

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Oddělení buněčné biologie

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum



**Odpoveď rastlín jačmeňa s knock-out mutáciou génu
pre mitogénom aktivovanú proteinkinázu 3 na
ovplyvnenie flagelínom 22**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Jakub Petrovaj
Študijný program:	N0512A130007 – Biotechnologie a genové inženýrství
Špecializácia:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok:	2021

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne s vyznačením všetkých použitých zdrojov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bol som zoznámený s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúci zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

podpis diplomanta.....

Moje poďakovanie patrí vedúcemu mojej práce doc. Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D., za jeho trpezlivosť, čas, cenné rady a pomoc ktorú mi vždy ochotne venoval. Za rady a pomoc by som chcel tiež poďakovať všetkým zamestnancom OBB Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, najmä Mgr. Pavlovi Melicherovi a všetkým laboratórnym technickým pracovníčkam. V neposlednom rade ďakujem mojej rodine za podporu pri písaní tejto diplomovej práce. Táto práca bola vykonaná s podporou projektu IGA_PrF_2020_025 s názvom „Vývoj embrya a endospermu je ovlivňováno YODA-HSP90 signální kaskádou v *Arabidopsis thaliana*“ poskytovaných Internou grantovou agentúrou.

Bibliografická identifikace

Meno a priezvisko autora	Bc. Jakub Petrovaj
Názov práce	Odpoveď rastlín jačmeňa s knock-out mutáciou génu pre mitogénom aktivovanú proteinkinázu 3 na ovplyvnenie flagelínom 22
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Oddelenie bunkovej biológie CRH
Vedúci práce	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Mitogénom aktivované proteín kinázy (MAPK) slúžia ako signálne kaskády pri vnímaní biotických a abiotických stresov u rastlín. MPK3 je kináza známa ako pozitívny regulátor obranných odpovedí na patogény u modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana*. Jej funkcie v jačmeni nie sú preštudované. V predloženej diplomovej práci sme skúmali zapojenie jačmennej MPK3 do imunitných reakcií na dobre známy bakteriálny elicítor, flagelín (flg22). Výsledkami fenotypových analýz sme poukázali, že vyradenie *MPK3* v rastlinách jačmeňa, pripravených pomocou TALEN technológie (*HvMPK3* KO), má špecifickú úlohu v raste koreňov a regulácii predlžovania koreňových vláskov po ovplyvnení flg22. Pomocou histochemickej analýzy sme dokázali, že *HvMPK3* má schopnosť ovplyvňovať hladinu H_2O_2 u jačmeňa. Pri analýzach aktivity chitináz sme zistili, že je znížená v mutantných líniiach v kontrolných podmienkach a aj po šesťhodinovom ovplyvnení flg22. Vďaka imunoblotovacím analýzám sme zistili, zníženú abundanciu HSP70 v *HvMPK3* KO líniiach v kontrolných podmienkach. Ovplyvnenie flg22 nespôsobilo výrazné zmeny v abundancii HSP70. Prostredníctvom bioinformatických analýz sme identifikovali predpokladané transkripčné faktory MYB, WRKY a ERF regulujúce expresiu chitináz pod kontrolou MAPK. Výsledky naznačujú, že MPK3 môže byť v rastlinách jačmeňa zapojená do signalizácie pri vnímaní flg22 a jej knock out mutácia spôsobuje oslabenú odpoveď na ovplyvnenie flg22.

Kľúčové slová	Imunitná odpoveď, natívna elektroforéza, chitinázy, flagelín, imunoblotovanie, HSP70, transkripčné faktory, dĺžka koreňa, fenotyp, koreňové vlásky
Počet strán	80
Počet príloh	6
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Jakub Petrovaj
Title	Response of barley knock-out mutants in gene encoding mitogen activated protein kinase 3 to flg22 treatment
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Cell Biology CRH
Supervisor	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Mitogen activated protein kinases (MAPKs) serve as signaling cascades in the perception of biotic and abiotic stresses. MPK3 is a kinase positively affecting defense responses in model plant species *Arabididopsis thalina*, but its function in barley are not well described. Within this thesis, we investigated the involvement of barley MPK3 in immune responses to the well-known bacterial elicitor, flagellin (flg22). The results of phenotypic analyzes showed that the elimination of MPK3 in barley plants, prepared using TALEN technology (*HvMPK3* KO), has a specific role in root growth and regulation of root hair elongation after flg22 treatment. Using histochemical analysis, we have shown that *HvMPK3* has the ability to affect H₂O₂ levels in barley. Biochemical analises have shown that the chitinase activity is reduced in control conditions and also after six hours flg22 treatment. Thanks to immunoblotting analysis of HSP70, we found that abundance is reduced in both *HvMPK3* KO lines. Flg22 treatment did not cause significant changes in HSP70 abundance. By bioinformatics analyses, we identified putative transcription factors MYB, WRKY and ERF regulating chitinase expression under control of MAPK. The results suggest that MPK3 may be involved in flg22 perception in barley plants and its knock out mutation causes an attenuated response to flg22.

Keywords	Immune response, native electrophoresis, chitinases, flagellin, immunoblotting, HSP70, transcription factors, root length, phenotype, root hairs
Number of pages	80
Number of appendices	6
Language	Slovak

Ciele práce

Teoretické ciele:

Vypracovanie literárnej rešerše na témy:

- Primárna a sekundárna imunitná odpoveď
- Proteíny spojené s patogenézou (chitinázy)
- Úloha mitogénom aktivovaných proteín kináz (MAPK) v rastlinnej imunite
- Aktivácia MAPK vyvolaná PAMP

Experimentálne ciele:

- Fenotypová analýza rastlín jačmeňa s knock-out mutáciou génu pre mitogénom aktivovanú proteinkinázu 3 (*HvMPK3* KO) po vplyve flg22 na pevných médiách
- Analýza enzýmovej aktivity chitináz na natívnych géloch
- Detekcia H₂O₂ pomocou histochemického farbenia 3,3'-diaminobenzidínom (DAB)
- Imunoblotová analýza HSP70 a RACK1a v *HvMPK3* KO rastlinách po vplyve flg22
- Identifikácia transkripčných faktorov pre reguláciu expresie chitináz pod kontrolou MAPK pomocou bioinformatických metód

Obsah

1 ÚVOD	9
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	10
2.1 Primárna a sekundárna imunitná odpoveď rastlín	10
2.1.1 Imunita vyvolaná patogénom	11
2.2 Kľúčové princípy rozpoznávania PAMP a signalizácie spustenej receptorom.....	12
2.2.1 Rozpoznávanie bakteriálnych PAMP.....	13
2.2.2 Rozpoznávanie hubových PAMP	14
2.2.3 Rozpoznávanie oomycétových PAMP	15
2.3 Potláčanie primárnej imunitnej odpovede rastlín	16
2.4 Proteíny spojené s obranou voči patogénom	17
2.4.1 Chitinázy.....	19
2.5 Úloha mitogénom aktivovaných proteinkináz v rastlinnej imunite.....	20
2.5.1 Rastlinné MAPK kaskády.....	22
2.5.1.1 Podskupiny rastlinných MAPK	22
2.6 Aktivácia MAPK vyvolaná PAMP.....	23
2.7 Aktivácia MAPK vyvolaná efektorom.....	25
2.8 Úloha MAPK v aktivácii PR génov u rastlín.....	25
2.8.1 Aktivácia MAPK a reaktívne formy kyslíka.....	28
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	30
3.1 Materiál	30
3.1.1 Použitý biologický materiál	30
3.1.2 Chemikálie	30
3.1.3 Použité prístroje.....	32
3.1.4 Protilátky použité pri imunoblotovaní.....	32
3.1.5 Použité softvéry	32
3.2 Metódy	32
3.2.1 Príprava rastlinného materiálu.....	32
3.2.2 Ošetrovanie rastlín flg22 a indukcia obrannej odpovede	33
3.2.3 Analýza fenotypov rastlín.....	33
3.2.4 Histochemická detekcia H ₂ O ₂	34
3.2.5 Extrakcia proteínov na stanovenie aktivity chitináz	34
3.2.6 Meranie koncentrácie bielkovín	34
3.2.7 Príprava glykolchitínu	35
3.2.8 Natívna polyakrylamidová elektroforéza.....	35
3.2.9 Stanovenie aktivity chitináz.....	36

3.2.10 Denaturujúca polyakrylamidová gélová elektroforéza (SDS-PAGE)	36
3.2.11 Imunoblotovanie	37
3.2.12 Bioinformatická predikcia regulácie expície chitinázového génu pomocou transkripčných faktorov	38
4 VÝSLEDKY	40
4.1 Fenotypová analýza koreňov rastlín <i>HvMPK3</i> KO po ovplyvnení flg22.....	40
4.2 Biochemická a histochemická analýza <i>HvMCP3</i> KO mutantov po ovplyvnení flg22	43
4.2.1 Vplyv knock-out mutácie v <i>HvMPK3</i> géne na aktivitu chitináz jačmeňa.....	43
4.2.2 Vplyv flg22 na aktivitu chitináz v mutantných líniiach jačmeňa	43
4.2.3 Histochemická analýza H ₂ O ₂ po krátkodobom pôsobení flg22	45
4.2.4 Analýza abundancie HSP70 v mutantných líniiach <i>HvMPK3</i> KO pomocou imunoblotovania	46
4.2.5 Vplyv flg22 na abundanciu HSP70 v mutantných líniiach <i>HvMPK3</i> KO.....	46
4.2.6 Analýza abundancie RACK1a v mutantných líniiach <i>HvMPK3</i> KO pomocou imunoblotovania	48
4.3 Identifikácia predpokladaných transkripčných faktorov regulujúcich expresiu chitináz pod kontrolou MAPK	49
5 DISKUSIA	52
6 ZÁVER.....	57
7 LITERATÚRA	58
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	71
9 PRÍLOHY	74

1 ÚVOD

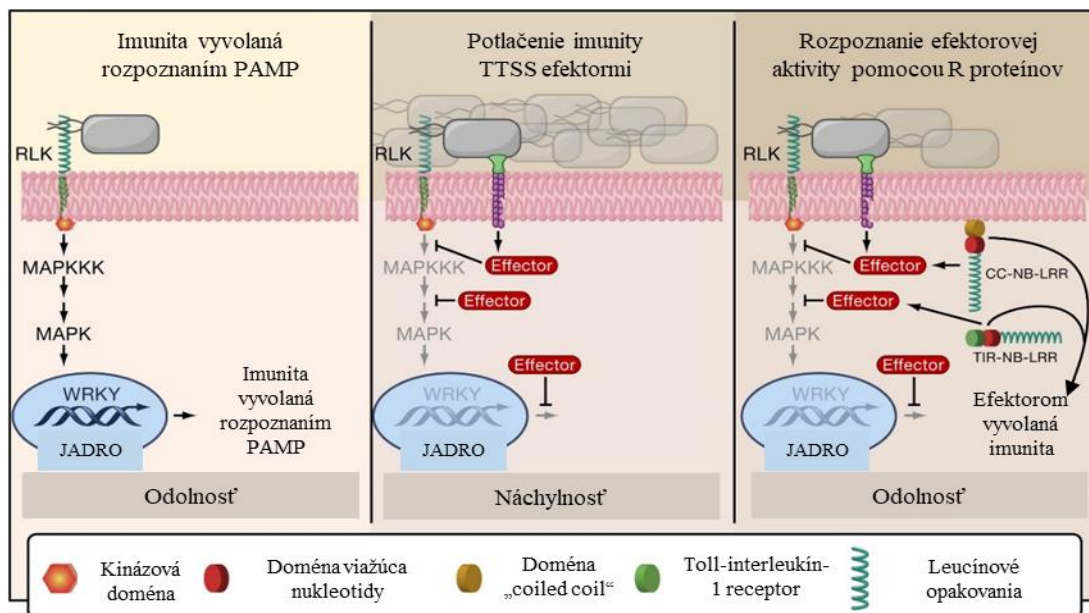
Korene predstavujú kľúčové rozhranie, kde rastliny vstupujú do rôznych interakcií s mikroorganizmami z prostredia, nazývané rizosféra. Niektoré interakcie sú vzájomne výhodné, (napr. symbióza alebo mykorrhíza), zatiaľ čo iné škodia rastline, ale slúžia mikroorganizmom (Sloan a Lebeis, 2015). Koreňový mikrobióm ovplyvňuje nielen dostupnosť živín, a tým vývoj rastlín, ale aj imunitu rastlín voči patogénom (Berendsen *et al.*, 2012). Rastliny často menia vývoj a rast koreňov, keď narazia na patogénne alebo symbiotické mikroorganizmy. Napríklad tým, že inhibujú rast koreňov alebo indukujú rast či elongáciu koreňových vláskov (Dovana *et al.*, 2015; Pečenková *et al.*, 2017). V rizosfére sú korene v permanentnom kontakte s nesmiernym počtom mikroorganizmov rôzneho druhového zloženia, z ktorých mnohé sú baktérie a huby (Trevors, 2010). Rastliny vnímajú tieto patogény prostredníctvom ich telesných zložiek – molekúl ako napr. flagelín 22 (flg22) alebo chitín, receptormi na plazmatickej membráne rastliny. Toto vedie k sérii následných udalostí, medzi ktoré patrí tvorba reaktívnych foriem kyslíka, fosforylácia mitogénom aktivovaných proteínkináz (MAPK), transkripčné preprogramovanie, akumulácia proteínov spojených s patogenézou (napr. chitinázy), ako aj antimikrobiálnych zlúčenín. (Boller a Felix, 2009; Segonzac a Zipfel, 2011).

Funkcia MAPK v odpovedi na patogény je v jačmeni len málo preštudovaná. Preto sme sa v tejto diplomovej práci zamerali na vplyv flg22 na fenotyp koreňov mutantných rastlín jačmeňa s vyradeným génom pre *HvMPK3*. Taktiež sme chceli zistiť ako flg22 mení aktivitu chitináz. Tie sa podieľajú na obranných reakciách rastlín pri strete s mikroorganizmami (Marzec-Schmidt *et al.*, 2020). Zamerali sme sa aj na proteín tepelného šoku 70 (HSP70) a jeho abundanciu v odpovedi na ovplyvnenie flg22, keďže HSP zohrávajú dôležitú úlohu pri koordinácii reakcií rastlín na stres (Khan *et al.*, 2019).

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Primárna a sekundárna imunitná odpoveď rastlín

Rastliny sú neustále vystavené mikroorganizmom a ich odolnosť je determinovaná schopnosťou rastlín tieto mikroorganizmy rozpoznať a vyvolať špecifickú obrannú odpoveď. Kutikula a bunková stena predstavujú fyzické bariéry na ochranu rastlín pred prenikaním mikróbov (Hückelhoven, 2007). Prenikanie mikróbov do rastlinných pletív a buniek je možné buď penetráciou cez bunkovú stenu a plazmatickú membránu, vstupom cez poranenia či prirodzené otvory. Takýmito otvormi sú napríklad prieduchy. Bunková stena rastlín je štruktúrou na báze celulózy obklopujúca rastlinné bunky. Penetrácia cez bunkovú stenu vystavuje membránu hostiteľskej cytoplazmy mikróbov. Patogény sú rozpoznávané receptormi na plazmatickej membráne (angl. pattern recognition receptors - PRRs) (Fritz-Laylin *et al.*, 2005) cez vnímanie ich špecifických molekulárnych zložiek (angl. pathogen associated molecular pattern – PAMP) (Yu *et al.*, 2017). Väzba PAMP na receptorovú kinázu iniciuje primárnu imunitnú odpoveď (angl. PAMP triggered immunity – PTI) (Jones a Dangl, 2006) (Obr. 1).



Obr. 1 Model vývoja bakteriálnej rezistencie rastlín

Zľava doprava, rozpoznávanie molekulárnych vzorov asociovaných s patogénom (ako je bakteriálny flagelín 22) pomocou extracelulárnych receptorových kináz (RLK) okamžite spúšťa bazálnu imunitu, ktorá vyžaduje signalizáciu prostredníctvom MAPK kaskád a transkripčné preprogramovanie sprostredkované rastlinnými transkripčnými faktormi WRKY. Patogénne baktérie používajú sekrečný systém typu III (TTSS) na dodávanie efektorov. Proteíny rezistencie rastlín (predstavované CC-NB-LRR a TIR-NB-LRR) rozpoznávajú efektorovú aktivitu a obnovujú rezistenciu prostredníctvom efektorom vyvolaných imunitných reakcií. (prevzané a upravené z Chisholm *et al.*, 2006).

Patogénne mikróby si vyvinuli stratégie na narušenie imunitných reakcií rastlín a tak získali schopnosť potlačiť PTI. Bežnou zbraňou sú sekretované efekторы, ktoré oslabujú imunitu rastlín a podporujú úspešnú infekciu (Lo Presti *et al.*, 2015). Takéto efekторы pôsobia buď v apoplaste rastlín (apoplastické efekторы) alebo vo vnútri rastlinných buniek (cytoplazmatické efekторы), aby plnili funkciu virulencie. Cytoplazmatické efekторы sú translokované do rôznych bunkových kompartmentov a interferujú s rôznymi fyziologickými procesmi rastlín (Lo Presti *et al.*, 2015). Takýmito procesmi sú napr. produkcia reaktívnych foriem kyslíka (ROS; Qi *et al.*, 2019), syntéza sekundárnych metabolitov (Nakano a Mukaiharu, 2018) a aktivácia MAPK (Ren *et al.*, 2019).

Rastliny si vyvinuli špecializovaný mechanizmus detekcie efektorov pomocou imunitných receptorov s doménou viažúcou nukleotidy a doménou bohatou na leucínové opakovania (angl. nucleotide-binding domain leucine-rich repeat – NB-LRR immune receptors), inak nazývané ako R proteíny (Jacob *et al.*, 2013; Castel *et al.*, 2019). Tento mechanizmus sa nazýva efektorom vyvolaná imunita (angl. effector triggered immunity – ETI) (Obr. 1). ETI obmedzuje rast patogénov a môže vyvrcholiť hypersenzitívnou imunitnou odpoveďou (angl. hypersensitive response – HR) (Cui *et al.* 2015). Často je sprevádzaná programovanou bunkovou smrťou (angl. programmed cell death – PCD) a tvorbou ROS; Terrón-Camero *et al.*, 2018) a nakoniec aj získaním systémovej rezistencie (angl. systemic acquired resistance – SAR) (Maithani *et al.*, 2021). Aktivácia rezistencie sprostredkovaná R proteínmi potláča mikrobiálny rast (Kourelis a van der Hoorn, 2018).

2.1.1 Imunita vyvolaná patogénom

PTI býva prvou aktívnou odpoveďou rastlín na vnímanie prítomnosti mikróbov. Je spojená so signalizáciou rôznych odpovedí vrátane produkcie ROS (Li *et al.*, 2014), zatvárania prieduchov (Liu *et al.*, 2019), aktivácie MAPK (Yan *et al.*, 2018), produkcie obranných hormónov (Lal *et al.*, 2018). PAMP plnia kritickú funkciu pre život organizmu. Sú vysoko štrukturálne konzervované v širokom spektre mikróbov a nie sú bežne prítomné v hostiteľovi (Chisholm *et al.*, 2006). Napríklad rastliny rozpoznávajú mnohopočetné komponenty gramnegatívnych baktérií na povrchu bunky, vrátane lipopolysacharidov a flagelínu, proteínovej podjednotky bičika. Podobne reagujú aj na chitín a ergosterol, hlavné zložky bunkovej steny vyšších húb (Zipfel a Felix 2005).

Najlepšie je preštudovaný mechanizmus vnímania a odpovede rastlín na flagelín (Gómez-Gómez a Boller, 2000). Bičíky sú potrebné pre bakteriálnu motilitu. Zatiaľ čo stredná oblasť bičíkov je variabilná, N- a C-terminálne časti sú vysoko konzervované naprieč eubaktériami. V rastlinách *Arabidopsis* postačuje na aktiváciu receptora hostiteľa 22 aminokyselinový peptid (flg22) zodpovedajúci vysoko konzervovanému amino-koncu flagelínu (Gómez-Gómez a Boller, 2000). Nové poznatky naznačujú, že peptidy flg22 konkrétne u proteobaktérií nie sú pre rastliny *Arabidopsis* univerzálne imunogénne (Cheng *et al.*, 2021). Peptidy flg22 γ - a β -proteobaktérií vyvolali silné oxidatívne vzplanutie (angl. „ROS burst“), zatiaľ čo peptidy z ϵ -, δ - a α -proteobaktérií vyvolali strednú, slabú alebo žiadnu odpoveď. Napriek tomu je flg22 vnímaný ako PAMP mnohými rastlinnými druhmi napr. u ryže (Li *et al.*, 2021), pšenice (Chen *et al.*, 2021) a jačmeňa (Takáč *et al.*, 2021). Identifikácia tohto silného peptidového elicítora uľahčila podrobnú analýzu flagelínových odpovedí rastlín. Pri dôkladnom skúmaní signalizačných komponentov obranných reakcií vyvolaných flg22 v protoplastoch *Arabidopsis* bola identifikovaná kompletná MAPK kaskáda a transkripčné faktory WRKY (Obr. 1), ktoré riadia transkripciu obranných génov po vnímaní flg22 (Asai *et al.*, 2002). Aj keď bola táto signalizačná dráha identifikovaná na základe zapojenia sa do reakcie na PAMP, aktivácia obrany nadmernou expresiou *WRKY* zmiernila príznaky spôsobené baktériami a hubami. To naznačuje, že mechanizmy rezistencie indukované po vnímaní flagelínu nie sú špecifické len pre baktérie. Je možné, že viac signálnych dráh PAMP môže konvergovať a aktivovať obranu prostredníctvom prekrývajúcich sa MAPK kaskád a transkripčných faktorov (Asai *et al.*, 2002).

2.2 Kľúčové princípy rozpoznávania PAMP a signalizácie spustenej receptorom

Medzi rastlinné PRR patria receptory podobné kinázam (angl. receptor-like kinases – RLKs) a receptory podobné proteínom (angl. receptor-like proteins – RLPs) (Boutrot a Zipfel, 2017). RLK sú zložené z extracelulárnej domény, transmembránovej domény a intracelulárnej kinázovej domény, zatiaľ čo RLP chýba intracelulárna kinázová doména. Medzi doteraz opísané ektodomény viažuce ligand patrí doména bohatá na leucínové opakovania (angl. leucine rich repeat – LRR; Boutrot a Zipfel, 2017), doménu s lyzínovými motívami (angl. lysin motifs – LysMs) (Saijo *et al.*, 2018) a lektínu podobnými motívami (Dambuzza a Brown, 2015). Triedy ektodomén do značnej miery zodpovedajú povahe rozpoznávaných ligandov.

U *Arabidopsis* je flagelín rozpoznávaný pomocou FLS2 (angl. flagellin sensing 2 – FLS2), ktorý patrí medzi LRR-RLK (Gómez-Gómez a Boller, 2000). FLS2 je potrebný pre bakteriálnu rezistenciu (Shi *et al.*, 2015). Iná LRR-RLK, EFR (angl. elongation factor – Tu receptor), rozpoznáva konkrétne N-acetylovaný 18–26-aminokyselinový epitop (elf18 – elf26) elongačného faktora (EF)-Tu, počas bakteriálnej rezistencie (Zipfel *et al.*, 2006) Zdá sa, že vnímanie elf18 sa obmedzuje na rodinu *Brassicaceae* (Boller a Felix, 2009). Zistilo sa, že klonovanie samotného EFR z *Arabidopsis* pomocou genetickej transformácie je dostatočné na to, aby poskytlo zvýšenú reakciu na elf18 v rastlinách *Nicotiana benthamiana* a *Solanum lycopersicum*, ktoré zvyšujú ich odolnosť voči *Pseudomonas syringae* (Lacombe *et al.*, 2010). To naznačuje, že PRR fungujú ako vymeniteľný modul v PTI a že patogény sú špecificky prispôsobené existujúcemu repertoáru PRR hostiteľa. Úspešný medzidruhový prenos EFR demonštruje účinnosť zvyšovania existujúceho PRR repertoáru a zvyšuje odolnosť voči bakteriálnym chorobám u mnohých rastlín, ako sú ryža (Schwessinger *et al.*, 2015), pšenica (Schoonbeek *et al.*, 2015), zemiaky (Boschi *et al.*, 2017) a *Medicago truncatula* (Pfeilmeier *et al.*, 2019).

2.2.1 Rozpoznávanie bakteriálnych PAMP

V rastlinách sa počas evolúcie významne rozšíril zoznam aktívnych PAMP ako aj zoznam PRR (Boutrot a Zipfel, 2017; Tab. 1). Bičik má aj iné elicitorovo aktívne epitopy ako je flg22 (Katsuragi *et al.*, 2015). Jeden taký epitop prechádzajúci silnou selekciou proti elicitorovej aktivite, nazývaný flgII-28, bol odhalený populačnou genomickou štúdiou u patogénu *Pseudomonas syringae pv. tomato* (Cai *et al.*, 2011). V ryži je bakteriálna virulencia ovplyvnená štrukturálnymi rozdielmi bičika (Katsuragi *et al.*, 2015). Strata bičika z nekompatibilných baktérií umožňuje ich množenie v hostiteľských rastlinách (Li *et al.*, 2005). Tieto objavy naznačujú, že rozpoznávanie bičikov definuje kritický determinant interakcií rastlín a baktérií a že diverzifikácia PAMP uľahčuje uniknutie pred PTI. Podobne ako u bičika, existujú aj značné polymorfizmy v aktívnych miestach inak vysoko konzervovaných proteínov patogénov (Vinatzer *et al.*, 2014). Stredná oblasť EF-Tu sa, mimo elf18, prekrýva s iným elicitorovo aktívnym fragmentom EF-Tu purifikovaným z baktérie *Acidovorax avenae*, ktorý je rozpoznávaný predovšetkým v ryži (Furukawa *et al.*, 2014).

Peptidoglykány (angl. peptidoglycan – PGN) sú zložkou bunkových stien väčšiny baktérií. Ich fragmenty, muropeptidy, sa uvoľňujú v dôsledku remodelácie bunkovej steny počas rastu baktérií. PGN teda slúžia ako signály naznačujúce stav rastu baktérií

v populáciách pre eukaryotických hostiteľov (Dworkin, 2014). Ich vnímanie vyvoláva imunitné reakcie *Arabidopsis* (Gust *et al.*, 2007) a ryže (Li *et al.*, 2017). N-deacetylácia PGN tlmí imunitnú odpoveď a pomáha listérii uniknúť imunite hostiteľa, pravdepodobne znížením väzby na receptory (Boneca *et al.*, 2007). Vnímanie PGN je sprostredkované proteínmi obsahujúcimi LysM doménu (Kouzai *et al.*, 2014). U *Arabidopsis* je rozpoznávanie PGN sprostredkované proteínmi s LysM 1 a 3 (angl. lysin-motif proteins 1 a 3 – LYM1/LYM3) (Willmann *et al.*, 2011) a u ryže sú to LYM4/LYM6 (Liu *et al.*, 2012a). Rozpoznávajú PGN a pravdepodobne pôsobia v komplexe s LysM receptorovou kinázou (angl. LysM receptor kinase – CERK1) počas bakteriálnej rezistencie (Willmann *et al.*, 2011).

2.2.2 Rozpoznávanie hubových PAMP

Chitín, lineárny polymér β -(1,4) viazaného N-acetylglukozamínu (GlcNAc) a jeho deacetylovaný derivát chitosan, sú hlavnými zložkami bunkovej steny húb a sú uznávané ako PAMP u širokej škály rastlín (Boller a Felix, 2009; Saijo *et al.*, 2018). Rozpoznávanie chitínu vyžaduje LysM-RLK CERK1 (Shinya *et al.*, 2015). V ryži sa OsCERK1 neviaže na chitín priamo, ale je v receptorovom komplexe s LysM-RLP viažucim chitín (angl. chitin elicitor binding protein – OsCEBiP) (Shimizu *et al.*, 2010; Hayafune *et al.*, 2014). Okrem toho aj chitín viažuce LysM proteíny 4 a 6 ryže (angl. LysM proteins – OsLYP4 a OsLYP6) (Liu *et al.*, 2012a) tiež heterodimerizujú s OsCERK1 (Kouzai *et al.*, 2014). V prípade *A. thaliana* sa CERK1 viaže priamo na chitín, čím sprostredkováva imunitu vyvolanú chitínom (Petutschnig *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012b).

Xylanáza indukujúca etylén (angl. ethylene-inducing xylanase – EIX) je v rajčiakoch rozpoznávaná prostredníctvom LRR-RLP Eix2 a Eix1 (Ron a Avni, 2004). V reakcii na EIX indukuje receptor Eix2 obranné reakcie. Eix1 a Eix2 po aplikácii EIX heterodimerizujú. Avšak Eix1 spôsobuje čiastočné utlmovanie Eix2. Receptor Eix1 funguje ako tzv. „decoy“ receptor. Funkcia Eix1 receptora je užitočná najmä z krátkodobého hľadiska, ale nebráni v prípade potreby výskytu obranných reakcií. Bolo dokázané, že tieto reakcie sú závislé od interakcie s BRI1 asociovanou kinázou 1 (angl. BRI1-associated receptor kinase 1 – BAK1), ktorá viaže Eix1 ale nie Eix2 (Bar *et al.*, 2010). Hubové endopolygalakturonázy (PG) hydrolyzujú kyselinu polygalakturónovú, hlavnú zložku pektínu rastlinnej bunkovej steny, a tiež vykazujú elicitorovú aktivitu (Zhang *et al.*, 2014). Štúdie prirodzených variácií genómu odhalili u *Arabidopsis* LRR-

RLP42, receptor odpovedajúci na prítomnosť polygalakturonáz z *Botrytis cinerea* 1 (angl. responsiveness to botrytis polygalacturonases1 – RBGP1), ktorý rozpoznáva niekoľko PG z *B. cinerea* a sprostredkováva rezistenciu indukovanú PG na *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Zhang *et al.*, 2014).

2.2.3 Rozpoznávanie oomycetových PAMP

Napriek intenzívnym štúdiám o oomycetoch (riasočkách), ako je patogén neskorej plesne zemiakovej *Phytophthora infestans*, sú poznatky o receptoroch PAMP oomycét v rastlinách stále obmedzené (Raaymakers a van den Ackerveken, 2016). Medzi PAMP oomycét patria elicitíny (Derevnina *et al.*, 2016), β -glukány (Fesel a Zuccaro, 2016), sekrečný proteín OPEL (Chang *et al.*, 2015), eikosapolyénové kyseliny (angl. eicosapolyenoic acids – EP) (Robinson a Bostock, 2015) a Pep-13 (Nürnbergger *et al.*, 1994). Nedávno Wang *et al.* (2019) zistili, že vnímanie Pep-13 nie je na rozdiel od ostatných známych PAMP implikované prostredníctvom BAK1 a receptorovou kinázou somatickej embryogenézy 3 (angl. somatic embryogenesis receptor kinase – SERK3). Endoglukanáza špecifická na xyloglukán (angl. xyloglucan-specific endoglucanase – XEG1) z *Phytophthora infestans* predstavuje faktor virulencie, ktorý degraduje β -glukán a xyloglukán. Taktiež poskytuje PAMP, ktorý je rozpoznávaný mechanizmami závislými na BAK1 (Ma *et al.*, 2015).

Medzi PAMP oomycét patria hlavne elicitíny (~10kDa). Elicitíny sú štruktúrne konzervované extracelulárne proteíny v druhoch patogénov ako je *Phytophthora* a *Pythium* (Derevnina *et al.*, 2016). *Phytophthora infestans* obsahuje šesť génov elicitínu, ktoré sú konzervované medzi rôznymi kmeňmi (Cooke *et al.*, 2012). Du *et al.* (2015) preukázali, že RLP elicitínovej odpovede (angl. RLP of elicitin response – RLP-ELR) zo *Solanum microdontum* sprostredkováva extracelulárne rozpoznanie elicitínovej domény pochádzajúcej z druhu *Phytophthora*. Transformácia ELR z *S. microdontum* do kultivovaných zemiakov viedlo k zvýšenej odolnosti voči *Phytophthora infestans*. LRR-RLP85 (ELR) zo *Solanum microdontum* je nevyhnutný na rozpoznanie radu elicitínov z rôznych druhov oomycét, vrátane INF1 z *Phytophthora infestans* (Du *et al.*, 2015). ELR podlieha ligandom indukovanej asociácii s BAK1/SERK3 typu RLK. V *Nicotiana benthamiana* sú BAK1/SERK3 a supresor receptoru interagujúceho s BAK1 (angl. suppressor of BIR1 – SOBIR1; angl. BAK1-interacting RLK – BIR1) potrebné pre vyvolanie bunkovej smrti vplyvom elicitínu, čo naznačuje možné zapojenie

komplexu ELR-BAK1-SOBIR1 do vnímania elicítínu a indukcie následnej signalizácie (Peng *et al.*, 2015).

2.3 Potláčanie primárnej imunitnej odpovede rastlín

Patogény rastlín sú schopné narušiť alebo potlačiť bazálnu obranu aktivovanú primárnym imunitným systémom. Na potlačenie vnímania PRR využívajú efekторы (Xin *et al.*, 2018). Patogény produkujú efekторы na potlačenie PTI a spôsobujú efektorom vyvolanú citlivosť (angl. effector-triggered susceptibility – ETS) (Jones a Dangl, 2006). U rezistentných hostiteľov je ETI iniciovaná intracelulárnym rozpoznávaním patogénnych efektorov (Dangl *et al.*, 2013; Win *et al.*, 2012). Akonáhle sú vo vnútri hostiteľskej rastliny, patogény proliferujú v apoplaste (intracelulárne priestory rastlín), odkiaľ absorbujú živiny. Tu patogény pomocou sekrečného systému typu III (angl. type three secretion system – T3SS) obvykle injektujú do rastlinných buniek tzv. efekторы typu III (angl. type three secretion effectors – T3SE) (Rocafort *et al.*, 2020). Vylučované T3SE zvyšujú mieru patogenézy narušením normálnych fyziologických a biochemických procesov rastlín (Marshall *et al.*, 2011). Bez funkčného T3SS nie sú schopné translokovať efekторы do hostiteľských buniek (Tseytin *et al.*, 2018b).

Jeden z najlepšie študovaných arzenálov T3SE nesie rastlinná patogénna baktéria *Pseudomonas syringae* (Mansfield *et al.*, 2012). Bakteriálny rastlinný patogén *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 používa T3SS na injekciu 29 T3SE a stal sa modelom skúmania funkčnej štruktúry efektorových repertoárov a súčasného sondovania štruktúry imunitného systému rastlín (Xin a He, 2013). *Pst* DC3000 je experimentálne atraktívny, pretože môže byť patogénny na troch modelových rastlinách: *Arabidopsis*, rajčiak a *Nicotiana benthamiana*. Štúdie s *Pst* DC3000 naznačujú, že repertoár obsahuje najmenej dve redundantné efektorové skupiny s komplementárnymi funkciami: HopM1 a AvrE1 (a pravdepodobne aj jeho paralóg, HopR1) redundantne podporujú tzv. „water-soaking“ kedy sa v apoplaste akumuluje vyšší ako normálny obsah vody, čo podporuje rast baktérií (Kvitko *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2016). Zatiaľ čo AvrPto a AvrPtoB redundantne potláčajú PTI, ktorá je vyvolaná flg22 prostredníctvom receptora FLS2 (Martin, 2012). Okrem dodania takmer 30 T3SE produkuje *Pst* koronátín, rozsiahle študovaný fytotoxín, analóg kyseliny jasmónovej (angl. jasmonic acid – JA), ktorý potláča obranné reakcie vyvolané kyselinou salicylovou (angl. salicylic acid – SA; Geng *et al.*, 2014).

2.4 Proteíny spojené s obranou voči patogénom

Proteíny spojené s rastlinnou patogenézou zahŕňajú veľkú rodinu proteínov hojne zastúpených v rastlinách (angl. pathogenesis related proteins – PR proteins; Ali *et al.*, 2018). PR proteíny sú indukované rôznymi typmi patogénov (Ray *et al.*, 2016). Niektoré z génov kódujúcich PR proteíny sú exprimované aj v reakcii na abiotický stres, napr. sucho (Gregorova *et al.*, 2015), ťažké kovy (Gálusová *et al.*, 2015), zvýšená salinita (Han *et al.*, 2017) a chlad (Zieliński *et al.*, 2021). Rastlinné PR proteíny boli najskôr identifikované v tabaku infikovanom vírusom tabakovej mozaiky (Van Loon a Van Kammen 1970). Neskôr boli tieto proteíny popísané u mnohých ďalších rastlín ako napr. ryža (Hou *et al.*, 2012), sója (Xu *et al.*, 2014) a *Brassica juncea* (Ali *et al.*, 2017a). Vykazujú spoločné biochemické vlastnosti, ktoré sú nevyhnutné pri vystavení rastliny patogénnym infekciám alebo nežiaducemu stresu. Sú to všeobecne nízkomolekulárne proteíny v rozmedzí 6 až 43 kDa, stabilné pri nízkom pH (<3) a sú rezistentné na proteázy, čo im poskytuje stabilitu v prostredí vakuol, medzibunkových priestorov alebo na povrchu bunkovej steny (Van Loon *et al.*, 1994). PR proteíny majú podobné funkcie, ale v závislosti od ich izoelektrických bodov to môžu byť kyslé alebo zásadité proteíny. Väčšina kyslých PR proteínov sa vylučuje v extracelulárnych priestoroch, zatiaľ čo zásadité PR proteíny sa nachádzajú predovšetkým vo vakuole vďaka signálnemu peptidu na C-konci (Ali *et al.*, 2018). Takáto lokalizácia však nemôže byť zovšeobecnená pre všetky PR proteíny. Najhojnejší výskyt PR proteínov je v listoch. Avšak môžu sa vyskytovať takmer vo všetkých rastlinných orgánoch vrátane stoniek, koreňov a kvetov. Kyslé PR sú zvyčajne regulované rôznymi signálnymi molekulami, ako je SA (Sinha *et al.*, 2014) a ROS (Chamnongpol *et al.*, 1998), zatiaľ čo zásadité PR majú zvýšenú reguláciu vplyvom plyných fytohormónov etylénom a metyljasmonátom (Xu *et al.* 1994) počas útoku patogénov. Na základe molekulárnej hmotnosti, izoelektrického bodu, lokalizácie a biologickej aktivity boli proteíny PR kategorizované do 17 rodín (Tab. 1) (Sels *et al.*, 2008), vrátane β -1,3-glukanáz, chitináz, proteínov podobných taumatínu, peroxidáz, ribozóm-inaktivačných proteínov, tionínov, lipidových prenosových proteínov, oxalát oxidázy a proteínom podobných oxalát-oxidáze.

Tabuľka 1. Klasifikácia, vlastnosti a zdroje PR-proteínov izolovaných z rôznych rastlinných druhov (prevzaté z Sels *et al.*, 2008).

PR-Proteíny	Databázové číslo génu (NCBI)	Vlastnosť/funkcia	Pôvod	Zdroj
PR1	Y00707	Antifungálna funkcia	<i>N. tabacum</i>	Antoniw <i>et al.</i> , (1980)
PR2	M59443.1	β -1,3-glukanázy	<i>N. tabacum</i>	Antoniw <i>et al.</i> , (1980)
PR3	X77111.1	Chitinázy Triedy I, II, IV, V, VI,VII	<i>N. tabacum</i>	Van Loon (1982)
PR4	NW_015888419.1	Chitinázy Triedy I, II	<i>N. tabacum</i>	Van Loon (1982)
PR5	NW_015793016	Taumatínu-podobné proteíny	<i>N. tabacum</i>	Van Loon (1982)
PR6	NW_004196001.1	Proteinázové inhibítory	<i>S. lycopersicum</i>	Green and Ryan(1972)
PR7	NC_015445.2	Endoproteinázy	<i>S. lycopersicum</i>	Vera and Conejero (1988)
PR8	NC_026660.1	Chitinázy Trieda III	<i>Cucumis sativus</i>	Metraux <i>et al.</i> , (1988)
PR9	EC 1.11.1.7	Peroxidázy	<i>N. tabacum</i>	Lagrimini <i>et al.</i> , (1987)
PR10	NC_026940.1	Ribonukleázam-podobné proteíny	<i>Petroselinum crispum</i>	Somssich <i>et al.</i> , (1986)
PR11	gi 899342	Chitinázy Triedy I	<i>N. tabacum</i>	Melchers <i>et al.</i> , (1994)
PR12	NC_025209.1	Defenzíny	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Terras <i>et al.</i> , (1995)
PR13	gi 1181531	Tioníny	<i>A. thaliana</i>	Epple <i>et al.</i> , (1995)
PR14	gi 1045201	Lipidový-prenosový proteín	<i>H. vulgare</i>	Garcia-Olmedo <i>et al.</i> , (1995)
PR15	gi 2266668	Oxalát oxidáza	<i>H. vulgare</i>	Zhang <i>et al.</i> , (1995)
PR16	gi 1070358	Proteíny podobné oxalát oxidáze	<i>H. vulgare</i>	Wei <i>et al.</i> , (1998)
PR17	–	Antifungálne a antivirálné funkcie	<i>N. tabacum</i>	Okushima <i>et al.</i> , (2000)

Pri biotických stresoch, ako sú napr. patogénne infekcie a útoky hmyzu (Bhattarai *et al.*, 2007) je aktívna taktiež rodina HSP. HSP sa nachádzajú hlavne v cytoplazme a podieľajú sa na prenose bunkových signálov do jadra za stresových podmienok. Spomedzi HSP sú funkcie HSP90 v imunite rastlín doposiaľ najlepšie charakterizované. HSP90 môže priamo interagovať s R proteínmi a mnohými jeho substrátmi sú kinázy a transkripčné faktory, ktoré aktivujú obranné reakcie (Breiman, 2014). Ďalšími

proteínmi z rodiny sú HSP70, predstavujúce jednu z najviac konzervovaných tried HSP. HSP70 má v mikrobiálnej patogenéze rôzne funkcie. HSP70 pozitívne reguluje vírusovú reprodukciu a pohyb, čo nakoniec podporuje infekciu (Hafren *et al.*, 2010). Bolo dokázané, že obalový proteín (angl. coat protein – CP) *zemiakového vírusu A* interaguje s HSP70 *N. tabacum*, čo je dôležité pre vírusovú infekciu (Hafren *et al.*, 2010). Podobne aj efektor HopI1 z *Pseudomonas syringae* využíva HSP70, ktorý je nevyhnutný pre jeho virulenciu. Viazá sa na neho priamo C-terminálnou doménou a stimuluje aktivitu hydrolýzy ATP. Pri vysokej teplote je HopI1 nepotrebný pre patogenitu *P. syringae*, pokiaľ nie je zaistený nadbytok HSP70. Hypotézou je, že HSP70 má aktivity podporujúce obranu, ktoré môže narušiť HopI1 alebo vysoká teplota. Zvýšená citlivosť rastlín zbavených HSP70 na nepatogénne kmene *P. syringae* potvrdzuje úlohu HSP70 pri podpore obrany (Jelenska *et al.*, 2010).

2.4.1 Chitinázy

Chitinázy a β -1,3-glukanázy sú dva dôležité hydrolytické enzýmy, ktoré sa hromadia v mnohých druhoch rastlín po infikovaní rôznymi typmi patogénov. Tieto hydrolytické enzýmy zohrávajú hlavnú úlohu v obrannej reakcii proti hubovým patogénom degradáciou ich bunkovej steny, pretože chitín a β -1,3-glukán sú hlavnými štruktúrnymi zložkami bunkových stien mnohých patogénnych húb (Nagpure *et al.*, 2013; Ravichandran *et al.*, 2018).

Chitín je prírodný homopolymér β -1,4-viazaných zvyškov N-acetylglukozamínu (Collinge *et al.*, 1993). Chitinázy (EC 3.2.1.14) katalyzujú hydrolytické štiepenie β -1,4-N-acetyl-D glukozamínu (Cohen-Kupiec a Chet 1998; Jitonnom *et al.*, 2011) a tiež hydrolyzujú deacetylovanú formu chitínu, ktorý sa označuje ako chitosan (Tanabe *et al.*, 2000). Chitinázy trávia chitosanový polysacharidový reťazec na reziduálnych zvyškoch acetylovaného cukru (Tanabe *et al.*, 2000). Aj keď skutočný substrát pre chitinázy v rastlinách nie je známy, predpokladá sa, že tieto enzýmy rozkladajú nešpecifické arabinogalaktánové proteíny (AGP) obsahujúce N-acetylglukozamín (Kasprzewska, 2003), ktoré sa podieľajú na biologických procesoch, ako je somatická alebo mikrospórová embryogenéza (Pereira *et al.*, 2016).

Bakteriálne chitinázy sa podieľajú hlavne na odbúravaní chitínu v prostredí, ktorý poskytuje bunkám výživu uhlíkom a dusíkom (Cohen-Kupiec a Chet, 1998; Patil *et al.*, 2000). Uvoľnené látky po štiepení môžu potom pôsobiť ako induktory obranných reakcií

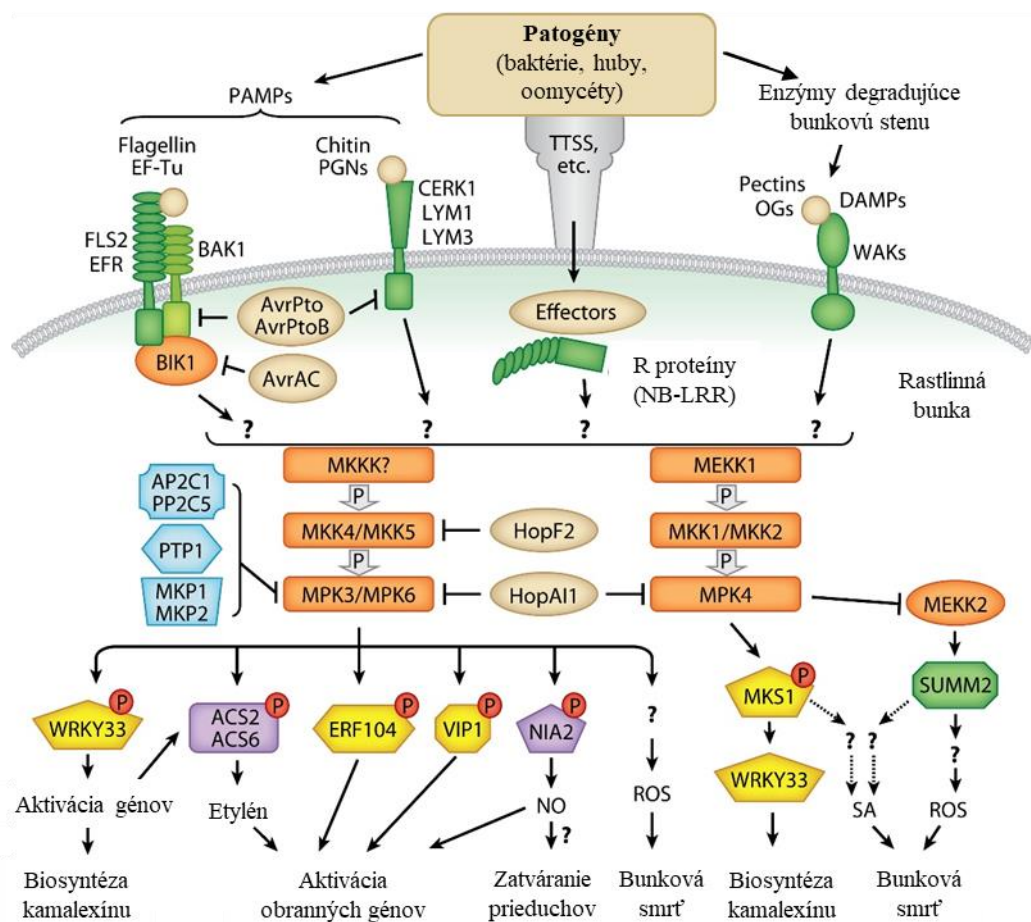
rastlín (Fesel a Zuccaro, 2016). Chitinázy, ktoré sú indukované v reakcii na napadnutie patogénmi študované napr. u kukurice (Ray *et al.*, 2016) a rajčiaka (Soliman *et al.*, 2019), patria medzi PR proteíny a ich izoformy sú označované ako PR3, PR4, PR8 a PR11 (Kasprzewska 2003). Ukázalo sa, že inhibujú rast patogénov (Ray *et al.*, 2016) a expresia niektorých chitinázových génov zvyšuje odolnosť voči patogénom v transgénnej sóji (Yang *et al.*, 2020), tabaku a kukurici (Liu *et al.*, 2020) ba dokonca aj v jablkách (Wang *et al.*, 2021).

Charakteristickou katalytickou doménou v chitinázach je glykozyldrolázová doména (Li a Greene, 2010). Podľa databázy pre enzýmy aktívne voči sacharidom (angl. database of carbohydrate-active enzymes – CAZy; <http://www.cazy.org>) tvoria chitinázy dve rodiny glykozidhydroláz (angl. glycoside hydrolase families – GH) GH18 a GH19, so vzájomne odlišnou štruktúrou a katalytickým mechanizmom. Rodina chitináz GH19 sa nachádza najmä v rastlinách. Hlavne na základe zloženia aminokyselín sú rastlinné chitinázy rozdelené do piatich tried (Neuhaus, 1999). Triedy I, II a IV patria do rodiny GH19, zatiaľ čo III a V do rodiny GH18. Gény kódujúce tieto enzýmy môžu byť exprimované v rastlinách konštitutívne (Colligne *et al.*, 1993) alebo môžu byť indukované pri patogénnej infekcii (Zur *et al.*, 2013), nízkej teplote (Zieliński *et al.*, 2021), etylénom (Zhong *et al.*, 2002), suchom (Gregova *et al.*, 2015), ťažkými kovmi (Meszaros *et al.*, 2014) alebo osmotickým stresom (Cao *et al.*, 2019). Objavila sa aj štúdia od Kim *et al.* (2015), kde zistili, že sa chitinázy zúčastňujú programovanej bunkovej smrti. Konkrétne je to chitináza 4 pochádzajúca z papriky (CaChitIV), ktorá interaguje s receptorom podobnou cytoplazmatickou proteínkinázou papriky (CaPIK1) a podporuje CaPIK1-spúšťanú bunkovú smrť a obranné reakcie voči *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*.

2.5 Úloha mitogénom aktivovaných proteínkináz v rastlinnej imunite

Rozpoznávanie PAMP alebo patogénnych efektorových proteínov spúšťa u rastlín niekoľko skorých obranných reakcií, ktoré zahŕňajú zmeny toku vápnika, aktiváciu niekoľkých mitogénom aktivovaných proteínkináz (angl. mitogen-activated protein kinases – MAPKs) MAPK, produkciu ROS a indukciu biosyntézy etylénu (Obr. 2). Skoré reakcie sa podieľajú na signalizácii a vedú k indukcii strednodobých a neskorých obranných reakcií, vrátane posilňovania bunkovej steny (Rani *et al.*, 2015), biosyntézy fytoalexínov (Yang *et al.*, 2020) a indukcie HR (Balint-Kurti, 2019). Tieto obranné reakcie sú regulované komplexnou signalizačnou sieťou, sprostredkovanou MAPK

kaskádami indukovanými po rozpoznaní patogénov rastlinnými PRR alebo intracelulárnymi R proteínmi (Obr. 2). Prostredníctvom fosforylácie cieľových proteínov vrátane transkripčných faktorov a enzýmov ovplyvňujú MAPK syntézu a/alebo signalizáciu obranných hormónov (Meng *et al.*, 2018), aktiváciu obranných génov (Son *et al.*, 2020) a uzatváranie prieduchov (Khokon *et al.*, 2017). Okrem týchto lokálnych reakcií sa u neinfikovaných častí rastliny zvyčajne vyvinie systémovo získaná rezistencia, ktorá sa prejaví ako zvýšená odolnosť voči budúcemu napadnutiu patogénom (Fu *et al.*, 2013).



Obr. 2. Rastlinné MAPK kaskády v signalizácii PAMP a v obranných reakciách vyvolaných efektorom. PRR rozoznávajú samotné PAMP odvodené od patogénu a spúšťajú PTI. Patogény používajú efekторы na potlačenie imunity rastlín. Rastliny využívajú proteíny rezistentcie (R) na snímanie prítomnosti týchto efektorov, čo spúšťa ETI. Aktivácia MAPK kaskád reagujúcich na patogény je jednou z prvých signalizačných udalostí v PTI a ETI. Patogény využívajú efekторы na inaktiváciu MAPK kaskád priamo alebo na potlačenie signalizácie nadradených signálnych zložiek. Proteínové fosfatázy, ktoré môžu defosforylovať a inaktivovať MAPK, sú tiež dôležité pri regulácii rozsahu, trvania a fyziologických výsledkov aktivácie MAPK. Otázniky označujú neidentifikované signalizačné komponenty. Jedna šípka môže označovať viac krokov. Skratky: NB-LRRs, proteíny bohaté na leucín s nukleotidovým väzbovým miestom; NO, oxid dusnatý; OG, oligogalakturónové kyseliny; WAK, kinázy spojené s bunkovou stenou (prevzaté a upravené z Meng a Zhang, 2013).

Aktivácia MAPK je jednou z prvých signalizačných udalostí po tom, čo rastlina zaznamená napadnutie patogénom (Pitzschke *et al.*, 2009; Tena *et al.*, 2011). Aktivácia MAPK sa uskutočňuje ich nadradenými kinázami, MAPK kinázami (MAPKK), tiež známymi ako MAPK a ERK kinázy (MEK), fosforyláciou Thr a Tyr zvyšku v Thr-X-Tyr aktivačnom motíve MAPK (Taj *et al.*, 2010). MAPKK sú zase regulované ich nadradenými kinázami, MAPKK kinázami alebo MEK kinázami (MAPKKKs alebo MEKKs) prostredníctvom fosforylácie dvoch zvyškov Ser/Thr v motíve Ser/Thr-X₃₋₅-Ser/Thr aktivačnej slučky MAPKK (Rodriguez *et al.*, 2010). Trojkinázové kaskády, známe ako MAPK kaskády, sú dôležité signalizačné moduly, ktoré prostredníctvom postupnej fosforylácie môžu prenášať a zosilňovať signály na následné proteíny a aktivovať expresiu génov rezistencie (Hamel *et al.*, 2006).

V bunke je viac zástupcov každej z troch úrovní kinázovej kaskády, ktoré prispievajú k špecifickosti prenášaného signálu. Kaskády MAPK hrajú dôležitú úlohu pri sprostredkovaní bunkovej diferenciácie, vývoja buniek, hormonálnej aktivity a reakcií na abiotický a biotický stres (Komis *et al.*, 2018). Genetická manipulácia MAPK môže zvýšiť toleranciu voči mnohým stresom u kultúrnych rastlín (Šamajová *et al.*, 2013).

2.5.1 Rastlinné MAPK kaskády

Mitogénom aktivované proteínkinázy sú súčasťou mnohých vzájomne sa prelínajúcich signálnych dráh v stresovej odpovedi u rastlín, vrátane ochrany proti mikrobiálnym patogénom (Bigeard *et al.*, 2015). V genóme *Arabidopsis* bolo na základe sekvenčnej homológie objavených 20 MAPK, 10 MAPKK a približne 60 MAPKKK (Ichimura *et al.*, 2002). Podobný rozsah génov, ktoré kódujú zložky MAPK kaskád, sa našiel aj v iných osekvenovaných rastlinných genómoch, vrátane ryže (Wankhede *et al.*, 2013), jačmeňa (Křenek *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2019), kukurice (Liu *et al.*, 2013) a trávy *Brachypodium distachyon* (Feng *et al.*, 2016).

2.5.1.1 Podskupiny rastlinných MAPK

Rastlinné MAPK majú buď aktivačný motív Thr-Glu-Tyr (TEY), podobný cicavčej podrodine ERK MAPK, alebo aktivačný motív Thr-Asp-Tyr (TDY), ktorý je pre rastlinné MAPK jedinečný. Na základe podobnosti sekvencií možno rastlinné TEY MAPK rozdeliť do troch skupín (A, B a C), zatiaľ čo TDY MAPK tvoria vzdialenejšiu skupinu (D) (Hamel *et al.*, 2006). Do skupiny A patria MPK3 a MPK6 z *Arabidopsis* a tiež ich ortológy v iných rastlinných druhoch, ako je napr. stresom aktivovaná MAPK (angl.

stress-activated MAP kinase – SAMK) a soľou indukovaná MAPK lucerny (angl. salt-induced MAP kinase – SIMK; Cardinale *et al.*, 2000; Hrbáčková *et al.*, 2021), proteínkináza indukovaná kyselinou salicylovou z tabaku (angl. SA-induced protein kinase – SIPK) a poranením indukovaná proteínkináza (angl. wounding-induced protein kinase – WIPK; Ogata *et al.*, 2016) a MPK3 a MPK6 z ryže (Rao *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 2017). Tieto MAPK sa podieľajú na odpovediach rastlín na biotické a abiotické stresy a tiež sa podieľajú na raste a vývoji (Komis *et al.*, 2018). MAPK skupiny B predstavujú MPK4 a MPK11 z *Arabidopsis* podieľajúce sa na obrane proti patogénom a reakciách na abiotický stres (Bethke *et al.*, 2012). Hrajú tiež zásadnú úlohu pri delení buniek (Beck *et al.*, 2011). Funkcie MAPK v skupinách C a D sú menej jasné.

2.6 Aktivácia MAPK vyvolaná PAMP

Kaskády rastlinných MAPK hrajú ústredné úlohy v signálnej dráhe PTI, kde prevádzajú signály z PRR na následné komponenty (Chisholm *et al.*, 2006).

Flg22 aj elf18 môžu indukovať zvýšenie, ale prechodnú aktiváciu MAPK v *Arabidopsis*, vrátane MPK3, MPK6, MPK4 a MPK11 (Asai *et al.*, 2002; Bethke *et al.*, 2012). Po stimulácii pomocou PAMP tvoria FLS2 aj EFR heterodiméry s BAK1 (Couto a Zipfel, 2016). Chýbajúca expresia *BAK1* v mutantoch *Arabidopsis* vedie k výraznému zníženiu aktivácie MPK3, MPK6 vyvolanej flg22 a elf18 (Heese *et al.*, 2007). Zároveň bolo zistené, že kináza podobná BAK1 (angl. BAK1-LIKE1 – BKK1), je tiež potrebná na flg22 a elf19-indukovanú aktiváciu MAPK. Predpokladá sa, že pri signalizácii PAMP spolupracuje BKK1 s BAK1 (Roux *et al.*, 2011). Jedným z potenciálnych regulátorov smerom od komplexu FLS2-BAK1 je cytoplazmatická kináza BIK1, ktorá interaguje s komplexom FLS2-BAK1 (Obr. 2). V súčasnosti sú známe niektoré komponenty spájajúce receptorové komplexy a MAPK kaskády. V štúdiu od Bi *et al.* (2018) zistili, že dva vysoko príbuzné MAPKKK, MAPKKK3 a MAPKKK5, sprostredkovávajú aktiváciu MPK3/6 najmenej štyrmi PRR z rodiny receptorových cytoplazmatických kináz VII (angl. receptor-like cytoplasmic kinases – RLCK VII) a poskytujú rezistenciu voči *Pst* DC3000 a *B. cinerea* v *Arabidopsis thaliana*. RLCK VII, ktoré pôsobia za PRR, priamo fosforylujú MAPKKK5, čo je potrebné na aktiváciu MPK3/6 prostredníctvom PAMP ako sú flg22, chitín alebo elf18. MPK6 prekvapivo spätne fosforyluje MAPKKK5 kvôli zvýšeniu aktivácie MPK3/6, čo ukazuje na mechanizmus pozitívnej spätnej väzby. Zistili tiež, že prostredníctvom RLCK VII je fosforylovaná aj MEKK1, čo je potrebné na aktiváciu MPK4 prostredníctvom PAMP. Tieto objavy ilustrujú centrálnu

mechanizmy, pomocou ktorých viac PRR aktivuje kaskády MAPK a odolnosť voči chorobám.

Po vnímaní flg22 sa v *Arabidopsis* aktivujú dve MAPK kaskády. Prvá kaskáda sa skladá z MKKK3/5-MKK4/5-MPK3/6 (Asai *et al.*, 2002). Druhá kaskáda MAPK aktivovaná flg22 sa skladá z MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 (Qiu *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2012). Kaskáda MPK3/MPK6 je pozitívnym regulátorom obranných reakcií (Tena *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2010). MPK3/MPK6 regulujú expresiu veľmi podobnej sady génov, čo naznačuje, že tieto MAPK sú konvergenčnými bodmi signalizácie PAMP (Zipfel *et al.*, 2006). U *Arabidopsis* sú MPK3 a MPK6 aktivované okrem flg22 napr. aj chitínom (Yamaguchi *et al.*, 2017) a elf18 (Sun *et al.*, 2018). Aktiváciu MAPK v *Arabidopsis* tiež spúšťajú ďalšie PAMP, ako napríklad proteín harpín z mnohých rastlinných patogénnych baktérií (Desikan *et al.*, 2001) a peptidy indukované nekrozou a etylénom (angl. necrosis- and ethylene-inducing peptide – Nep1) z rôznych oomycét (Qutob *et al.*, 2006).

Cheng *et al.* (2015) dokázali, že receptor pre proteíny aktivovanej kinázy C 1 (RACK1) z *Arabidopsis*, funguje ako proteín viažúci MAPK kaskádu MEKK1-MKK5-MPK3/MPK6 a spája ju s nadradeným heterotrimérom G proteínom. Vnímanie elicítov, ako je proteáza IV z *Pseudomonas aeruginosa* a ArgC z *Xanthomonas campestris*, neznámym receptorom vedie k uvoľneniu kaskády MEKK1-MKK5-MPK3/MPK6 z komplexu s RACK1 a následnému spúšťaniu imunitnej odpovede rastlín (Cheng *et al.*, 2015). RACK1 je proteín, ktorý má sedem tzv. „WD“ opakujúcich sa motívov so štruktúrou β -vrtule, ktorá udeľuje schopnosť proteín-proteínej interakcie (Ron *et al.*, 1994, Ullah *et al.*, 2008). RACK1 vykazuje vysokú sekvenciu a štruktúrnu podobnosť medzi rôznymi rastlinnými druhmi vrátane ryže (Iwasaki *et al.*, 1995), lucerny (McKhann *et al.*, 1997) a *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2006). U *Arabidopsis* má RACK1 tri izoformy kódované génmi *RACK1A*, *RACK1B* a *RACK1C* (Chen *et al.*, 2006). Mutanti *Arabidopsis* deficitné v *RACK1A* vykazujú zníženú rýchlosť tvorby listov ružice, pozmenený vývoj výhonkov a oneskorené kvitnutie (Chen *et al.*, 2006), čo naznačuje vývojové funkcie *RACK1A*. Tieto fenotypové defekty sú výraznejšie u dvojitéch mutantov *rack1a/rack1b* a *rack1a/rack1c*. Trojitý mutant *Arabidopsis rack1a/b/c* nie je schopný prežitia, čo naznačuje nerovnakú redundanciu medzi génmi *RACK1* pri regulácii vývoja rastlín (Guo a Chen, 2008). Počas klíčenia semien sú mutanty *rack1a* menej citlivé na kyselinu gibberelínovú a brasinolid, ale viac reagujú na ošetrovanie kyselinou abscisovou

(angl. abscisic acid – ABA). Okrem toho mutanty *rack1a* produkujú menej bočných koreňov po exogénnom pridaní auxínu v porovnaní s divým typom (Chen *et al.*, 2006).

2.7 Aktivácia MAPK vyvolaná efektorom

Arabidopsis MPK3 a MPK6 sú tiež zapojené do ETI (Tsuda *et al.*, 2009). Infekcia tabaku pomocou *Pst* DC3000 nesúcou efektor AvrRpt2 spustila oveľa rýchlejšiu aktiváciu MPK6 a MPK3 v porovnaní s oštrením *Pst* DC3000 nenesúcou efektor (Underwood *et al.*, 2007). Bolo zistené, že mutácie v dvoch MAPK fosfatázach, MAPK fosfatáze 1 a proteín tyrozín fosfatáze 1 (MKP1 a PTP1), ktoré negatívne regulujú MPK3/MPK6, vedú ku konštitutívnej obrannej odpovedi závislej od R proteínu, supresoru *npr1-1* (angl. Suppressor of *npr1-1*, Constitutive 1 – SNC1; Bartels *et al.*, 2009).

Pôvodne bola MPK4 kaskáda považovaná za dráhu, ktorá negatívne ovplyvňuje obranné reakcie pretože mutanti *Arabidopsis mpk4* vykazujú zvýšenú expresiu obranných génov a tiež rezistenciu voči patogénom a trpasličiu morfológiu. Avšak bolo zistené, že tieto prejavy sú spôsobené autoimunitou (Ichimura *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2008). Zhang *et al.* (2012) zistili, že autoimunitné odpovede u mutantov kaskády MPK4 sú spôsobené aktiváciou ETI sprostredkovanou NB-LRR proteínom nazvaným SUMM2 (angl. suppressor of *mkk1 mkk2* 2). Mutácie v *SUMM2* takmer úplne potláčajú autoimunitné fenotypy u mutantov *mpk4*, *mkk1/mkk2* a *mekk1*. Vo výsledku bolo navrhnuté, aby kaskáda MPK4 bola označená ako „strážca“ SUMM2. MPK4 za bežných podmienok fosforyluje SUMM2, ktorý je neaktívny. Pri napadnutí patogénom HopAI1 efektor blokuje aktivitu MPK4. SUMM2 v takomto prípade nie je fosforylovaná a spúšťa obranné reakcie, vrátane tvorby ROS (Zhang *et al.*, 2012). Okrem toho genetický skrining identifikoval MEKK2 (pôvodne SUMM1), MAPKKK zdieľajúcu vysokú homológiu s MEKK1. MEKK2 je základný komponent spájajúci aktiváciu MPK4 s SUMM2. Ďalšie genetické a biochemické štúdie naznačujú, že MPK4 negatívne reguluje MEKK2, pravdepodobne priamou fosforyláciou, a aktivácia MEKK2 v *mpk4* mutantoch spúšťa ETI sprostredkovanú SUMM2 (Obr. 2; Kong *et al.*, 2012).

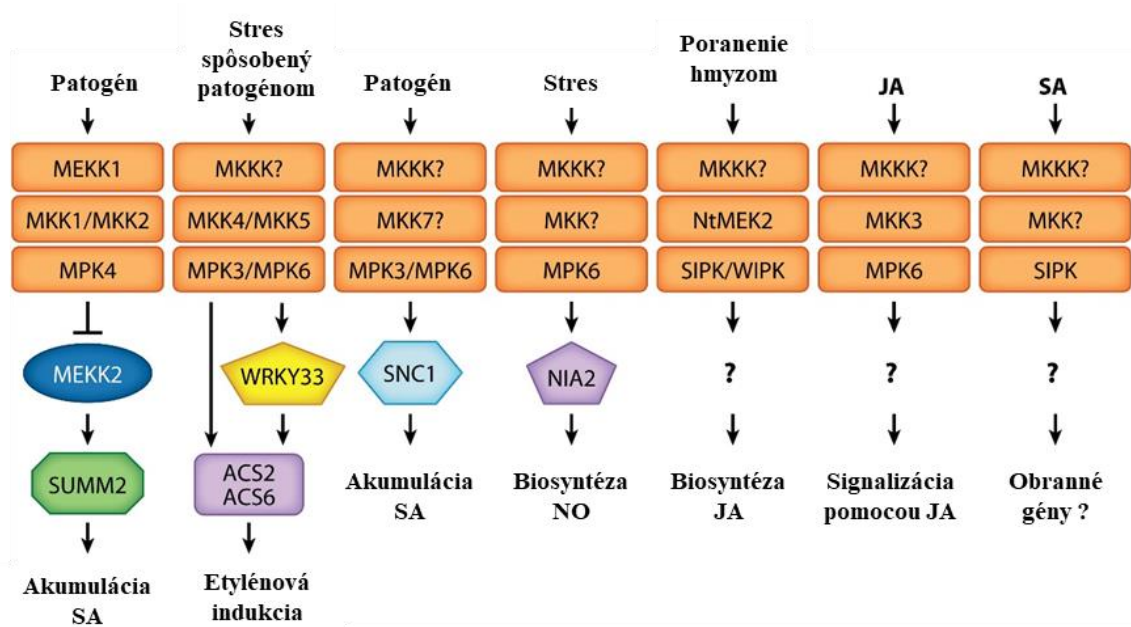
2.8 Úloha MAPK v aktivácii PR génov u rastlín

Aktivácia MPK3/MPK6 u *Arabidopsis* alebo SIPK/WIPK u tabaku indukuje mnoho génov súvisiacich s obranou (Ishihama *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2011). Okrem kontroly expresie obranných génov prostredníctvom modulácie biosyntézy hormónov a signalizácie môžu MAPK aktivovať expresiu obranných génov prostredníctvom

priamej fosforylácii podradených transkripčných faktorov. U *Arabidopsis*, MPK6 interaguje a fosforyluje ERF104, člena rodiny etylénových faktorov odozvy (angl. ethylene response factor – ERF), ktorý aktivuje gény *DEFENZÍN 1.2a* a *1.2b* (angl. *PLANT DEFENSIN – PDF1.2a* a *PDF1.2b*; Obr. 2; Bethke *et al.*, 2009). Interakcia MPK6 s ERF104 je len dočasná a ERF104 je z interakcie uvoľnený hneď po aktivácii MPK6 (Bethke *et al.*, 2009). Taktiež bol identifikovaný ERF6, ďalší člen rodiny ERF u *Arabidopsis*, ako substrát MPK3/MPK6. Fosforylácia ERF6 pomocou MPK3/MPK6 vedie k stabilizácii proteínu ERF6, ktorý ďalej aktivuje expresiu viacerých génov súvisiacich s obranou, vrátane *PDF1.1*, *PDF1.2a*, *PDF1.2b*, *ENDOCHITINÁZY B* a *HEL* (angl. *HEVEIN LIKE PROTEIN*; Meng *et al.*, 2013). Transkripčné faktory VIP1 sú fosforylované prostredníctvom MPK3, čo následne vedie k translokácii VIP1 z cytoplazmy do jadra a aktivácii *PRI* (Djamei *et al.*, 2007).

V reakcii na napadnutie patogénom je produkcia nízkomolekulárnych antimikrobiálnych zlúčenín známych ako fytoalexíny dôležitou súčasťou obrany rastlín (Yang *et al.*, 2020). Rôzne čeľade rastlín produkujú rôzne triedy fytoalexínov (Dixon, 2001). Kamalexín (3-tiazol-20-yl-indol) je hlavný fytoalexín produkovaný u zástupcov rodu *Arabidopsis* a príbuzných druhoch *Brassicaceae* (Ahuja *et al.*, 2012). Produkciu kamalexínu môžu v *Arabidopsis* vyvolať rôzne patogény ako napr. *Sclerotinia sclerotiorum* (Stotz *et al.*, 2011) a *Colletotrichum gloeosporioides* (Hiruma *et al.*, 2013). Dôkazy naznačujú, že MAPK hrajú kľúčovú úlohu v regulácii biosyntézy kamalexínu. Expresia konštitutívne aktívnych variant MKK4 (MKK4^{DD}) a MKK5 (MKK5^{DD}), ktoré aktivujú MPK3/MPK6 u *Arabidopsis*, vedie k indukcii biosyntézy kamalexínu a koordinovanej pozitívnej regulácii viacerých génov, vrátane *GLUTAMÁT-CYSTEÍN LIGÁZY*, *INDOLEACETALDOXIM DEHYDRATÁZY* a *KAMALEXÍN SYNTÁZY* (*PAD2*, *CYP71A13* a *PAD3*), ktoré pôsobia v biosyntetickej dráhe kamalexínu (Ren *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2011).

Aktivácia MPK3/MPK6 fosforylujú WRKY33, ktorý je dôležitý pre biosyntézu kamalexínu (Obr. 3; Mao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2020). Väzba WRKY33 na promótor *PAD3* génu naznačuje, že WRKY33 priamo aktivuje expresiu génov pre biosyntézu kamalexínu (Mao *et al.*, 2011). Je zaujímavé, že MPK3/MPK6 tiež riadia patogénom indukovateľnú expresiu génu *WRKY33*. WRKY33 sa môže viazať na svoj vlastný promótor, čo naznačuje potenciálnu regulačnú spätnú väzbu sprostredkovanú MPK3/MPK6, ktorá riadi expresiu *WRKY33* (Mao *et al.*, 2011). Táto dvojúrovňová



Obr. 3. Rastlinné mitogénom aktivované proteínkinázové (MAPK) kaskády v regulácii biosyntézy a signalizácie rastlinných obranných hormónov. MAPK reagujúce na patogén sa podieľajú na indukcii biosyntézy rastlinných hormónov vrátane etylénu, kyseliny salicylovej (SA), kyseliny jasmónovej (JA) a oxidu dusnatého (NO), ktoré sú sekundárnymi signálnymi molekulami obranných reakcií rastlín. MAPK sú tiež zapojené do signalizačných dráh SA a JA. Otázniky označujú neznáme komponenty. Jedna šípka môže označovať viac krokov (prevzané a upravené z Meng a Zhang, 2013).

regulácia WRKY33 prostredníctvom MPK3/MPK6 na posttranslačnej a transkripčnej úrovni hrá dôležitú úlohu pri regulácii biosyntézy kamalexínu u *Arabidopsis*.

WRKY33 riadi produkciu kamalexínu aj prostredníctvom interakcie s MPK4 (Obr. 2; Qiu *et al.*, 2008). WRKY33 vytvára jadrový komplex s MPK4 a jeho substrátom MKS1 (angl. MPK4 substrate 1). Predpokladá sa, že fosforylácia MKS1 pomocou MPK4 v reakcii na flg22 alebo bakteriálnu infekciu vedie k uvoľneniu komplexu MKS1-WRKY33 z MPK4, ktorý následne aktivuje expresiu *PAD3* (Mao *et al.*, 2011).

Etylén je dôležitý rastlinný hormón. Biosyntetická dráha etylénu je podrobne popísaná už viac ako dve desaťročia. V biosyntéze etylénu sú dôležité dva enzymatické kroky: premena metabolického prekursora S-adenosyl-metionínu, na kyselinu 1-aminocyklopropán-1-karboxylovú (ACC) pomocou ACC syntázy (ACS) a oxidačné štiepenie ACC za vzniku etylénu pomocou ACC oxidázy (ACO) (Wang *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2017). ERF sú jednou z niekoľkých rodín transkripčných faktorov špecifických pre rastliny (Riechmann *et al.*, 2000). Nedávne štúdie odhalili, že ERF sú kľúčovými regulátormi v reakciách rastlín na abiotický stres ako je chlad (Bolt *et al.*, 2017), zvýšená

salinita (Yao *et al.*, 2016) a biotický stres akým je napr. napadnutie patogénom *Botrytis cinerea* (Catinot *et al.*, 2015).

SIPK/WIPK v tabaku a MPK3/MPK6 u *Arabidopsis*, hrajú kľúčovú úlohu v regulácii biosyntézy etylénu vyvolanej patogénmi (Obr. 3; Han *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). Aktivácia SIPK/WIPK indukuje produkciu etylénu v tabaku (Kim *et al.*, 2003). Zároveň, podrobné biochemické a genetické analýzy u *Arabidopsis* preukázali, že ACS2 a ACS6, dve izoformy ACS typu I, sú substrátmi MPK3 a MPK6 (Obr. 3). Fosforylácia ACS2/ACS6 pomocou MPK3 a MPK6 stabilizuje proteín ACS *in vivo*, čo vedie k zvýšeniu aktivity ACS a teda k produkcii etylénu (Han *et al.*, 2010). Transkripčná aktivácia génov ACS pomocou WRKY33 zohráva rozhodujúcu úlohu pri udržiavaní zvýšenej produkcie etylénu (Li *et al.*, 2012). Preto hrá regulácia ACS na transkripčnej úrovni pomocou MPK3/MPK6 kľúčovú úlohu pri určovaní kinetiky a rozsahu indukcie tvorby etylénu po infekcii patogénom.

2.8.1 Aktivácia MAPK a reaktívne formy kyslíka

PTI je tiež spojená s rýchlou produkciou ROS, známou ako oxidatívne vzplanutie, ktoré nastáva aktivitou NADPH oxidáz lokalizovaných v plazmatickej membráne (Apel a Hirt, 2004; Torres, 2010). Na základe aktivácie MPK3, MPK6 a MPK4 v *Arabidopsis* a SIPK a WIPK v tabaku exogénne aplikovaným H₂O₂ bolo predpokladané, že táto produkcia ROS je nadradená MAPK v signalizácii indukovanej PAMP a až zvýšená produkcia ROS vedie k následnej aktivácii MAPK (Pitzschke a Hirt, 2009). Aktivácia MAPK vyvolaná PAMP je ale nezávislá od ROS produkovaných NADPH oxidázou. Umlčanie génu pre NADPH oxidázu (angl. respiratory burst oxidase homolog – RBOH) v *N. benthamiana* (*RbohB*) znižuje produkciu ROS po ošetrení flg22 alebo chitínom, ale neovplyvňuje aktiváciu MAPK indukovanú týmito PAMP (Segonzac *et al.*, 2011). U mutanta *Arabidopsis rbohD* je flg22 indukovaná aktivácia MAPK nenarušená, aj keď tvorba ROS je u tohto mutanta úplne blokovaná (Zhang *et al.*, 2007).

Na druhej strane MAPK sú nadradené RBOH a teda aj zvýšenej produkcii ROS v obrannej odpovedi. Umlčanie oboch MAPK, *NbSIPK* a *NbNTF6*, potlačilo expresiu *NbRbohB* a tak aj akumuláciu ROS po elicitácii INF1 (Asai *et al.*, 2008). Inaktivácia MPK3/MPK6 ektopickou expresiou bakteriálneho efektora HopA11 znižuje akumuláciu ROS (Obr. 2; Zhang *et al.*, 2007). Segonzac *et al.* (2011) zistili, že zníženie expresie *NbSIPK* a *NbWIPK*, vplýva na produkciu ROS vyvolanú flg22 v *N. benthamiana* avšak

zníženie expresie *NbNTF6* nie. Strata *MPK6* u *Arabidopsis*, ortológ k *SIPK*, spôsobuje iba mierne zvýšenie ROS v reakcii na chitín, ale nie na flg22 (Segonzac *et al.*, 2011). Zatiaľ čo strata *MPK3*, ortológ k *WIPK*, vedie k zvýšenej a predĺženej akumulácii ROS v reakcii na chitín aj flg22 (Segonzac *et al.*, 2011). MAPK môžu pomocou fosforylácie WRKY ovplyvňovať *RBOHD* a tak aj produkciu ROS (Adachi *et al.*, 2015). Výsledkom môžeme povedať, že aktivácia MAPK je nadradená tvorbe ROS produkovaných NADPH oxidázami pri vnímaní PAMP.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Použitý biologický materiál

V práci boli použité *HvMPK3* knock out (KO) mutantné línie jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare*), ktoré boli pripravené transformáciou nezrelých zygotových embryí kultivaru Golden Promise (Takáč *et al.*, 2021). Knock out mutácia bola pripravená pomocou TAL efektor nukleáz (angl. transcription activator-like effector nuclease – TALEN) technológie. Kontrolné rastliny (A a D) boli pripravené regeneráciou z netransformovaných zygotových embryí. Línie transgénnych rastlín KO B a KO C pochádzajú z nezávislých transformácií. Línie divého typu (WT A a WT D) pochádzajú zo zygotových embryí rôznych semien ich regeneráciou rovnakým procesom ako boli pripravené transgénne rastliny. Semená všetkých línií boli poskytnuté Dr. P. Křenkom.

3.1.2 Chemikálie

2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)

2-propanol (PENTA)

3,3'-diaminobenzidín (DAB) (Sigma-Aldrich)

40 % Akrylamid/bisakrylamid 37,5:1 (Biorad)

4x Laemmli pufor (Biorad)

Anhydrid kyseliny octovej (Sigma-Aldrich)

Azid sodný (Sigma-Aldrich)

Blotting Grade Bloker (Biorad)

Bradfordovo činidlo Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Biorad)

Brómfenolová modrá (BFB) (Sigma-Aldrich)

Clarity ECL Western Blotting substrate (Biorad)

Complete (Protease Inhibitor Cocktail Tablets) (Roche)

Coomassie brilliant blue r-250 (CBB) (Biorad)

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich)

Dihydrogénfosforečnan sodný (NaH_2PO_4) (Sigma-Aldrich)

Dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich)

Draselná soľ 2-(N-morfolino)ethánsulfónovej kyseliny (MES) (Sigma-Aldrich)

Etanol (PENTA)

Flagelín22 (Cambridge Research Biochemicals)

Fluorescent brightener 28 (Calcofluore) (Sigma-Aldrich)
Fluorid sodný (Sigma-Aldrich)
Gellan gum (Alfa-Aesar)
Glycerol (Sigma-Aldrich)
Glycín (Sigma-Aldrich)
Glykolchitosan (Sigma-Aldrich)
HEPES (Duchefa)
Hovädzí sérový albumín (BSA) (Sigma-Aldrich)
Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)
Chlorid horečnatý (Sigma-Aldrich)
Chlorid sodný (Sigma-Aldrich)
Chlórnan sodný (Sigma-Aldrich)
Inhibítör fosfatáz (Phostop - Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets) (Roche)
Kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich)
Kyselina etylénglykoltetraoctová (EGTA) (Sigma-Aldrich)
Kyselina chlórovodíková (Sigma-Aldrich)
Kyselina octová (Sigma-Aldrich)
Metanol (Sigma-Aldrich)
Murashige a Skoog médium, basal salt mixture (MS) (Duchefa)
Octan sodný (Sigma-Aldrich)
Peroxid vodíka (H₂O₂) (Sigma-Aldrich)
Peroxodisíran amónny (APS) (Biorad)
Polyvinylpyrolidón (PVP) (Sigma-Aldrich)
Ponceau S (Sigma-Aldrich)
Prenosový transferový pufor (Biorad)
Proteínový štandard Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad)
Sacharóza (Sigma-Aldrich)
Síran amónny (Sigma-Aldrich)
Tekutý dusík (Messer Technogas)
Tetrametyletyléndiamín (TEMED) (Sigma-Aldrich)
TGX Stain free FastCast Acrylamide Kit 10 % (Biorad)
Tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris) (Sigma-Aldrich)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
Tween-20 (Sigma-Aldrich)

3.1.3 Použité prístroje

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG)

Aparatúra pre SDS-PAGE (Biorad)

Centrifúga (Allegra 64R, Beckmann Coulter)

Digestor (Merci)

Flowbox (Merci)

Fytotron (WEISS)

GE Image Scanner III (GE Healthcare)

ChemiDoc™ MP Imaging System (Biorad)

Infinite M Nano (TECAN)

pH meter (PC 2700, Eutech – Instruments)

Rocker-Shaker MR-12 (Biorad)

Simplicity UV Water Purification Systems (Merck Millipore)

Stereomikroskop Leica M165FC (Leica Microsystems)

Thermoshaker TS-100 (BioSan)

Vortex-2-Genie (Scientific Industrie)

Zdroj napätia PowerPac HV (Biorad)

Zoomovací stereomikroskop ZEISS Axio Zoom V16 (Carl ZEISS)

3.1.4 Protilátky použité pri imunoblotovaní

Goat anti-rabbit IgG konjugovaná s HRP (Sigma-Aldrich)

Rabbit anti-HSP70 (Agrisera)

Rabbit anti-RACK1 (Agrisera)

3.1.5 Použité softvéry

ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)

ImageLab (Biorad)

MS Excel (Microsoft)

MS Powerpoint (Microsoft)

ZEN Blue (Carl ZEISS)

3.2 Metódy

3.2.1 Príprava rastlinného materiálu

Semená jačmeňa boli sterilizované v plastovej skúmavke v piatich následných krokoch. Najskôr bol k semenám pridaný 70% v/v etanol, v ktorom boli semená inkubované po dobu 30 sekúnd. Následne bol etanol odobraný a nahradený 5% v/v chlórnanom

sodným, v ktorom boli semená inkubované ďalších 5 minút. Po odobraní chlórnanu sodného bol k semenám na premytie na 30 sekúnd pridaný znova 70% v/v etanol. Po odobraní etanolu sa pridala sterilná destilovaná voda, ktorá bola vždy po 5 minútach vymenená za čistú vodu a to v šiestich opakovaníach. Takto sterilizované semená boli prenesené do sterilnej destilovanej vody s obsahom 1% v/v H₂O₂ a ponechané pri izbovej teplote cez noc. Po inkubácii boli semená nasadené na ½ MS médium (15 g.l⁻¹ sacharóza, 4,3 g.l⁻¹ MS basal salt mixture, 2,5 g.l⁻¹ MES, 4,5 g.l⁻¹ Gellan gum, pH (5,8)) a uchované v chladničke v tme na 2 noci pri 4 °C kvôli prelomeniu dormancie a synchronizácii klíčenia. Ďalší deň boli semená v Petriho miskách vyložené do fytotronu na 8 dní a kultivované pri dennom režime 16/8h (svetlo/tma) a pri teplote 21 °C.

3.2.2 Ošetrovanie rastlín flg22 a indukcia obrannej odpovede

Pre sledovanie dlhodobých efektov flg22 na fenotypy rastlín, boli 3 dňové rastliny prenesené na médium s prídavkom 1 µM flg22. Flg22 sa do média pridal po autoklavovaní a vychladnutí média na 60°C. Rastliny boli naďalej inkubované a sledované na týchto médiách.

Pre krátkodobé ovplyvnenie flg22 (biochemické analýzy) boli 5 dňové rastliny prenesené do sklenenej Petriho misky s tekutým ½ MS médiom s prídavkom 0,2 µM flg22. Petriho misky s rastlinami boli položené na kývačku, pričom boli miešané pomalým kývaním. Rastliny boli inkubované v roztoku 6 hodín vo fytotrone za rovnakých podmienok ako je uvedené vyššie. Rastliny, ktoré boli vystavené inkubácii v tekutom ½ MS médiu bez prídavku flg22 slúžili ako kontroly. Po ošetrovaní boli odobraté korene inkubovaných rastlín a okamžite zmrazené v tekutom dusíku. Vzorky boli uskladnené pri -80°C v hlbokomraziacom boxe.

3.2.3 Analýza fenotypov rastlín

Počet a dĺžka koreňov kontrolných rastlín (bez ovplyvnenia) boli vyhodnocované v 4-6 deň kultivácie. Analýza bola robená v 3 nezávislých replikách, kde pri každom opakovaní bolo analyzovaných 5 rastlín divého typu a oboch mutantných línií. Rozdiely medzi 15 rastlinami jednotlivých línií boli štatisticky vyhodnotené t-testom ($p \leq 0,05$). Dĺžka koreňových vláskov bola vyhodnotená v 5. deň kultivácie na ½ MS. Vplyv flg22 na dĺžku koreňových vláskov bola vyhodnotená na 2. deň po prenesení na médium s flg22. Do úvahy sa brali plne vyvinuté neporušené koreňové vlásky. Na dokumentáciu rastlín na miskách bol využitý skener Image Scanner III. Na dokumentáciu koreňových vláskov

bol využitý zoomovací stereomikroskop ZEISS Axio Zoom V16 (Carl ZEISS) so zväčšením 10-20x. Rastliny boli pozorované v prechádzajúcom svetle priamo na miskách. S využitím softvéru ImageJ a Microsoft Excell sa vyhodnocovali potrebné údaje koreňov a koreňových vlásokov u kontrolných a flg22 ovplyvnených rastlín. Vo fenotypovej analýze bolo celkovo na jednu repliku počítaných 80 koreňových vlásokov z najmenej 3 koreňov. Analýza bola robená v dvoch biologických replikách. Rozdiely boli vyhodnotené t-testom ($p \leq 0,05$).

3.2.4 Histochemická detekcia H₂O₂

Na *in situ* detekciu H₂O₂ s 3,3'-diaminobenzidínom (DAB) sa použili korene divého typu a KO *HvMPK3* línií B a C. Po 6h ovplyvnení flg22 sa 2 cm dlhé apikálne segmenty koreňov inkubovali v roztoku obsahujúcom 4,7 mM DAB, Tween 20 (0,05% v/v) a 10 mM Na fosfátový pufo (pH 7,0) a umiestnili na 8 hodín do tmy. Zafarbené korene sa premiestnili do zmesi 20% glycerolu v/v a 80% v/v etanolu na podložnom sklíčku. Produkcia H₂O₂ sa prejavila ako hnedá zrazenina oxidovaného DAB.

Zafarbené korene sa pozorovali zoomovacím stereomikroskopom ZEISS Axio Zoom V16 (Carl ZEISS). Nastavenia boli rovnaké pre všetky obrázky v experimente. Analýza bola robená v 3 biologických opakovaníach pozostávajúcich z 5 apikálnych segmentov koreňov.

3.2.5 Extrakcia proteínov na stanovenie aktivity chitináz

Na extrakciu sa použili celé korene študovaných línií. Následne sme materiál preniesli do vychladenej trecej misky a priliali dostatočné množstvo tekutého dusíka. V trecej miske boli korene homogenizované na jemný prášok pomocou tĺčika. Homogenát bol prenesený do vopred vychladenej čistej mikroskúmavky a uchovaný na ľade. K homogenátom bol pripipetovaný približne jeden a polnásobok extrakčného pufru vzhľadom k objemu homogenátu. Vzorky boli extrahované 100 mM Tris pufrom (pH 8,0) s prídavkom 1.5% (w/v) PVP, inhibítora fosfatáz, 10% (v/v) glycerolu a 0,02% (v/v) 2-merkaptóetanolu. Po premiešaní na vortexe sa zmes inkubovala 30 minút na ľade. Po inkubácii nasledovala 20 minútová centrifugácia pri 13 000 g a 4°C a supernatant bol udržiavaný na ľade alebo uschovaný pri -80°C.

3.2.6 Meranie koncentrácie bielkovín

Stanovovanie koncentrácie proteínov bolo robené pomocou Bradfordovej metódy (Bradford, 1976) v 96 jamkových mikrotitračných doštičkách. Reakčná zmes (300 μ l)

bola pripravená z 239 μl destilovanej vody, 60 μl 5x Bradfordovho činidla a 1 μl bielkovinového extraktu. Pomocou spektrofotometra s monochromátorom Infinite M Nano (TECAN) bola meraná absorbanca pri 595 nm. Koncentrácie bielkovín boli stanovené pomocou kalibračnej krivky pripravenej použitím známych koncentrácií albumínu (angl. bovine serum albumin – BSA).

3.2.7 Príprava glykolchitínu

Prvým krokom bolo naváženie 1 g glykolchitosanu, ktorý bol rozdrvený v trecej miske a rozpustený v 10% (v/v) kyseline octovej. Tento viskózný roztok sa nechal odstáť pri laboratórnej teplote (22°C) cez noc. Na druhý deň bolo k tomuto roztoku pridávaných 90 ml 100 % metanolu za dôkladného miešania. Následne bol tento roztok veľmi pomaly prefiltrovaný cez filtračný papier Whatman No. 4. Filtrát bol preliaty do kadičky a za stáleho miešania bol k filtrátu pridaný 1,5 ml anhydridu kyseliny octovej, pričom sa z viskózneho roztoku stal gél. Výsledný gél sa nechal odstáť 30 minút pri laboratórnej teplote. Následne bol gél segmentovaný a odstránila sa zvyšná kvapalina. Segmenty gélu boli prenesené do mixéra a po pridaní 20 ml 100% metanolu boli homogenizované 4 minút pri maximálnej rýchlosti mixéra. Vzniknutá suspenzia bola centrifugovaná pri 27 000 g po dobu 15 minút pri 4°C. Želatínový pelet bol rozrušený pipetovaním jeden násobným objemom 100% metanolu a dvakrát sa opakovali kroky rozrušenia a centrifugácie. Po týchto krokoch bol pelet rozpustený v 100 ml roztoku destilovanej vody s prídavkom 0,02% w/v azidu sodného. Výsledkom bolo získanie 1% zásobného roztoku glykolchitínu. Glykolchitín bol následne uskladnený v mraziacom boxe pri -20°C a použitý v potrebných analýzach (Trudel a Asselin, 1989).

3.2.8 Natívna polyakrylamidová elektroforéza

Pre zachovanie enzýmovej aktivity vo vzorkách bola použitá metóda natívnej polyakrylamidovej (PAGE) elektroforézy. Bol pripravený 10% natívny PAGE gél s rozmermi 8,3 x 7,3 cm o hrúbke 1 mm. Zloženie rozlišovacieho gélu: 1,875 ml 40% (v/v) akrylamid/bis-akrylamid 37,5:1; 1,875 ml 1,5 M roztoku Tris-HCl s pH 8,8; 3,138 ml MiliQ vody; 3,75 μl 99% v/v TEMED; 37,5 μl 10% w/v APS; 70 μl 1% w/v glykolchitín. Polymerizácia prebiehala 45 minút pri laboratórnej teplote. Zloženie 4% zaostrovacieho gélu: 250 μl 40% (v/v) akrylamid/bisakrylamid 37,5:1; 630 μl 0,5 M roztoku Tris-HCl s pH 6,8; 3,21 ml MiliQ vody; 2,5 μl 99% v/v TEMED; 12,5 μl 10%

w/v APS). Polymerizácia zaostrovacieho gélu prebiehala 30 minút pri laboratórnej teplote.

Elektroforetická aparatúra bola vložená do ľadového kúpeľa aby bolo zabezpečené neustále chladenie. Do aparatúry bol naliaty elektródový pufor (3 g.l⁻¹ Tris a 14,4 g.l⁻¹ glycín) a do jamiek na géli boli nanesené natívne extrakty s 15-20 µg proteínu. Elektroforéza prebiehala po dobu 1 hodiny a 30 minút pri konštantnom prúde nastavenom na 20 mA na jeden gél.

Analýza chitináz bola robená v 3 biologických replikách. Na jednu biologickú repliku boli použité korene z 3 rastlín.

3.2.9 Stanovenie aktivity chitináz

Farbenie špecifickej aktivity chitináz bolo robené v štyroch krokoch. Po separácii natívnou elektroforézou bol gél inkubovaný v 50 mM Na-acetátovom pufri s pH 5,0 po dobu 1 hodiny a 15 minút pri 37°C. Druhým krokom bola inkubácia gélu 20 minút v 50 mM Tris-HCl pufri s pH 8,9, ktorý obsahoval 0,01% fluorescent brightener 28, v tme pri izbovej teplote. Tretím krokom bolo viacnásobné premývanie v MiliQ vode. Toto premývanie prebiehalo niekoľko dní pri 4°C. Posledným krokom bola vizualizácia aktivity na géle pomocou UV svetla v dokumentačnom prístroji Chemidoc (Biorad), pričom aktivita chitináz bola viditeľná ako tmavé pásy na svetlom pozadí. Optická denzita pruhov bola kvantifikovaná pomocou softvéru ImageJ. Rozdiely v denzitách pruhov boli štatisticky vyhodnotené t-testom ($p \leq 0,05$).

Po detekcii bol gél premytý v MiliQ vode. Následne boli gély zafarbené CBB, ktorá bola pripravená zmiešaním vodného roztoku 10% (w/v) síranu amónneho a 2% (w/v) kyseliny fosforečnej s následným pridaním CBB G-250 z 5% (w/v) vodného zásobného roztoku na finálnu koncentráciu 0,1% (w/v); toto sa pred farbením zmiešalo s 20% (v/v) metanolom (Neuhoff *et al.*, 1988) minimálne 2 hodiny. Farbenie gélov prebiehalo v miskách na kývačke (Rocker Shaker, Biorad) pri nízkej rýchlosti kývania. Po zafarbení proteínov boli gély premývané 5x v MiliQ vode pri vysokej rýchlosti kývania kvôli odfarbeniu pozadia gélov. Keď boli gély premyté, nasledovalo skenovanie pomocou skenera pri 300 dpi (Image Scanner).

3.2.10 Denaturujúca polyakrylamidová gélová elektroforéza

Pred SDS-PAGE bol objem každej z natívnych vzoriek odpovedajúci 15 µg proteínu prepipetovaný do novej mikroskúmavky. K tomuto objemu bol pridaný denaturačný

pufor (4x koncentrovaný Laemmliho pufor; 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol) v pomere 3:1 (vzorka : pufor). Predtým bol 4x Laemmliho pufor obohatený 2-merkaptotanolom v pomere 1:4 (2-merkaptotanol : Laemmliho pufor). Takto nachystané vzorky boli premiešané na vortexe a povarené pri 96°C po dobu 10 minút v termobloku. Denaturujúci polyakrylamidový gél bol pripravený s využitím TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 10% (Biorad) podľa inštrukcií výrobcu.

Do elektroforetickej aparatúry bol naliaty elektródový pufor (3 g.l⁻¹ Tris, 14,4 g.l⁻¹ glycín, 1 g.l⁻¹ SDS) a do jamiek na géle bolo nanesených 15 µg proteínu. Elektroforéza prebiehala prvých 10 minút pri 100 V a potom približne 50 minút pri 180 V. Vizualizácia proteínov prebiehala pomocou dokumentačného prístroja ChemiDoc (Biorad) a softvéru Image Lab (Biorad) s nastavením protokolu pre detekciu proteínov na „Stain-Free“ géli. Táto technológia je založená na detekcii proteínov pomocou UV žiarenia (Biorad).

3.2.11 Imunoblotovanie

Proteíny sa preniesli na polyvinylidéndifluoridovú (PVDF) membránu (GE Healthcare) pomocou mokrého prenosu v aparatúre (Biorad) s použitím prenosového pufru (25 mM Tris, 192 mM glycín, 10% (v/v) methanol) pri 100 V po dobu 1,5 hodiny za neustáleho chladenia. Membrána bola v prípade imunodetekcie HSP70 blokována v zmesi 4% w/v odtučneného sušeného mlieka Blotting Grade Blocker a 4% w/v BSA v Tris buffer saline s prídavkom detergentu Tween 20 (TBS-T) cez noc pri 4°C za pomalého kývania. V prípade imunoznačenia RACK1A bol použitý blokovací roztok obsahujúci 5% BSA v TBS-T. TBS-T pufor bol zložený z 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl a 0,1% v/v Tween 20. Na ďalší deň bol blokovací roztok nahradený roztokom primárnej protilátky anti-HSP70 (králičia polyklonálna protilátka; riedená 1:5000 v 3 % w/v Blotting Grade Blocker v TBS-T) alebo anti-RACK1A (králičia polyklonálna protilátka; riedená 1:2000 v 3 % w/v Blotting Grade Blocker v TBS-T) pri nízkej rýchlosti kývania cez noc pri 4°C. Po inkubácii v roztoku primárnej protilátky boli membrány premývané 5x7 minút v TBS-T pri vysokej rýchlosti kývania. Membrány boli po premytí inkubované 1,5 hodiny v laboratórnych podmienkach so sekundárnou protilátkou pri nízkej rýchlosti kývania (kozia protilátka rozpoznávajúca králičí IgG, konjugovaná s chrenovou peroxidázou; riedená 1:5000 v 1% w/v BSA v TBS-T). Po inkubácii so sekundárnou protilátkou boli membrány opäť premývané 5x7 minút v TBS-T pri vysokej rýchlosti kývania.

Signál bol na membráne vyvolaný pomocou komerčne dostupného chemiluminiscenčného substrátu (Clarity Western ECL Substrate, Biorad). Najprv sme membránu inkubovali v 2 ml roztoku substrátu po dobu 2 minút a potom sme ju premiestnili do dokumentačného prístroja ChemiDoc (Biorad). Použitím softvéru Image Lab (Biorad) sme detekovali chemi-luminiscenciu. Bol použitý protokol s názvom „Chemi“ a expozíciou v rozmedzí 0,1-2 sekundy pre dosiahnutie najlepšieho signálu. Pomocou softvérov Image Lab a ImageJ bola robená úprava obrazového materiálu spojená s kvantifikáciou intenzity pruhov. V programe Microsoft Excel (Microsoft) boli získané dáta následne spracované. Imunoblotové analýzy detekcie HSP70 boli robené v troch biologických replikách. Detekovanie HSP70 po ovplyvnení flg22 bolo robené v dvoch biologických replikách a detekcia RACK1a bola vyhotovená v jednej replike. Rozdiely v denzitách pruhov boli štatisticky vyhodnotené t-testom ($p \leq 0,05$).

3.2.12 Bioinformatická predikcia regulácie expresie chitinázového génu pomocou transkripčných faktorov

Pomocou viacerých softvérov boli predikované transkripčné faktory (TF), ktoré sa môžu viazať na promótorové sekvencie chitinázy a sú zároveň potenciálnymi substrátmi MPK3. Prvým génom použitým pre analýzy bol *AtMPK3* (AT3G45640) z *Arabidopsis*, ako heterológ k jačmennému génu *HvMPK3* (Křenek et al., 2015). Ako reprezentant chitináz bol vybratý gén *26KD-PRAEPROTEIN DER CHITINASE G (CHIG)* z jačmeňa, ktorého kódovaný proteín mal zníženú abundanciu v *HvMPK3* KO mutante (Takáč et al., 2021). Z dôvodu že niektoré predikčné softvéry sú špecifické pre genóm *Arabidopsis*, bol pomocou BLASTp analýzy (NCBI) identifikovaný najbližší heterológny gén v modelovej rastline *Arabidopsis*. Z výsledného zoznamu sme vybrali gén, ktorý mal najvyššie skóre a 75,52% identity, konkrétne *BASIC CHITINASE* (AT3G12500). Najskôr boli nájdené TF špecifické pre cis elementy prítomné v promótorovej sekvencii cieľového chitinázového génu pomocou AthaMap softvéru (Génová analýza – „Upstream“ oblasť: -1000; „Downstream“ oblasť: 50; % obmedzenie na vysoko konzervované väzbové miesta pre TF: 0; výber TF rodín: „ALL“) (<http://www.athamap.de>). Vybrané TF sa analyzovali v GPS 3.0 softvéri (vybraný druh: „*Arabidopsis thaliana*“, skupina kináz: „CMGC/MAPK“) na prítomnosť MAPK-špecifického fosforylačného miesta (Wang et al., 2020). U tých s pozitívnym výsledkom sa hľadala prítomnosť dokovacích sekvencií špecifických pre MAPK v softvéri pre zdroje eukaryotických lineárnych motívov (angl. Eukaryotic Linear Motif resource – ELM) (bunkový kompartment: nešpecifikované,

taxonomický kontext: *Arabidopsis thaliana*) (<http://www.elm.eu.org>). Zároveň bol vygenerovaný zoznam TF koexprimujúcich s oboma génmi záujmu pomocou ATTED II (<http://atted.jp>). Predikované TF predstavovali prienik medzi jednotlivými bioinformatickými analýzami (AthaMap, GPS3.0 a ATTED II). Informácie o experimentálne dokázanej fosforylácii boli získané z PhosPhAt 4.0 databázy.

4 VÝSLEDKY

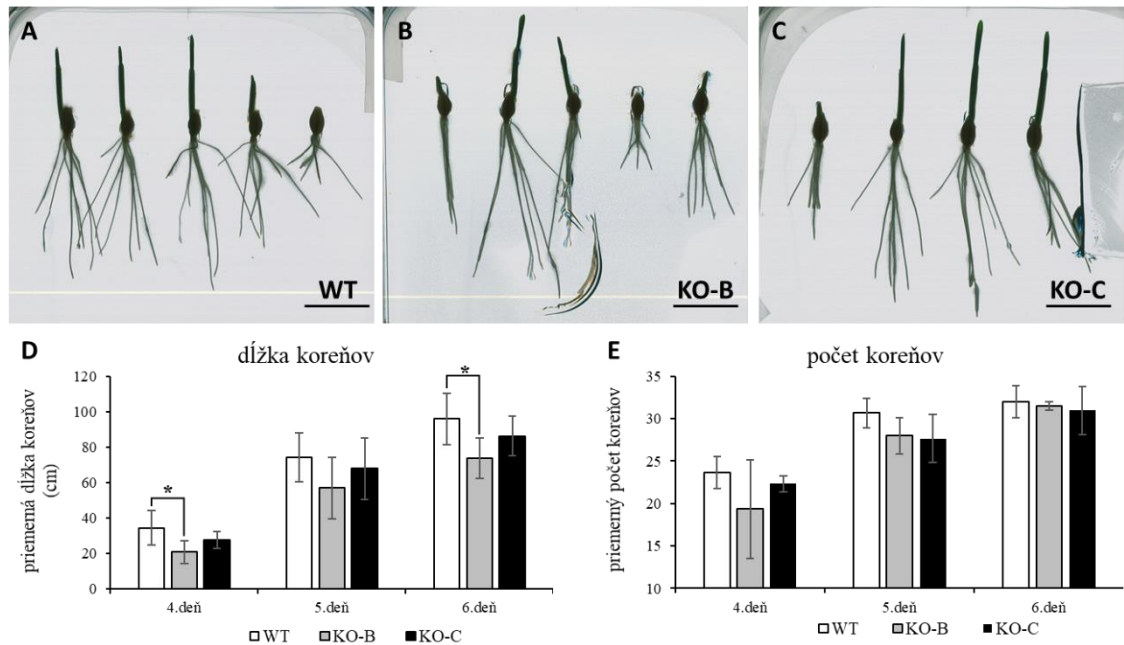
V rámci experimentálnej časti sme vyhodnotili vplyv KO mutácie *HvMPK3* génu na dlhodobé (fenotypy) a krátkodobé (aktivita chitináz, abundancia HSP70, akumulácia H₂O₂) pôsobenie flg22. Tieto experimenty umožnili vyhodnotiť význam *HvMPK3* v indukcii imunitných odpovedí jačmeňa.

4.1 Fenotypová analýza koreňov rastlín *HvMPK3* KO po ovplyvnení flg22

MAPKs sú známe regulátory vývinových procesov vrátane vývinu koreňového systému. V prvej sérii experimentov sme sa preto zaoberali fenotypom koreňov *HvMPK3* KO rastlín a rastlín divého typu jačmeňa. Cieľom bolo zistiť možné rozdiely v dĺžke a počte koreňov v kontrolných podmienkach a odpoveď rastlín na ovplyvnenie flg22.

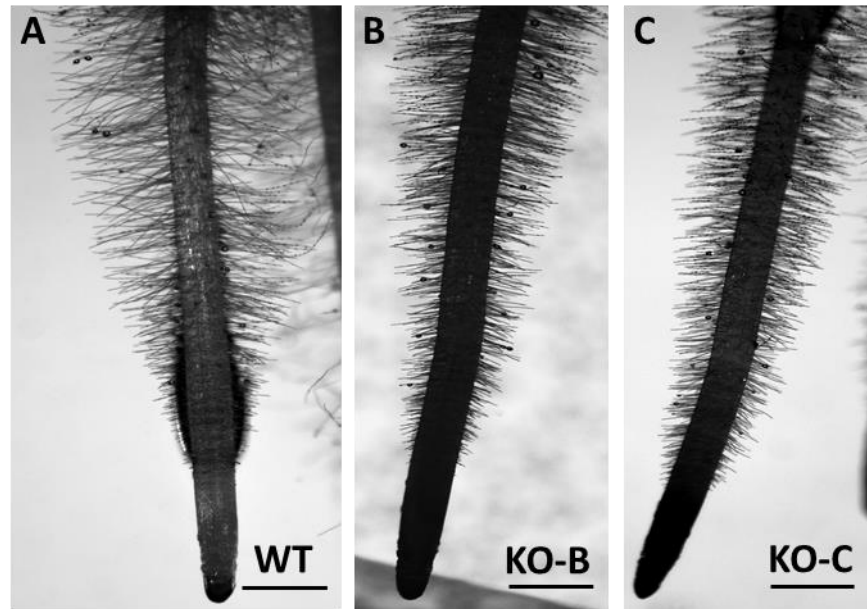
Priemerná dĺžka koreňov štvordňových rastlín bola v kontrolných podmienkach u *HvMPK3* KO-B mutanta približne 1,6-krát nižšia ako dĺžka koreňov divého typu (Obr. 4A, B, D). Rozdiely v dĺžke koreňov boli štatisticky významné. U *HvMPK3* KO-C mutanta bola priemerná dĺžka koreňov približne 1,25-krát nižšia než u divého typu (Obr. 4C, D) avšak rozdiely v dĺžke koreňov neboli štatisticky významné. Na 6 deň kultivácie sa tieto rozdiely medzi líniami znížili. *HvMPK3* KO-B mutant mal priemernú dĺžku koreňov približne 1,3-krát nižšiu než divý typ ale stále bola štatisticky významná a u KO-C mutanta bola priemerná dĺžka približne 1,1-krát nižšia než u divého typu. Bol tiež sledovaný aj počet koreňov u jednotlivých rastlín. Zistili sme, že ich počet je u jednotlivých línii podobný po 3 dňoch kultivácie (Obr. 4E) a rozdiely v počte koreňov medzi mutantnými líniami a divým typom neboli štatisticky významné. Pozorovali sme rozdiely v dĺžke koreňových vláskov medzi koreňmi rastlín divého typu a *HvMPK3* KO (Obr. 5). Vlázky začínali vyrastať v diferenciačnej zóne a predlžovali sa v smere od koreňovej špičky. Dĺžka koreňových vláskov bola v koreňoch divého typu (Obr. 5A) o 1,37-krát vyššia oproti koreňovým vláskom mutantov *HvMPK3* KO (Obr. 5B, C). Rozdiely v dĺžke koreňových vláskov boli štatisticky významné.

MAPK majú tiež potenciál ovplyvňovať vývinové procesy počas odpovedi na stres, akými môžu byť aj biotické interakcie s baktériami.

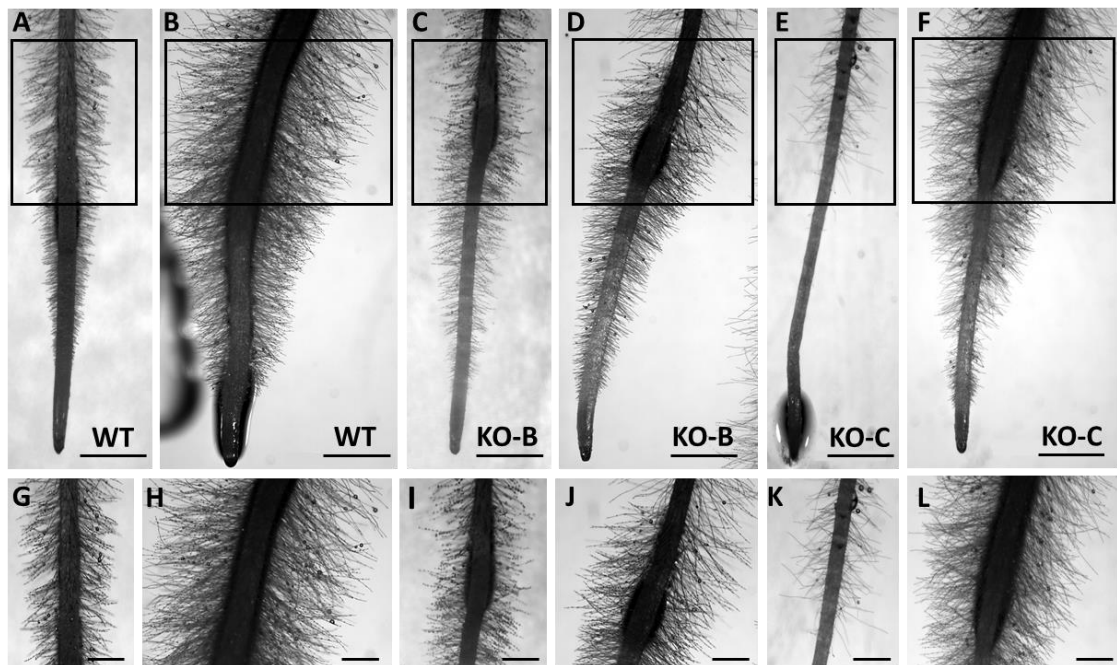


Obr. 4 Fenotypová analýza koreňov rastlín jačmeňa divého typu a mutantných *HvMPK3* KO línií rastúcich na $\frac{1}{2}$ MS médiu. A – klíčence divého typu (WT); B – klíčence KO-B línie; C – klíčence KO-C línie, všetky po 3 dňoch kultivácie; Mierka – 2 cm; D – graf priemernej dĺžky koreňov rastlín; E – graf priemerného počtu koreňov rastlín. Chybové úsečky znázorňujú smerodajnú odchýlku v hodnotách u 10 rastlín; Štatisticky významné rozdiely podľa t-testu ($p \leq 0,05$) sú označené hviezdičkou.

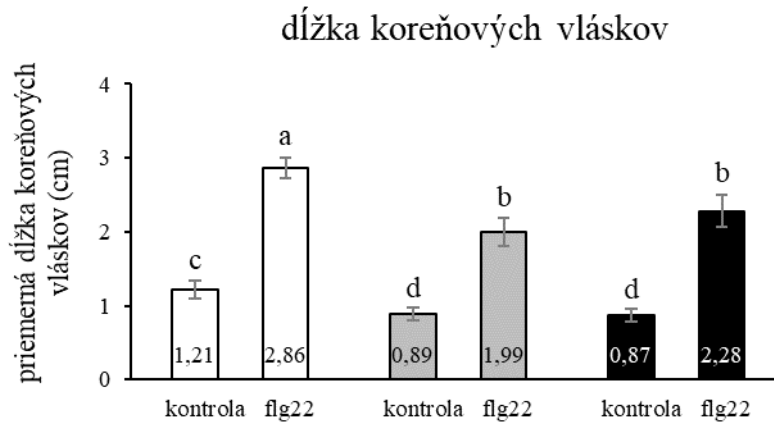
Trojdnňové rastliny boli prenesené buď na kontrolné médium (Obr. 6A, C, E) alebo na médium s prídavkom $1\mu\text{M}$ flg22 (Obr. 6B, D, F) na ktorom rástli ďalšie 4 dni. Flg22 silne stimuloval rast koreňových vláskov vo všetkých troch genotypoch jačmeňa (Obr. 6A–F). Priemerná dĺžka koreňových vláskov rastlín po 2 dňoch na médiu s flg22 bola u *HvMPK3* KO-B mutantu približne 1,43-krát nižšia a u *HvMPK3* KO-C mutantu približne 1,25-krát nižšia než u rastlín divého typu (Obr. 7). Rozdiely v dĺžke koreňových vláskov boli po ovplyvnení flg22 štatisticky významné.



Obr. 5 Vplyv knock-out mutácie *HvMPK3* génu na fenotyp koreňových vláskov jačmeňa. (A–C) Reprezentatívne obrázky koreňov a koreňových vláskov rastlín divého typu (WT) a *HvMPK3* KO línií (KO-B a KO-C) rastúcich 3 dni na ½ MS médiu ukazujúce kratšie koreňové vlásky u KO línií. Mierka: 1 mm.



Obr. 6 Vplyv knock-out mutácie *HvMPK3* génu a ošetrenia flg22 na fenotyp koreňových vláskov. (A–F) Korene rastlín divého typu (WT) (A, B), *HvMPK3* KO-B (C, D) a *HvMPK3* KO-C (E, F) 2 dni po prenose buď na kontrolné médium (A, C, E) alebo na médium obsahujúce flg22 (B, D, F); (G–L) Zväčšenie orámovaných oblastí (A–F) podrobne zobrazujúcich koreňové vlásky WT a *HvMPK3* KO-B a KO-C v kontrolných podmienkach (G, I, K) a po ovplyvnení flg22 (H, J, L); Mierky: 2 mm (A–F), 1 mm (G–L).



Obr. 7 Graf priemernej dĺžky koreňových vláskov rastlín z Obr. 6. Chybové úsečky znázorňujú smerodajnú odchýlku v hodnotách u 150 vláskov; Rozdielne malé písmená nad stĺpcami predstavujú štatisticky významné rozdiely podľa t-testu ($p \leq 0,05$).

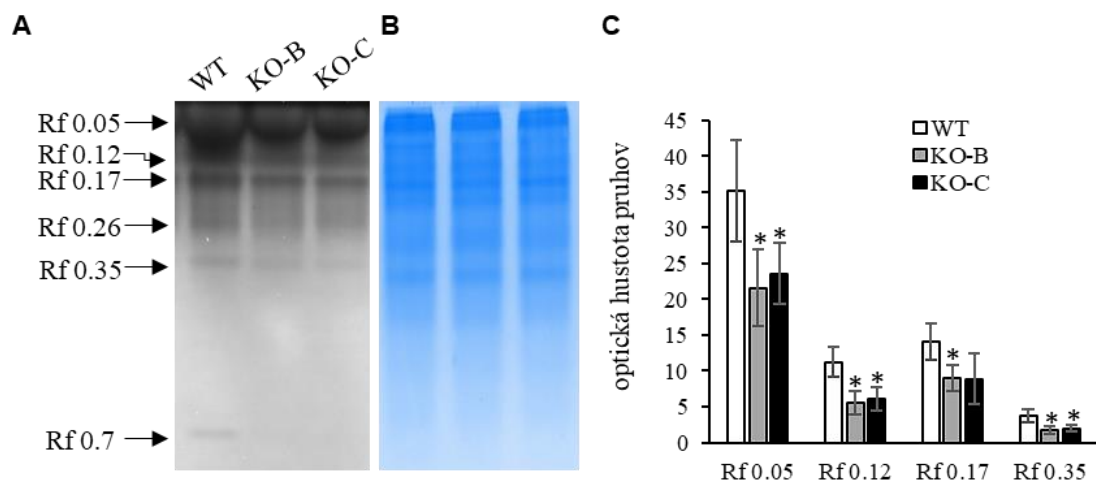
4.2 Biochemická a histochemická analýza *HvMKP3* KO mutantov po ovplyvnení flg22

4.2.1 Vplyv knock-out mutácie v *HvMPK3* géne na aktivitu chitináz jačmeňa

V ďalších experimentoch sme sa zamerali na krátkodobé odpovede mutantných línií na 6h trvajúci vplyv flg22. Analýza aktivity chitináz pomocou natívnej elektroforézy umožnila detekovať šesť izozýmov v koreňoch jačmeňa, pričom sme zistili rozdiely medzi študovanými líniami (Obr. 8). Každý z izozýmov bol označený podľa retenčného faktoru (Rf). V kontrolných podmienkach bola aktivita jednotlivých izozýmov chitináz u *HvMPK3* KO-B a taktiež KO-C mutantných línií výrazne a štatisticky významne nižšia v porovnaní s divým typom. Konkrétne aktivita chitinázy s Rf 0.05 bola 1,6-krát nižšia u KO-B línií a o 1,45-krát nižšia u KO-C línií v porovnaní s divým typom (Obr. 8B). Aktivita chitinázy s Rf 0.7 bola u mutantných línií pod hranicou senzitivity metódy, pričom u vzoriek rastlín divého typu bola detekovateľná. Môžeme teda predpokladať, že knock-out *HvMPK3* génu negatívne ovplyvňuje aktivitu chitináz v koreňoch jačmeňa.

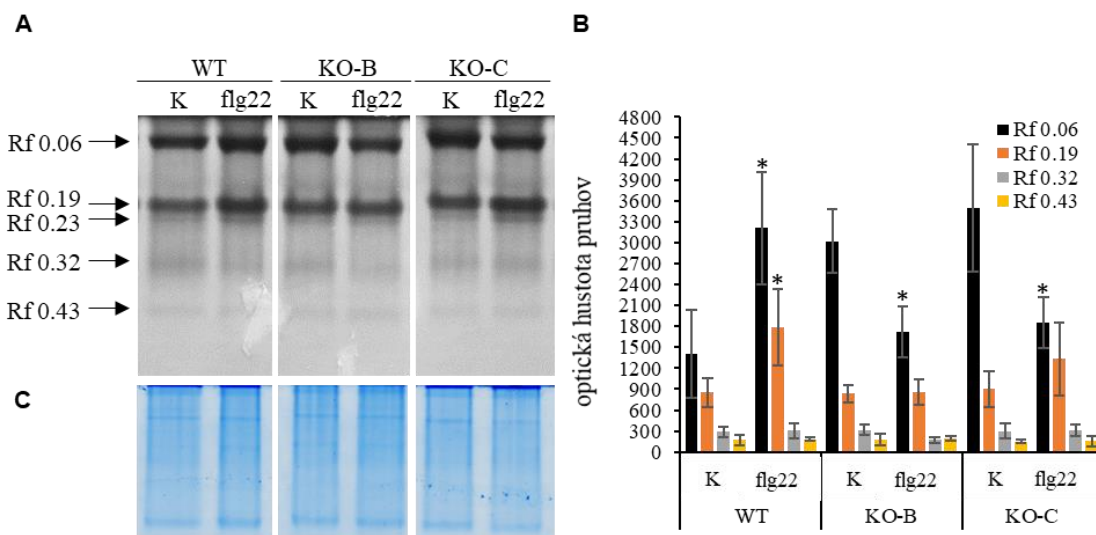
4.2.2 Vplyv flg22 na aktivitu chitináz v mutantných líniách jačmeňa

V analýze vplyvu flg22 na aktivitu chitináz bolo pozorovaných 5 izozýmov, s rôznymi Rf (Obr. 9). Zistili sme že senzitivita jednotlivých izozýmov chitináz na flg22 sa líšila (Obr. 9A). U rastlín divého typu bolo po ovplyvnení flg22 pozorované, štatisticky významné, až 2,2-násobne zvýšenie aktivity chitináz s Rf 0.06 a Rf 0.19 oproti kontrolnému ovplyvneniu (Obr. 9B). Opačný trend bol pozorovaný u oboch línií



Obr. 8 Biochemická analýza aktivity chitináz v koreňoch rastlín *HvMPK3* KO línií jačmeňa a rastlín divého typu. A –gél po farbení použitím Fluorescent brightener 28 a vyvolaní pomocou UV lampy. Detekované pruhy reprezentujú jednotlivé izozýmy chitináz; WT rastliny divého typu, KO-B a KO-C – rastliny *HvMPK3* KO línií; B – vizualizácia proteínov na géli z A pomocou CBB; C – kvantifikácia optickej hustoty pruhov izozýmov chitinázy z Rf 0.05, 0.12, 0.17 a 0.35 z obrázku A; Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku. Štatisticky významné rozdiely podľa t-testu ($p \leq 0,05$) sú označené hviezdikou. Neorezaný celý pôvodný obrázok gélu je zdokumentovaný v prílohe č. 1.

HvMPK3 KO mutantov. U *HvMPK3* KO-B línie bola po ovplyvnení flg22 pozorovaná 1,75-krát nižšia aktivita chitinázy s Rf 0.06 oproti kontrolnému ovplyvneniu. Aktivita chitinázy s Rf 0.19 sa u tejto línie po ovplyvnení flg22 nemenila (Obr. 9B). Podobná tendencia v znižovaní aktivity po flg22 ovplyvnení bola pozorovaná aj u druhej *HvMPK3* KO línie. *HvMPK3* KO-C línia vykazovala skoro až 2-krát nižšiu aktivitu chitinázy s Rf 0.06 po ovplyvnení flg22. Chitinázy s Rf 0.32 a Rf 0.43 svoju aktivitu nemenili, s výnimkou v prípade *HvMPK3* KO-B línie, konkrétne v prípade chitinázy s Rf 0.32 (Obr. 9B). Aktivita konkrétne týchto dvoch izozýmov môže byť konštantná a nemusí reagovať na flg22 ako ostatné izozýmy.

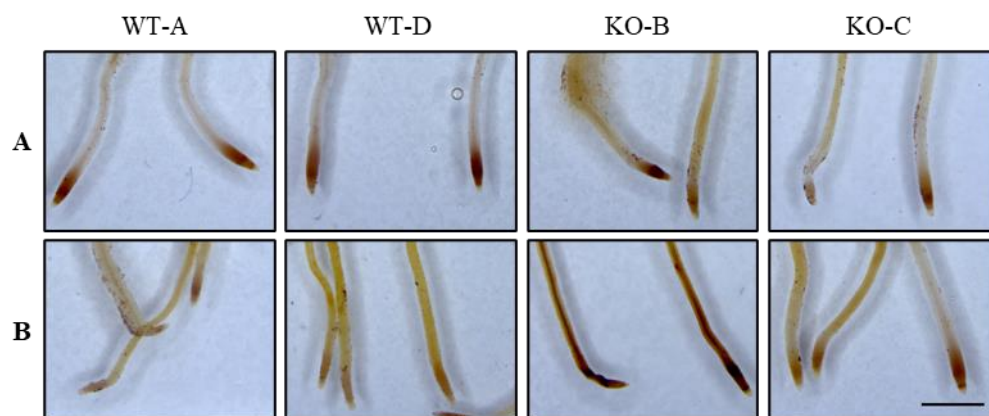


Obr. 9 Biochemická analýza aktivity chitináz v koreňoch rastlín jačmeňa divého typu (WT) a *HvMPK3* KO-B a KO-C línií po 6h ovplyvnení 200nM flg22. A –gél po farbení použitím Fluorescent brightener 28 a vyvolaní pomocou UV lampy. Detekované pruhy reprezentujú jednotlivé izozýmy chitináz; B – kvantifikácia optickej hustoty pruhov izozýmu chitinázy z Rf 0.06, 0.19, 0.32 a 0.43 z obrázku A; C – vizualizácia proteínov na géli z obrázku A pomocou CBB; K – ovplyvnenie tekutým ½ MS médiom, flg22 – ovplyvnenie tekutým ½ MS médiom s prídavkom 200nM flg22. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku. Štatisticky významné rozdiely podľa t-testu ($p \leq 0,05$) sú označené hviezdíčkou. Neorezaný celý pôvodný obrázok gélu je zdokumentovaný v prílohe č. 2.

4.2.3 Histochemická analýza H_2O_2 po krátkodobom pôsobení flg22

Pomocou farbenia DAB bola zisťovaná hladina H_2O_2 v koreňoch rastlín divého typu a *HvMPK3* KO líniách po krátkodobom ošetrení flg22 (Obr.10). DAB farbenie odhalilo akumuláciu H_2O_2 v koreňových špičkách rastlín divého typu a mutantných rastlín po kontrolnom ovplyvnení tekutým médiom bez prídavku flg22 (Obr. 10A). Ovplyvnenie flg22 spôsobilo u rastlín divého typu zníženie akumulácie H_2O_2 , pričom u *HvMPK3* KO línií bolo pozorované po ovplyvnení flg22 zvýšenie akumulácie H_2O_2 , ktoré bolo viditeľné aj vo vyšších zónach koreňa (Obr. 10B).

Tieto pozorovania ukázali rozdiel v odpovedi študovaných línií na 6h pôsobenie flg22 z hľadiska tvorby H_2O_2 .



Obr. 10 Histochemické farbenie H_2O_2 v koreňoch jačmeňa divého typu A a D (WTA/D), dvoch mutantných líníach *HvMPK3* KO (KO-B a KO-C), rastúcich 8 dní na $\frac{1}{2}$ MS médiu. A – histochemické farbenie H_2O_2 v koreňoch jačmeňa ovplyvnených kontrolným médiom; B – histochemické farbenie H_2O_2 v koreňoch jačmeňa ovplyvnených $1\mu M$ flg22; Mierka – 2 mm.

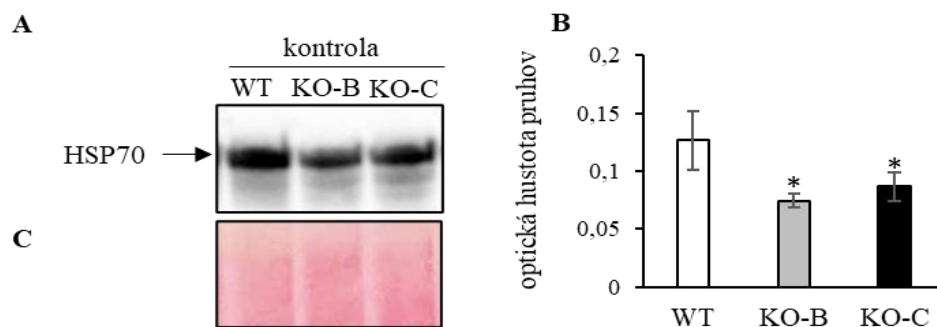
4.2.4 Analýza abundancie HSP70 v mutantných líníach *HvMPK3* KO

pomocou imunoblotovania

HSP70 je jeden z najvýznamnejších stresových proteínov u rastlín. Preto bolo našim cieľom porovnať abundanciu HSP70 proteínu v rastlinách divého typu a v mutantných líníach. Pomocou imunoblotovania s protilátkou anti-HSP70 sme detekovali v proteínovom extrakte koreňov rastlín jačmeňa špecifický pruh s Mr 70 kDa zodpovedajúcou proteínu HSP70 (Obr. 11A). Zistili sme, že obe mutantné línie sa vyznačovali nižšou abundanciou HSP70 proteínu v porovnaní s divým typom. V *HvMPK3* KOB línii abundancia klesla takmer na polovicu, u druhej mutantnej línie bol pokles menší (Obr. 11B). Pokles v abundancii bol v oboch KO líníach štatisticky významný.

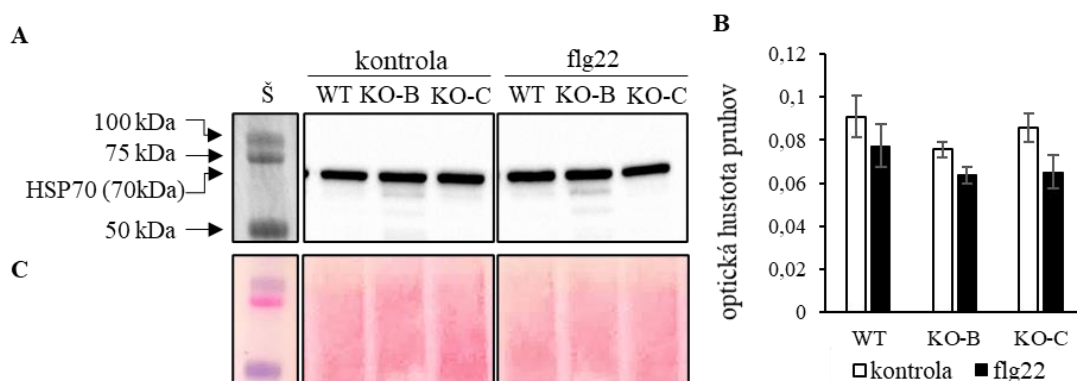
4.2.5 Vplyv flg22 na abundanciu HSP70 v mutantných líníach *HvMPK3* KO

Bolo zaujímavé analyzovať abundanciu proteínu HSP70 aj v odpovedi na krátkodobé ovplyvnenie flg22 (Obr. 12). Ako v kontrolných podmienkach tak aj po ovplyvnení flg22 však nebola pozorovaná výrazná zmena v abundancii HSP70 medzi *HvMPK3* KO líniami a divým typom (Obr. 12B).



Obr. 11 Imunoblotová analýza abundancie HSP70 v koreňoch rastlín jačmeňa divého typu (WT) a dvoch mutantných líníach *HvMPK3* KO (KO-B a KO-C). A – imunoblot pripravený pomocou anti-HSP70 protilátky; B – kvantifikácia optickej hustoty pruhov odpovedajúcich HSP70 z obrázku A; C – vizualizácia proteínov na membráne pomocou farbenia Ponceau S; Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku. Štatisticky významné rozdiely podľa t-testu ($p \leq 0,05$) sú označené hviezdikou. Neorezaný celý pôvodný obrázok imunoblotu je zdokumentovaný v prílohe č. 3.

Nami predkladané výsledky poukazujú na to, že knock-out *HvMPK3* génu znižuje abundanciu HSP70 v podmienkach bez ošetrenia. Naopak flg22 nemal výrazný vplyv na abundanciu HSP70.

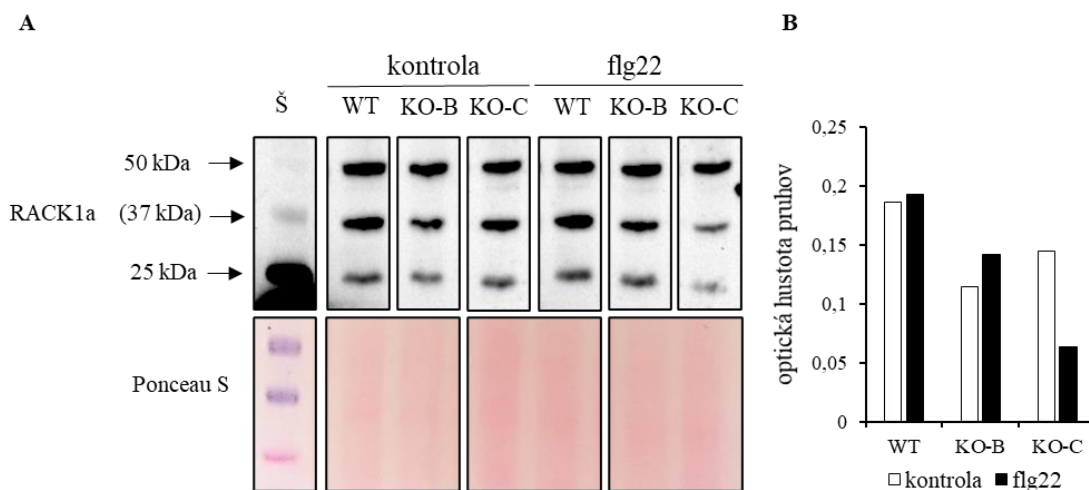


Obr. 12 Imunoblotová analýza abundancie HSP70 v koreňoch rastlín jačmeňa divého typu (WT) a dvoch mutantných líníach *HvMPK3* KO (KO-B a KO-C) po 6h ovplyvnení 200nM flg22. A – imunoblot pripravený pomocou anti-HSP70 protilátky; B – kvantifikácia optickej hustoty pruhov odpovedajúcich HSP70 z obrázku A; C – vizualizácia proteínov na membráne pomocou farbenia Ponceau S; Š – proteínový štandard, kDa – molekulová hmotnosť. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku. Štatisticky významné rozdiely podľa t-testu ($p \leq 0,05$) neboli pozorované. Neorezaný celý pôvodný obrázok imunoblotu je zdokumentovaný v prílohe č. 4.

4.2.6 Analýza abundancie RACK1a v mutantných líniách *HvMPK3 KO* pomocou imunoblotovania

Okrem proteínu HSP70 sme imunoblotovaním detekovali tiež „scaffold proteín“ RACK1a, ktorý je dôležitým proteínom pre imunitnú odpoveď rastlín. Na imunoblotovanie bola použitá protilátka anti-RACK1a, ktorá u *A. thaliana* rozpoznáva proteín RACK1a o veľkosti 37 kDa. V našom experimente sme detekovali 3 výrazné pruhy s Mr 50, 37 a 25 kDa (Obr. 13). Predpokladáme, že pruh s Mr približne 37kDa predstavuje proteín RACK1a (Obr. 13A). Pomocou programu BlastP (NCBI) sme identifikovali proteín jačmeňa s databázovým číslom BAJ90663.1, ktorý vykazoval 70% identitu s proteínom RACK1a z *Arabidopsis thaliana* (At1g18080, Príloha 6). Peptid (neznámej aminokyselínovej sekvencie) z tohoto proteínu bol použitý ako antigén na prípravu primárnej protilátky (Agrisera). Proteín BAJ90663.1 je zložený z 335 aminokyselín a má predikovanú Mr 36,2 kDa, pričom RACK1a z *Arabidopsis* má 327 aminokyselín a Mr 35,7 kDa; Príloha 6). Toto potvrdzuje identitu hore uvedeného pruhu ako RACK1a proteín jačmeňa. V kontrolných podmienkach bola abundancia RACK1a u *HvMPK3 KO-C* línie 1,6-krát nižšia a u *HvMPK3 KO-C* línie o 1,3-krát nižšia v porovnaní s divým typom. Po ovplyvnení flg22 sa abundancia RACK1a u *HvMPK3 KO-B* línie zvýšila. Takýto trend sme u *HvMPK3 KO-C* línie nepozorovali, keďže po ovplyvnení flg22 došlo ku zníženiu abundancie (Obr. 13B). V prípade divého typu však ovplyvnenie flg22 spôsobilo mierne zvýšenie abundancie RACK1a. Avšak v oboch mutantných líniach bola abundancia po flg22 nižšia než u divého typu (Obr. 13B).

Uvedený výsledok, hoci len v jednom opakovaní, hovorí o zníženej abundancii RACK1a proteínu u flg22 ovplyvnených mutantných rastlín v porovnaní s divým typom.



Obr. 13 Imunoblotová analýza abundancie RACK1a v koreňoch rastlín jačmeňa divého typu (WT) a dvoch mutantných líníach *HvMPK3* KO (KO-B a KO-C) po 6h ovplyvnení 200nM flg22. A – imunoblot pripravený pomocou anti-RACK1a protilátky; B – kvantifikácia optickej hustoty pruhov odpovedajúcich RACK1a z obrázku A; C – vizualizácia proteínov na membráne pomocou farbenia Ponceau S; Š – proteínový štandard, kDa – molekulová hmotnosť. Neorezaný celý pôvodný obrázok imunoblotu je zdokumentovaný v prílohe č. 5.

4.3 Identifikácia predpokladaných transkripčných faktorov regulujúcich expresiu chitináz pod kontrolou MAPK

Cieľom tejto bioinformatickej analýzy bolo predikovať možné transkripčné faktory, ktoré môžu regulovať transkripciu chitináz pod kontrolou MAPK. Pomocou AthaMap (<http://www.athamap.de>) boli nájdené TF, ktoré sa viažu na promótorovú sekvenciu chitinázy („*basic chitinase*“; AT3G12500; heterológ k jačmennej *CHIG*). Tiež bol vygenerovaný zoznam TF, ktoré koexprimujú s *AtMPK3* a chitinázou (*basic chitinase*) pomocou ATTED-II (<http://atted.jp>) softvéru (Príloha 4.). Následne sme vybrali TF, ktoré spĺňali obe tieto kritériá. V aminokyselinových sekvenciách vyselektovaných TF boli predikované MAPK-špecifické fosforlované miesta pomocou GPS 3.0 (Wang *et al.*, 2020) softvéru (Tab. 2). Tento softvér určí aj stupeň pravdepodobnosti pre možnosť fosforylácie MAPK („score“). V priemere bolo zistených približne 5 MAPK špecifických fosforylačných miest pre každý transkripčný faktor. Najviac fosforylovanými aminokyselinami boli serín a threonín (Tab. 2).

V aminokyselinových sekvenciách vybraných TF sa pomocou ELM softvéru (<http://www.elm.eu.org>) zisťovala prítomnosť MAPK-špecifickej dokovacej domény a sekvencie (Tab. 3). Podarilo sa nám nájsť 5 rôznych dokovacích domén a to: MOD_ProDKin_1, DOC_MAPK_MEF2A6, DOC_MAPKgen1, DOC_MAPKHePTP8, DOC_MAPK_FxFP2. Z týchto piatich domén softvér vyhodnotil doménu

MOD_ProDKin_1 za najviac pravdepodobnú doménu jednotlivých TF. Toto tvrdenie podporuje aj fakt, že jedine sekvencie pochádzajúce z tejto domény sa zhodovali so sekvenciou fosforylačného peptidu z GPS 3.0 analýzy (Tab. 2). Pomocou softvéru PhosPhAt 4.0 sa nám podarilo nájsť aj experimentálny dôkaz fosforylácie WRKY33 (Tab. 4; Príloha 5.) (Roitinger *et al.*, 2015).

Tab. 2: Predikcia najpravdepodobnejších MAPK-špecifických fosforylačných miest v aminokyselinovej sekvencii transkripčných faktorov pochádzajúcich z prieniku AthaMap a ATTED-II softvéru pomocou GPS 3.0 softvéru

TF		GPS 3.0 (CMGC/MAPK)				
AGI	Meno	Pozícia	Kód	Peptid	Skóre	Medzné hodnoty
AT1G18570	MYB51	244	T	CHGTVATTPVSSNFD	39,675	14,896
		335	T	ENDVVDVTPVYERQD	33,802	14,896
		19	T	GLKKGAWTPEEDQKL	27,954	14,896
		4	T	****MVRTPCCKAEL	26,242	14,896
		203	S	GSGGPLASTSHTTNT	17,197	14,896
AT2G38470	WRKY33	85	S	SSANVLASPTTGALI	42,659	14,896
		59	S	SISPSLVSPSTCFSP	38,635	14,896
		65	S	VSPSTCFSPSLFLDS	36,591	14,896
		72	S	SPSLFLDSPAFVSSS	35,141	14,896
		54	S	APSSISISPSLVSPS	32,9	14,896
AT2G46400	WRKY46	250	S	GNFVEDLSPATSGSA	40,948	14,896
		168	S	HTCNNITSPKTTTNF	39,455	14,896
AT3G23240	ERF1	22	S	PEYSIGSSPDSFSSS	35,469	14,896
		8	S	MDPFLIQSPFSGFSP	33,472	14,896
		14	S	QSPFSGFSPEYSIGS	32,212	14,896
		159	S	YTYEDGCSPVVALKR	28,429	14,896
AT4G17490	ERF6	22	S	KYLLEDELSPLPTTAT	52,943	14,896
		269	S	MPLLSPLSPHPPFGY	51,228	14,896
		266	S	FLSMPLLSPLSPHPP	43,103	14,896
		3	T	*****MATPNEVSAL	35,092	14,896
		61	T	PEIIDLVTPKPEISD	33,599	14,896
AT5G04340	ZAT6	8	S	MALETLTSPRLSSPM	44,258	14,896
		77	S	DLPSSSSSPPLLPL	42,094	14,896
		223	S	NGDEEVMSMPAKKL	32,36	14,896
		13	S	LTSPRLSSPMPTLFQ	32,35	14,896
		86	T	PLLPLPTPIYKCSV	27,564	14,896

Tab. 3: Predikcia MAPK špecifických dokovacích sekvencií transkripčných faktorov pochádzajúcich z prieniku AthaMap a ATTED-II softvéru pomocou ELM softvéru

TF	ELM				
Meno	ELM Meno	Pozícia	Zhodné sekvencie	Pravdepodobnosť	
MYB51	MOD_ProDKin_1	1-7	MVRTPCC	1,54E-02	
		241-247 332-338	VATTPVS VDVTPVY		
WRKY33	MOD_ProDKin_1	51-57 56-62 62-68 69-75 82-88	ISISPSL SLVSPST TCFSPSL FLDSPAF VLASPTT	1,54E-02	
		DOC_MAPK_gen_1	343-352	KTVREPRIVV	4,32E-03
WRKY46	MOD_ProDKin_1	247-253	EDLSPAT	1,54E-02	
	DOC_MAPK_MEF2A_6	85-94 203-211	KNTEKVKVFV KSEVMISL	2,58E-03	
	DOC_MAPK_gen_1	200-209	KPTKSEEVMI	4,32E-03	
	DOC_MAPK_HePTP_8	82-94	VSEKNTEKVKVFV	1,07E-04	
ERF1	MOD_ProDKin_1	5-11 11-17 19-25 156-162	LIQSPFS SGFSPEY IGSSPDS DGCSPVV	1,54E-02	
		DOC_MAPK_MEF2A_6	102-109	RNGIRVWL	2,58E-03
		DOC_MAPK_gen_1	187-197	RSVKLDNVVVF	4,32E-03
ERF6	MOD_ProDKin_1	19-25 58-64 263-269 266-272	DELSPLP DLVTPKP PLLSPLS SPLSPHP	1,54E-02	
		DOC_MAPK_gen_1	98-104 157-164 185-193	RKPPLKI RRGTRVWL RGSKAILNF	4,32E-03
		DOC_MAPK_FxFP_2	274-277	FGYP	5,63E-05
ZAT6	MOD_ProDKin_1	5-11 10-16 74-80 220-226	TLTSPRL RLSSPMP SSSSPPL EVMSPMP	1,54E-02	
		DOC_MAPK_FxFP_2	232-235	FDFP	5,63E-05

Tab. 4: Experimentálne (iTRAQ analýza) dokázané fosforylácie zistených transkripčných faktorov pomocou PhosPhAt 4.0 softvéru

TF	PhosPhAt 4.0		
Meno	Peptid	Skóre	Zdroj
WRKY33	TSTSSLEDLEIPK	31.14	Roitinger <i>et al.</i> , 2015

5 DISKUSIA

Jedným z prvých cieľov tejto diplomovej práce bola fenotypová analýza koreňov *HvMPK3* KO rastlín jačmeňa. MPK3 a MPK6 sú zapojené do mnohých biologických procesov ako je vrodená imunita rastlín (Asai *et al.*, 2002), vývoj prieduchov (Wang *et al.*, 2007), tvorba laterálnych koreňov (Zhu *et al.*, 2019) a obrana rastlín (Yang *et al.*, 2020). Bolo publikované, že dvojitý mutant *mpk3mpk6* je embryo-letálny (Wang *et al.*, 2007). Aby sa prekonala letalita embryí, boli pripravené dvojité mutanty *mpk3mpk6*, ktoré exprimovali buď MPK3 alebo MPK6 pod ich natívnymi promótormi. Obe kinázy boli bodovo mutované tak, aby bola zvýšená ich citlivosť na kinázového inhibítora NAPP1 a následný pokles ich expície (Su *et al.*, 2017). Dĺžka koreňov oboch takto pripravených transgénnych dvojitých mutantov bola o 2/3 kratšia ako dĺžka u rastlín divého typu (Shao *et al.*, 2020), čo naznačuje, že MPK3 a MPK6 hrajú úlohu v raste a vývoji koreňov. V našich experimentoch sme pozorovali kratšie korene v *HvMPK3* KO mutantoch voči koreňom rastlín divého typu. Dĺžka koreňov však bola u *HvMPK3* mutantov len mierne nižšia ako u divého typu. Štatisticky významný rozdiel nebol pozorovaný kvôli značnej variabilite v dĺžkach a malému počtu analyzovaných koreňov u všetkých línii. Počet koreňov sa v našich experimentoch u jednotlivých študovaných línii nelíšil oproti divému typu, čo môže naznačovať, že knock-out v *MPK3* géne nemá vplyv na tvorbu koreňov a ani na mechanizmy v ich predlžovaní.

Okrem úlohy vo vývoji, raste a signalizácii sú ROS aj esenciálnymi molekulami v interakcii medzi rastlinou a patogénom (Camejo *et al.*, 2016) a celkovo hrajú dôležitú rolu v rastlinnej imunite (Qi *et al.*, 2017). Zistili sme, že u akumulácia ROS negatívne koreluje s indukciou imunitnej odpovede, ktorá sa prejavila napr. v aktivácii chitináz, a je znížená po vystavení rastlín divého typu 6h-trvajúcemu ovplyvneniu flg22. Naproti tomu v *HvMPK3* KO líniiach nedochádza k zníženiu akumulácie ROS. Flg22 mal zjavne pozitívny vplyv na akumuláciu ROS u KO línii. U divého typu zjavne ovplyvnenie flg22 naštartovalo obrannú odpoveď, vrátane kontroly tvorby ROS, kdežto u *HvMPK3* KO línii k aktivácii zrejme nedošlo. Týmito výsledkami by sa dalo predpokladať, že mutantné línie majú oslabené reakcie antioxidantného systému vyvolané flg22 oproti rastlinám divého typu, keďže sa akumulácia H₂O₂ výrazne zvýšila u týchto línii. Túto hypotézu je ale nutné experimentálne validovať.

Naším nasledujúcim zámerom bolo študovať zmeny vo fenotype koreňových vláskov po ovplyvnení flg22. Rast koreňových vláskov je zložitý proces podmienený

mnohými mechanizmami (Shibata a Sugimoto, 2019). Kým u rastlín divého typu flg22 spôsobil predĺženie a nadmernú tvorbu koreňových vláskov, u *HvMPK3* KO líniách bol tento efekt miernejší. V štúdiu od Poncini *et al.* (2017) bola v koreňoch rastlín *Arabidopsis* dokázaná úloha viacerých bakteriálnych elicítov ako inhibítorov rastu. Flg22 so zvyšujúcimi sa koncentráciami až do 1 μ M, ktorú sme použili aj v našich experimentoch, spôsobil skrátenie a mal negatívny efekt na rast koreňov. Okrem inhibície rastu koreňa, PAMP indukujú rast a elongáciu koreňových vláskov v závislosti na PAMP a rastlinnom druhu. PAMP indukovaný rast koreňových vláskov je závislý na expresii receptorových kináz (Okada *et al.*, 2020). Flg22 u *Arabidopsis* rast koreňových vláskov neovplyvňuje (Pečenková *et al.*, 2017; Okada *et al.*, 2020). Naše výsledky ukazujú, že odpovede jačmeňa na flg22 sa líšia od *Arabidopsis* v tvorbe koreňových vláskov. Výsledky tiež poukazujú na fakt, že KO mutácia v *HvMPK3* géne potláča vnímanie flg22, keďže sa fenotyp koreňových vláskov *HvMPK3* KO línií líši od fenotypu rastlín divého typu. Vnímanie flg22 ale nie je úplne potlačené, keďže sa aj u *HvMPK3* KO línií predĺžili koreňové vlásky po raste na médiu s flg22 oproti tým rastúcim na kontrolných médiách. Táto skutočnosť môže byť spôsobená prítomnosťou jeho homológu *HvMPK6*, s ktorým pôsobia redundantne v niekoľkých biologických procesoch (Wang *et al.*, 2007).

Jedným z možných mechanizmov, ktorými MAPK, a teda aj *HvMPK3*, ovplyvňujú rast môže byť aj úloha cytoskeletu, teda správne fungovanie mikrotubúl a aktínového cytoskeletu (Komis *et al.*, 2011). Zostaveniu a dynamike mikrotubúl pomáha koordinované pôsobenie proteínov asociovaných s mikrotubulami (v angl. microtubule associated proteins – MAPs) a ďalších regulačných proteínov (Hamada, 2014). MAP65-1 je fosforylovaný pomocou MPK6 a MPK4 (Smertenko *et al.*, 2008; Beck *et al.*, 2010). V mutantných líniách *mpk4* bol MAP65-1 nedostatočne fosforylovaný (Beck *et al.*, 2010). Správna organizácia mikrotubulov podmieňuje predovšetkým polaritu rastu koreňových vláskov, pričom ich tvorba nie je ovplyvnená (Vaškebová *et al.*, 2018). Podobne vykazovali koreňové vlásky v *mpk4* mutante *Arabidopsis* rozkonárovanie (Beck *et al.*, 2010). To naznačuje, že *HvMPK3* pravdepodobne neovplyvňuje rast koreňových vláskov cez reguláciu MAP65-1, resp. organizáciu mikrotubulov.

Šamaj *et al.* (2002) analyzovali funkciu stresom aktivovanej MAP kinázy lucerny (angl. stress induced MAPK – SIMK), ktorá je heterológna ku MPK6 u *Arabidopsis*,

v koreňových vláskoch. Pomocou mikroskopických techník zistili, že SIMK sa v aktívnej forme nachádza spoločne s F-aktínovou sieťou v špičkách koreňových vláskov a koreluje s ich tvorbou. Neporušený aktínový cytoskelet je nevyhnutný pre rast špičky koreňových vláskov. Taktiež dokázali, že nadmerná expresia *SIMK* stimuluje rast a tvorbu koreňových vláskov a naopak chemická inhibícia aktivity MAPKK spôsobila zmeny v subcelulárnej distribúcii aktínu a SIMK, čo malo za následok inhibíciu rastu špičiek a aberantnú morfológiu koreňových vláskov. Tieto objavy naznačujú, že intaktný aktínový cytoskelet je nevyhnutný pre správnu lokalizáciu SIMK v špičkách koreňových vláskov a ich rast. Tým môžeme povedať, že aktivita MAPK je nevyhnutná pre rast koreňových vláskov a že inhibícia aktivity MAPK spôsobuje remodeláciu aktínového cytoskeletu vo vznikajúcich koreňových vláskoch. Reorganizáciu aktínu ovplyvňujú proteíny viažuce aktín (napr. profilín, vilín, aktínový depolymerizačný faktor, proteíny spojené s aktínom, formín, dehydrín a anexín) (Li *et al.*, 2015; Takáč *et al.*, 2016). Inhibícia aktivity MAPK ako *HvMPK3* môže spôsobovať problémy vo fosforylácii týchto proteínov a regulovať tak ich správnu funkciu u jačmeňa.

Naše výsledky ukazujú, že *HvMPK3* má schopnosť ovplyvňovať aj hladinu H_2O_2 u jačmeňa. Je známe, že genetická modifikácia MAPKs často vedie k zmenám v koncentrácii H_2O_2 , ako bolo napr. dokázané pre MAPKKK ANP2 a ANP3 (Takáč *et al.* 2014). MAPK ovplyvňujú hladinu ROS cez reguláciu expresie NADPH oxidáz (Adachi *et al.*, 2015) alebo apoplastických peroxidáz (Han *et al.*, 2015). Je známe že H_2O_2 ovplyvňuje predlžovanie koreňa (Mhamdi a Breusegem, 2018) ale aj tvorbu koreňových vláskov (Carol *et al.*, 2005) . Toto sa deje z dvoch možných príčin a to je regulácia predlžovania buniek pomocou ROS cez rozvolňovanie polysacharidových reťazcov (Schopfer *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2018) alebo regulácia bunkového delenia (Qi *et al.*, 2017). ROS tiež aktivujú vápnikové kanály a následná akumulácia vápnika je nevyhnutná pre tvorbu a polárny rast koreňových vláskov (Carol a Dolan, 2006). Tieto poznatky naznačujú, že redukcia dĺžky koreňových vláskov u *HvMPK3* KO línií mohla súvisieť s poruchami kontroly tvorby ROS.

Ďalším našim cieľom bola analýza aktivity chitináz v KO *HvMPK3* líniách. Chitinázy sú enzýmy hydrolyzujúce chitín ale aj iné molekuly (napr. chitosan, peptidoglykány; Malik, 2019). U rastlín je ich expresia indukovaná v obranných reakciách pri biotickom strese (Ray *et al.*, 2016), ale aj v reakcii na abiotický stres ako napr. stres z chladu (Zieliński *et al.*, 2021), stres z ťažkých kovov (Gálusová *et al.*,

2015) či osmotický stres (Cao *et al.*, 2019). Indukovanie expresie chitináz je možné aj elicitormi, a to samotným chitínom (Chen *et al.*, 2018) alebo flg22 (Meng *et al.*, 2019), ktorý sme použili aj my v našich experimentoch.

Zistili sme, že aktivita chitináz bola významne nižšia u *HvMPK3* KO mutantov v porovnaní s divým typom u všetkých izozýmov. Po 6h ovplyvnení flg22 sa senzitivita jednotlivých izozýmov chitináz líšila. Bolo pozorovaných päť izozýmov, z ktorých sa aktivita dvoch vôbec nemenila. Môžeme usudzovať, že konkrétne tieto dva izozýmy na flg22 nereagujú. U divého typu došlo k výraznému zvýšeniu aktivity u dvoch izozýmov, na rozdiel od opačného trendu pozorovaného u *HvMPK3* KO línií po 6h ovplyvnení flg22. Podľa týchto výsledkov sa dá predpokladať, že KO mutácia v *HvMPK3* negatívne reguluje úroveň aktivity chitináz ako v kontrolných podmienkach tak aj po 6h ovplyvnení flg22. Chitinázy sa radia medzi významné PR proteíny, ktoré môžu predstavovať markery obranných reakcií rastlín na biotický stres (Marzec-Schmidt *et al.*, 2020). Preto je možné na základe našich výsledkov povedať, že KO *HvMPK3* línie majú oslabenú rezpozivitu na flg22 v porovnaní s rastlinami divého typu.

Expresia chitináz je regulovaná prostredníctvom TF (Gao a Zhao, 2017). V našej bioinformatickej analýze sme identifikovali potencionálne transkripčné faktory ako MYB, WRKY, ERF a ZAT, ktoré by mohli regulovať expresiu chitináz pod kontrolou MPK3. Po vnímaní flg22 sa v *Arabidopsis* aktivujú dve MAPK kaskády. Sú to MKKK3/5-MKK4/5-MPK3/6 a MEKK1-MKK1/2-MPK4 (Asai *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2012). Prvá z nich zahŕňa MPK3/MPK6, ktoré ďalej aktivujú transkripčné faktory ako napr. WRKY33 a ERF6, regulujúce expresiu obranných génov a akumuláciu antimikrobiálnej zlúčeniny kamalexínu po napadnutí *Botrytis cinerea* u *Arabidopsis* (Meng *et al.*, 2013). MPK3/MPK6 po napadnutí *B. cinerea* taktiež fosforylujú a stabilizujú biosyntetické enzýmy etylénu ACS2 a ACS6, a tým riadia jeho produkciu (Han *et al.*, 2010). Transkripčný faktor ryže OsWRKY114 priamo zvyšuje promótorové aktivity *OsPR1a* a *chitinázy* po napadnutí *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Son *et al.*, 2020). Taktiež MYB transkripčné faktory, konkrétne BjMYB1, indukuje transkripčnú aktiváciu chitinázy *BjCH11* po napadnutí *B. cinerea* u *Brassica juncea* (Gao a Zhao, 2017). Dá sa teda predpokladať, že aj homológy týchto TF u jačmeňa majú podobné vlastnosti, na to by však bolo potrebné tieto vlastnosti experimentálne dokázať.

Naše dáta ukazujú, že hladina HSP70 proteínu je v *HvMPK3* KO líniách nižšia než u divého typu v neovplyvnených rastlinách. KO mutácia v *HvMPK3* spôsobila zníženie abundancie HSP70 v týchto vzorkách. Rodina HSP je zodpovedná za udržiavanie homeostázy proteínov pri strese rastlín z vysokých teplôt a uľahčovanie ich renaturácie pri poškodení tepelným stresom (Wang *et al.*, 2020). Faktory tepelného šoku (angl. heat shock factors – HSF) zohrávajú dôležitú úlohu pri koordinácii reakcií rastlín na teplo a množstvo ďalších nepriaznivých podmienok (Andrási *et al.*, 2019). Pri tepelnom strese sa HSF, ktoré inak zostávajú viazané na HSP, uvoľňujú a HSP sa viažu na nesprávne poskladané proteíny. Po uvoľnení sa HSF viažu na konzervované motívy v promótoroch podradených génov a aktivujú ich (Haak *et al.*, 2017). Evrard *et al.* (2013) popísali aktiváciu AtMPK6 po pôsobení tepelného stresu s následnou cieľovou fosforyláciou HsfA2. Pérez-Salamó *et al.* (2014) zistili, že HSFA4A je substrátom AtMPK3/MPK6. Andrási *et al.* (2019) popísali fosforyláciu HSFA4A prostredníctvom AtMPK4. Naše výsledky u *HvMPK3* KO línií môžu teda poukazovať na potencionálny vplyv nedostatočnej fosforylácie HSF pomocou *HvMPK3* a tak teda dôvod zníženej abundancie HSP70.

6 ZÁVER

V predkladanej diplomovej práci sme sa venovali štúdiu koreňov *HvMPK3* KO rastlín. Študovali sme fenotyp koreňov a pozorovali zmeny vznikajúce vo fenotype koreňových vláskov po ovplyvnení flg22. Histochemickým farbením sme zisťovali množstvo H₂O₂ vytvoreného po vystavení koreňov rastlín ovplyvneniu flg22. Natívnou elektroforézou sme sledovali aktivitu chitináz v koreňových extraktoch *HvMPK3* KO rastlín. Ďalej sme sa zaoberali imunoblotovacou analýzou HSP70 a RACK1A proteínov v koreňových extraktoch *HvMPK3* KO rastlín. V poslednej časti práce sme sa venovali bioinformatickej analýze, kde sme zisťovali potencionálne transkripčné faktory regulujúce expresiu chitináz pod kontrolou MPK3.

Zistili sme, že *HvMPK3* má úlohu v regulácii dĺžky koreňov jačmeňa a tiež ovplyvňuje predlžovanie koreňových vláskov. Koreňové vlásky jačmeňa sú na rozdiel od *Arabidopsis* rezpozívne na flg22 a dochádza k ich predlžovaniu. Knock-out mutácia v *HvMPK3* géne potláča predlžovanie koreňových vláskov jačmeňa. Tento gén preto prepája obranné mechanizmy s vývinovými procesmi, ako je predovšetkým predlžovanie koreňových vláskov.

Podarilo sa nám ukázať, že *HvMPK3* KO rastliny majú zníženú aktivitu chitináz v natívnych podmienkach, ale aj po šesťhodinovom ovplyvnení flg22 v porovnaní s rastlinami divého typu. Pomocou bioinformatických analýz sme určili transkripčné faktory, ktoré by mali byť potencionálnymi regulátormi expresie chitináz pod kontrolou MPK3. Zistili sme, že *HvMPK3* ovplyvňuje aj abundanciu stresového proteínu HSP70 v podmienkach bez ošetrovania, avšak flg22 nemal na jeho abundanciu výrazný vplyv.

Dokázali sme na rôznych úrovniach, že knock-out mutácia v *HvMPK3* géne spôsobuje oslabenú odpoveď na ovplyvnenie flg22. Zistené výsledky významne prispeli k poznaniu MAPK u jačmeňa.

7 LITERATÚRA

- Adachi H., Nakano T., Miyagawa N., Ishihama N., Yoshioka M., Katou Y., Yoshioka H. *et al.* (2015): WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell* **27**, 2645-2663.
- Ahuja I., Kissen R., Bones A. M. (2012): Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* **17**, 73–90.
- Ali S., Ganai B. A., Kamili A. N., Bhat A. A., Mir Z. A., Bhat J. A., Grover A. *et al.* (2018): Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research* **212**, 29-37.
- Ali S., Chandrashekar N., Rawat S., Nayanakantha N. M. C., Mir Z. A., Manoharan A., Sultana M., Grover A. (2017a): Isolation and molecular characterization of pathogenesis related PR2 gene and its promoter from *Brassica juncea*. *Biol. Plant.* **61**, 763-773.
- Andrási N., Rigó G., Zsigmond L., Pérez-Salamó I., Papdi C., Klement E. *et al.* (2019): The mitogen-activated protein kinase 4-phosphorylated heat shock factor A4A regulates responses to combined salt and heat stresses. *J Exp Bot* **70**, 4903–4917.
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373–99.
- Asai S., Ohta K., Yoshioka H. (2008): MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **20**, 1390–406.
- Asai T., *et al.* (2002): MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977–983.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L. *et al.* (2002): MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977–83.
- Balint-Kurti P. (2019): The plant hypersensitive response: Concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology* **20**, 1163–1178.
- Bar M., Sharfman M., Ron M. and Aveni A. (2010): BAK1 is required for the attenuation of ethylene-inducing xylanase (Eix)-induced defense responses by the decoy receptor LeEix1. *Plant J.* **63**, 791–800.
- Bartels S., Anderson J. C., Gonzalez Besteiro M. A., Carreri A., Hirt H. *et al.* (2009): MAP kinase phosphatase1 and protein tyrosine phosphatase1 are repressors of salicylic acid synthesis and SNC1-mediated responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 2884–97.
- 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. *Plant Cell* **22**, 755–771.
- Berendsen R. L., Pieterse C. M., Bakker P. A. (2012): The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science* **17**, 478-486.
- Bethke G., Pecher P., Eschen-Lippold L., Tsuda K., Katagiri F. *et al.* (2012): Activation of the *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase MPK11 by the flagellin-derived elicitor peptide, flg22. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**, 471–80.
- Bethke G., Unthan T., Uhrig J. F., Poschl Y., Gust A. A. *et al.* (2009): Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 8067–72.
- Bhattarai K. K., Li Q., Liu Y., Dinesh-Kumar S. P., Kaloshian I. (2007): The Mi-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. *Plant Physiology* **144**, 312-323.
- Bi G., Zhou Z., Wang W., Li L., Rao S., Wu Y., Zhou J. M. *et al.* (2018): Receptor-like cytoplasmic kinases directly link diverse pattern recognition receptors to the activation of mitogen-activated protein kinase cascades in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **30**, 1543-1561.
- Bigeard J., Colcombet J., Hirt H. (2015): Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular plant* **8**, 521-539.
- Bindschedler L. V., Dewdney J., Blee K. A., Stone J.M., Asai T. *et al.* (2006): Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J* **47**, 851-863.

- Boller T, Felix G. (2009): A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 379–406.
- Boller T., Felix G. (2009): A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 379–406.
- Bolt S., Zuther E., Zintl S., Hinch D. K., Schmölling T. (2017): ERF105 is a transcription factor gene of *Arabidopsis thaliana* required for freezing tolerance and cold acclimation. *Plant, cell & environment* **40**, 108-120.
- Boneca I. G., Dussurget O., Cabanes D. *et al.* (2007): A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 997–1002.
- Boutrot F., Zipfel C. (2017): Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **55**, 257–286.
- Bradford M. M. (1976): Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Breiman A. (2014): Plant Hsp90 and its co-chaperones. *Curr Protein Pept Sci.* **15**, 232–244.
- Cai R., Lewis J., Yan S. *et al.* (2011): The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity. *PLoS Pathog.* **7**, e1002130.
- Camejo D., Guzman-Cedeno A., Moreno A. (2016): Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiol. Biochem.* **103**, 10–23.
- Cao S., Wang Y., Li Z., Shi, W., Gao F., Zhou Y., Zhang G., Feng J. (2019): Genome-wide identification and expression analyses of the chitinases under cold and osmotic stress in *Ammopiptanthus nanus*. *Genes* **10**, 472.
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T., Hirt H. (2000): Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J Biol Chem* **275**, 36734–36740.
- Carol R. J., Dolan L. (2006): The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *Journal of experimental botany* **57**, 1829-1834.
- Carol R. J., Takeda S., Linstead P., Durrant M. C., Kakesova H., Derbyshire P., Dolan, L. *et al.* (2005): A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* **438**, 1013-1016.
- Castel B., Ngou P. M., Cevik V., Redkar A., Kim D. S., Yang Y. Ding P., and Jones, J. D. G. (2019): Diverse NLR immune receptors activate defence via the RPW8-NLR NRG1. *New Phytol.* **222**, 966-980.
- Catinot J., Huang J. B., Huang P. Y., Tseng M. Y., Chen Y. L., Gu S. Y., Zimmerli L. (2015): ETHYLENE RESPONSE FACTOR 96 positively regulates *Arabidopsis* resistance to necrotrophic pathogens by direct binding to GCC elements of jasmonate- and ethylene-responsive defence genes. *Plant, cell & environment* **38**, 2721-2734.
- Cohen-Kupiec R., Chet I. (1998): The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 270–277.
- Collinge D. B., Kragh K. M., Mikkelsen J. D., Nielsen K. K., Rasmussen U., and Vad K. (1993): Plant chitinases. *Plant J.* **3**, 31–40.
- Cooke D. E. *et al.* (2012): Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog.* **8**, e1002940.
- Couto D., Zipfel C. (2016): Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 537–552.
- Cui H., Tsuda K., and Parker J. E. (2015): Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 487-511.
- Cui L., Yang G., Yan J., Pan Y., Nie X. (2019): Genome-wide identification, expression profiles and regulatory network of MAPK cascade gene family in barley. *BMC genomics* **20**, 1-20.
- Dambuza I. M., Brown G. D. (2015): C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol.* **32**, 21–7.

- Dangl J. L. *et al.* (2013): Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* **341**, 746-751.
- Derevnina L., Dagdas Y. F., De la Concepcion J. C., Bialas A., Kellner R., Petre, B. *et al.* (2016): Nine things to know about elicitors. *New Phytologist* **212**, 888-895.
- Desikan R., Hancock J.T., Ichimura K., Shinozaki K., Neill S.J. (2001): Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol.* **126**, 1579-87.
- Dixon R.A. (2001): Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843-47.
- Djamei A., Pitzschke A., Nakagami H., Rajh I., Hirt H. (2007): Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318**, 453-56.
- Du J., Verzaux E., Chaparro-Garcia A. *et al.* (2015): Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nat. Plants* **1**, 15034.
- Dworkin J. (2014): The medium is the message: interspecies and interkingdom signaling by peptidoglycan and related bacterial glycans. *Annu. Rev. Microbiol.* **68**, 137-154.
- Evrard A., Kumar M., Lecourieux D., Lucks J., Koskull-Doring P. V., Hirt H. (2013): Regulation of the heat stress response in *Arabidopsis* by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ* **1**, e59.
- Feng K., Liu F., Zou J., Xing G., Deng P., Song W., Tong W., Nie X. (2016): Genome-wide identification, evolution and co-expression network analysis of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in *Brachypodium distachyon*. *Front Plant Sci.* **7**, 1400.
- Fesel P. H., Zuccaro A. (2016): β -glucan: crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genet. Biol.* **90**, 53-60.
- Fritz-Laylin L. K., Krishnamurthy N., Tör M., Sjölander K. V., Jones J. D. (2005): Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. *Plant physiology* **138**, 611-623.
- Fu Z. Q., Dong X. (2013): Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 839-863.
- Furukawa T., Inagaki H., Takai R., Hirai H. and Che F.S. (2014): Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **27**, 113-124.
- Gálusová T., Rybanský L., Mészáros P. *et al.* (2015): Variable responses of soybean chitinases to arsenic and cadmium stress at the whole plant level. *Plant Growth Regul.* **76**, 147-155.
- Gao Y., Zhao K. (2017): Molecular mechanism of *BjCH11*-mediated plant defense against *Botrytis cinerea* infection. *Plant Signal. Behav.* **12**, e1271859.
- Geng X., Jin L., Shimada M., Kim M.G., Mackey D. (2014): The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*. *Planta* **240**, 1149-1165.
- Gómez-Gómez L., Boller T. (2000): FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell.* **5**, 1003-1011.
- Goormachtig S., Lievens S., Van de Velde W., Montagu M., and Holsters M. (1998): Srchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. *Plant Cell* **10**, 905-915.
- Gregorova Z., Kovacik J., Klejdus B. Maglovski M., Kuna R., Hauptvogel P., Matusikova I. (2015): Drought-induced responses of physiology, metabolites, and pr proteins in *Triticum aestivum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 8125-8133.
- Guo J., Chen J. G. (2008): RACK1 genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **8**, 1-11.
- Gust A. A., Biswas R., Lenz H. D., Rauhut T., Ranf S. *et al.* (2007): Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **282**, 32338-48.
- Haak D. C., Fukao T., Grene R., Hua Z., Ivanov R., Perrella G., Li S. (2017): Multilevel regulation of abiotic stress responses in plants. *Front Plant Sci* **8**, 1564.
- Hafren A., Hofius D., Rönholm, G., Sonnewald U., Mäkinen K. (2010): HSP70 and its cochaperone CPIP promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions. *The Plant Cell* **22**, 523-535.
- Hamada T. (2014): Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **312**, 1-52.

- Hamel L. P., Nicole M. C., Sritubtim S., Morency M. J., Ellis M. *et al.* (2006): Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends Plant Sci.* **11**, 192–98.
- Han L., Li G. J., Yang K. Y., Mao G., Wang R. *et al.* (2010): Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate *Botrytis cinerea*-induced ethylene production in *Arabidopsis*. *Plant J.* **64**, 114–27.
- Han S., Fang L., Ren X., Wang W., Jiang, J. (2015): MPK6 controls H₂O₂-induced root elongation by mediating Ca²⁺ influx across the plasma membrane of root cells in *Arabidopsis* seedlings. *New Phytologist* **205**, 695-706.
- Han, X., He, X., Qiu, W., Lu, Z., Zhang, Y., Chen, S., ... & Zhuo, R. (2017): Pathogenesis-related protein PR10 from *Salix matsudana* Koidz exhibits resistance to salt stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* **141**, 74-82.
- Hartog M., Verhoef N., and Munnik T. (2003): Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension-cultured Alfalfa cells. *Plant Physiol* **132**, 311–317.
- Hayafune M., Berisio R., Marchetti R. *et al.* (2014): Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E404–E413
- Heese A., Hann D. R., Gimenez-Ibanez S., Jones A. M., He K. *et al.* (2007): The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 12217–22.
- Hiruma K., Fukunaga, S., Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Watanabe, S. *et al.* (2013): Glutathione and tryptophan metabolism are required for *Arabidopsis* immunity during the hypersensitive response to hemibiotrophs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 9589-9594.
- Hou M., Xu W., Bai H., Liu Y., Li L., Liu L., Liu B., Liu G. (2012): Characteristic expression of rice pathogenesis-related proteins in rice leaves during interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Plant Cell Rep* **31**, 895–904.
- Hrbáčková M., Luptovciak I., Hlaváčková K., Dvořák P., Tichá M., Šamajová O., Šamaj J. *et al.*, (2020): Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal*.
- Hückelhoven R. (2007): Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**, 101-127.
- Chamnongpol S. *et al.* (1998): Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5818–5823.
- Chang Y. H., Yan H. Z., and Liou R. F. (2015): A novel elicitor protein from *Phytophthora parasitica* induces plant basal immunity and systemic acquired resistance. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 123–136.
- Chen J. G., Ullah H., Temple B., Liang J., Guo J., Alonso J. M. *et al.* (2006). RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* **57**, 2697-2708.
- Chen J., Piao Y., Liu Y., Li X., Piao Z. (2018): Genome-wide identification and expression analysis of chitinase gene family in *Brassica rapa* reveals its role in clubroot resistance. *Plant Sci.* **270**, 257-267.
- Chen Z., Shen Z., Zhao D., Xu L., Zhang L., Zou Q. (2021): Genome-Wide Analysis of LysM-Containing Gene Family in Wheat: Structural and Phylogenetic Analysis during Development and Defense. *Genes* **12**, 31.
- Cheng J. H., Bredow M., Monaghan J., diCenzo G. C. (2021): Proteobacteria Contain Diverse flg22 Epitopes That Elicit Varying Immune Responses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* MPMI-11-20-0314.
- Cheng Z., Li J. F., Niu Y., Zhang X. C., Woody O. Z., Xiong Y., Djonović S. *et al.* (2015): Pathogen-secreted proteases activate a novel plant immune pathway. *Nature* **521**, 213-6.
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. (2006): Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, 803–14.

- Ichimura K., Casais C., Peck S. C., Shinozaki K., Shirasu K. (2006): MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 36969–76.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y. et al. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**, 301–8.
- Ishihama N., Yamada R., Yoshioka M., Katou S., Yoshioka H. (2011): Phosphorylation of the *Nicotiana benthamiana* WRKY8 transcription factor by MAPK functions in the defense response. *Plant Cell* **23**, 1153–70.
- Iwasaki Y., Komano M., Ishikawa A., Sasaki T., Asahi T. (1995): Molecular cloning and characterization of cDNA for a rice protein that contains seven repetitive segments of the Trp-Asp forty-amino-acid repeat (WD-40 repeat). *Plant and cell physiology* **36**, 505-510.
- Jacob F., Vernaldi S., Maekawa T. (2013): Evolution and conservation of plant NLR functions. *Front Immunol* **4**, 297.
- Jelenska J., Van Hal J. A., Greenberg J. T. (2010): *Pseudomonas syringae* hijacks plant stress chaperone machinery for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 13177-13182.
- Jitnom J., Lee V. S., Nimmanpipu P., Rowlands H. A., and Mulholland A. J. (2011): Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of substrate assisted catalysis in family 18 chitinases: conformational changes and the role of Asp142 in catalysis in *ChiB*. *Biochemistry* **50**, 4697–4711.
- Jones J. D. G., and Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329
- Jones J. D., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323–29.
- Kasprzewska, A. (2003): Plant chitinases regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**, 809–824.
- Katsuragi Y., Takai R., Furukawa T., Hirai H., Morimoto T., Katayama T. et al. (2015): CD2-1, the C-terminal region of flagellin, modulates the induction of immune responses in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* **28**, 648–658.
- Khan A., Ali M., Khattak A. M., Gai W. X., Zhang H. X., Wei A. M., Gong Z. H. (2019): Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International journal of molecular sciences* **20**, 5321.
- Khokon M. A. R., Salam M. A., Jammes F., Ye W., Hossain M. A., Okuma E. et al. (2017): MPK9 and MPK12 function in SA-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **81**, 1394-1400.
- Kim C. Y., Liu Y., Thorne E. T., Yang H., Fukushige H. et al. (2003): Activation of a stress-responsive mitogenactivated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell* **15**, 2707–18.
- Kim D. S., Kim N. H., Hwang B.K. (2015): The *Capsicum annuum* class IV chitinase *ChitIV* interacts with receptor-like cytoplasmic protein kinase PIK1 to accelerate PIK1-triggered cell death and defence responses. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1987–1999.
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshioka H. (2007): Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* **19**, 1065–1080.
- Komis G., Illés P., Beck M., Šamaj J. (2011): Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* **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.
- Kong Q., Qu N., Gao M., Zhang Z., Ding X. et al. (2012): The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 kinase cascade negatively regulates immunity mediated by a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 2225–36.
- Kourelis J., and van der Hoorn R. A. L. (2018): Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *The Plant Cell* **30**, 285–299.
- Kouzai Y., Mochizuki S., Nakajima K. et al. (2014): Targeted gene disruption of OsCERK1 reveals its indispensable role in chitin perception and involvement in the peptidoglycan response and immunity in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* **27**, 975–982.

- Křenek P., Niks R. E., Vels A., Vyplelová P., Šamaj J. (2015): Genome-wide analysis of the barley MAPK gene family and its expression patterns in relation to *Puccinia hordei* infection. *Acta physiologiae plantarum* **37**, 1-16.
- Kvitko B. H., Park D. H., Velásquez A. C., Wei C. F., Russell A. B. *et al.* (2009): Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS Pathog* **5**, e1000388.
- Lacombe S., Rougon-Cardoso A., Sherwood E. *et al.* (2010): Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotechnol.* **28**, 365–369.
- Lal N.K., Nagalakshmi U., Hurlburt N.K., Flores R., Bak A., Sone P., Ma X., Song G. *et al.* (2018): The receptor-like cytoplasmic kinase BIK1 localizes to the nucleus and regulates defense hormone expression during plant innate immunity. *Cell Host Microbe* **23**, 485-497.
- Li G., Meng X., Wang R., Mao G., Han L. *et al.* (2012): Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **8**, e1002767.
- Li H., Greene L.H. (2010): Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding. *PLoS ONE* **5**, e8654.
- Li J., Blanchoin L. & Staiger C. J. (2015): Signaling to actin stochastic dynamics. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 415–440.
- Li L., Li M., Yu L., Zhou Z., Liang X., Liu Z., Cai G., Gao L., Zhang X., Wang Y. *et al.* (2014): The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe* **15**, 329-338.
- Li X., Lin H., Zhang W., Zou Y., Zhang J., Tang X. and Zhou J.M. (2005): Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 12990–12995.
- Li Y., Liao S., Mei P., Pan Y., Zhang Y., Zheng X., Miao Y. *et al.* (2021): OsWRKY93 Dually Functions Between Leaf Senescence and in Response to Biotic Stress in Rice. *Frontiers in plant science* **12**, 327.
- Li Z., Ao Y., Feng D., Liu J., Wang J., Wang H. B., Liu B. (2017): OsRLCK 57, OsRLCK107 and OsRLCK118 positively regulate chitin-and PGN-induced immunity in rice. *Rice* **10**, 1-5.
- Liu B., Li J.F., Ao Y. *et al.* (2012a): Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. *Plant Cell* **24**, 3406–3419.
- Liu T., Liu Z., Song C., Hu Y., Han Z., She J., Fan F., Wang J., Jin C., Chang J. *et al.* (2012b): Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science* **336**, 1160–1164.
- Liu X., Yu Y., Liu Q., Deng S., Jin X., Yin Y. *et al.* (2020): A *Na2CO3*-Responsive Chitinase Gene From *Leymus chinensis* Improve Pathogen Resistance and Saline-Alkali Stress Tolerance in Transgenic Tobacco and Maize. *Frontiers in plant science* **11**, 504.
- Liu Y., Maierhofer T., Rybak K., Sklenar J., Breakspear A., Johnston M. G. *et al.* (2019): Anion channel SLAH3 is a regulatory target of chitin receptor-associated kinase PBL27 in microbial stomatal closure. *eLife* **8**, e44474.
- Liu Y., Zhang D., Wang L., Li D. (2013): Genome-wide analysis of mitogen-activated protein kinase gene family in maize. *Plant molecular biology reporter* **31**, 1446-1460.
- Lo Presti L., Lanver D., Schweizer G., Tanaka S., Liang L., Tollot M. *et al.* (2015): Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 513-545.
- Lu D., Wu S., Gao X., Zhang Y., Shan L., He P. (2010): A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 496–501.
- Ma Z., Song T., Zhu L., Ye W., Wang Y., Shao Y., Wang Y. *et al.* (2015): A *Phytophthora sojae* glycoside hydrolase 12 protein is a major virulence factor during soybean infection and is recognized as a PAMP. *The Plant Cell* **27**, 2057-2072.
- Maithani D., Singh H., Sharma A. (2021): Stress alleviation in plants using SAR and ISR: Current views on stress signaling network. In: *Microbes and Signaling Biomolecules Against Plant Stress* (Sharma A. eds.) Springer, Singapore, 7-36.

- Malik A. (2019): Purification and properties of plant chitinases: A review. *Journal of Food Biochemistry*, **43**, e12762.
- Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P. *et al.* (2012): Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 614–629.
- Mao G., Meng X., Liu Y., Zheng Z., Chen Z., Zhang S. (2011): Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 1639–53.
- Marshall R. *et al.* (2011): Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant Physiol.* **156**, 756-769.
- Martin G. B. (2012): Suppression and activation of the plant immune system by *Pseudomonas syringae* effectors AvrPto and AvrPtoB. *Effectors in plant-microbe interactions* **84**, 123-154.
- Marzec-Schmidt K., Hura K., PŁAŻEK A. (2020): Rapid increases in β -1, 3-glucanase and chitinase activities are markers of resistance to *Microdochium nivale* in grasses of the *Lolium-Festuca* complex. *BIOLOGIA PLANTARUM* **64**, 710-716.
- McKhann H. I., Frugier F., Petrovics G., de la Pena T. C., Jurkevitch E. *et al.* (1997): Cloning of a WD-repeat-containing gene from alfalfa (*Medicago sativa*): a role in hormone-mediated cell division? *Plant molecular biology* **34**, 771-780.
- Meng L. S., Xu M. K., Wan W., Yu F., Li C., Wang J. Y. *et al.* (2018): Sucrose signaling regulates anthocyanin biosynthesis through a MAPK cascade in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **210**, 607-619.
- Meng Q., Gupta R., Min C. W., Kim J., Kramer K., Wang Y., Kim S. T. (2019): A proteomic insight into the MSP1 and flg22 induced signaling in *Oryza sativa* leaves. *Journal of Proteomics* **196**, 120-130.
- Meng X. Z., Zhang S. Q. (2013): MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**, 245–266.
- Meng X., Xu J., He Y., Yang K. Y., Mordorski B. *et al.* (2013): Phosphorylation of an ERF transcription factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. *Plant Cell* **25**, 1126–42.
- Meszaros P., Rybansky L., Spiess N., Socha P., Kuna R., Libantova J. *et al.* (2014): Plant chitinase responses to different metal-type stresses reveal specificity. *Plant Cell Reports* **33**, 1789–1799.
- Mhamdi A., Van Breusegem F. (2018): Reactive oxygen species in plant development. *Development* **145**, dev164376.
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K. *et al.* (2007): CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 19613–18.
- Nagpure A., Choudhary B., Gupta R. K. (2013): Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Crit. Rev. Biotechnol.* **34**, 215-232.
- Nakano M., Mukaihara T. (2018): *Ralstonia solanacearum* type III effector RipAL targets chloroplasts and induces jasmonic acid production to suppress salicylic acid-mediated defense responses in plants. *Plant Cell Physiol.* **59**, 2576–2589.
- Neuhaus J. M. (1999): Plant chitinases (pr-3, pr-4, pr-8, pr-11). *Pathogenesis-related proteins in plants*, 77–105.
- Neuhoff V., Arold N., Taube D. E. W. (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Nürnberg T., Nennstiel D., Jabs T., Sacks W. R., Hahlbrock K., Scheel D. (1994): High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449–460.
- Ogata T., Okada H., Kawaide H., Takahashi H., Seo S., Mitsuhashi I., Matsushita Y. (2015): Involvement of NtERF3 in the cell death signalling pathway mediated by SIPK/WIPK and WRKY 1 in tobacco plants. *Plant Biology* **17**, 962-972.
- Okada K., Kubota Y., Hirase T., Otani K., Goh T., Hiruma K., Saijo Y. (2021): Uncoupling root hair formation and defence activation from growth inhibition in response to damage-associated Pep peptides in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **229**, 2844-2858.

- Patil R. S., Ghormade V., and Deshpande M. V. (2000): Chitinolytic enzymes: An exploration. *Enzyme Microbiol. Technol.* **26**, 473–483.
- Pečenková T., Janda M., Ortmannová J., Hajná V., Stehlíková Z., Žárský V. (2017): Early *Arabidopsis* root hair growth stimulation by pathogenic strains of *Pseudomonas syringae*. *Annals of botany* **120**, 437-446.
- Peng K. C., Wang C. W., Wu C. H., Huang C. T. and Liou R. F. (2015): Tomato SOBIR1/EVR homologs are involved in elicitor perception and plant defense against the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **28**, 913–926.
- Pereira A. M., Lopes A. L., Coimbra S. (2016): Arabinogalactan proteins as interactors along the crosstalk between the pollen tube and the female tissues. *Frontiers in plant science* **7**, 1895.
- Pérez-Salamó I., Papdi C., Rigó G. *et al.* (2014): The heat shock factor A4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the mitogen activated protein kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiol* **165**, 319–334.
- Petutschnig E. K., Jones A. M., Serazetdinova L., Lipka U. and Lipka V. (2010): The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **285**, 28902–28911.
- Pfeilmeier S., George J., Morel A., Roy S., Smoker M., Stransfeld L., Zipfel C. (2019): Expression of the *Arabidopsis thaliana* immune receptor EFR in *Medicago truncatula* reduces infection by a root pathogenic bacterium, but not nitrogen-fixing rhizobial symbiosis. *Plant biotechnology journal* **17**, 569-579.
- Pitzschke A., Hirt H. (2009): Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *Plant Physiol.* **149**, 606–15.
- Pitzschke A., Schikora A., Hirt H. (2009): MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 421–26.
- Poncini L., Wyrsh I., Déneraud Tendon V., Vorley T., Boller T., Geldner N., *et al.* (2017): In roots of *Arabidopsis thaliana*, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer. *PLoS One* **12**, e0185808.
- Qi J., Wang J., Gong Z., Zhou J.M. (2017): Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* **38**, 92–100.
- Qi T., Guo J., Liu P., He F., Wan C., Islam M. A., Guo J. *et al.* (2019): Stripe rust effector PstGSRE1 disrupts nuclear localization of ROS-promoting transcription factor TaLOL2 to defeat ROS-induced defense in wheat. *Molecular plant* **12**, 1624-1638.
- Qiu J. L., Fiil B. K., Petersen K., Nielsen H. B., Botanga C. J. *et al.* (2008): *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J.* **27**, 2214–21.
- Qiu J. L., Zhou L., Yun B. W., Nielsen H. B., Fiil B. K. *et al.* (2008): *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol.* **148**, 212–22.
- Qutob D., Kemmerling B., Brunner F., Kufner I., Engelhardt S. *et al.* (2006): Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell.* **18**, 3721–44.
- Raaymakers T. M. and Van den Ackerveken G. (2016): Extracellular recognition of oomycetes during biotrophic infection of plants. *Front. Plant Sci.* **7**, 906.
- Ranf S., Eschen-Lippold L., Pecher P., Lee J., Scheel D. (2011): Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant J.* **68**, 100–13.
- Rani T. S., Takahashi D., Uemura M., Podile A. R. (2015): Proteins associated with oxidative burst and cell wall strengthening accumulate during citrus-*Xanthomonas* non-host interaction. *Plant molecular biology reporter* **33**, 1349-1360.
- Rao K. P., Richa T., Kumar K., Raghuram B., Sinha A. K. (2010): In silico analysis reveals 75 members of mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family in rice. *DNA Res.* **17**, 139–153.
- Ravichandran G., Kumaresan V., Mahesh A., Dhayalan A. *et al.* (2018): Bactericidal and fungistatic activity of peptide derived from GH18 domain of prawn chitinase 3 and its immunological functions during biological stress. *Int. J. Biol. Macromol.* **106**, 1014-1022.

- Ray S., Alves P. C., Ahmad I., Gaffoor I., Acevedo F. E., Peiffer M., Luthe D. S. *et al.* (2016): Turnabout Is Fair Play: Herbivory-Induced Plant Chitinases Excreted in Fall Armyworm Frass Suppress Herbivore Defenses in Maize. *Plant Physiology* **171**, 694-706.
- Ren D., Liu Y., Yang K. Y., Han L., Mao G. *et al.* (2008): A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5638–43.
- Ren Y., Armstrong M., Qi Y., McLellan H., Zhong C., Du B., Tian Z. *et al.* (2019): *Phytophthora infestans* RXLR effectors target parallel steps in an immune signal transduction pathway. *Plant physiology* **180**, 2227-2239.
- Riechmann J. L., Ratcliffe O. J. (2000): A genomic perspective on plant transcription factors. *Current opinion in plant biology* **3**, 423-434.
- Robinson S. M., Bostock R. M. (2015): β -glucans and eicosapolyenoic acids as MAMPs in plant-oomycete interactions: past and present. *Front. Plant Sci.* **5**, 797.
- Rocafort M., Fudal I., Mesarich C. H. (2020): Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. *Curr Opin Plant Biol* **56**, 9-19.
- Rodriguez M. C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu.Rev. Plant Biol.* **61**, 621–49.
- Ron D., Chen C. H., Caldwell J., Jamieson L., Orr E., Mochly-Rosen D. (1994): Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 839-843.
- Ron M., Avni A. (2004): The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* **16**, 1604–1615.
- Roux M., Schwessinger B., Albrecht C., Chinchilla D., Jones A. *et al.* (2011): The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell*, **23**, 2440–55.
- Saijo Y., Loo E. P., Yasuda S. (2018): Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. *Plant J* **93**, 592–613
- Segonzac C., Feike D., Gimenez-Ibanez S., Hann D. R., Zipfel C., Rathjen J. P. (2011): Hierarchy and roles of pathogen-associated molecular pattern-induced responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* **156**, 687–99.
- Sels J., Mathys J., De Coninck B. M., Cammue B. P., De Bolle M. F. (2008): Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 941-950.
- Shao Y., Yu X., Xu X., Li Y., Yuan W., Mao C., Zhang S., Xu J. (2020): The YDA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 cascade functions downstream of the RGF1-RGI ligand-receptor pair in regulating mitotic activity in the root apical meristem. *Mol. Plant.* **13**, 1608-1623.
- Shi Q., Febres V. J., Jones J. B., Moore G. A. (2015): Responsiveness of different citrus genotypes to the *Xanthomonas citri* ssp. *citri*-derived pathogen-associated molecular pattern (PAMP) flg22 correlates with resistance to citrus canker. *Molecular plant pathology* **16**, 507-520.
- Shibata M., Sugimoto K. (2019): A gene regulatory network for root hair development. *J Plant Res* **132**, 301–309.
- Shimizu T., Nakano T., Takamizawa D. *et al.* (2010): Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J.* **64**, 204–214.
- Shinya T., Nakagawa T., Kaku H. and Shibuya N. (2015): Chitin-mediated plant-fungal interactions: catching, hiding and handshaking. *Curr. Opin. Plant Biol.* **26**, 64–71.
- Schoonbeek H. J., Wang H. H., Stefanato F. L., Craze M., Bowden S., Wallington E., Zipfel C. and Ridout C. J. (2015): *Arabidopsis* EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. *New Phytol.* **206**, 606–613.
- Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M. *et al.*, (2002): Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, **214**, 821–828.
- Schwessinger B., Bahar O., Thomas N. *et al.* (2015): Transgenic expression of the dicotyledonous pattern recognition receptor EFR in rice leads to ligand-dependent activation of defense responses. *PLoS Pathog.* **11**, e1004809
- Sinha M. *et al.* (2014): Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *Sci World J* **2014**, 543195.

- Sloan S. S., Lebeis S. L. (2015): Exercising influence: distinct biotic interactions shape root microbiomes. *Current opinion in plant biology* **26**, 32-36.
- Smertenko A.P., Kaloriti D., Chang H.Y., Fiserova J., Opatrny Z., Hussey P.J. (2008): The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65 isoforms. *Plant Cell* **20**, 3346–3358.
- Soliman A., Idriss M., El-Meniawi F., Rawash I. (2019): Induction of Pathogenesis-Related (PR) Proteins as A plant Defense Mechanism for Controlling the Cotton Whitefly *Bemisia tabaci*. *Alexandria Journal of Agricultural Sciences* **64**, 107-122.
- Son S., An H. K., Seol Y.J., Park S. R., Im J. H. (2020): Rice transcription factor WRKY114 directly regulates the expression of *OsPRIa* and *Chitinase* to enhance resistance against *Xanthomonas oryzae* *pv.* *oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **533**, 1262-1268.
- Stotz H. U., Sawada Y., Shimada Y., Hirai M. Y., Sasaki E., Krischke M. *et al.* (2011): Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *The Plant Journal* **67**, 81-93.
- Su J., Zhang M., Zhang L., Sun T., Liu Y., Lukowitz W., Xu J., Zhang S. (2017): Regulation of stomatal immunity by interdependent functions of a pathogen-responsive MPK3/MPK6 cascade and abscisic acid. *Plant Cell* **29**, 526-542.
- Su T., Xu J., Li Y., Lei L., Zhao L. *et al.* (2011): Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **23**, 364–80.
- Sun T., Nitta Y., Zhang Q., Wu D., Tian H., Lee J. S., Zhang Y. (2018): Antagonistic interactions between two MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. *EMBO reports* **19**, e45324.
- Šamaj J. *et al.*, (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J.* **21**, 3296–3306.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* **31**, 118-128.
- Taj G., Agarwal P., Grant M., Kumar A. (2010): MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant signaling & behavior* **5**, 1370-1378.
- Takáč T., Křenek P., Komis G., Vadovič P., Ovečka M., Ohnoutková L., Šamaj J. *et al.* (2021): TALEN-based HvMPK3 knock-out attenuates proteome and root hair phenotypic responses to flg22 in barley. *Frontiers in Plant Science* **12**, 725.
- Takáč T., Šamajová O., Vadovič P., Pechan T., Košútová P., Ovečka M., Husičková A., Komis G., Šamaj J. (2014): Proteomic and biochemical analyses show functional network of proteins involved in antioxidant defense of *Arabidopsis anp2anp3* double mutant. *Journal of Proteome Research* **13**, 5347–5361.
- Takáč T., Vadovič P., Pechan T. *et al.* (2016): Comparative proteomic study of *Arabidopsis* mutants *mpk4* and *mpk6*. *Sci Rep* **6**, 28306.
- Tanabe T., Kawase T., Watanabe T., Uchida Y., and Mitsutomi M. (2000): Enzymology and protein engineering purification and characterization of a 49-kDa chitinase from *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J. Biosci Bioengin.* **89**, 27–32.
- Tena G., Boudsocq M., Sheen J. (2011): Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 519–29.
- Terrón-Camero L. C., Molina-Moya, E., Sanz-Fernández, M., Sandalio, L. M., Romero-Puertas, M. C. (2018): Detection of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) during hypersensitive cell death. In: *Plant Programmed Cell Death* (De Gara L., Locato V. eds.) Humana Press, New York, 97-105.
- Torres M.A. (2010): ROS in biotic interactions. *Physiol. Plant.* **138**, 414–29.
- Trevors J. T. (2010): One gram of soil: a microbial biochemical gene library. *Antonie Van Leeuwenhoek* **97**, 99-106.
- Trudel J., Asselin A. (1989): Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* **178**, 362-366.

- Tseytin I., Madar A., Mitrovic B., Deng W., Finlay B. B., Sal-Man N. (2018b): The third transmembrane domain of EscR is critical for function of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system. *mSphere* **3**, e00162–18.
- Tsuda K., Sato M., Stoddard T., Glazebrook J., Katagiri F. (2009): Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet.* **5**, e1000772.
- Ullah H., Scappini E. L., Moon A. F., Williams L. V., Armstrong D. L., Pedersen L. C. (2008): Structure of a signal transduction regulator, RACK1, from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Science* **17**, 1771-1780.
- Underwood W., Zhang S., He S.Y. (2007): The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **52**, 658–72.
- Van Loon L. C., Pierpoint W. S., Boller T. H., Conejero V. (1994): Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**, 245-264.
- Van Loon L.C., van Kammen A. (1970): Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN”. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 190–211.
- Vaškebová L., Šamaj J., Ovečka M. (2018): Single-point ACT2 gene mutation in the *Arabidopsis* root hair mutant *der1-3* affects overall actin organization, root growth and plant development. *Annals of botany* **122**, 889-901.
- Vinatzer B. A., Monteil C. L. and Clarke C.R. (2014): Harnessing population genomics to understand how bacterial pathogens emerge, adapt to crop hosts, and disseminate. *Annu. Rev. Phytopathol.* **52**, 19–43.
- Wang C., Xu H., Lin S., Deng W., Zhou J., Zhang Y., Xue Y. *et al.* (2020): GPS 5.0: an update on the prediction of kinase-specific phosphorylation sites in proteins. *Genomics, proteomics & bioinformatics* **18**, 72-80.
- Wang F., Yang S., Wang Y., Zhang B., Zhang F., Xue H., Ma Y. *et al.* (2021): Overexpression of Chitinase gene enhances resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria alternata* in apple (*Malus domestica*). *Scientia Horticulturae* **277**, 109779.
- Wang H., He H., Qi Y., McLellan H., Tian Z., Birch P. R., Tian Z. (2019): The oomycete microbe-associated molecular pattern Pep-13 triggers SERK3/BAK1-independent plant immunity. *Plant cell reports* **38**, 173-182.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J. C., Zhang S. (2007): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 63-73.
- Wang K. L., Li H., Ecker J. R. (2002): Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* **14**, 131–51.
- Wang L., Ma K. B., Lu Z. G., Ren S. X., Jiang H. R., Cui J. W., Chen G. *et al.* (2020): Differential physiological, transcriptomic and metabolomic responses of *Arabidopsis* leaves under prolonged warming and heat shock. *BMC Plant Biol* **20**, 86.
- Wankhede D. P., Misra M., Singh .P, Sinha A. K. (2013): Rice mitogen activated protein kinase kinase and mitogen activated protein kinase interaction network revealed by in-silico docking and yeast two-hybrid approaches. *PLoS One* **8**, e65011.
- Willmann R., Lajunen H. M., Erbs G. *et al.* (2011): *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 19824–19829.
- Win J. *et al.* (2012): Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **77**, 235-247.
- Xin X. F., He S. Y. (2013): *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**, 473-498.
- Xin X. F., Kvitko B., He S.Y. (2018): *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat Rev Microbiol* **16**, 316-328.
- Xin X. F., Nomura K., Aung K., Velásquez A. C., Yao J., Boutrot F., Chang J. H., Zipfel C., He S. Y. (2016): Bacteria establish an aqueous living space in plants crucial for virulence. *Nature* **539**, 524-529.

- Xu P., Jiang L., Wu J., Li W., Fan S., Zhang S. (2014): Isolation and characterization of a pathogenesis-related protein 10 gene (GmPR10) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae*. *Mol Biol Rep* **41**, 4899–4909.
- Xu Y.I. *et al.* (1994): Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**, 1077–1085.
- Yamada K., Yamaguchi K., Yoshimura S., Terauchi A., Kawasaki T. *et al.* (2017): Conservation of chitin-induced MAPK signaling pathways in rice and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **58**, 993-1002.
- Yamada M., Han X. W., Benfey P. N. (2018): Root meristem growth factor 1 controls root meristem size through reactive oxygen species signaling. *bioRxiv* **10**, 1101/244947.
- Yamaguchi K., Mezaki H., Fujiwara M., Hara Y., Kawasaki T. (2017): *Arabidopsis* ubiquitin ligase PUB12 interacts with and negatively regulates Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 (CERK1). *PLoS One* **12**, e0188886.
- Yan H., Zhao Y., Shi H., Li J., Wang Y., Tang D. (2018): BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1 phosphorylates MAPKKK5 to regulate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **176**, 2991-3002.
- Yang L., Zhang Y., Guan R. *et al.* (2020): Co-regulation of indole glucosinolates and camalexin biosynthesis by CPK5/CPK6 and MPK3/MPK6 signaling pathways. *J. Integr. Plant Biol.* **62**, 1780-1796.
- Yang X., Yang J., Li H., Niu L., Xing G., Zhang Y., Dong Y. (2020): Overexpression of the chitinase gene *CmCHI* from *Coniothyrium minitans* renders enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Transgenic research* **29**, 187-198.
- Yao W., Wang S., Zhou B., Jiang, T. (2016): Transgenic poplar overexpressing the endogenous transcription factor ERF76 gene improves salinity tolerance. *Tree physiology* **36**, 896-908.
- Yu X., Feng B., He P., Shan L. (2017): From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annu. Rev. Phytopathol.* **55**, 109–137.
- Zhang J., Shao F., Li Y., Cui H., Chen L. *et al.* (2007): A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* **1**, 175–85.
- Zhang L., Kars I., Essenstam B., Liebrand T. W., Wagemakers L. *et al.* (2014): Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the *Arabidopsis* receptor-like protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES1. *Plant Physiol.* **164**, 352–364.
- Zhang Z., Wu Y., Gao M., Zhang J., Kong Q. *et al.* (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**, 253–63.
- Zhong R. Q., Kays S. J., Schroeder B. P., Ye Z. H. (2002): Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene. *Plant Cell* **14**, 165–179.
- Zhou J., Wang X., He Y., Sang T., Wang P., Dai S. *et al.* (2020): Differential phosphorylation of the transcription factor WRKY33 by the protein kinases CPK5/CPK6 and MPK3/MPK6 cooperatively regulates camalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **32**, 2621–2638.
- Zhu Q., Shao Y., Ge S., Zhang M., Zhang T., Hu X., Xu J. *et al.* (2019): A MAPK cascade downstream of IDA–HAE/HSL2 ligand–receptor pair in lateral root emergence. *Nature plants* **5**, 414-423.
- Zieliński K., Dubasa E., Geršič Z. *et al.*, (2021): β -1,3-Glucanases and chitinases participate in the stress-related defence mechanisms that are possibly connected with modulation of arabinogalactan proteins (AGP) required for the androgenesis initiation in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Science* **302**, 110700.
- Zipfel C., Felix G. (2005): Plants and animals: a different taste for microbes? *Current opinion in plant biology* **8**, 353-360.
- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D. *et al.* (2006): Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**, 749–60.

Zur I., Gołębiowska G., Dubas E., Golemić E., Matušíková I., Libantová J., & Moravčíková J. (2013): β -1, 3-glucanase and chitinase activities in winter triticales during cold hardening and subsequent infection by *Microdochium nivale*. *Biologia* **68**, 241-248.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

ABA	kyselina abscisová
ACC	kyselina 1-aminocyklopropán-1-karboxylová
ACO	ACC oxidáza
ACS	ACC syntáza
AvrE1	efektor <i>Pseudomonas syringae</i>
AvrPto	efektor <i>Pseudomonas syringae</i>
AvrPtoB	efektor <i>Pseudomonas syringae</i>
AvrRpt2	efektor <i>Pseudomonas syringae</i>
BAK1	receptorová kináza asociovaná s BRI1
BIK1	proteínkináza indukovaná rodom <i>Botrytis</i>
BIR1	RLK interagujúca s BAK1
BKK1	kináza podobná BAK1
BSA	hovädzí sérový albumín
CaChitIV	chitináza 4 pochádzajúca z papriky
CaPIK1	receptoru podobná cytoplazmatická proteínkináza papriky
CAZy	databáza aktívnych enzýmov voči sacharidom
CBEL	lektínový elicítor viažúci celulózu
CEBiP	proteín viažúci chitín
CERK1	LysM receptorová kináza
CYP71A13	gén kódujúci, indoleacetaldoxim dehydratázu
EF	elongačný faktor
EFR	receptor vnímajúci elongačný faktor Tu
EGF	epidermálny rastový faktor
EIX	xylanáza indukujúca etylén
elf18 – elf26	N-koncový 18–26-aminokyselinový epitop EF-Tu
ELM	eukaryotické lineárne motívy
ERF	etylénový faktor odozvy
ETI	efektorom vyvolaná imunita
ETS	efektorom vyvolaná citlivosť
flg22	N-koncový, 22 aminokyselinový epitop flagelínu
FLS2	receptor citlivý na flagelín
GH	glykozidhydrolázy

GlcNAc	N-acetylglukozamín
H ₂ O ₂	peroxid vodíka
HEL	proteín podobný heveínu
HopAII	efektor <i>Pseudomonas syringae</i>
HopI1	efektor <i>Pseudomonas syringae</i>
HopM1	efektor <i>Pseudomonas syringae</i>
HR	hypersenzitívna imunitná odpoveď
ChiB	endochitináza B
INF1	elicítin z <i>P. infestans</i>
JA	kyselina jasmónová
LYM1	receptorový proteín s LysM doménou 1
LYM3	receptorový proteín s LysM doménou 3
LYP4/6	LysM proteíny 4 a 6
LysMs	lyzínové motívy
MAPK	mitogénom aktivovaná proteínkináza
MAPK	mitogénom aktivované proteínkinázy
MKK4 ^{DD}	konštitutívne aktívny variant MKK4
MKK5 ^{DD}	konštitutívne aktívny variant MKK5
MKP1	MAPK fosfatáza
MKS1	substrát MPK4
NADPH	redukovaný nikotínamidadenín dinukleotidfosfát
NB-LRR	doména viažuca nukleotidy a doména bohatá na leucínové opakovania
Nep1	peptid indukovaný nektrózou a etylénom
NO	oxid dusnatý
<i>NTF6</i>	gén kódujúci MAPK príbuznú SIPK v tabaku
NtMEK2 ^{DD}	variant NtMEK2
OG	oligogalakturónové kyseliny
PAD2	gén kódujúci glutamát-cysteín ligázu
PAD3	gén kódujúci kamalexín syntázu
PAMP	molekulárne zložky patogénu
PCD	programovaná bunková smrť
PDF	rastlinný defenzín
PGN	peptidoglykán
PR	proteíny spojené s rastlinnou patogenézou

PRR	receptor rozpoznávající patogén
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PTI	primární imunitná odpověď
PTP1	protein tyrosin fosfatáza
RBGP1	receptor odpovídající na přítomnost polygalakturonáz z <i>Botrytis cinerea</i>
RBOH ₂	oxidázový homológ oxidativního vzplanutia
RLK	receptor podobný kináze
RLP	receptor podobný proteinu
RLP-ELR	receptor podobný proteinu elicitinové odpovědi
ROS burst	oxidativní vzplanutí
ROS	reaktivní formy kyslíka
SA	kyselina salicylová
SAMK	stresem aktivovaná MAPK
SAR	získaná systémová rezistence
SERK3	receptorová kináza somatické embryogenézy
SIMK	solí indukovaná MAPK
SIPK	protein kináza indukovaná kyselinou salicylovou
SNC1	konstitutivní supresor <i>npr1-1</i>
SOBIR1	supresor BIR1
SUMM2	supresor MKK1 a MKK2
T3SE	sekreční efektor typu III
T3SS	sekreční systém typu III
TALEN	TAL efektor nukleáza
WAK	kinázy spojené s bunčovou stěnou
WIPK	protein kináza indukovaná poraněním
XEG1	endoglukanáza špecifická na xyloglukan

9 PRÍLOHY

Zoznam príloh

Príloha 1. Fotografie gélov chitináz

Príloha 2. Fotografie skenov membrán s anti-HSP70 protilátkou

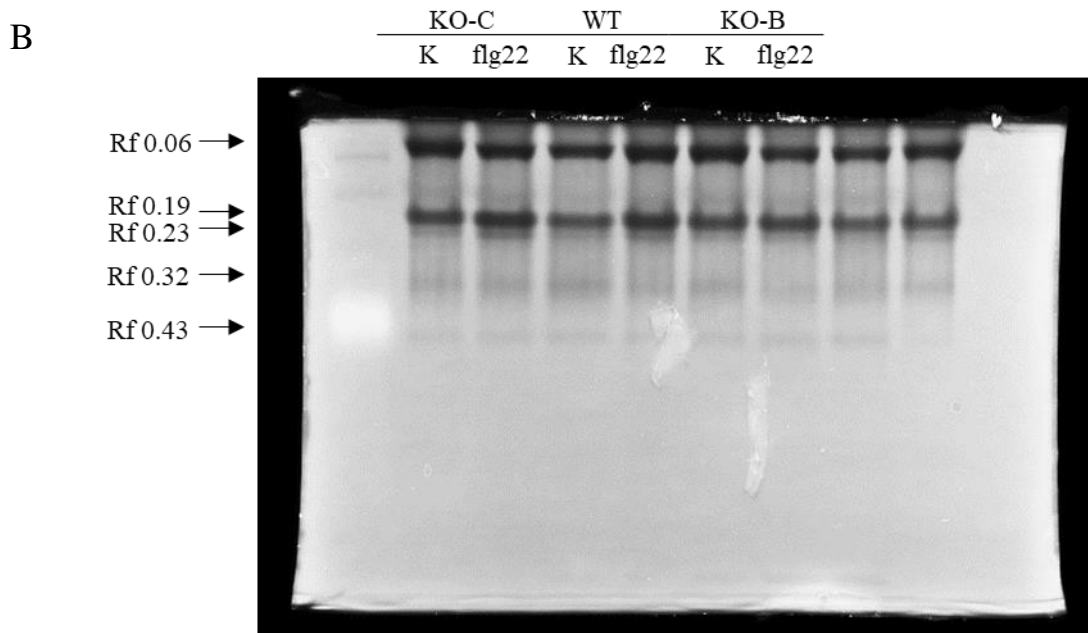
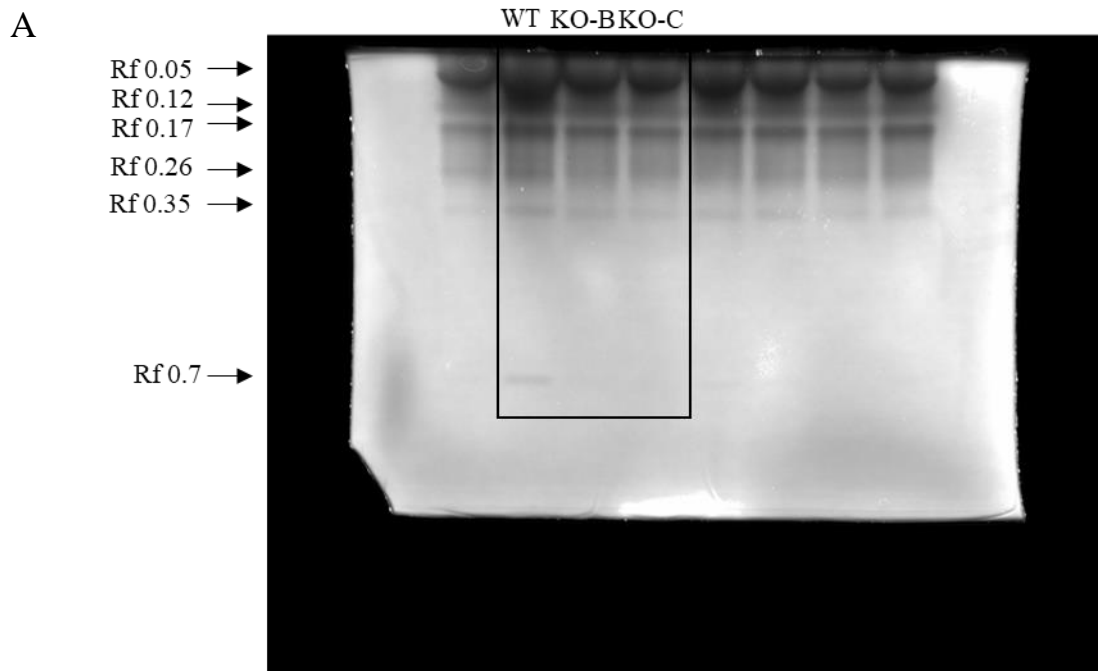
Príloha 3. Fotografie skenov membrán s anti-RACK1a protilátkou

Príloha 4. Dáta získané z databázy AthaMap a ATTED-II

Príloha 5. Experimentálne získané informácie o fosforylácii WRKY33 uvedené v databáze PhosPhAt 4.0.

Príloha 6. Hľadanie heterológneho proteínu k RACK1a v jačmeni pomocou BlastP (NCBI) softvéru

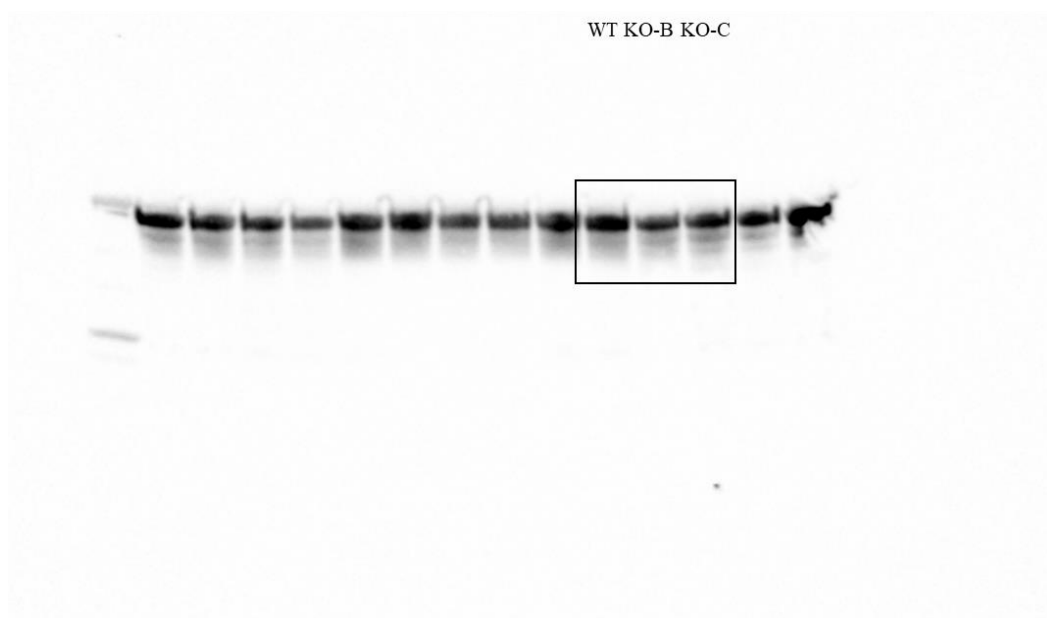
Príloha 1. Fotografie gélov chitináz



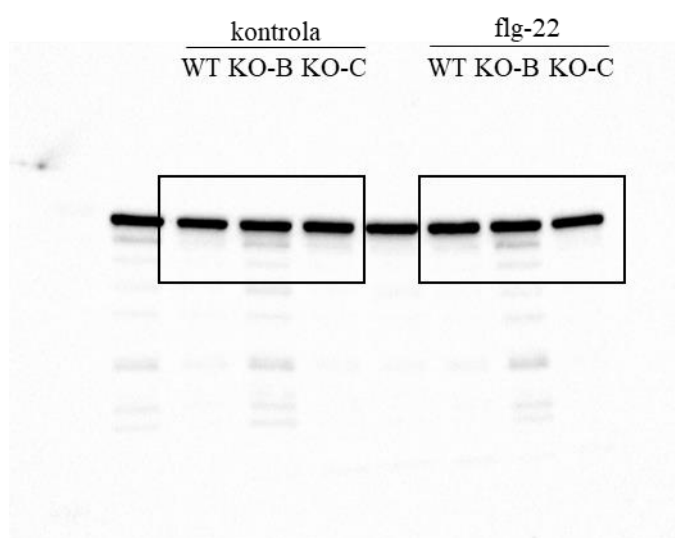
Príloha 1: Úplne skeny celých pôvodných gélov zafarbených na aktivitu chitináz uvedených na obrázkoch 8A (A) a 9A (B). Zvýraznené oblasti zobrazujú prezentované časti. Vzorky nanesené v pruhoch, ktoré nie sú anotované, nie sú pre túto štúdiu relevantné.

Príloha 2. Fotografie skenov membrán s anti-HSP70 protilátkou

A

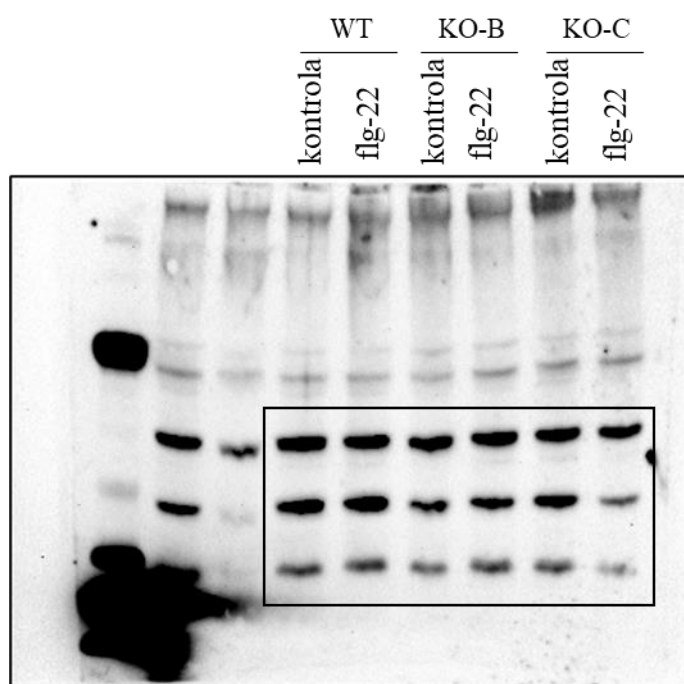


B



Príloha 2: Úplné skeny celých pôvodných membrán sondovaných s primárnou protilátkou anti-HSP70 uvedenej na obrázku 11A (A) a 12A (B). Zvýraznená oblasť zobrazuje predloženú časť. Nanesené vzorky v pruhoch, ktoré nie sú anotované, nie sú pre túto štúdiu relevantné.

Príloha 3. Fotografie skenov membrán s anti-RACK1a protilátkou



Príloha 3: Úplný sken celej pôvodnej membrány sondovanej s primárnou protilátkou anti-RACK1a uvedenej na obrázku 13A. Zvýraznená oblasť zobrazuje predloženú časť. Nanesené vzorky v pruhoch, ktoré nie sú anotované, nie sú pre túto štúdiu relevantné.

Príloha 4. Dáta získané z databázy AthaMap (TF špecifické pre cis elementy prítomné v promótorovej sekvencii cieľového chitinázového génu, *basic chitinase*) a ATTED-II (CoexSearch – *AtMPK3* a *basic chitinase*). V tabuľke je uvedených prvých dvadsať pozícií zoznamu vyhodnotených proteínov.

ATHAMPAP		
Factor	Family	Score
Ta MYB80	MYB	11,98
MYB83	MYB	7,66
RVE1 , REVEILLE 1, Myb-like transcription factor	MYB	7,51
WRKY12	WRKY(Zn)	9,8
WRKY45	WRKY(Zn)	9,76
WRKY38	WRKY(Zn)	9,33
ERF1 , ethylene responsive element binding factor 1	AP2/EREBP	10,73
RAP2.3 , RELATED TO AP2 2, ERF72 , ETHYLENE RESPONSE FACTOR 72	AP2/EREBP	10,7
RAP2.6 , RELATED TO AP2 6, ERF113 , ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR113	AP2/EREBP	10,46
ORA47 , (ERF018)	AP2/EREBP	10,1
KAN4 , (ERF018)	GARP	9,97
NtERF2 , Ethylene-responsive transcription factor 2	AP2/EREBP	9,73
DREB2C (ERF48)	AP2/EREBP	7,47
ZAT18 (zinc finger protein 18)	C2H2(Zn)	9,1
HSF82a , heat shock transcription factorB2A	HSF	7,32
DEAR4 , DREB AND EAR MOTIF PROTEIN 4	AP2/EREBP	11,82
DEAR3 , DREB AND EAR MOTIF PROTEIN 3	AP2/EREBP	9,9
RRTF1 , redox responsive transcription factor 1	AP2/EREBP	10,15
ABI4 , ABA INSENSITIVE 4	AP2/EREBP	9,8
TOE2 , TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED (EAT) 2	AP2/EREBP	9,51

ATTED II			
AGI	Factor		Score
AT1G18570	MYB51	myb domain protein 51	3,18
AT2G38470	WRKY33	WRKY DNA-binding protein 33	5,38
AT1G80840	WRKY40	WRKY DNA-binding protein 40	2,45
AT4G31550	WRKY11	WRKY DNA-binding protein 11	2,22
AT4G23810	WRKY53	WRKY family transcription factor	2,19
AT2G23320	WRKY15	WRKY DNA-binding protein 15	2,12
AT2G46400	WRKY46	WRKY DNA-binding protein 46	2,87
AT3G56400	WRKY70	WRKY DNA-binding protein 70	1,00
AT4G17490	ERF6	ethylene responsive element binding factor 6	3,8
AT5G47230	ERF5	ethylene responsive element binding factor 5	2,61
AT1G28370	ERF11	ERF domain protein 11	2,91
AT5G47220	ERF2	ethylene responsive element binding factor 2	2,82
AT5G61600	ERF104	ethylene response factor 104	2,48
AT2G31230	ERF15	ethylene-responsive element binding factor 15	2,48
AT3G15210	ERF4	ethylene responsive element binding factor 4	2,2
AT2G44840	ERF13	ethylene-responsive element binding factor 13	2,2
AT4G17500	ERF-1	ethylene responsive element binding factor 1	2
AT5G04340	ZAT6	zinc finger family protein	2,11
AT2G40140	CZF1	zinc finger (CCCH-type) family protein	2,89
AT4G18880	HSFA4A	heat shock transcription factor A4A	2,67

Príloha 5. Experimentálne (získané informácie o fosforylácii WRKY33 uvedené v databáze PhosPhAt 4.0.

The screenshot displays the PhosPhAt 4.0 software interface. The main window title is "Protein prediction WRKY33". On the left, there is a small image of a white flower. The central panel contains the following information:

- Species: Arabidopsis thaliana
- Protein: AT2G38470.1
- Peptide: TSTSLEDLEIPK
- Mod. peptide: TSTS(pS)LEDLEIPK(*)
- m/z (float): 596.6353 • 3
- Charge:

On the right side, there are two tables:

Modifications	
S	5 phos
K	13 ITRAQ144

Peptide parameters	
Mascot_Score	31.14
ppm	-0.3579
Enrichment	IMAC/TIO2
Treatment	ionizing radiation
Instrument	LTO-Orbitrap Velos
Tipcup	meette

At the top right of the interface, there are buttons for "Enlarge spectrum..." and "Export spectrum".

Príloha 6. Hľadanie heterológneho proteínu k RACK1a v jačmeni pomocou BlastP (NCBI) softvéru.

BLAST® » **blastp suite-2sequences** » results for RID-8ZRRWUYD114

Job Title [ref|NP_173248.1|...](#)
 RID [8ZRRWUYD114](#) Search expires on 05-04 19:31 pm
 Program Blast 2 sequences
 Query ID [NP_173248.1](#) (amino acid)
 Query Descr [Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein \[Arabidopsis thaliana\]...](#)
 Query Length 327
 Subject ID [BAJ90663.1](#) (amino acid)
 Subject Descr [predicted protein \[Hordeum vulgare subsp. vulgare\]...](#)
 Subject Length 335

Descriptions

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	Hordeum vulgare subsp. vulgare	475	497	99%	1e-174	70.24%	335	BAJ90663.1

Graphic Summary

Distribution of the top 2 Blast Hits on 1 subject sequences



Alignments

Alignment view CDS feature

guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein A [Hordeum vulgare]

Sequence ID: **KAE8787065.1** Length: 335 Number of Matches: 2

Range 1: 4 to 327

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
475 bits(1222) 1e-174() Compositional matrix adjust. 236/336(70%) 268/336(79%) 24/336(7%)						
Query 1	MAEGLV	KGTMRAHTDMVTAIATPIDNADIIVSASRDKSIIILWKLTKDDKA-----				51
Sbjct 4	M E L L	GIMR H D-VTAIA PIDN+ IVS SRDKS+++W LT +				63
Query 52	YGVAQRRLTGHSHFVEDVVLSSDGFALSGSWDGLRLWDLAAGVSTRRFVGHGHTKDVLSV					111
Sbjct 64	Y V	RRLTGH HFV+DVV+SSDGFALSGSWDGLRLWDL+ G++TRRFVGHGHTKDV+SV				123
Query 112	AFSLDNRQIVSASRDRTIKLWNTLGECKYTISEGEGE---HRDWVSCVRFSPNTLQPTIV					168
Sbjct 124	AFS+DNRQIVSASRD	TIKLWNTLGECKYTI G H WVSCVRFSPN OPTIV				183
Query 169	SASWDKTVKVNLSNCKLRSTLAGHTGYVSTVAVSPDGLSCASGGKDGVLWDLAEGKK					228
Sbjct 184	S S	WDKTVKVNLSNCKLRSTLAGH GVV+ VAVSPDGLSCASGGKDGV LLWDL+EGK+				243
Query 229	LYSLEANSVIHALCFSPNRYWILCAATEHGKIKWDLLESKIVEDLKVLDKAEAEKADNSGP					288
Sbjct 244	LY LEA S+IH+LCFSPNRYWILCAATE	IKIWDLESK +V+DLK +++				292
Query 289	AATKRVICYTSLNNSADGSTLFSGYTDGIRVWGI		324			
Sbjct 293	-VSKNQMLYCTSLNNSADGSTLYTYDGTIRVFKI		327			