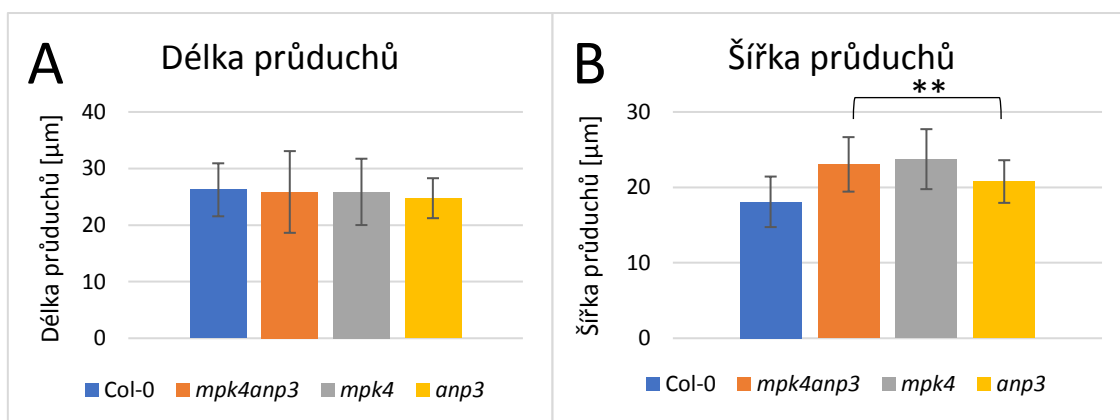
Průměrná délka průduchů u Col-0 byla 26,24  $\mu\text{m}$ , průduchy se vizuálně jevily jako homogenní, epidermální buňky měly typický puzzlovitý tvar (Obr. 9 A a 11 A). Průměrná šířka průduchů byla 18,09  $\mu\text{m}$ , což byla nejnižší hodnota ze všech testovaných rostlin (Obr. 9 B). Listy Col-0 obsahovaly průměrně 122,6 průduchů na 1  $\text{mm}^2$  listu (Obr. 10).

Při porování listů dvojitého mutanta *mpk4anp3* byly viditelné změny od divokého typu Col-0. Populace průduchů byla ve srovnání s Col-0 viditelně heterogenní. Na listu dvojitého mutanta se vyskytovaly průduchy jak velikosti srovnatelné s průduchy Col-0, tak průduchy nadměrné velikosti, které dosahovaly i dvojnásobku ve srovnání s Col-0, viditelné byly i deformované průduchy. Změny byly viditelné také u epidermálních buněk, několik z nich nemělo dokončenou buněčnou stěnu (Obr. 11 B). Průměrná naměřená délka průduchů byla 25,86  $\mu\text{m}$  (Obr. 9 A), průměrná šířka 23,05  $\mu\text{m}$  (Obr. 9 B) a průměrný počet průduchů na 1  $\text{mm}^2$  byl 93,59 (Obr. 10), což byl nejmenší počet ze všech testovaných rostlin.

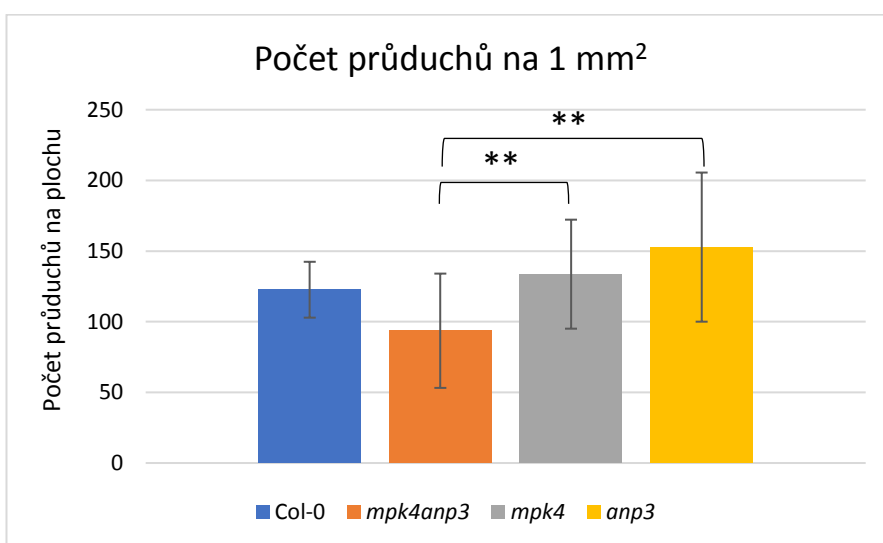
I listy mutanta *mpk4* se vyznačovaly heterogenními průduchy různé velikosti a také zde byly pozorovány nedokončené buněčné stěny epidermálních buněk, včetně deformovaných průduchů, jako v případě *mpk4anp3* (Obr. 11 C). Průměrná délka byla 25,87  $\mu\text{m}$  (Obr. 9 A), průměrná šířka 23,74  $\mu\text{m}$  (Obr. 9 B) a průměrný počet průduchů na 1  $\text{mm}^2$  byl 133,6 (Obr. 10). Studentovým t-testem byl zjištěn průkazný rozdíl mezi počtem průduchů, *mpk4anp3* jich měl znatelně méně než *mpk4*, u šířky ani délky rozdíly nebyly zjištěny.

Průduchy mutanta *anp3* byly homogenní podobně jako u divokého typu Col-0 (Obr. 11 D). Epidermální buňky měly dokončené buněčné stěny, průměrná délka dosahovala 24,75  $\mu\text{m}$  (Obr. 9 A), průměrná šířka 20,78  $\mu\text{m}$  (Obr. 9 B). Průměrný počet průduchů na 1  $\text{mm}^2$  byl 152,78, což představovalo nejvyšší počet ze všech testovaných rostlin (Obr. 10). Provedením Studentova t-testu byl odhalen statisticky průkazný rozdíl u šířky průduchů mezi *anp3* a *mpk4anp3*. Průduchy *anp3* měly znatelně tenčí šířku než průduchy

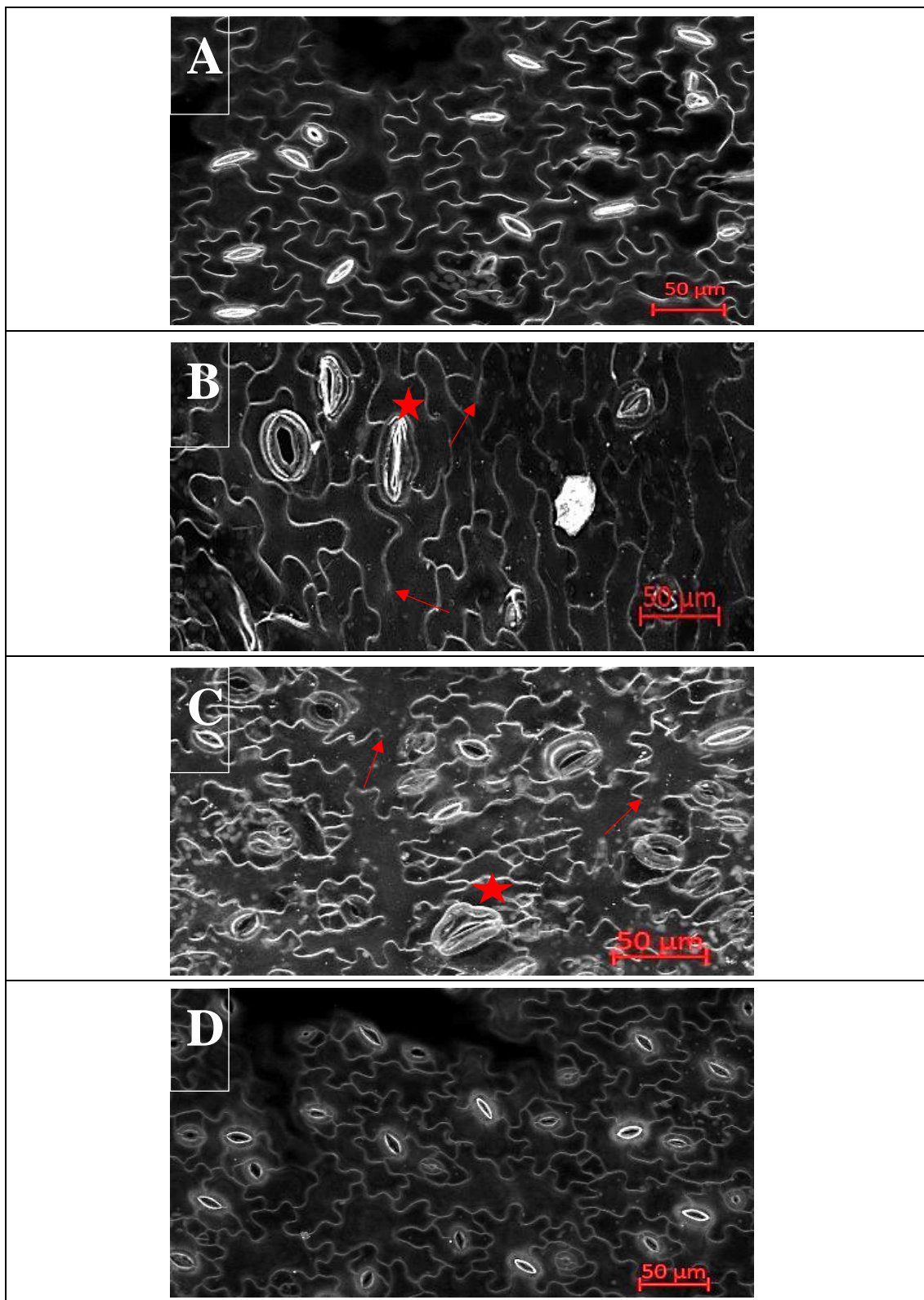
*mpk4anp3* (Obr. 9 B). Rozdíl byl zjištěn také u počtu průduchů na plochu listu, dvojitý mutant *mpk4anp3* jich měl méně než *anp3*.



Obrázek 9 – Průměrná délka a šířka průduchů pravých listů rostlin Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* v kontrolních podmínkách. Odebrány byly 14 dnů staré třetí pravé listy. A – délka průduchů; B – šířka průduchů, dvě hvězdičky značí statisticky průkazný rozdíl mezi *anp3* a *mpk4anp3* dle Studentova t-testu ( $p < 0,05$ ).



Obrázek 10 – Průměrný počet průduchů na 1 mm<sup>2</sup> listu u rostlin Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* v kontrolních podmínkách. Odebrány byly 14 dnů staré třetí pravé listy, dvě hvězdičky značí průkazný rozdíl mezi *mpk4* a *mpk4anp3* a také mezi *anp3* a *mpk4anp3* dle Studentova t-testu ( $p < 0,05$ ).



Obrázek 11 - Reprezentativní fotografie průduchů pravých listů barvených FM4-46 a pozorovaných konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem. A – epidermální buňky s průduchy u Col-0; B – epidermální buňky s průduchy u *mpk4anp3* šipky ukazují na neúplné buněčné stěny, hvězdička značí deformovaný průduch; C – epidermální buňky s průduchy u *mpk4*, šipky ukazují na neúplné buněčné stěny, hvězdička značí deformovaný průduch; D – epidermální buňky s průduchy u *anp3*. Měřítko odpovídá 50 µm.

## 4.2 Vliv solného stresu na fenotyp dvojitého mutanta *mpk4anp3*

### 4.2.1 Studium vlivu solného stresu na kořen rostlin

Testování vlivu solného stresu na kořen rostlin spočívalo ve vysazení semen Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* na ½ MS médium a následné přenesení 3 dny starých semenáčků na média s různým obsahem KCl. V experimentech byly použity následující koncentrace KCl: 0 mM (kontrola, základní ½ MS médium), 25 mM, 50 mM a 100 mM. Petriho misky byly následně skenovány po dobu 10 dnů a poté došlo k měření hlavního kořene v programu ImageJ.

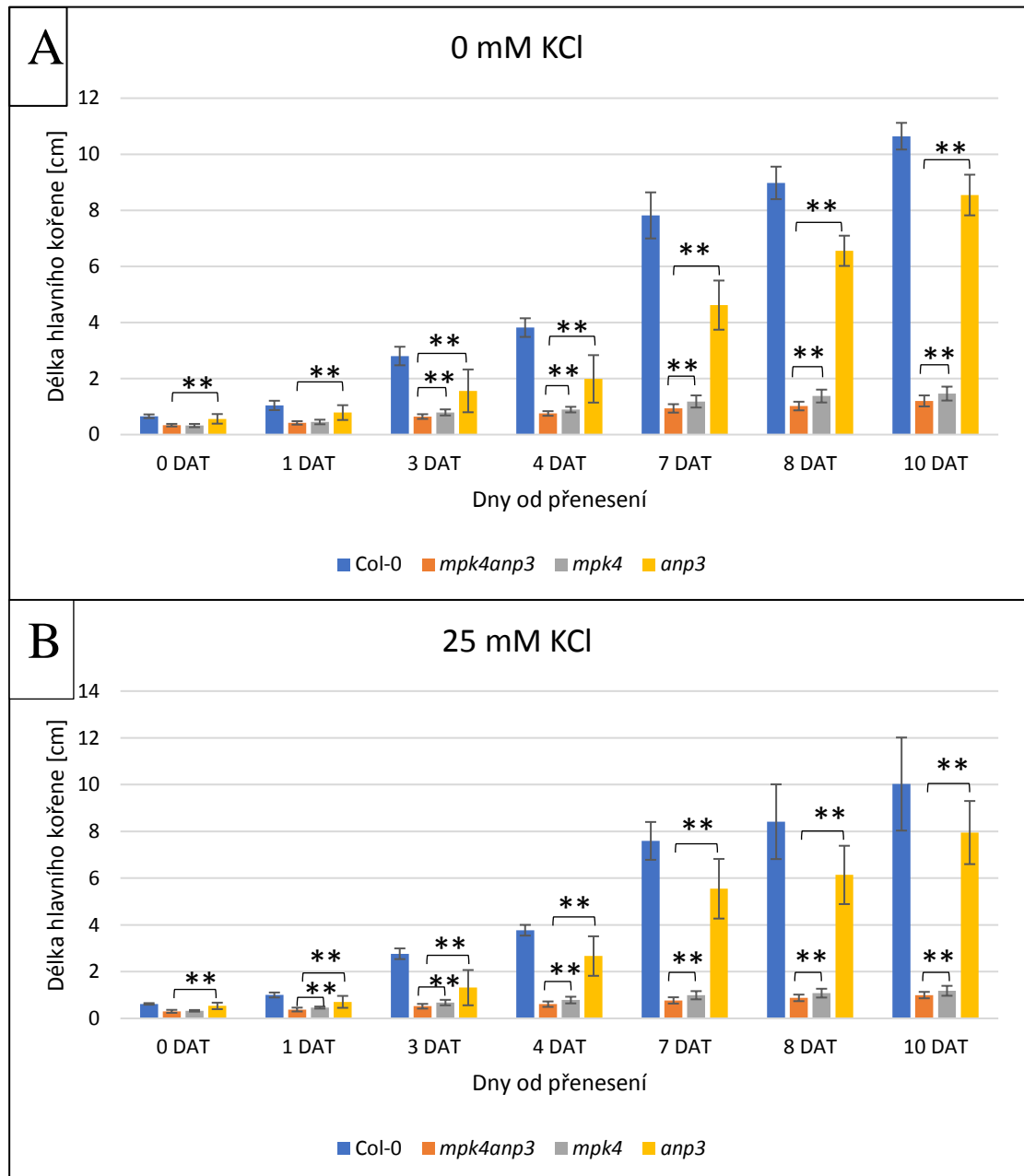
Na kontrolním médiu dosahovaly 10.den po přenosu největší délku kořeny Col-0, průměrná délka byla 10,65 cm, druhé největší délky hlavních kořenů dosahovaly rostliny *anp3*, jejichž průměrná délka byla 8,55 cm (Obr. 12 A). Jak již bylo zmíněno v předcházejícím textu, *mpk4* a *mpk4anp3* mají viditelně zakrslý fenotyp, čemuž odpovídaly i délky kořenů na kontrolním médiu. Pro *mpk4* byla 10.den kultivace průměrná délka kořene 1,46 cm, u *mpk4anp3* to bylo 1,20 cm (Obr. 12 A). Po provedení Studentova t-testu vyplynulo, že od 3. dne měření až do konce měření se od sebe průkazně lišily hodnoty délky kořenů *mpk4* v porovnání s *mpk4anp3*, zatímco hodnoty *anp3* v porovnání s *mpk4anp3* se lišily po celou dobu měření. (Obr. 12 A).

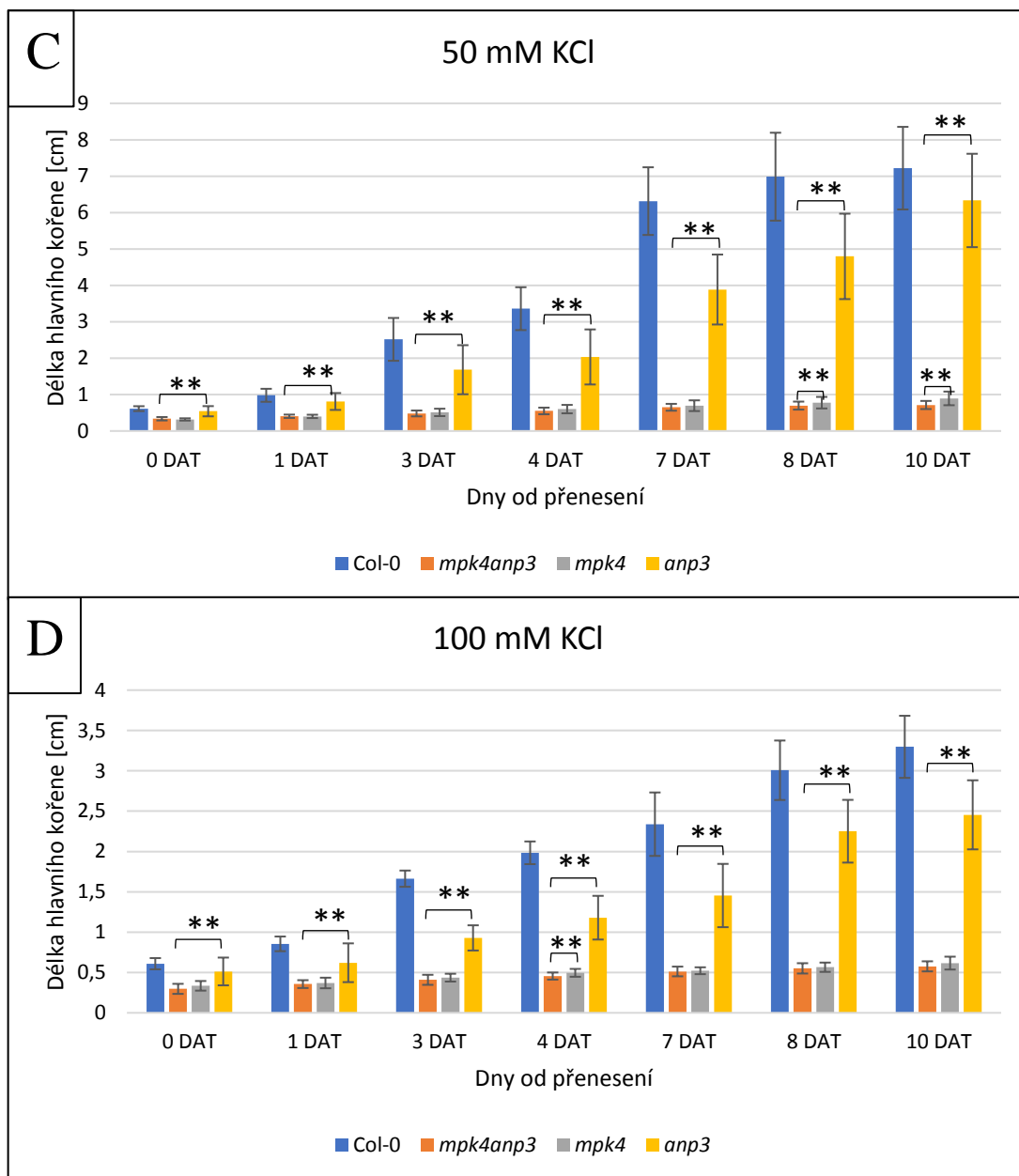
Solný stres inhiboval růst kořenů u všech testovaných rostlin. Inhibice byla znatelná již při nejnižší použité koncentraci KCl – 25 mM. Na tomto médiu byla 10.den po přenosu průměrná délka kořenů Col-0 10,03 cm, u *anp3* byla průměrná hodnota 7,95 cm. Hlavní kořeny *mpk4* dosahovaly průměrné délky 1,18 cm, u *mpk4anp3* to byl 1 cm. Studentův t-test ukázal, že již od 1. dne po přenosu se délky kořenů *mpk4anp3* průkazně lišily od *mpk4*. Průkazný rozdíl byl po celou dobu měření také mezi *anp3* a *mpk4anp3* (Obr. 12 B).

Při koncentraci 50 mM KCl docházelo k výraznější inhibici než u koncentrace 25 mM. Průměrné délky kořenů u všech rostlin dosahovaly 10.den po přenesení na médium se solí nižších hodnot než v případě 25 mM. Vyšší koncentrace soli tedy vedla k vyšší inhibici růstu kořenů. U Col-0 byla průměrná délka 7,22 cm, u *anp3* 6,33 cm, hlavní kořeny *mpk4* měly průměrnou délku 0,90 cm a pro *mpk4anp3* to bylo 0,72 cm. Podle Studentova t-testu se hodnoty *mpk4* a *mpk4anp3* průkazně lišily v 8. a 10. den po přenosu, hodnoty *anp3* a *mpk4anp3* se lišily po celou dobu měření (Obr. 12 C).

U nejvyšší použité koncentrace 100 mM KCl dosahovaly délky kořenů všech rostlin nejnižších průměrných hodnot ze všech použitých koncentrací, tedy koncentrace 100 mM KCl inhibovala růst kořenů nejvíce. Na tomto médiu 10.den po přenosu dosahovala

průměrná délka Col-0 3,30 cm, u *anp3* to bylo 2,45 cm, *mpk4* dosahovaly délky 0,62 cm a *mpk4anp3* 0,58 cm. Průkazně odlišné hodnoty mezi *mpk4* a *mpk4anp3* byly zjištěny pouze 4.den po přenosu, hodnoty *anp3* v porovnání s *mpk4anp3* se lišily po celou dobu měření (Obr. 12 D). Dvojitý mutant *mpk4anp3* tedy u všech použitých koncentrací dosahoval nejnižší délky hlavního kořene.





Obrázek 12 – Porovnání průměrných délek primárních kořenů Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* v podmínkách solného stresu. Délka kořenů byla měřena v průběhu 10 dní, k přenosu došlo u 3 dny starých semenáčků na kontrolní médium (A), médium s obsahem 25 mM KCl (B), 50 mM KCl (C) a 100 mM KCl (D). Dvě hvězdičky označují statisticky průkazný rozdíl mezi *mpk4* a *mpk4anp3* a také mezi *anp3* a *mpk4anp3* dle Studentova t-testu ( $p < 0,05$ ).

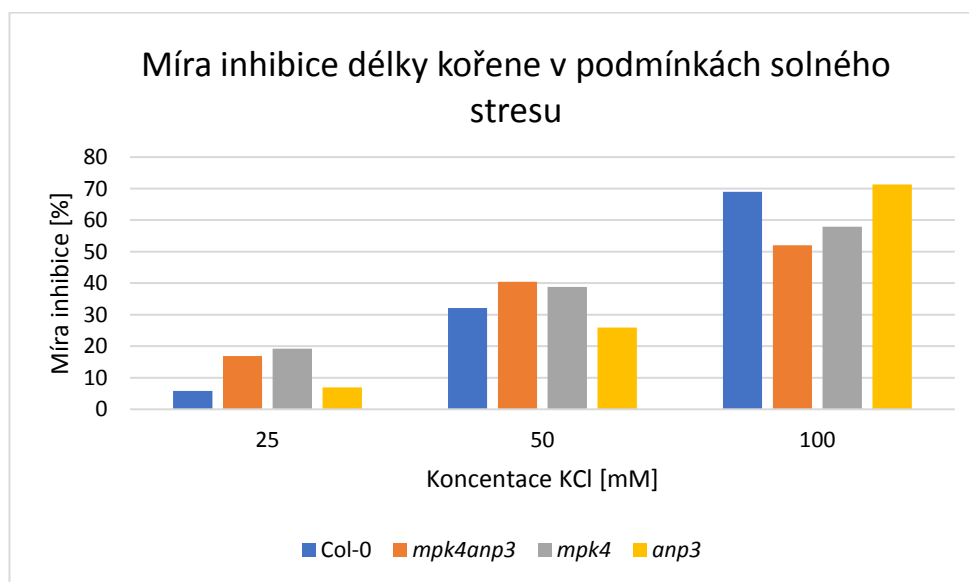
#### 4.2.2 Míra inhibice délky kořene v podmínkách solného stresu

Stanovení míry inhibice v délce hlavního kořene v podmínkách solného stresu proběhlo 10. den po přenosu na médium s různou koncentrací KCl. Průměrné hodnoty délky kořenů při jednotlivých koncentracích KCl byly porovnány s kontrolními podmínkami a byla vypočtena procentuální míra inhibice.

Při koncentraci 25 mM KCl byla míra inhibice u Col-0 5,8 %, u dvojitého mutantu *mpk4anp3* byla 16,9 %, *mpk4* měl 19,2 % míru inhibice a u *anp3* byla 6,9 % míra inhibice (Obr. 13). Při nejnižší použité koncentraci soli byly tedy nejvíce inhibovány kořeny *mpk4*.

Se zvětšující se koncentrací soli se zvětšovala i míra inhibice u jednotlivých linií. Při koncentraci 50 mM KCl vykazovaly kořeny Col-0 32,2 % míru inhibice, dvojitý mutant *mpk4anp3* byl při této koncentraci ze všech linií inhibován nejvíce, míra inhibice byla 40,5 %. Kořeny *mpk4* byly v porovnání s kontrolou inhibovány o 38,8 % a kořeny *anp3* o 25,9 % (Obr. 13).

U nejvyšší použité koncentrace 100 mM byla pozorován nejvyšší míra inhibice u všech linií rostlin. Kořeny Col-0 vykazovaly 69 % míru inhibice, dvojitý mutant *mpk4anp3* měl 52 % míru inhibice, kořeny *mpk4* byly inhibovány o 57,9 % a nejvíce byly inhibovány kořeny *anp3* – 71,3 % (Obr. 13). Z uvedených dat lze usoudit, že zvyšující se koncentrace soli vede k větší míře inhibice délky kořene.



Obrázek 13 – Míra inhibice délky primárního kořene v podmínkách solného stresu u Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3*. Jednotlivé sloupce grafu znázorňují procentuální míru inhibice při dané koncentraci ve srovnání s kontrolními podmínkami, ke srovnání došlo 10. den po přenesení.

### 4.2.3 Vliv solného stresu na počet laterálních kořenů

V rámci studia vlivu solného stresu na kořen rostlin byl také stanoven počet laterálních kořenů v závislosti na koncentraci KCl. K počítání laterálních kořenů u všech testovaných rostlin pomocí stereomikroskopu došlo 7. den po přenesení na média se solí. Přehled fotografií kořenů rostlin, na kterých byly laterální kořeny počítány jsou na Obrázku 15.

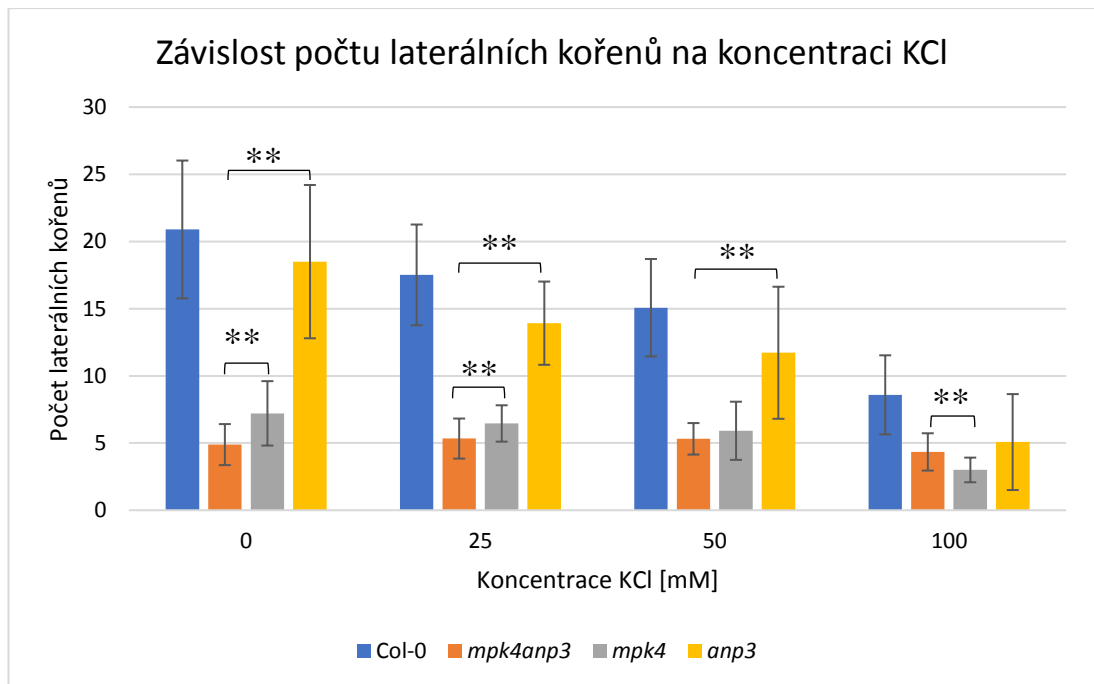
V kontrolních podmínkách měly největší počet laterálních kořenů rostliny Col-0. Průměrný počet byl 20,9, druhý největší počet laterálních kořenů měly rostliny *anp3*, jejichž průměrný počet byl 18,5, rostliny *mpk4* měly průměrně 7,2 laterálních kořenů a nejmenšího počtu dosahovaly rostliny dvojitého mutanta *mpk4anp3* – 4,89 (Obr. 14 a 15 A). Studentův t-test ukázal, že se od sebe průkazně lišilo množství laterálních kořenů *mpk4* a *mpk4anp3* i *anp3* v porovnání s *mpk4anp3* (Obr. 14).

Solný stres měl vliv na počet laterálních kořenů, již při nejmenší použité koncentraci (25 mM KCl) došlo k redukci jejich počtu. Rostliny Col-0 měly průměrný počet 17,51 kořenů, u rostlin *anp3* to bylo 13,92 kořenů, *mpk4* měly v průměru 6,46 kořenů a *mpk4anp3* 5,33 kořenů (Obr. 14 a 15 B). I v tomto případě se od sebe průkazně lišily hodnoty *mpk4* a *mpk4anp3* a také *anp3* v porovnání s *mpk4anp3* (Obr. 14).

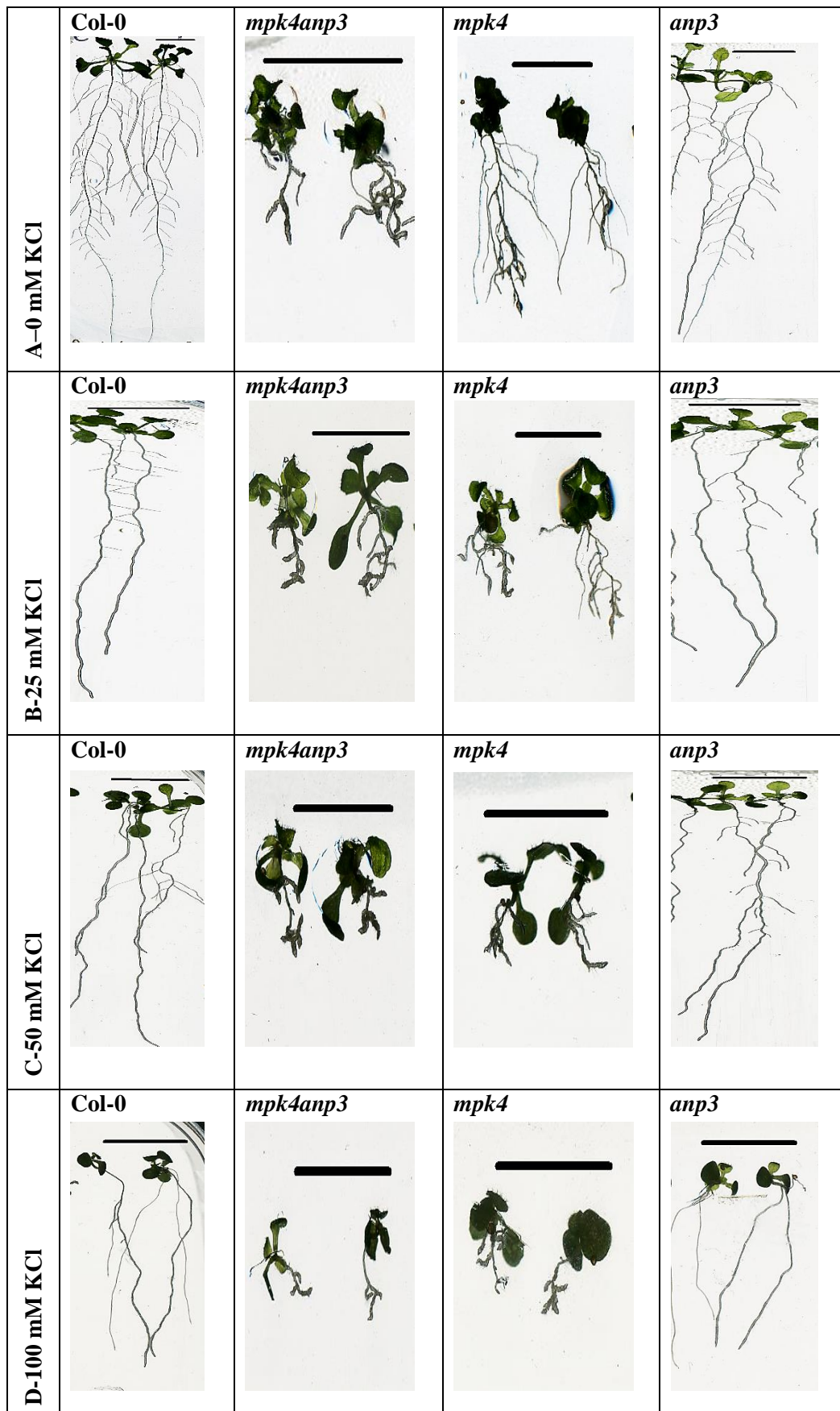
Se zvyšující se koncentrací KCl docházelo k vyšší redukci počtu laterálních kořenů ve srovnání s kontrolními podmínkami. U Col-0 byl při koncentraci 50 mM KCl průměrný počet 15,07 kořenů, u rostlin *anp3* to bylo 11,72, *mpk4* rostliny měly průměrně 5,91 laterálních kořenů a dvojitý mutant *mpk4anp3* 5,32 kořenů. Při koncentraci 50 mM byly průkazné rozdíly zjištěny při porovnání *anp3* a *mpk4anp3* (Obr. 14 a 15 C).

U nejvyšší testované koncentrace 100 mM KCl dosahovaly všechny testované rostliny nejmenšího počtu laterálních kořenů. Koncentrace 100 mM KCl měla tedy největší inhibiční účinek na počet laterálních kořenů. Rostliny Col-0 měly průměrně 8,59 kořenů, *anp3* 5,07 kořenů, u *mpk4* to byly 3 kořeny a *mpk4anp3* 4,34 kořenů. Při nejvyšší koncentraci KCl měly tedy rostliny *mpk4* nejmenší počet laterálních kořenů (Obr. 14 a 15 D). Podle Studentova t-testu se od sebe průkazně lišily počty kořenů *mpk4* v porovnání s *mpk4anp3*, u souboru dat *anp3* v porovnání s *mpk4anp3* nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl (Obr. 14).





Obrázek 14 – Závislost počtu laterálních kořenů na koncentraci KCl u rostlin Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3*. Laterální kořeny byly počítány 7.den po přenesení. Dvě hvězdičky označují statisticky průkazný rozdíl mezi *mpk4* a *mpk4anp3*, a také mezi *anp3* a *mpk4anp3* dle Studentova t-testu ( $p < 0,05$ ).



Obrázek 15 – Přehled kořenů rostlin Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* 7. den po přenosu na kontrolní médium (A), médium obsahující 25 mM (B), 50 mM (C) a (D) 100 mM KCl. Měřítko odpovídá 1 cm.

#### 4.2.4 Vliv solného stresu na vzdálenost kořenové špičky od kořenového vlásku

Vzdálenost mezi kořenovou špičkou a prvním kořenovým vláskem byla měřena 3. den po přenesení na média u všech testovaných rostlin – Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3*.

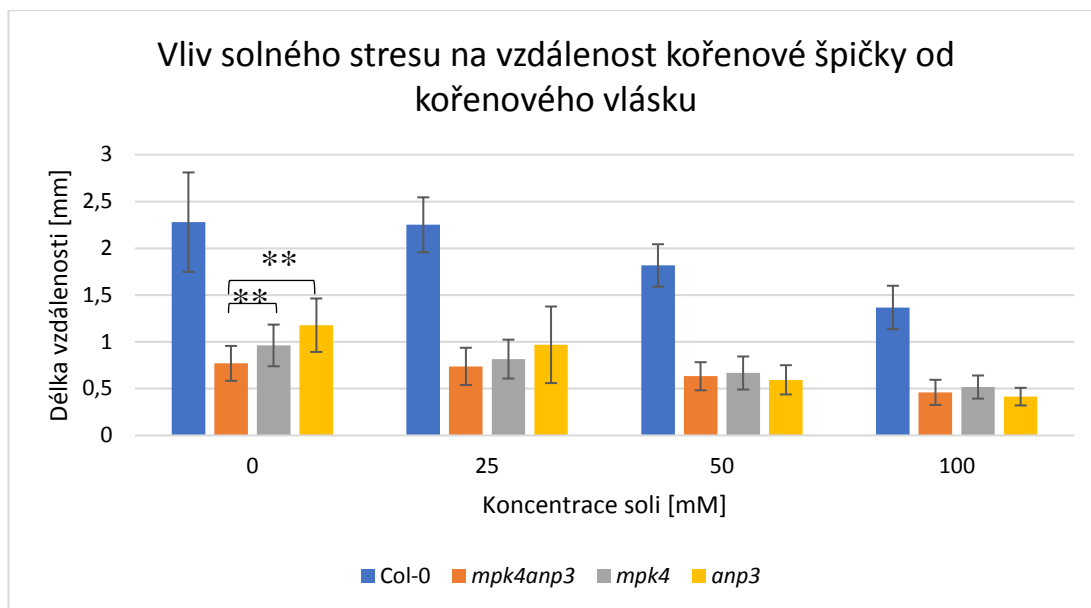
V kontrolních podmínkách měly rostliny Col-0 vzdálenost mezi kořenovou špičkou a kořenovým vláskem nejdelší, průměrná vzdálenost byla 2,28 mm, u dvojitého mutantu 0,77 mm, *mpk4* 0,96 mm a rostliny *anp3* měly průměrnou vzdálenost 1,78 mm. Studentův t-test odhalil, že v kontrolních podmínkách byly statisticky průkazné rozdíly jak mezi *mpk4* a *mpk4anp3*, tak mezi *anp3* a *mpk4anp3* (Obr. 16).

Působení solného stresu měřenou vzdálenost snižovalo již při nejnižší použité koncentraci. U koncentrace 25 mM KCl byla průměrná vzdálenost rostlin Col-0 2,25 mm, *mpk4anp3* 0,74 mm, rostliny *mpk4* měly průměrnou vzdálenost 0,82 mm a *anp3* 0,97 mm. Studentův t-test neodhalil statisticky průkazné rozdíly mezi srovnávanými soubory dat (Obr. 16).

Koncentrace 50 mM KCl vedla k další redukci měřené vzdálenosti. Při této koncentraci měly rostliny Col-0 průměrnou vzdálenost 1,82 mm, dvojitý mutant *mpk4anp3* 0,63 mm, rostliny *mpk4* 0,67 a *anp3* 0,59 mm. Ani při této koncentraci neodhalil Studentův t-test statisticky průkazné rozdíly mezi hodnocenými soubory dat (Obr.16).

Nejvyšší použitá koncentrace - 100 mM KCl nejvíce inhibovala vzdálenost mezi kořenovou špičkou a prvním kořenovým vláskem. U rostlin Col-0 byla průměrná vzdálenost 1,37 mm, *mpk4anp3* 0,46 mm, u rostlin *mpk4* to bylo 0,52 mm a *anp3* 0,42 mm. Studentovým t-testem nebyly odhaleny statisticky průkazné rozdíly mezi hodnocenými daty (Obr.16).

Nejmenší naměřenou vzdálenost tedy vykazoval ve všech případech dvojitý mutant *mpk4anp3*.



Obrázek 16 – Vliv solného stresu na vzdálenost kořenové špičky od kořenového vlásku u rostlin Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3*. Hodnocená vzdálenost byla měřena 3. den po přenesení na média. Dvě hvězdičky označují statisticky průkazný rozdíl mezi *mpk4* a *mpk4anp3* a také mezi *anp3* a *mpk4anp3* dle Studentova t-testu ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.5 Vliv solného stresu na nadzemní část rostlin

Pro studium změn fenotypů a viability rostliny působením dlouhodobého solného stresu byly vysazeny všechny testované rostliny (Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4*, *anp3*) na Petriho misku. Třetí den byly semenáčky přeneseny na média obsahující různé koncentrace KCl a NaCl. Zvolené koncentrace KCl byly 50, 100 a 125 mM, u NaCl to byly koncentrace 50, 75 a 100 mM. Miska s ½ MS médiem sloužila jako kontrola, Petriho misky byly vyfotografovány 0., 7. a 14. den po přenosu.

Po 7 dnech bylo možné na kontrolní misce pozorovat stejnou velikost listové růžice u Col-0 a *anp3*. Rostliny *mpk4* měly zase srovnatelnou velikost listové růžice s rostlinami *mpk4anp3* (Obr. 17, kontrola). Na médiích s různými koncentracemi KCl byla ve srovnání s kontrolou pozorovatelná redukce velikosti listové růžice u všech testovaných linií. Po 7 dnech na miskách s koncentrací 50 a 100 mM KCl všechny rostliny přežily (Obr. 17, 50 a 100 mM KCl), nekrotizované rostliny se nacházely na misce s koncentrací 125 mM KCl – přeživalo 90,9 % rostlin *mpk4anp3* a 90 % *mpk4*, rostliny Col-0 a *anp3* přežily všechny (Obr. 17, 125 mM KCl).

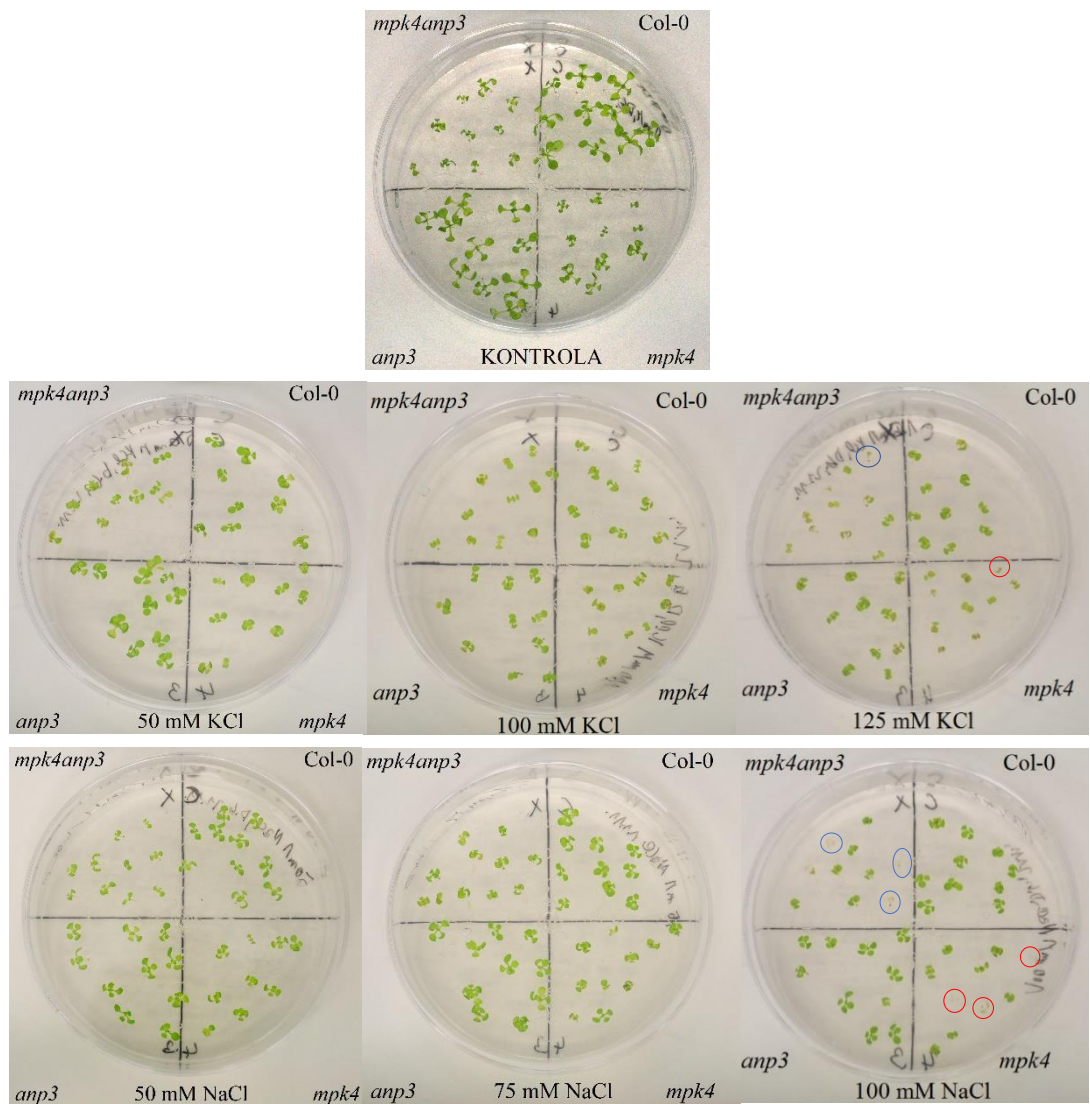
Na miskách s různou koncentrací NaCl byla také pozorována redukce velikosti listové růžice u všech rostlin. Na miskách s koncentracemi 50 a 75 mM NaCl přežily všechny rostliny (Obr. 17, 50 a 75 mM NaCl). U nejvyšší použité koncentrace NaCl – 100 mM

byly pozorovány nekrotizované rostliny. Přeživalo 70 % rostlin dvojitého mutantu *mpk4anp3* i mutantu *mpk4*, rostliny Col-0 a *anp3* přeživaly všechny (Obr. 17, 100 mM NaCl).

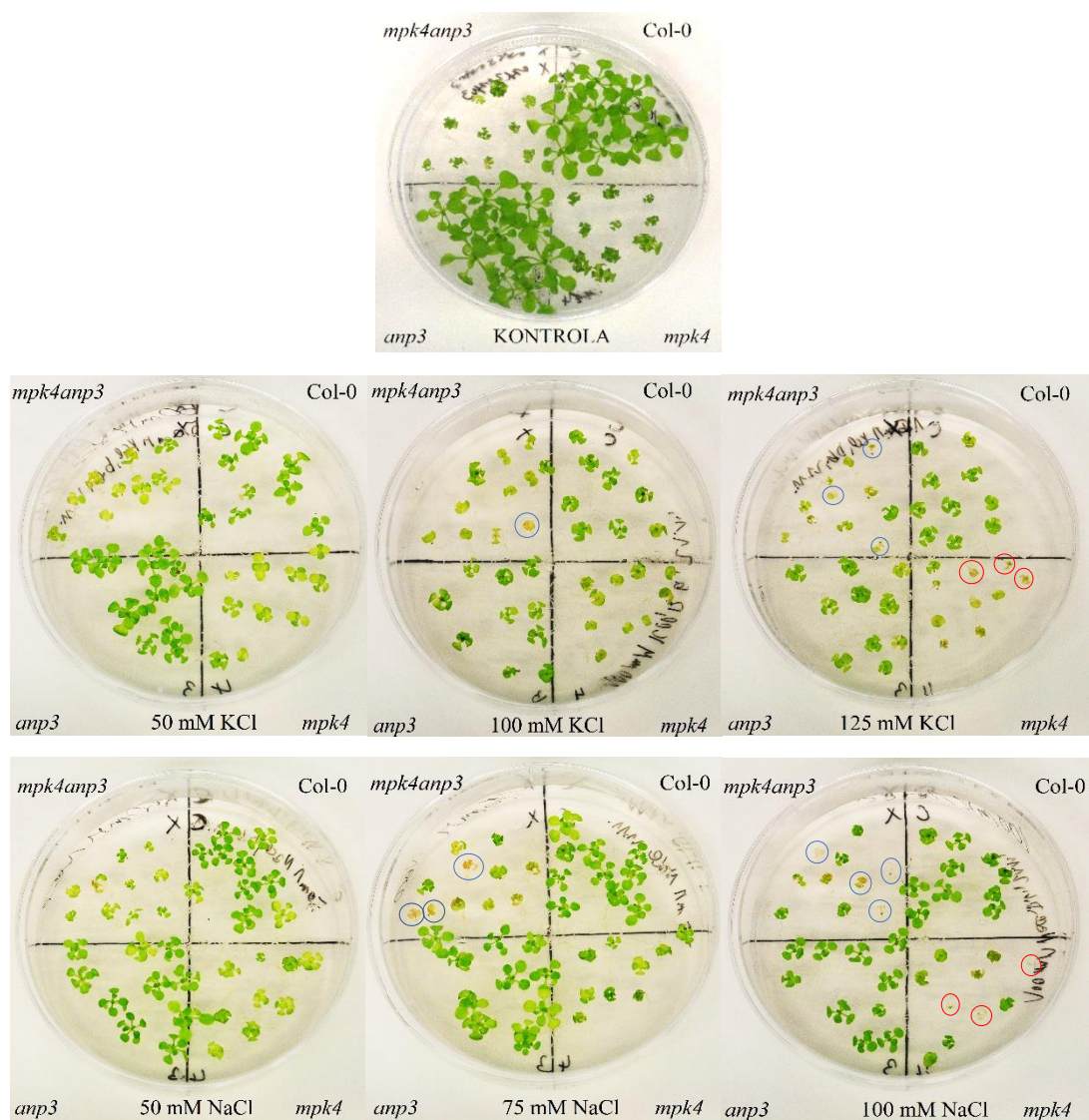
Po 14 dnech kultivace byly na miskách obou použitých solí viditelné rozdíly. Na misce s koncentrací 50 mM KCl byly u rostlin *mpk4* a *mpk4anp3* pozorovatelné žloutnoucí listové růžice, u Col-0 a *anp3* byly všechny listové růžice zelené a normálně rostly. Všechny testované linie rostlin při této koncentraci přeživaly (Obr. 18, 50 mM KCl). U koncentrace 100 mM KCl byly listové růžice mutantů *mpk4anp3* a *mpk4* světlejší ve srovnání s kontrolou. Při této koncentraci přeživalo 90,9 % rostlin *mpk4anp3*, z ostatních testovaných rostlin přeživaly všechny (Obr. 18, 100 mM KCl). Na misce s největší koncentrací KCl – 125 mM byly u rostlin *mpk4* a *mpk4anp3* pozorovatelné světlé listové růžice a u obou linií se na misce nacházely nekrotizované rostliny. Viabilita u *mpk4* dosahovala 70 % a u *mpk4anp3* 72,7 % (Obr. 18, 125 mM KCl).

Na misce s koncentrací 50 mM NaCl byly ve srovnání s kontrolou pozorované žloutnoucí listové růžice rostlin *mpk4* a *mpk4anp3* a všechny testované rostliny přeživaly (Obr. 18, 50 mM NaCl). U koncentrace 75 mM NaCl přeživalo 72,7 % rostlin *mpk4anp3*, rostliny Col-0, *mpk4* a *anp3* přeživaly všechny (Obr. 18, 75 mM NaCl). Také na misce s nejvyšší použitou koncentrací NaCl – 100 mM byly pozorovány nekrotizované rostliny, u *mpk4* dosahovala viabilita 70 % a u *mpk4anp3* 60 % (Obr. 18, 100 mM NaCl).

Z experimentu vyplývá, že mutantní rostliny *mpk4anp3* a *mpk4* jsou citlivější na působení solného stresu než divoký typ Col-0 a mutant *anp3*. U těchto rostlin nemělo působení dvoutýdenního stresu vliv na viabilitu, docházelo ale k redukci velikosti listové růžice. Účinek solného stresu způsobeného KCl na viabilitu rostlin *mpk4* a *mpk4anp3* byl zhruba srovnatelný, solný stres způsobený NaCl byl toxicitější pro dvojitého mutantu *mpk4anp3*.



Obrázek 17 – Vliv solného stresu KCl a NaCl na rostliny Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* po 7 dnech kultivace: kontrola, 50 mM KCl, 100 mM KCl, 125 mM KCl, 50 mM NaCl, 75 mM NaCl, 100 mM NaCl. Červené kruhy značí nekrotizované rostliny *mpk4*, modré kruhy značí uhynulé rostliny *mpk4anp3*.



Obrázek 18 – Vliv solného stresu KCl a NaCl na rostliny Col-0, *mpk4anp3*, *mpk4* a *anp3* po 14 dnech kultivace: kontrola, 50 mM KCl, 100 mM KCl, 125 mM KCl, 50 mM NaCl, 75 mM NaCl, 100 mM NaCl. Červené kruhy značí nekrotizované rostliny *mpk4*, modré kruhy značí uhynulé rostliny *mpk4anp3*.

## 5 Diskuze

Cílem této bakalářské práce byla fenotypová charakterizace dvojitého mutantu *mpk4anp3*. Nejdříve byla provedena obecná charakterizace dvojitého mutantu v kontrolních podmínkách a následně byl aplikován solný stres. V průběhu experimentů byl použit divoký typ Col-0 jako kontrola, vybraný dvojitý mutant – *mpk4anp3* a jemu příslušní jednodušší mutanti *mpk4* a *anp3* pro srovnání.

Dvojitý mutant *mpk4anp3* se vyznačoval zakrslým růstem ve srovnání s Col-0, stejně jako jednoduchý mutant *mpk4*. Při mikroskopickém pozorování byly zjištěny další podobnosti s *mpk4*. Obě rostliny měly podobný fenotyp kořene, ektopický růst kořenových vlásků, docházelo také k větvení kořenových vlásků u obou rostlin (Obr. 5 C, D, E, F). Mutanti *mpk4* a *anp2anp3* vykazují nedostatky v celkové organizaci mikrotubulů, což vede k abnormálnímu růstu buněk, mimo jiné i k větvení kořenových vlásků, které mají často ztluštělou bázi vlásku (Beck *et al.*, 2010), všechny tyto aberace byly pozorovány i v této práci. Jednoduchý mutant *anp3* se jevil podobný Col-0, neměl redukovaný růst, kořenové vlásky rostly stejně jako u divokého typu ve sloupcích, nicméně při bližším mikroskopickém pozorování kořene bylo také odhaleno větvení kořenových vlásků jako u *mpk4anp3* a *mpk4* (Obr. 5 G, H).

Délka kořene *mpk4anp3* byla v kontrolních podmínkách kratší než u příslušných jednoduchých mutantů. Délka kořene *mpk4anp3* se v kontrolních podmínkách průkazně odlišovala dle Studentova t-testu od *mpk4* a to od 3. dne měření až po 10. den (Obr. 12 A). Ve srovnání s *anp3* dle Studentova t-testu byly významné rozdíly ve všech měřených dnech (Obr. 12 A). Tato pozorování odpovídají práci, kde dvojitý mutant *mpk4anp3* vykazoval redukci oproti *mpk4* a mutant *anp3* byl podobný divokému typu Col-0 (Su a Krysan, 2016).

Dalším sledovaným parametrem byl počet laterálních kořenů u všech testovaných rostlin. V tomto případě bylo zjištěno, že dvojitý mutant má průkazně menší počet laterálních kořenů než jemu odpovídající jednodušší mutanti *mpk4* a *anp3* v kontrolních podmínkách (Obr. 14). Studium vzdálenosti od kořenové špičky po první kořenový vlásek odhalilo, že i tato vzdálenost je ve srovnání s jednoduchými mutanty *mpk4* a *anp3* v kontrolních podmínkách významně kratší u dvojitého mutantu (Obr. 16).

Proběhlo také pozorování anatomie kořenové špičky pomocí barvení vitálním fluorescenčním barvivem FM4-46. Zde byly odhaleny rozdíly mezi anatomii Col-0 a dvojitého mutantu *mpk4anp3*. Zatímco u Col-0 měly buňky pravidelný tvar a byly



přehledně uspořádány, tak u *mpk4anp3* byly pozorovány buňky nepravidelného tvaru a nedokončené buněčné stěny. Dvojitý mutant se opět podobal jednoduchému mutantovi *mpk4*, mutant *anp3* nevykazoval žádné odlišnosti ve srovnání s Col-0 (Obr. 6). Nedokončené buněčné stěny souvisí s defekty v cytokinezi, pozorování zde uvedená korelují prací s Beck *et al.* (2011), kde byly také u mutantu *mpk4* po nabarvení FM4-46 pozorovány stejné aberace, Col-0 měla v této práci normální uspořádání, po barvení pomocí DAPI bylo zjištěno že většina zvětšených buněk u *mpk4*, včetně těch, které měly nedokončené buněčné stěny, měly dvě a více jader

Při pozorování průduchů pod epifluorescenčním mikroskopem nebyly odhaleny významné rozdíly mezi testovanými rostlinami. Délka průduchů u kotyledonů byla u všech rostlin delší než délka průduchů na pravých listech (Obr. 7). Průduchy byly také pozorovány pomocí barvení vitálním fluorescenčním barvivem FM4-64 a hodnocenými parametry byly délka, šířka a počet průduchů na plochu listu. Při hodnocení délky průduchů nebyly odhaleny průkazné rozdíly mezi rostlinami *mpk4* v porovnání s *mpk4anp3* a *anp3* v porovnání s *mpk4anp3* (Obr. 9 A). Naopak u šířky průduchů existoval průkazný rozdíl podle Studentova t-testu mezi *mpk4anp3* a *anp3* (Obr. 9 B). Průměrná šířka průduchů *anp3* byla menší než u *mpk4anp3*. Stanovením počtu průduchů na plochu listu vyplynulo, že dvojitý mutant má průkazně menší počet průduchů na plochu ve srovnání s jednoduchými mutanty *mpk4* a *anp3* (Obr. 10).

Další částí práce bylo působení solného stresu na testované rostliny. I v tomto případě byla měřena délka kořenů, vzdálenost od kořenové špičky po první kořenový vlásek, počítání laterálních kořenů. Solný stres měl inhibiční účinek na testované rostliny. Působení solného stresu na rostliny způsobuje redukci růstu, redukci celkové plochy listů, kořenového systému a má také vliv na viabilitu rostlin (Yadav *et al.*, 2011; Carillo *et al.*, 2011; Chartzoulakis a Klapaki, 2000), ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  ve zvýšené koncentraci toxicky ovlivňují buněčné membrány a také metabolismus (Kader a Lindberg, 2010).

Se zvyšující se koncentrací se snižovala délka kořenů, počet laterálních kořenů a také vzdálenost od kořenové špičky po kořenový vlásek (Obr. 12 B, C, D, Obr. 14, Obr. 16). Z těchto experimentů ale není možné určit, zdali byl dvojitý mutant *mpk4anp3* citlivější na sůl než *mpk4*. I když dvojitý mutant dosahoval při všech koncentracích ve všech měřených dnech nižších délek kořenů než *mpk4*, provedením Studentova t-testu byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly při koncentraci 25 mM od 1. po 10. den měření, u koncentrace 50 mM v 8. a 10. dnu měření a při 100 mM pouze u 4. dne měření. Při srovnání dvojitého mutantu s *anp3* byly zjištěny průkazné rozdíly po celou dobu měření

u všech použitých koncentrací (Obr. 12 B, C, D). Stanovení míry inhibice růstu kořene neukázalo jasný trend, při každé měřené koncentraci došlo k největší inhibici jiné testované rostliny (Obr. 13).

Byl tedy sledován vliv solného stresu na nadzemní část rostlin, proběhlo stanovení viability. Byla použita média s různými koncentracemi KCl a NaCl. Po 2 týdnech kultivace neměly ani nejvyšší použité koncentrace KCl (125 mM) a NaCl (100 mM) zásadní vliv na rostliny Col-0 a *anp3*, viditelná byla pouze redukce listové růžice (Obr. 18). Nekrotizované rostliny *mpk4* a *mpk4anp3* byly pozorovány po 7 dnech na miskách s koncentracemi 125 mM KCl a 100 mM NaCl (Obr. 17). Po dvou týdnech se nacházely nekrotizované rostliny *mpk4anp3* na miskách s koncentracemi 100 a 125 mM KCl, 75 a 100 mM NaCl, nekróza *mpk4* byla pozorována pouze na nejvyšších použitých koncentracích KCl (125 mM) a NaCl (100 mM) (Obr. 18). Solný stres způsobil kromě nekrózy také úbytek chlorofylu (Li *et al.*, 2016). Solný stres způsobený NaCl byl ve srovnání *mpk4anp3* s *mpk4* toxičtější pro dvojitého mutantu, vliv KCl byl zhruba srovnatelný.

## 6 Závěr

Tato bakalářská práce byla rozdělena na teoretickou a experimentální část, v teoretické části byla popsána modelová rostlina *Arabidopsis thaliana*, která slouží jako modelový organismus v buněčné a molekulární biologii. Byl popsán mechanismus fungování MAPK, které představují důležitou součást rostlinné signalizace. Hlavní část byla věnována zapojení MAPK do odpovědi rostlin na různorodý abiotický stres. Další kapitola teoretické části byla věnována dvojitým mutantům, kteří mohou sloužit při odhalování funkce genů. Zmíněn je také proces produkce dvojitých mutantů.

Experimentální část se nejdříve věnovala obecné charakterizaci dvojitého mutantu *mpk4anp3*, proběhlo srovnání s divokým typem Col-0 a příslušnými jednoduchými mutanty *mpk4* a *anp3*. Dvojitý mutant *mpk4anp3* se projevoval zakrslým růstem, ektopickým růstem kořenových vlásků, které byly mnohdy rozvětvené. Při hodnocení délky kořenů, počtu laterálních kořenů, vzdálenosti od kořenové špičky po první kořenový vlásek dosahoval dvojitý mutant ze všech testovaných rostlin nejmenších hodnot. Ve srovnání s ostatními rostlinami měl také menší počet průduchů na plochu listu, část průduchů byla různě deformovaná. V oblasti kořenové špičky byly pozorovány nedokončené buněčné stěny a chaotické uspořádání buněk.

Další část byla zaměřena na studium působení solného stresu na dvojitého mutantu *mpk4anp3*. Solný stres měl inhibiční účinek, docházelo ke snižování hodnot měřených parametrů – délky kořenů, vzdálenosti kořenové špičky po první kořenový vlásek, počtu laterálních kořenů. Dlouhodobé působení solného stresu způsobovalo všem testovaným rostlinám redukcii velikosti listové růžice, u *mpk4anp3* a *mpk4* docházelo také k nekróze části rostlin. Solný stres navozený NaCl snížil viabilitu dvojitého mutantu *mpk4anp3* ve srovnání s *mpk4*.

## 7 Literatura

- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry C.C., Ecker J.R. (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653–657.
- Arioli T., Peng L., Betzner A.S., Burn J., Wittke W., Herth W., Camilleri C., Höfte H., Plazinski J., Birch R., Cork A., Glover J., Redmond J., Williamson R.E. (1998): Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* **279**, 717–720.
- Arisz S.A., van Wijk R., Roels W., Zhu J.K., Haring M.A., Munnik T. (2013): Rapid phosphatidic acid accumulation in response to lowtemperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1.
- Assaad, F.F., Mayer U., Wanner G., Jurgens G. (1996): The KEULE gene is involved in cytokinesis in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics* **253**, 267–277.
- Banno H., Hirano K., Nakamura T., Irie K., Nomoto S., Matsumoto K., Machida Y. (1993): NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11, and Byr2 protein kinases. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 4745–4752.
- Bargmann B.O., Laxalt A.M., ter Riet B., van Schooten B., Merquiol E., Testerink C., Haring M.A., Bartels D., Munnik T. (2009): Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiology* **50**, 78–89.
- Bartels S, González Besteiro M.A., Lang D., Ulm R. (2010): Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends in Plant Science* **15**, 322–329.
- Beck M., Komis G., Müller J., Menzel D., Šamaj J. (2010): *Arabidopsis* Homologs of Nucleus – and Phragmoplast-Localized Kinase 2 and 3 and Mitogen-Activated Protein Kinase 4 Are Essential for Microtubule Organization. *The Plant Cell* **22**, 755–771.
- Beck M., Komis G., Ziemann A., Menzel D., Šamaj J. (2011): Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist Journal* **189**, 1069–1083.
- Bergmann D.C., Lukowitz W., Somerville C.R. (2004): Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* **304**, 1494–7.
- Bhattacharyya R.P., Reményi A., Yeh B.J., Lim W.A. (2006): Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annual Review of Biochemistry* **75**, 655–680.
- Bigeard J., Hirt H. (2018): Nuclear Signaling of Plant MAPKs. *Frontiers in Plant Science* **9**, 469.
- Bögre L., Ligterink W., Meskiene I., Barker P.J., Heberle-Bors E., Huskisson N.S., Hirt H. (1997): Wounding induces the apid and transient activation of a specific MAP kinase Pathway. *Plant Cell* **9**, 75–83.
- Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauach M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N.S., Hirt H., Heberle-Bors E. (1999): A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* **11**, 101–113.
- Bolle C., Schneider A., Leister, D. (2011): Perspectives on systematic analyses of gene function in *Arabidopsis thaliana*: new tools, topics and trends. *Current Genomics* **12**, 1–14.

- Boller T., Felix G. (2009): A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 379–406.
- Boone C., Bussey H. and Andrews B.J. (2007): Exploring genetic interactions and networks with yeast. *Nature Reviews Genetics* **8**, 437–449.
- Broekaert W.F., Delaure S.L., De Bolle M.F., Cammue B.P.A. (2006): The role of ethylene in host–pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 393–416.
- Bush S.M. and Krysan P.J. (2007): Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2181–2191.
- Calderini O., Bogre L., Vicente O., Binarova P., Heberle-Bors E., Wilson C. (1998): A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *Journal of Cell Science* **111**, 3091–3100.
- Carillo P., Annunziata M. G., Pontecorvo G., Fuggi A., Woodrow P. (2011): Salinity Stress and salt tolerance. *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. (Prof. Shanket A. ed.), In Tech, 22-38.
- Cassimeris L., Spittle C. (2001): Regulation of mikrotubule associated proteins. *International Review of Cytology* **210**, 163–226.
- Ciais P., Reichstein M., Viovy N., Granier A., Ogee J., Allard V., Aubinet M., Buchmann N., Bernhofer Ch., Carrara A., Chevallier F., De Noblet N., Friend A.D., Friedlingstein P., Grünwald B., Heinesch B., Keronen P., Knohl A., Krinner G., Loustau D., Manca G., Matteucci G., Miglietta F., Ourcival J.M., Papale D., Pilegaard K., Rambal S., Seufert G., Soussana J.F., Sanz M.J., Schulze E.D., Vesala T., Valentini R. (2005): Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* **437**, 529-533.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217–226.
- Costanzo M., Baryshnikova A., Bellay J., Kim Y., Spear E.D., Sevier C.S., Ding H., Koh J.L., Toufighi K., Mostafavi S., Prinz J., St Onge R.P., VanderSluis B., Makhnechiv T., Vizeacoumar F.J., Alizadeh S., Bahr S., Brost R.L., Chen Y., Cokol M., Deshpande R., Li Z., Lin Z.Y., Liang W., Marback M., Paw J., San Luis B.J., Shuterigi E., Tong A.H., van Dyk N., Wallace I.M., Whitney J.A., Weirauch M.T., Zhong G., Zhu H., Houry W.A., Brudno M., Ragibizadeh S., Papp B., Pál C., Roth F.P., Giaever G., Nislow C., Troyanskaya O.G., Bussey H., Bader G.D., Gingras A.C., Morris Q.D., Kim P.M., Kaiser C.A., Myers C.L., Andrews B.J., Boone C. (2010): The genetic landscape of a cell. *Science* **327**, 425–431.
- Cutler S., McCourt P. (2005): Dude, where's my phenotype? Dealing with redundancy in signaling networks. *Plant Physiology* **138**, 558–559.
- Das R., Pandey G.K. (2010): Expressional analysis and role of calcium regulated kinases in abiotic stress signaling. *Current Genomics* **11**, 2–13.
- D'Emilio M., Caggiano R., Macchiato M., Ragosta M., Sabia S. (2013): Soil heavymetal contamination in an industrial area: analysis of the data collected during a decade. *Environmental Monitoring and Assessment* **185**, 5951–5964.
- Desai A., and Mitchison T.J. (1997): Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**, 83–117.
- Dóczi R., Okrészl L., Romero A.E., Paccanaro A., Bögre L. (2012): Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends in Plant Science* **17**, 518–525.

- Du X., Jin Z., Liu D., Yang G., Pei Y. (2017): Hydrogen sulfide alleviates the cold stress through MPK4 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **120**, 112–119.
- Duan P., Rao Y., Zeng D., Yang Y., Yu R., Zhang B., Dong G., Qian Q., Li Y. (2014) SMALL GRAIN 1, which encodes a mitogen-activated protein kinase kinase 4, influences grain size in rice. *Plant Journal* **77**, 547–557.
- Franklin-Tong V.E., Gourlay CW. (2008): A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochemical Journal* **413**, 389–404.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006): Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 436–442.
- Gao H., Granka J.M., Feldman M.W. (2010): On the classification of epistatic interactions. *Genetics* **184**, 827–837.
- Garai A., Zeke A., Gógl G., Törő I., Fördős F., Blankenburg H., Bárkai T., Varga J., Alexa A., Emig D., Albrecht M., Reményi A. (2012): Specificity of linear motifs that bind to a common mitogen-activated protein kinase docking groove. *Science Signaling* **5**, 74.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909–930.
- Guan Y., Lu J., Xu J., McClure B., Zhang S. (2014): Two mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, are required for funicular guidance of pollen tubes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **165**, 528–533.
- Han L., Li G.J., Yang K.Y., Mao G., Wang R., Liu Y., Zhang S. (2010): Mitogen activated protein kinase 3 and 6 regulate *Botrytis cinerea*-induced ethylene production in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **64**, 114–127.
- Han S., Wang C.W., Wang W.L., Jiang J. (2014): Mitogen-activated protein kinase 6 controls root growth in *Arabidopsis* by modulating Ca<sup>2+</sup>-based Na<sup>+</sup> flux in root cell under salt stress. *Journal of Plant Physiology* **171**, 26–34.
- Hong Y., Zhang W., Wang X. (2010): Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant Cell Environment* **33**, 627–635.
- Hord C.L.H., Sun Y.J., Pillitteri L.J., Torii K.U., Wang H., Zhang S., Ma H. (2008): Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Molecular Plant* **1**, 645–658.
- Huang G.T., Ma S.L., Bai L.P., Zhang L., Ma H., Jia P., Liu J., Zhong M., Guo Z.F. (2012): Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports* **39**, 969–987.
- Huang T.L., Huang H.J. (2008): ROS and CDPK-like kinase-mediated activation of MAP kinase in rice roots exposed to lead. *Chemosphere* **71**, 1377–1385.
- Huang Y., Li H., Gupta R., Morris P.C., Luan S., Kieber J.J. (2000): ATMPK4, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiology* **122**, 1301–1310.
- Chaiwongsar S., Otegui M.S., Jester P.J., Monson S.S., Krysan P.J. (2006): The protein kinase genes MAP3Ke1 and MAP3Ke2 are required for pollen viability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **48**, 193–205.
- Chang L., Karin M. (2001): Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* **410**, 37–40.

- Chang X. and Nick P. (2012): Defence signalling triggered by Flg22 and Harpin is integrated into a different stilbene output in *Vitis* cells. *PLoS ONE* **7**, e40446.
- Chartzoulakis K., Klapaki G. (2000): Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia Horticulturae*. **86**, 247-260.
- Cheng, C.Y., Krishnakumar V., Chan A.P., Thibaud-Nissen F., Schobel S. and Town C. D. (2017): Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *The Plant Journal* **89**, 789–804.
- Choudhury S., Panda P., Sahoo L., Panda S.K. (2013): Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling Behavior* **8**, e23681.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant Journal* **24**, 655–665.
- Ishihama N., Yoshioka H. (2012): Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 431–437
- Jammes F., Song C., Shin D., Munemasa S., Takeda K., Gu D., Cho D., Lee S., Giordo R., Sritubtim S., Leonhardt N., Ellis B.E., Murata Y., Kwak J.M. (2009): MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **106**, 20520–20525.
- Jonak C., Kiegerl S., Ligterink W., Barker P.J., Huskisson N.S., Hirt H. (1996): Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **93**, 11274-11279.
- Jonak C., Okresz L., Bogre L., Hirt H. (2002): Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 415-424.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. (2004): Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology* **136**, 3276–3283.
- Jones J.D., Dangl J.L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Kader M. A., Lindberg S. (2010): Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signaling and Behavior* **5**, 233-238.
- Khan M.N., Siddiqui M.H., Mohammad F., Naeem M. (2012): Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide* **27**, 210–218.
- Khokhlatchev A.V., Canagarajah B., Wilsbacher J., Robinson M., Atkinson M., Goldsmith E., Cobb M.H. (1998): Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**, 605–615.
- Kim J.M., Woo D.H., Kim S.H., Lee S.Y., Park H.Y., Seok H.Y., Chung W.S., Moon Y.H. (2012): Arabidopsis MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *Plant Cell Reports* **31**, 217–224.
- Kim S.H., Woo D.H., Kim J.M., Lee S.Y., Chung W.S., Moon Y.H. (2011): Arabidopsis MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **412**, 150–154.
- Komis G., Illes P., Beck M., Šamaj, J. (2011): Microtubules and mitogen activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 650–657.
- Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2018): Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology* **69**, 237-265.

- Koorneef M., Meinke D. (2010): The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal* **61**, 909-921.
- Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcombet J., Sasabe M., Soyano T., Takahashi S., Hirt H., Machida Y. (2010): The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 3778–3790.
- Kovtun Y., Chiu W.L., Zeng W., Sheen J. (1998): Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* **395**, 716–720.
- Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **97**, 2940–2945.
- Krtková J., Benáková M., Schwarzerová K. (2016): Multifunctional Microtubule-Associated Proteins in Plants. *Frontiers in Plant Science* **7**, 474.
- Krysan P.J., Jester P.J., Gottwald J.R., Sussman M.R. (2002): An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell* **14**, 1109–1120.
- Kuzmin E., Sharifpoor S., Baryshnikova A., Costanzo M., Myers C.L., Andrews B.J., Boone, C. (2014): Synthetic genetic array analysis for global mapping of genetic networks in yeast. *Methods in Molecular Biology* **1205**, 143–168.
- Lampard G.R., Lukowitz W., Ellis B.E., Bergmann D.C. (2009): Novel and expanded roles for MAPK signaling in *Arabidopsis* stomatal cell fate revealed by cell type-specific manipulations. *Plant Cell* **21**, 3506–3517.
- Laohavisit A., Colaco R, Davies J. (2012): Cytosolic Ca(2+) determinations in studying plant responses to salinity and oxidative stress. *Methods in Molecular Biology* **913**, 163–171.
- Lee H.K., Cho S.K., Son O., Xu Z., Hwang I., Kim W.T. (2009a): Drought stress-induced Rma1H1, a RING membraneanchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **21**, 622-641.
- Lee J.S., Ellis B.E. (2007): *Arabidopsis* MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 25020–25029.
- Lee J.S., Wang S., Sritubtim S., Chen J.G., Ellis B.E. (2009b): *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase MPK12 interacts with the MAPK phosphatase IBR5 and regulates auxin signaling. *The Plant Journal* **57**, 975–985.
- Li G., Meng X., Wang R., Mao G., Han L., Liu Y., Zhang S. (2012): Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **8**, e1002767.
- Li P.C., Huang J.G., Yu S.W., Li Y.Y., Sun P., Wu C.A., Zheng C.C. (2016): *Arabidopsis* YL1/BPG2 Is Involved in Seedling Shoot Response to Salt Stress through ABI4. *Scientific Reports* **6**, 30163.
- Li S., Han X., Yang L., Deng X., Wu H., Zhang M., Liu Y., Zhang S., Xu J. (2018): Mitogen-activated protein kinases and calcium-dependent protein kinases are involved in wounding-induced ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell, Environment* **41**, 134-147.
- Li W.X., Oono Y., Zhu J., He X.J., Wu J.M., Iida K., Lu X.Y., Cui X., Jin H., Zhu J.K. (2008): The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* **20**, 2238-2251.



- Limmongkon A., Giuliani C., Valenta R., Mittermann I., Heberle-Bors E., Wilson C. (2004): MAP kinase phosphorylation of plant profilin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **324**, 382–386.
- Lin Y.Y., Qi Y., Lu J.Y., Pan X., Yuan D.S., Zhao Y., Bader J.S., Boeke J.D. (2008): A comprehensive synthetic genetic interaction network governing yeast histone acetylation and deacetylation. *Genes Development* **22**, 2062–2074.
- Liu X.M., Kim K.E., Kim K.C., Nguyen X.C., Han H.J., Jung M.S., Kim H.S., Park H.C., Yun D.J., Chung W.S. (2010): Cadmium activates Arabidopsis MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* **71**, 614–618.
- Liu Y. (2012): Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling. *Plant Cell Reports* **31**, 1–12.
- Lloyd J., Meinke, D. (2012): A comprehensive dataset of genes with a loss-of-function mutant phenotype in Arabidopsis. *Plant Physiology* **158**, 1115–1129.
- López-Bucio J.S., Dubrovsky J.G., Raya-González J., Ugartechea-Chirino Y., López-Bucio J., de Luna-Valdez L.A., Ramos-Vega M., León P., Guevara-García A.A. (2014) Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of Experimental Botany* **65**, 169–183.
- Luan S. (2003): Protein phosphatases in plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 63–92.
- Ludwig A.A, Romeis T., Jones J.D. (2004): CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany* **55**, 181–188.
- Lumbreras V., Vilela B., Irar S., Sole M., Capellades M., Valls M., Coca M., Pagés M. (2010): MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in Arabidopsis and functionally interacts with MPK3 and MPK6. *Plant Journal* **63**, 1017–1030.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**, 139-158.
- Mahmood A., Rashid S., Malik R.N. (2013): Determination of toxic heavy metals in indigenous medicinal plants used in Rawalpindi and Islamabad cities, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology* **148**, 158–164.
- Machida Y., Nakashima M., Morikiyo K., Banno H., Ishikawa M., Soyano T., Nishihama, R. (1998): MAPKKK-related protein kinase NPK1: Regulation of the M phase of plant cell cycle. *Journal of Plant Research* **111**, 243–246.
- Maia J., Dekkers B.J., Provart N.J., Ligterink W., Hilhorst H.W. (2011): The re-establishment of desiccation tolerance in germinated Arabidopsis thaliana seeds and its associated transcriptome. *PLoS One* **6**, e29123.
- Matsuoka D., Nanmori T., Sato K., Fukami Y., Kikkawa U., Yasuda T. (2002): Activation of AtMEK1, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in E. coli and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant Journal* **29**, 637–647.
- Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D., Koorneef M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* **282**, 662-682.
- Miles G.P., Samuel M.A., Zhang Y., Ellis B.E. (2005): RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environmental Pollution* **138**, 230–237.

- Miller G.A.D., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R.O.N. (2010): Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environment* **33**, 453–467.
- Mishra N.S., Tuteja R., Tuteja N. (2006): Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **452**, 55–68.
- Miura K., Okamoto H., Okuma E., Shiba H., Kamada H., Hasegawa P.M., Murata Y. (2013): SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in Arabidopsis. *Plant Journal* **73**, 91–104.
- Mok J., Kim P.M., Lam H.Y., Piccirillo S., Zhou X., Jeschke G.R., Sheridan D.L., Parker S.A., Desai V., Jwa M., Cameron E., Niu H., Good M., Remenyi A., Ma J.L., Sheu Y.J., Sassi H.E., Sopko R., Chan C.S., De Virgilio C., Hollingsworth N.M., Lim W.A., Stern D.F., Stillman B., Andrews B.J., Gerstein M.B., Snyder M., Turk B.E. (2010): Deciphering protein kinase specificity through large-scale analysis of yeast phosphorylation site motifs. *Science Signaling* **3**, ra12.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., Šamaj J. (2010): Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal* **61**, 234–248.
- Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651–681.
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. (2005): Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* **10**, 339–346.
- Nakagami H., Soukupová H., Schikora A., Zárský V., Hirt, H. (2006): A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 38697–38704.
- Nakashima M., Hirano K., Nakashima S., Banno H., Nishihama R., Machida, Y. (1998): The expression pattern of the gene for NPK1 protein kinase related to mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) in a tobacco plant: Correlation with cell proliferation. *Plant Cell Physiology* **39**, 690–700.
- Nicol F., His I., Jauneau A., Vernhettes S., Canut H., Hofte, H. (1998): A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in Arabidopsis. *EMBO Journal* **17**, 5563–5576.
- Nishihama R., Banno H., Kawahara E., Irie K., Machida, Y. (1997): Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of Arabidopsis ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKKs). *Plant Journal* **12**, 39–48.
- Nishihama R., Ishikawa M., Araki S., Soyano T., Asada T., Machida Y. (2001): The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes & Development* **15**, 352–363.
- Nongpiur R., Soni P., Karan R., Singla-Pareek S.L., Pareek A. (2012): Histidine kinases in plants: cross talk between hormone and stress responses. *Plant Signaling Behavior* **7**, 1230–1237.
- Pawson T., Scott, J.D. (2005): Protein phosphorylation in signaling – 50 years and counting. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 286–290.

- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H.B., Lacy M., Augustin M.J., Parker J.E., Sharma S.B., Klessig D.F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A.B., Mundy J. (2000): Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111–1120.
- Phillips P.C. (2008): Epistasis—the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics* **9**, 855–867.
- Pitzschke A., Djamei A., Bitton F., Hirt H. (2009): A major role of the MEKK1–MKK1/2–MPK4 pathway in ROS signalling. *Molecular Plant* **2**, 120–37.
- Qiu J.L., Zhou L., Yun B.W., Nielsen H.B., Fiil B.K., Petersen K., Mackinlay J., Loake G.J., Mundy J., Morris, P.C. (2008): Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiology* **148**, 212–222.
- Rao K.P., Vani G., Kumar K., Wankhede D.P., Misra M., Gupta M., Sinha A.K. (2011): Arsenic stress activates MAP kinase in rice roots and leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **506**, 73–82.
- Rasmussen M.W., Roux M., Petersen M., Mundy, J. (2012): MAP Kinase Cascades in Arabidopsis Innate Immunity. *Frontiers in Plant Science* **3**, 169.
- Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621–649.
- Salam M.A., Jammes F., Hossain M.A., Ye W., Nakamura Y., Mori I.C., Kwak J.M., Murata Y. (2012): MAP kinases, MPK9 and MPK12, regulate chitosan-induced stomatal closure. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **76**, 1785–1787.
- Samuel M.A., Ellis B.E. (2002): Double jeopardy: both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. *Plant Cell* **14**, 2059–2069.
- Sangwan V., Orvar B.L., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R.S. (2002): Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant Journal* **31**, 629–638.
- Santner A., Estelle M. (2009): Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature* **459**, 1071–1078.
- Sarma H., Deka S., Deka H., Saikia R.R. (2011): Accumulation of heavy metals in selected medicinal plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **214**, 63–86.
- Sasabe M., Machida Y. (2006a): MAP65: A bridge linking a MAP kinase to MT turnover. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 563–570.
- Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Sonobe S., Igarashi H., Itoh T.J., Hidaka M., Machida Y. (2006b): Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes&Development* **20**, 1004–1014.
- Sasabe M., Kosetsu K., Hidaka M., Murase A., Machida Y. (2011): Arabidopsis thaliana MAP65-1 and MAP65-2 function redundantly with MAP65-3/PLEIADE in cytokinesis downstream of MPK4. *Plant Signaling&Behavior* **6**, 743–747
- Sasabe M., Machida Y. (2012): Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis. *Cytoskeleton* **69**, 913–918.
- Sedbrook J.C. (2004): MAPs in plant cells: Delineating microtubule growth dynamics and organization. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 632–640.

- Sedbrook J.C., Kaloriti D. (2008): Microtubules, MAPs and plant directional cell expansion. *Trends in Plant Science* **13**, 303–310.
- Shen H., Liu C., Zhang Y., Meng X., Zhou X., Chu C., Wang X. (2012): OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* **80**, 241–253.
- Schweighofer A., Kazanaviciute V., Scheikl E., Teige M., Doczi R., Hirt H., Schwanninger M., Kant M., Schuurink R., Mauch F., Buchala A., Cardinale F., Meskiene I. (2007): The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 2213–2224.
- Sieberer B.J., Ketelaar T., Esseling J.J., Emons, A.M. (2005): Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytologist Journal* **167**, 711–719.
- Singh R., Lee J.E., Dangol S., Choi J., Yoo R.H., Moon J.S., Shim J.K., Rakwal R., Agrawal G.K., Jwa N.S. (2012): Rice mitogen-activated protein kinase interactome analysis using the yeast two-hybrid system. *Plant Physiology* **160**, 477–487.
- Sinha A.K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling&Behavior* **6**, 196–203.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014a): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**, 2-11.
- Smékalová V., Luptovčiak I., Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Doskočilová A., Takáč T., Vadovič P., Novák O., Pechan T., Ziemann A., Košútová P., Šamaj J. (2014b): Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in Arabidopsis post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytologist* **203**, 1175-1193.
- Smertenko A.P., Chang H.Y., Sonobe S., Fenyk S.I., Weingartner M., Bogre L., Hussey P.J. (2006): Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *Journal of Cell Science* **119**, 3227–3237.
- Smith L.G. (2001): Plant cell division: Building walls in the right places. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 33–39.
- Solanke A.U., Sharma A.K. (2008): Signal transduction during cold stress in plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **14**, 69–79.
- Sörensson C., Lenman M., Veide-Vilg J., Schopper S., Ljungdahl T., Grotli M., Tamás M.J., Peck S.C., Andreasson E. (2012): Determination of primary sequence specificity of Arabidopsis MAPKs MPK3 and MPK6 leads to identification of new substrates. *Biochemical Journal* **446**, 271–278.
- Su S.H., Suarez-Rodriguez M.C., Krysan P. (2007): Genetic interaction and phenotypic analysis of the Arabidopsis MAP kinase pathway mutations mekk1 and mpk4 suggests signaling pathway complexity. *FEBS Letters* **581**, 3171–3177.
- Su S.H., Krysan P.J. (2016): A double-mutant collection targeting MAP kinase related genes in Arabidopsis for studying genetic interactions. *The Plant Journal* **88**, 867-878.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R. (2011): Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 691–699.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. (2012): ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environment* **35**, 259–270.

- Swarbreck D., Wilks C., Lamesch P., Berardini T.Z., Garcia-Hernandez M., Foerster H., Li D., Meyer T., Muller R., Ploetz L., Radenbaugh A., Singh S., Swing V., Tissier C., Zhang P., Huala E. (2008): The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research* **36**, D1009–D1014.
- Šamaj J., Ovečka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluška F., Hirt H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO Journal* **21**, 3296–3306.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013a): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* **31**, 118-128.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013b): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* **18**, 140-148.
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3–MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 805–818.
- Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K., Shinozaki K. (2011): Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in Arabidopsis. *Molecular Cell* **41**, 649–660.
- Takahashi Y., Soyano T., Kosetsu K., Sasabe M., Machida Y. (2010): HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiology* **51**, 1766–1776.
- Takekawa M., Tatebayashi K., Saito H. (2005): Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Molecular Cell* **18**, 295–306.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Doczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L., Hirt H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell* **15**, 141–152.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408**, 796-815.
- The Arabidopsis Information Resource ([www.arabidopsis.org/browse/genefamily/index.jsp](http://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/index.jsp)). (12.1.2018).
- Theocharis A., Clement C., Barka E.A. (2012): Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta* **235**, 1091–1105.
- Till B.J., Reynolds S.H., Greene E.A., Comomo C.A., Enns L.C., Johnson J.E., Burtner C., Odden A.R., Young K., Taylor N.E., Henikoff J.G., Comai L., Henikoff S. (2003): Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Research* **13**, 524–530.
- Tong A.H., Evangelista M., Parsons A.B., Xu H., Bader G.D., Pagé N., Robinson M., Raghizadeh S., Hogue C.W., Bussey H., Andrews B., Tyers M., Boone C. (2001): Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**, 2364–2368.

- Tong A.H., Lesage G., Bader G.D., Ding H., Xu H., Xin X., Young J., Berriz G.F., Brost R.L., Chang M., Chen Y., Cheng X., Chua G., Friesen H., Goldberg D.S., Haynes J., Humphries C., He G., Hussein S., Ke L., Krogan N., Li Z., Levinson J.N., Lu H., Ménard P., Munyana C., Parsons A.B., Tyan O., Tonikian R., Roberts T., Scidu A.M., Shapiro J., Sheikh B., Suter B., Wong S.L., Zhang L.V., Zhu H., Burd C.G., Munro S., Sander C., Rine J., Greenblatt J., Peter M., Bretscher A., Bell G., Roth F.P., Brown G.W., Andrews B., Bussey H., Boone C. (2004): Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* **303**, 808–813.
- Ulm R., Ichimura K., Mizoguchi T., Peck S.C., Zhu T., Wang X., Shinozaki K., Paszkowski J. (2002): Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO Journal* **21**, 6483–6493.
- van Loon L.C., Geraats B.P., Linthorst H.J. (2006): Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* **11**, 184–191.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J.C., Zhang S. (2007a): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 63–73.
- Wang H., Chevalier D., Larue C., Cho S.K., Walker J.C. (2007b): The protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* **5**, e0106.
- Wang J., Ding H., Zhang A., Ma F., Cao J., Jiang M. (2010): A novel mitogen-activated protein kinase gene in maize (*Zea mays*), ZmMPK3, is involved in response to diverse environmental cues. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 442–452.
- Wang K.L.-C., Li H., Ecker J.R. (2002): Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell* **14**, 131–151.
- War A.R., Paulra jM.G., Ahmad T., Buhroo A.A., Hussain B., Ignacimuthu S., Sharma H.C. (2012): Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 1306–1320.
- Wasteneys G.O. (2002): Microtubule organization in the green kingdom: Chaos or self-order? *Journal of Cell Science* **115**, 1345–1354.
- Whitmarsh A.J., Davis R.J. (1998): Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 481–485.
- Xu J., Li Y., Wang Y., Liu H., Lei L., Yang H., Liu G., Ren D. (2008): Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 26996–7006.
- Xu J., Zhang S. (2014): Regulation of ethylene biosynthesis and signaling by protein kinases and phosphatases. *Molecular Plant* **7**, 939–942.
- Xu J., Zhang S. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Sciences* **20**, 56–64.
- Yadav S., Irfan M., Ahmad A., Hayat S. (2011): Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *Journal of Environmental Biology* **3**, 667–685.
- Yao Y., Liu X., Li Z., Ma X., Rennenberg H., Wang X., Li H. (2013): Drought-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in subsidiary cells is involved in regulatory signaling of stomatal closure in maize leaves. *Planta* **238**, 217–227.
- Ye Y., Li Z., Xing D. (2013): Nitric oxide promotes MPK6-mediated caspase-3-like activation in cadmium-induced *Arabidopsis thaliana* programmed cell death. *Plant Cell Environment* **36**, 1–15.

- Yeh C.M., Hsiao L.J., Huang H.J. (2004): Cadmium activates a mitogen-activated protein kinase gene and MAP kinases in rice. *Plant Cell Physiology* **45**, 1306–1312.
- Yeh C.M., Chien P.S., Huang H.J. (2007): Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *Journal of Experimental Botany* **58**, 659–671.
- Yu L., Nie J., Cao C., Jin Y., Yan M., Wang F., Liu J., Xiao Y., Liang Y., Zhang W. (2010): Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **188**, 762–773.
- Zeng Q., Chen J.G., Ellis B.E. (2011): AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **67**, 895–906.
- Zhang J., Shao F., Li Y., Cui H., Chen L., Li H., Zou Y., Long C., Lan L., Chai J., Chen S., Tang X., Zhou J.M. (2007): A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* **1**, 175–185.
- Zhang J., Zhang S., Cheng M., Jiang H., Zhang X., Peng C., Lu X., Zhang M., Jin J. (2018): Effect of Drought on Agronomic Traits of Rice and Wheat: A Meta-Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **15**, 839.
- Zhang Z., Wu Y., Gao M., Zhang J., Kong Q., Liu Y., Ba H., Zhou J., Zhang Y. (2012): Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a *Pseudomonas syringae* effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. *Cell Host Microbe* **11**, 253–263.
- Zhao Q., Guo H.W. (2011): Paradigms and paradox in the ethylene signaling pathway and interaction network. *Molecular Plant* **4**, 626–634.
- Zhou X.F., Jin Y.H., Yoo C.Y., Lin X.L., Kim W.Y., Yun D.J., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Jin J.B. (2013): CYCLIN H;1 regulates drought stress responses and blue light-induced stomatal opening by inhibiting ROS accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **162**, 1030–1041.
- Zhu J.K. (2002): Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 247–273.
- Zhu X., Feng Y., Liang G., Liu N., Zhu J.K. (2013): Aequorin-based luminescence imaging reveals stimulus – and tissue-specific Ca<sup>2+</sup> dynamics in *Arabidopsis* plants. *Molecular Plant* **6**, 444–455.

## 8 Seznam použitých zkratk

**ABA** kyselina abscisová

**Col-0** ekotyp Columbia

**CPK** na vápníku závislé proteinkinasy

**DSPs** fosfatasy s duální specifitou

**etOH** ethanol

**HR** hypersensitivní odpověď

**JA** kyselina jasmonová

**MAP65** protein 65 asociovaný s mikrotubuly

**MAPK, MPK** mitogenem aktivované protein kinasy

**MAPKK, MAP2K, MKK** mitogenem aktivované protein kinasy kinasy

**MAPKKK, MAP3K, MEKK, ANP** mitogenem aktivované protein kinasy kinasy kinasy

**MS** Murashige & Skoog

**MT** mikrotubuly

**PAMPs** s patogenem asociované molekulární vzory

**PLD** fosfolipasa D

**PRRs** vzor rozeznávající receptory

**PSPs** tyrosin- specifické fosfatasy

**PTI** PAMP spouštěná imunita

**ROS** reaktivní kyslíkové radikály

**SIMK** stresem indukovaná MAPK

**SOD** superoxid dismutasa

**TAIR** The *Arabidopsis* Information Resource

**T-DNA** inzerční DNA

**WT** wild type, divoký typ