

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií

**CHARAKTERIZACE SUPEROXIDDISMUTAS U  
ROSTLIN *MEDICAGO TRUNCATULA* A  
*MEDICAGO SATIVA L.***



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Kristýna Pokorná**

Studijní program: B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství

Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.

Rok: 2024

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. 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 .....

.....

Podpis studenta

## **Poděkování:**

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce panu Mgr. Petru Dvořákovi, Ph.D. za věnovaný čas, za trpělivost, kterou se mnou měl, za cenné rady a za vedení experimentální části mé práce. Dále bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům katedry biotechnologií. Chtěla bych poděkovat vedoucímu katedry panu prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc za poskytnutí kvalitních přístrojů a laboratorního vybavení potřebných k vypracování této práce. Jmenovitě bych chtěla poděkovat Mgr. Janu Řehákovi a Bc. Maryně Tsinyk, za jejich ochotu, rady a pomoc. Nejvíce bych chtěla poděkovat mé rodině, která mě od malička podporovala ve všech mých cestách a rozhodnutích. Díky jejich podpoře mi bylo umožněno se vzdělávat a studovat, za což jsem jim velmi vděčná. Na závěr bych chtěla poděkovat všem mým přátelům, za to že mi byli psychickou oporou a že mě vyslechli.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Kristýna Pokorná
Název práce:	Charakterizace superoxiddismutas u rostlin <i>Medicago truncatula</i> a <i>Medicago sativa</i> L.
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra biotechnologií
Vedoucí práce:	Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024

### Abstrakt:

Vývoj rostlin a řadu buněčných procesů provází vznik reaktivních forem kyslíku (ROS). Někteří zástupci ROS hrají důležitou roli jako druhotní poslové a jsou zapojeny do procesu signalizace u rostlin. Nadměrná akumulace ROS během působení stresu vede k oxidaci biomolekul a poškození subcelulárních struktur. Z tohoto důvodu je pro rostliny zcela nezbytné regulovat hladinu ROS v buňkách tak, aby nepřekračovala fyziologické koncentrace. Hladinu ROS v buňkách reguluje systém antioxidační obrany, jehož součástí je i enzymatická rodina superoxiddismutas (SOD). Expres *Cu/ZnSOD* (CSD) a *FeSOD1* (FSD1) u rostliny *Arabidopsis thaliana* je závislá na hladinách mědi a je řízena transkripčním faktorem SQUAMOSA promoter-binding protein-like7 (SPL7), který je zcela klíčový pro udržování homeostasy mědi u rostlin. Předchozí práce naznačují, že tato regulace SOD je částečně narušena u rostliny *Medicago sativa*, která je známá pro svoji schopnost iniciovat symbiotický vztah s dusík fixující bakterií *Sinorhizobium meliloti*.

Předmětem této práce bylo ověření zachování této regulační dráhy SOD řízené SPL7 u příbuzného druhu *Medicago truncatula*. Byla provedena detekce aktivit a abundance SOD isoform za využití metod NATIVE PAGE s následným specifickým barvením SOD aktivit a Western-blot. Pomocí inhibičních analýz aktivit byly popsány SOD isoformy *M. truncatula*. Již dříve byl u *M. truncatula* identifikován gen *MtCSD2*, který pravděpodobně nemá homologa u *A. thaliana*. Protein *MtCSD2* by měl být lokalizován v chloroplastu, dle dříve provedené lokalizační predikce. Dalším cílem této práce byla příprava konstruktů *35S::MtCSD2::GFP*, jehož funkčnost byla ověřena transienční transformací v *Nicotiana benthamiana*, která odhalila přítomnost *MtCSD2*-GFP v chloroplastu, cytoplazmě a jádře.

Klíčová slova: oxidativní stres, enzymatická antioxidační obrana, superoxiddismutasy, SQUAMOSA promoter-binding protein-like7, CSD2. *Medicago truncatula*, *Medicago sativa*

Počet stran: 72

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Kristýna Pokorná

Title: Characterization of superoxid dismutases in *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* L.

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Biotechnology

Supervisor: Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Abstract:

Plant development and many cellular processes are accompanied by the production of reactive oxygen species (ROS). Some ROS representatives play important roles as second messengers and are involved in the signaling process in plants. Excessive accumulation of ROS during stress leads to oxidation of biomolecules and damage to subcellular structures. Plants must effectively manage ROS levels within cells to prevent exceeding the physiological concentrations of ROS, which are regulated by the antioxidant defense system, including the superoxide dismutase (SOD) enzyme family. The expression of Cu/ZnSOD (CSD) and FeSOD1 (FSD1) in *Arabidopsis thaliana* depends on copper levels. It is controlled by the SQUAMOSA promoter-binding protein-like7 (SPL7) transcription factor, which is a full component of maintaining copper homeostasis in plants. Previous work suggests that this SOD regulation is partially disrupted in *Medicago sativa*, a plant known for its ability to initiate a symbiotic relationship with the nitrogen-fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti*.

The present work was undertaken to verify the maintenance of this SPL7-driven SOD regulatory pathway in the related species *Medicago truncatula*. Detection of SOD isoforms activity and abundance were performed using NATIVE PAGE with specific SOD activity staining and Western-blot methods. The SOD isoforms of *M. truncatula* were characterized using inhibitory activity assays. The *MtCSD2* gene was previously identified in *M. truncatula*, which probably has no homologues in *A. thaliana*. The *MtCSD2* protein is predicted to be localized in the chloroplast, according to previous bioinformatic predictions. Another aim of this work was to prepare a *35S::MtCSD2::GFP* construct whose functionality was verified by transient transformation in *Nicotiana benthamiana*, which revealed the presence of *MtCSD2*-GFP in the chloroplast, cytoplasm and nucleus.

Keywords: oxidative stress, enzymatic antioxidant system, superoxide dismutases, SQUAMOSA promoter-binding protein-like7, CSD2. *Medicago truncatula*, *Medicago sativa*

Number of pages: 72

Number of appendices: 0

Language: Czech

## OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Současný stav řešené problematiky .....	2
2.1	Reaktivní formy kyslíku.....	2
2.1.1	Charakterizace zástupců reaktivních forem kyslíku .....	3
2.1.2	Signalizační a vývojová role ROS .....	6
2.1.2.1	Vznik ROS v apoplastu a šíření signálu.....	7
2.1.2.2	Zapojení ROS do fyziologických procesů rostlin .....	8
2.2	Antioxidační obrana .....	9
2.2.1	Neenzymatická antioxidační obrana .....	9
2.2.1.1	Askorbát .....	9
2.2.1.2	Tokoferoly .....	9
2.2.1.3	Glutathion.....	10
2.2.1.4	Karotenoidy.....	10
2.2.2	Enzymatická antioxidační obrana .....	11
2.2.2.1	Katalasa .....	11
2.2.2.2	Peroxidasy .....	11
2.2.2.3	Askorbát-glutathionový cyklus .....	12
2.2.3	Superoxiddismutasy .....	12
2.2.3.1	Cu/Zn superoxiddismutasy .....	14
2.2.3.2	FeSOD.....	15
2.2.3.3	MnSOD .....	16
2.2.3.4	Regulace exprese superoxiddismutasy řízená SPL7 .....	16
2.2.3.5	Rodina superoxiddismutasy u <i>M. truncatula</i> a <i>M. sativa</i> .....	17
2.3	Nodulace u rostlin <i>Medicago sativa</i> a <i>Medicago truncatula</i> .....	20
2.3.1	Zapojení superoxiddismutasy do procesu nodulace.....	23
3	Experimentální část.....	26
3.1	Biologický materiál.....	26
3.2	Přístroje a pomůcky.....	26
3.3	Seznam použitých programů a databází.....	27
3.4	Chemikálie .....	27
3.5	Složení roztoků a médií.....	30
3.6	Metody .....	34
4	Výsledky .....	48
4.1.1	Stanovení aktivit superoxiddismutasy u <i>M. truncatula</i> v závislosti na různé dostupnosti mědi .....	48
4.1.2	Imunolokalizace SOD izoenzymů u <i>M. truncatula</i> .....	51

4.1.3	Příprava konstruktů <i>35S::MtCSD2::GFP</i> .....	53
4.1.3.1	Izolace cDNA z <i>M. truncatula</i> .....	53
4.1.3.2	Rekombinační reakce: MultiSite Gateway® Technology.....	55
4.1.3.3	Mikroskopická analýza konstruktů <i>35S::MtCSD2::GFP</i> .....	58
5	Diskuse.....	61
6	Závěr .....	64
7	Literatura.....	65
8	Seznam použitých zkratk .....	70



## CÍLE PRÁCE

Vypracování rešerše na téma:

- Reaktivní formy kyslíku a jejich detoxifikace pomocí antioxidační obrany rostlin se zaměřením na superoxiddismutasy (SOD).
- Popsání závislosti a regulace SODs skrze dostupnost mědi a zapojení SQUAMOSA promoter-binding protein-like7 transkripčního faktoru do jejich regulace.
- Proces nodulace u rostlin *Medicago truncatula* a *Medicago sativa* L. a možné zapojení SOD v tomto procesu.

Experimentální cíle:

- Získání praktických zkušeností v práci s rostlinami a v základních molekulárně-biologických a biochemických metodách.
- Ověření vlivu různých koncentrací mědi v růstovém médiu na abundanci a aktivitu SOD u divokého typu *M. truncatula*. Definování jednotlivých izoenzymů SOD pomocí inhibiční analýzy u *M. truncatula*.
- Příprava konstruktů (*35S::MtCSD2::GFP*) pro fluorescenčně značenou *MtCSD2* pod kontrolou nadexpresního promotoru pomocí metody.
- Ověření funkčnosti připraveného konstruktů pomocí transienční transformace s následnou mikroskopií.

## 1 Úvod

Veškeré aerobní organismy jsou závislé na přítomnosti kyslíku v atmosféře. Jeho odhadovaný obsah v atmosféře je v současné době ~ 20,95 %. Kyslík byl hybnou silou pohánějící evoluci biosféry na planetě Zemi (Mills et al., 2023) a je akceptorem elektronů v řadě biologických procesů. Tato reakce však může vést ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS). Pro rostliny je gradient ROS důležitý pro určité vývojové procesy, nicméně v buňkách musí být ROS udržovány homeostáze, protože jejich nadměrná akumulace vede k oxidativnímu poškození buněčných struktur (Dreyer & Schippers, 2019). Oxidativní stres vzniká v důsledku působení biotických i abiotických stresorů na organismus. Vzhledem k sesilnímu způsobu života došlo právě u rostlin k vývoji propracovaného a účinného systému antioxidační obrany (Janků et al., 2019). Superoxiddismutasy (SOD) jsou primárními antioxidačními enzymy přítomnými u organismů (Dreyer & Schippers, 2019).

Expres *Cu/ZnSOD* a *FeSOD1* je u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* závislá na dostupnosti mědi, přičemž regulace exprese je řízena prostřednictvím transkripčního faktoru SQUAMOSA promoter binding protein-like7 (SPL7) (Yamasaki et al., 2009). Bylo zjištěno, že regulace exprese *FeSOD* prostřednictvím SPL7 byla narušena u hospodářsky významné plodiny *Medicago sativa* (Hanáková, 2022). Předmětem této práce je stanovení vlivu dostupnosti mědi na aktivitu a abundanci SOD u příbuzné rostliny *Medicago truncatula*. K tomuto stanovení byly použity biochemické metody NATIVE PAGE s následným specifickým barvením aktivity SOD a Western-blot. Cílem této části práce bylo především ověřit, zda u *M. truncatula* byla rovněž v průběhu evoluce narušena regulace exprese *FeSOD* řízená transkripčním faktorem SPL7.

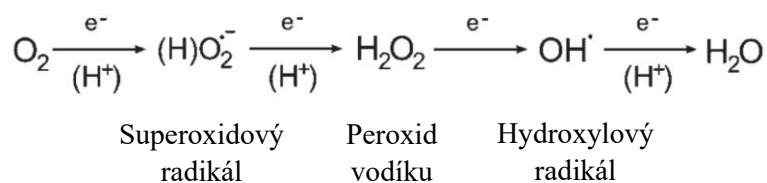
Skupina *SOD* genů se vyznačuje mezidruhovou konzervovaností, avšak u *M. sativa* a *M. truncatula* došlo k vývoji *CSD2*, který se zdá být pro tyto rostliny unikátní, u *A. thaliana* není pravděpodobně v genomu obsažen ortologní gen. Pro *CSD2* byla porovnáním proteinových sekvencí u *M. truncatula* predikována chloroplastická lokalizace proteinu (Hanáková, 2022). Za účelem potvrzení predikované lokalizace *CSD2* u *M. truncatula* byla část této práce zaměřena na genové inženýrství. Pomocí technologií MultiSite Gateway® byl připraven konstrukt *35S::MtCSD2:GFP* jako osučást vektoru *pB7m34GW* a byla provedena validace funkčnosti konstruktu pomocí transientní transformace *Nicotiana benthamiana* s následnou mikroskopickou analýzou.

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Reaktivní formy kyslíku

Přítomnost kyslíku v atmosféře je nezbytná pro život veškerých aerobních organismů, které získávají energii při procesu oxidativní fosforylace. Aerobní metabolismus umožňuje organismům efektivnější tvorbu energie, což umožnilo organismům vyvinout se v složitější formy života. Kyslík hraje klíčovou roli v elektronovém transportním řetězci, kde je koncovým příjemcem elektronů. Paradoxně je však kyslík pro aerobní organismy toxický. Při vystavení organismů zvýšené koncentraci kyslíku dochází oxidativnímu poškození buněk. K oxidativnímu poškození však dochází i při normální koncentraci kyslíku. Superoxidová teorie toxicity kyslíku označuje jako příčinu toxicity kyslíku nadměrnou tvorbu superoxidových radikálů, který vzniká redukcí molekuly kyslíku (Obrázek 1) (Halliwell, 2006).

Ze superoxidového radikálu mohou být generováni další zástupci reaktivních forem kyslíku (ROS). ROS se vyznačují vysokou reaktivitou, díky přítomnosti nespárovaných elektronů a nestabilní elektronové konfiguraci. Hlavními zástupci ROS v buňkách rostlin jsou superoxidový radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), hydroxylový radikál ( $OH^{\cdot}$ ), singletní kyslík ( $^1O_2$ ) (Halliwell, 2006). Jednotliví zástupci ROS jsou dále charakterizováni v kapitole (2.1.1).



Obrázek 1: Produkce reaktivních forem kyslíku prostřednictvím víceúrovňové redukce molekuly kyslíku. Převzato z (Gechev et al., 2006).

Většina ROS vzniká při aktivaci kyslíku v elektronových transportních řetězcích. ROS jsou generovány v řadě buněčných struktur – v chloroplastech, mitochondriích, peroxisomech, apoplastu a částečně i v cytosolu. U rostlin je hlavním místem produkce právě chloroplast (Alscher et al., 2002).

ROS jsou přítomny v rostlinných i živočišných buňkách při běžných fyziologických podmínkách. Problém však nastává, když jsou ROS nadměrně generovány, a to například během působení biotického a abiotického stresu. Zvýšená akumulace ROS vyvolává v buňkách oxidativní stres (He et al., 2018). Během oxidativního stresu ROS narušují

strukturu biomolekul (lipidů, proteinů, nukleových kyselin) a dochází tak k poškození buněčných struktur, například membránových systémů, což negativně ovlivňuje fyziologické procesy (Alscher et al., 2002). Vzhledem k tomu že rostliny žijí přisedle, musely si během evoluce vytvořit systém adaptací, aby mohly růst a prospívat i za nepříznivých podmínek okolí (He et al., 2018). Adaptací rostlin na oxidační stres je propracovaný systém enzymatické a neenzymatické antioxidační obrany (Alscher et al., 2002), která je detailněji probírána v kapitole 2.2.

Jak již bylo zmíněno, ROS jsou sice při vyšší koncentraci toxické, ale současně je jejich přítomnost v buňkách nezbytná. ROS figurují během působení stresu jako převaděče signálu (sekundární poslové) v signalizačních drahách a jsou zapojeny do řady fyziologických a vývojových procesů rostlin (Del Río & López-Huertas, 2016). ROS aktivují odpověď rostliny na stres a spouštějí fyziologické změny nezbytné pro adaptaci rostliny, čímž zvyšují toleranci rostlin vůči stresu (Del Río & López-Huertas, 2016; He et al., 2018). Pro plné pochopení funkcí ROS je neprve nutné vysvětlit jejich původ vzniku v rostlině a jejich chemické vlastnosti.

### 2.1.1 Charakterizace zástupců reaktivních forem kyslíku

Jednotlivé ROS se vzájemně odlišují mírou reaktivity a poločasem rozpadu, které jsou závislé na jejich struktuře a elektronovém uspořádání. Řada ROS existuje ve formě volných radikálů. Radíme mezi ně  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$ , peroxylový radikál ( $\text{ROO}\cdot$ ), hydroxyperoxylový radikál ( $\text{HO}_2\cdot$ ). Volný radikál je molekula, která se vyskytuje volně a ve svém orbitalu obsahuje nespárovaný elektron, díky čemuž se molekula vyznačuje zvýšenou reaktivitou. I molekula  $\text{O}_2$  je ve své podstatě volným radikálem, protože obsahuje dva nespárované elektrony (Halliwell, 2006).

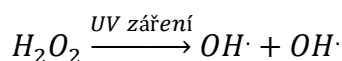
Obecně lze říci, že nebezpečnost radikálů pro buňky spočívá v tom, že mohou spustit řetězovou reakci kterou je například peroxidace lipidů. Během peroxidace lipidů dochází k poškození membránových proteinů, kanálů a receptorů. Může dojít k narušení integrity membrán kvůli fragmentaci řetězce mastných kyselin. Membrána se může stát propustnější pro sloučeniny, které jí běžně prochází přes specifické iontové kanály. Můžou být vytvářeny sloučeniny, které mají schopnost ničit tkáň a pletiva jako jsou např. isoprostany a kyselina eikosapentaenová. Rozkladem lipidových peroxidů vznikají toxické sloučeniny, které narušují molekuly DNA a jsou potenciálními mutageny – nasycené a nenasycené aldehydy, ketony, epoxidy (Halliwell, 2006).

Nejvíce reaktivním zástupcem ROS je právě  $\text{OH}\cdot$ , zároveň má však tato molekula nejnižší životnost a je nejméně stabilní ze všech ROS ( $t_{1/2} = 1 \text{ ns}$ ), též má nejkratší migrační vzdálenost – 1 nm (Mittler, 2017).  $\text{OH}\cdot$  má silné destrukční účinky vůči biomolekulám (nukleovým kyselinám, proteinům a lipidům). Organismy nemají antioxidační obranu přímo cílenou na tuto formu ROS, jejich taktikou je zabránit formaci  $\text{OH}\cdot$ . Ten vzniká interakcí jiných ROS (Haber-Weissova reakce), nebo při reakci ROS a iontů kovů, proto je cílem eliminovat množství těchto faktorů přispívajících k tvorbě  $\text{OH}\cdot$  (Gechev et al., 2006). Místem vzniku  $\text{OH}\cdot$  uvnitř buněk jsou chloroplasty, peroxisomy a mitochondrie (Mittler, 2017). K produkci  $\text{OH}\cdot$  dochází také v buněčné stěně a cytoplazmatické membráně (Richards et al., 2015).  $\text{OH}\cdot$  vzniká Fentonovou reakcí (Obrázek 2), kdy ve vodě rozpustný  $\text{Fe}^{2+}$  reaguje s  $\text{H}_2\text{O}_2$ . K této reakci může docházet v živých organismech, proto je v nich limitováno množství dostupného  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Halliwell, 2006).



Obrázek 2: Vznik hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí (Halliwell, 2006).

Dále může  $\text{OH}\cdot$  vznikat působením UV záření na molekulu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , kdy dochází k rozpadu vazby mezi atomy kyslíku (Obrázek 3).



Obrázek 3: Vznik hydroxylového radikálu působením UV záření na molekulu peroxidu vodíku (Halliwell, 2006).

Navzdory svým ničivým účinkům a krátkému poločasu rozpadu figuruje  $\text{OH}\cdot$  jako signalizační molekula (Richards et al., 2015) (viz. kapitola 2.1.2).

Dalším poměrně reaktivním zástupcem ROS je  $^1\text{O}_2$  ( $t_{1/2} = 1\text{-}4 \mu\text{s}$ , migrační vzdálenost – 30 nm) (Mittler, 2017), který vzniká při excitaci  $\text{O}_2$ , během níž dochází ke změně konfigurace elektronů v orbitalech, což zvyšuje oxidační schopnosti  $\text{O}_2$ . V chloroplastech vzniká  $^1\text{O}_2$  během fotosyntézy ve fotosystému II (PSII) při nedostatečné disipaci energie. Excitací vzniká tripletní chlorofyl, z něhož může dojít k přenosu energie na  $\text{O}_2$  za vzniku  $^1\text{O}_2$ , který poškozuje fotosyntetický aparát v chloroplastu (Halliwell, 2006).  $^1\text{O}_2$  může být generován i v peroxisomech, mitochondriích a v jádře (Del Río & López-Huertas, 2016).  $^1\text{O}_2$  vzniká v přítomnosti iontu kovu v Haber-Weissově reakci (Obrázek 4), kdy spolu reagují  $\text{O}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Vzniká také vysoce reaktivní  $\text{OH}\cdot$  (Mor et al., 2014).



Obrázek 4: Vznik singletního kyslíku během Haber-Weissovy reakce (Khan & Kasha, 1994).

Cílem  ${}^1\text{O}_2$  jsou proteiny (konkrétně aminokyselinové zbytky cysteinu, histidinu, tryptofanu a tyrosinu), taktéž  ${}^1\text{O}_2$  může přenést svou energii na nenasycené mastné kyseliny, dochází k jejich peroxidaci (Gechev et al., 2006; Mittler, 2017). I přestože je  ${}^1\text{O}_2$  toxický, je signální molekulou viz. kapitola 2.1.2 (Halliwell, 2006). K zhášení  ${}^1\text{O}_2$  dochází zejména působením malých lipofilních antioxidantů, kterými jsou tokoferoly a karotenoidy. Potenciálními zhášení  ${}^1\text{O}_2$  jsou plastochinon a D1 protein PSII (Janků et al., 2019).

Méně reaktivním zástupcem ROS je  $\text{O}_2^-$ . V porovnání s  $\text{OH}^\cdot$  a  ${}^1\text{O}_2$ , má nicméně podobný poločas rozpadu jako  ${}^1\text{O}_2$  ( $t_{1/2} = 1-4 \mu\text{s}$ , migrační vzdálenost – 30 nm). V případě když  $\text{O}_2$  přijme elektron, který obsadí orbital  $\pi^*$ , vzniká  $\text{O}_2^-$  (Halliwell, 2006). Místa vzniku  $\text{O}_2^-$  v rostlinných buňkách jsou chloroplast, mitochondrie, peroxisomy, cytoplazma a apoplast (Janků et al., 2019). V chloroplastech je generován  $\text{O}_2^-$  jak ve fotosystému I (PSI), tak i ve PSII, v PSII může dojít k úniku elektronů, což vede k redukci  $\text{O}_2$  (Janků et al., 2019). Během světelné fáze fotosyntézy je na akceptorové straně PSI generován  $\text{O}_2^-$  Mehlerovou reakcí, která je dependentní na nízké hladině  $\text{NADP}^+$  a na přítomnosti redukováných proteinů thioredoxinu a ferredoxinu (Waszczak et al., 2018). V mitochondriích je  $\text{O}_2^-$  běžně produkován v elektronovém transportním řetězci během respirace. V nadměře je produkován v případě, kdy je limitována rychlost respirace dostupností ADP (Janků et al., 2019). V peroxisomu je  $\text{O}_2^-$  generován jak v membráně, tak i v matrix. V matrix peroxisomu je  $\text{O}_2^-$  generován systémem xantinoxidasy (XO), který katalyzuje oxidaci xantinu a hypoxantinu na kyselinu močovou. Dále  $\text{O}_2^-$  vzniká v membráně peroxisomu jako produkt elektron transportního řetězce do nějž jsou zapojeny enzymy flavoprotein NADH:ferrikyanidreduktasa a cytochrom b (Del Río & López-Huertas, 2016). Tvorba  $\text{O}_2^-$  v apoplastu aktivitou NADPH oxidas je samostatně popsána v kapitole 2.1.2.1.

Cílem  $\text{O}_2^-$  jsou proteiny, kdy má schopnost inaktivovat enzymy a mění jejich katalytickou aktivitu, zejména pokud obsahují Fe-S klastr (Halliwell, 2006). Díky negativnímu náboji není  $\text{O}_2^-$  schopen průchodu přes buněčné membrány, avšak v kyselém prostředí se vyskytuje v protonované formě  $\text{HO}_2^\cdot$ . Protonovaná forma je schopná procházet přes buněčné membrány, spouští oxidaci lipidů (Halliwell, 2006). Hodnota pH tedy ovlivňuje

distribuci  $O_2^-$  v buněčných strukturách, až 16 %  $O_2^-$  se vyskytuje právě v protonované formě (Janků et al., 2019).

Nejméně reaktivní ROS je molekula  $H_2O_2$ , současně má však  $H_2O_2$  nejdelší životnost v porovnání s ostatními ROS a je nejstabilnější molekulou ROS. Má nicméně poměrně velkou migrační vzdálenost ( $t_{1/2} > 1$  ms, migrační vzdálenost  $> 1$   $\mu$ m) (Mittler, 2017). Stabilita a nízká reaktivita  $H_2O_2$  souvisejí se zapojením této molekuly do buněčné signalizace. Toto zapojení je nicméně podmíněno efektivním průchodem molekul přes buněčné membrány.  $H_2O_2$  nemůže volně difundovat z místa vzniku do okolních buněk, pohyb této molekuly přes membrány je zprostředkován kanály v membráně – aquaporiny (Bienert et al., 2006; Henzler & Steudle, 2000). Bylo zjištěno že aquaporiny mají schopnost regulovat intracelulární a intercelulární výměnu  $H_2O_2$ , díky čemuž se tyto kanály částečně podílejí na regulaci signalizace (Bienert & Chaumont, 2014).

K tvorbě  $H_2O_2$  v rostlinných buňkách dochází v peroxisomech, chloroplastech, mitochondriích, cytoplazmě, apoplastu (Mittler, 2017). Pravděpodobně velká část  $H_2O_2$  v buňkách má původ v peroxisomech, kde vzniká aktivitou glykolát oxidasy, acyl-Co-A-oxidasy, flavinioxidasy a dismutací  $O_2^-$  (Del Río & López-Huertas, 2016).  $H_2O_2$  je generován v mitochondriích v elektronovém transportním řetězci a dismutací  $O_2^-$ , rovněž vzniká v elektronovém transportním řetězci lokalizovaném v membránách endoplazmatického retikula. V PSII  $H_2O_2$  vzniká při neúplné oxidaci molekuly vody, taktéž je  $H_2O_2$  v chloroplastech generován dismutací (Janků et al., 2019). I přes nižší reaktivitu  $H_2O_2$  oproti ostatním ROS narušuje  $H_2O_2$  strukturu biomolekul, tyto atakuje cysteinové a methioninové zbytky proteinů, rovněž negativně interagují s molekulami DNA (Mittler, 2017).

Za zmínku taktéž stojí, že ROS radikálové povahy mohou indukovat tvorbu reaktivních forem dusíku (RNS), což jsou taktéž významné molekuly pro buněčnou signalizaci (Farnese et al., 2016). Například reakcí  $O_2^-$  s radikálem oxidu dusnatého (NO) vzniká peroxyinitrit ( $ONOO^-$ ). Protonovaná forma peroxyinitritu – kyselina peroxydusitá ( $ONOOH$ ) je silným oxidantem (Halliwell, 2006).

### 2.1.2 Signalizační a vývojová role ROS

V minulosti byly ROS vnímány pouze jako cytotoxické molekuly, v současnosti však došlo k změně pohledu na tuto skupinu molekul, které jsou nezbytnou součástí buněčné

signalizace, regulují řadu buněčných procesů a ovlivňují genovou expresi (Shapiguzov et al., 2012).

ROS v signalizaci figurují jako sekundární poslové – redoxně působí na signalizační molekuly, čímž moduluji jejich aktivitu. ROS interagují s proteiny, které mají ve své struktuře určité motivy senzitivní vůči oxidaci (vázané atomy kovů, zbytky cysteinu, methioninu), právě oxidací může být ovlivněna biologická aktivita těchto proteinů. Prostřednictvím ROS mohou být aktivovány reverzibilní oxidací redoxně senzitivní proteiny – thioredoxiny, glutaredoxiny, peroxiredoxiny. ROS mohou měnit redoxní stav transkripčních faktorů a tím je aktivovat (Waszczak et al., 2018). Prostřednictvím ROS mohou být aktivovány MAPK kaskády („MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE“) (Jalmi & Sinha, 2015). ROS mohou rovněž interagovat s fytohormony, RNS,  $\text{Ca}^{2+}$  (Janků et al., 2019). Nejlépe je popsána signalizační role  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ten interaguje s řadou molekul - ABA (kyselina abscisová), ET (ethylen), JA (kyselina jasmonová), SA (kyselina salicylová), NO (oxid dusnatý),  $\text{Ca}^{2+}$  (He et al., 2018).

#### 2.1.2.1 Vznik ROS v apoplastu a šíření signálu

Pro signalizaci jsou klíčové ROS produkované v apoplastu rostlinných buněk řadou enzymů - aminooxidázami, peroxidázami buněčných stěn (peroxidasy třídy III) a NADPH oxidázami (Francoz et al., 2015; Qi et al., 2017). Zcela zásadním producentem  $\text{O}_2^-$  (následně ihned dismutovaný na  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) v apoplastu jsou enzymy známe jako NADPH oxidasy, které jsou u rostlin nazývané jako RBOH („RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG“). Tyto enzymy jsou lokalizovány v cytoplazmatické membráně a mají cytosolickou, transmembránovou a apoplastickou část. RBOH enzymy katalyzují redukci  $\text{O}_2$  na  $\text{O}_2^-$ , přičemž donorem elektronu v této reakci je NADPH (Chapman et al., 2019). Genom *A. thaliana* kóduje 10 genů RBOH, přičemž dvě isoformy RBOHD a RBOHF jsou aktivní při odpovědi na stres způsobený biotickými a abiotickými stimuly. Produkce ROS v apoplastu, buněčné stěně a cytoplazmatické membráně zprostředkovaná přechodným oxidativním vzplanutím je esenciální pro imunitní obranu reakci rostlin vůči patogenům. Během působení abiotického i biotického stresu dochází k propagaci signálu mezi buňkami prostřednictvím tzv. ROS vlny („ROS waves“). Aktivovaný RBOHD produkuje  $\text{O}_2^-$ , který je dismutován na  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ten prostřednictvím akvaporinů difunduje do okolních buněk.  $\text{H}_2\text{O}_2$  má schopnost aktivovat kanály pro transport vápníku lokalizované na cytoplazmatické membráně. Zásadní pro detekci extracelulárního  $\text{H}_2\text{O}_2$  je HPCA1 („ $\text{H}_2\text{O}_2$ -INDUCED  $\text{Ca}^{2+}$  INCREASES 1“). HPCA1 během buněčné



signalizace detekuje apoplastický  $H_2O_2$ . HPCA1 je element propojující ROS signalizaci a  $Ca^{2+}$  signalizaci, je nezbytný pro aklimatizaci buněk na stres. HPCA1 má schopnost regulovat kanály pro transport vápníku. Po detekci apoplastických ROS/ $H_2O_2$  indukuje HPCA1 akumulaci vápníku v buněčném cytosolu. V důsledku akumulace vápníku dochází ke spuštění vápník-dependentní protein kinasových kaskád. Vysoká hladina vápníku je detekována proteinem, který má schopnost vázat vápník – CBL4 („CALCINEURIN B-LIKE CALCIUM SENSOR 4“). Po navázání vápníku na CBL4 dojde ke změně konformace tohoto proteinu, ten následně aktivuje proteinkinasu CIPK26 („CBL4-INTERACTING PROTEIN KINASE 26“), která prostřednictvím interakce může aktivovat proteinkinasu OST1 („OPEN STOMATA 1“). CIPK26 a OST1 fosforylací aktivují RBOHD, což vede ke zvýšení produkce ROS a následné propagaci ROS vlny, jejímž prostřednictvím je signál šířen do rostlinných buněk, které nejsou přímo stresu vystaveny a dochází ke spuštění adaptačních mechanismů potřebných pro přežití rostliny (Fichman & Mittler, 2020; Hu et al., 2020).

#### 2.1.2.2 Zapojení ROS do fyziologických procesů rostlin

ROS regulují řadu fyziologických procesů esenciálních pro vývoj rostlin. Ovlivňují růst a prodloužení kořenových vlásků, růst pylové láčky, vývoj trichomů, zrání tracheálních elementů, apikální dominanci, růst a tvar listů (Gechev et al., 2006). Jedním z důvodů, proč ROS ovlivňují tyto vývojové procesy je to, že mají značný vliv na extenzi buněčné stěny během buněčného růstu. Například  $OH^-$  podporuje elongaci buněčné stěny, tím že buněčnou stěnu rozvolňuje oxidativním štěpením pektinů a xyloglukanů. Naopak  $H_2O_2$  iniciuje tvorbu příčných vazeb mezi polysacharidy buněčné stěny, formaci disulfidických vazeb a dalo by se říci, že  $H_2O_2$  spíše limituje expanzi buněčné stěny. (Janků et al., 2019)

V kořenech dochází k relativně vysoké akumulaci ROS, které regulují míru proliferace a diferenciaci buněk. Produkce ROS je zcela ztřežní při správném vývoji kořenových vlásků a zakladání a růstu laterálních kořenů (přidejte vhodné citace). ROS jsou taktéž zapojeny do procesu regulace apertury průduchů (Kimura et al., 2017).

Dalším fyziologickým procesem řízeným ROS je programovaná buněčná smrt (BS), kdy dochází k akumulaci ROS v pletivech, které mají být odstraněny (Kimura et al., 2017). BS může nastat v určité vývojové fázi rostliny (např. během senescence listů, BS buněk aleuronové vrstvy semen), anebo je BS vyvolána nepříznivými podmínkami vnějšího prostředí, jako je například hypersenzitivní odpověď rostlin na patogeny.

V tomto případě je zpuštěna BS napadených buněk, čímž může být zabráněno šíření patogenních organismů do okolních buněk pletiva (Janků et al., 2019).

## 2.2 Antioxidační obrana

Oxidační stres je faktor, který ovlivňuje různé aspekty růstu a vývoje rostlin (viz. kapitola 2.1.2). Oxidační stres vzniká tehdy, když je narušena rovnováha mezi produkcí ROS a schopností buněk tyto ROS neutralizovat. Během evoluce došlo k vývoji sofistikovaných obranných systémů, které pomáhají rostlinám vyrovnávat se s oxidačním stresem. Systém antioxidační obrany rostlin je komplexní a mnohoúrovňový. Antioxidační obranu rostlin je možno rozdělit na dvě hlavní kategorie – na neenzymatickou a enzymatickou (Dumanović et al., 2021).

### 2.2.1 Neenzymatická antioxidační obrana

Rostliny produkují řadu antioxidačních metabolitů – karotenoidy, flavonoidy, tokoferoly, betalainová barviva, askorbát. Tyto metabolity jsou oxidovány ROS, oxidací vznikají nepříliš aktivní molekuly, díky přenosu energie dochází ke zhášení ROS a je eliminováno riziko poškození biomolekul reaktivními formami kyslíku. (Halliwell, 2006; He et al., 2018).

#### 2.2.1.1 Askorbát

Askorbát neboli vitamín C je metabolit přítomný v široké řadě rostlinných pletiv a je jedním z hlavních rostlinných antioxidantů. V buňkách se vyskytuje v redukované formě. Je syntetizován v mitochondriích a jeho distribuce probíhá pomocí difuze a elektrochemického gradientu (Ahmad et al., 2010). Je redukčním činidlem pro řadu reaktivních molekul, podílí se na detoxifikaci zejména peroxidu  $H_2O_2$  a přímo deaktivuje  $^1O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH\cdot$ ,  $ROO\cdot$  a kyselinu peroxodisítnou ( $HNO_3$ ) (Ahmad et al., 2010; Halliwell, 2006). Askorbát nelze striktně označit pouze jako prvek neenzymatické antioxidační obrany, vzhledem k tomu, že je askorbát zapojen i do enzymatické antioxidační obrany, díky tomu, že je enzymatickým kofaktorem a je zapojen do askorbát-glutathionového cyku, který je podrobněji popsán v kapitole 2.2.2.3. Redukovaný askorbát figuruje jako kofaktor enzymu violaxanthin de-epoxidasy (VDE), který je zapojen do procesu nefotochemického zhášení (NPQ).

#### 2.2.1.2 Tokoferoly

Tokoferoly jsou v tucích rozpustné molekuly, které jsou syntetizovány pouze fotoheterotrofními organismy. Jedná se o antioxidanty, které hrají protektivní roli při oxidativním stresu v chloroplastech rostlin. Dále mohou být u rostlin lokalizovány

v amyloplastech, leukoplastech a chromoplastech (Ali et al., 2022). Jsou to protektanty vůči peroxidaci lipidů v membránách, deaktivují zejména  $\text{ROO}\cdot$  (Halliwell, 2006). Tokoferoly mají schopnost zhasět  $^1\text{O}_2$  (Janků et al., 2019). Jedná se o strukturně různorodou skupinu látek, kterou můžeme rozdělit na jednotlivé formy na základě počtu a polohy methylových skupin na chromanolovém kruhu. Tokoferoly dělíme do čtyř skupin ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), přičemž u rostlin je dominantní formou  $\alpha$ -tokoferol (Muñoz & Munné-Bosch, 2019). Lokalizace  $\alpha$ -tokoferolu je ve vnitřní membráně plastidů a plastoglobul (Ali et al., 2022). Tyto čtyři formy se vzájemně odlišují různou biologickou aktivitou, nejvyšší biologickou aktivitu vykazuje  $\alpha$ -tokoferol (Ahmad et al., 2010).

### 2.2.1.3 Glutathion

Glutathion (GSH) je tripeptid ( $\gamma$ -glutamylcysteinglycin) esenciální pro metabolismus rostlin. Je zdrojem nízkomolekulárních thiolů (Noctor et al., 2012). Syntéza GSH je u rostlin a živočichů velmi podobná a probíhá ve dvou krocích. Do první reakce vstupuje glutamát a cystein a reakce je katalyzována enzymem  $\gamma$ -glutamylcysteinsyntetasou ( $\gamma$ -ECS). Během druhé reakce katalyzované glutathionsyntetasou vzniká GSH z  $\gamma$ -glutamylcysteinu a glycinu. Nejvyšší koncentrace GSH u rostlin je v chloroplastech, přičemž redukovaná forma převažuje nad oxidovanou. GSH je zapojen do askorbát-glutathionového cyklu, viz. kapitola 2.2.2.3 (Ahmad et al., 2010).

GSH je také zapojen do thiol-disulfidických interakcí. GSH je oxidován na disulfidickou formu glutathionu (GSSG). GSSG může být zpětně redukován na GSH enzymem glutathionreduktasou (GR). Oxidované formy GSH mohou tvořit s proteiny a thioley smíšené disulfidy (Noctor et al., 2012). GSH je součástí antioxidační obrany. Je oxidován ROS na GSSG, který může být zpětně redukován GR na GSH. Detoxifikuje  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}\cdot$  (Ahmad et al., 2010).

### 2.2.1.4 Karotenoidy

Karotenoidy jsou antioxidačními protektanty syntetizované rostlinami a mikroorganismy. Struktura karotenoidů jim umožňuje delokalizovat nespárované elektrony (Ahmad et al., 2010). Jedná se o polynenasycené isoprenoidní sloučeniny syntetizované v plastidech. Je pro ně charakteristické žluté, oranžové, až červené zbarvení, a proto jsou využívány jako přírodní pigmenty. Syntéza karotenoidů probíhá zejména ve fotosynteticky aktivních pletivech, jsou však též syntetizovány v plodech, v zásobních kořenech, v květech a v semenech. Mají schopnost zhasět  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Akumulace karotenoidů chrání lipidy membrán před peroxidací (Ahmad et al., 2010). U rostlin během fotosyntézy,

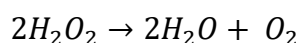
zhášejí jak tripletní chlorofyl, tak i  $^1\text{O}_2$ , chrání chloroplasty před poškozením. (Halliwell, 2006). Během zhášení  $^1\text{O}_2$  dochází k excitaci karotenoidů, přičemž elektrony karotenoidů se dostávají do excitovaného tripletního stavu. Návrat na standardní energetickou hladinu je zajištěn vyzářením tepla. Nejefektivněji  $^1\text{O}_2$  odbourává  $\beta$ -karoten (Janků et al., 2019).

### 2.2.2 Enzymatická antioxidační obrana

Enzymatická antioxidační obrana rostlin je klíčová pro překonání stresových podmínek. Jedněmi z nejvýznamnějších enzymů zapojených do antioxidační obrany rostlin jsou superoxiddismutasy, kterým je věnovaná značná část této práce. Dále důležitou roli v antioxidační obraně rostlin hrají peroxidasy, katalasy a enzymy askorbát-glutathionového cyklu (Rajput et al., 2021), které jsou níže krátce charakterizovány. Jako součást antioxidační obrany by měly být zmíněny taktéž peroxiredoxiny (thioredoxin-dependentní peroxidasy), jsou klasifikovány do čtyř podskupin. Redukují peroxidy, včetně  $\text{H}_2\text{O}_2$  a organických hydroperoxidů, pomocí thiolových skupin cysteinu. Tyto enzymy jsou aktivní v peroxisomech (Del Río & López-Huertas, 2016; Navrot et al., 2006)

#### 2.2.2.1 Katalasa

Katalasa (CAT) je enzym katalyzující reakci, během níž dochází k odstranění  $\text{H}_2\text{O}_2$  jeho rozpadem na  $\text{H}_2\text{O}$  a na  $\text{O}_2$  (Obrázek 5). U rostlin je katalasa přítomna především v peroxisomech (Halliwell, 2006). Katalasa může být v peroxisomech přítomna v podobě inkluzí, které jsou tvořeny krystaly, mohou mít také amorfni charakter. Peroxisomální katalasa však není účinná v odbourávání cytoplazmatického  $\text{H}_2\text{O}_2$ . U *A. thaliana* jsou kódovány tři geny pro katalasu, *CAT1* je spojena s  $\beta$ -oxidací mastných kyselin, *CAT2* je aktivní při fotorespiraci, *CAT3* hraje roli při senescenci (Del Río & López-Huertas, 2016).



Obrázek 5: Rozpad molekuly peroxidu vodíku katalyzovaný katalasou (Halliwell, 2006).

#### 2.2.2.2 Peroxidasy

Rostlinné peroxidasy (POX) můžeme rozdělit do 3 tříd. Příkladem POX třídy I je askorbát peroxidasa, mezi POX třídy II patří ligninasa. POX třídy III (POX; EC 1.11.1.7) jsou jediným typem rostlinných POX, které odbourávají u rostlin extracelulární  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ten je redukován za oxidace kosubstrátu. Pro redukci  $\text{H}_2\text{O}_2$  využívají POX jako kosubstrát fenolické sloučeniny. (Halliwell, 2006; Rajput et al., 2021). POX mají strukturu glykoproteinů, jsou produkovány v endoplazmatické retikulu a Golgiho aparátu. Jsou

vyučovány do mezibuněčných prostor nebo uchovávány ve vakuolách. Co se týče jejich zapojení do odbourávání  $H_2O_2$ , jedná se spíše o pomocný mechanismus a jsou spíše součástí druhé obranné linie, Klíčový pro odbourávání  $H_2O_2$  je askorbát-glutathionový cyklus (kapitola 2.2.2.3). POX jsou vyjma odbourávání ROS důležité i pro buněčné procesy – zesíťování rostlinných buněčných stěn, rozvolňování buněčných stěn, katabolismus auxinů, suberinizaci (Rajput et al., 2021).

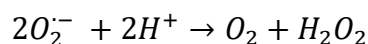
### 2.2.2.3 Askorbát-glutathionový cyklus

Významným komponentem enzymatické antioxidační obrany je askorbát-glutathionový cyklus (Foyer-Halliwell-Asadův cyklus), který probíhá v peroxisomech, chloroplastech, mitochondriích a v cytoplazmě. Tento mechanismus pomáhá detoxifikovat ROS na molekuly s nižší reaktivitou, zejména dochází k odbourávání  $H_2O_2$ . Tento mechanismus je esenciální pro udržení redoxní homeostáze. Součástí cyklu je sled enzymatických reakcí, které jsou katalyzovány enzymy askorbát peroxidasou (APX) a glutathion peroxidasou (GPX). V reakci figurují antioxidanty askorbát a GSH (Del Río & López-Huertas, 2016).

V tomto cyklu jsou dvě redukované molekuly askorbátu využity APX jako donory elektronu pro redukci  $H_2O_2$  na  $H_2O$ . Touto reakcí vzniká monodehydroaskorbát (MDA), z něž dismutací může vznikat dehydroaskorbát (DHA) a molekula redukovaného askorbátu (AsA). Též je možný přímý vznik AsA z MDA pomocí monodehydroaskorbát reduktázy (MDAR), donorem elektronu je NADPH. DHA může být redukován zpět na askorbát pomocí enzymu dehydroaskorbátreduktasy (DHAR). Tato reakce využívá GSH jako elektronový donor, což vede k oxidaci GSH na GSSG, který aktivitou glutathionreduktasy (GR), může být regenerován na GSH. Regenerace GSH pomocí GR je dependentní na přítomnosti NADPH (Ahmad et al., 2010).

### 2.2.3 Superoxiddismutasy

Superoxiddismutasy (SOD, EC 1.15.1.1) jsou skupinou metaloenzymů, které jsou zapojeny do řady fyziologických procesů u rostlin. Zejména je však tato skupina enzymů zapojena do antioxidační obrany (Pilon et al., 2011; Song et al., 2018). Jejich primární funkcí je katalýza dismutace  $O_2^{\cdot-}$  na méně toxický  $H_2O_2$  a na  $O_2$  (Obrázek 6) (McCord & Fridovich, 1969). Dismutace probíhá prostřednictvím oxidace a redukce atomu kovu vázaného ve struktuře SOD. Dochází k posměnění redoxního potenciálu ve struktuře vázaného kovu na hladinu potřebnou pro dismutaci  $O_2^{\cdot-}$  (Perry et al., 2010).



Obrázek 6: Dismutace superoxidového radikálu katalyzovaná SOD (Halliwell, 2006).

SOD jsou přítomny jak u rostlin, tak i živočichů. Dismutace  $O_2^{\cdot-}$  byla popsána McCordem a Fridovichem v roce 1969, nicméně tyto proteiny byly izolovány už v roce 1939 Mannem a Keilinem z hovězích erytrocytů.

SOD můžeme rozdělit do čtyř skupin podle navázaného kofaktoru, kterým může být kationt mědi a zinku (Cu/ZnSOD), železa (FeSOD), manganu (MnSOD), nebo niklu (NiSOD). NiSOD u rostlin nejsou přítomny (Pilon et al., 2011) a nahcází se pouze u bakterií (Perry et al., 2010).

Evoluce SOD je spojena s vývojem zemské atmosféry. Tato skupina enzymů vznikla s nejvyšší pravděpodobností jako odpověď na selekční tlak – zvyšující se koncentraci kyslíku v atmosféře. Vznik a vývoj SOD skupin je úzce propojen s příslušnými kofaktory vázanými ve struktuře jednotlivých skupin. Evolučně nejstarší skupinou SOD jsou FeSOD. Vyvinuly se jako první skupina, neboť železo bylo nejdostupnějším přechodným kovem v biosféře (Bannister et al., 1991; Ochiai, 1983). Vzhledem k tomu, že *FeSOD* nejsou přítomny u živočichů, existuje teorie, že se původně vyvinuly v chloroplastu a až později byla jejich genetická informace zabudována do jaderného genomu (Alscher et al., 2002). Skupiny *FeSOD* a *MnSOD* jsou evolučně starší a zdá se, že jsou si i více vývojově bližší. Je možné, že se *FeSOD* a *MnSOD* vyvinuly z jednoho původního genu. Díky nárůstu tlaku kyslíku v atmosféře došlo k oxidaci  $Cu^+$  na rozpustnou formu mědi  $Cu^{2+}$  a vývoji prvních *Cu/ZnSOD*. *Cu/ZnSOD* mají kvůli vázanému atomu mědi odlišné elektrochemické vlastnosti než *FeSOD* a *MnSOD* a liší se více od nich svou strukturou (Bannister et al., 1991).

SOD bývají primárně lokalizovány v organelách, v nichž dochází ke zvýšené produkci  $O_2^{\cdot-}$ , který není schopen volně procházet přes fosfolipidové membrány. Právě proto aby nedošlo k poškození buňky, dochází v těchto subcelulárních strukturách k akumulaci SOD (Alscher et al., 2002). Regulace exprese *SOD* je úzce spjatá s vývojovým stádiem, v němž se rostliny nacházejí, abundance jednotlivým isoformem je v průběhu životního cyklu rostlin různá. U *A. thaliana* jsou nejvíce exprimovány *FSD1*, *CSD1*, *CSD2*, *MSD1* (Pilon et al., 2011). U *A. thaliana* je exprese *CSD* a *FSD1* regulována prostřednictvím transkripčního faktoru SPL7 (Yamasaki et al., 2009). Tato regulace je podrobněji popsána v kapitole 2.2.3.4. Aktivita SOD může být regulována prostřednictvím posstranlačních

modifikací (PTM) – glykace, glutathionylace, nitrace, fosforylace (Yamakura & Kawasaki, 2010).

### 2.2.3.1 Cu/Zn superoxiddismutasy

Cu/ZnSOD bývají v buňce lokalizovány v chloroplastech, cytosolu a peroxisomech. Častěji jsou zastoupeny u eukaryotických organismů než u prokaryot, avšak byly nalezeny i v prokaryotických organismech – u *Photobacterium leiognathi*, pseudomonád a u *Caulobacter crescentus* (Alscher et al., 2002). Cu/ZnSOD mají strukturu homodimeru nebo tetrameru. Homodimerní formy jsou lokalizovány cytoplazmě nebo v periplazmě. Jako homotetramer jsou přítomny extracelulárně či v chloroplastech. Jednotlivé podjednotky enzymu jsou schopny samostatně fungovat nezávisle na zbylých podjednotkách. Na každou podjednotku se vážou jedna molekula mědi a jedna molekula zinku (Alscher et al., 2002). U *A. thaliana* byly identifikovány tři geny Cu/ZnSOD: *CSD1*, *CSD2*, *CSD3* (Kliebenstein et al., 1998).

*CSD1* je lokalizován v cytoplazmě a v jádře (Dreyer & Schippers, 2019; Xu et al., 2010). *CSD1* v jádře a v cytosolu interaguje s proteinem DJ-1a, který má schopnost vázat měď a podílí se na aktivaci enzymu prostřednictvím transportu mědi. Rodina DJ-1 rozšířená u savců a bakterií má ve struktuře obsažený pouze jeden typ domény DJ-1. U rostlin (u *A. thaliana*) došlo k vývoji tří variant DJ-1, které nesou označení DJ-1a, DJ-1b a DJ-1c (Xu et al., 2010).

*CSD2* je lokalizován ve stromatu chloroplastu (obsahuje N-terminální peptid cílící na chloroplasty) (Bindschedler et al., 2008; Rutschow et al., 2008). *CSD3* je peroxisomální varianta enzymu (obsahuje C-terminální peptid cílící na peroxisomy). Bylo zjištěno, že pokud dojde k deleci N-terminální cílící sekvence *CSD2* a nebo C-terminální cílící sekvence *CSD3*, dochází chybnému umístění isoform (Dreyer & Schippers, 2019).

*CSD* jsou aktivovány prostřednictvím chaperonu pro mědnaté SOD (Cu chaperon for SOD; CCS), jehož exprese je také regulována prostřednictvím SPL7. Jejich hlavní funkce je doručení a aktivace skrze inkorporaci mědi do aktivního místa *CSD* (Cohu et al., 2009). U mutantních linií *A. thaliana*, kde došlo k inaktivaci *CCS* prostřednictvím „knock out“ nebyla naměřena detekovatelná aktivita SOD v chloroplastech a v cytosolu, nicméně tyto rostliny nevykazovaly žádné viditelné změny fenotypu. Z toho lze usoudit, že rostlinám pro růst stačí velmi nízké hladiny aktivit SOD a pro jejich normální růst je dostatečná aktivita *CCS* nezávisle aktivovaných *CSD*. Existuje teorie, že jsou *CSD*

exprimovány v nadmíře, aby do své struktury vázaly  $\text{Cu}^{2+}$ , které jsou pro rostliny ve vyšší koncentraci toxické (Cohu et al., 2009; Huang et al., 2012). U mutantních linií *csd1*, *csd2*, *ccs* rostliny *A. thaliana* byla pozorována zvýšená termotolerance (Guan et al., 2013).

### 2.2.3.2 FeSOD

FeSOD se nacházejí u prokaryotních i eukaryotních organismů, kde jsou především akumulovány v chloroplastech. U *A. thaliana* byly identifikovány tři různé formy FeSOD: *FSD1*, *FSD2* a *FSD3*. Protein *FSD3* je vývojově odlišný od ostatních FeSODs u *A. thaliana*, patří do jiného klastru a je lokalizován v chloroplastech (Kliebenstein et al., 1998). *FSD3* se akumuluje v plastidovém nukleoidu, *FSD2* je přítomen v celé struktuře chloroplastu. *FSD2* a *FSD3* hrají klíčovou roli ve vývoji časných chloroplastů. Utvářejí dohromady heteromer lokalizovaný v plastidovém nukleoidu, který eliminuje vznikající ROS, díky čemuž je chloroplast chráněn v časných fázích vývoje. U jednoduchých mutantů *fsd2* a *fsd3* byl detekován vybělený („pale green“) fenotypový projev a byl pozorován pokles v obsahu chlorofylu. U dvojitý *fsd2/fsd3* mutant byl narušen vývoj chloroplastů, vykazoval albinoidní fenotyp a docházelo k nadměrné akumulaci ROS. Naopak u transgenních rostlin, u nichž docházelo k nadexpresi obou genů, byla pozorována zvýšená odolnost vůči ROS. V práci Myouga et al., 2008 nebyl detekován fenotypový projev u *fsd1* mutantní linie, na základě čehož bylo shledáno, že *FSD1* nejspíše nehraje důležitou roli ve vývoji rostliny při normálních podmínkách. Nicméně u „knock out“ mutantů *fsd1* v práci Dvořák et al., 2021 byl detekován pokles míry tvorby laterálních kořenů a bylo zjištěno, že aktivita a abundance *FSD1* je u *A. thaliana* závislá na vývojové fázi rostliny. Taktéž, že *FSD1* hraje důležitou roli při osmotickém stresu a při ochraně chloroplastu po ošetření s methyl viologenem, který je známý jako herbicid indukující oxidativní stres v chloroplastu.

Regulace aktivity FeSOD probíhá prostřednictvím mediátoru co-chaperoninu CHAPERONIN 20 (CPN20). CPN20 interaguje s FeSOD v chloroplastu a zabudovává železo do aktivního místa, čímž je aktivuje. CPN20 má lokalizaci v chloroplastu a podílí se společně s CPN60s na procesu skládání proteinů. U rostlin, kde došlo k umlčení genu CPN20 byl detekován pokles aktivity *FSD1* a byl narušen vývoj chloroplastů. CPN20 může hrát roli během vývoje semen a je potenciálně spojován s aborcí semen (Kuo et al., 2013).



### 2.2.3.3 MnSOD

Místem lokalizace MnSOD jsou mitochondrie a peroxizomy. Podobně jako FeSOD tvoří i MnSOD homodimery nebo homotetramery. MnSOD se vyskytují jak u prokaryot, tak i u eukaryot. Rostlinné MnSOD vykazují značnou podobnost v sekvencích. Mají sice podobnou strukturu jako FeSOD, nicméně tyto dvě skupiny enzymů mají odlišné funkce, které jsou vzájemně nezaměnitelné (Alscher et al., 2002). U rostlin skupina MnSOD vykazuje vysokou konzervovanost sekvencí (Martin et al., 2013). V genomu *A. thaliana* jsou kódované dvě isoformy *MnSOD*: *MSD1* a *MSD2* (Chen et al., 2022; Kliebenstein et al., 1998).

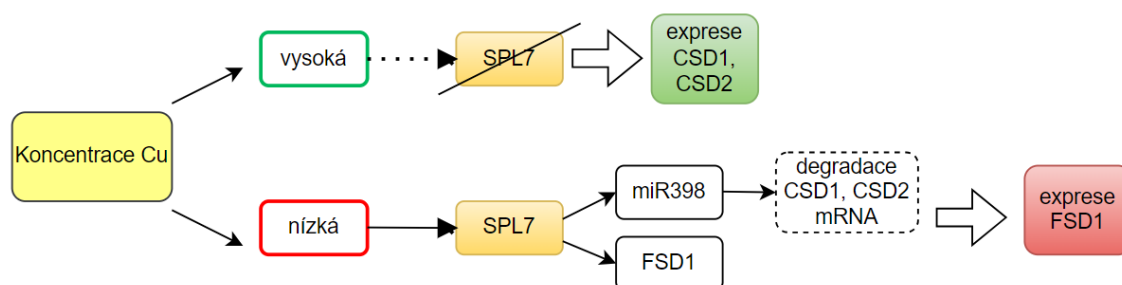
Aktivita *MSD1* je nezbytná pro samičí gametogenezi a pro proces oplození, protože *MSD1* reguluje homeostázi ROS v gametofytu. (Martin et al., 2013). Naopak *MSD2* byla jako první SOD izoforma lokalizována v apoplastu. Potenciálně tato isoforma může být součástí systému extracelulární mezibuněčné signalizace ROS (Chen et al., 2022).

### 2.2.3.4 Regulace exprese superoxiddismutas řízená SPL7

Transkripční faktor SPL7 (SQUAMOSA promoter binding protein– like7) je součástí proteinové rodiny SPL. Rodina *SPL* genů je u *A. thaliana* tvořena 16 geny, které mají schopnost vázat se na GTAC motivy v promotoru, čímž mohou regulovat expresi jiných genů. Gen *SPL7* se skládá z 10 exonů a 9 intronů. Protein SPL7 má ve své struktuře zinkový prst typu C4 a ve své struktuře obsahuje SBP doménu. Pomocí SBP domény se váže na GTAC motivy (Yamasaki et al., 2009).

*SPL7* je centrálním regulátorem homeostáze mědi u rostliny *A. thaliana*. Při nízké abundanci mědi je spuštěna exprese *SPL7*. *SPL7* při podmínkách nízké dostupnosti mědi přímo i nepřímo reguluje expresi řady genů. Aby rostlina kompenzovala nedostatečné množství mědi, dochází během deficiencie ke zvýšení exprese genů, které kódují přenašeče mědi a genů zapojených do příjmu mědi. *SPL7* zvyšuje expresi transportérů mědi - *COPT1* (Copper transporter 1), *COPT2*, *ZIP2* (ZRT, IRT-like proteins), *YSL2* (metal-nicotianamine transporter). *SPL7* rovněž zvyšuje při nedostatku mědi expresi chaperonu mědi *CCH*, který se podílí na mobilizaci mědi v pletivech během senescence. Zvýšení exprese přenašečů mědi během jejího nedostatku může hrát roli v rovnoměrné distribuci mědi v rostlině. Naopak při dostatku mědi *SPL7* snižuje expresi *FRO3* (Ferric chelate reductase). *FRO3* se podílí na redukci  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^{+}$ . Exprese *COPT1*, *COPT2*, *ZIP2*, *YSL2* a *CCH* je regulována *SPL7* přímo. *FRO3* neobsahuje v promotorové oblasti GTAC motivy, je regulován *SPL7* nepřímo (Yamasaki et al., 2009).

Expres *Cu/ZnSOD* a *FSD1* je u *A. thaliana* regulována prostřednictvím SPL7 (Obrázek 7). SPL7 při podmínkách deficiencie mědi indukuje expresi mikroRNA *miR398*. *A. thaliana* má v genomu kódované 3 geny pro *miR398* – *miR398a*, *miR398b*, *miR398c*, přičemž *miR398b* a *miR398c* reagují velice podobně na deficit mědi a jejich exprese je řízena SPL7 – obě ve své promotorové oblasti (-300 až -1) obsahují 8 GTAC motivů. Oproti tomu promotorová oblast *miR398a* neobsahuje GTAC motivy. *miR398* se přímo váže na transkripty *CSD1* a *CSD2*, dochází ke štěpení a degradaci jejich mRNA, čímž je snížena exprese těchto genů. Zatímco při nedostatku mědi dochází ke snížení exprese *CSD1* a *CSD2*, současně je prostřednictvím vazby SPL7 na GTAC motivy v promotorové oblasti *FSD1* aktivována zvýšená exprese této SOD (Yamasaki et al., 2009).



Obrázek 7: Schéma regulace exprese *SOD* u *A. thaliana* prostřednictvím transkripčního faktoru SPL7. Zdroj: (Yamasaki et al., 2009), autor diagramu: (Kristýna Pokorná).

Hladina akumulace *miR398* se u *A. thaliana* při působení různých druhů stresu mění. Nárůst akumulace *miR398* je spojen s růstovými podmínkami nadměrné koncentrace sacharosy v růstovém médiu. Pokles hladiny *miR398* byl zaznamenán při abiotickém stresu vyvolaném fumigací ozónem, při stresu z nadměrného zasolení a při ošetření rostlin paraquatem, při nadměrném působení světla a při vysoké koncentraci mědi. Pokles abundance *miR398* pozitivně koreluje s nárůstem akumulace *CSD1* a *CSD2* (Jagadeeswaran et al., 2009).

SPL7 aktivuje při nízké abundanci mědi i expresi dalších *miRNA*: *miR397*, *miR408* a *miR857*. Tyto *miRNA* snižují expresi genů, které kódují proteiny obsahující měď (Yamasaki et al., 2009).

### 2.2.3.5 Rodina superoxiddismitas u *M. truncatula* a *M. sativa*

*Medicago truncatula* je diploidní modelový organismus a ve srovnání s *Medicago sativa* disponuje menším genomem (1,08 pg DNA/2C), který byl již plně sekvencován (Fyad-Lameche et al., 2016; Tang et al., 2014). *M. truncatula* vykazuje syntenii s řadou ekonomicky důležitých luskovin (Young & Udvardi, 2009).

Genová rodina SOD je u rostliny *M. truncatula* tvořena 7 geny. Je menší než genová rodina SOD u *A. thaliana*, které je tvořena 8 geny. Prozatím jsou v genomu *M. truncatula* anotovány 4 *Cu/ZnSOD*, 2 *FeSOD* a 1 *MnSOD*. Jednotlivým MtSOD byly predikovány tyto lokalizace: MtCSD1 (chloroplast), MtCSD2 (chloroplast), MtCSD3 (cytoplazma), MtCSD4 (cytoplazma), MtFSD1 (chloroplast), MtFSD2 (cytoplazma), MtMSD (mitochondrie) (Song et al., 2018). Ve všeobecnosti lze ale říci, že současná literatura neposkytuje mnoho informací o funkčních rolích jednotlivých MtSOD.

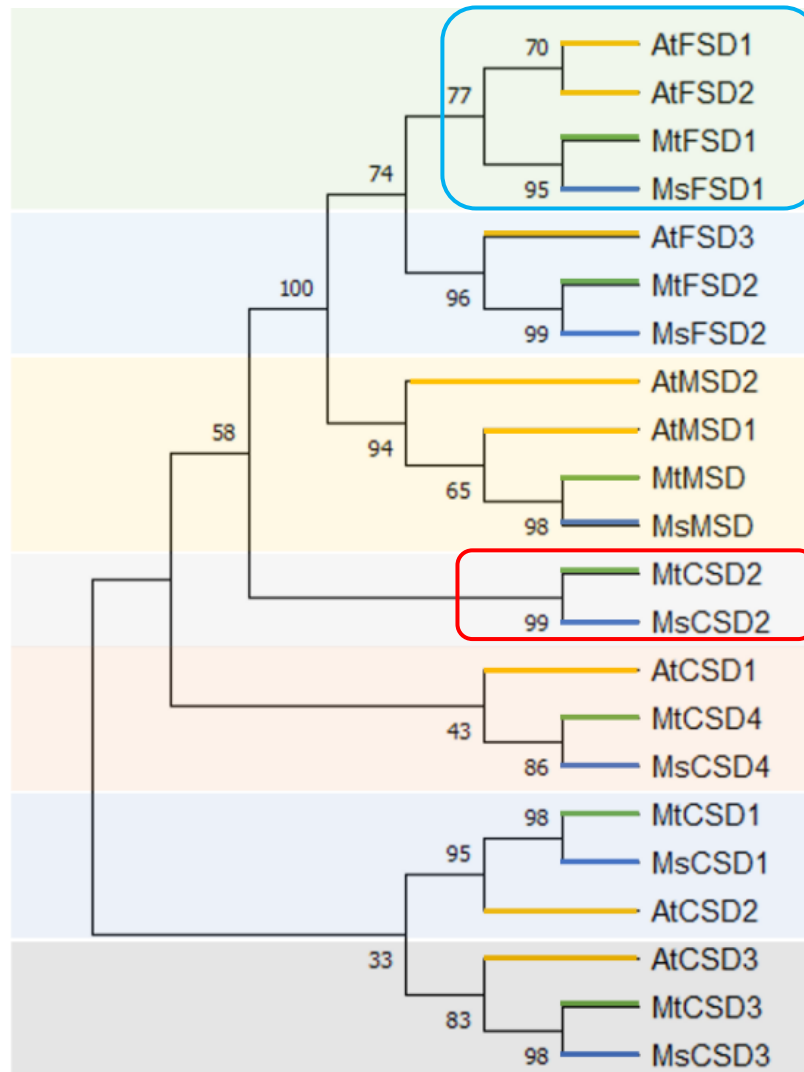
Při *in silico* analýze vzorů exprese *SOD* u *M. truncatula* bylo zjištěno, že *CSD1*, *CSD2*, *CSD4* a *MSD* pravděpodobně hrají úlohu při vývoji semen, protože právě v semenech byla zaznamenána jejich zvýšená exprese. Primární funkcí isoformů CSD3, FSD1 a FSD2 je pravděpodobně deaktivace ROS, protože jsou nejsilněji exprimovány v listech. Geny jednotlivých isoformů *SOD* jsou během odlišných druhů stresu exprimovány různě, což indikuje, že stěžejní rolí SOD u *M. truncatula* je adaptace na stresové podmínky. Během působení stresu ze zasolení na kořen *M. truncatula* byl pozorován nárůst exprese *CSD1*, *CSD2*, *CSD4*, po 6 h a 12 h od ošetření byl detekován pokles exprese těchto genů. U ostatních *SOD* byl během stresu ze zasolení pozorován pokles exprese. Během působení stresu ze sucha byl v rané fázi (Při působení chladu na rostlinu došlo k poklesu exprese všech *SOD* isoformů (Song et al., 2018).

Rostlina *Medicago sativa* je taxonomicky řazena do čeledi *Fabaceae*, někdy také v literatuře označované jako *Leguminosae*. *M. sativa* je tetrasomní tetraploid s velikostí genomu 800 – 1000 Mbp (3,4 pg DNA/2C; 1,6x10<sup>9</sup> párů bazí na haploidní genom). Doposud nebyla publikována kompletní sekvence genomu *M. sativa*, což ztěžuje studium genů u této rostliny (Bora & Sharma, 2011; Fyad-Lameche et al., 2016). Tato luštěnina je hospodářsky významnou plodinou, která se využívá především jako krmivo pro hospodářská zvířata, především protože má vysoký obsah proteinů. Výhodou kultivace této pícniny je schopnost zvyšovat kvalitu půdy díky symbiotickým vztahům s dusík fixujícími bakteriemi, což je podrobněji popsáno v kapitole 2.3 (Bacchetti et al., 2018).

Pro optimální růst *M. sativa* je vhodný rozsah koncentrace mědi 300nM - 3μM. Při kultivaci v podmínkách s nižší koncentrací mědi vykazují rostliny známky deficiencie minerálních látek, dochází k chlorózám listů a předčasné senescenci listů. Naopak při vyšších koncentracích může být měď pro rostliny toxická. Bylo zjištěno, že při zvýšené koncentraci mědi (10μM) dochází ke snížení příjmu železa u *M. sativa* a u rostlin dochází

k poklesu obsahu ferritinu a jsou pozorovány symptomy typické při podmínkách deficiencie železa (Printz et al., 2016).

Přesný počet *SOD* kódovaných v genomu *M. sativa* není doposud znám, nicméně na základě sekvenční homologie bylo detekováno stejné množství *SOD* jako u *M. truncatula* (Hanáková, 2022). Geny *SOD* jsou u různých druhů vysoce konzervované (Song et al., 2018). Zdá se být zajímavé, že *CSD2* u *M. truncatuly* a *M. sativy* jsou pravděpodobně vývojově unikátní. Během evoluce prošly vlastní vývojovou dráhou a u *A. thaliana* není pravděpodobně kódován ortologní gen pro tuto *SOD* isoformu (Obrázek 8) (Hanáková, 2022). Proteinová sekvence MtCSD2 neobsahuje dvě konzervované signatury charakteristické pro Cu/ZnSOD, avšak obsahuje dva motivy pro vazbu kovů, což napovídá tomu, že by tato *SOD* mohla být homologem chaperonu mědi (Song et al., 2018). Pro protein *CSD2* *M. truncatuly* byla na základě porovnání proteinových sekvencí predikována lokalizace v chloroplastech. Na počátku proteinové sekvence MtCSD2 byl identifikován signální peptid, který je zodpovědný za lokalizaci proteinu v chloroplastech (Hanáková, 2022). Podvětev MtFSD1 a MtFSD2 vykazuje příbuznost s AtFSD1 a zároveň s AtFSD2 (Obrázek 8). Na základě biochemických výsledků získaných v práci Hanáková, 2022 je asi pravděpodobné, že homologní gen pro AtFSD1 u *M. sativa* není přítomen nebo je narušena jeho regulace skrze SPL7.



Obrázek 8: Fylogenetická analýza proteinových sekvencí superoxididismutas u rostlin *A. thaliana*, *M. truncatula*, *M. sativa*. Jednotlivé isoformy byly na základě predikované příbuznosti s *A. thaliana* rozděleny do 7 skupin. Červeně byla zvýrazněna izolovaná vývojová větev zahrnující MtCSD2 a MsCSD2 modře byla zvýrazněna vývojová větev MtFSD1, MsFSD1, žluté větvení odpovídá – *A. thaliana*, zelené větvení – *M. truncatula*, modré větvení – *M. sativa*. Tato analýza byla převzata z bakalářské práce (Hanáková, 2022).

### 2.3 Nodulace u rostlin *Medicago sativa* a *Medicago truncatula*

Nodulace je pro řadu rostlin významný fyziologický proces, který jim umožňuje získávat biologicky fixovaný dusík prostřednictvím symbiotického vztahu s bakteriemi. Některé mikroorganismy mají schopnost konvertovat atmosférický dusík na formy dusíku, které jsou pro rostliny využitelné (např. amoniak). Dusík je jedna z živin esenciálních pro růst rostlin. Symbiotický vztah rostlin s dusík fixujícími bakteriemi těmto rostlinám dodává kompetiční výhodu oproti rostlinám, které tento vztah nejsou schopny navázat. Nodulace zvyšuje produktivitu rostlin v půdách s nízkým obsahem dusíku. Studium symbiotických vztahů mezi rostlinami a dusík fixujícími bakteriemi má potenciál, protože by v budoucnu díky využití tohoto procesu mohla být snížena spotřeba dusíkatých hnojiv v zemědělství

(Roy et al., 2020). Na druhou stranu pro bakterie je tento symbiotický vztah výhodný díky tomu, že jsou jim rostlinou dodávány asimiláty vzniklé během fotosyntézy. Nodulující rostliny floémem transportují do nodulů sacharózu, která je zdrojem energie a uhlíku potřebných pro aktivitu enzymatického komplexu nitrogenasy (Aranjuelo et al., 2015).

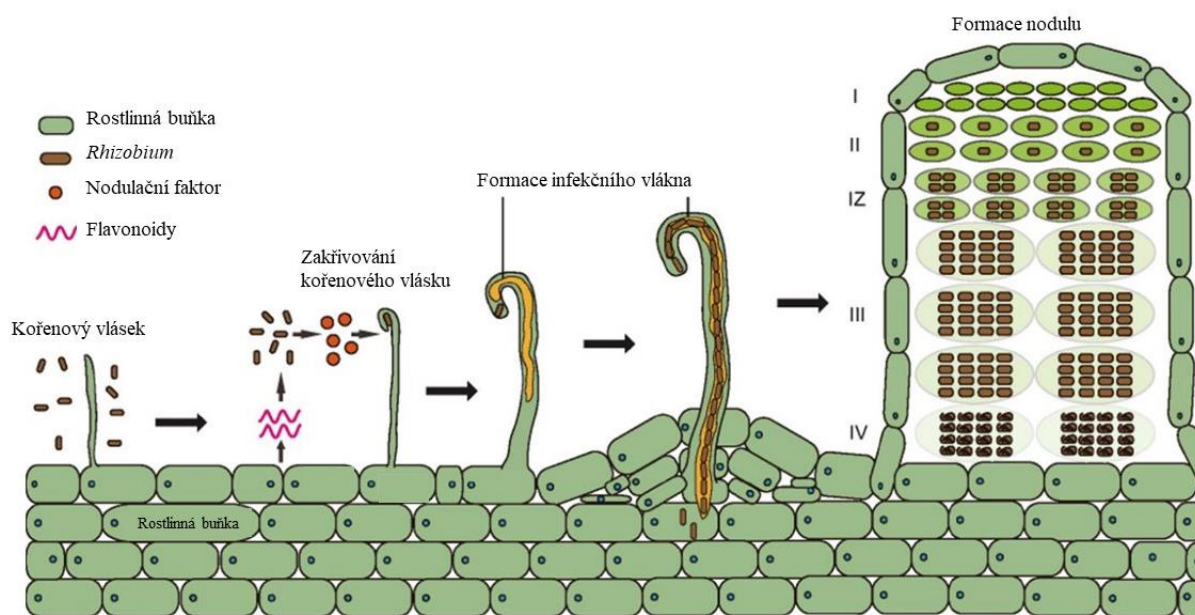
Tato interakce rostlin s dusík fixujícími mikroorganismy je typická pro čeleď *Leguminosae* (luštinaté), do níž jsou řazeny např. *M. sativa*, *M. truncatula*, *Pisum sativum* (hrách setý), *Glycine max* (sója luštinatá). Řada prokaryotických organismů má schopnost podílet se na procesu fixace atmosférického dusíku. Tato schopnost je typická pro bakteriální rody: *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* a *Bradyrhizobium*. Schopnost fixovat dusík má rovněž rod aktinomycet *Frankia*. Dusík fixující mikroorganismy mohou žít jak v symbiotickém vztahu s rostlinami tak i volně v půdě (Gage, 2004).

Většina rhizobií navazuje symbiotický vztah pouze s omezeným množstvím hostitelských druhů rostlin nebo pouze s jedním druhem. Fixace atmosférického dusíku prostřednictvím bakterií je katalyzována nitrogenasovým komplexem. Nitrogenasa je dvoukomponentový enzym, skládá se z FeP proteinu (homodimer) a MoFeP proteinu (heterotetramer) (Rutledge et al., 2022). Tento komplex je aktivní pouze při anoxygenních podmínkách. Aby byly zajištěny anoxygenní podmínky potřebné pro funkčnost komplexu nitrogenasy rhizobií, dochází u některých druhů rostlin na povrchu kořenů k formaci hlízek (nodul). Rhizobia jsou lokalizována uvnitř nodul, díky čemuž je enzymatický komplex nitrogenasa izolována od aerobního prostředí (Gage, 2004). Anoxygenní podmínky v nodulech pomáhá udržovat hemoprotein leghemoglobin. Leghemoglobin má schopnost vázat kyslík, což podporuje funkčnost enzymatického komplexu nitrogenasy, zároveň leghemoglobin zajišťuje dostatečné množství kyslíku pro respiraci rostlinných buněk a bakterií (Appleby, 1984). Rostliny mají schopnost regulovat množství nodul prostřednictvím signální smyčky autoregulace nodulace AON (autoregulation of nodulation). Tato signální dráha probíhá mezi kořenem a nazenmní částí v obou směrech (Roy et al., 2020).

Na počátku procesu nodulace bakterie rozpoznají přítomnost kořene hostitelského druhu rostliny prostřednictvím detekce flavonoidů a betainu, které jsou kořenem vylučovány do půdy. Detekce těchto látek bakteriemi spouští expresi genů pro zahájení nodulace. Dále je spuštěna syntéza a transport signálních molekul – nodulačních faktorů, které

indukují fyziologické změny u kořenů hostitelských rostlin (Gage, 2004). Nodulační faktory se vážou na RLK, které jsou lokalizovány v epidermálních buňkách kořene. U *M. truncatula* je za rozponání nodfaktorů zodpovědný komplex MtLYK3/MtLYK4 and MtNFP (Limpens et al., 2005). Po navázání nodulačních faktorů na receptory jsou spuštěny fyziologické změny provázející iniciaci procesu nodulace. Tyto změny dávají vzniknout primordiu nodul – dochází k deformaci kořenových vlásků, membrány buněk jsou depolarizovány, je iniciováno dělení buněk kortexu kořene a osciluje koncentrace vápníku uvnitř buněk kořene (Obrázek 9) (Gage, 2004).

Kořenové vlásky jsou cílem rhizobií pravděpodobně díky tomu, že mají tenkou buněčnou stěnu. Jejich buněčná stěna má nižší intenzitu zesíťování, což umožňuje změnu organizace mikrotubulů. Tyto vlastnosti buněk kořenových vlásků usnadňují průchod rhizobií do nitra kořene. Rhizobia mohou do kořene dále snadno procházet místy v nichž došlo k mechanickému porušení rhizodermy (Ferguson et al., 2010). Při zakřivování kořenových vlásků dochází k uvěznění bakterií na povrchu kořene. Kolonie obklopené buněčnými stěnami kořene produkují enzymy štěpící buněčnou stěnu a produkují také nodulační faktory. Opakovaně dochází k narušení buněčné stěny a k její opětovné syntéze. Kolonie jsou obaleny extracelulární matrix. Těmito procesy je iniciována formace infekčního vlákna. Prostřednictvím infekčního vlákna bakterie pronikají z vnějšího povrchu kořene přes kořenové vlásky do jeho kortexu. Uvnitř infekčního vlákna dochází k buněčnému dělení bakterií. Infekční vlákno se větví, dochází k apikálnímu růstu a postupně prorůstá mezibuněčnými prostory. Bakterie se přesunou z infekčního vlákna do cytoplazmy buněk primordia nodulu. Prostorová orientace dělení buněk primordia nodulu je řízena prostorovým gradientem fytohormonů. Jedním z těchto fytohormonů je ethylen. V primordiu nodulu dochází k buněčnému dělení, k diferenciaci bakterií a k následné syntéze aparátu pro fixaci dusíku (Gage, 2004; Roy et al., 2020). Bakterie jsou při procesu podobnému endocytóze obaleny membránou rostlinného původu a vzniká peribakteroidní membrána. Bakterie se zformují do útvarů zvaných symbiosomy. Uvnitř symbiosomů probíhá buněčné dělení. Symbiosomy se diferenciuji na bakteroidy, které pozbývají schopnost reprodukovat se. Mezi bakteroidy a rostlinnými buňkami dochází k výměně živin (Becker, 2017; Ferguson et al., 2010).



Obrázek 9: Schématické znázornění všech fází procesu nodulace. Výsledkem infekce je formace nedeterminovaných nodul v kořenovém systému rostliny. Po rozpoznání dusík-fixujících bakterií dochází k exkreci flavonoidů buňkami kořene. Rhizobia uvolňují nodulační faktory, které jsou rozpoznány rostlinou. Bakterie vstupují do nitra kořene přes zakřívující se kořenové vlásky, dochází k formaci infekčního vlákna. Zralý nedeterminovaný nodul je složen z meristematické zóny (I), infekční zóny (II), interzóny (IZ), zóny fixující dusík (III) a zóny senescence (IV). Obrázek byl převzat a upraven z (Wang et al., 2018).

Během procesu fixace atmosférického dusíku vzniká v bakterioidech amoniak. Ten je uvnitř rostlinného pletiva převeden enzymem glutaminsynthasou na glutamin, který je glutamátsynthasou konvertován na glutamát (Ferguson et al., 2010).

### 2.3.1 Zapojení superoxiddismutas do procesu nodulace

Fixace dusíku v nodulech může vést ke vzniku zvýšeného množství ROS a RNS, což vyžaduje existenci antioxidační obrany nodul. Na antioxidační obraně se podílejí oba symbiotičtí partneři – rostlina i bakterie (Becana et al., 2010). Bakteroidy mají vlastní systém antioxidační obrany, do nějž jsou zapojeny jimi produkované metabolity a enzymy (např. CAT, GR, peroxiredoxiny a MnSOD) (Becana et al., 2010).

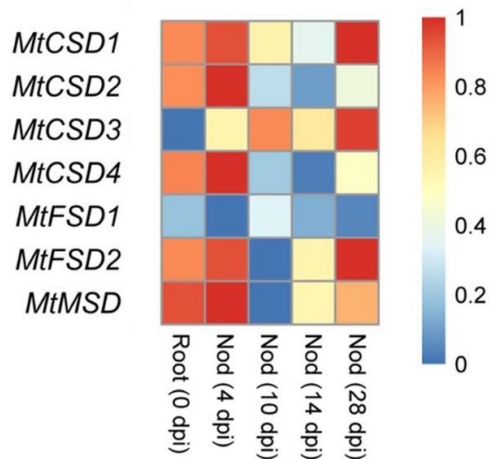
Bylo zjištěno, že ROS jsou v různé míře akumulovány v nodulech v závislosti na vývojovém stádiu nodulu.  $O_2^-$  je akumulován v oblastech, kde došlo k infekci a je přítomen v infekčním vlákne. K akumulaci  $O_2^-$  dochází v meristematicky aktivních zónách kořene. Dále je  $O_2^-$  akumulován v primordiích nodulů a uvnitř mladých nodulů, které ještě nejsou schopny fixovat dusík. V mladých nodulech dochází k vysoké akumulaci  $O_2^-$ . U nodul fixujících dusík byla v oblastech, kde je dusík fixován,



pozorována nízká akumulace  $O_2^-$ .  $H_2O_2$  je akumulován v buňkách, které byly infikovány, aby došlo k zesílení buněčné stěny v místech infekce. Nodul je členěn na oblast s akumulací  $O_2^-$ , oblast s akumulací  $H_2O_2$  a na přechodnou oblast a oblast s nízkou koncentrací  $O_2$ , kde dochází k fixaci dusíku (Yu et al., 2019).

V nodulech přítomných u *M. truncatula* dochází ve vysoké míře k expresi isoform *MtCu/ZnSOD* a *MtMnSOD*, oproti tomu *MtFeSOD* nejsou exprimovány v takové míře. *MtCu/ZnSOD* jsou nejsilněji exprimovány v invazní a meristematické zóně. *MtCu/ZnSOD* jsou zapojeny do růstu infekčního vlákna. Jejich aktivitou je tvořen  $H_2O_2$ , který je zapojen do procesu zesíťování extensinů uvnitř a v extracelulární matrix infekčního vlákna, což je nezbytné pro tvorbu buněčné stěny infekčního vlákna. Abundance  $H_2O_2$  může být rovněž řízena aktivitou CAT. Je pravděpodobné, že *MtCu/ZnSOD* jsou přítomny v periplazmatických prostorách bakteroidů. Přímou v bakterioidech nodulů byly lokalizovány *MtFeSOD* a mitochondriální *MtMnSOD*. Nejvyšší míra exprese *MtMnSOD* je v infekční zóně. (Becana et al., 2010).

Během procesu nodulace u *M. truncatula* byla v rané fázi vývoje nodul pozorována zvýšená exprese *MtMSD*, *MtFSD2*, *MtCSD1*, *MtCSD2*, *MtCSD4* (Obrázek 10). U *MtCSD2*, *MtCSD4* v průběhu vývoje nodul došlo k poklesu exprese. U *MtCSD1*, *MtFSD2*, *MtMSD* byl zaznamenán 10 dpi (dní po inokulaci) pokles exprese, nicméně u těchto genů byla zaznamenána zvýšená exprese 28 dpi. *MtCSD3* byl rovněž exprimován v 28 dpi, tyto isoformy jsou pravděpodobně zapojeny do pozdního vývoje nodul. Naopak během nodulace byla zaznamenána velmi slabá exprese *MtFSD1*, nebyla téměř detekována (Song et al., 2018).



Obrázek 10: Profil exprese genů superoxiddismutas *M. truncatula* (*MtSOD*) během procesu vývoje nodul. Průměrné hodnoty log signálů *MtSOD* byly získány z *M. truncatula* atlasu genové exprese (MtGEA). Databáze projektu (<https://mtgea.noble.org/v3/>). Barevná škála reprezentuje hodnoty log signálů. Dpi = počet dní po inokulaci bakteriemi rhizobium, Root = kořen, Nod = nodul.

SOD jsou aktivní během procesu nodulace jak u rostliny, tak i u symbiotických bakterií. U volně žijících bakterií rodu *Rhizobium* byla detekována zvýšená aktivita SOD oproti bakteriím žijícím v symbiotickém vztahu s rostlinami ve formě bakteroidu. Nejvyšší aktivita SOD a nitrogenasy byla detekována ve stejné vývojové fázi. Zvýšené hladiny SOD korelují se zvýšenou akumulací  $O_2^-$ , který může být generován respirací nebo metabolismem dusík fixujících bakterií (Puppo & Rigaud, 1986). Bakteriální SOD nehrají roli pouze při protekci nitrogenasy, jsou esenciální pro navázání symbiotického vztahu mezi kořenem rostliny a bakterií. Volně žijící mutantní bakterie s absencí genu *sodA* vykazovala pouze nízkou senzitivitu vůči oxidačnímu stresu a jejich fyziologické funkce se zdály být normální. Avšak u *S. melioli* v symbióze s *M. sativa* došlo k negativnímu ovlivnění vývoje nodul. Mutantní bakterie ve velké míře nedosáhly stádia diferenciacce, nedošlo k formaci bakteroidů schopných fixovat dusík. U takto postižených bakterií došlo k předčasné senescenci. Absence genu *sodA* *S. melioli* měla negativní vliv na formaci nodul. U mutantních bakterií byla pozorována snížená úspěšnost infekce kořenů, protože došlo k přerušení vývoje infekčních vláken (Santos et al., 2000).

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Biologický materiál

- *Agrobacterium tumefaciens* (kmen GV3101; kmen GV3101 *p19*)
- divoký typ *Arabidopsis thaliana* (Col-0)
- divoký typ *Medicago sativa* (Regen-SY)
- divoký typ *Medicago truncatula* (Jemalong A17)
- *Escherichia coli* (One Shot TOP10)

#### 3.2 Přístroje a pomůcky

- Allegra 64R, chlazená centrifuga (Beckman Coulter)
- Automatické pipety s rozsahem 2,5; 10; 100; 200; 1000  $\mu$ l (Eppendorf)
- Centrifugační zkumavky BluCAPP 50 ml (Capp)
- Digestoř (MERCİ)
- Elektromagnetické míchadlo (Boeco)
- Fytotronová komora (WEISS Gallenkamp)
- Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad)
- Injekční stříkačka (OMNIFIX)
- Laminární box (MERCİ)
- LSM 710, Axio Imager 2, konfokální laserový skenovací mikroskop (Carl ZEISS)
- Membránový filtr PES Syringe Filter, velikost pórů 0.22  $\mu$ m (filtraTECH)
- Mikrotitrační 96jamková destička
- Mikrozukavka (Eppendorf)
- NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- Pasteurovy pipety
- pH metr (Eutech Instruments)
- Plastové mikrozukavky o objemu 1,5 ml a 2 ml (Eppendorf)
- Spektrofotometru s monochromátorem Infinite M Nano (TECAN)
- Suchý blok s ohřevem ThermoCell MixingBlock (Bioer)
- Špičky (Eppendorf)
- T100 Thermal Cycler, PCR termocykler (Bio-Rad)
- Vortex Genie 2, vortex (Scientific Industries)
- XA 110/2X, analytické váhy (Radwag)

### 3.3 Seznam použitých programů a databází

- A plasmid editor (ApE; v2.0.61)
- EPSON Scan (3.49E; Seiko Epson Corporation)
- Image Lab (BioRad; verze 4.0.1 build 6)
- Microsoft Excel (Microsoft)
- Microsoft Powerpoint (Microsoft)
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>)
- ZEN Blue (Carl ZEISS)

### 3.4 Chemikálie

- 1-bromo-3-chloropropan (BCP; Sigma Aldrich)
- β-merkptoethanol (Sigma Aldrich)
- Akrylamid - N,N'-methylenbisakrylamid, 40%, 37,5:1 (BioRad)
- Činidlo Bradfordové - Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad)
- Deoxyribonukleotidy (dNTP; 10 mM)
- Dihydrát molybdenanu sodného ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; Sigma Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan sodný ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; Sigma Aldrich)
- DNA Gel Loading Dye, 6X (Thermo Scientific)
- DNasa I (Invitrogen)
- Dodecylsírán sodný (SDS; Sigma Aldrich)
- Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové (MES; Duchefa Biochemie)
- Dusičnan amonný ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; Sigma Aldrich)
- Dusičnan draselný ( $\text{KNO}_3$ ; Sigma Aldrich)
- EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová; Sigma Aldrich)
- Ethanol o koncentracích 70 % a 96 % (Lach:ner)
- Fe EDTA (Sigma Aldrich)
- First Strand Buffer (Thermo Scientific)
- Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix (Thermo Scientific)
- Gateway™ pDONR™221 Vector (Thermo Scientific)
- Gellan gum (Sigma Aldrich)
- GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich)

- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)
- Hexahydrát chloridu kobaltnatého ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma Aldrich)
- Heptahydrát síranu zinečnatého ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma Aldrich)
- Hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; Sigma Aldrich)
- Hypochlorid sodný ( $\text{NaClO}$ ; Honeywell Fluka)
- Chlorid nitrotetrazoliové modři (NBT; Sigma Aldrich)
- Chlorid vápenatý ( $\text{CaCl}_2$ ; Sigma Aldrich)
- P1 pufr (QIAGEN)
- P2 pufr (QIAGEN)
- P3 pufr (QIAGEN)
- iProof HF Buffer (5x koncentrovaný; BioRad)
- iProof High Fidelity DNA Polymerase (BioRad)
- Protilátka – primární, anti CSD2 chloroplastic Cu/ZnSOD (rabbit; Agrisera, kat. č. AS06 170)
- Protilátka – primární, anti FeSOD chloroplastic Fe-dependent SOD (rabbit; Agrisera, kat. č. AS06 125)
- Protilátka – sekundární, anti rabbit (Thermo-Fischer, kat. č. 31460)
- Jodid draselný (KI; Sigma Aldrich)
- Kanamycin (Duchefa Biochemie)
- Kyanid draselný (KCN; Sigma Aldrich)
- Kyselina boritá ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; Sigma Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková (HCl; Sigma Aldrich)
- Kyselina L-askorbová (Sigma Aldrich)
- Kyselina sírová ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; Sigma Aldrich)
- Laemliho pufr, 4X (BioRad)
- LB Broth (Miller; Sigma Aldrich)
- LB Broth s agarem (Miller; Sigma Aldrich)
- M-MLV reverzní transkriptasa (Invitrogen)
- Midori Green Advance DNA/RNA stain (Nippon Genetics)
- Monohydrát síranu manganatého ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; Sigma Aldrich)
- *Nde*I (Thermo Scientific; ER0581)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED; Sigma Aldrich)

- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (MACHEREY-NAGEL)
- Odtučňené sušené mléko, Blotting Grade Blocker (BioRad)
- Oligo(dT)18 primer (Sigma Aldrich)
- pB7m34GW (VIB, Gent, Belgie; Karimi et al., 2005)
- Pentahydrát síranu měďnatého ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; Duchefa Biochemie)
- Peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Sigma-Aldrich)
- Peroxodisíran amonný (APS; Sigma Aldrich)
- Primery (Eurofins Genomics)
- Proteinase K, recombinant, PCR grade (Thermo Scientific)
- *PvuII* (Thermo Scientific; ER0631)
- Reakční pufr s  $\text{MgCl}_2$  pro DNasu I, 10X (Thermo Scientific)
- Riboflavin (Applichem)
- RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega)
- Sacharosa (Penta Chemicals)
- Síran hořečnatý ( $\text{MgSO}_4$ ; Sigma Aldrich)
- SOC médium (Invitrogen)
- Spektinomycin (Duchefa Biochemie)
- TE buffer (Invitrogen™)
- Tris Acetát EDTA (TAE), 10X (Sigma Aldrich)
- Tris(hydroxymetyl)aminomethan (Tris; Sigma-Aldrich)
- TRIzol Reagent (Invitrogen)
- Tween 20 (Sigma Aldrich)
- UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda (Invitrogen)

### 3.5 Složení roztoků a médií

Složení zásobních roztoků pro přípravu MS média s modifikovaným obsahem mědi byla popsána v (Tabulka 1, Tabulka 2).

Tabulka 1: Složení 1000 x koncentrovaného zásobního roztoku mikroelementů pro přípravu MS média. Uvedené navážky jsou pro objem 1000 ml.

<b>1000x koncentrovaný zásobní roztok mikroelementů</b>	
<b>Mikroelementy</b>	<b>Navážka (g)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,25
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8,6
KI	0,83
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	16,9

Objem zásobního roztoku byl doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml.

Tabulka 2: Složení 10 x koncentrovaného zásobního roztoku makroelementů pro přípravu MS média. Uvedené navážky jsou pro objem 1000 ml.

<b>10x koncentrovaný zásobní roztok makroelementů</b>	
<b>Makroelementy</b>	<b>Navážka (g)</b>
CaCl <sub>2</sub>	3,32
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7
KNO <sub>3</sub>	19,0
MgSO <sub>4</sub>	1,81
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5

Objem zásobního roztoku byl doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml.

#### **1000 x koncentrovaný zásobní roztok železa (100 ml)**

- 3,67 g FeEDTA bylo rozpuštěno v 100 ml deionizované vody.

#### **Zásobní roztok 2mM mědi (100 ml)**

- 0,05 g CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O bylo rozpuštěno v 100 ml deionizované vody.

### **MS médium s modifikovaným obsahem mědi (1000 ml)**

- 10 g sacharosy
- 0,5 g MES
- 6,5 g Gellan gum
- 100 ml zásobního roztoku makroelementů
- 1 ml zásobního roztoku mikroelementů
- 1 ml zásobního roztoku železa
- 2mM zásobní roztok mědi
  - Pro 0,01 $\mu$ M koncentraci mědi – 5  $\mu$ l/l
  - Pro 0,1 $\mu$ M koncentraci mědi – 50  $\mu$ l/l
  - Pro 2 $\mu$ M koncentraci mědi – 1 ml/l

pH bylo upraveno na hodnotu 5,8 pomocí 10M a 1M KOH. Objem byl doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml. Sterilizace byla provedena autoklávováním

### **Sterilizační roztok pro sterilizaci *M. sativa***

- 66 ml 10% (v/v) hypochloridu sodného
- 34 ml 70% (v/v) ethanolu
- 1 ml smáčedla Tween 20

### **Extrakční NaP pufr (200 ml)**

- 1,1998 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 35,2 mg kyselina L-askorbová
- 20 ml glycerolu

pH bylo pomocí 1M NaOH upraveno na hodnotu 7,8 a objem byl deionizovanou vodou doplněn do 200 ml.

### **Činidlo Bradfordové - Protein Assay Dye Reagent Concentrate**

- Činidlo je ředěno deionizovanou vodou v poměru 1:4.

### **10% roztok APS (w/v)**

- 80 mg APS bylo rozpuštěno v 800  $\mu$ l deionizované vody



### **10 % roztok SDS (w/v)**

- 10 g SDS bylo rozpuštěno v 100 ml deionizované vody.

### **Tris-Cl 0,5M pufr (pH=6,8) (400 ml):**

- 24 g Tris

pH bylo pomocí HCl upraveno na hodnotu 6,8. Objem roztoku byl deionizovanou vodou doplněn do objemu 400 ml.

### **Tris-Cl, 1,5M (pH 8,8) (300 ml):**

- 54,45 g Tris

pH 8,8 byl pomocí HCl upraveno na hodnotu 8,8. Objem roztoku byl deionizovanou vodou doplněn do objemu 300 ml.

### **Transferový Tris-glycinový pufr (1000 ml):**

- 3 g Tris
- 14,4 g glycin

Objem byl deionizovanou vodou doplněn do objemu 1000 ml.

### **12% separační gel o tloušťce 1 mm**

- 3 ml akrylamidu
- 2,5 ml Tris-HCl pufru (pH=8,8)
- 4,35 ml deionizované vody
- 5  $\mu$ l TEMED
- 50  $\mu$ l 10% (w/v) APS
- Při SDS-PAGE bylo pro přípravu gelu použito 0,1 ml 10% (w/v) SDS

### **4% zaostřovací gel**

- 0,5 ml akrylamidu
- 1,26 ml Tris-HCl pufru (pH=6,8)
- 3,18 ml deionizované vody
- 5  $\mu$ l TEMED
- 25  $\mu$ l 10% (w/v) APS
- Při SDS-PAGE bylo pro přípravu gelu použito 0,05 ml 10% (w/v) SDS

### **200mM roztok KCN**

- 0,025 g KCN bylo rozpuštěno v 1,9 ml 50mM roztoku NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7,8)

### **50mM roztok NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7,8) (300 ml)**

- 2,67 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O bylo rozpuštěno v 250 ml deionizované vody.

pH bylo upraveno na hodnotu 7,8 a objem byl doplněn do 300ml.

- Inhibiční analýza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – k 50 ml roztoku NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bylo přidáno 24 μl 35% (v/v)
- Inhibiční analýza KCN – k 50 ml roztoku NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bylo přidáno 0,5 ml 200mM roztoku KCN

### **Roztok NBT (50 ml)**

- 24,4 mg NBT bylo rozpuštěno v 50 ml 50mM roztoku NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7,8).

### **Roztok EDTA (50 ml)**

- 92 mg Na<sub>2</sub>EDTA bylo rozpuštěno v 50 ml 50mM roztoku NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7,8).
- 2 minuty před počátkem inkubace bylo přidáno 162 μl TEMED
- 2 minuty před počátkem inkubace bylo přidáno 6 μl roztoku riboflavinu, který byl připraven rozpuštěním 7,2 mg riboflavinu v 500 μl 96% (v/v) ethanolu.

### **Pufr pro SDS-PAGE (Running buffer) (1000 ml)**

- 3 g Tris
- 14,4 g glycin
- 1 g SDS

Objem byl doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml.

### **TBS-T pufr (1000 ml)**

- 2,42 g Tris
- 8,78 g NaCl
- 1 ml Tween 20

pH je pomocí HCl upraveno na hodnotu 7,4 a objem je doplněn deionizovanou vodou do 1000 ml.

## **Roztoky mléka**

- 5% (w/v) roztok mléka - 5g mléka na 100 ml TBS-T
- 2% (w/v) roztok mléka – 1,5g mléka na 50 ml TBS-T

## **1% agarosový gel pro horizontální elektroforetickou separaci (100 ml)**

- 1 g agarosy
- 100 ml 1x TAE
- 1  $\mu$ l/ml Midori

## **Tekuté LB médium (500 ml)**

- 12,5 g LB Broth bylo rozpuštěno v deionizované vodě.

pH bylo upraveno na hodnotu 7,2 a objem byl doplněn do 500 ml. Proběhla sterilizace autoklávováním.

## **Tuhé LB médium (250 ml)**

- 10 g LB Broth s agarem bylo umístěno do 500ml skleněné lahve a zalito 250 ml deionizované vody. Sterilizace proběhla autoklávováním.

## **3.6 Metody**

### **3.6.1 Příprava kultivačního MS média s modifikovaným obsahem mědi**

Příprava kultivačního média vychází z postupu přípravy MS média (Murashige a Skoog médium-DUCHEFA). V 700 ml deionizované (MilliQ) vody bylo rozpuštěno 10 g sacharosy a 0,5 g MES. Do roztoku bylo přidáno 100 ml zásobního roztoku makroelementů a 1 ml zásobního roztoku železa (zásobní roztoky viz. kapitola 3.5). Pomocí 10M a 1M roztoku KOH bylo upraveno pH na hodnotu 5,8. Objem média byl doplněn deionizovanou vodou na 1000 ml. Médium bylo rozděleno po 500 ml do dvou litrových lahví. Do obou lahví bylo přidáno 3,25 g ztužovače Gellan gumu a obsah uzavřené lahve byl promíchán krouživými pohyby. Médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci byl do média přidán v laminárním boxu 1 ml sterilního roztoku mikroelementů. Mikroelementy byly sterilizovány prostřednictvím filtrace přes membránový filtr. Do média dále bylo přidáno příslušné množství sterilního roztoku 2mM mědi, který byl rovněž sterilizován filtrací. Byla připravována média s koncentracemi mědi: 0,01 $\mu$ M; 0,1 $\mu$ M; 2 $\mu$ M. Média s přidanými komponenty byla rozlita přibližně po 50 ml do hranatých Petriho misek.

### 3.6.2 Sterilizace semen *Arabidopsis thaliana*

Sterilizace semen byla prováděna ve sterilních podmínkách laminárního boxu. Do 2ml Eppendorf mikrozkušavky obsahující semena byl pipetován 1 ml 70% ethanolu (v/v). Semena byla v 70% (v/v) ethanolu inkubována po dobu 5 minut za stálého protřepávání. Po uplynutí 5 minut byl pomocí pipety odstraněn co největší objem ethanolu. Do mikrozkušavky byl následně pipetován 96% (v/v) ethanol, v němž byla semena inkubována 1 minutu. V tomto kroku je třeba dodržet dobu inkubace, neboť delší inkubační doba může negativně ovlivnit klíčivost semen. Po 1 minutě byl pipetou odstraněn podíl ethanolu. Semena byla dále promývána ve sterilní deionizované vodě. Do mikrozkušavky byl přidán 1 ml deionizované sterilní vody, který byl po 5 minutách promývání odstraněn. Promývání deionizovanou vodou probíhá celkem dvakrát po dobu 5 minut. Po druhém promývání jsou semena ponechána ve vodě. Pomocí automatické pipety se sterilní špičkou byl rozvířen obsah mikrozkušavky. Následně byl obsah nabrán do špičky pipety. Pomocí pipety byla nasátá semena rovnoměrně rozprostřena na povrch filtračního papíru, který byl položen do nitra zaoblené Petriho misky. Semena byla ponechána v laminárním boxu v otevřené Petriho misce, tak aby došlo k odpaření vody z filtračního papíru. Po odpaření vody byl obsah Petriho misky uzavřen pomocí parafilmu a papírové lepicí pásky, tak aby nedošlo ke kontaminaci semen po vyjmutí misky z laminárního boxu.

### 3.6.3 Chemické narušení testy a sterilizace semen *Medicago truncatula*

K semenům umístěným v 50ml Eppendorf zkumavce bylo v digestoři přidáno 25 ml 96% (v/v) kyseliny sírové. Za stálého protřepávání byla semena inkubována v kyselině po dobu 10 minut. Po 10 minutách byla kyselina sírová ze zkumavky odstraněna pomocí Pasteurovy pipety. Semena byla šestkrát promyta v 40 ml destilované vody. V laminárním boxu byla semena inkubována v roztoku 4% (v/v) hypochloridu sodného po dobu 10 minut za stálého protřepávání obsahu zkumavky. Po odstranění roztoku hypochloridu sodného byla semena sedmkrát promyta v 25 ml sterilní deionizované vody. Po posledním promývání byla semena ponechána v 25 ml sterilní deionizované vody. Ústí zkumavky bylo obaleno parafilmem, aby nedošlo ke kontaminaci jejího obsahu. Semena byla ponechána v lednici ve vodě po dobu minimálně 24 h před jejich samotnou kultivací.

#### 3.6.4 Narušení testy a sterilizace semen *Medicago sativa*

Pro kultivaci semen *M. sativa* je esenciální porušit testu semene. Porušení testy zlepšuje klíčivost semen. Semena *M. sativa* mají testu o větší tloušťce než *M. truncatula*. U *M. sativy* byl vyzkoušen protokol při němž je testa narušena pomocí smirkového papíru. Bylo taktéž vyzkoušeno chemické narušení testy pomocí kyseliny sírové, které bývá využíváno u *M. truncatula* (viz. kapitola 3.6.3). Byla rovněž provedena kombinace obou protokolů, kdy bylo nejprve provedeno mechanické narušení testy a sterilizace sterilizačním roztokem a poté bylo provedeno chemické narušení testy a sterilizace roztokem hypochloridu. Kombinace těchto dvou protokolů se neosvědčila a nejlepší klíčivost byla zaznamenána u protokolu využívající chemické narušení testy.

Při mechanickém narušení testy byl do zaoblené Petriho misky položen vystřižený kruh smirkového papíru, na nějž byla rozprostřena semena. Semena byla přikryta dalším kruhem smirkového papíru. Petriho miska byla uzavřena pomocí papírové lepicí pásky. Pomocí lepicí pásky byla Petriho miska i s jejím obsahem připevněna na vortex. Semena byla tímto způsobem mechanicky obrušována po dobu 8 minut. Po ukončení broušení semen byla semena přenesena do 50ml Eppendorf zkumavky a byla sterilizována v laminárním boxu. K semenům bylo přidáno 25 ml 70% (v/v) ethanolu, v němž byla inkubována 1 minutu. Po odstranění ethanolu pomocí pipety bylo k semenům přilito 25 ml sterilizačního roztoku pro sterilizaci *M. sativa* (viz. kapitola 3.5) a semena byla v roztoku za protřepávání ponechána po dobu 3 minut. Po 3 minutách byl sterilizační roztok odstraněn pomocí pipety a semena byla dvakrát promyta ve sterilní deionizované vodě. Stejně jako *M. truncatula* byla semena *M. sativa* po dobu 24 hodin ponechána v lednici v sterilně uzavřené zkumavce obsahující vodu, aby došlo k nabobtnání semen.

#### 3.6.5 Kultivace rostlin v *in vitro* podmínkách

Sterilizovaná semena *A. thaliana* byla pomocí sterilního párátko přenesena z filtračního papíru na povrch kultivačního média v hranaté Petriho misce. Semena *A. thaliana* byla před kultivací ve fytotronové komoře stratifikována 1-2 dny při teplotě 4°C.

Sterilní semena *M. truncatula* a *M. sativa* byla v Eppendorf zkumavce rozvířena a byla přelita společně s vodou do sterilní prázdné Petriho misky. Pomocí sterilní pinzety byla semena umístována na povrch kultivačního média. Mezi jednotlivými miskami byla pinzeta namáčena do 96% (v/v) ethanolu a byla žihána v přístroji pro sterilizaci nástrojů, aby bylo eliminováno riziko kontaminace.

Semena byla kultivována ve fytotronové komoře za podmínek: teplota 22°C, při denním režimu: 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70% vlhkosti a intenzitě osvětlení 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### 3.6.6 Homogenizace rostlinného materiálu

Semenáčky *M. sativa* a *M. truncatula* byly homogenizovány ve stáří 28 dní, *A. thaliana* ve stáří 19 dní. Rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce, která byla předem vychlazená tekutým dusíkem. Do třecí misky obsahující tekutý dusík byl pomocí pinzety ponořen semenáček. Následně byl tloučkem semenáček rozdrcen na jemný homogenát. Homogenát byl špachtlí přenesen do 2ml mikrozkušavky Eppendorf. Mikrozkušavka obsahující homogenát byla ponořena do tekutého dusíku, čímž byl vzorek rychle zamražen, aby bylo eliminováno riziko denaturace biomakromolekul. Takto připravené vzorky byly skladovány v mrazícím boxu při teplotě -80°C.

### 3.6.7 Extrakce proteinů

Do mikrozkušavky obsahující homogenát byl pipetován extrakční NaP pufr. Na přibližně 1 ml homogenitu bylo pipetováno 400  $\mu\text{l}$  extrakčního pufru. Homogenát s extrakčním pufrům byl mírně vortexován a ponechán na ledu po dobu 35 minut, přičemž každých přibližně 10 minut byl vzorek jemně vortexován. Vzorek byl 15 minut centrifugován v centrifuze při 13 000 g a teplotě 4°C. Po centrifugaci byl pipetou ze zkumavek odebrán supernatant. Supernatant byl přenesen do sterilních mikrozkušavek a byl znovu centrifugován po dobu 5 minut při 13 000 g a teplotě 4°C, aby došlo k odstranění veškerých znečišťujících pevných částic. Po druhé centrifugaci byl opět pipetou odebraný supernatant přenesen do sterilních mikrozkušavek. Takto získaný extrakt byl zmražen v tekutém dusíku a dále byl skladován v mrazícím boxu při teplotě -80°C.

### 3.6.8 Kvantifikace celkového obsahu proteinů metodou Bradfordové

Principem kolorimetrické metody stanovení celkové koncentrace proteinů Marion M. Bradfordové je navázání barviva Coomassie brilliant blue G-250 na bazické aminokyseliny a zbytky aromatických aminokyselin proteinů. Po navázání barviva na proteiny dochází ke změně zabarvení roztoku a posunu absorpčního maxima z 465 nm na 595 nm (Bradford, 1976). Nejprve musí být činidlo Bradfordové naředěno deionizovanou vodou v poměru (1:4). Měření absorbance jednotlivých vzorků je prováděnou spektrofotometricky v 96jambkové mikrotitrační destičce. Měření každého vzorku je prováděno ve 3 replikátech, a kromě vzorků musí být též změřen slepý vzorek (tzv. blank), jehož absorbance je odčítána od absorbancí jednotlivých vzorků. Do 3 jamek

destičky bylo napipetováno jako blank 300  $\mu$ l zředěného činidla. Pro každý vzorek je do 3 jamek napipetováno 299  $\mu$ l zředěného činidla a 1  $\mu$ l daného vzorku. Pomocí pipety byly extrakt a činidlo promíchány. Před měřením absorbance je třeba vzorky s činidlem alespoň 15 minut inkubovat při laboratorní teplotě. V jamkách nesmí být přítomny vzduchové bubliny, které by mohly ovlivnit měření. Po inkubaci je možno vložit mikrotitrační destičku do spektrofotometru (Infinite M Nano) a změřit absorbance. Koncentrace byly zjištěny z již známe kalibrační křivky hovězího sérového albuminu (BSA). Výsledky byly zpracovány v programu MS Excel.

### 3.6.9 Stanovení aktivit superoxiddismutas metodou NATIVE-PAGE

Elektroforetická separace proběhla za nedenedaturujících podmínek. Byly použity 1mm polyakrylamidové gely. Hustota rozdělovacího gelu byla 12 %. Vrstva zaostřovacího gelu měla hustotu 4 %. Skla pro přípravu gelů byla řádně vyčištěna 96% (v/v) ethanolem a následně byla vysušena dusíkem. Byla sestavena aparatura pro přípravu gelů. Nejprve byl připraven rozdělovací gel (viz. kapitola 3.5). Mezi skla byla pomocí Pasteurovy pipety napipetována vrstva rozdělovacího gelu. Hladina rozdělovacího gelu nesahala až po horní hranu skla, byl ponechán prostor pro vrstvu zaostřovacího gelu a pro vložení hřebínku (přibližně 2 cm). Nepolymerizovaný gel byl převrstven vrstvou isopropanolu, aby bylo zabráněno odpaření vody z gelu. Gel byl ponechán k tuhnutí 45 minut. Po ztuhnutí byla slita ochranná vrstva isopropanolu, gel byl 10x promyt destilovanou vodou. Přebytná voda byla z gelu odstraněna pomocí filtračního papíru. Rozdělovací gel byl převrstven 4% zaostřovacím gelem (viz. kapitola 3.5) a mezi skla byl vložen 10jamkový hřebínek. Gel byl ponechán k tuhnutí 30 minut. Po ztuhnutí byl před použitím gel zabalen do čiré potravinářské folie, aby bylo zabráněno vysychání gelu. Pro experiment byl použit proteinový extrakt v NaP pufriu (viz. kapitola 3.6.7). Pro stanovení aktivit SOD u *A. thaliana* byla použita nanáška 20 mg proteinů. Pro stanovení aktivit u *M. sativa* a *M. truncatula* byla použita nanáška 30 mg proteinů. Během separace byla elektroforetická vana naplněna transferovým tris-glycinovým pufrem. Do jamek gelu byly pipetovány objemy extraktu odpovídající požadované nanášce proteinů. Do jedné z jamek bylo nanášeno 3,5  $\mu$ l markeru Precision Plus Protein Dual Color Standards. Aparatura byla během separace chlazená ledem. Při separaci proteinů na jednom gelu byl aplikován konstantní proud 20 mA a proměnlivým napětím s maxime při 270 V. Separace probíhala 1,5 hodiny.

Po ukončení separace byl gel vyjmut ze skel. Nejprve byl za stálého třepání 10 minut inkubován v 50mM roztoku  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  o pH 7,8. Poté byl gel za stálého třepání inkubován 20 minut ve tmě v roztoku NBT (viz. kapitola 3.5). Následně byl gel umístěn na 15 minut do roztoku EDTA (viz. kapitola 3.5). Inkubace v roztoku EDTA probíhala ve tmě za stálého třepání. Po 15 minutách byl gel s roztokem EDTA vystaven světelnému záření o intenzitě  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Po 5 minutách byl roztok EDTA odstraněn a nahrazen destilovanou vodou. Gel v destilované vodě byl dále alespoň 1 hodinu ponechán na světle, aby došlo k vývoji zabarvení. Gel byl zdokumentován na zařízeních Image Scanner III (GE Healthcare) a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Byly použity programy PSON Scan (3.49E; Seiko Epson Corporation) a Image 47 Lab (Bio-Rad).

Pro provedení inhibičních analýz byly do roztoku 50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  o pH 7,8 přidány inhibitory  $\text{H}_2\text{O}_2$  (výsledná  $c = 5\text{mM}$ ), a KCN (výsledná  $c = 2\text{mM}$ ).

### 3.6.10 Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Pro přípravu vzorků se používá Laemliho pufr, který se ředí  $\beta$ -merkapt ethanolom v poměru 9:1 (900  $\mu\text{l}$  Laemliho pufru bylo smíšeno s 100  $\mu\text{l}$   $\beta$ -merkapt ethanolu). Proteinové extrakty v NaP pufru byly smíšeny se zředěným Laemliho pufrém v poměru 3:1 (90  $\mu\text{l}$  proteinového extraktu na 30  $\mu\text{l}$  zředěného Laemliho pufru). Následně byly extrakty zahřáty inkubovány v suchém bloku s ohřevem při teplotě  $96^\circ\text{C}$  po dobu 5 minut.

### 3.6.11 SDS-PAGE

Gely byly připraveny stejným způsobem jako u metody NATIVE-PAGE (viz. kapitola 3.6.9), avšak do separačního a zaostřovacího gelu byl navíc přidán roztok 10% SDS. Elektroforetická vana byla naplněna pufrém pro SDS-PAGE (viz. kapitola 3.5). Do jamek byly pipetovány proteinové extrakty obsahující Laemliho pufr. Samotná elektroforetická separace probíhala nejprve 15 minut při napětí 150 V, poté bylo napětí zvýšeno na 100 V. Separace probíhala 90 minut.

### 3.6.12 Transfer proteinů na PVDF membránu

Byla připravena PVDF membrána o rozměrech 6 x 8,5 cm. Membrána byla aktivována v methanolu (přibližně 30 s). Filtrační papír a houby byly hydratovány v transferovém pufru. Taktéž membrána byla promyta v transferovém pufru. Do kazety byly navrstveny v následujícím pořadí: houba, 3 filtrační papíry, polyakrylamidový gel, membrána, 3 filtrační papíry, houba. Na jednotlivé vrstvy byl aplikován válečkem přiměřený tlak, aby došlo k vypuzení vzduchových bublin. Kazeta byla vložena do vany naplněné



transferovým pufrům a byla chlazená chladícím blokem. Byl zvolen pomalý transfer, který probíhal přes noc (přibližně 17 h). Vana byla během transferu chlazená v lednici a bylo zvoleno napětí 24 V. Po ukončení transferu byla membrána promyta v deionizované vodě. Proteiny na membráně byly obarveny roztokem Ponceau S. pro ověření transferu. Membrána byla zbavena přebytečného barviva promytím v deionizované vodě a byla fotograficky zdokumentována. Membrána byla třikrát (pokaždé po dobu 10 minut) promyta v TBS-T pufru.

### 3.6.13 Imunolokalizace proteinů

Membrána byla 2 hodiny blokována v roztoku 5% (w/v) sušeného mléka rozpuštěného v TBS-T pufru. Blokace probíhala za pokojové teploty na třepacím zařízení. Primární protilátky (anti FeSOD, anti CSD2) byly zředěny v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-T pufru v poměru 1:2000. Membrána byla v roztoku obsahujícím primární protilátku inkubována přes noc, na třepacím zařízení při teplotě 4 °C. Po ukončení inkubace v roztoku s primární protilátkou byla membrána 4x promyta v TBS-T pufru (každé promývání trvalo 8 minut). Následně byl připraven roztok sekundární protilátky (1:5000) v 2% (w/v) roztoku sušeného mléka v TBS-T. Inkubace membrány probíhala 1,5 h za pomalých kývavých pohybů za pokojové teploty. Po ukončení inkubace byla membrána 3x promyta v TBS-T (každé promytí probíhalo 5 minut). Pro vizualizaci byl připraven roztok luminolu a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v poměru 1:1, v němž byla membrána inkubována 2 minuty. Membrána byla vizualizována v přístroji ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad), byl využit program Image Lab.

### 3.6.14 Izolace celkové RNA *Medicago truncatula*

Pro izolaci celkové RNA byly použity homogenáty rostlinného materiálu *M. truncatula* (viz. kapitola 3.6.6), které byly kultivovány na MS médiu o koncentracích mědi: 0,01 μM; 0,1 μM; 2 μM.

Zmrazený homogenát v 2ml mikrokumavce byl převrstven 800 μl TRIzol Reagentu. S Reagentem byl homogenát 5 minut inkubován při laboratorní teplotě. Suspenze byla centrifugována při 12000 g, 10 minut, při teplotě 4°C. Po centrifugaci byl odebrán supernatant, který byl přenesen do sterilní 2ml mikrokumavky a byl převrstven 80 μl BCP. Vzorek s BCP byl třepáním (20 s) promíchán a následně tato směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Vzorek byl centrifugován při 12000 g, 15 minut, při teplotě 4 °C. Po centrifugaci vzniklo rozhraní fází, byla odebrána vodná fáze, byla přenesena do sterilní 2ml mikrokumavky a převrstvena 100% (v/v) isopropanolem

v poměru 2:1. Pomocí vortexu byla směs řádně promísena. Následovala inkubace 5 minut při laboratorní teplotě, po ukončení inkubace byl vzorek centrifugován při 12000 g, 8 minut, při teplotě 4 °C. Supernatant byl pomocí pipety odstraněn a získaný pelet byl převrstven 1 ml 75% (v/v) ethanolu. Proběhla centrifugace při 7500 g, 5 minut, při teplotě 4°C. Pomocí pipety byl odstraněn ze vzorku ethanol a pelet byl následně vysušen (5 minut při laboratorní teplotě). Vysušený pelet byl rozpuštěn v 50 µl destilované vody s nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda). Pelet s destilovanou vodou byl inkubován na ledu 30 minut.

Pomocí NanoDrop Lite spektrofotometru byla změřena absorbance vzorku RNA. Koncentrace vzorku RNA byla pomocí destilované vody s nulovou aktivitou RNas upravena na hodnotu 200 ng/µl.

### 3.6.15 Odstranění kontaminující DNA se vzorku izolované RNA

Ze vzorku RNA bylo nutno odstranit kontaminující gDNA pomocí enzymu DNasa I. Celkový objem enzymatické reakce byl 20 µl. Do mikrozkušavky bylo pipetováno 2 µl reakčního pufru s obsahem MgCl<sub>2</sub> (pufr je 10x koncentrovaný, jeho výsledná koncentrace je 1x), 2 µl DNasy I, 10 µl vzorku izolované RNA (2000 ng izolátu RNA v reakční směsi). Objem byl do 20 µl doplněn 6 µl destilované vody s nulovou aktivitou RNas.

Reakční směs byla inkubována v termocycleru (40 minut, při 37 °C). Pro zastavení aktivity enzymu DNasa I byly do reakční směsi byly přidány 2 µl 50mM roztoku EDTA. Reakční směs byla s EDTA inkubována 10 minut při 70 °C. Purifikovaný izolát RNA byl umístěn na led. Byla odebrána část izolátu RNA pro zhodnocení čistoty a kvality izolátu pomocí horizontální elektroforetické separace (viz. kapitola 3.6.18) v 1% (w/v) agarosovém gelu.

### 3.6.16 Reverzní transkripce

Pro přípravu konstruktů bylo nutno získat z purifikovaného izolátu RNA pomocí reverzní transkriptasy komplementární cDNA. Reakce byla provedena v 0,2ml mikrozkušavkách. Celkový objem reakční směsi byl 20 µl, tato reakce však byla složena ze dvou reakčních směsí (reakční směs I, reakční směs II), přičemž obě reakční směsi měly objem 10 µl.

Do reakční směsi I bylo pipetováno: 4,5 µl destilované vody s nulovou aktivitou RNas, 0,5 µl Oligo(dT)18 primer (10µM), 5 µl purifikovaného izolátu RNA. Proběhla inkubace reakční směsi I v termocycleru (10 minut, 70 °C, teplota víka 75 °C). Po ukončení inkubace byla reakční směs I umístěna na led a byla následně přidána reakční směs II.

Reakční směs II obsahovala: 4,2 µl destilované vody s nulovou aktivitou RNAs, 4 µl First Strand Pufr (5x koncentrovaného, výsledná koncentrace 1x), 0,4 µl RNasin Ribonuclease inhibitoru, 0,4 µl M-MLV reverzní transkriptázy, 1 µl 10mM dNTP (výsledná koncentrace 0,5mM). Reakční směs obsahující reakční směsi I a II byla v termocycleru inkubována 3 hodiny, při 42 °C, teplota víka 45 °C. Deaktivace reverzní transkriptasy je provedena pomocí působení zvýšené teploty na vzorek. Pro deaktivaci byl vzorek vložen do termocycleru a byl 10 minut inkubován při teplotě 70 °C, teplotě víka 75 °C.

### 3.6.17 PCR reakce

Pro PCR reakci byla jako templát použita izolovaná cDNA z *M. truncatula* kultivované na MS médiu s 2µM koncentrací mědi. Byl použit tento izolát vzhledem k tomu, že cílem bylo amplifikovat cDNA CSD2, přičemž exprese Cu/ZnSOD je silně závislá na abundanci mědi. Během přípravy reakční směsi byly jednotlivé komponenty chlazeny na ledu, enzym byl chlazen v chladicím stojanu a se směsí bylo opatrně zacházeno, aby nedošlo k degradaci cDNA a enzymu, a nebo ke kontaminaci reakční směsi.

Byla provedena PCR o objemu 200 µl. Do 1,5ml mikrozkušavky bylo pipetováno: 40 µl pufru 5X iProof HF Buffer (výsledná koncentrace 1x), 4 µl dNTP (výsledná koncentrace 200µM), 10 µl pracovního roztoku forward primeru a 10 µl pracovního roztoku reverse primeru (koncentrace pracovního roztoku 10µM; výsledná koncentrace obou primerů 0,5µM), 134 µl destilované vody s nulovou aktivitou RNAs/DNAs, 2 µl DNA polymerasy (iProof High Fidelity DNA Polymerase; výsledná koncentrace 0,02 U/µl), 1 µl templátové cDNA. Připravená 200µl reakce byla jemně promíchána pomocí vortexu a byla stočena ve stolní mikrocentrifuze. Směs byla po 50 µl rozpipetována do 4 mikrozkušavek o objemu 0,2 ml. Připravená reakční směs byla vložena do termocycleru, teplota annealingu byla nastavena na 72 °C, teplota víka na 105 °C, reakce byla nastavená na opakování 35 cyklů. Po ukončení polymerasové reakce byla provedena horizontální elektroforetická separace.

Pro amplifikaci genu *MtCSD2* byly navrženy primery tak, aby byl úsek ohraničen attB1 a attB2 recombinačními místy:

Forward primer:

```
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGATGGCATTCTAAGGTCAATA  
GC
```

Reverse primer:

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGAACTTGCTAGGAACAAAATC  
TG

### 3.6.18 Horizontální elektroforetická separace

Byla nachystána aparatura na přípravu agarosového gelu a následně byl připraven 1% agarosový gel (viz. kapitola 3.5). Agarosa byla za působení tepla rozpuštěna v 1x TAE. Po zchladnutí na přibližně 45 °C bylo přidáno Midori, aby nedošlo k degradaci barviva. Tekutý agarosový gel byl vlit do aparatury pro přípravu gelu, do neztuhnutého gelu byl vložen 10jamkový hřebínek a gel byl ponechán k tuhnutí 30 minut. K vzorku bylo přidáno 6x Loading Dye (výsledná koncentrace 1x). Gel byl vložen do elektroforetické vany naplněné 1x TAE. Do první jamky byly pipetovány 4 µl markeru GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Do zbytku jamek byl pipetován vzorek smíšený s Loading Dye. Na zdroji bylo nastaveno elektrické napětí 100 V, elektroforetická separace probíhala 30 minut. Gel byl vizualizován v přístroji Gel Doc EZ Imager a pro zpracování byl využit program Image Lab.

### 3.6.19 Izolace PCR produktu z gelu a jeho purifikace

Po ukončení horizontální elektroforézy byla část gelu obsahující amplifikovaný PCR produkt vyříznuta z gelu pomocí skalpelu. Pro vizualizaci PCR produktu byl použit UV transiluminátor.

Pro purifikaci PCR produktu byla použita sada NucleoSpin Gel and PCR Clean-up. Vyříznutý gel byl umístěn do mikrozkuhavky a převrstven NTI pufrem. Na 800 mg 1% (w/v) agarosového gelu bylo použito 1,6 ml NTI pufru. Vzorek byl zahříván v suchém bloku s ohřevem při teplotě 50 °C do úplného rozpuštění gelu, aby nedošlo k ucpání pórů purifikační kolonky. Vzorek byl v průběhu rozpouštění gelové matrice třikrát promíchán pomocí vortexu. Do purifikační kolonky bylo nanášeno 700 µl vzorku. Kolonka byla centrifugována při 11000 g po dobu 46 s. Eluát, který prošel kolonkou, byl znovu napipetován do kolonky a opět centrifugován. To bylo opakováno ještě jednou, aby bylo dosaženo co nejvyššího výtěžku. Do kolonky bylo pipetováno 700 µl NT3 pufru a následně byla centrifugována po dobu 30 s při 11 000 g. Eluát byl odstraněn a prázdná kolonka byla opět centrifugována (1 minutu při 11000 g), aby byla zbavena reziduí pufru. Kolonka byla v suchém bloku s ohřevem 5 minut zahřívána při teplotě 70 °C, aby došlo k vysušení kolonky. Do kolonky bylo pipetováno 34 µl destilované vody s nulovou aktivitou RNas/DNas a kolonka byla 1 minutu centrifugována při 11000 g. Eluát

obsahující cDNA byl dvakrát znovu pipetován do kolonky a centrifugován, aby bylo uvolněno z matrice maximální množství cDNA. Následně byla na NanoDrop Lite spektrofotometru změřena absorbance vzorku cDNA. Purifikovaný izolát cDNA byl dlouhodobě uchován při teplotě -20 °C.

### 3.6.20 BP rekombinační reakce

Do mikrozkušavky byl pipetován 1 µl cDNA PCR produktu, 1 µl donorového vektoru (150 ng/µl) a objem reakce byl doplněn do 8 µl TE puforem (pH=8). Do reakční směsi bylo pipetováno 8 µl enzymu BP Clonase™ II enzyme mix. Reakční směs byla mírně vortexována. Reakční směs byla inkubována přes noc při teplotě 25 °C. Do reakční směsi byl přidán 1 µl Proteinasy K, směs byla jemně promíchána pomocí vortexu a inkubována 10 minut při teplotě 37 °C.

### 3.6.21 Transformace konstruktů do bakteriální kultury *Escherichia coli*

Do mikrozkušavky bylo ke kultuře *Escherichia coli* pipetováno 10 µl vektoru. Bakterie byly vystaveny teplotnímu šoku. Kultura s vektorem byla 30 minut ponechána na ledové tříšti. Poté byla kultura na 1 minutu umístěna do suchého bloku s ohřevem, který byl předem zahřát na teplotu 42 °C. Kultura byla opět inkubována na ledu, a to po dobu 3 minut. Ke kultuře bylo přidáno 200 µl SOC média. Pro regeneraci byla kultura 1 h inkubována na třepačce v inkubátoru při teplotě 37 °C.

Tuhé LB médium bylo rozehřáto v mikrovlnné troubě. Ke kapalnému LB médiu bylo přidáno po zchladnutí antibiotikum, aby nedošlo k jeho degradaci. Vektor *pDONR™221* nese gen pro rezistenci vůči kanamycinu. K 25 ml LB média bylo přidáno 25 µl kanamycinu (koncentrace zásobního roztoku 50 mg/ml; výsledná koncentrace v médiu 50 µg/ml). Vektor *pB7m34GW* obsahuje gen pro rezistenci vůči spektinomycinu. K 25 ml LB média bylo přidáno 12,5 µl spektinomycinu (koncentrace zásobního roztoku 100 mg/ml; výsledná koncentrace v médiu 50 µg/ml). 200 µl bakteriální kultury bylo v laminárním boxu pomocí očkovací hokejky rozetřeno na povrch tuhého LB média s obsahem selekčního antibiotika. Bakteriální kultura byla na LB médiu přes noc kultivována při teplotě 37 °C. Kultury v Petriho misce kultivované na LB médiu byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

Pomocí sterilního párátko bylo jednotlivými koloniemi inokulováno sterilní tekuté LB médium obsahující daná selekční antibiotika v koncentraci 50 µg/ml (z každé kolonie byla založena nová kultura v tekutém LB médiu). Takto vytvořené suspenzní kultury byly

kultivovány do druhého dne v inkubátoru při teplotě 37 °C. Z jednotlivých kultur byla izolována plasmidová DNA. Transformované kultury byly uchovány v 25% (v/v) glycerolu v mrazícím boxu při teplotě -80 °C.

### 3.6.22 Izolace plasmidové DNA

Bakteriální suspenzní kultura (viz. 3.5.21) byla přenesena do 2ml mikrozkušavky a centrifugována (3000-6000 g; 4 minuty). Byl odstraněn supernatant, tímto způsobem byl centrifugován celý objem bakteriální kultury. K peletu bylo v dalším kroku přidáno 250 µl P<sub>1</sub> pufru. Pomocí vortexu byla kultura v pufru suspendována. Bylo přidáno 250 µl P<sub>2</sub> pufru. Vzorek byl 10x promíchán kývavým pohybem a inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Ke vzorku bylo napipetováno 300 µl P<sub>3</sub> pufru, vzorek byl 5 minut inkubován na ledu. Poté proběhla centrifugace vzorku (14000-15000 g, 15 minut, 4 °C). Krátce před koncem centrifugace bylo do sterilní 1,5ml mikrozkušavky pipetováno 600 µl 100% (v/v) isopropanolu. Po ukončení centrifugace byl odebrán supernatant, ten byl následně přidán do mikrozkušavky obsahující isopropanol. Proběhla centrifugace (16000g, 20 minut, za pokojové teploty). Po ukončení centrifugace byl odstraněn isopropanol a pelet byl promyt 750 µl vychlazeného ethanolu 75% (v/v). Proběhla centrifugace (16000 g, 5 minut, při pokojové teplotě). Pomocí pipety byl odstraněn ethanol. Vzorek byl opět centrifugován (16000 g, 2 minuty, při pokojové teplotě) a byly odstraněny zbytky ethanolu. Pelet byl vysušen v laminárním boxu.

Po vysušení byl pelet rozpuštěn v 50 µl destilované vody s nulovou aktivitou RNas/DNas. Na NanoDrop Lite spektrofotometru byla změřena absorbance vzorku při programu měření dsDNA. Vzorek byl uchován v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

### 3.6.23 Restrikční štěpení

Pro restrikční štěpení entryklonu i expresního vektoru byl použit enzym *PvuII*. Expresní vektor byl podruhé štěpen endonukleasou *NdeI*. Restrikční štěpení bylo provedeno pro ověření správnosti připraveného konstruktů. Na 1 reakci bylo pipetováno: 14,8 µl destilované vody s nulovou aktivitou RNas/DNas, 2 µl pufru, 0,2 µl enzymu *PvuII*, 3 µl DNA. Reakce byla inkubována 45 minut při teplotě 37 °C. Po ukončení inkubace byla provedena horizontální elektroforetická separace vzorku (viz. kapitola 3.6.18).

### 3.6.24 Purifikace plasmidové DNA

Pro purifikaci plasmidové DNA byla použita sada GenElute™ Plasmid Miniprep Kit. Do kolonky bylo pipetováno 500 µl promývacího pufru Column Preparation Buffer. Kolonka naplněná promývacím pufrem byla 1,5 minuty centrifugována při 12800 RPM. Ke vzorku

bylo přidáno 200  $\mu$ l Optional Wash Solution. Veškerý objem vzorku byl pipetován do promyté kolonky a následně centrifugován (12800 RPM, 1,5 minuty, laboratorní teplota). Pro zvýšení výtěžku, byl eluát dvakrát opětovně nanesen do nitra kolonky a centrifugován (centrifugace proběhne celkem třikrát). Eluát byl odstraněn a do kolonky bylo pipetováno 750  $\mu$ l Wash Solution. Proběhla centrifugace (12800 RPM, 2 minuty, laboratorní teplota). Eluát byl odstraněn a centrifugace byla opakována, aby došlo k odstranění zbytků roztoku z kolonky. Kolonka byla sušena 5 minut v suchém bloku s ohřevem při teplotě 65 °C. Do kolonky bylo přidáno 35  $\mu$ l destilované vody s nulovou aktivitou RNAs/DNAs a proběhla centrifugace (12800 RPM, 2 minuty, laboratorní teplota). Pro zvýšení výtěžku purifikace byl eluát opětovně pipetován do kolonky a centrifugován. V přístroji NanoDrop Lite spektrofotometr byla změřena absorbance vzorku při programu měření dsDNA.

### 3.6.25 Transformace bakteriální kultury *Agrobacter tumefaciens*

K 50  $\mu$ l bakteriální kultury *A. tumefaciens* v 1,5ml mikrozkumavce bylo pipetováno 5  $\mu$ l purifikované plasmidové DNA. Bakteriální kultura byla umístěna na led a proběhla inkubace kultury po dobu 30 minut. Kultura byla zmrazena tekutým dusíkem a v dusíku byla ponechána 5 minut. Následně proběhla 15minutová inkubace kultury při laboratorní teplotě. Pro regeneraci buněk v kultuře bylo přidáno 400  $\mu$ l SOC média. Kultura byla inkubována (180 RPM, 25 °C, po dobu dvou hodin).

### 3.6.26 Transientní transformace *Nicotiana benthamiana*

Do 20 ml tekutého LB média byl přidán spektinomycin (výsledná koncentrace 50  $\mu$ g/ml). Médium bylo inokulováno 50  $\mu$ l bakteriální kultury *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt *35S::MtCSD2::GFP*. Rovněž bylo inokulováno 20 ml LB média s kanamycinem (výsledná koncentrace kanamycinu 50  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l kultury *p19*. Kultury byly uchovány v 25% (v/v) glycerolu při -80 °C. Proběhla kultivace přes noc (180 RPM, 25 °C, ve tmě).

Druhého dne byly kultury centrifugovány (3200 g, 10 minut, při laboratorní teplotě). Supernatant byl odstraněn. K peletu bylo přidáno 10 ml infiltračního média. Pelet s infiltračním médiem byl centrifugován, aby došlo k jeho promytí (3200 g, 5 minut, při laboratorní teplotě) a supernatant byl následně odstraněn. K peletu bylo přidáno 10 ml infiltračního média. Pelet byl suspendován kývavými pohyby a byla změřena optická hustota kultury při vlnové délce záření 600 nm. V případě že se OD<sub>600</sub> u kultury nesoucí *35S::MtCSD2::GFP* pohybovalo v rozmezí 0,7-0,8, kultura měla vhodnou hustotu. Pokud bylo OD<sub>600</sub> vyšší než 0,9, kultura byla zředěna infiltračním médiem. Vhodné OD<sub>600</sub> pro kulturu *p19* bylo 1. Následně proběhla inkubace bakteriálních kultur 2 h ve tmě při

pokožkové teplotě. Dvě hodiny před transformací byly z fytotronu přeneseny do laboratoře rostliny *Nicotiana benthamiana*, aby byly aklimatizovány na laboratorní podmínky a byly zalaty vodou, aby došlo k otevření průduchů v listech.

Byly smísены bakteriální kultury *35S::MtCSD2::GFP* a *p19* v poměru 1:1. Bakteriální kultury byly pomocí 2ml injekční stříkačky vpraveny do listů *Nicotiana benthamiana*. Rostliny byly do druhého dne ponechány v laboratoři přikryté tmavými sáčky, aby bylo eliminováno působení světla na bakteriální kulturu v listech. Druhého dne byly rostliny přeneseny do fytotronu (22 °C, denní režim: 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70% vlhkost, intenzita osvětlení: 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

### 3.6.27 Mikroskopická analýza listů po transienční transformaci

Tři dny od provedení transienční transformace byla provedena mikroskopická analýza. Vzorek byl připraven následujícím způsobem: Na podložní sklíčko byly proti sobě horizontálně nalepeny dva tenké proužky oboustranné lepicí pásky. Na podložní sklíčko bylo Pasteurovou pipetou nanášeno přiměřené množství vody. Byl uštěřen segment listu v okolí vpichu, kam pronikla kultura během infiltrace. List byl položen do kapky vody na podložní sklíčko abaxiální stranou vzhůru. List byl přikryt krycím sklíčkem. Volné okraje krycího sklíčka byly obaleny parafilmem, aby bylo zabráněno odpařování vody z prostoru mezi skly.

Pro mikroskopickou analýzu byl použit konfokální laserový mikroskop LSM 710, Axio Imager 2. Zvětšení okuláru tohoto mikroskopu je 10x. Během pozorování byl nejprve použit objektiv s 10x zvětšením (EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27), poté byl použit objektiv s 20x zvětšením (Plan-Apochromat 20x/0.8 M27). Pro excitaci zeleného fluorescenčního proteinu byl využit laser o vlnové délce 488 nm a 2% intenzitě. Chlorofyl byl excitován laserem o vlnové délce 633 nm a 2% intenzitě. Emisní spektrum zeleného fluorescenčního proteinu bylo detekováno v rozmezí 493-598 nm, emisní spektrum chlorofylu bylo detekováno v rozhraní 638-721 nm. Fotografie byly zpracovány v programu ZEN Blue.



## 4 Výsledky

### 4.1.1 Stanovení aktivit superoxiddismutas u *M. truncatula* v závislosti na různé dostupnosti mědi

Pro stanovení aktivit SOD u *M. truncatula* a *M. sativa* byly použity rostliny kultivované na MS médiu, které bylo připravováno ze zásobních roztoků, aby byla modifikována koncentrace mědi v médiu. Pro kultivaci bylo použito MS médium s třemi koncentracemi mědi ( $0,01\mu\text{M}$ ;  $0,1\mu\text{M}$ ;  $2\mu\text{M}$ ). U rostlin nebyla pozorována významná změna fenotypu v souvislosti s modifikací dostupnosti mědi v médiích (Obrázek 11; Obrázek 12). Rostliny kultivované v podmínka s deficiencí mědi neměly v tomto stádiu růstu výrazně menší vzrůst oproti rostlinám v podmínkách s dostatkem mědi. Roslinný materiál *M. sativa* a *M. truncatula* byl sesbíráán a homogenizován ve stáří 28 dní, *A. thaliana* ve stáří 19 dní. V návaznosti na to byla provedena extrakce a kvantifikace proteinů pro účely následujících biochemický analýz.



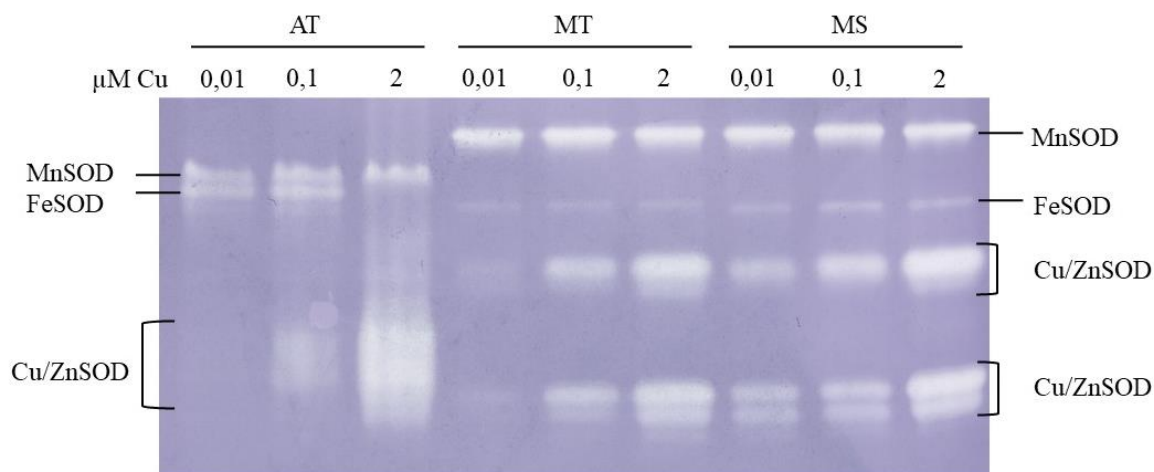
Obrázek 11: Dvanáctidenní semenáčky *Medicago sativa* kultivované na MS médiu připravovaném ze zásobních roztoků s modifikovaným obsahem mědi. A – MS médium s  $0,01\mu\text{M}$  koncentrací mědi; B - MS médium s  $0,1\mu\text{M}$  koncentrací mědi; C – MS médium s  $2\mu\text{M}$  koncentrací mědi. Velikost měřítka je 1 cm.



Obrázek 12: Dvanáctidenní semenáčky *Medicago truncatula* kultivované na MS médiu připravovaném ze zásobních roztoků s modifikovaným obsahem mědi. A – MS médium s  $0,01\mu\text{M}$  koncentrací mědi; B - MS médium s  $0,1\mu\text{M}$  koncentrací mědi; C – MS médium s  $2\mu\text{M}$  koncentrací mědi. Velikost měřítka je 1 cm.

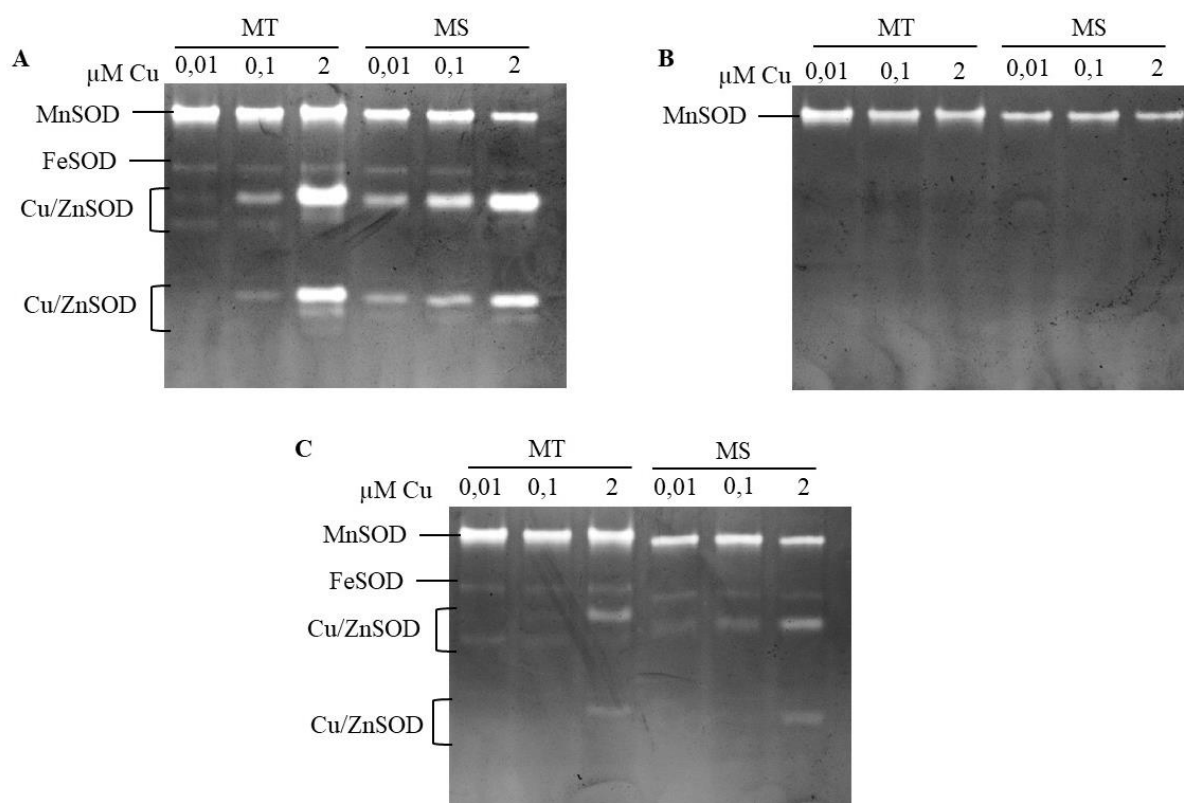
Dále byla provedena elektroforetická separace v polyakrilamidovém gelu za nativních podmínek pro porovnání aktivit SOD u *A. thaliana*, *M. truncatula*, *M. sativa* v závislosti na podmínky různé dostupnosti mědi během kultivace rostlin (Obrázek 13). U rostliny *A. thaliana*, která byla k experimentu přidána jako kontrolní modelový organismus, nedošlo k úplné separaci Cu/ZnSOD pásů, což je již známý a popsáný jev. Aktivita MnSOD při různých koncentracích mědi zůstává u všech třech rostlin neměnná. Exprese *MnSOD* není regulována transkripčním faktorem SPL7, proto pásy odpovídající MnSOD mohou figurovat jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků proteinového extraktu. U *A. thaliana* je s rostoucí koncentrací mědi možno sledovat trend poklesu intenzit pásů odpovídajících aktivitě FSD1. Současně se zvyšující se koncentrací mědi dochází k nárůstu aktivit CSD isoform (Obrázek 13). Regulace exprese *FSD1* je u *A. thaliana* zprostředkována transkripčním faktorem SPL7 (Yamasaki et al., 2009). U *M. truncatula* a *M. sativa* na měnící se dostupnosti mědi reagovaly pouze aktivity Cu/ZnSOD isoform (Obrázek 13). S nárůstem koncentrace mědi je možno sledovat u *M. truncatula* a *M. sativa* zvyšující se gradient aktivit Cu/ZnSOD isoform. Naopak nedochází k poklesu aktivit FeSOD s nárůstem dostupnosti mědi, s měnící se koncentrací mědi zůstává intenzita pásů

odpovídající aktivitě FeSOD konstantní. U *M. truncatula* a *M. sativa* byla regulace exprese CSD isoformem řízená SPL7 zachována, regulace exprese *FSD1* řízená SPL7 zachována nebyla (Obrázek 13).



Obrázek 13: Porovnání aktivit isoformů superoxiddismutas u rostlin *A. thaliana*, *M. truncatula*, *M. sativa* v závislosti na různé dostupnosti mědi (0,01 μM; 0,1 μM; 2 μM) v MS médiu během kultivace.

Pro potvrzení totožnosti jednotlivých pásů u *M. truncatula* a *M. sativa* byly po elektroforetické separaci provedeny inhibiční analýzy (Obrázek 14). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> má schopnost inhibovat veškeré FeSOD a Cu/ZnSOD isoformy (Beyer & Fridovich, 1987; Bray et al., 1974), přičemž aktivní zůstávají pouze MnSOD isoformy (Obrázek 14B). KCN inhibuje Cu/ZnSOD isoformy (Asada et al., 1974) (Obrázek 14C). Při inhibici KCN je patrné, že nedošlo k úplné inhibici aktivit Cu/ZnSOD, nicméně došlo k poklesu intenzit pásů, které odpovídají aktivitě Cu/ZnSOD isoformů. Popis pásů SOD isoformů u *M. truncatula* je v souladu s identifikací pásů v publikované práci (Esteban et al., 2016). Získané výsledky zadefinovaly přítomnost jednotlivých SOD izoenzymů u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula* a potvrdily nepřítomnost nebo narušení regulace FeSOD v závislosti na měnící se koncentraci mědi skrze SPL7.

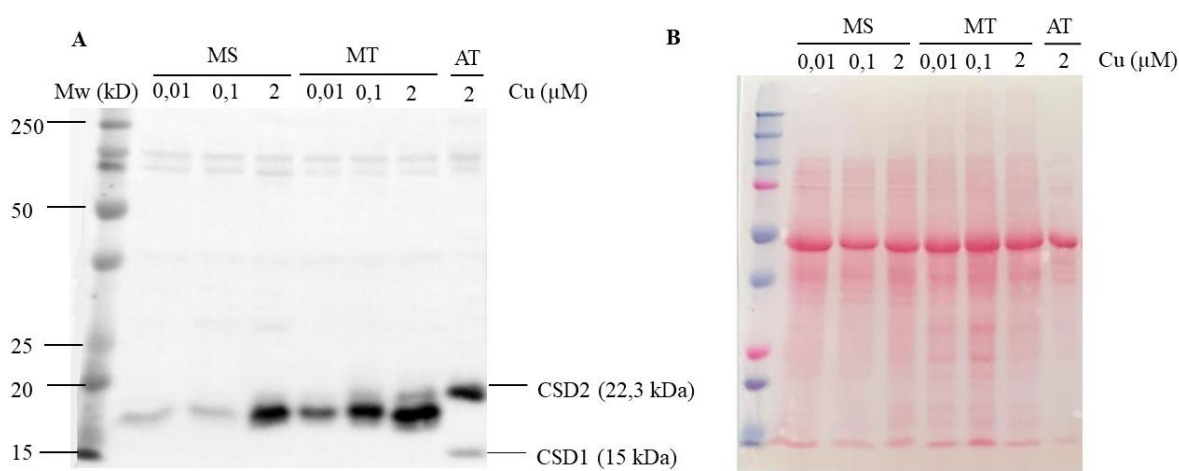


Obrázek 14: Inhibiční analýzy aktivit superoxiddismutas u *M. truncatula* a *M. sativa*. A – Analýza aktivit SOD bez použití inhibitorů; B – Inhibice aktivit FeSOD a Cu/ZnSOD pomocí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; C – Inhibice aktivit Cu/ZnSOD isoformem pomocí KCN.

#### 4.1.2 Imunolokalizace SOD izoenzymů u *M. truncatula*

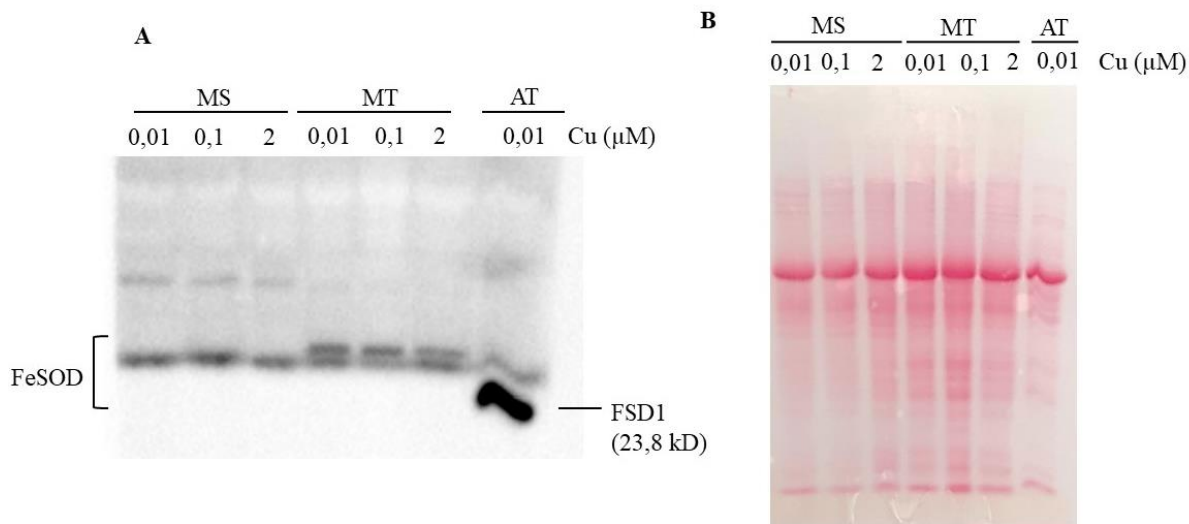
Pro detekci abundance Cu/ZnSOD byla použita primární protilátka anti-CSD2, která rozpoznává CSD2 a CSD1 u *A. thaliana* (Obrázek 15). Jako kontrola specificity protilátek byl použit proteinový extrakt z *A. thaliana* kultivované na médiu se zvýšenou dostupností mědi. U extraktů z *M. truncatula* a *M. sativa* byla zaznamenána zvyšující se abundance proteinů Cu/ZnSOD se zvyšující se koncentrací mědi. Díky znalosti velikosti jednotlivých pásů použitého markeru Precision Plus Protein Dual Color Standards byly popsány pásy Cu/ZnSOD isoformem *A. thaliana* jako proteiny CSD1 (15 kDa), CSD2 (22 kDa). U *M. truncatula* byly bioinformaticky predikovány 4 Cu/ZnSOD isoformy o molekulových hmotnostech: MtCSD1 – 21,24 kDa; MtCSD2 – 33,63 kDa; MtCSD3 – 16,42 kDa; MtCSD4 – 15,23 kDa (Song et al., 2018), nicméně však nelze na základě této analýzy přesně definovat identitu jednotlivých proteinů u *M. sativa* a *M. truncatula*. Z výsledků je zde patrný trend zvyšující se abundance neznáme CSD isoformy jak u *M. sativa* tak u *M. truncatula*, což naznačuje zachovné regulace v závislosti na dostupnosti mědi na úrovni abundance CSD. MtCSD1 je možným homologem CSD2 *A. thaliana*, vzhledem k tomu, že tyto proteiny mají podobnou velikost a vykazují podobnost

proteinových sekvencí (Hanáková, 2022). Je tedy možné, že nejsilnější pásy MtCSD1, nicméně jedná se pouze o spekulace, které by musely být dále experimentálně povrzeny.



Obrázek 15: Imunolokalizace Cu/ZnSOD isoforem u *M. sativa* a *M. truncatula* v závislosti na měnící se dostupnosti mědi v kultivačním MS médiu. A – Imunoblot Cu/ZnSOD isoforem. Pro detekci proteinů byla použita primární protilátka AS06 170- anti-CSD2 Chloroplatic Cu/ZnSOD. Pro určení molekulových hmotností odpovídající jednotlivým pásům byl použit marker Precision Plus Protein Dual Color Standards. B – Kontrola nanášky proteinů pomocí vizualizace proteinů barvivem Ponceau S.

Pro detekci FeSOD byla použita anti-FeSOD primární protilátka (Obrázek 16), která rozpoznává FSD1 izoenzym u *A. thaliana*. Jako kontrola byl použit proteinový extrakt z *A. thaliana* kultivované v podmínkách s nízkou abundancí mědi. Při použití markeru v kombinaci s touto protilátkou může docházet k nežádoucím nespecifickým interakcím, proto marker nebyl použit při této analýze. Avšak na základě předešlých experimentů (Dvořák et al., 2021) byl identifikován pás odpovídající proteinu FSD1 *A. thaliana*, jehož velikost je 23,8 kDa. Na základě této analýzy nelze přesně popsat jednotlivé detekované pásy odpovídající FeSOD. Z výsledku experimentu je však patrné, že v obou případech u *M. sativa* i u *M. truncatula* je při měnící se koncentraci mědi intenzita jednotlivých pásů odpovídající abundanci FeSOD neměnná. Regulace exprese *FeSOD* není u *M. sativa* i u *M. truncatula* závislá na dostupnosti mědi, což bylo dokázáno i na úrovni abundndace FeSOD.



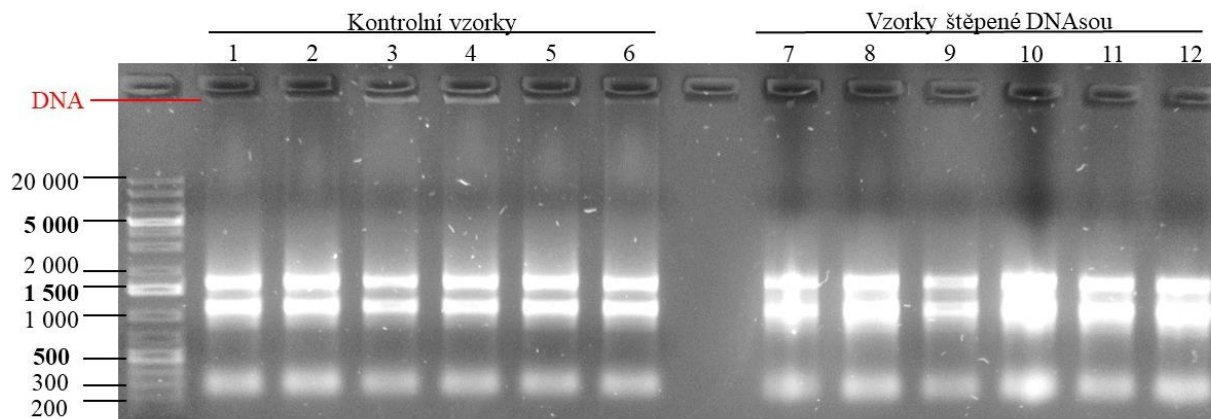
Obrázek 16: Imunolokalizace FeSOD isoformů u *M. sativa* a *M. truncatula* v závislosti na měnící se dostupnosti mědi v kultivačním MS médiu. A – Imunoblot FeSOD isoformů. Pro detekci proteinů byla použita primární protilátka AS06 125 – anti FeSOD Chloroplatic Fe-dependent superoxide dismutase. B – Kontrola nanášky proteinů pomocí vizualizace proteinů barvivem Ponceau S.

### 4.1.3 Příprava konstruktů *35S::MtCSD2::GFP*

#### 4.1.3.1 Izolace cDNA z *M. truncatula*

Pro přípravu konstruktů *35S::MtCSD2::GFP* bylo třeba izolovat cDNA z *M. truncatula*. Byla izolována cDNA z rostlin kultivovaných na MS médiu při koncentracích mědi 0,01 μM; 0,1 μM; 2 μM.

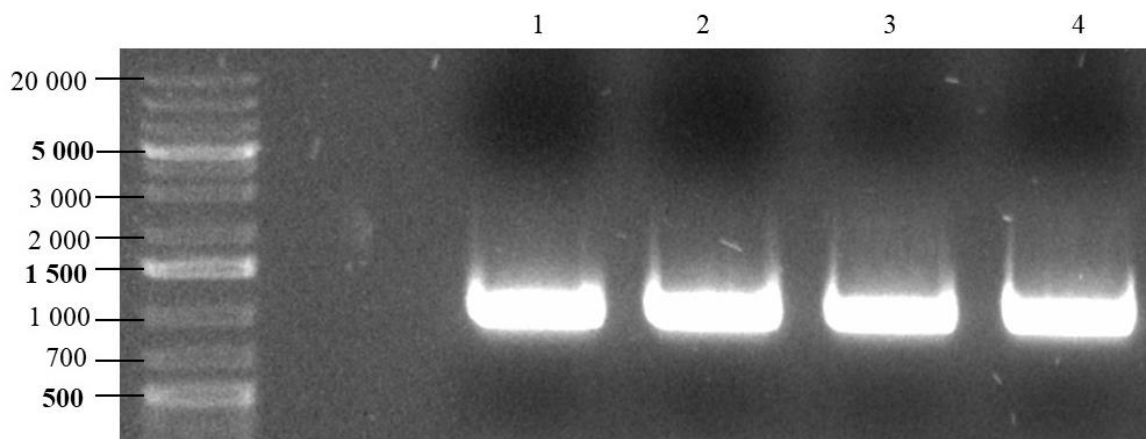
Prvním krokem byla izolace celkové RNA z rostliny. Izolovaná RNA byla následně pomocí enzymu DNAsa I zbavena kontaminující gDNA (genomické DNA). Pro potvrzení čistoty a kvality štěpených vzorků byla provedena horizontální elektroforetická separace na 1% agarosovém gelu (Obrázek 17). Jako kontrola byly použity neštěpené vzorky. U kontrolních vzorků je možno vidět pásy odpovídající gDNA v oblasti pod jamkami. U gDNA vzhledem k její velikosti téměř nebyla pozorována migrace. Přítomnost intenzivních pásů v oblasti 2000-1000 bp, které odpovídají rRNA, značí dobrou kvalitu izolované RNA (Obrázek 17). Po izolaci a přečištění RNA byla provedena reverzní transkripce pomocí enzymu M-MLV reverzní transkriptasy, čímž byla získána odpovídající cDNA.



Obrázek 17: Kontrola purifikace RNA pomocí enzymu DNAsaI. RNA byla separována v 1% agarosovém gelu. Jako marker byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Vzorky č. 1,2,7,8 – izoláty RNA z rostlin kultivovaných při 0,01 $\mu$ M koncentraci mědi. Vzorky č. 3, 4, 9, 10 - izoláty RNA z rostlin kultivovaných při 0,1 $\mu$ M koncentraci mědi. Vzorky č. 5, 6, 11, 12 - izoláty RNA z rostlin kultivovaných při 2 $\mu$ M koncentraci mědi.

Dalším cílem bylo připravit konstrukt nesoucí gen *MtCSD2*, přičemž při zvýšené koncentraci mědi přirozeně dochází u *M. truncatula* ke zvýšené expresi tohoto genu. Proto byla provedena amplifikace cílového genu pomocí PCR s navrženými primery pro *MtCSD2* a izolátem cDNA z *M. truncatula* kultivované v podmínkách se zvýšenou koncentrací mědi (2 $\mu$ M koncentrace mědi). Primery pro tuto reakci byly navrženy tak, aby byl PCR produkt ohraničen attB1 a attB2 rekombinačními místy, jejichž přítomnost je nutná při syntéze konstruktů MultiSite Gateway® technologií.

Po amplifikaci genu zájmu byla provedena horizontální elektroforetická separace v 1% agarosovém gelu (Obrázek 18). Separace PCR produktu proběhla ve čtyřech jamkách. V gelu byl detekován pás cDNA *MtCSD2* v přibližné poloze okolo 1000 bp, přičemž velikost cílového genu s att přesahy je 987 bp. Z přítomnosti jednoho pásu a jeho velikosti lze usoudit, že byl reakcí amplifikován gen zájmu. Po ukončení separace byl z gelu PCR produkt vyříznut a purifikován pomocí komerčně dostupné soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean-up.



Obrázek 18: Produkt amplifikace genu *MtCSD2* pomocí PCR s primery navrženými pro inkorporaci attB1 a attB2 rekombinačních míst. Jako templát byla použita izolovaná cDNA. Velikost cílového genu s att přesahy je 987 bp.

#### 4.1.3.2 Rekombinační reakce: MultiSite Gateway® Technology

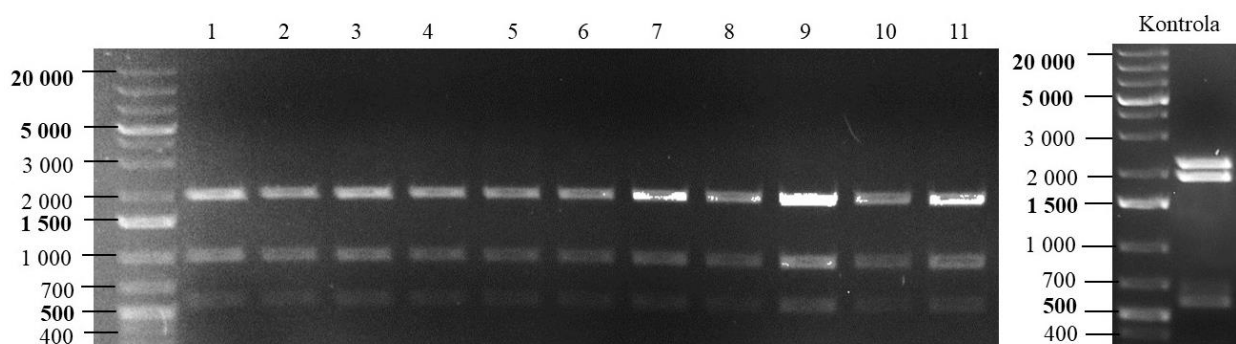
Za účelem potvrzení predikované lokalizace *MtCSD2* v chloroplastu rostliny *M. truncatula* byl připraven konstrukt *35S::MtCSD2::GFP*. Konstrukt byl připraven pomocí technologie MultiSite Gateway®, jejíž princip je založen na rekombinačních reakcích. Třífragmentový expresní vektor byl vytvořen pomocí dvou rekombinačních reakcí.

Nejprve byla s amplifikovanou DNA *MtCSD2* provedena BP rekombinační reakce, během níž byl PCR produkt ohraničený attB1 a attB2 rekombinačními místy rekombinován do donorového vektoru *pDONR<sup>TM</sup>221* nesoucího attP1 a attP2 rekombinační místa. Následně byla rekční směs transformována do bakteriální kultury *E. coli* (One Shot TOP10). Transformovaná kultura byla selektována na pevném LB médiu obsahujícím antibiotikum kanamycin. Po ukončení kultivace bylo detekováno 11 potenciálně transformovaných kolonií. Pro účely validace skrze restrikční štěpení bylo vypíchnuto a kultivováno 11 kolonií.

Z kultur byla izolována plasmidová DNA, která byla purifikována pomocí komerčně dostupné soupravy GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit. Restrikční analýza byla provedena pomocí enzymu *pvuII* (Obrázek 19). Endonukleasa *pvuII* štěpí prázdný donorový vektor ve třech specifických místech za vzniku tří fragmentů o velikostech: 2217 bp, 1942 bp, 602 bp; pozitivní klon obsahující gen zájmu je endonukleasou štěpen rovněž ve třech místech za vzniku fragmentů o velikostech: 1942 bp, 965 bp, 576 bp. Po restrikčním



štěpení byla provedena elektroforetická separace. Všech 11 kolonií bylo pozitivních. Jako kontrola byl štěpen prázdný donorový vektor.

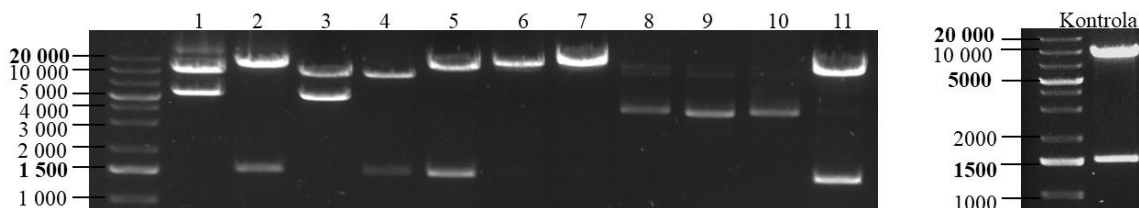


Obrázek 19: Restrikční štěpení produktu BP rekombinační reakce endonukleasou *pvuII*. DNA izolovaná z pozitivních kolonií byla enzymem štěpena na tři fragmenty o velikostech 1942 bp, 965 bp, 576 bp. Jako kontrola byl restrikčně štěpen prázdný donorový vektor *pDONR<sup>TM</sup>221* za vzniku tří fragmentů o velikostech 2217 bp, 1942 bp, 602 bp.

Dalším krokem byla příprava finálního vektoru pomocí tříkomponentové rekombinační reakci mezi destinačním vektorem *pB7m34GW* a třemi vektory: *pDONR221 P1-P4* nesoucím promotor *35S C-MV*, BP reakcí připraveným *pDONR221::MtCSD2* a vektorem *pDONR221 P3-P2* nesoucím *eGFP* se stopkodonom. Po rekombinaci byla provedena transformace reakční směsi do kultury *E. coli* (One Shot TOP10).

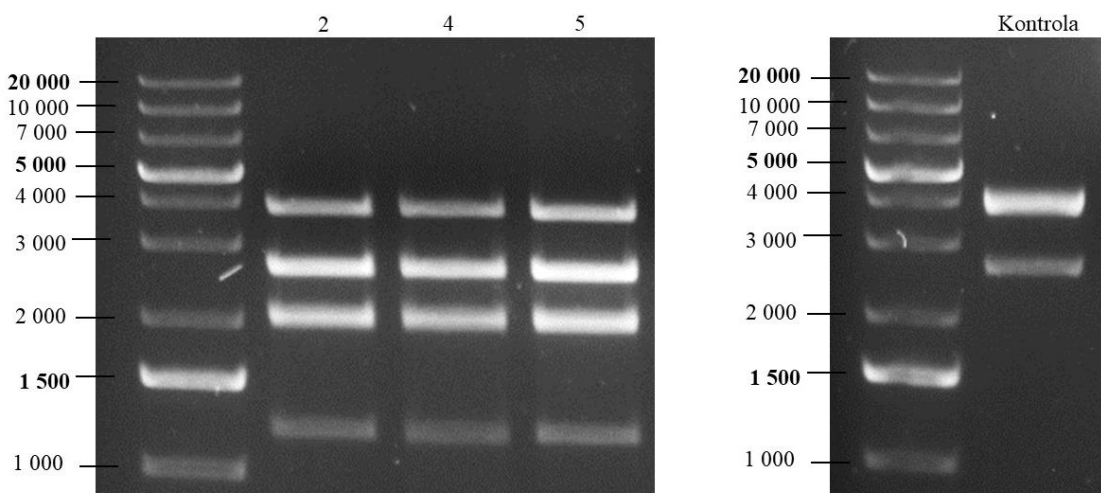
Opět byla provedena selekce na pevném LB médiu, tentokrát obsahujícím antibiotikum spektinomycin. Bylo detekováno 11 kolonií, které byly dále kultivovány v tekutém LB médiu. Z kultur byla izolována a purifikována plasmidová DNA.

Pro restrikční štěpení byl nejprve zvolen taktéž enzym *pvuII* (Obrázek 20), jako kontrola byl použit nerekombinovaný destinační vektor. Tato endonukleasa štěpí destinační vektor i expresní vektor na dva fragmenty mající velice podobné velikost (velikost fragmentů destinačního vektoru: 8464 bp, 1481 bp; velikost fragmentů expresního vektoru: 8745 bp, 2370 bp). Byla zavržena možnost přítomnosti buněk transformovaných nerekombinovaným destinačním vektorem, vzhledem k tomu, že nerekombinovaný destinační vektor obsahuje gen *ccdB* pro negativní selekci. Jako pozitivní byly selektovány 3 vzorky označené čísly 2, 5, 11.



Obrázek 20: Restriční štěpení produktu LR rekombinační reakce endonukleasou *pvuII*. DNA izolovaná z pozitivních kolonií by měla být enzymem štěpena ve dvou pozicích za vzniku fragmentů o velikostech 8745 bp, 2370 bp. Jako kontrola byl enzymem *pvuII* štěpen prázdný destinační vektor *pB7m34GW* za vzniku dvou fragmentů o velikostech 8464 bp, 1481 bp. Jako pozitivní byly vyhodnoceny 4 vzorky – 2,4,5,11.

Pro verifikaci rekombinace bylo provedeno druhé restriční štěpení (Obrázek 21). Byla zvolena endonukleasa *NdeI* štěpící destinační vektor na 3 fragmenty o velikostech: 3807 bp, 3649 bp, 2489 bp; expresní vektor na 5 fragmentů o velikostech: 3649 bp, 2489 bp, 1982 bp, 1866 bp 1126 bp. Byly štěpeny pouze 3 dříve selektované pozitivní vzorky a jako kontrola byl štěpen prázdný destinační vektor. Vzhledem k tomu, že velikost fragmentů 1982 bp a 1866 bp je velmi podobná, nebylo možno během elektroforetické separace v 1% agarosovém gelu rozlišit pásy odpovídající těmto dvěma fragmentům, tyto pásy splynuly a jeví se jako jeden pás. Pomocí druhého restričního štěpení byla potvrzena správnost přípravy konstruktů *35S::MtCSD2::GFP*. Pro úplné ověření byl výsledný konstrukt odeslán k sekvencování v komerční firmě. Výsledky potvrdily přítomnost připravovaného konstruktů.

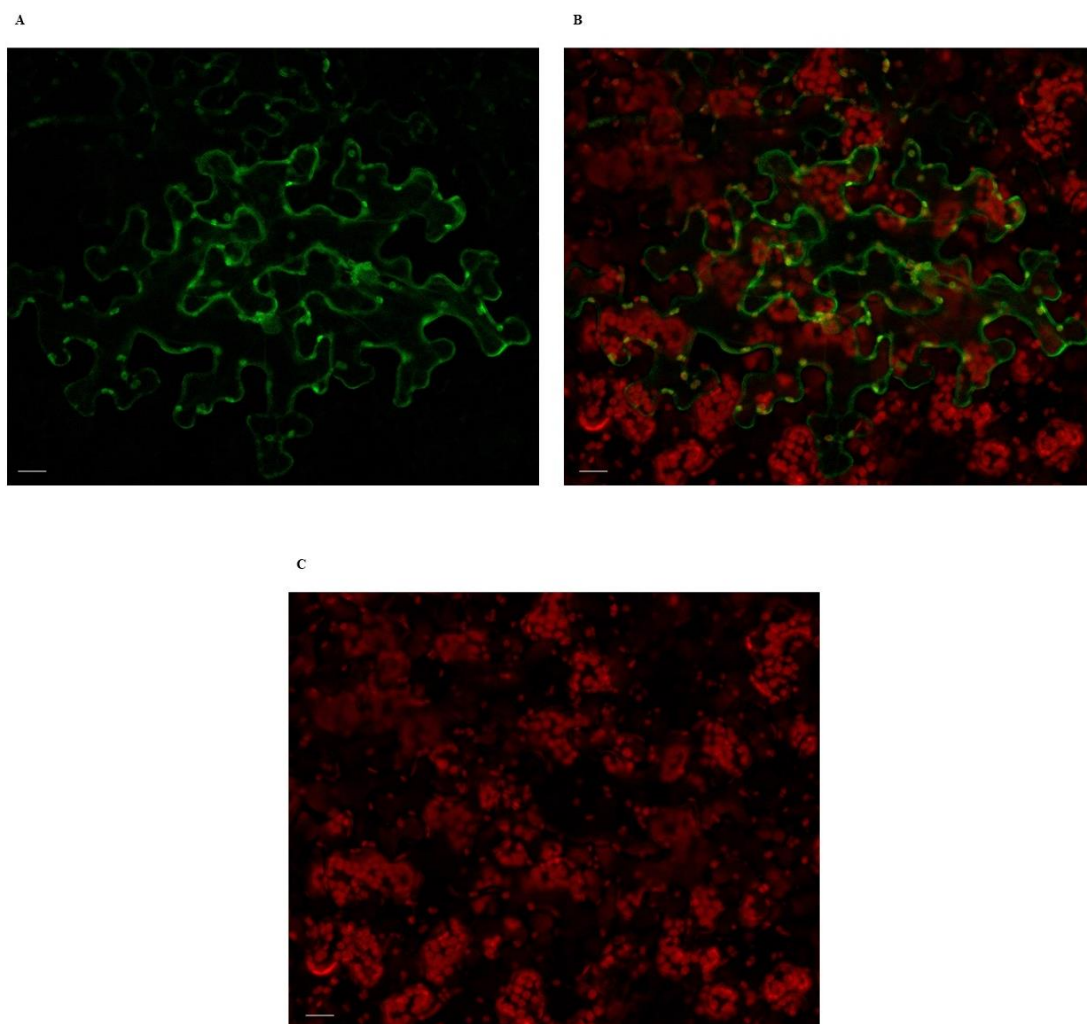


Obrázek 21: Restriční štěpení produktu LR rekombinační reakce endonukleasou *NdeI*. DNA izolovaná z pozitivních kolonií by měla být enzymem štěpena v pěti pozicích za vzniku fragmentů o velikostech 3649 bp, 2489 bp, 1982 bp, 1866 bp 1126 bp. Jako kontrola byl enzymem *NdeI* štěpen prázdný destinační vektor *pB7m34GW* za vzniku tří fragmentů o velikostech 3807 bp, 3649 bp, 2489 bp. Bylo potvrzeno, že 3 vzorky – 2,4,5 jsou pozitivní.

Připravený konstrukt *35S::MtCSD2:GFP* byl transformován do bakteriální kultury *A. tumefaciens* (kmen GV3101).

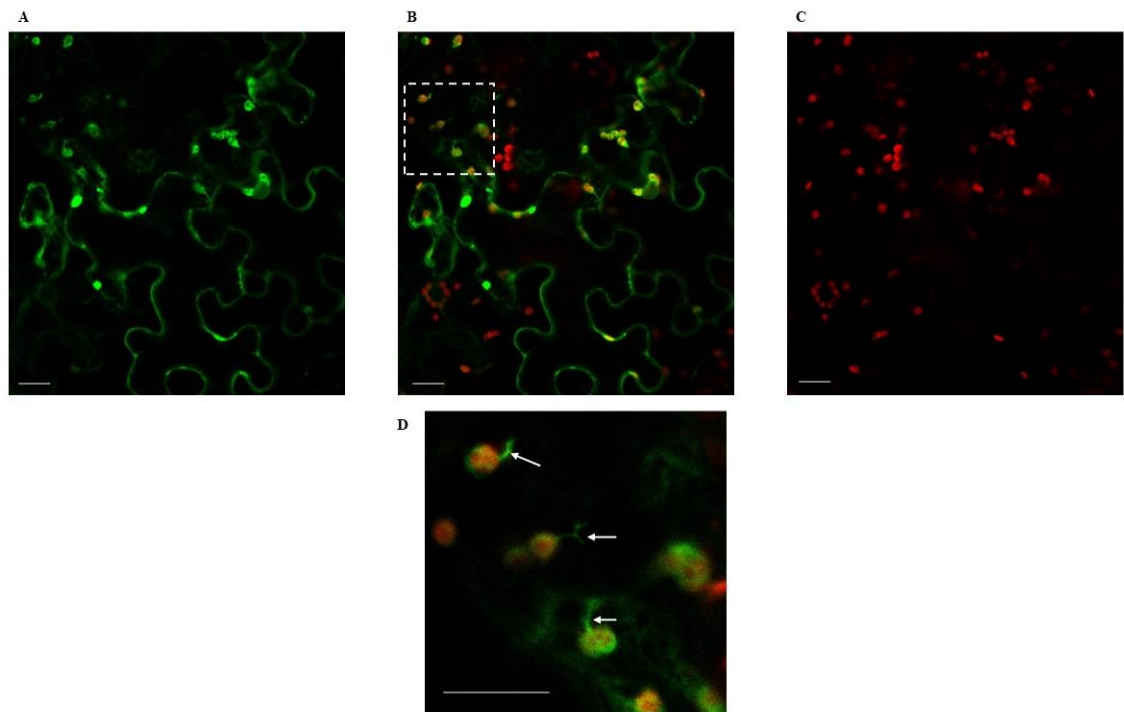
#### 4.1.3.3 Mikroskopická analýza konstruktů *35S::MtCSD2:GFP*

Pro validaci funkčnosti konstruktů byla provedena transientní transformace listů *N. benthamiana* pomocí získané bakteriální kultury *A. tumefaciens* (kmen GV3101) nesoucí *35S::MtCSD2:GFP* konstrukt. Připravená bakteriální kultura byla pomocí injektáže infiltrována do listů *N. benthamiana* a přítomnost fluorescence MtCSD2-GFP proteinu byla detekována pomocí konfokální mikroskopu (Obrázek 22). Nejvyšší akumulace transgenního proteinu během mikroskopické analýzy byla zaznamenána třetí den od provedení injektáže.



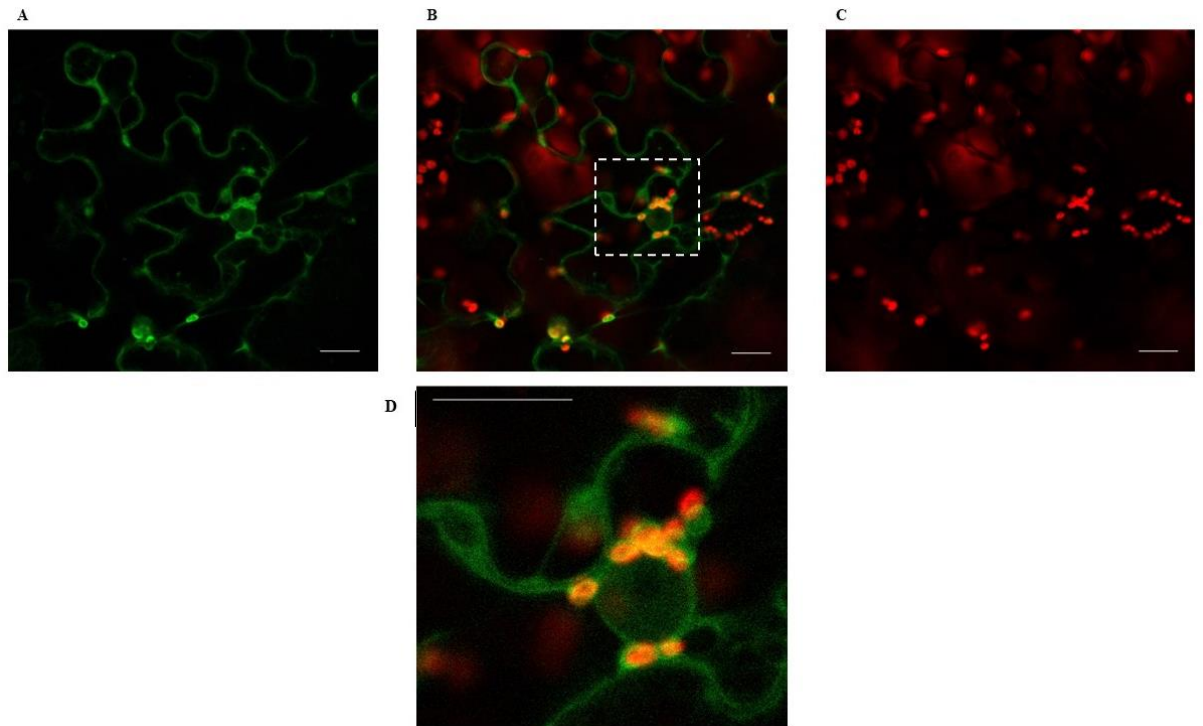
Obrázek 22: Mikroskopická analýza konstruktů *35S::Mt:CSD2:GFP* transformovaného transientní transformací do listu *Nicotiana benthamiana*. A – zelený fluorescenční signál konstruktů; B – snímek zachycující kolokalizaci signálů zeleného fluorescenčního proteinu a autofluorescence chlorofylu; C – signál autofluorescence chlorofylu v chloroplastech. Zvětšení použitého objektivu – 10x. Velikost měřítka 20  $\mu\text{m}$ .

Fluorescenční signál byl detekován v cytoplazmě, v okolí plazmatické membrány a v chloroplastech. Silný signál byl přítomný v okolí jaderné membrány. Slabší signál byl detekován v jádře, nebyla pozorována přítomnost signálu v jadérku. Bylo možné pozorovat překryv zeleného fluorescenčního signálu s červeným fluorescenčním signálem chlorofylu, který je součástí fotosyntetického aparátu chloroplastů (Obrázek 23), což povrzuje chloroplastovou lokalizaci proteinu. Z výřezu je patrné, že transgenní protein je akumulován ve stromulech chloroplastu (Obrázek 23D). Jedná se o dynamickou strukturu chloroplastu, tubuly jejichž obsah je vyplněn stromou. Z tohoto je možno usoudit, že transgen je exprimován konkrétně ve stromatu chloroplastů, nikoliv v thylakoidní membráně.



Obrázek 23: Mikroskopická analýza konstruktů *35S::Mt:CSD2::GFP* se zaměřením na detail ve stromě chloroplastu. A – zelený fluorescenční signál konstruktů; B – snímek zachycující kolokalizaci signálů zeleného fluorescenčního proteinu a signálu autofluorescence chlorofylu v chloroplastech; C – signál autofluorescence chlorofylu; D – detail kolokalizace signálů konstruktů a signálu chlorofylu, na detailu jsou stromuli označeny šipkou. Zvětšení použitého objektivu – 20x. Velikost měřítka 20  $\mu\text{m}$ .

Na fotografii je patrný zelený fluorescenční signál v buněčném jádře, silná akumulace signálu byla v okolí jaderné membrány (Obrázek 24). Okolo buněčného jádra je možno pozorovat kolokalizaci zeleného a červeného fluorescenčního signálu v chloroplastech (Obrázek 24D).



Obrázek 24: Mikroskopická analýza konstruktů *35S::Mt:CSD2::GFP* se zaměřením na lokalizaci v jádře a ve stromě chloroplastu. A – zelený fluorescenční signál konstruktů; B – snímek zachycující kolokalizaci signálů zeleného fluorescenčního proteinu a signálu autofluorescence chlorofylu v chloroplastech; C – signál autofluorescence chlorofylu; D – detail zachycující lokalizaci signálu konstruktů v jádře, jádro je obklopeno chloroplasty, v nichž je pozorována kolokalizace signálů. Zvětšení použitého objektivu – 20x. Velikost měřítka 20  $\mu\text{m}$ .

Výsledky mikroskopické analýzy potvrdily predikovanou lokalizaci MtCSD2 v chloroplastu. Překvapivě byl tento protein lokalizován i okolí jaderné membrány a v samotném jádře.

## 5 Diskuse

S nárůstem lidské populace se zvyšují nároky na množství vyprodukované potravy a zároveň se zvyšují nároky na životní prostor na úkor zemědělské půdy. Klimatické změny negativně ovlivňují kvalitu úrody hospodářských plodin. Abychom však mohli zvýšit odolnost rostlin vůči stresu a produkci hospodářských plodin, je třeba nejprve popsat genetickou výbavu rostlin a porozumět fungování rostlin na buněčné úrovni. Moderní biotechnologické postupy a genové inženýrství by mohly být v budoucnu použity k vylepšení vlastností stávajících polnohospodářsky využívaných odrůd nebo pro tvorbu odrůd zcela nových. Z těchto důvodů je studium mechanismů funkce rostlinných buněk a genů důležité pro budoucnost lidstva (Varshney et al., 2011). Systém antioxidační obrany rostlin je jedním z nepostradatelných mechanismů, které rostlinám umožňují vyrovnávat se s buněčným stresem, doposud však existují aspekty fungování tohoto systému, které nebyly objasněny (Dreyer & Schippers, 2019). Jedním z ne zcela objasněných témat je enzymatická antioxidační obrana rostlin *M. truncatula* a *M. sativa* a to především samotné SOD.

SOD jsou skupinou antioxidačních enzymů, jejichž hlavní funkcí je katalýza dismutace - chemické reakce během níž je vysoce reaktivní  $O_2^-$  přeměněn na méně reaktivní a méně cytotoxickou molekulu  $H_2O_2$  (Pilon et al., 2011).  $O_2^-$  je jednou z nejčastěji produkovaných ROS (Landis & Tower, 2005). U rostlin je  $O_2^-$  produkován zejména během světelné fáze fotosyntézy fotosystémem I (Asada et al., 1974).  $O_2^-$  a ostatní molekuly ROS jsou zapojeny do buněčné signalizace, zároveň při zvýšené akumulaci poškozují celulární struktury, což vede k buněčnému stárnutí. Enzymatická rodina SOD byla evolučně konzervována je přítomna, jak u primitivních organismů jako jsou bakterie, tak je i přítomna u vyšších organismů jakými jsou živočichové a rostliny. Je rozšířen názor, že SOD jsou přítomny ve všech buňkách, které mají schopnost aerobně metabolizovat. SOD jsou centrálními regulátory rezistence vůči oxidativnímu stresu, který je u rostlin vyvolán působením abiotických stresorů (Bannister et al., 1991; Dreyer & Schippers, 2019).

Měď je esenciálním mikronutrientem pro vývoj a růst rostlin, z důvodu toho že je vázána ve formě kofaktoru ve struktuře řady metaloproteinů, nicméně ve zvýšeném množství je měď pro rostlinné buňky taktéž toxická. Při nadměrné akumulaci mědi dochází k narušení elektronového transportu v průběhu fotosyntézy (Yruela, 2005). Udržování homeostáze mědi v rostlinných buňkách je u *A. thaliana* zprostředkováno mimo jiné i prostřednictvím

transkripčního faktoru SPL7. V minulosti byla prokázána regulace exprese *SOD* u *A. thaliana* v závislosti na dostupnosti mědi, transkripčním faktorem SPL7, který je exprimován v podmínkách nedostatku mědi. SPL7 se u *A. thaliana* váže do promotorové oblasti *miR398* a isoformy *FSD1*, čímž je spuštěna exprese těchto genů. Tato miR398 degraduje mRNA plastidových i cytosolických CSD, díky čemuž dochází postranskripčně k snížení míry exprese těchto isoform. Při podmínkách nedostatku mědi dochází ke zvýšení exprese *FSD1* a naopak k potlačení exprese *CSD* izoform u *A. thaliana* (Yamasaki et al., 2009).

Předmětem biochemické části mé bakalářské práce bylo popsat vztah mezi dostupností mědi a aktivitou a abundancí isoform *SOD* u *M. truncatula* a popsat jednotlivé isoformy na základě inhibičních analýz. Pro tuto část práce byla klíčovým krokem optimalizace přípravy MS média ze zásobních roztoků, které měly stejné složení makroelementů a mikroelementů jako komerčně dostupné MS soli. MS médium bylo připravováno ručně ze zásobních roztoků zejména z toho důvodu, aby mohla být regulována úroveň dostupnosti mědi v kultivačních médiích. Pomocí inhibičních analýz za využití dvou inhibitorů –  $H_2O_2$  a KCN byly identifikovány během analýzy aktivit *SOD* metodou NATIVE PAGE pásy odpovídající jednotlivým *SOD* isoformám u *M. truncatula* a *M. sativa*. Identifikace isoform *M. truncatula* touto metodou byla v souladu s identifikací, která byla provedena v práci (Esteban et al., 2016).

V minulosti bylo zjištěno, že u *M. sativa* došlo k narušení regulace exprese *FSD1* prostřednictvím SPL7 v závislosti na dostupnosti mědi (Hanáková, 2022). V této předložené práci byla porovnána abundance a aktivita *SOD* u *A. thaliana*, *M. sativa*, *M. truncatula* v podmínkách různé dostupnosti mědi (0,01 $\mu$ M; 0,1 $\mu$ M; 2 $\mu$ M). Prostřednictvím biochemických metod bylo zjištěno, že u *M. truncatula*, stejně jako u *M. sativa*, zůstává aktivita a abundance FeSOD s měnící se koncentrací mědi konstantní. U *M. truncatula* rovněž došlo k narušení regulace exprese *FSD1* transkripčním faktorem SPL7. Bioinformatickou analýzou byly charakterizovány v genomu *M. truncatula* dva geny pro FeSOD (Song et al., 2018), je tedy pravděpodobné že ortologní gen odpovídající FSD1 z *A. thaliana* nebyl v genomech *M. sativa* a *M. truncatula* zachován, čímž byla narušena tato regulace. Z analýz bylo nicméně patrné, že regulace exprese Cu/ZnSOD prostřednictvím SPL7 narušena nebyla, neboť byl u těchto isoform pozorován gradient zvyšující se aktivity a abundance v souladu se zvyšující se koncentrací mědi.

Pro ověření predikce subcelulární lokalizace proteinu MtCSD2 byl připraven konstrukt *35S::MtCSD2::GFP*, jehož funkčnost byla ověřena pomocí transientní transformace do mezofýlních buněk listů *N. benthamiana*. Během mikroskopické analýzy byl GFP signál detekován v cytoplazmě, ve stromatu chloroplastu a taktéž v jádře a v okolí jaderné membrány. Lokalizace tohoto proteinu v jádře bylo zajímavým zjištěním. Ve všeobecnosti se o jaderné funkci SOD ví velmi málo. Nicméně u lidské a kvasinokové Cu/ZnSOD byla její role v regulaci genů v odpovědi na indukovaný stres (Tsang et al., 2014). Pro potvrzení přesné lokalizace a role MtCSD2 bude připravený konstrukt použit pro stabilní transformaci *M. truncatula*. Tato získaná linie by mohla následně sloužit jako základ pro pochopení role MtCSD2 u této rostliny.



## 6 Závěr

Za účelem pochopení regulace SOD u *M. truncatula* a *M. sativa* byly kultivovány rostliny *M. truncatula* a *M. sativa* na MS médiu manuálně připravovaném ze zásobních roztoků s modifikovaným obsahem mědi (0,01 μM; 0,1 μM; 2 μM koncentrace Cu<sup>2+</sup>). Za účelem biochemické analýzy byly získány proteinové extrakty z rostlin kultivovaných při podmínkách různé dostupnosti mědi a metodou NATIVE PAGE byla provedena analýza stanovení aktivit jednotlivých SOD. Bylo zjištěno, že u *M. truncatula* není aktivita FeSOD ovlivňována dostupností mědi, stejně jako u *M. sativa*. Naopak u *M. truncatula* a *M. sativa* byl pozorován trend nárůstu aktivit Cu/ZnSOD s rostoucí dostupností mědi. Pro identifikaci jednotlivých pásů SOD byla provedena analýza stanovení aktivit SOD s využitím inhibitorů KCN a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Díky této analýze byly popsány pásy odpovídající jednotlivým SOD isoformám u *M. truncatula*. Dále byla pomocí imunolokalizace metodou Western-blot detekována abundance FeSOD a Cu/ZnSOD u rostlin *M. truncatula* a *M. sativa*. Při detekci FeSOD u *M. truncatula* bylo zjištěno, že s měnící se dostupností mědi zůstává abundance těchto isoenzymů konstantní, stejně jako je tomu u *M. sativa*. Během detekce Cu/ZnSOD *M. truncatula* byl pozorován gradient rostoucí abundance Cu/ZnSOD s rostoucí koncentrací mědi. Z biochemických analýz vyplývá, že během evoluce u *M. truncatula* došlo pravděpodobně ke ztrátě genu homolognímu *FSD1* z *A. thaliana* a kvůli tomu tedy došlo k narušení regulace exprese *FeSOD* transkripčním faktorem SPL7. Narušení této regulace u *M. sativa* bylo již dříve popsáno v práci (Hanáková, 2022). Regulace exprese *Cu/ZnSOD* prostřednictvím SPL7 byla u rostlin *M. truncatula* a *M. sativa* zachována.

V části práce zaměřené na genové inženýrství byl pomocí technologie MultiSite Gateway® připraven konstrukt *35S::MtCSD2::GFP*. Tento konstrukt byl připraven za účel potvrzení predikované lokalizace proteinu MtCSD2 v chloroplastech buněk. Pro přípravu tohoto konstruktu bylo však třeba nejprve izolovat cDNA rostliny *M. truncatula*. Správnost rekombinačních reakcí byla potvrzena restrikcími štěpeními a sekvenací. Připravený konstrukt byl transiентně transformován do listu *N. benthamiana*. Během mikroskopické analýzy byl zelený fluorescenční signál detekován v stromě chloroplastu, cytoplazmě, v okolí cytoplazmatické membrány, v buněčném jádře a okolo buněčné membrány. Byla tedy potvrzena predikovaná lokalizace MtCSD2 v chloroplastech pomocí experimentálních přístupů.

## 7 Literatura

- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., & Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3), 161–175. <https://doi.org/10.3109/07388550903524243>
- Ali, E., Hussain, S., Hussain, N., Kakar, K. U., Shah, J. M., Zaidi, S. H. R., Jan, M., Zhang, K., Khan, M. A., & Imtiaz, M. (2022). Tocopherol as plant protector: An overview of Tocopherol biosynthesis enzymes and their role as antioxidant and signaling molecules. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(2), 20. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03350-x>
- Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). *Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants*.
- Appleby, C. A. (1984). Leghemoglobin and Rhizobium Respiration. *Annual Review of Plant Biology*, 35(Volume 35, 1984), 443–478. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.002303>
- Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Aldasoro, J., Arrese-Igor, C., & Nogués, S. (2015). Effect of shoot removal on remobilization of carbon and nitrogen during regrowth of nitrogen-fixing alfalfa. *Physiologia Plantarum*, 153(1), 91–104. <https://doi.org/10.1111/ppl.12222>
- Asada, K., Takahashi, M., & Nagate, M. (1974). Assay and Inhibitors of Spinach Superoxide Dismutase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(2), 471–473. <https://doi.org/10.1080/00021369.1974.10861178>
- Bacenetti, J., Lovarelli, D., Tedesco, D., Pretolani, R., & Ferrante, V. (2018). Environmental impact assessment of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay production. *Science of The Total Environment*, 635, 551–558. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.161>
- Bannister, W. H., Bannister, J. V., Barra, D., Bond, J., & Bossa, F. (1991). Evolutionary Aspects of Superoxide Dismutase: The Copper/Zinc Enzyme. *Free Radical Research Communications*, 12(1), 349–361. <https://doi.org/10.3109/10715769109145804>
- Becana, M., Matamoros, M. A., Udvardi, M., & Dalton, D. A. (2010). Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytologist*, 188(4), 960–976. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03512.x>
- Becker, A. (2017). Classic Spotlight: Bacteroids—Views of an Enigmatic Bacterial State in Root Nodule Symbiosis through the Centuries. *Journal of Bacteriology*, 199(3), e00741-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00741-16>
- Beyer, W. F., & Fridovich, I. (1987). Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 26(5), 1251–1257. <https://doi.org/10.1021/bi00379a008>
- Bienert, G. P., & Chaumont, F. (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(5), 1596–1604. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017>
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(8), 994–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Bindschedler, L. V., Palmblad, M., & Cramer, R. (2008). Hydroponic isotope labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics; an oxidative stress case study. *Phytochemistry*, 69(10), 1962–1972. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.007>
- Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biology*, 49(2), 211–220. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.504732>
- Bradford, M. M. (b.r.). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*.
- Bray, R. C., Cockle, S. A., Fielden, E. M., Roberts, P. B., Rotilio, G., & Calabrese, L. (1974). Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 139(1), 43–48. <https://doi.org/10.1042/bj1390043>
- Cohu, C. M., Abdel-Ghany, S. E., Gogolin Reynolds, K. A., Onofrio, A. M., Bodecker, J. R., Kimbrel, J. A., Niyogi, K. K., & Pilon, M. (2009). Copper delivery by the copper

- chaperone for chloroplast and cytosolic copper/zinc-superoxide dismutases: Regulation and unexpected phenotypes in an Arabidopsis mutant. *Molecular Plant*, 2(6), 1336–1350. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp084>
- Del Río, L. A., & López-Huertas, E. (2016). ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling. *Plant and Cell Physiology*, pcw076. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw076>
- Dreyer, B. H., & Schippers, J. H. M. (2019). Copper-Zinc Superoxide Dismutases in Plants: Evolution, Enzymatic Properties, and Beyond. In J. A. Roberts (Ed.), *Annual Plant Reviews online* (1. vyd., s. 933–968). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0705>
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., & Jačević, V. (2021). The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Frontiers in Plant Science*, 11, 552969. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>
- Dvořák, P., Krasylenko, Y., Ovečka, M., Basheer, J., Zapletalová, V., Šamaj, J., & Takáč, T. (2021). In vivo light-sheet microscopy resolves localisation patterns of FSD1, a superoxide dismutase with function in root development and osmoprotection. *Plant, Cell & Environment*, 44(1), 68–87. <https://doi.org/10.1111/pce.13894>
- Esteban, R., Royo, B., Urarte, E., Zamarreño, A. M., Garcia-Mina, J. M., & Moran, J. F. (2016). Both Free Indole-3-Acetic Acid and Photosynthetic Performance are Important Players in the Response of Medicago truncatula to Urea and Ammonium Nutrition Under Axenic Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00140>
- Farnese, F. S., Menezes-Silva, P. E., Gusman, G. S., & Oliveira, J. A. (2016). When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471>
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M., Lin, Y., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61–76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>
- Fichman, Y., & Mittler, R. (2020). Rapid systemic signaling during abiotic and biotic stresses: Is the ROS wave master of all trades? *The Plant Journal*, 102(5), 887–896. <https://doi.org/10.1111/tpj.14685>
- Francoz, E., Ranocha, P., Nguyen-Kim, H., Jamet, E., Burlat, V., & Dunand, C. (2015). Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry*, 112, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.020>
- Fyad-Lameche, F.-Z., Iantcheva, A., Siljak-Yakovlev, S., & Brown, S. C. (2016). Chromosome number, genome size, seed storage protein profile and competence for direct somatic embryo formation in Algerian annual Medicago species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(3), 531–540. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0912-2>
- Gage, D. J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280–300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., & Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28(11), 1091–1101. <https://doi.org/10.1002/bies.20493>
- Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y., & Zhu, J. (2013). Heat stress induction of *mi R 398* triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 74(5), 840–851. <https://doi.org/10.1111/tpj.12169>
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, 141(2), 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Hanáková, S. (2022): *Charakterizace vybraných SOD u rostlin Arabidopsis thaliana a Medicago sativa*. [Bakalářská práce]. Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.

- He, M., He, C.-Q., & Ding, N.-Z. (2018). Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>
- Henzler, T., & Steudle, E. (2000). Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: Model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. *Journal of Experimental Botany*, 51(353), 2053–2066. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.353.2053>
- Hu, C.-H., Wang, P.-Q., Zhang, P.-P., Nie, X.-M., Li, B.-B., Tai, L., Liu, W.-T., Li, W.-Q., & Chen, K.-M. (2020). NADPH Oxidases: The Vital Performers and Center Hubs during Plant Growth and Signaling. *Cells*, 9(2), 437. <https://doi.org/10.3390/cells9020437>
- Huang, C.-H., Kuo, W.-Y., Weiss, C., & Jinn, T.-L. (2012). Copper Chaperone-Dependent and -Independent Activation of Three Copper-Zinc Superoxide Dismutase Homologs Localized in Different Cellular Compartments in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 158(2), 737–746. <https://doi.org/10.1104/pp.111.190223>
- Chapman, J. M., Muhlemann, J. K., Gayomba, S. R., & Muday, G. K. (2019). RBOH-Dependent ROS Synthesis and ROS Scavenging by Plant Specialized Metabolites To Modulate Plant Development and Stress Responses. *Chemical Research in Toxicology*, 32(3), 370–396. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00028>
- Chen, H., Lee, J., Lee, J.-M., Han, M., Emonet, A., Lee, J., Jia, X., & Lee, Y. (2022). MSD2, an apoplastic Mn-SOD, contributes to root skotomorphogenic growth by modulating ROS distribution in Arabidopsis. *Plant Science*, 317, 111192. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111192>
- Jagadeeswaran, G., Saini, A., & Sunkar, R. (2009). Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis. *Planta*, 229(4), 1009–1014. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0889-3>
- Jalmi, S. K., & Sinha, A. K. (2015). ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress-striking similarities and differences. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00769>
- Janků, L., Luhová, & Petřivalský. (2019). On the Origin and Fate of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Compartments. *Antioxidants*, 8(4), 105. <https://doi.org/10.3390/antiox8040105>
- Khan, A. U., & Kasha, M. (1994). Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), 12365–12367. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12365>
- Kimura, S., Waszczak, C., Hunter, K., & Wrzaczek, M. (2017). Bound by Fate: The Role of Reactive Oxygen Species in Receptor-Like Kinase Signaling. *The Plant Cell*, 29(4), 638–654. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00947>
- Kliebenstein, D. J., Monde, R. A., & Last, R. L. (1998). Superoxide dismutase in Arabidopsis: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology*, 118(2), 637–650. <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.637>
- Kuo, W. Y., Huang, C. H., Liu, A. C., Cheng, C. P., Li, S. H., Chang, W. C., Weiss, C., Azem, A., & Jinn, T. L. (2013). CHAPERONIN 20 mediates iron superoxide dismutase (Fe SOD) activity independent of its co-chaperonin role in Arabidopsis chloroplasts. *New Phytologist*, 197(1), 99–110. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04369.x>
- Landis, G. N., & Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(3), 365–379. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.08.012>
- Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T., & Geurts, R. (2005). Formation of organelle-like N<sub>2</sub>-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by *DMI2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(29), 10375–10380. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504284102>
- Martin, M. V., Fiol, D. F., Sundaresan, V., Zabaleta, E. J., & Pagnussat, G. C. (2013). *Oiwa*, a Female Gametophytic Mutant Impaired in a Mitochondrial Manganese-Superoxide Dismutase, Reveals Crucial Roles for Reactive Oxygen Species during Embryo Sac

- Development and Fertilization in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(5), 1573–1591. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.109306>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- Mills, B. J. W., Krause, A. J., Jarvis, I., & Cramer, B. D. (2023). Evolution of Atmospheric O<sub>2</sub> Through the Phanerozoic, Revisited. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 51(1), 253–276. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-032320-095425>
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Mor, A., Koh, E., Weiner, L., Rosenwasser, S., Sibony-Benyamini, H., & Fluhr, R. (2014). Singlet Oxygen Signatures Are Detected Independent of Light or Chloroplasts in Response to Multiple Stresses. *Plant Physiology*, 165(1), 249–261. <https://doi.org/10.1104/pp.114.236380>
- Muñoz, P., & Munné-Bosch, S. (2019). Vitamin E in Plants: Biosynthesis, Transport, and Function. *Trends in Plant Science*, 24(11), 1040–1051. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.08.006>
- Myouga, F., Hosoda, C., Umezawa, T., Iizumi, H., Kuromori, T., Motohashi, R., Shono, Y., Nagata, N., Ikeuchi, M., & Shinozaki, K. (2008). A Heterocomplex of Iron Superoxide Dismutases Defends Chloroplast Nucleoids against Oxidative Stress and Is Essential for Chloroplast Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(11), 3148–3162. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061341>
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D. B., Issakidis, E., Jacquot, J.-P., & Rouhier, N. (2006). Plant Glutathione Peroxidases Are Functional Peroxiredoxins Distributed in Several Subcellular Compartments and Regulated during Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Physiology*, 142(4), 1364–1379. <https://doi.org/10.1104/pp.106.089458>
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 454–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
- Ochiai, E.-I. (1983). Copper and the biological evolution. *Biosystems*, 16(2), 81–86. [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(83\)90029-1](https://doi.org/10.1016/0303-2647(83)90029-1)
- Perry, J. J. P., Shin, D. S., Getzoff, E. D., & Tainer, J. A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(2), 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.004>
- Pilon, M., Ravet, K., & Tapken, W. (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(8), 989–998. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.002>
- Printz, B., Guerriero, G., Sergeant, K., Audinot, J.-N., Guignard, C., Renaut, J., Lutts, S., & Hausman, J.-F. (2016). Combining -Omics to Unravel the Impact of Copper Nutrition on Alfalfa (*Medicago sativa*) Stem Metabolism. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 407–422. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw001>
- Puppo, A., & Rigaud, J. (1986). Superoxide dismutase: An essential role in the protection of the nitrogen fixation process? *FEBS Letters*, 201(2), 187–189. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80605-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80605-6)
- Qi, J., Wang, J., Gong, Z., & Zhou, J.-M. (2017). Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.022>
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., Gour, V. S., Minkina, T., Sushkova, S., & Mandzhieva, S. (2021). Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology*, 10(4), 267. <https://doi.org/10.3390/biology10040267>
- Richards, S. L., Wilkins, K. A., Swarbreck, S. M., Anderson, A. A., Habib, N., Smith, A. G., McAINSH, M., & Davies, J. M. (2015). The hydroxyl radical in plants: From seed to seed. *Journal of Experimental Botany*, 66(1), 37–46. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru398>

- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Rutledge, H. L., Cook, B. D., Nguyen, H. P. M., Herzik, M. A., & Tezcan, F. A. (2022). Structures of the nitrogenase complex prepared under catalytic turnover conditions. *Science*, 377(6608), 865–869. <https://doi.org/10.1126/science.abq7641>
- Rutschow, H., Ytterberg, A. J., Friso, G., Nilsson, R., & Wijk, K. J. van. (2008). Quantitative Proteomics of a Chloroplast SRP54 Sorting Mutant and Its Genetic Interactions with CLPC1 in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 148(1), 156. <https://doi.org/10.1104/pp.108.124545>
- Santos, R., Hérouart, D., Puppo, A., & Touati, D. (2000). Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*–legume symbiosis. *Molecular Microbiology*, 38(4), 750–759. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02178.x>
- Shapiguzov, A., Vainonen, J. P., Wrzaczek, M., & Kangasjärvi, J. (2012). ROS-talk – how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Frontiers in Plant Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00292>
- Song, J., Zeng, L., Chen, R., Wang, Y., & Zhou, Y. (2018). In silico identification and expression analysis of superoxide dismutase (SOD) gene family in *Medicago truncatula*. *3 Biotech*, 8(8). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1373-1>
- Tang, H., Krishnakumar, V., Bidwell, S., Rosen, B., Chan, A., Zhou, S., Gentzbittel, L., Childs, K. L., Yandell, M., Gundlach, H., Mayer, K. F., Schwartz, D. C., & Town, C. D. (2014). *An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume Medicago truncatula*.
- Tsang, C. K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., & Zheng, X. F. S. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature Communications*, 5(1), 3446. <https://doi.org/10.1038/ncomms4446>
- Varshney, R. K., Bansal, K. C., Aggarwal, P. K., Datta, S. K., & Craufurd, P. Q. (2011). Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: Hope or hype? *Trends in Plant Science*, 16(7), 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.004>
- Wang, Q., Liu, J., & Zhu, H. (2018). Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 313. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00313>
- Waszczak, C., Carmody, M., & Kangasjärvi, J. (2018). *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*.
- Xu, X. M., Lin, H., Maple, J., Björkblom, B., Alves, G., Larsen, J. P., & Møller, S. G. (2010). The *Arabidopsis* DJ-1a protein confers stress protection through cytosolic SOD activation. *Journal of Cell Science*, 123(10), 1644–1651. <https://doi.org/10.1242/jcs.063222>
- Yamakura, F., & Kawasaki, H. (2010). Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(2), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.010>
- Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y., & Shikanai, T. (2009). *SQUAMOSA* Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(1), 347–361. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060137>
- Young, N. D., & Udvardi, M. (2009). Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.11.005>
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 145–156. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100012>
- Yu, L., Huang, L., Zeng, S., Tang, G., Wang, S., Li, N., Yan, J., & Luo, L. (2019). Reactive oxygen species accumulation patterns of alfalfa root nodules identified using an optimized method. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 51(4), 448–451. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmz008>

## 8 Seznam použitých zkratek

$^1\text{O}_2$	singletní kyslík
ABA	kyselina abscisová
APX	akorbát peroxidasa
BS	programovaná buněčná smrt
CAT	katalasa
CBL4	CALCINEURIN B-LIKE CALCIUM SENSOR 4
CCS	Cu chaperon for SOD; CCS
CIPK26	CBL4-INTERACTING PROTEIN KINASE 26
COPT1	Copper transporter 1
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> ekotyp Columbia
CPN20	CHAPERONIN20
CSD1-4	superoxiddismutasa 1-4 obsahující měď a zinek
Cu/ZnSOD	superoxiddismutasa obsahující měď a zinek
DHA	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
Dpi	dny po inokulaci
ET	ethylen
FeSOD	superoxiddismutasa obsahující železo
FRO3	Ferric chelate reductase
FSD1-3	superoxiddismutasa 1-3 obsahující železo
GFP	Zelený fluorescenční protein
GPX	glutathion peroxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion
GSSG	disulfidická forma glutathionu
$\text{H}_2\text{O}_2$	peroxid vodíku
$\text{HO}_2\cdot$	hydroxyperoxylový radikál
HPCA1	$\text{H}_2\text{O}_2$ -INDUCED $\text{Ca}^{2+}$ INCREASES 1
JA	kyselina jasmonová
MAPK	MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE
MDA	monodehydroaskorbát

MES	Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové
MnSOD	superoxiddismutasa obsahující mangan
MS	Murashige a Skoog médium
MSD1-2	superoxiddismutasa 1-2 obsahující mangan
NATIVE-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek
NBT	Chlorid nitrotetrazoliové modři
NiSOD	superoxiddismutasa obsahující nikl
NPQ	nefotochemické zhášení
OH·	hydroxylový radikál
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitrit
ONOOH	kyselina peroxydusitá
OST1	OPEN STOMATA 1
POX	peroxidasy
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
PTM	posttranslační modifikace
PVDF	polyvinyliden difluoridová membrána
RBOH	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG
RNS	reaktivní forma dusíku
ROO·	Peroxylový radikál
ROS	reaktivní formy kyslíku
SA	kyselina salicylová
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného
SOD	superoxiddismutasa
sodA	cytoplazmatická superoxiddismutasa <i>Sinorhizobium meliloti</i>
SPL	SQUAMOSA promoter-binding protein-like
SPL7	SQUAMOSA promoter-binding protein-like7
t <sub>1/2</sub>	poločas rozpadu
TBS-T	Tris buffer saline s přídavkem Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin



VDE	violaxanthin de-epoxidasa
XO	xanthinoxidasa
YSL2	metal-nicotianamine transporter
ZIP2	ZRT, IRT-like proteins