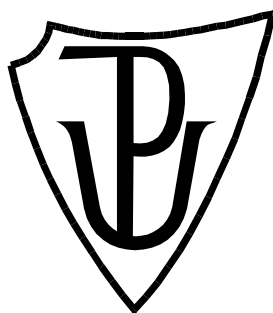


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Charakterizace transgenních linií ječmene s
modifikovanou expresí vybraných mitogen-
aktivovaných protein kinas**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Tichá
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Studijní program:	B1406 Biochemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Pavel Křenek, Ph.D.

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

V Olomouci dne:

Tereza Tichá

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé práce Ing. Pavlu Křenkovi Ph.D. a všem členům z oddělení buněčné biologie CRH za odborné rady a věcné připomínky při zpracování této diplomové práce. Dále mé rodině a přátelům za podporu a trpělivost. Práce byla podpořena granty IGA (projekty č. IGA_PrF_2015_015 a IGA_PrF_2016_012) ze Studentské grantové soutěže na Univerzitě Palackého v Olomouci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Tichá
Název práce	Charakterizace transgenních linií ječmene s modifikovanou expresí vybraných mitogen-aktivovaných protein kinas
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Centrum regionu Haná
Vedoucí práce	Ing. Pavel Křenek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na molekulární, biochemickou a fyziologickou charakterizaci transgenních linií ječmene setého (*Hordeum vulgare*) s nadprodukcí a parciální nebo úplnou deplecí dvou mitogenem-aktivovaných protein-kinas (MAPK) ječmene. Genotypování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) potvrdilo přítomnost kompletních T-DNA kazet u všech studovaných transgenních linií ječmene. Nadprodukční transgenní linie měly výrazně zvýšenou hladinu mRNA manipulovaných MAPK a transgenní knock-down a knock-out linie měly výrazně sníženou hladinou mRNA manipulovaných MAPK. Transgenní a kontrolní linie byly podrobeny působení biotických a abiotických stresových faktorů a následně analyzovány pomocí western blotu s protilátkami, které specificky detekují aktivované verze manipulovaných MAPK. Výsledky těchto analýz ukázaly, že obě manipulované MAPK hrají důležitou roli v signalizaci biotického a oxidativního stresu. Biologické testy spojené s fenotypovou analýzou dále ukázaly, že nadprodukční linie jsou náchylnější na působení oxidativního stresu než kontrolní linie a linie s parciální nebo úplnou deplecí manipulovaných MAPK.

Klíčová slova	ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i>), transgenóze, MAPK, biotický a oxidativní stres, western blot
Počet stran	94
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Tereza Tichá
Title	Characterization of transgenic barley lines with altered expression levels of selected mitogen-activated protein kinases
Type of thesis	Diploma
Department	Centrum of the Region Haná
Supervisor	Ing. Pavel Křenek, Ph.D.
The year of presentation	2016

Abstract

This diploma thesis is focused on molecular, biochemical and physiological characterization of transgenic barley (*Hordeum vulgare*) lines with overproduction and partial or complete depletion of two barley mitogen-activated protein kinases (MAPKs). The presence of complete T-DNA cassettes was confirmed in all analyzed transgenic lines by means of polymerase chain reaction (PCR). Highly enhanced mRNA levels of manipulated MAPKs were detected in the overproduction lines, whereas the mRNA levels of manipulated MAPKs were strongly down regulated in the knock-down and knock-out lines. Transgenic and control lines were exposed to abiotic and biotic stress conditions and further analyzed by means of western blot with antibodies, which specifically detect activated versions of manipulated MAPKs. The result of this analysis showed that both MAPKs play an important role in biotic and abiotic stress signaling. Biological assays linked with phenotype analysis further showed that overexpression lines are more susceptible to oxidative stress than control lines and lines with partial or completed depletion of manipulated MAPKs.

Keywords	barley (<i>Hordeum vulgare</i>), transgenic technologies, MAPK, biotic and oxidative stress, western blot
Number of pages	94
Language	Czech

1. ÚVOD

Ječmen představuje v dnešním světě nepostradatelný zdroj surovin pro potravinářský a v poslední době rovněž pro farmaceutický průmysl a představuje společně s kukuřicí, rýží a pšenicí jednu z nejvýznamnějších zemědělských plodin. V poslední době ovšem dochází ke stále rapidnějším změnám v životním prostředí a tedy vzrůstá potřeba vyšlechtěných rostlin schopných odolávat stále se zhoršujícím klimatickým vlivům. Mezi nejčastější vlivy výrazně ovlivňující výnosnost lze zařadit teplotní nebo osmotický stres. Rostliny jsou ovšem ohrožovány nejen klimatickými extrémy, ale i různými škůdci. Důkladné pochopení a prostudování mechanismů obrany rostlin představuje důležitý krok pro přípravu mutantních rostlin s žádanými vlastnostmi. Jednou z významných skupin genů, účastnících se reakcí rostlin na stresové podněty biotického i abiotického typu, představují mitogenem aktivované proteinové kinázy.

Diplomová práce je rozčleněna na teoretickou a praktickou část. Teoretická část obsahuje čtyři kapitoly. První část podává obecné informace o ječmenu setém ve vztahu k taxonomickému zařazení a jeho významu v zemědělství. Druhá kapitola teoretické části představuje literární rešerši na téma mitogenem aktivované proteinové kinázy a dále se zabývá signální kaskádou, které se tyto enzymy účastní. Další kapitola podává přehled vybraných biotických a abiotických stresů a poslední kapitola popisuje metodu cílených editací genomu ječmene s využitím TAL efektor nukleáz (TALEN). Praktická část je věnována experimentům vykonaným v rámci diplomové práce s následným popisem získaných výsledků. Experimentální část je rozčleněna do několika kapitol popisujících výsledky molekulární, biochemické a fyziologické charakterizace transgenních rostlin ječmene. Veškeré výsledky jsou následně diskutovány, a poté shrnuty do závěru.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Ječmen setý

Taxonomické zařazení ječmene setého:

Říše: *Plantae* – rostliny

Oddělení: *Magnoliophyta* – rostliny krytosemenné

Třída: *Liliopsida* – rostliny jednoděložné

Řád: *Poales* – lipnicotvaré

Čeleď: *Poaceae* – lipnicovité

Podčeleď: *Pooideae*

Rod: *Hordeum* – ječmen

Druh: *Hordeum vulgare* L. – ječmen setý

(Vědecká synonyma: *Hordeum aegiceras* Nees ex Royle, *Hordeum coeleste* (L.) P. Beauv., *Hordeum irregulare* Aberg & Wiebe, *Hordeum sativum* Pers., *Hordeum sativum* var. *coeleste* (L.) Vilm., *Hordeum vulgare* var. *coeleste* L., *Hordeum vulgare* var. *trifurcatum* (Schlecht.) Alef.) Do čeledi lipnicovitých patří mnoho druhů rostlin, využívaných jako obiloviny, kromě ječmene např. pšenice, žito, tritikale, oves, kukuřice, čirok, rýže a další (Biolib, Kalina & Slavíková, 2003). Z historického hlediska je ječmen uváděn jako druhá nejstarší obilovina. První zmínky o ječmenu pocházejí z období 5000-7000 př.n.l., z území Mezopotámie (Clark, 1967). Celosvětová produkce ječmene se v roce 2015 pohybovala kolem 139,7 milionů tun (Statista 2015). V České republice se jedná o druhou nejpěstovanější obilninu po pšenici (Dreiseitl, 2003). Ječmen setý lze pěstovat jako zimní (ozimý) nebo jarní, tyto varianty se mezi sebou liší především výtěžností až o 30%. Větší výtěžnost je dosahována především u zimních odrůd (Špunar *et al.*, 2002). Ječmen odedávna patří mezi významné zemědělské plodiny, dnes je využíván v potravinářském průmyslu (Schulte *et al.*, 2009), a to hlavně ve sladovnickém průmyslu, případně jako krmivo pro koně (Pospíšilová *et al.*, 2016). V minulosti byly jeho obilky rovněž úspěšně použity pro produkci terapeutických proteinů, což nabízí možnosti využití ve farmaceutickém průmyslu (Mrízová *et al.*, 2013). Semena ječmene, podobně jako semena dalších obilnin obsahují vlákninu, která při konzumaci aktivně přispívá k lidskému zdraví, především pak ve smyslu snižování rizika výskytu kardiovaskulárních onemocnění, Diabetes melitus II typu a rakoviny tlustého střeva

(Collins *et al.*, 2010). Za zmínku rovněž stojí vysoká odolnost ječmene proti chladu, suchu, alkalické půdě a vůči solnému stresu (Hoffman *et al.*, 1979). Některé tibetské odrůdy ječmene jsou schopny růst v nadmořských výškách až kolem 4000 m.n.m. Geneticky je ječmen setý rostlina s diploidním genomem ($2n = 2x = 14$), se sedmi unikátními chromozomy. Velikost genomu ječmene je stanovena v rozmezí 4,9 až 5,3 x 10⁹ bp (Kleinhofs & Graner, 2001). V současné době je osekvenováno přibližně 90% jeho genomu (Mrízová *et al.*, 2013). V průběhu 20. století byla za účelem zvýšení výnosu a odolnosti vůči stresovým podmínkám vyšlechtěna odrůda ječmene Golden Promise, vyznačující se rychlým růstem, dobrou odolností vůči stresovým podmínkám a vysokou kvalitou sladu. Nevýhodou této odrůdy byla náchylnost k infekci padlí ječmene (Huckelhoven *et al.*, 2000). Navzdory tomu je tato odrůda nadále používána jako významná pokusná plodina.

2.2. Mitogenem-aktivované protein kinasy

Eukaryotické MAPK představují skupinu mitogen-aktivovaných proteinových kinas, zodpovídajících v eukaryotických buňkách za přenos a zesílení extracelulárních signálů do buňky (Smékalová *et al.*, 2014). Přenos extracelulárních signálů je realizován s pomocí tří typů reverzibilně fosforylovaných kinas. Jedná se o MAP kinasy kinasy kinasy (MAP3K, MAPKKK, MEKK), MAP kinasy kinasy (MAP2K, MKK, MEK) a MAP kinasy (MAPK, MPK) (Nakagami *et al.*, 2005; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2010). Všechny MAP kinasy se vyskytují ve dvou formách představující aktivovaný (fosforylovaný) a deaktivovaný (defosforylovaný) stav. Přejít z aktivovaného do deaktivovaného stavu je zprostředkován fosfatasami (Luan, 2003; Rodriguez *et al.*, 2010). MAPK stejně jako příslušné fosfatasy mohou mít rozličnou subcelulární lokalizaci (Bartels *et al.*, 2010). Aktivace MAPK souvisí se schopnostmi rostlin reagovat na vnější podněty. Jejich aktivace může být způsobena infekcí, patogenem, poraněním, nízkou a vysokou teplotou, suchem nebo osmotickým stresem (Morris, 2001). Další možností pro aktivování MAPK je aktivace prostřednictvím tzv. druhých posílů jako jsou například reaktivní formy kyslíku, oxid dusnatý nebo Ca²⁺ ionty (Xiong *et al.*, 2002). Schopnost aktivovat MAPK mají rovněž rostlinné hormony, především pak auxiny, kyselina abscisová nebo ethylen (Devoto & Turner, 2003). Význam MAPK kaskády spočívá v přenosu signálu na transkripční faktory a cytoskeletární proteiny (Ichimura *et al.*, 2002).

Nezanedbatelný je také vliv MAPK při reakci rostliny na stresové podmínky (Jonak *et al.*, 2002). MAPK jsou přítomny jak v jednoděložných tak i dvouděložných rostlinách. Jako jednoděložnou rostlinu s nejlépe prostudovanými MAP kinasami lze uvést rýži (Hamel *et al.*, 2006). V případě ječmene jsou MAP kinasy popsány pouze v malé míře. Nejvíce prozkoumaná MAPK v ječmeni je v současné době *HvMPK4*, u které byla prokázána významná funkce v procesu reakce na biotický a salinitní stres (Abass & Morris, 2013). Činnost MAP kinasových kaskád může být zobrazena s pomocí několika modelů. První model představuje MAP kinasy kinasy kinasy (MAP3K), které jsou umístěny na cytoplazmatické membráně a jsou aktivovány stimulováním transmembránových receptorů. Z hlediska funkce je možné je zahrnout mezi Ser/Thr kinasy, fosforylující Ser/Thr v konzervované proteinové sekvenci Ser/Thr-X(3-5)-Ser/Thr, kde X představuje volitelnou aminokyselinu. Druhý model zahrnuje MAP kinasy kinasy (MAP2K) zprostředkující aktivaci posledních MAP kinas. Jedná se o enzymy aktivované následnou fosforylací (Rodriguez *et al.*, 2010) se schopností fosforylovat MAP kinasy na aminokyselinách Thr/Tyr v konzervovaném sekvenčním motivu Thr-X-Tyr. Písmeno X zde představuje volitelnou aminokyselinu. V tomto případě je nutná fosforylace obou rezidui jak Thr i Tyr (Ichimura *et al.*, 2002, Nakagami *et al.*, 2005).

2.3. Vybrané stresy ovlivňující MAPK signální cestu

2.3.1. Osmotický stres

Osmotický stres je způsobován vysokou koncentrací látek v půdním roztoku, nebo sníženou dostupností vody pro rostlinu. Jedná se o vcelku běžný půdní jev inhibující růst kořenového systému. Rovněž dochází k omezení dostupnosti vody pro biochemické procesy, což má za následek poškození buněk, případně modulaci aktivity hormonálních metabolických drah (Munns & Tester, 2008; Munns, 2002; Dinneny, 2014; Geng *et al.*, 2013). Dalším problémem, který osmotický stres způsobuje, je inhibice procesu fotosyntézy vlivem hromadění iontů v listech (Müller *et al.*, 2014), a inhibice polymerace mikrotubulů s následným asymetrickým růstem kořenů (Shoji *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011). Na subcelulární úrovni osmotický stres způsobuje změnu turgoru rostlinné buňky a celkového objemu buňky. Rovněž dochází k následnému hromadění stabilizujících osmolytů a antioxidantů, jejichž

úkolem je zvýšení tolerance vůči osmotickému stresu (Hasegawa *et al.*, 2000). Často jednou z prvních pozorovatelných reakcí rostliny na osmotický stres je změna v růstu rostliny, kdy tento účinek bývá velmi často vysvětlován změnou v iontové rovnováze rhizosféry (Munns, 1993). Druhá fáze rostlinné reakce je časově podstatně náročnější a vyžaduje řádově dny nebo i týdny. Nejedná se ovšem pouze o důsledek primární stresové reakce (Munns, 2002). V této fázi dochází k poškození rostlinných buněk, které již nejsou schopny akumulovat ionty ve vakuolách (Läuchli & Grattan, 2007; Munns, 1993, 2002, 2005). Výsledná buněčná smrt má často lokální charakter, ovšem neznamena ještě nutně ohrožení celé rostliny, jelikož rostliny mohou preferovat strategii akumulace iontů ve starších listech, které nejsou pro danou rostlinu natolik klíčové (Munns & Tester, 2008). Mezi rostliny využívající metodu akumulace iontů patří kukuřice, která v případě stresu Na^+ ionty, hromadí tyto ionty ve vakuolách (De Costa *et al.*, 2007; Zorb *et al.*, 2009). Reakce rostlinných buněk na stresové podmínky vyvolané zvýšenou koncentrací iontů, zahrnuje dva hlavní režimy odezvy. První z nich je spouštění Ca^{2+} ionty jako signální molekulou a druhý z nich zahrnuje spouštění oxidativního vzplanutí v apoplastu (Ismail *et al.*, 2014). Výzkum osmotického stresu z hlediska zasolení půdy je poměrně jednoduchý z hlediska experimentálního provedení, vzhledem ke skutečnosti, že aplikování roztoku solí na zkoumanou rostlinu je snadno proveditelné (Verslues *et al.*, 2006). Pokud se rostlina dostane do osmotického stresu vyvolaného účinkem vysoké koncentrace Na^+ iontů, dochází primárně k transportu těchto iontů dovnitř buněk kořenového systému, za pomoci Na^+/K^+ symportu (Volkov *et al.*, 2009). Velmi často tímto způsobem dochází k deficienci K^+ a Ca^{2+} iontů, které hrají klíčovou roli v řadě biochemických procesů, a mohou tak vyvolat poškození rostlinných pletiv (Han *et al.*, 2014). Reakce rostlin na osmotický stres je velmi úzce spjatá s MAP kinázami. U *Arabidopsis thaliana* aplikace roztoku chloridu sodného indukuje aktivaci AtMPK4 a AtMPK6 (Ichimura, 2000). Rovněž u rýže byly nalezeny MAPK reagující na salinitní stres, mezi které patří OsMAPK5 (Xiong, 2003). V *Arabidopsis thaliana* jsou účinkem solí specificky aktivovány MPKK2 a tyto rostliny mají zvýšenou aktivitu MPK4 a MPK6 s následně zvýšenou tolerancí vůči osmotickému stresu (Teige, 2004). MPK6 kromě reakce na osmotický stres rovněž provádí fosforylaci ACS (syntázu 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny), která se účastní procesu biosyntézy ethyleny v *Arabidopsis thaliana* (Yu *et al.*, 2010).

2.3.2. Oxidativní stres

Oxidativní stres může být způsoben řadou rozličných příčin, mezi které náleží herbicidy, napadení patogenem nebo teplotní stres. Velmi významnou roli zde hrají reaktivní formy kyslíku (ROS) jako signální molekuly regulující řadu biologických procesů jako je růst, vývoj nebo reakce na rostlinný stres (Baxter *et al.*, 2013). ROS jsou reaktivní formy molekulárního kyslíku, včetně hydroxylového radikálu (HO^\cdot), superoxidu ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxidu vodíku (H_2O_2) a singletového kyslíku (Shapiguzov *et al.*, 2012). V posledních letech byla popsána řada zajímavých pohledů na činnost ROS a na jejich význam jako druhých posílů v regulaci buněčných procesů v různých částech buňky. Jako příklad místa, kde dochází k produkci ROS, je možné uvést chloroplasty, mitochondrie nebo peroxizomy (Rhoads *et al.*, 2006, Foyer *et al.*, 2003). Jednotlivé sloučeniny ROS se odlišují nejen z hlediska chemické povahy, ale také z hlediska toxicity. Kupříkladu superoxidový radikál je považován za nejstarší ROS, zatímco OH^\cdot patří mezi vysoce reaktivní ROS. Právě tato sloučenina má tedy ve srovnání s ostatními ROS mnohem vyšší potenciál k oxidačnímu poškození molekuly DNA, proteinů, sacharidů nebo lipidů. Různorodost funkce ROS je pravděpodobně způsobena rozdíly v regulačních mechanismech z hlediska tkáňové specifikace a prostorově-temporální koordinací mezi ROS a dalšími signály (Baxter *et al.*, 2013). Signalizační kaskády založené na ROS jsou vysoce konzervovány napříč aerobními organismy. Pro využití ROS jako posílů je nutné, aby rostlina striktně udržovala rovnováhu mezi produkcí ROS enzymy, samovolnou produkcí ROS a metabolickými procesy, které zahrnují pohlcování ROS (Mittler *et al.*, 2004; Mittler *et al.*, 2011). Reakce na stresové podněty zahrnují zvýšený tok Ca^{2+} iontů do cytosolu s následnou aktivací specifické MAP kinázy a fosforylací proteinů (Benschop *et al.*, 2007) v řádech několika málo minut od vystavení stresovým podmínkám (Benschop *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2009; Finka *et al.*, 2012). Následuje produkce řady ROS, které v buňce jako signální molekuly spouštějí další signalizační kaskády. Druhotnou reakcí na stresové podmínky, jsou fenotypové změny, jako je změna v růstu rostliny (Coupe *et al.*, 2006). Produkce ROS má tedy za následek aktivaci specifických MAPK signálních kaskád. Transkriptomická analýza *Arabidopsis thaliana* podrobeného stresovým podmínkám odhalila změny v expresi velkého počtu genů, mezi jejichž produkty patřily proteiny zprostředkovávající přenos signálu, účastníci se buněčné ochrany a reakce na stresové podmínky (Teige

et al., 2004). MAPK4 se například v *Arabidopsis thaliana* účastní regulace rovnováhy mezi kyselinou salicylovou a jasmonovou a podporuje biochemické dráhy syntetizující jasmonáty a ethylen. Některé MAPK mohou rovněž působit jako antagonisté pro abiotický stres. Jako příklad lze uvést AtMAPK1 která v *Arabidopsis* negativně reguluje putativní Na⁺/H⁺ antiportéry, což vede k citlivosti na obsah iontů (Chinnusamy *et al.*, 2006). Zajímavou látkou indukující abiotický stres v pletivech rostlin je paraquat. Jedná se o velmi široce používaný neselektivní herbicid, který se řazen mezi nejvíce toxické a nebezpečné herbicidy jak pro rostliny, tak i pro zvířata a člověka (Moustaka *et al.*, 2014; Aksakal, 2013; Huang *et al.*, 2014). Expozice rostlin *Arabidopsis thaliana* paraquatem měla za následek lokální zvýšení koncentrace peroxidu vodíku v listových cévních svazcích a sousedních buňkách mezofylu. Tolerance rostlin vůči biotickému stresu způsobeným paraquatem pravděpodobně souvisí s redoxním stavem chinonu A (Moustaka *et al.*, 2015). Rovněž v chloroplastech je možné generovat ROS vystavením listů účinkům paraquatu (Moustaka *et al.*, 2014, Mehler, 1951)

2.3.3. Biotický stres

Rostliny jsou schopny detekovat patogeny prostřednictvím PAMP (pathogen-associated molecular patterns) receptorů, případně s pomocí receptorů vzorově rozpoznávajících určité patogeny, na základě genetické identifikace. Jedním z těchto receptorů je flagelin senzitivní receptor 2 (Boller & Felix, 2009). Navzdory množství známých PAMP rozpoznávaných rostlinami, je množství takto specifikovaných receptorů stále omezené (Zipfel, 2009). Samotné PAMP ve své struktuře zahrnují lipopolysacharidy pro gram-negativní bakterie, případně kyselinou teichoovou pro grampozitivní bakterie. Mezi další látky řazené do této skupiny patří některé peptidoglykany, deriváty manosy, glukan nebo bakteriální DNA a RNA. Patogenní bakterie velmi často vylučují několik efektorů uvnitř rostlinných buněk, které se zaměřují na PAMP receptory nebo následné komponenty indukující imunitní reakci za účelem dosažení efektivní virulence (Göhre & Robatzek, 2008; Hann *et al.*, 2010). Množství patogenů si vyvinulo mechanismus, na základě kterého se potlačuje rozvoj imunitní reakce hostitele. Na druhé straně rostliny vyvinuly R proteiny, které specificky rozpoznávají tyto efekторы, nebo reagují na jejich činnost, což vede k efektorové imunitní reakci (Chinchilla *et al.*, 2009). Jednou z prvních reakcí na

PAMP jsou změny v toku iontů přes buněčnou membránu. Následkem toho je velmi rychlé a přechodné zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu (Boller & Felix, 2009). Ca^{2+} následně působí jako důležitý druhý posel pro aktivaci buněčné odpovědi na vystavení PAMP. Mezi enzymy významně se podílející na této reakci patří NADPH oxidáza, která je zodpovědná za oxidativní vzplanutí vyvolané účinkem PAMP, které je regulováno vápníkem a kalcium-dependentní protein kinásou (Boller & Felix, 2009; Boudsocq *et al.*, 2010). Důležitou oblastí v reakci rostlin na biotický stres je interakce flagelinu se specifickým membránovým receptorem FLS2 (Flagellin Sensing 2), který jako svůj substrát přijímá flagelin nebo flg22 peptid (Smith *et al.*, 2013) a iniciuje specifickou buněčnou odpověď. Vazba extracelulárního flagelinu na extracelulární doménu receptoru FLS2 vede k aktivaci signální kaskády s následnou aktivací nebo represí specifických genů, podílejících se na obraně reakci rostliny (Hadwigera & Chang, 2015). Další významnou molekulou v iniciaci obraně reakce rostlin je chitin, respektive chitinové oligomery. Chitin z chemického pohledu lze definovat jako polymer N-acetyl-D-glukosaminu tvořící důležitou součást buněčné stěny hub a plísní. V rostlinách se tento polymer běžně nevyskytuje, a proto jsou rostliny vybaveny enzymy uzpůsobenými pro jeho degradaci. Vzniklé chitinové oligomery následně pravděpodobně interagují se specifickými transmembránovými buněčnými receptory (Bulawa *et al.*, 1995, Shibuya *et al.*, 2001, Soulie *et al.*, 2006). Velmi důležitou roli v procesu reakce hostitele na patogen mají MAPK, které jsou důležité pro modulaci odpovědi rostlinných buněk na vnitřní i vnější podněty. Konkrétně u MAPK 3 a 6 byla detekována aktivace u *Arabidopsis* při vystavení rostlinné tkáně chitinu. Aktivace těchto MAPK je závislá na předcházejících MAPK kinázách (MKK4 a 5), což naznačuje, že rovněž MAPK 4 a 5 se mohou podílet na chitinové signalizaci a následné reakci hostitelské rostliny na napadení patogenem (Wan *et al.*, 2008).

2.3.4. Reakce na těžké kovy

Mezi těžké kovy patří Pd, Tl, Zn, Co, Cu, Ni, Mn, Mo, Fe, Hg, Pb a Cd. Všechny uvedené kovy jsou potenciálně toxické, což je v přímé souvislosti s koncentrací daného kovu v rostlinném pletivu a senzitivitě organismu k těmto kovům. Kovy lze rozdělit na esenciální kovy, vyskytující se v rostlinách ve vysokých koncentracích (Fe, Cu, Zn, Ni) a neesenciální toxické kovy (Pb, Cd, As). (Rascio *et al.*, 2011;

Jarup, 2003; Kien *et al.*, 2010). Dle rezistence proti těžkým kovům lze rostliny rozdělit do čtyř kategorií a sice na kovově senzitivní, kovově rezistentní, kovově tolerantní a kovově tolerantní akumulující. Reakce rostlin na kontakt s těžkými kovy je realizována pomocí kovové homeostázy, která indukuje reaktivní oxidační molekulovou signální dráhu. Reakcí rostlin na intoxikaci těžkými kovy je rovněž snížení objemu biomasy, inhibice růstu kořenů a další morfologické změny. V extrémním případě to může vyvolat až smrt rostliny (Lin & Arts, 2012). Rostliny mohou trpět jednak intoxikací zvýšeným množstvím jednoho nebo několika kovů, ale i jejich deficitem (Hanikenne, 2009). Rostliny obecně mají několik mechanismů pro ochranu případně reakci na expozici těžkými kovy (Verbruggen *et al.*, 2009; Marschner, 1991). První z nich je strategie, kdy se snaží rostlina zabránit vstupu těžkých kovů do kořenového systému nebo jejich distribuci v rámci rostliny. Rozpustnost kovu v rhizosféře je ovlivňována hodnotou pH, kationtovou výměnnou kapacitou, koncentrací kovových chelatačních sloučenin, případně koncentrací dalších organických látek a činností mikroorganismů (Ghosh & Singh, 2005). Jako jeden z ochranných mechanismů používají rostliny sekreci organických kyselin schopných tvořit komplexy s těžkými kovy, čímž potlačují jejich vstřebávání (Murphy & Taiz, 1995). Pokud ovšem nastane situace, kdy se rostlina nachází v oblasti vysoké koncentrace kovů, pak je výše popsán mechanismus ochrany před těžkými kovy zcela nedostačující. Ve snaze vyrovnat se s takovou situací rostliny vyvinuly odlišný způsob obrany, založený především na strategii tolerance. Tento způsob je založen především na detoxikačních mechanismech. Řada rostlin hromadí kovy v extrémně vysokých koncentracích a přednostně transportuje kovy do nadzemní části rostliny (Pollard *et al.*, 2002). Nezřídka se stává, že jsou produkty detoxikace kovy distribuovány rostlinou do starých listů, odkud se jich pak rostlina snáze zbavuje. Rostlina akumuluje kovy především s využitím proteinů označovaných jako fytochelatiny, jejichž základním kamenem je glutation (Jozefczak *et al.*, 2012). V závislosti na volbě strategie detoxikace je velmi důležité, aby rostlina měla zajištěnou správnou regulaci homeostázy esenciálních minerálů. Tento proces je realizován důslednou regulací biochemických drah zajišťujících transport esenciálních prvků (Lin & Aarts, 2012). Velkým problémem je často reakce rostliny na smíšenou kontaminaci půdy zinkem a mědí. Samotná měď náleží mezi nejvíce potřebné, ale také nejvíce toxické těžké kovy pro růst a vývoj rostlin. Přítomnost mědi je nezbytným předpokladem pro růst a vývoj rostliny. Měď je rovněž velmi

důležitou složkou Cu/Zn superoxid dismutas (Cu/Zn-SOD), které jsou lokalizovány v podpurné vazivové tkáni s ochrannou funkcí proti reaktivním formám kyslíku, generovaným během fotosyntetických reakcí (Yruela, 2009). Velmi významnou toxicitu má měď hlavně pro fotosyntetické buňky v rostlinných pletivech, kde toxicita mědi výrazně ovlivňuje produkci reaktivních forem kyslíku. Měď rovněž způsobuje poruchy příjmu některých dalších prvků, mezi které náleží například železo. Pokud je rostlina chronicky intoxikována mědí, rovněž dochází k omezení příjmu zinku (Thomas *et al.*, 2013). Při zkoumání kořenů rýže intoxikovaných mědí bylo prokázáno, že měď ovlivňuje vezikulární transport (Lin *et al.*, 2013). Další skupinu procesů, kterou měď v rostlině ovlivňuje, je signalizace v kooperaci s oxidem dusnatým, kdy dochází k indukci syntézy bílkovin při mikromolárních koncentracích mědi (Zhang *et al.*, 2008). Rostlina se snaží využívat různé obranné mechanismy pro snížení toxicity mědi, mezi které patří především transportéry mědi, které měď přesunují z vnitřního do vnějšího prostředí (Cuypers *et al.*, 2002). Dalším významným kovem, který je důležitý pro rostliny, je zinek. Zinek je velmi důležitý neesenciální prvek účastnící se řady biochemických procesů, jako je růst rostliny, příjem a skladování živin. Zinek se rovněž podílí na obraně rostliny proti oxidačnímu stresu, ovšem nadměrná koncentrace zinku způsobuje zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku (Tewari *et al.*, 2008). V některých oblastech světa je především problém s deficitem zinku, nikoli s jeho přítomností v toxických koncentracích. Pokud se ovšem rostlina vyskytuje v půdě, která je přirozeně bohatá na zinek, může se zinek projevovat svými toxickými účinky, které jsou především založeny na substituci v proteinech slabě vázaných dvojmocných prvků právě zinkem. Jednou z možností, kde tato událost může nastat je nahrazení dvojmocného hořčíku v molekule chlorofylu zinkem. Dochází tak ke vzniku nefunkční molekuly, která má za následek inhibici procesu fotosyntézy (Watanabe *et al.*, 1988; Küpper *et al.*, 2003). Následný úbytek fotosyntetizujících pigmentů má za důsledek viditelnou chlorosu rostliny, která je typickým příznakem toxických účinků zinku. Mezi další příznaky intoxikace rostliny zinkem náleží snížení růstu rostliny a nekróza některých tkání vlivem produkce anthokyanů. Další prvek, který zinek pravděpodobně substituuje v enzymech při vysoké koncentraci, je železo. U rostlin zkoumaných v této souvislosti byl nalezen snížený obsah železa a všech fotosyntetizujících pigmentů (Sagardoy *et al.*, 2009). Srovnatelné výsledky byly rovněž popsány při zkoumání deficitu železa. Je tedy možné, že zvýšená koncentrace zinku vyvolala deficit železa (Larbi *et al.*,

2006; Bonnet *et al.*, 2000). Rovněž bylo experimentálně zjištěno, že nadměrná koncentrace kovových iontů indukuje aktivaci specifických MAPK (Jonak *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2010; Arroyo-Serraltan *et al.*, 2005). Produkce ROS vyvolaná vysokou koncentrací Cu spouští aktivaci SIMK (solným stresem indukovaná MAPK) a SAMK (stresem aktivovaná MAPK) přes SIMKK (solným stresem indukovaná MAPK kinasa) (Jonak *et al.*, 2004).