

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie



**Fenotypová analýza mutantů *Arabidopsis thaliana* v
genu pro Fe superoxididismutasu 1 v odpovědi na
inhibitor auxinového transportu.**

Bakalářská práce

Autor:	Marek Kvapil
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok: :	2021

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

.....
Marek Kvapil

Chtěl bych poděkovat vedoucímu mé práce doc. Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D. za odborné rady, ochotu, vřelý přístup, trpělivost a čas, který mi věnoval při zpracování bakalářské práce v této náročné době. Dále bych chtěl poděkovat rodině a přátelům za podporu při psaní této bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Marek Kvapil
Název práce	Fenotypová analýza mutantů <i>Arabidopsis thaliana</i> v genu pro Fe superoxiddismutasu 1 v odpovědi na inhibitor auxinového transportu.
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení buněčné biologie
Vedoucí práce	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Fe superoxiddismutasa (FSD1) patří do rodiny enzymů superoxiddismutas (SOD), zodpovědných za dismutaci superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$) na peroxid vodíku (H_2O_2), čímž zabraňují oxidativnímu poškození rostlinných buněk, způsobenému velmi reaktivním hydroxylovým radikálem (HO^{\cdot}). Tyto molekuly jsou známé jako reaktivní formy kyslíku (ROS) a mimo jiné procesy se účastní regulace fytohormonální signalizace během vývoje rostlin. Auxin je rostlinný hormon zodpovědný za celou řadu procesů během růstu a vývoje rostlin. Pletivová distribuce FSD1 se částečně shoduje s distribucí auxinu v kořenových špičkách *Arabidopsis thaliana*. Cílem této práce bylo analyzovat fenotyp kořene mutantů *A. thaliana fsd1* v odpovědi na inhibici polárního transportu auxinu navozeného pomocí kyseliny N-1-naftylftalamové (NPA), a tak vyhodnotit roli FSD1 v polárním transportu auxinu. Zjistili jsme, že se mutanti *fsd1* nelišili od divého typu v odpovědi na NPA z hlediska délky primárního kořene a gravitropismu. Naopak malé, ale průkazné změny byly zjištěny v počtu a délce kořenových vlásků a ve vzdálenosti prvního kořenového vlásku od kořenového apexu. Naše výsledky ukázaly, že FSD1 má specifický vliv na odpovědi rostlin na inhibici polárního transportu auxinu.

Klíčová slova	ROS, auxin, FSD1, kyselina N-1-naftylftalamová, polární transport auxinu, superoxiddismutasy
Počet stran	62
Počet příloh	3
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Marek Kvapil
Title	Phenotypic analysis of <i>Arabidopsis thaliana</i> mutants deficient in <i>Fe SUPEROXIDE DISMUTASE 1</i> in response to auxin transport inhibitor.
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of the region Haná for biotechnological and agricultural research, Department of Cell biology
Supervisor	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Fe superoxide dismutase (FSD1) belongs to the enzymatic family of superoxide dismutases (SODs), which are responsible for dismutation of superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2), thereby preventing oxidative damage to plant cells by a highly reactive hydroxyl radical (HO^{\cdot}). These molecules are known as reactive oxygen species (ROS) and they participate, among other processes, in regulation of phytohormonal signalling during plant development. Auxin is a plant hormone responsible for multiple processes during plant growth and development. FSD1 tissue-specific distribution shows partial overlap with the distribution of auxin in *Arabidopsis thaliana* root tips. The objective of this thesis was to analyze the root phenotype of *A. thaliana fsd1* mutants in response to the inhibition of polar auxin transport by N-1-naphtylphtalamic acid (NPA) and thus to evaluate the role of *FSD1* during polar auxin transport. We have found that the response of *fsd1* mutants to NPA did not differ from wild types in terms of root elongation and gravitropism. On the other hand, FSD1 deficiency slightly affected the root hair number and elongation, as well as the distance of the first root hair bulge from root tip upon NPA treatment. These results indicate, that FSD1 has slight, but very specific roles in polar auxin transport in *A. thaliana* roots.

Keywords	ROS, auxin, FSD1, N-1-naphtylphtalamic acid, polar auxin transport, superoxide dismutases
Number of pages	62
Number of appendices	3
Language	Czech

Obsah

1	Úvod	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Tvorba a regulace reaktivních forem kyslíku u rostlin	9
2.1.1	Reaktivní formy kyslíku	9
2.1.2	Charakterizace reaktivních forem kyslíku	10
2.1.3	Tvorba reaktivních forem kyslíku	11
2.1.3.1	Tvorba reaktivních forem kyslíku v chloroplastech	11
2.1.3.2	Tvorba reaktivních forem kyslíku v mitochondriích	13
2.1.3.3	Tvorba reaktivních forem kyslíku v peroxisomech	13
2.1.3.4	Tvorba reaktivních forem kyslíku v apoplastu	14
2.1.4	Neenzymatická antioxidační obrana	15
2.1.5	Enzymatická antioxidační obrana	16
2.1.5.1	Superoxiddismutasy	16
2.1.5.2	Další enzymy antioxidační obrany	19
2.2	Auxin	21
2.2.1	Metabolismus auxinu	21
2.2.2	Transport auxinu	24
2.2.2.1	Buněčný import a export auxinu	24
2.2.2.2	Kyselina N-1-naftylftalamová	26
2.3	Reaktivní formy kyslíku a auxin	28
2.3.1	Vliv ROS na auxin	28
2.3.2	Vliv auxinu na ROS	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1	Materiály	31
3.1.1	Biologický materiál	31
3.1.2	Chemikálie	31
3.1.3	Přístroje	31
3.2	Metody	31
3.2.1	Příprava rostlinného materiálu	31
3.2.2	Fenotypová analýza rostlin <i>A. thaliana</i>	32
4	VÝSLEDKY	34
4.1	Fenotypová analýza rostlin divého typu a mutantů <i>fsdl</i> v odpovědi na NPA	34
4.1.1	Délka primárního kořene	34
4.1.2	Počet a délka kořenových vlásků	36
4.1.3	Vzdálenost kořenového apexu od prvního kořenového vlásku	39
5	DISKUZE	41
6	ZÁVĚR	44
7	LITERATURA	45
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57
9	PŘÍLOHY	60

Cíle práce

Vypracovat literární rešerši na téma:

Tvorba a regulace reaktivních kyslíkových radikálů u rostlin

Vývojové role ROS a antioxidantů

Fe superoxiddismutasa (FSD1)

Auxin

Interakce ROS s auxinem

Získat zručnosti a samostatně provádět metody:

Práce s rostlinným materiálem *in vitro* a *in vivo*

Dokumentace a kvantitativní vyhodnocení fenotypu rostlin

Experimentální cíle:

Analýza délky a kořenů rostlin divého typu a mutantů *fsd1* v odpovědi na modulaci polárního transportu auxinů

Analýza délky kořenových vlásků rostlin divého typu a mutantů *fsd1* v odpovědi na modulaci polárního transportu auxinů

Na základě výsledků vyhodnotit vliv polárního transportu auxinu na FSD1

1 Úvod

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou částečně redukované formy atmosférického kyslíku. Jsou známé především pro svou vlastnost způsobovat oxidativní poškození proteinů, DNA a lipidů. Mohou ovšem sloužit také jako signální molekuly, kdy spouštějí genovou expresi v podmínkách stresu anebo napomáhají při regulaci buněčného cyklu, prodlužování buněk, embryogenezi, klíčení semen a programové buněčné smrti (PCD; Mittler, 2017). ROS se v rostlinách tvoří jako vedlejší produkty aerobního metabolismu ve více buněčných kompartmentech, a během stresových podmínek dochází k jejich nadměrné akumulaci. Díky toxicitě některých ROS si rostliny musely vyvinout určité obranné mechanismy, díky nimž se mohou efektivně těmto toxickým účinkům bránit.

Superoxiddismutasy (SOD) jsou antioxidační enzymy, které představují jeden z těchto obranných mechanismů proti oxidativnímu poškození způsobenému ROS. SOD odbourávají superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$) na peroxid vodíku (H_2O_2) a molekulu kyslíku. Tímto zabrání tvorbě hydroxylového radikálu (HO^{\cdot}), nejvíce reaktivní formy ROS, jež extrémně reaguje se všemi biomolekulami (Mittler, 2017). Jedná se o rodinu metaloenzymů, využívající kovové kofaktory, kdy u vyšších rostlin mezi takto využívané kovové kofaktory patří železo (FeSOD), mangan (MnSOD) a zinek-měď (Cu/ZnSOD).

Auxin je jedním z hlavních fytohormonů, který ovlivňuje řadu procesů v rostlinách, zejména procesy související s růstem a vývojem. Při zvýšené hladině ROS, auxin interaguje s redoxním metabolismem, což vede ke snížení hladiny ROS (Iglesias *et al.*, 2010). ROS na druhou stranu ovlivňují stabilitu auxinu, a to oxidací kyseliny indol-3-octové (IAA), jež je jedním z nejvíce zastoupených auxinů (Kawano, 2003). Kyselina N-1-naftylftalamová (NPA) je syntetický inhibitor polárního transportu auxinu (PAT). NPA interaguje s proteiny zodpovídajícími za transport auxinu, ale také s proteiny zodpovědných za regulaci transportu auxinu (Bailly *et al.*, 2008).

Pletivová distribuce exprese *FSD1* (*FeSOD1*) ukázala značnou podobnost s distribucí auxinu v kořenové špičce *Arabidopsis thaliana* (Pettersson *et al.*, 2009; Dvořák *et al.*, 2021a). Z tohoto důvodu bylo cílem této práce studovat propojení FSD1 s PAT prostřednictvím testování vlivu NPA na fenotyp tDNA inserčních mutantů *A. thaliana fsd1-1* a *fsd1-2*.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Tvorba a regulace reaktivních forem kyslíku u rostlin

2.1.1 Reaktivní formy kyslíku

ROS jsou částečně redukované formy atmosférického kyslíku, které jsou zejména známe pro svou vlastnost způsobovat oxidativní poškození proteinů, DNA a lipidů. Narůstající množství důkazů ale poukazuje na to, že ROS jsou také signální molekuly. Jsou neustále produkovány rostlinami jako vedlejší produkty aerobního metabolismu. Na Zemi se pravděpodobně objevily zároveň s prvními molekulami atmosférického kyslíku před zhruba 2,4 - 3,8 miliardami lety (Halliwell a Gutteridge, 2015).

Jsou to reaktivní formy molekulárního kyslíku. Patří mezi ně například singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), hydroxylový radikál (HO^\cdot), superoxid ($\text{O}_2^\cdot^-$) a peroxid vodíku (H_2O_2 ; Wrzaczek *et al.*, 2013). Tvorba ROS probíhá v mitochondriích, chloroplastech, peroxisomech, ale také v každé buněčné organelle obsahující proteiny nebo molekuly s dostatečně vysokým redoxním potenciálem k excitaci nebo transferu elektronu atmosférickému kyslíku (Mittler, 2017).

ROS vznikají přeměnou kyslíku v základním stavu ($^3\text{O}_2$), a to dvěma způsoby: buď transferem energie, nebo transferem elektronu. Transfer energie vede k tvorbě singletového kyslíku. Transfer elektronu směřuje k redukci a následnému vzniku superoxidu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu (Apel a Hirt, 2004).

Jakožto signální molekuly jsou ROS velmi všestranné, za což vděčí svým rozmanitým vlastnostem. Příkladem těchto vlastností jsou rozdílné úrovně reaktivity, místa produkce a potenciál pro průchod biologickými membránami (Mignolet-Spruyt *et al.*, 2016; Halliwell a Gutteridge, 2015). ROS byly pravděpodobně použity buňkami jako první signální molekuly k detekci nebezpečných hladin atmosférického kyslíku nebo k monitorování metabolických reakcí (Mittler *et al.*, 2011). Například u vyšších rostlin došlo ke zjištění, že ROS regulují vývoj, diferenciaci, redoxní rovnováhu, odpovědi na stres, interakci s ostatními organismy, systematické odpovědi na PCD (Mittler, 2017).

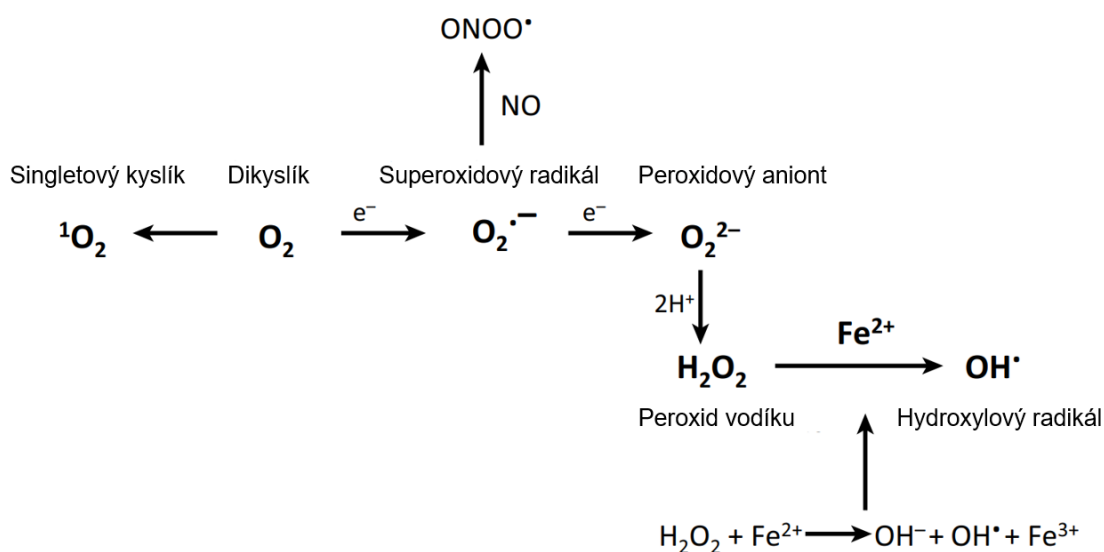
Některé ROS mohou být velmi toxické a jsou následně detoxikovány různými enzymatickými a neenzymatickými mechanismy. Produkce ROS jako vedlejších produktů aerobního metabolismu, spojená s jejich detoxikací antioxidantním systémem, probíhá v buňkách neustále z důvodu prevence potenciálního oxidativního stresu vedoucího k oxidativnímu poškození. Evoluce aerobních metabolických procesů, jako jsou respirace a fotosyntéza, vedla k produkci ROS v chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech.

2.1.2 Charakterizace reaktivních forem kyslíku

Každý z ROS se liší v několika vlastnostech, jako jsou reaktivita, životnost, migrační vzdálenost, místa produkce a látky/mechanismy, které je detoxikují. Liší se i mechanismem vzniku, kdy dojde k přeměně atmosférického kyslíku různými mechanismy (Mittler *et al.*, 2004).

Singletový kyslík jako jediný ROS vzniká transferem energie a je poměrně reaktivní (Obr. 1). Reaguje zejména s lipidy (Farmer a Mueller, 2013), s aminokyselinovými zbytky Trp, His, Tyr, Met nebo Cys (König *et al.*, 2012; Mignolet-Spruyt *et al.*, 2016) a s guaninem v DNA (Mignolet-Spruyt *et al.* 2016), jež oxiduje. Jeho životnost je odhadována na několika mikrosekund (1-4 μ s) a migrační vzdálenost je zhruba 30 nm. Místa produkce jsou buněčné membrány, tylakoidní membrána chloroplastů a jádro. Typickými detoxikanty jsou karotenoidy a α -tokoferoly (Mittler, 2017).

Superoxidový radikál vzniká transferem elektronu (Obr. 1). Je poměrně reaktivní s Fe-S proteiny, ale také může docházet k jeho dismutaci na peroxid vodíku (Obr. 1). Mimo dismutaci na peroxid vodíku může superoxidový radikál reagovat s oxidem dusnatým (Obr. 1), čímž dojde k tvorbě peroxynitritu, což je jedna z reaktivních forem dusíku (Vandelle a Delledonne, 2011). Životnost a migrační vzdálenost je podobná jako u singletového kyslíku. Vzniká v elektronovém transportním řetězci chloroplastů a mitochondrií, dále pak v apoplastu a peroxisomech. Typickými detoxikanty jsou flavonoidy, askorbát (ASC) a SOD (Mittler, 2017).



Obr. 1 Schéma vzniku jednotlivých reaktivních forem kyslíku (ROS) a jedné z reaktivních forem dusíku, kdy jako základní molekula figuruje molekula atmosférického kyslíku (dikyslíku). Zdroj: (Mittler, 2017).

Peroxid vodíku může vznikat transferem elektronů superoxidovému radikálu, kdy vzniká peroxidový iont (O_2^{2-}), který je následně přeměněn za dodání protonů na peroxid vodíku (Obr. 1). Peroxid vodíku je také jedním z produktů fotorespirace. V tomto případě je produkován v peroxisomech oxidací glykolátu, produkováného v chloroplastech během fotorespirace. Peroxid vodíku je nejstabilnější formou ROS. Životnost má peroxid vodíku větší než 1 ms a migrační vzdálenost je větší než 1 μ m. Reaguje s aminokyselinovými zbytky (Cys a Met), s proteiny obsahujícími hemovou skupinu a s DNA. Je rozkládán neenzymaticky pomocí ASC a glutathionu (GSH), a také enzymaticky askorbátperoxidasou (APX), jinými peroxidasami (PRX), katalasou (CAT) a peroxiredoxinem (Prxr; Mittler, 2017).

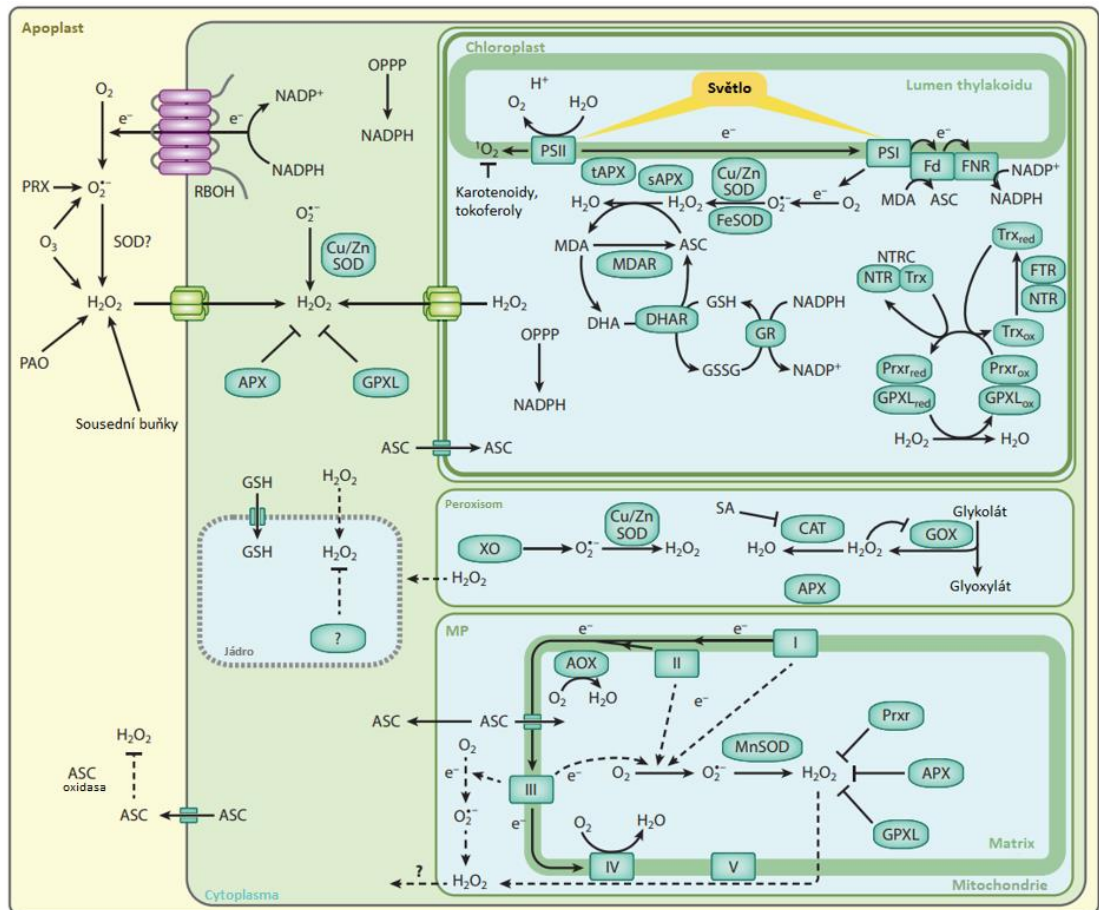
Hydroxylový radikál vzniká transferem elektronů, konkrétně Fentonovou reakcí, kdy reaguje peroxid vodíku s železnatým iontem (Fe^{2+} ; Obr. 1). Je to nejvíce reaktivní forma ROS, kdy extrémně reaguje se všemi biomolekulami, včetně DNA, RNA, lipidů a proteinů. Má nejmenší životnost (okolo 1 ns) a migrační vzdálenost (zhruba 1 nm) ze všech ROS. Typickými detoxikanty jsou flavonoidy, prolin, cukry a ASC (Mittler, 2017).

2.1.3 Tvorba reaktivních forem kyslíku

2.1.3.1 Tvorba reaktivních forem kyslíku v chloroplastech

Produkce ROS v chloroplastech je velmi úzce spojena s fotosyntetickými reakcemi závislými na světle a je ovlivněna fyziologickými a environmentálními faktory. Ve chvíli, kdy intenzita fotonů převyšuje intenzitu vyžadovanou pro asimilaci CO_2 , dojde k akumulaci elektronů v elektronovém transportním řetězci chloroplastů a ke zvýšení míry tvorby ROS (superoxidu) přenosem elektronů z fotosystému I (PSI) nebo fotosystému II (PSII) na kyslík (Obr. 2; Asada, 2006). K této situaci dochází především během abiotického stresu (sucho, salinita, extrémní teploty), který způsobí vodní stres a limitaci koncentrace CO_2 vlivem zavírání průduchů (Das a Roychoudhury, 2014).

Jako donor elektronu může figurovat například NADPH nebo xantin (Obr. 2). Tyto donory jsou oxidovány svými specifickými oxidasami (pro NADPH to je NADPH-oxidasa, pro xantin to je xantinoxidasa (XO; Obr. 2). Superoxidový radikál je přeměňován na peroxid vodíku ve stroma chloroplastů spontánně, nebo za pomoci enzymů SOD (Obr. 2). Tvorba peroxidu vodíku v chloroplastech spolu se změnami antioxidačních systémů jsou signálem poskytujícím informace o chloroplastových metabolických změnách do jádra v procesu retrogradní signalizace. Pro chloroplasty je



→ Aktivace —| Inhibice - - - Hypoteticky

Obr. 2 Schéma tvorby a detoxikace ROS v rostlinné buňce. K tvorbě singletového kyslíku dochází zejména transferem energie z PSII v membráně tylakoidů. Ke tvorbě superoxidového radikálu dochází v procesech s velkým tokem elektronů, jako jsou elektronové transportní řetězce v chloroplastech a mitochondriích, anebo může vznikat jako produkt několika enzymatických reakcí. Peroxid vodíku je produktem enzymaticky katalyzovaných dismutací superoxidového radikálu, nebo může vznikat jako vedlejší produkt oxidace glykolátu. Peroxid vodíku jako jediný z ROS, je schopen procházet přes biomembrány pomocí akvaporinů. Všechny subcelulární kompartmenty, ve kterých vznikají ROS, mají mechanismy (ať už neenzymatické, nebo enzymatické), kterými detoxikují vznikající ROS. Všemi mechanismy tvorby a detoxikace ROS si je buňka schopná regulovat vnitřní hladiny ROS dle potřeby. Zkratky: AOX, alternativní oxidasa; APX, askorbátperoxidasa; ASC, askorbát; CAT, katalasa; DHA, dehydroaskorbát; DHAR, dehydroaskorbátreduktasa; SOD, superoxiddismutasy; MDA, monodehydroaskorbát; MDAR, monodehydroaskorbátreduktasa; Fd, ferredoxin; FNR, ferredoxin-NADP⁺ reduktasa; FTR, ferredoxin dependentní thioredoxinreduktasa; GOX, glykolát oxidasa; GR, glutathionreduktasa; GPXL, enzymy podobné glutathionperoxidase; GSH, glutathion; GSSG, glutathion disulfid; MP, mezimembránový prostor; NTR, NADPH dependentní thioredoxinreduktasa; OPPP, oxidativní pentosa-fosfátová dráha; PAO, polyaminoxidasa; PRX, peroxidasy; Prxr, peroxiredoxiny; PSI, fotosystém I; PSII, fotosystém II; RBOH, NADPH-oxidasy lokalizované na plazmatické membráně; ROS, reaktivní formy kyslíku; sAPX, stromální askorbátperoxidasa; SA, kyselina salicylová; SOD, superoxiddismutasa; tAPX, tylakoidní askorbátperoxidasa; Trx, thioredoxin; XO, xantinoxidasa; I-V, mitochondriální elektronové transportní řetězce. Zdroj: (Waszczak *et al.*, 2018).

unikátní formování singletového kyslíku. Ten může vznikat transferem energie

z tripletového primárního donoru elektronů ($^3P_{680}^*$) PSII do kyslíku v základním stavu (Obr. 2; Waszczak *et al.*, 2018).

2.1.3.2 Tvorba reaktivních forem kyslíku v mitochondriích

Živočišné mitochondrie jsou největším zdrojem ROS, zatímco u rostlin přispívají k tvorbě ROS relativně málo, především ve fotosyntetizujících pletivech (Apel a Hirt, 2004). K tvorbě ROS v rostlinných mitochondriích dochází převážně za normálních podmínek, ovšem během abiotického stresu je tvorba ROS velmi zvýšena, což ovlivňuje spřažení elektronového transportního řetězce a syntézy ATP (v mitochondriích), vedoucí ke zvýšené redukci elektronových přenašečů (např. ubichinonu), což generuje ROS (Das a Roychoudhury, 2014).

Produkce ROS v mitochondriích je spojena s mitochondriálním elektronovým transportním řetězcem, nacházejícím se na vnitřní membráně. Hlavními místy produkce superoxidového radikálu v mitochondriích jsou mitochondriální komplexy I, II a III (Obr. 2). Mezi komplexy III u rostlin a živočichů nejsou žádné významné rozdíly, a díky tomu lze usoudit, že produkce superoxidového radikálu na vnitřní membráně probíhá i u rostlin (Waszczak *et al.*, 2018).

Není jisté, zda mezimembránový prostor mitochondrií obsahuje enzymy štěpící ROS, ovšem na základě polopropustnosti vnější membrány by tuto roli mohly zastávat cytoplazmatické komponenty. Rostliny mají strategie, jak se vyhnout formování ROS v mitochondriích, a to přeměrováním proudu elektronů alternativní cestou přes alternativní oxidasu (AOX) mimo komplexy III a IV (Obr. 2; Huang *et al.*, 2016). Ve chvíli, kdy jsou elektrony z redukovaného ubichinonu (Millenaar a Lambers, 2003) předány AOX, elektrony již dále nepokračují do komplexu III a IV, jak tomu bývá obvyklé, ale na místo toho jsou uvolněny ve formě tepelné energie (Obr. 2; Millenaar a Lambers, 2003).

2.1.3.3 Tvorba reaktivních forem kyslíku v peroxisomech

V peroxisomech dochází k metabolickým procesům, z nichž mnoho vede k tvorbě ROS. K fotorespiraci dochází za podmínek nízkých koncentrací CO_2 (při stresových podmínkách, např. při zavírání průduchů za podmínek vodního stresu), kdy místo toho, aby došlo ke karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu, dojde k oxygenaci za vzniku 2-fosfoglykolátu, který je přeměněn na glykolát (Foyer *et al.*, 2009). Proto je tvorba ROS v peroxisomech úzce propojena s fotosyntézou (Waszczak *et al.*, 2018). Glykolát je transportován z chloroplastu do peroxisomu, kde je oxidován glykolátoxidásoou na

glyoxylát, přičemž zároveň s glyoxylátem vzniká peroxid vodíku (Obr. 2; Foyer *et al.*, 2009).

V peroxisomech dochází i k tvorbě jiných ROS. Superoxidový radikál je produkován v peroxisomech na dvou místech. Prvním místem je matrix peroxisomů, kde se nachází XO, jež hraje roli v přeměně xantinu a hypoxantinu na kyselinu močovou, během které dochází k tvorbě superoxidového radikálu jako vedlejšího produktu (Obr. 2). Druhým místem je membrána peroxisomu, v níž se nachází na NADPH závislý elektronový transportní řetězec, který využívá O₂ jako akceptor elektronů a uvolňuje superoxidový radikál do cytosolu (Das a Roychoudhury, 2014).

CAT jsou hlavními peroxisomovými enzymy štěpící H₂O₂ (Obr.2), kdy mutantní rostliny s nedostačující aktivitou CAT vykazují mnohé abnormality růstu závislé na periodě a intenzitě světla a na koncentraci CO₂ (Queval *et al.*, 2007).

2.1.3.4 Tvorba reaktivních forem kyslíku v apoplastu

Apoplast je místem, kde dochází k výměně živin a informací mezi rostlinou buňkou a prostředím. Mimo tyto funkce se zde tvoří i ROS. K produkci ROS v apoplastu dochází díky aktivní stimulaci enzymů, jako jsou NADPH-oxidasy lokalizované na plazmatické membráně (RBOHs.), apoplastické PRX (peroxidázy třídy III) a polyaminoxidasy (PAO; Obr. 2).

NADPH-oxidasy jsou nejdůležitějšími producenty ROS v apoplastu. Tyto oxidasy přenášejí elektrony přes plazmatickou membránu z cytoplazmatické NADPH na molekulární kyslík, a produkují tak superoxidový radikál (Obr. 2). Ten může být přeměněn na peroxid vodíku spontánně, nebo pomocí apoplastické SOD (Suzuki *et al.*, 2011). U rostlin jsou NADPH-oxidasy kódovány geny rodiny RBOH (Kadota *et al.*, 2015). Z této rodiny jsou RBOHD a RBOHF nejdůležitějšími enzymy při signalizaci v reakci na biotický či abiotický stres (Kadota *et al.*, 2015). Za regulaci těchto RBOH je zodpovědných několik mechanismů. Jedním je regulace závislá na apoplastickém Ca²⁺. Jedná se o pozitivní regulaci, kdy se v přítomnosti patogenu Ca²⁺ naváže na specifické vazebné místo na RBOH, čímž spustí produkci ROS (Kadota *et al.*, 2004). Dalším regulátorem jsou na Ca²⁺ závislé protein kinasy, které aktivují RBOHD jeho fosforylací, což způsobí tvorbu ROS jakožto signálních molekul při napadení rostliny patogenem (Dubiella *et al.*, 2013). Mimo tyto mechanismy existují i regulační mechanismy nezávislé na Ca²⁺. Příkladem je regulace RBOHD cytoplazmatickou kinázou BIK1, jež fosforyluje N-terminální část RBOHD (Li *et al.*, 2014). Odlišným mechanismem regulace RBOHD

je endocytóza, kdy dochází ke změně subcelulární lokalizace RBOHD. Tímto se sníží celkové množství aktivní RBOHD na plazmatické membráně (Hao *et al.*, 2014).

RBOH společně s apoplastickými PRX hrají klíčovou roli při tzv. apoplastickém oxidativním vzplanutí v odpovědi na biotický stres. Apoplastické PRX mají důležitou roli při poranění rostliny, kdy zesilují buněčnou stěnu polymerizací makromolekul a zesilujících komponent buněčné stěny (Almagro *et al.*, 2009). PAO katalyzují metabolismus spermidinu a sperminu, přičemž je tento metabolismus doprovázen tvorbou peroxidu vodíku (Yoda *et al.*, 2006).

2.1.4 Neenzymatická antioxidační obrana

Antioxidační systémy u rostlin udržují koncentraci ROS na netoxické úrovni. Antioxidační obranu rostlin lze rozdělit na enzymatickou a neenzymatickou. Mezi typické neenzymatické antioxidanty patří ASC, GSH, aminokyseliny, cukry, karotenoidy a flavonoidy (Noctor *et al.*, 2018).

Nejdůležitějšími antioxidanty nacházejícími se v rostlinách jsou ASC a GSH, které fungují jako přímé detoxikanty ROS (dochází k přímému chemickému odstranění ROS; Noctor *et al.*, 2018). Mohou ale být i součástí enzymatické antioxidační obrany, kdy vystupují jako substrát (GSH – pro určité PRX), nebo jako kofaktor (ASC – pro PRX; Noctor *et al.*, 2018). Výhodou ASC a GSH je, že mohou být opakovaně využity pro udržení redoxní rovnováhy, na rozdíl od jiných antioxidantů (Foyer a Noctor, 2011). Toho je docíleno regenerací jejich oxidované formy vysokokapacitními reduktasami a přidruženými systémy, jež čerpají reduktanty generované během fotosyntézy (Foyer a Noctor, 2011).

Dalšími jsou α -tokoferoly, karotenoidy, flavonoidy a prolin. A-tokoferoly jsou jediným zástupcem tokoferolů, přispívajících k antioxidační obraně rostlin (Hussain *et al.*, 2013). Reagují s lipidovými radikály, které redukují, a samy se přitom transformují na radikál, jenž je následně recyklován na svoji redukovanou formu interakcí s redukovaným GSH nebo s kyselinou askorbovou (Das a Roychoudhury, 2014). Karotenoidy se nacházejí v plastidech fotosyntetických a nefotosyntetických tkání rostlin (Sun *et al.*, 2018). Reagují jednak s excitovaným, nebo tripletovým chlorofylem ($^3\text{Chl}^*$), čímž zabrání tvorbě singletového kyslíku. Dále pak mohou přímo detoxikovat singletový kyslík, během čehož se uvolňuje energie ve formě tepla (Pospíšil, 2016). Flavonoidy jsou sekundárními detoxikanty ROS, protože doplňují jiné, více důležité antioxidační mechanismy, např. enzymy (Fini *et al.*, 2011). Aminokyselina prolin je jedním z účinných

detoxikantů hydroxylového radikálu a singletového kyslíku (Verbruggen a Hermans, 2008).

2.1.5 Enzymatická antioxidační obrana

K enzymatické antioxidační obraně dochází za pomoci enzymů. Odbourávání superoxidu a peroxidu vodíku je zabezpečováno odlišnými enzymy. Mezi nejvýznamnější enzymatické antioxidanty řadíme SOD, CAT, APX, monodehydroaskorbátreduktasy (MDAR), dehydroaskorbátreduktasy (DHAR), glutathionreduktasy (GR) a glutathionperoxidasy (GPX; Dvořák *et al.*, 2021b).

2.1.5.1 Superoxiddismutasy

SOD jsou antioxidační enzymy, které odbourávají (katalyzují dismutaci) superoxidový radikál na peroxid vodíku, čímž zabraňují jeho přeměně na velmi reaktivní hydroxylový radikál Haber-Weissovou reakcí (Fridovich, 1995; Kliebenstein *et al.*, 1998). Jedná se o rodinu metaloenzymů, využívajících kovové kofaktory. U vyšších rostlin mezi takto využívané kovové kofaktory patří železo (FeSOD), mangan (MnSOD) a měď-zinek (Cu/ZnSOD).

Výskyt jednotlivých SOD u rostlin (Kliebenstein *et al.*, 1998) a živočichů (Oury *et al.*, 1996) se liší. Genom *A. thaliana* obsahuje celkem sedm isoform SOD, z níž tři jsou isoformy Cu/ZnSOD (*CSD1*, *CSD2* a *CSD3*), dále pak tři isoformy FeSOD (*FSD1*, *FSD2* a *FSD3*) a jedna isoforma MnSOD (*MSD1*; Dvořák *et al.*, 2021b). Lokalizace jednotlivých SOD v buňce se různí a je závislá na požadavcích na odbourávání superoxidového radikálu.

Cu/ZnSOD je složena ze dvou podjednotek vázajících atomy Cu a Zn, což zvyšuje celkovou aktivitu a stabilitu enzymu (Lin *et al.*, 1995). Všechny tři isoformy se vyskytují v různých kompartmentech buňky. *CSD1* je cytosolická (Kliebenstein *et al.*, 1998), *CSD2* se nachází v chloroplastech (Kliebenstein *et al.*, 1998; Myouga *et al.*, 2008) a *CSD3* je pravděpodobně peroxisomální (Chu *et al.*, 2005). Pro jejich aktivitu a expresi je důležitá koncentrace mědi v prostředí (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Cu/ZnSOD chrání rostliny před fotooxidativním stresem (Xing *et al.*, 2013) a zvyšují jejich toleranci vůči nízkým teplotám (Che *et al.*, 2020). Mají také vliv na kvetení rostlin (Rizhsky *et al.*, 2003).

MnSOD je mitochondriálním zástupcem SOD u *A. thaliana* (Morgan *et al.*, 2008). Rostlinám propůjčuje zvýšenou toleranci vůči solnému stresu a stresu ze sucha (Wang *et al.*, 2005; 2007). Je také důležitá při růstu rostliny (Morgan *et al.*, 2008) a udržuje homeostázu ROS během embryogeneze (Martin *et al.*, 2013).

FeSOD se vyskytují u prokaryot a rostlin, ale ne u živočichů, což vede k názoru, že gen *FSD* pochází z genomu plastidů a až následně se přesunul do jaderného genomu v průběhu evoluce (Alscher *et al.*, 2002). Tato teorie je podporována přítomností několika konzervovaných sekvencí *FSD* v rostlinách a cyanobakteriích, jež se ovšem nenacházejí u nefotosyntetizujících bakterií (Bowler *et al.*, 1994).

FSD2 a FSD3 se vyskytují v chloroplastech rostlin, kde těsně přiléhají na stromální stranu tylakoidní membrány (Kliebenstein *et al.*, 1998; Myouga *et al.*, 2008). Obě tyto SOD spolu tvoří heterokomplex v nukleoidech chloroplastů a jsou zodpovědné za ochranu chloroplastů před oxidativním poškozením (Myouga *et al.*, 2008).

Protein FSD1 byl lokalizován v nadzemních i podzemních orgánech *A. thaliana*. Subcelulárně se FSD1 vyskytuje v plastidech, jádru a cytosolu, kde je lokalizovaná zejména v blízkosti plazmatické membrány (Kuo *et al.*, 2013; Myouga *et al.*, 2008; Dvořák *et al.*, 2021a). Lokalizace FSD1 je podobná i za podmínek etiolizace, i když intenzita FSD1 v cytosolu v blízkosti plazmatické membrány je větší oproti světlu vystaveným rostlinám (Dvořák *et al.*, 2021a). V jádře je lokalizace FSD1 difúzní, přičemž absentuje v jádérku (Dvořák *et al.*, 2021a).

Jednou z funkcí FSD1 je její vliv na vývoj rostliny. Účastní se růstu laterálních kořenů a klíčení (Dvořák *et al.* 2021a). Exprese *FSD1* během klíčení a brzkého vývoje klíčků *A. thaliana* se různí v závislosti na čase. Během prvních hodin klíčení dochází k maximální expresi v mikropylárním endospermu v oblasti budoucího místa proniknutí radikuly. S protržením endospermu a se vznikem rychle rostoucího primárního kořene dojde k utlumení exprese v mikropylárním endospermu a hlavním místem exprese se stává primární kořen, a to zejména v přechodové (angl. transition zone) a prodlužovací zóně, ovšem se snižující se expresí v diferenciační zóně zejména po vzniku kořenových vlásků. Ke zvýšení exprese následně dochází ve vznikajících kotyledonech, později v hypokotylu a s pokračujícím vývojem ve stonkovém apexu a v prvních pravých listech. Celkově pak dochází ke snížení exprese v oblastech prodlužování buněk, diferenciace a v oblastech vzniku kořenových vlásků (Dvořák *et al.*, 2021a).

V případě kořenů byl protein FSD1 lokalizován v buňkách kořenového apexu. Nachází se v buňkách laterální kořenové čepičky, v meristematických buňkách, buňkách prodlužovací (elongační) zóny primárního kořene, v trichoblastech v diferenciační zóně primárního kořene, v menší míře v buňkách kolumely a v primordiích laterálních kořenů. Zvýšená akumulace FSD1 byla pozorována v iniciálech kortexu a endodermu, přičemž v buňkách klidového centra exprese absentovala (Dvořák *et al.*, 2021a).

Při tvorbě kořenových vlásků se nejdříve FSD1 akumuluje v apikální a subapikální zóně kořenového vlásku a po ukončení prodlužování se FSD1 akumuluje v plastidech v kortikální vrstvě cytosolu. Ze všech organel to jsou právě plastidy, v nichž dochází k největší akumulaci FSD1, kdy celkové množství FSD1 v plastidech odpovídá zhruba polovině celkového množství FSD1 v buňce (Dvořák *et al.*, 2021a).

Hlavním faktorem ovlivňujícím expresi *FSD1* jsou přítomnost a koncentrace mědi v prostředí/médiu. Při nedostatku mědi se transkripční faktor (TF), zodpovědný za regulaci homeostázy (rovnovážného stavu) Cu^{2+} SPL7 (SQUAMOSA promotor vázající protein-like 7) přímo váže na *FSD1* promotor, čímž pozitivně reguluje expresi *FSD1* (Yamasaki *et al.*, 2009). Při nízkých koncentracích mědi v prostředí SPL7 také pozitivně reguluje expresi miRNA398, která negativně ovlivňuje expresi *CSD1* a *CSD2* (Cohu *et al.*, 2009). Při vysokých koncentracích mědi je exprese *CSD1* a *CSD2* regulována pozitivně, ovšem exprese *FSD1* je potlačena (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Mimo tento faktor expresi genů *FSD1* (a *SPL7*) regulují také cirkadiální a diurnální rytmy (Perea-García *et al.*, 2016).

Aktivita FSD1 je zprostředkována přímou interakcí s chloroplastovým co-chaperonem 20 (CPN20; Kuo *et al.*, 2013) a také pomocí MAPK (mitogenem aktivované proteinkinasy; Takáč *et al.*, 2014). CPN20 pomáhá chaperonu CPN60 při skládání proteinů v chloroplastech. CPN20 má tedy dvojí funkci kdy, mimo napomáhání při skládání proteinů, podstatně zprostředkovává aktivitu FSD1. Mimo tyto funkce CPN20 také pravděpodobně zasahuje do post-transkripční regulace *FSD1* (Kuo *et al.*, 2013).

FSD1 je známa především pro svou funkci chránit rostliny před oxidativním poškozením způsobeném ROS, konkrétně superoxidového radikálu (McKersie *et al.*, 2000; Camp *et al.*, 1990; Gallie *et al.*, 2019). Jelikož se FSD1 vyskytuje i v cytosolu, mohla by být jedním z proteinů odpovídajícím za detoxikaci superoxidu v cytosolu, a mohla by tak chránit buněčné kompartmenty před oxidativním poškozením způsobeném akumulací superoxidu v cytosolu (Dvořák *et al.*, 2021a). Plastidová FSD1 u *A. thaliana* je důležitá při obraně vůči ROS generovaných v chloroplastech. Tato funkce plastidové FSD1 byla potvrzena experimentem, kdy knock-out mutantní linie *fsd1* vykazovala při vystavení oxidativnímu stresu podstatně snížené množství chlorofylu a a chlorofylu b oproti divému typu a transgenním liniím (Dvořák *et al.*, 2021a).

Mimo antioxidační funkci během oxidativního stresu ale přibývá studií upozorňujících na další funkce, a to konkrétně na osmoprotektivní úlohu FSD1 při toleranci vůči solnému stresu. Úlohou FSD1 při vystavení solnému stresu je zvýšení tolerance rostliny

A. thaliana na tento stres, a to jak během klíčení rostliny, tak i celkově během života rostliny (Dvořák *et al.*, 2021b). Solný stres způsobuje prudkou produkci ROS (konkrétně superoxidu) NADPH-oxidasami (Leshem *et al.*, 2007). Akumulace takto produkovaných ROS musí být přísně kontrolována, aby nedošlo k oxidativnímu poškození způsobenému ROS (Dvořák *et al.*, 2021a). Během vystavení buněk hypertonickému prostředí (např. pomocí NaCl) dochází k jejich plazmolýze. FSD1 je během tohoto, mimo svou typickou lokalizaci (plastidy, cytosol, jádro), lokalizována v Hechtových řetězcích a Hechtově retikulu (Dvořák *et al.*, 2021a), které propojují smrštěné protoplasty s buněčnou stěnou plazmolyzovaných buněk. Akumulace ROS a lokalizace FSD1 na Hechtových řetězcích a Hechtově retikulu se shoduje u buněk, kde došlo k plazmolýze vlivem solného stresu, z čehož lze usoudit, že produkce a akumulace ROS v Hechtových řetězcích a Hechtově retikulu závisí na expresi FSD1 (Dvořák *et al.*, 2021a).

2.1.5.2 Další enzymy antioxidační obrany

Detoxifikaci peroxidu vodíku zajišťují CAT, APX a GPX. MDAR, DHAR a GR se podílejí na detoxifikaci peroxidu vodíku nepřímou, jelikož slouží k regeneraci ASC a GSH v rámci askorbát-gluthathinového cyklu (ASC-GSH; Obr. 2). CAT katalyzuje dismutaci peroxidu vodíku na H₂O a O₂ v peroxisomech (Mhamdi *et al.*, 2010).

CAT se nachází v peroxisomech, cytosolu a mitochondriích a má vysokou aktivitu, kdy je schopna přeměnit 6×10^6 molekul peroxidu vodíku na H₂O a O₂ za min⁻¹ (Mhamdi *et al.*, 2010). *A. thaliana* obsahuje tři CAT geny, *CAT1*, *CAT2* a *CAT3*, přičemž *CAT1* a *CAT3* jsou lokalizované na chromosomu 1 a *CAT2* je lokalizován na chromosomu 4 (Frugoli *et al.*, 1996). Aktivita CAT je důležitá pro toleranci rostlin během mnoha abiotických a biotických stresů, jako jsou solný a osmotický stres, stres z nízkých teplot (Vanderauwera *et al.*, 2005), rezistence vůči bakteriím (Chaouch *et al.*, 2010), fotooxidativní stres (Vandenabeele *et al.*, 2004) nebo stres z těžkých kovů (Corpas a Barroso, 2017). *CAT2* dohromady s *CAT1* a *CAT3* generují signál, který podporuje autofágní PCD během imunitní odpovědi rostliny (Hackenberg *et al.*, 2013). CAT mají významnou roli při senescenci, kde je jejich exprese regulována TF jako GBF1 (G-Box vázající faktor; Smykowski *et al.*, 2010) anebo WRKY53 a WRKY25 (Miao *et al.*, 2004; Doll *et al.*, 2020) a účastní se také procesů souvisejících s růstem primárního kořene (Yang *et al.*, 2019).

APX jsou součástí ASC-GSH cyklu. Jedná se o PRX obsahující hemovou skupinu. Redukují peroxid vodíku v cytosolu a chloroplastech na H₂O a dehydroaskorbát (DHA) pomocí ASC jakožto reduktantu (Obr. 2). V *A. thaliana* se nachází 9 APX genů, přičemž

jeden je pseudogen a jednomu chybí detoxikační aktivita peroxidu vodíku (Granlund *et al.*, 2009). Zbýlých sedm APX se odlišuje svou subcelulární lokalizací, kdy tři APX (APX1, APX2, APX6) jsou cytosolické, dále jsou dvě chloroplastové, jež se dělí na stromální (sAPX) a tylakoidní (tAPX), a dvě peroxisomální (APX3 a APX5; Maruta *et al.*, 2016). sAPX byly lokalizované i v mitochondriích (Chew *et al.*, 2003). APX mají především význam při odbourávání peroxidu vodíku produkovaného v chloroplastech. Studie potvrzují, že sAPX a tAPX jsou nezbytné pro odpověď rostlin při vystavení nadměrnému osvětlení (Kangasjärvi *et al.*, 2008), při zlepšení tolerance vůči solnému a osmotickému stresu (Sun *et al.*, 2010a; Li *et al.*, 2012) nebo při odolnosti vůči nízkým a vysokým teplotám (Sun *et al.*, 2010b). Je zajímavé, že exprese cytosolických isoform je důležitá pro stabilitu exprese chloroplastových isoform (Davletova *et al.*, 2005) a že cytosolické isoformy se významně podílejí na obranných reakcích rostlin vůči solnému stresu (Teixeira *et al.*, 2006), stresu z vysokých teplot a vůči patogenům (Park *et al.*, 2004), těžkým kovům (Vansuyt *et al.*, 1997) a vůči nadměrnému osvětlení (Fryer *et al.*, 2003). APX hrají roli během růstu, reprodukce a také zlepšují klíčení (Agrawal *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2010a).

GPX jsou enzymy neobsahující hemovou skupinu jakožto kofaktor detoxifikující peroxid vodíku. Místo toho obsahují Cys (Bela *et al.*, 2015). Genom *A. thaliana* obsahuje celkem 8 *GPX* genů, k jejichž expresi dochází v rozdílných buněčných kompartmentech (chloroplasty, cytosol, mitochondrie, jádro, plazmatická membrána, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum (ER), apoplast; Bela *et al.*, 2015). Hrají důležitou roli při biosyntéze ligninu a obraně proti biotickému stresu, a to použitím peroxidu vodíku při degradaci IAA (Djiana *et al.*, 1996; Morales a Barceló, 1997). Důležitá role GPX spočívá především v ochraně rostliny před solným stresem a stresem z mrazu (Paiva *et al.*, 2019; Janda *et al.*, 2003). Během vývoje rostliny jsou GPX důležitým kontrolorem architektury kořene a vývoje laterálních kořenů (Passaia *et al.*, 2014).

MDAR regeneruje askorbovou kyselinu z monodehydroaskorbátu pomocí NADPH jakožto reduktantu (Obr. 2; Foyer a Noctor, 2011). MDAR souvisí se zvýšenou odolností rostlin vůči ozónu, solnému a osmotickému stresu (Eltayeb *et al.*, 2007). Mimo svou účast v odolnosti vůči různým stresům figuruje MDAR také v procesech klíčení, vývoje klíčků a senescence (Eastmond, 2007). DHAR redukuje DHA na askorbovou kyselinu využitím redukovaného GSH jakožto donoru elektronů a ten je oxidován na glutathion disulfid (GSSG; Obr. 2). Je to thiolová skupina na DHAR, která se účastní katalyzované reakce (Dvořák *et al.*, 2021b). DHAR se účastní procesů souvisejících s ochranou rostlin proti

solnému a fotooxidativnímu stresu (Ushimaru *et al.*, 2006; Noshi *et al.*, 2017). GR využívá NADPH jako reduktantu k redukci GSSG na GSH, jenž je následně využit na regeneraci askorbové kyseliny (Obr. 2). GR chrání rostliny před fotooxidativním stresem a stresem z těžkých kovů (Müller-Schüssele *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2016). Účastní se i vývoje rostlin, a to konkrétně růstu kořenů a udržování kořenového apikálního meristému (RAM; Yu *et al.*, 2013). Tento ASC-GSH je odpovědný za udržování rovnováhy v hladinách peroxidu vodíku v buňce (Obr. 2).

Specifickou skupinou, která detoxikuje peroxid vodíku ve stroma chloroplastů, jsou Prxr (Asada, 2006). Prxr využívají katalytických mechanismů založených na thiolu k redukci peroxidu vodíku (Obr. 2; Dietz, 2011). Jejich regenerace může být následně katalyzována glutaredoxiny, thioredoxiny (Trx) a NADPH dependentní thioredoxinreduktasou C (Obr. 2; Dietz, 2011).

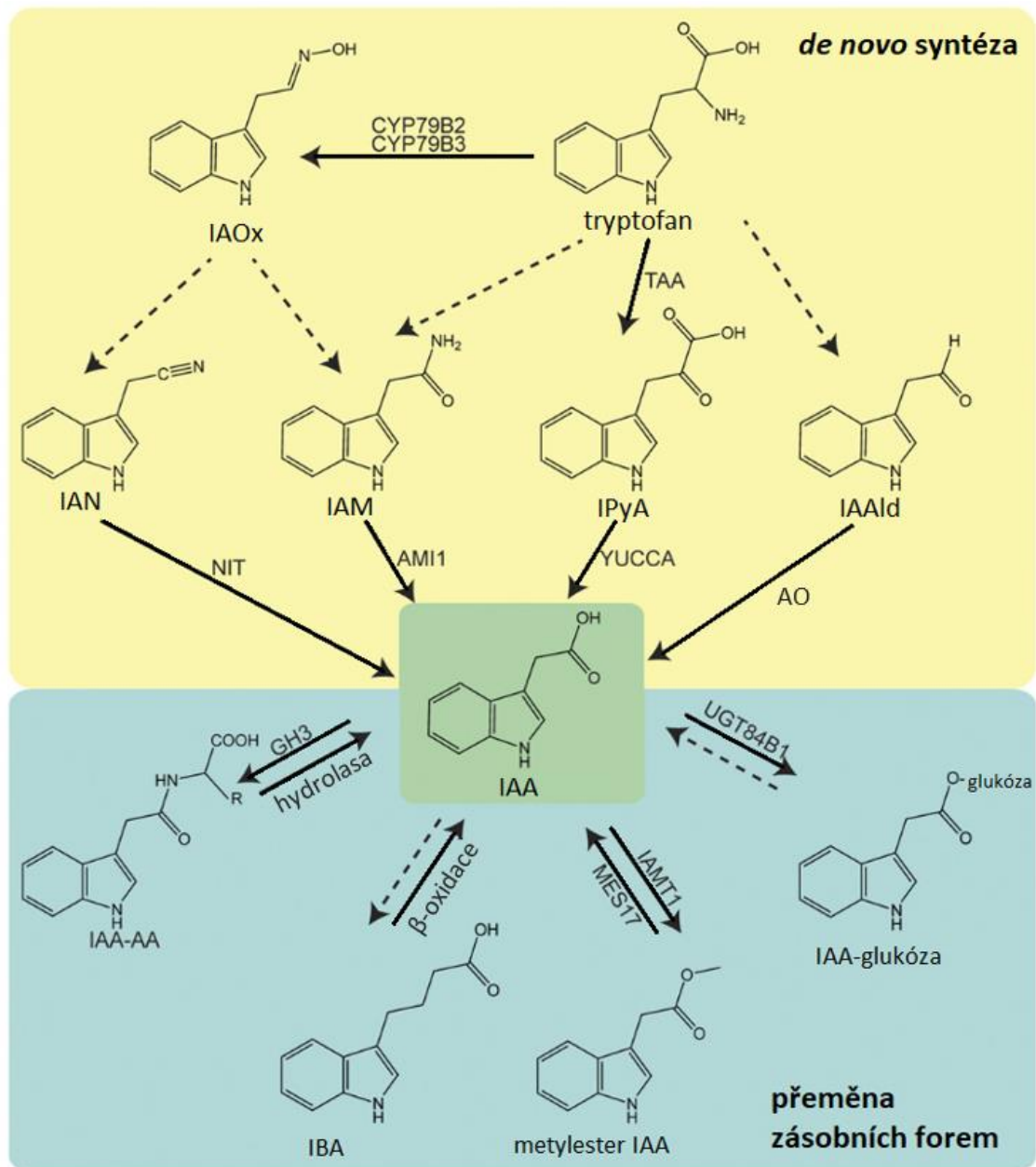
2.2 Auxin

Auxin je jedním z hlavních fytohormonů, jenž ovlivňuje řadu procesů, zejména ty, které souvisejí s růstem a vývojem rostlin. Zodpovídá za regulaci dělení, elongaci a diferenciaci buněk, dále reguluje tvorbu laterálních kořenů a kvetení rostlin (Davies, 2010; Zhao, 2018). Mezi auxiny spadá mnoho sloučenin, z nichž nejznámější, nejvýznamnější a v přírodě přirozeně se vyskytující formou auxinu je IAA. Mimo IAA existuje mnoho jiných forem auxinu, ať už přirozených, či syntetických, kdy z přirozených lze zmínit například kyselinu indol-3-máselnou (IBA) nebo kyselinu fenylactovou, ze syntetických například 2,4-dichlorofenoxyoctovou kyselinu (2,4-D) nebo kyselinu 1-naftyloctovou (NAA; Enders a Strader, 2015).

2.2.1 Metabolismus auxinu

Biosyntéza auxinu v rostlinách je komplexní a rostliny mají unikátní strategie pro její regulaci. K biosyntéze dochází v mladých pletivech, a to zejména v meristematických, ve špičkách primárního kořene, dále pak v listech, či apikálních meristémech (Tognetti *et al.*, 2012; Wang a Jiao, 2018). Převládající forma auxinu IAA, je syntetizována z indolových prekurzorů, a to buď prostřednictvím na tryptofanu závislé syntézy, či na tryptofanu nezávislými drahami (Zhao, 2018). Mezi nejvíce se vyskytující prekurzory patří kyselina indol-3-pyrohroznová (IPyA), indol-3-acetaldoxim (IAOx), indol-3-acetamid (IAM), indol-3-acetonitril (IAN) a indol-3-acetaldehyd (IAAld; Obr. 3).

Tryptofan-dependentní dráha, při které dochází k dvoukrokové přeměně tryptofanu na IAA, je považována za hlavní dráhu biosyntézy auxinu (Enders a Strader, 2015). Prvním



Obr. 3 Tvorba kyseliny IAA z indolových prekurzorů (*de novo* syntéza, tryptofan dependentní) a přeměna zásobních neaktivních forem IAA na aktivní formu. Plné čáry reprezentují reakce, u kterých jsou známy katalyzující enzymy, zatímco čárkované čáry reprezentují reakce, u nichž nebyly identifikovány žádné enzymy nebo je jejich objev ve fázích zkoumání. Zkratky: AMI1, amidasa 1; AO, aldehydoxidasa; IAA, kyselina indol-3-octová; IAA-AA, amidové konjugáty IAA; IAAlD, indol-3-acetaldehyd; IAM, indol-3-acetamid; IAN, indol-3-acetonitril; IAOx, indol-3-acetaldoxim; IBA, kyselina indol-3-máselná; IPyA, kyselina indol-3-pyrohroznová; NIT, nitrolasa; TAA, tryptofanaminotransferasa. Zdroj: (Enders a Strader, 2015).

krokem je přeměna tryptofanu na IPyA pomocí enzymu tryptofanaminotransferasa z *A. thaliana* (Stepanova *et al.*, 2008) a druhým krokem je přeměna IPyA na IAA pomocí tzv. YUCCA enzymů (Obr. 3; Stepanova *et al.*, 2011). Tryptofan je na IAOx přeměněn pomocí cytochrom P450 enzymů, což jsou monooxygenasy s označením CYP79B2

a CYP79B3 (Hull *et al.*, 2000). V závislosti na podmínkách je IAOx přeměněn v různé míře na IAA (Enders a Strader, 2015). Endogenní auxinový prekurzor IAM může vznikat přeměnou IAOx nebo i jiných prekurzorů (Sugawara *et al.*, 2009). Mechanismus přeměny IAOx na IAN a IAM zatím není znám a vyžaduje další studie. Je ovšem znám způsob přeměny IAN a IAM na IAA. Přeměna IAM na IAA je dosažena pomocí enzymu amidasa 1 (AMI1; Obr. 3; Pollmann *et al.*, 2003). IAA vzniká z IAN reakcí katalyzovanou nitrolasami (Obr. 3; Normanly *et al.*, 1997). IAALd je přeměňován na IAA pomocí aldehydoxidas (AO; Seo *et al.*, 1998).

Existence Trp-nezávislých drah biosyntézy IAA byla prokázána analýzou, kdy *trp* mutantní rostliny *A. thaliana* nevykazovaly žádné změny hladin volné IAA v porovnání s rostlinami divého typu (Normanly *et al.*, 1993). Cytosolická indolsyntasa je klíčovým enzymem drah Trp-nezávislé biosyntézy IAA, kdy takto generovaný auxin má nezastupitelnou roli během počátečních fází vývinu embrya (embryogeneze) u *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2015).

Mimo zmíněné dráhy může dojít k rychlé tvorbě IAA ze zásobních neaktivních IAA forem, mezi něž patří amidové konjugáty IAA (IAA-AA), metylester IAA (MeIAA) nebo IBA (Obr. 3; Korasick *et al.*, 2013). Konjugace auxinu je jedním z determinantů jeho homeostázy a spolu s oxidačními procesy negativně (inaktivací IAA) ovlivňuje stabilitu, transport a ukládání auxinu (Tognetti *et al.*, 2012; Casanova-Sáez *et al.*, 2021). Existují tři hlavní typy auxinových konjugátů: esterové typy (karboxylová skupina IAA je vázána na sacharidy např. glukózu), amidové typy (karboxylová skupina IAA tvoří amidovou vazbu s aminokyselinami či s polypeptidy) a MeIAA (Casanova-Sáez *et al.*, 2021). U *A. thaliana* patří většina extrahovatelných konjugátů ve vegetativních pletivech mezi amidové typy (Tam *et al.*, 2000). IAA-AA, konkrétně IAA-Leu a IAA-Ala, mohou být hydrolyzovány zpět na IAA aktivitou specifických hydrolas (Obr. 3; Korasick *et al.*, 2013). Zisk IAA z MeIAA je zapříčiněn díky aktivitě enzymu metylesterasa a dalším enzymům (Obr. 3; Yang *et al.*, 2008). IBA je β -oxidací přeměněna na IAA, ovšem mechanismus převedení IAA na IBA v rostlinách není znám, tudíž nelze přesně říct, zda je IBA prekurzorem, nebo zásobní formou IAA (Casanova-Sáez *et al.*, 2021). Mimo konjugaci mohou oxidativní modifikace také katabolizovat auxiny. Oxidativními modifikacemi se v tomto případě rozumí na peroxidáze závislá oxidace IAA, při níž nedochází k dekarboxylaci. Tyto modifikace ovlivňují indolový kruh i s jeho kruhovými řetězci, což vede k inaktivaci auxinu (Woodward a Bartel, 2005).

2.2.2 Transport auxinu

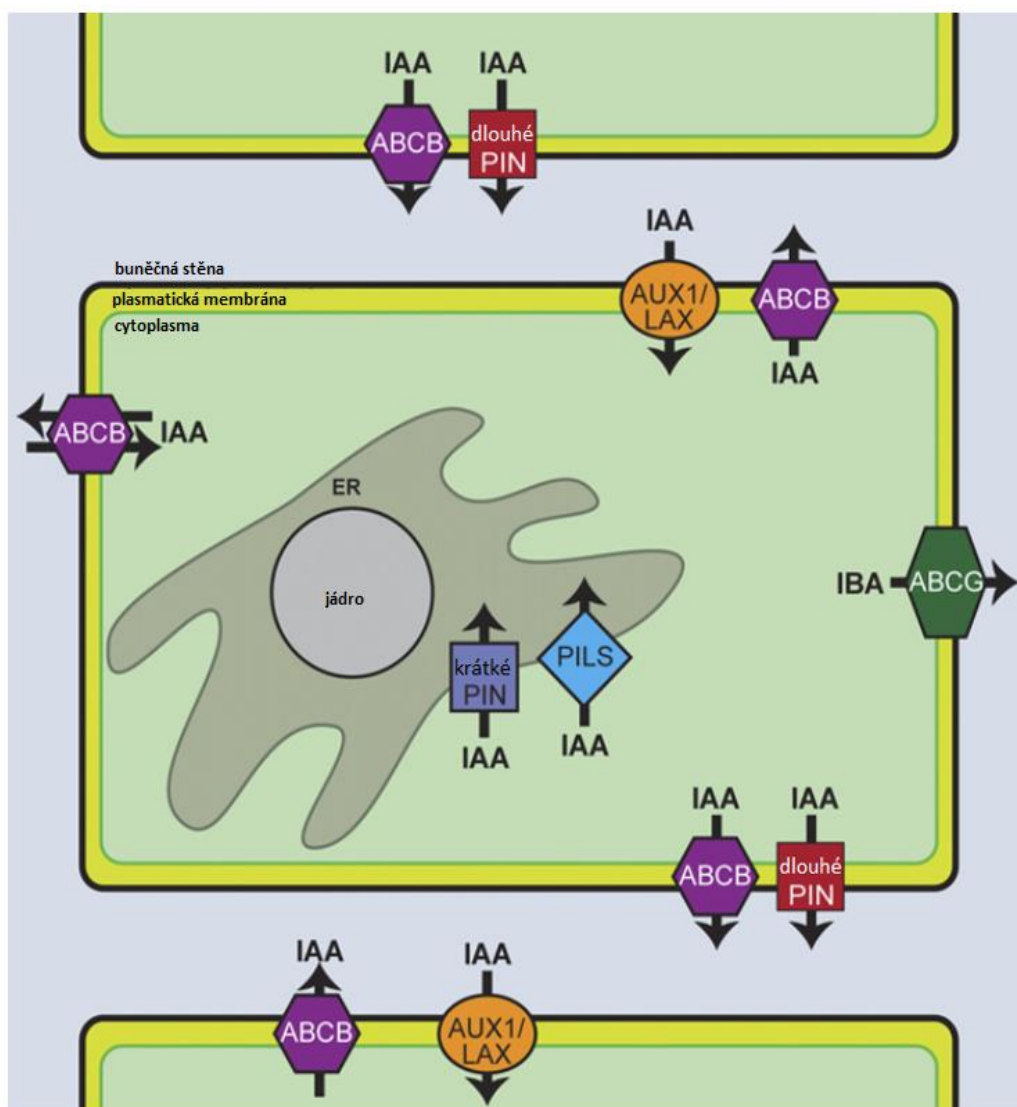
Transport auxinu je zajišťován jak aktivními, tak pasivními mechanismy. Auxin syntetizovaný ve zdrojových pletivech je distribuován na velkou vzdálenost pasivně prostřednictvím floému do kořenů, kořenových špiček a dalších pletiv. Druhou možností transportu je transport na krátkou vzdálenost mezi buňkami. Jedná se o aktivní transport, který je pomalejší ve srovnání s pasivním transportem a je zabezpečován polaritou buněk (Vanneste a Friml, 2009). Tento polární transport buněk zabezpečuje asimetrickou distribuci auxinu v pletivech, což vede k růstovým změnám (Zhao, 2018).

V rámci kořenové špičky se distribuce auxinu různí. Největší koncentrace auxinů je ve srovnání s okolním kořenovým pletivem v buňkách klidového centra (až 5x větší), v buňkách endodermis a v buňkách apikální části stély (2x větší). Naproti tomu v buňkách epidermis a v buňkách kolumely je celková hladina auxinů menší v porovnání s okolními pletivy (Pettersson *et al.*, 2009). Existuje specifické schéma transportu auxinu v kořeni nazvané obrácená fontána (Grieneisen *et al.*, 2007). Auxin je v tomto mechanismu transportován uvnitř stély směrem ke kořenové špičce, tam dojde k jeho redistribuci a následně je transportován směrem vzhůru (ke stonku) vnějšími vrstvami kořene (Grieneisen *et al.*, 2007).

2.2.2.1 Buněčný import a export auxinu

Za příjem a výdej auxinu buňkou zodpovídají různé přenašeče (transportéry). Příjem auxinu je zprostředkováván AUX1/LAX (AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1) přenašeči, které jsou lokalizované na plazmatické membráně a jsou specifické pro určité formy auxinu (Obr. 4; Kerr a Bennett, 2007). Výdej auxinu buňkou je možný díky pro rostlinu specifickým PIN proteinům (Plant-specific pin-formed; Gälweiler *et al.*, 1998), nebo díky ABCB transportnímu proteinu (ATP vázající kazetový transportér B; Obr. 4; Verrier *et al.*, 2008).

PIN proteiny jsou gradientem poháněné přenašeče auxinu ovlivňující PAT, jež se ovšem účastní i endomembránového transportu (Mravec *et al.*, 2009). Vyskytují se pouze u rostlin a u *A. thaliana* se nachází celkem osm isoformů těchto proteinů rozdělených na „krátké“ a „dlouhé“ PINy (Adamowski a Friml, 2015). Dlouhé PINy (PIN1-4, PIN7) jsou subcelulárně lokalizovány polárně na plazmatické membráně (Obr. 4) a jejich lokalizace v rámci pletiv se liší (Enders a Strader, 2015). Všechny dlouhé PINy transportují IAA, ovšem schopnost transportovat ostatní formy auxinu se výrazně liší mezi jednotlivými PINy (Enders a Strader, 2015). Je to právě polární lokalizace PIN proteinů na plazmatické membráně, která je důležitá pro polaritu buněk (Adamowski a Friml, 2015). Krátké PINy



Obr. 4 Transportní mechanismus auxinu z/do buňky. Auxin je do buněk transportován pomocí AUX1/LAX přenašečům nebo specifickými ABCB proteiny (ABCB4 a ABCB21) v závislosti na koncentraci cytoplazmatického volného auxinu. Pokud je koncentrace vysoká, ABCB4 a ABCB21 se „přepnou“ z importu na export auxinu z buňky. Mimo tyto specifické ABCB proteiny jsou za výdej auxinu buňkou odpovědné zbývající ABCB proteiny a „dlouhé“ PIN proteiny. Dlouhé Piny jsou lokalizované na apikální nebo bazální straně buňky v kořenech z důvodu udržování auxinového gradientu a ovlivňování PAT. V buňce může být auxin transportován z cytoplazmy do ER „krátkými“ PINy, nebo pomocí PILS proteinů. Tímto buňka reguluje hladiny volného auxinu v cytoplasmě. Na vnější laterální oblasti v epidermis se nacházejí ABCG proteiny, které transportují IAA ven z buněk. Zkratky: ABCB/G, ATP vázající kazetový transportér B/G; AUX1/LAX, AUXIN RESISTANT/LIKE AUX1 proteiny; ER, endoplazmatické retikulum; IAA, kyselina indol-3-máselná; IBA, kyselina indol-3-máselná; PILS, proteiny podobné PIN proteinům; PIN, Plant-specific pin-formed proteiny. Zdroj: (Enders a Strader, 2015).

(PIN5, PIN6, PIN8) a proteiny podobné PIN proteinům (PILS) transportují IAA a NAA z cytoplazmy do lumen ER (Obr. 4). Krátké PINy jsou lokalizované v membráně ER a fungují jako regulátory homeostázy volného auxinu v cytoplasmě (Mravec *et al.*, 2009;

Ding *et al.*, 2012; Simon *et al.*, 2016). PIN5 a PIN6 jsou podobné dlouhým PINům a mohou být lokalizované i na plazmatické membráně, z čehož lze usoudit, že tyto PINy mohou fungovat jako duální regulátory intra- a extracelulárního transportu auxinu (Ganguly *et al.*, 2014; Simon *et al.*, 2016).

ABCB transportní proteiny jsou další možné transportéry, které jsou využívány pro výdej auxinu buňkou (Obr. 4). Jedná se o aktivní transportéry, jež pro transport auxinu proti jeho gradientu využívají energii z hydrolyzy ATP, na rozdíl od PINů a AUX1/LAX, které transportují auxin po elektrochemickém gradientu (Geisler *et al.*, 2017). ABC transportéry se skládají ze dvou transmembránových domén zodpovědných za translokaci a dvou cytoplazmatických domén hydrolyzujících ATP (Liu *et al.*, 2017). U *A. thaliana* to jsou konkrétně ABCB1, ABCB4, ABCB19 a ABCB21 (Remy a Duque, 2014). I když jsou tyto proteiny zmíněné v souvislosti s výdejem auxinu buňkou, tak konkrétně ABCB4 a ABCB21 se mohou „přepnout“ a v závislosti na vnitřních koncentracích auxinu mohou buď exportovat auxin ven z buňky (při vysokých koncentracích), nebo importovat auxin do buňky (při nízkých koncentracích), což je pravděpodobně zapříčiněno rozdílnou strukturou ABCB4 a ABCB21 oproti ostatním ABCB (Kamimoto *et al.*, 2012; Kubeš *et al.*, 2012).

Mimo transport aktivních forem auxinu (např. IAA, 2,4-D, NAA) dochází u rostlin i k transportu endogenního auxinového prekurzoru IBA, která je transportována ABCG transportními proteiny (Obr. 4; Růžička *et al.*, 2010). Transport prekurzorů a zásobních forem auxinu je zatím málo prozkoumán a je předmětem budoucích studií.

2.2.2.2 Kyselina N-1-naftylftalamová

Jednou z vlastností auxinu je, že pro jeho hormonální funkci vyžaduje aktivní transport auxinu mezi buňkami a celkově i v rámci celé rostliny, v kontrolovaném směru (Abas *et al.*, 2021). Tento proces se označuje PAT. Schopnost vykonávat PAT je přisuzována aktivitě PIN proteinů poskytovat export auxinu (Petrášek *et al.*, 2006). Jak již bylo řečeno, PIN proteiny jsou lokalizovány polárně na plazmatické membráně a ve chvíli, kdy je polarita v buňce udržována v kombinaci s aktivitou PINů, dochází k proudu auxinu daným směrem (Wiśniewska *et al.*, 2006).

NPA je syntetický inhibitor PAT, který byl původně syntetizován jako herbicid a až později využit jakožto inhibitor PAT za účelem charakterizace jednotlivých mechanismů PAT, pohánějících růst a vývoj rostlin (Hertel *et al.*, 1983). Rostliny ošetřené NPA vykazují fenotyp podobný fenotypu mutantních rostlin *pin1* (Okada *et al.*, 1991). U rostlin *A. thaliana* došlo k ovlivnění květenství, kdy u 30 dní starých rostlin nedošlo

k formování květů a listy byly formované v opačné poloze na ose květenství (Okada *et al.*, 1991). NPA má také vliv na fenotyp kořene. Inhibuje prodlužování kořene a narušuje jeho gravitropismus (Fujita a Syono, 1996). Klíčení na médiu obsahujícím NPA vede k radiálnímu růstu kořene, což je způsobeno ektopickým dělením buněk a narušenou orientací dělení (Sabatini *et al.*, 1999). Mimo to také inhibuje tvorbu laterálních kořenů tím, že inhibicí PAT dochází k akumulaci auxinu v kořenovém apexu a jeho úbytku z pletiv iniciace laterálních kořenů (Casimiro *et al.*, 2001). Rostliny kukuřice ošetřené NPA měly silně nevyvinuté laterální kořeny, tento efekt přetrval i v případě, že po kultivaci na médiu s NPA byly rostliny přeneseny na médium bez NPA (Scanlon, 2003). Dále NPA způsobuje opožděné zakořenění u borovice (Greenwood *et al.* 2001) či způsobuje větší délku kořenových vlásků (Santelia *et al.*, 2005). NPA narušuje planární polaritu trichoblastů a tvorbu ektopických kořenových vlásků (Fischer *et al.*, 2007). Mimo NPA existují i další inhibitory PAT, a to 2,3,5-trijodobenzoová kyselina (TIBA) a morfactin (Katekar a Geissler, 1980; Thomson a Leopold, 1974). Inhibiční mechanismus NPA pravděpodobně spočívá v navázání NPA na specifické proteiny na plazmatické membráně (Michalke *et al.*, 1992; Muday *et al.*, 1993; Geisler *et al.*, 2016).

Přímá asociace NPA s PINy byla již prokázána na sobě nezávislými studiemi (Abas *et al.*, 2021; Teale *et al.*, 2021). Došlo ke zjištění, že oligomerace PINů je senzitivní na ošetření pomocí NPA. V prvním případě NPA stabilizovala PIN dimery (Teale *et al.*, 2021), v druhém případě NPA inhibovala jejich zesíťování do dimerů (Abas *et al.*, 2021). Z těchto vlivů lze usoudit, že vazba NPA vede k jejich konformačním změnám a že vazba NPA na PINy je pravděpodobně ovlivněna jejich oligomerizačním stavem (Tan, 2021).

NPA se mimo PINy váže i na ABC transportní proteiny (Di Pietro *et al.* 2002), TWD1 (TWISTED DWARF1) chaperon, který asociuje s ABCB1 a ABCB19 transportními proteiny na plazmatické membráně (Geisler *et al.*, 2004) a v poslední řadě se může NPA vázat na aminopeptidasu 1 (APM1; Murphy *et al.*, 2002). Z ABC proteinů to jsou ABCB1 a ABCB19, jež ukázaly vysokou afinitu k NPA (Geisler *et al.*, 2017). Přesný mechanismus, kterým TWD1 reguluje transport auxinu nebo biogenezi ABCB proteinů, není zatím znám (Hao *et al.*, 2020). NPA se nemůže stabilně vázat na komplex TWD1-ABCB, ovšem NPA zasahuje do regulace ABCB proteinů chaperonem TWD1, čímž ovlivňuje interakci mezi ABCB a TWD1. TWD1 se rovněž účastní transportu PINů závislém na aktinu, procesu senzitivnímu na NPA (Zhu *et al.*, 2016). Díky těmto znalostem byl vytvořen model, kdy TWD1 ovlivňující senzitivitu ABCB a PIN proteinů může fungovat jako modulátor PAT (Abas *et al.*, 2021). APM1 je významný regulátor

procesů růstu rostlin souvisejících s auxinem (Peer *et al.*, 2009). NPA se navzdory malé afinitě váže na APM1, ovšem tato interakce nijak nesouvisí s přímou regulací PAT (Peer *et al.*, 2009).

2.3 Reaktivní formy kyslíku a auxin

Během působení stresu dochází k adaptivním obměnám a abnormalitám růstu a vývoje rostlin. Takovéto změny označujeme jako stresem vyvolané morfogenetické reakce (SIMRs, stresem indukované morfogenetické odpovědi). SIMRs jsou součástí aklimatizační strategie, která zeslabí nebo zabráni škodlivým efektům vzniklým působením vnějších stresů (Potters *et al.*, 2007; 2009). Tyto obměny jsou ovlivněny řadou faktorů, mezi než patří homeostáza mezi ROS a fytohormony (Tognetti *et al.*, 2012). Příkladem SIMRs je inhibice elongace kořene nebo stimulace tvorby laterálních kořenů (Potters *et al.*, 2009).

S ohledem na morfogenetické změny během adaptace, ROS a auxin jsou hlavní regulátory, jelikož jsou oba silně ovlivněny během vystavení rostlin vnějšími podněty (Tognetti *et al.*, 2012). Auxiny hrají důležitou roli v hormonálních procesech ovlivněných stresem, kdy mohou regulovat homeostázu ROS nepřímo, či přímo pomocí ROS detoxikačních enzymů, jako jsou GSH S-transferasy, NADPH-oxidasy (RBOH) či apoplastické PRX (Laskowski *et al.*, 2002; Correa-Aragunde *et al.*, 2013; Mangano *et al.*, 2017).

ROS a auxin jsou součástí velkého komplexu hormonálních procesů, ve kterých kontrolují různorodé aspekty růstu a vývoje rostlin, jako jsou buněčný cyklus (Feher *et al.*, 2008), plasticita buněčné stěny (Teale *et al.*, 2006), adaptace na abiotický stres (Tognetti *et al.*, 2010), větvení stonku a doba kvetení (Tognetti *et al.*, 2010), PCD (Gechev *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2005), tvorba adventivních kořenů (Takáč *et al.*, 2016) a tvorba laterálních kořenů (Orman-Ligeza *et al.*, 2016).

2.3.1 Vliv ROS na auxin

Pasternak *et al.* (2005) zjistil, že při ošetření rostlin *A. thailana* dvěma látkami navozujícími oxidativní stres (alloxan a paraquat) dochází k fyziologickým změnám souvisejícím se změnou homeostázy auxinu. Mezi tyto změny patří rychlejší prolomení osemení, inhibice elongace kořene, růst klíčného listu a expanze pravých listů (Pasternak *et al.*, 2005). K podobným změnám dochází i při ošetření semen *A. thaliana* NPA (Tognetti *et al.*, 2012).

Jak již bylo řečeno, GR je součástí ASC-GSH cyklu, který je zodpovědný za udržování rovnováhy v hladinách peroxidu vodíku. GR zde redukuje GSSG na GSH. Toto je

důležité zejména u RAM, kdy se v buňkách klidového centra nachází silně oxidované prostředí z důvodu akumulace GSSG. Za správný vývoj RAM zodpovídá plastidová GR2. Akumulace GSSG snižuje expresi *PLETHORA 1 (PLT1)* a *PLT2* genů, TF ovlivňující *PIN* geny, což dokazuje nutnost GSH na signalizaci auxinu v RAM (Yu *et al.*, 2013). Z tohoto lze vyvodit, že celkové množství peroxidu vodíku ovlivňuje signalizaci auxinu pomocí GSH.

S RAM souvisí i jiný mechanismus vlivu ROS na auxin. Kyselina abscisová (ABA) indukuje tvorbu ROS v mitochondriích. Tyto ROS zprostředkovávají retrogradní signál, jenž v jádře redukuje expresi *PLT* genů vedoucí ke snížení akumulace a signalizace auxinu, což se projeví regulací RAM. Důvodem snížení akumulace a signalizace auxinu by mohla být přeměna aktivní formy auxinu (IAA) na oxidovanou formu s malou auxinovou aktivitou (IAOx). Zvýšená akumulace ROS by mohla tuto přeměnu stimulovat (Yang *et al.*, 2014).

Peroxid vodíku může ovlivnit PAT a redistribuci auxinu, a tak regulovat architekturu kořenového systému. Po ošetření rostlin *A. thaliana* peroxidem vodíku došlo ke změně auxinové odpovědi a k redistribuci auxinu ve špičkách laterálních kořenů a v primordiích laterálních kořenů. K redistribuci došlo pozměněním exprese *AUX1/LAX* a *PIN* genů zodpovědných za PAT (Su *et al.*, 2016). Z tohoto důvodu je peroxid vodíku důležitým regulátorem PAT a architektury kořenového systému.

2.3.2 Vliv auxinu na ROS

Stejně jak ROS ovlivňují homeostázu, signalizaci, akumulaci či redistribuci auxinu, tak i auxin může ovlivňovat ROS. Například auxin může indukovat tvorbu ROS. Při auxinem indukovaném vzniku laterálních kořenů auxin indukuje expresi *RBOH* genů, čímž dojde k tvorbě peroxidu vodíku (Orman-Ligeza *et al.*, 2016). RBOHD a RBOHE katalyzují produkci superoxidu, který funguje jako donor pro SOD produkující peroxid vodíku (Sagi a Fluhr, 2006). Tato produkce peroxidu vodíku podporuje vývoj laterálních kořenů tím, že peroxid vodíku podporuje vznik modifikací buněčné stěny (Orman-Ligeza *et al.*, 2016).

Další možností, jak může auxin regulovat tvorbu ROS, je pomocí ARFs (faktory auxinové odpovědi; Mangano *et al.*, 2017). ARFs jsou TF regulující expresi genů auxinové odpovědi a jsou aktivovány auxinem (Guilfoyle a Hagen, 2007). Ty mohou transkripčně regulovat (aktivovat) *RSL4 (ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE 4)* geny (Mangano *et al.*, 2017). RSL4 je TF kontrolující homeostázu ROS během růstu polárních

kořenových vlásků regulací exprese *RBOH* genů (konkrétně *RBOHC*, *RBOHH*, *RBOHJ*) a genů pro apoplastické PRX (Mangano *et al.*, 2017).

APX1 je schopna udržovat redoxní homeostázu, přičemž aktivita APX1 může být negativně regulovaná auxinem. Mechanismus regulace APX1 auxinem spočívá v denitrosylaci APX1. Auxin indukuje denitrosylaci pomocí Trx systému, čímž částečně inaktivuje APX1. Inaktivací APX1 dojde k navýšení hladiny peroxidu vodíku, jelikož cytosolická APX1 je enzym degradující peroxid vodíku (Correa-Aragunde *et al.*, 2013).

Auxin může ovlivňovat ROS svojí signalizací, a to vazbou auxinu na auxinové receptory TIR1/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX), kdy touto vazbou dojde k cílené ubiquitinizaci a degradaci Aux/IAA proteinů (Dharmasiri *et al.*, 2005). Tato degradace napomáhá aktivaci ARFs a následné expresi na auxin reagujících genů (Hagen a Guilfoyle, 2002). Auxin takto způsobuje snížení hladin ROS (peroxidu vodíku) indukci antioxidantního metabolismu (Iglesias *et al.*, 2010).

Auxin může ovlivňovat ROS i nepřímo. V kořenech *A. thaliana* auxin zlepšuje degradaci DELLA proteinů (Fu a Harberd, 2003). DELLA proteiny zvyšují expresi genů kódujících enzymy detoxikující ROS (SOD, konkrétně *CSD1* a *CSD2*), čímž přispívají k toleranci vůči solnému stresu (Achard *et al.*, 2008).

Dalším bodem propojení mezi ROS a auxinem jsou Rho GTPasy u *A. thaliana*, což je rozmanitá rodina monomerních GTP vázajících proteinů (Tognetti *et al.*, 2012). Jedna podtřída těchto genů, kódovaná *RAC/ROP* geny, reguluje rozmanité procesy, jako jsou hormonální a stresové odpovědi, růst, vývoj, reprodukce a Ca²⁺ signalizace (Duan *et al.*, 2010). *RAC/ROP* proteiny jsou aktivovány auxinem a interagují s NADPH-oxidasami, které produkují ROS v apoplastech (Duan *et al.*, 2010).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály

3.1.1 Biologický materiál

Jako rostlinný materiál byly použity rostliny *A. thaliana* L. Heynh (Huseniček rolní) ekotyp Col-0 (divý typ) a dvě T-DNA inzerční mutantní linie *fsd1-1* a *fsd1-2*. Linie *fsd1-1* pochází z kolekce SALK (SALK_029455) a linie *fsd1-2* pochází z kolekce GABI (GABI_740E11; Dvořák *et al.* 2021).

3.1.2 Chemikálie

Název chemikálie	Dodavatel
dimetylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Sigma-Aldrich
gellan gum	Alfa-Aesar
hydroxid draselný	Sigma-Aldrich
kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová (MES)	Sigma-Aldrich
kyselina N-1-naftylftalamová (NPA)	Sigma-Aldrich
M0221 Murashige a Skoog médium bez vitamínů	Duchefa
sacharosa	Sigma-Aldrich

3.1.3 Přístroje

Název přístroje	Dodavatel
analytické váhy (XA 110/2X)	Radwag
flowbox	Merci
fytotron	Weiss Technik
Imagescanner III	GE Healthcare
pH elektroda (PC 2700)	Eutech Instruments
zoomovací stereo mikroskop (Axio Zoom.V16)	Carl Zeiss

3.2 Metody

3.2.1 Příprava rostlinného materiálu

Semena *A. thaliana* divého typu a mutantních linií byla asepticky vysterilizovaná v boxu s cirkulovaným vzduchem. V prvním kroku byla semena promývána v roztoku 70% (v/v) ethanolu po dobu pěti minut. V druhém kroku byla semena přemístěna do roztoku 96% (v/v) ethanolu a zde promývána po dobu tří minut. Po uplynutí tří minut byla semena promyta 5x sterilní destilovanou vodou.

Tabulka 1 Složení ½ MS média

Složení	Množství látky na 1 l média
sacharosa	10 g
MS soli	2,15 g
MES	1 g
gellan gum	6 g

Po promytí se semena přemístila na suchý filtrační papír umístěný v Petriho misce a ponechána ve sterilním boxu pro vysušení.

Po vyschnutí byla semena přemístěna na sterilní ½ MS médium (složení Tab. 1, pH = 5,8) ve čtvercové Petriho misce. Na jednu Petriho misku bylo nanášeno pomocí sterilního párátko celkem 30 semen divého typu do jedné řady a po 30 semenech od každé mutantní linie do dvou řad. Horní řada byla umístěna zhruba 1 cm od horního okraje. Jednotlivé řady byly od sebe odsazeny zhruba 2-3 cm. Petriho misky se semeny byly umístěny do lednice za účelem stratifikace přes noc při 4 °C. Následně byla Petriho miska přemístěna z lednice do fytotronu (Weiss Technik), kde byla kultivována vertikálně po dobu 4 dní při 21 °C, 70% vlhkosti a fotoperiodě 16/8h (světlo/tma) s intenzitou světla 150 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Po čtyřdenní kultivaci byly klíčky přeneseny na kontrolní ½ MS médium s přídavkem 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NPA rozpuštěné v DMSO. Pro kontrolní ovlivnění byly rostliny simultánně kultivovány na médiu s přídavkem sterilního DMSO v koncentraci zodpovídající množství v NPA médiu (0,0001% v/v). Petriho misky obsahující kontrolní médium a médium s NPA byly podélně rozděleny na tři segmenty. Jednotlivé segmenty byly určeny pro jednotlivé linie. Po přenesení byly Petriho misky ze spodu zakryty černými fóliemi, aby se omezil přístup světla na kořeny. Černé fólie zasahovaly do výšky báze primárního kořene klíčků.

Takto byly následně klíčky kultivovány po dobu 10 dní ve fytotronu (Weiss Technik) při 21 °C, 70% vlhkosti a fotoperiodě 16/8h (světlo/tma) s intenzitou světla 150 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.2.2 Fenotypová analýza rostlin *A. thaliana*

Rostliny *A. thaliana* byly od přenesení na kontrolní médium a na médium obsahující NPA dokumentovány denně pomocí skeneru Image Scanner III (GE Healthcare) po dobu deseti dní (od 4. dne do 14. dne). Cílem bylo zaznamenat denní přírůstek primárního kořene na jednotlivých médiích. Čtrnáctý den byly rostliny zdokumentovány pomocí zoomovacího stereomikroskopu ZEISS Axio Zoom.V16 (Carl ZEISS). Cílem byla dokumentace kořenových vlásků jednotlivých čtrnáct dní starých rostlin.

Na linii bylo měřeno 54 rostlin ve třech biologických replikách, po 18 rostlinách na repliku. Z každé repliky byla polovina rostlin kultivována na kontrolním médiu a polovina na médiu s NPA. U rostlin byla měřena délka primárních kořenů, počet a délka kořenových vlásků (25 vlásků na rostlinu) a vzdálenosti apexu primárního kořene od prvního kořenového vlásku byly změřeny pomocí softwaru ImageJ. Délka kořenových vlásků byla měřena u kořenových vlásků v oblasti 5 mm od kořenové apexu. Nasbíraná data byla následně analyzována a vyhodnocena s využitím jednofaktorového ANOVA (Analysis Of Variance) testu s Tukey HSD testem. Získaná data byla následně zpracována v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation) do formy grafů. Obrázky byly upraveny pomocí programu ZEN 3.3 Blue edition (Carl ZEISS), dále pomocí programu Microsoft PowerPoint (Microsoft Corporation) nebo pomocí programu Adobe Photoshop (Adobe Systems).

4 VÝSLEDKY

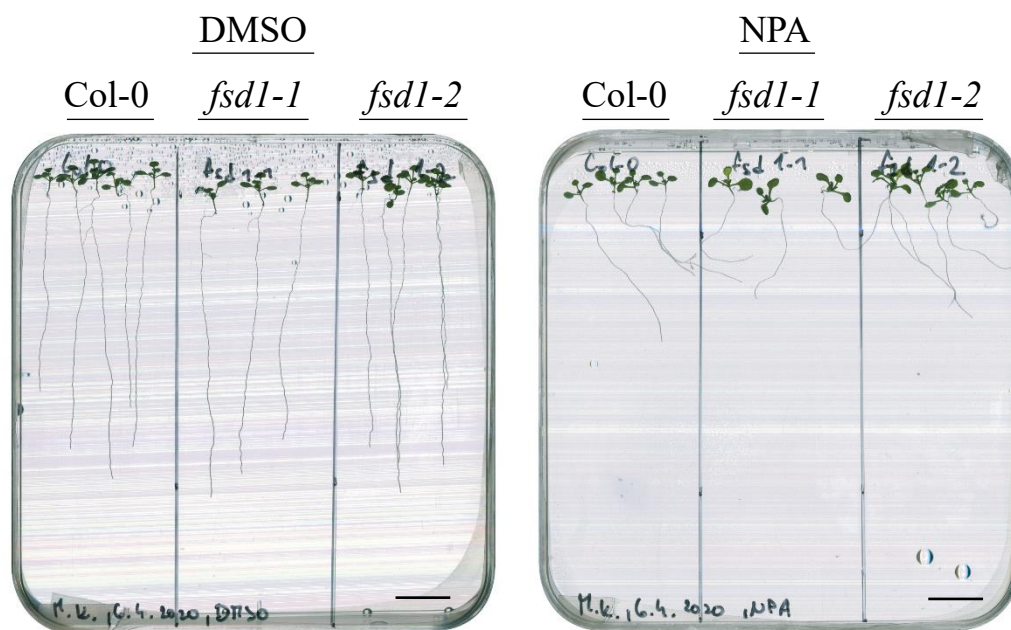
4.1 Fenotypová analýza rostlin divého typu a mutantů *fsd1* v odpovědi na NPA

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo zjistit projev fenotypu kořenů rostlin divého typu a mutantních linií *fsd1* při modulaci PAT. K modulaci PAT byl využit syntetický inhibitor NPA.

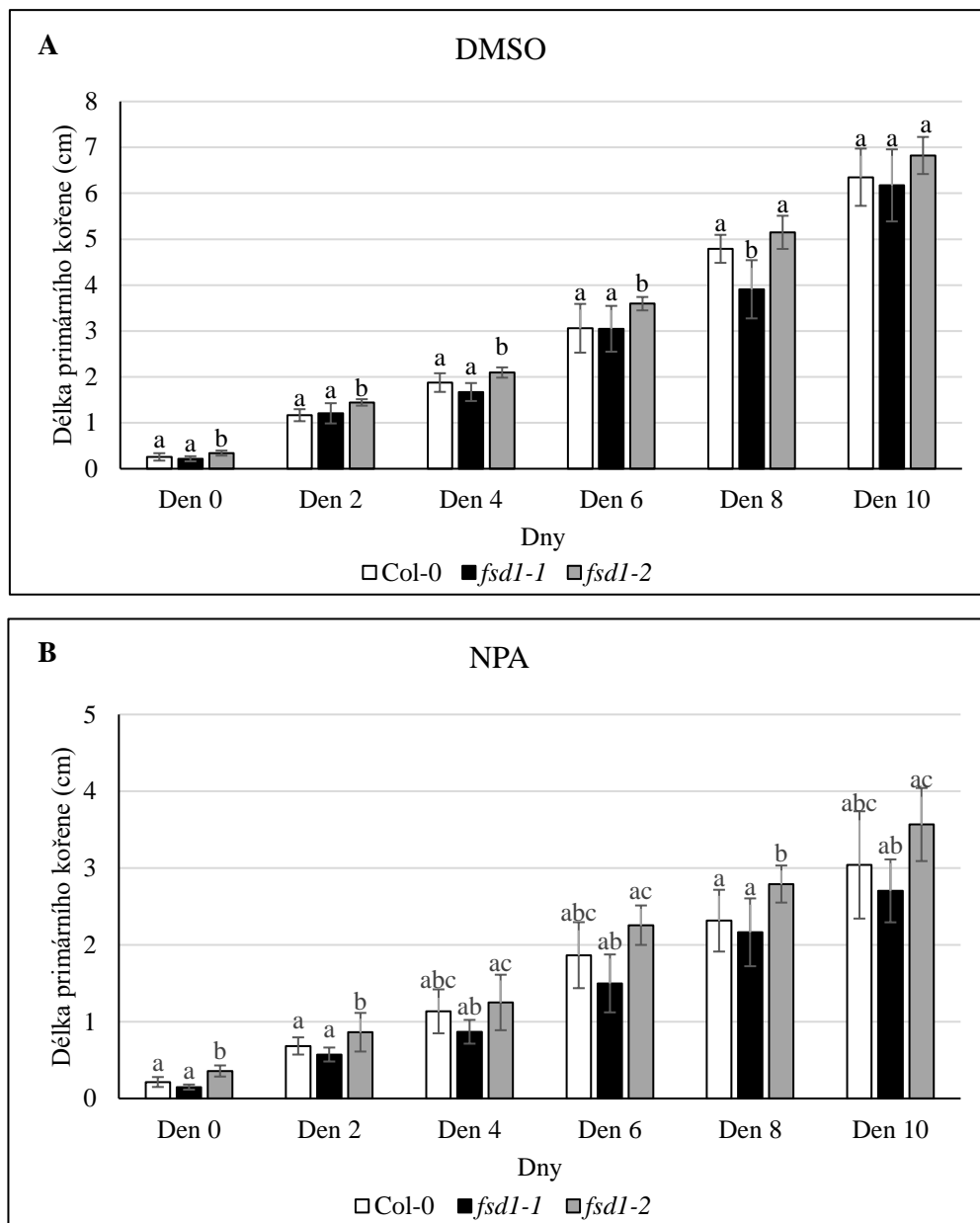
4.1.1 Délka primárního kořene

Prvním pozorovaným projevem fenotypu při modulaci PAT byla délka primárního kořene. Délky primárních kořenů se lišily, a to jak v závislosti na kultivačních podmínkách, tak i v závislosti na genotypu. Obecně lze říct, že rostliny kultivované na médiu s NPA měly kratší primární kořeny oproti rostlinám kultivovaným na kontrolním médiu (Obr. 5). Rozdíl byl velmi dobře viditelný u 14 dní starých rostlin (Obr. 5). Z obrázku je také viditelný negativní vliv NPA na gravitopismus, přičemž nebyly pozorovány rozdíly mezi divým typem a mutantními rostlinami (Obr. 5).

Délka primárních kořenů byla měřena pomocí programu ImageJ a statistická analýza byla provedena pomocí jednofaktorové ANOVA analýzy při hladině významnosti 0,05 pro porovnání genotypů. Při kultivaci na kontrolním médiu se ukázalo, že délka kořenů mutantní linie *fsd1-1* se nelišila od délky kořenů divého typu s výjimkou 8. dne, kdy byly kořeny *fsd1-1* mutanta mírně kratší (Obr. 6A).



Obr. 5 Fotodokumentace rostlin *A. thaliana* Col-0 (divý typ), a tDNA inserčních mutantů *fsd1-1* a *fsd1-2* po deseti dnech kultivace na kontrolním médiu (DMSO) a na médiu s přídatkem kyseliny N-1-naftylftalamové (NPA). Měřítka = 1 cm.



Obr. 6 Délky primárních kořenů rostlin *A. thaliana* divého typu Col-0 a mutantních linií *fsd1-1* a *fsd1-2* přenesených na kontrolní médium (A) a na médium s přidavkem kyseliny N-1-naftylftalamové (NPA) (B). Den 0 je den ve kterém byly rostliny přeneseny. Chybové úsečky představují standardní odchylky. Statistická analýza provedena jednofaktorovou ANOVA analýzou při $p = 0,05$; $n = 9$. Statisticky byly porovnány linie (Col-0, *fsd1-1*, *fsd1-2*) v jednotlivé dny. Písmena a, b, c znázorňují

Mutant *fsd1-2* vykazuje průkazně delší primární kořeny v porovnání s divým typem a linií *fsd1-1* (Obr. 6). Toto platilo do 6. dne kultivace. Rozdíly mezi mutanty a divým typem byly podobné také po ovlivnění NPA. Zatím co délka kořene u mutantu *fsd1-1* byla mírně kratší (bez statistické průkaznosti), mutant *fsd1-2* měl (statisticky neprůkazně) mírně delší primární kořeny v porovnání s divým typem (Obr. 6B). Byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi linií *fsd1-1* a linií *fsd1-2* po celou dobu kultivace na

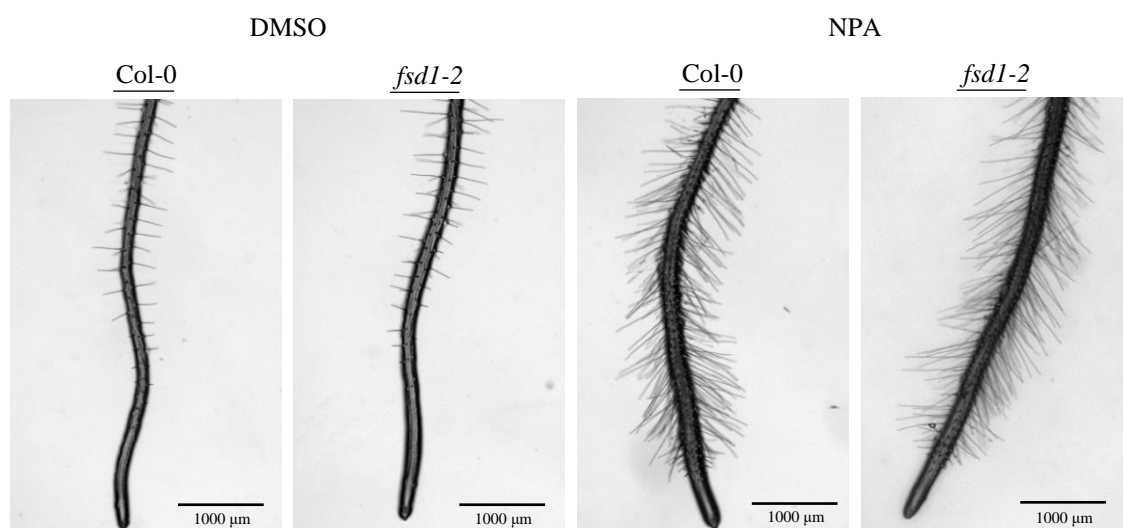
NPA médiu, kdy linie *fsd1-2* měla delší primární kořeny, a to průměrně o 34 % (Obr 6B). Míra inhibice růstu primárního kořene vlivem NPA se u divého typu pohybovala průměrně okolo 40,1 %, u *fsd1-1* okolo 47,4 % a u *fsd1-2* okolo 34,4 %.

Z těchto výsledků je patrný negativní vliv NPA na růst primárního kořene rostlin. Zároveň můžeme usoudit, že FSD1 nemá vliv na odpověď rostlin *A. thaliana* na NPA z hlediska délky primárních kořenů a gravitropismu.

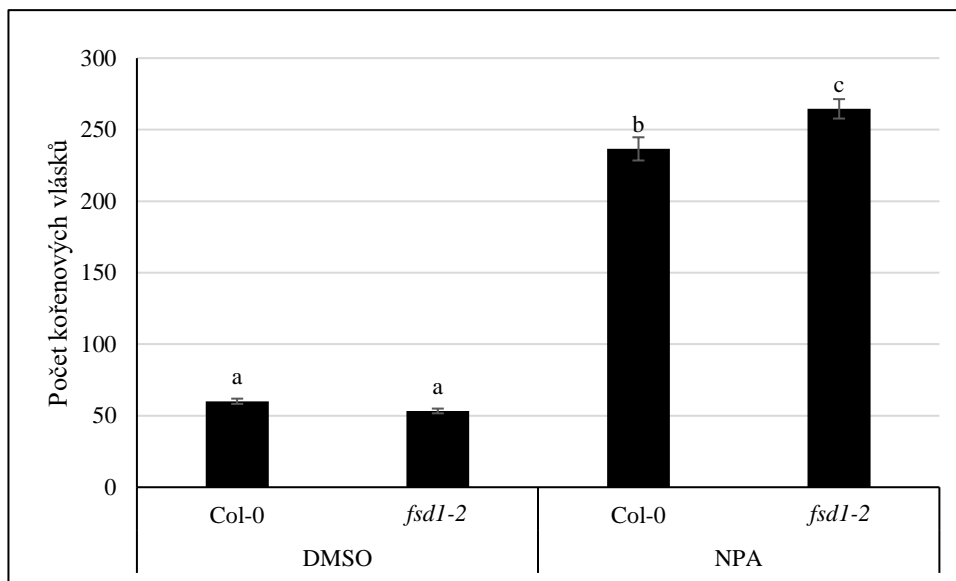
4.1.2 Počet a délka kořenových vlásků

Dalším pozorovaným znakem byl fenotyp kořenových vlásků. Zjistili jsme změny v počtu a délce kořenových vlásků u rostlin divého typu a mutantní linie *fsd1-2* po deseti dnech kultivace na kontrolním médiu a na médiu s NPA (Obr. 7). Rostliny kultivované na kontrolním médiu měly o 74,5 % v případě divého typu a o 80 % v případě linie *fsd1-2* méně kořenových vlásků oproti rostlinám kultivovaným na médiu s NPA (Obr. 8).

Počet kořenových vlásků jednotlivých linií kultivovaných na kontrolním médiu se významně nelišil, zatímco u rostlin kultivovaných na médiu obsahujícím NPA byl počet kořenových vlásků u mutantu průměrně o 10,5 % větší oproti divému typu. Toto prokázala i statistická analýza, kdy signifikantní rozdíl byl zjištěn jen při porovnání divého typu a linie *fsd1-2* na NPA médiu (Obr. 8). Do počtu jsou zahrnuty kořenné vlásky do vzdálenosti 5 mm od apexu primárního kořene. Tento znak poukazuje na fakt, že NPA stimuluje zakládání kořenových vlásků a zároveň FSD1 může tento jev do určité míry ovlivňovat.



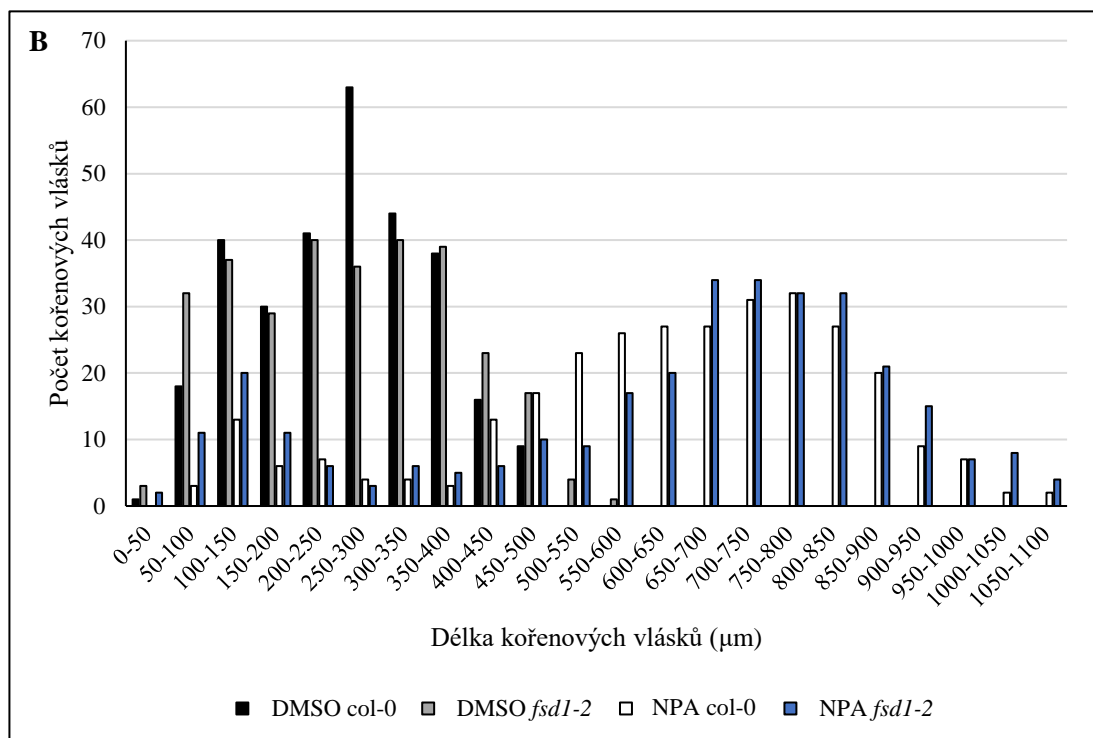
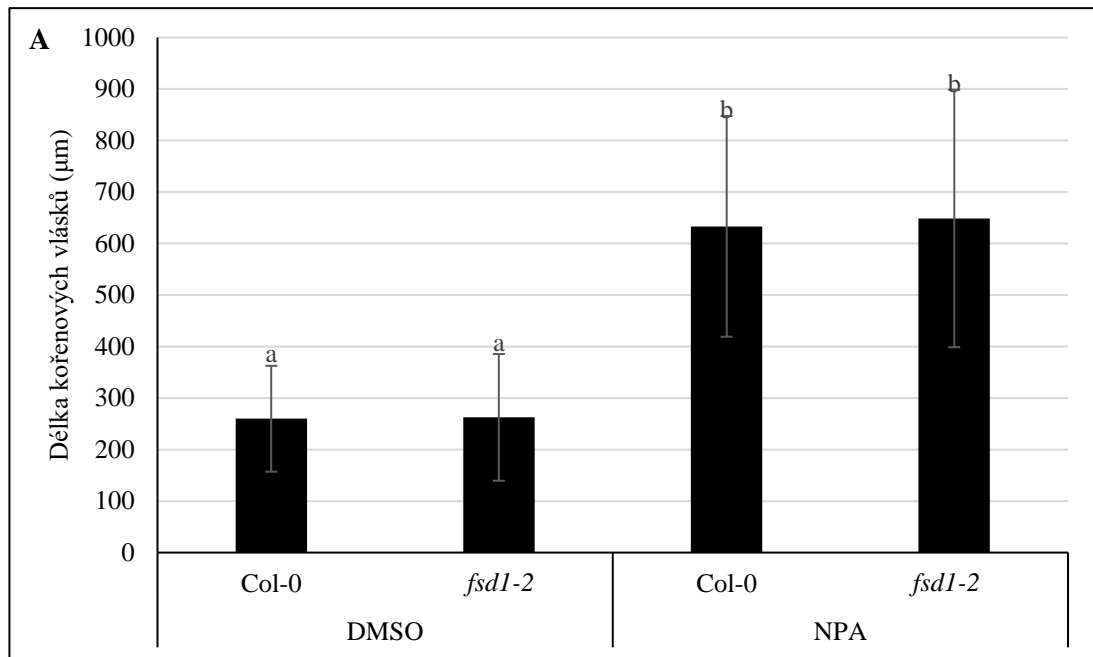
Obr. 7 Snímky primárních kořenů rostlin *A. thaliana* divého typu Col-0 a mutantní linie *fsd1-2* deset dní po přenesení na kontrolní médium (DMSO) a na médium s přidavkem kyseliny N-1-naftylftalamové (NPA). Snímky byly pořízené pomocí zoomovacího stereo mikroskopu. Měřítka = 1000 μm .



Obr. 8 Počet kořenových vlásků rostliny *A. thaliana* divého typu Col-0 a mutantní linie *fsd1-2* deset dní po přenesení na kontrolní médium (DMSO) a na médium s přidavkem kyseliny N-1-naftylftalamové (NPA). Kořenové vlásky byly počítány do vzdálenosti 5 mm od apexu primárního kořene. Chybové úsečky představují standardní odchylky; n = 9. Statistická analýza provedena jednofaktorovou ANOVA analýzou při p = 0,05. Písmena a, b, c znázorňují signifikantní rozdíly.

Délky kořenových vlásků byly odlišné v závislosti na přítomnosti NPA (Obr. 9A). Délka kořenových vlásků byla měřena po 10 dnech od přenesení na kontrolní a NPA médium. NPA způsobilo výrazné prodloužení kořenových vlásků u obou linií (Col-0 a *fsd1-2*; Obr. 9A). Rozdíly mezi rostlinami divého typu a mutantem nebyly zjištěny. Statistická analýza prokázala statisticky významné rozdíly mezi délkami kořenových vlásků rostlin kultivovaných na kontrolním médiu a rostlinami kultivovanými na médiu obsahujícím NPA, kdy rostliny kultivované na NPA médiu měly průměrně o 59 % v případě divého typu a o 59,5 % v případě linie *fsd1-2* delší kořenové vlásky (Obr. 9A).

Pro detailnější porovnání jsme vyhodnotili početnost kořenových vlásků v různých intervalech jejich délky (Obr. 9B). Rostliny kultivované na kontrolním médiu mají více kořenových vlásků o délkách do 500 μm , zatímco rostliny rostoucí na médiu s NPA mají více kořenových vlásků o délkách nad 500 μm (Obr. 9B). Dále je i pozorovatelný vliv genotypu. Mutant *fsd1-2* má v kontrolních podmínkách rychlejší prodlužování v ranných stádiích růstu kořenových vlásků (Obr. 9B), přičemž ale délka dospělých kořenových vlásků nedosáhne velikosti divého typu. Prodlužování kořenových vlásků je naopak



Obr. 9 Délky kořenových vlásků rostlin *A. thaliana* divého typu Col-0 a mutantní linie *fsd1-2* deset dní po přenesení na kontrolní médium (DMSO) a na médium s přidávkou kyseliny N-1-naftylftalamové (NPA). Délka všech kořenových vlásků (A) a počet kořenových vlásků v jednotlivých intervalech délky (B). Chybové úsečky představují standardní odchylky; n = 225. Statistická analýza provedena jednofaktorovým ANOVA testem při p = 0.05. Písmena a, b znázorňují signifikantní rozdíly.

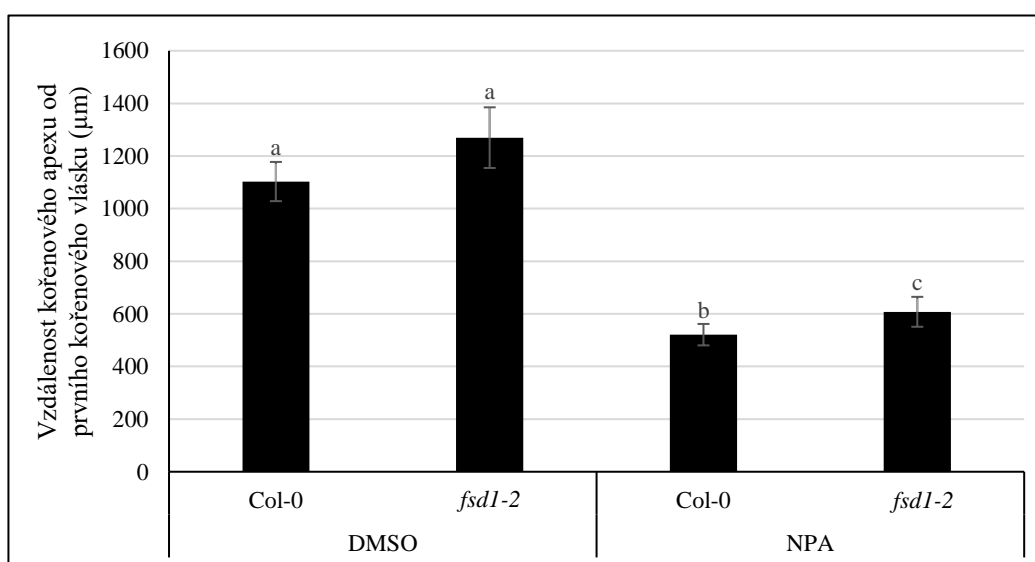
v podmínkách NPA rychlejší u divého typu (intervaly mezi 400-650 nm), ale maximální délky jsou u obou linií podobné (Obr. 9B).

Z těchto výsledků lze vyvodit pozitivní vliv NPA na iniciaci a elongaci kořenových vlásků. FSD1 má zrychlující efekt na elongaci kořenových vlásků v kontrolních podmínkách. Zdá se však, že *fsd1-2* mutant pomaleji odpovídá na vliv NPA, což indikuje zapojení FSD1 do PAT.

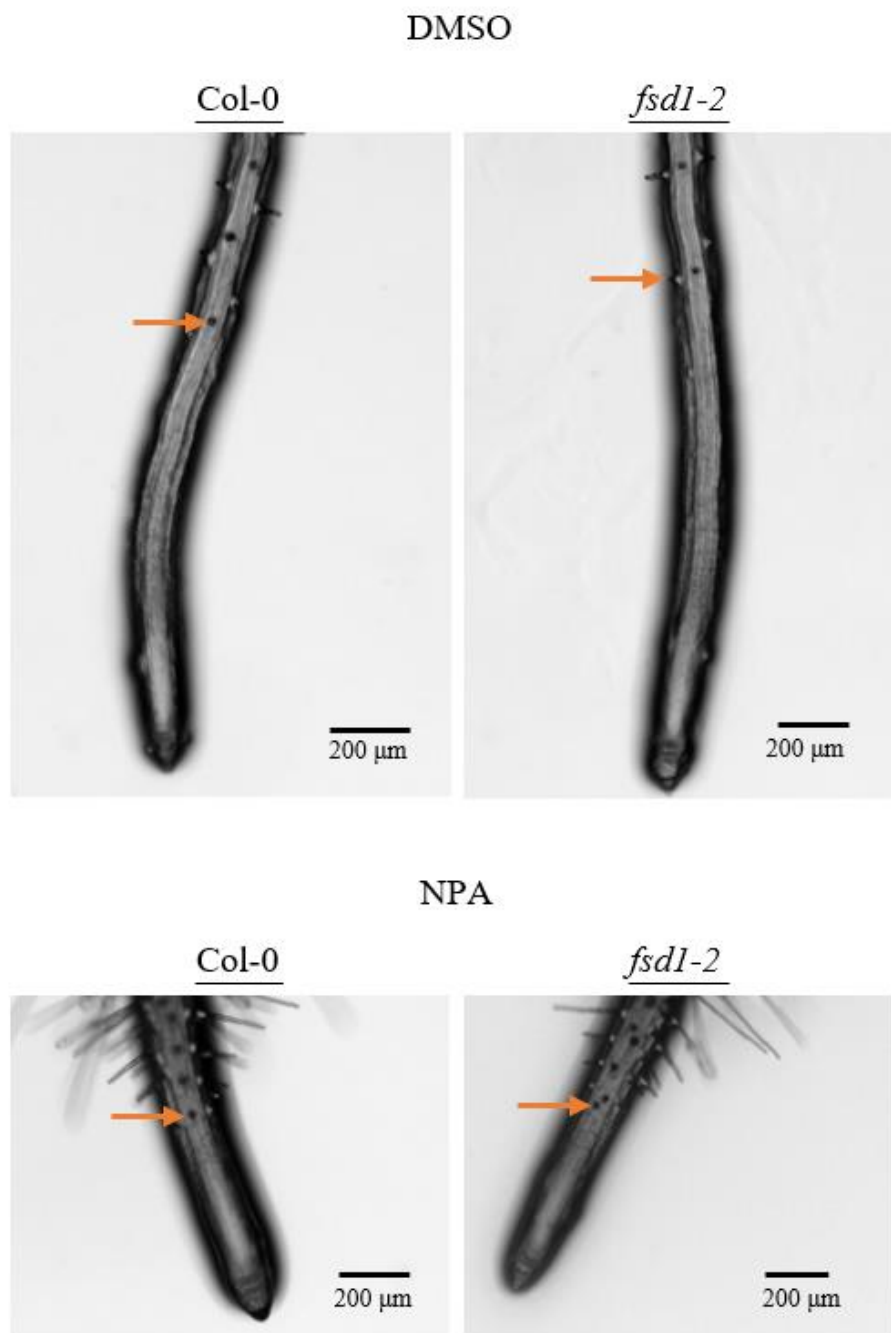
4.1.3 Vzdálenost kořenového apexu od prvního kořenového vlásku

Vzdálenost kořenového apexu od prvního kořenového vlásku naznačuje změnu organizace zón kořenové špičky, přičemž zkrácením dané vzdálenosti může docházet ke zkrácení meristemické, přechodové a prodlužovací zóny. Vzdálenost se lišila jednak u rostlin kultivovaných na kontrolním médiu a médiu obsahujícím NPA, jednak v závislosti na genotypu rostlin (Obr. 10). V případě rostlin kultivovaných na NPA docházelo k iniciaci kořenového vlásku průměrně o 52 % dříve v porovnání s rostlinami na kontrolním médiu. (Obr. 10). Při porovnání divého typu a linie *fsd1-2* se ukázalo, že vzdálenost byla u mutantní linie vyšší (o 13,5 %), a to jak v případě kontroly, tak i v případě ošetření (Obr 10.) Vzdálenost byla měřena 10 dní po přenosu rostlin na NPA médium a k měření byly využity snímky pořízené pomocí zoomovacího stereo mikroskopu (Obr. 11).

Byly zjištěny signifikantní rozdíly jednak mezi rostlinami kultivovanými na různých médiích a jednak mezi liniemi (Obr. 10). Tyto výsledky poukazují na vliv NPA na iniciaci kořenových vlásků, kdy u rostlin na médiu s NPA dochází k iniciaci kořenových vlásků



Obr. 10 Vzdálenosti kořenového apexu od prvního kořenového vlásku rostlin *A. thaliana* divého typu Col-0 a mutantní linie *fsd1-2* deset dní po přenesení na kontrolní médium (DMSO) a na médiu s přidavkem kyseliny N-1-naftylftalové (NPA). Chybové úsečky představují standardní odchylky; n = 9. Statistická analýza provedena jednofaktorovou ANOVA analýzou při p = 0,05. Písmena a, b, c znázorňují signifikantní



Obr. 11 Detailní snímky špiček primárních kořenů rostlin *A. thaliana* divého typu Col-0 a mutantní linie *fsd1-2* po deseti dnech kultivace na kontrolním médiu (DMSO) a na médiu s přidavkem kyseliny N-1-naftylftalamové (NPA). Snímky byly pořízené pomocí zoomovacího stereo mikroskopu. Měřítko 200 µm. Šipky označují první kořenový vlásek.

blíže k apexu v porovnání s kontrolou. Vliv FSD1 na zakládání kořenových vlásků se sice projevil, ovšem tento vliv je poměrně zanedbatelný (Obr. 10).

5 DISKUZE

Cílem této práce bylo zanalyzovat vliv modulace PAT pomocí NPA na fenotyp rostlin tDNA inserčních linií *A. thaliana fsd1*.

FSD1 patří mezi SOD, enzymy zodpovědné za detoxikaci ROS, čímž zabraňují oxidativnímu poškození rostlin (Kliebenstein *et al.* 1998). SOD katalyzují dismutaci superoxidu na peroxid vodíku. Auxin jakožto rostlinný hormon ovlivňuje řadu procesů spojených s vývojem a růstem kořene, jako jsou elongace kořene a gravitropismus (Chen *et al.* 2014) nebo tvorba laterálních kořenů (Dubrovsky *et al.* 2011). Schopnost auxinu ovlivňovat tyto procesy souvisí s biosyntézou auxinu (Chen *et al.* 2014) a PAT, kdy hlavní role PAT spočívá v regulaci gravitropismu (Chen *et al.* 1998) a růstu kořene (Grieneisen *et al.* 2007). Distribuce exprese FSD1 se částečně shoduje s distribucí auxinu v kořenových špičkách *A. thaliana* (Petersson *et al.*, 2009; Dvořák *et al.* 2021a). Z těchto důvodů jsme se snažili pomocí analýzy fenotypu kořenů mutantů *fsd1-1* a *fsd1-2*, kultivovaných na médiu obsahujícím syntetický inhibitor PAT NPA, vyvodit možný vliv FSD1 na PAT.

Naše výsledky ukazují, že chybějící exprese FSD1 nemá vliv na odpověď rostlin na NPA z hlediska prodlužování kořene. Je možné, že tento efekt je způsoben právě rozdílností distribuce auxinu a FSD1 v kořenové špičce, když auxin je na rozdíl od FSD1 akumulován v klidovém centru primárního kořene (Grieneisen *et al.*, 2007; Dvořák *et al.*, 2021a). Kontrola metabolismu ROS je důležitá pro zabezpečení správného buněčného dělení a kořenového růstu (Tsukagoshi, 2016). Zdá se, že FSD1 nemá zásadní roli pro redoxní regulaci důležitou pro prodlužování primárního kořene regulovaného PAT. Podobné výsledky byly získány také v kontrolních podmínkách (Dvořák *et al.*, 2021a). Redoxní homeostáze v meristému kořene jsou kontrolovány například glutathionem, přesněji poměrem redukovaného a oxidovaného glutathionu (Tsukagoshi, 2016).

Rostliny kultivované na médiu s NPA vykazovali abnormality gravitropismu. PAT je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících gravitropismus. Během vertikálního růstu kořene je auxin transportován rovnoměrně po všech stranách kořene. Pokud je kořen ovšem orientován horizontálně, auxin je transportován ve větší míře na spodní stranu kořene, což vede k nerovnoměrné distribuci auxinu a ke změně směru růstu kořene (Raschotte *et al.*, 2000). Toto je zapříčiněno relokací PIN3 proteinů (Friml *et al.*, 2002; Harrison a Masson, 2008). Takto vzniklý lokální auxinový gradient reguluje expresi genů zodpovědných za syntézu škrobových zrn, která způsobí akumulaci těchto zrn, které fungují jako statolity (Zhang *et al.*, 2019). Navzdory výrazné akumulaci FSD1 v

amyloplastech kolumely jsme nezjistili rozdíly v gravitropismu mezi rostlinami divého typu a mutanty *fsd1*. Role FSD1 v kolumele musí být ještě prostudována.

Deficience FSD1 v *fsd1-2* mutantech jen mírně ovlivnila odpověď rostlin na NPA z hlediska počtu kořenových vlásků a vzdálenosti iniciace prvního kořenového vlásku. Celkově měli rostliny divého typu kultivované na médiu s NPA delší kořenové vlásky, což se shoduje se Santelia *et al.* (2005). Zjistili jsme také, že počet kořenových vlásků je výrazně větší u rostlin kultivovaných na médiu s NPA v porovnání s rostlinami kultivovanými na kontrolním médiu. V tomto znaku se odlišovala i mutantní linie *fsd1-2* od divého typu, ale pouze při kultivaci na médiu s NPA, kdy mutantní rostliny měli mírně větší počet kořenových vlásků. Z těchto výsledků vyplývá, že FSD1 má jenom malý vliv na PAT v těchto parametrech. Je třeba poznamenat, že k vyhodnocení fenotypu kořenových vlásků byly k dispozici jenom rostliny linie *fsd1-2*. Je potřebné tyto výsledky potvrdit i na druhé mutantní linii.

Mezi faktory ovlivňující tvorbu a růst kořenových vlásků patří membránový transport a aktinový cytoskelet (Šamaj *et al.*, 2006), interakce několika proteinů jako RHD6 a RSL4 (Menand *et al.*, 2007; Mangano *et al.*, 2017), přítomnost fytohormonů (Pitts *et al.*, 1998) a produkce ROS a akumulace Ca^{2+} (Foreman *et al.*, 2003). Místa tvorby kořenových vlásků jsou charakterizována zvýšenou akumulací Ca^{2+} , ROS a Rop GTPas. Ve chvíli, kdy je koncentrace Ca^{2+} v apoplastu vysoká, dojde k aktivaci kanálů propustných pro Ca^{2+} a nastane influx Ca^{2+} do cytoplazmy (Foreman *et al.*, 2003). Při vysokých koncentracích Ca^{2+} v cytoplazmě dojde k produkci ROS prostřednictvím RBOHs (Foreman *et al.*, 2003). ROS produkované RBOH mají schopnost modifikovat buněčnou stěnu, čímž determinují růst kořenových vlásků (Kärkönen a Kuchitsu, 2015). Rop GTPasy (ROP2,4 a 6) označují místa, v nichž dochází k iniciaci tvorby kořenových vlásků, a zároveň jsou přítomny po celou dobu růstu a vývoje kořenového vlásku (Molendijk *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002). Rop GTPasy jsou regulovány ARF1-GTPasou, což je důležitá komponenta vezikulárního transportu (Yang, 2002). ROP2 reguluje aktivitu RBOH kódované *RHD2*, který hraje důležitou roli během influxu Ca^{2+} do buňky (Jones *et al.*, 2007).

RBOHC je isoformou RBOHs produkující superoxidový radikál směrem do apoplastu a ovlivňuje růst kořenových vlásků (Chapman *et al.*, 2019). Jednou z možností regulace apoplastického superoxidu je regulace prostřednictvím SOD (Pilon *et al.*, 2011). FSD1 jakožto jedna z SOD by mohla tuto roli zastávat, a to z několika důvodů. FSD1 má transmembránovou doménu na plazmatické membráně, orientovanou směrem do

apoplastu (Příloha 1; Příloha 2). Dvořák *et al.* (2021a) zaznamenali zvýšenou expresi FSD1 v trichoblastech, ze nichž následně vznikají kořenové vlásky. Tato data se shodují s expresí RBOHC (Příloha 3). Z těchto důvodů lze usoudit jistou možnost výskytu FSD1 v apoplastu a její roli v regulaci hladiny apoplastického superoxidu a peroxidu vodíku. Tato hypotéza ale musí být potvrzena dalšími experimenty. Jako možný experiment pro prokázání role FSD1 v odbourávání apoplastického superoxidu lze využít mutantní linii *fsd1* kultivovanou na médiu s inhibitorem RBOHs diphenyleneiodonium (DPI). Tato fenotypová pozorování by bylo vhodné doplnit o detekci hladiny ROS u *fsd1* mutantů v závislosti na přítomnosti inhibitoru. V budoucnu je potřebné zjistit hladiny transkripce, abundance a aktivity FSD1 v mutantech *rbohC*. *In vivo* mikroskopické analýzy můžou odhalit změny v lokalizaci FSD1 v trichoblastech v *rbohC* mutantech. Je ale také potřebné dokázat možnou lokalizaci FSD1 na plazmatické membráně nebo v apoplastu. V literatuře byla tato lokalizace prokázána např. pro CSD1 v listech hrachu nebo pro MnSOD a Cu/ZnSOD v kořenech pšenice (Hernández *et al.*, 2001; Sgherri *et al.*, 2007). Důkaz lokalizace FSD1 na PM je možné provést pomocí kolokalizace FSD1-GFP s membránovým markerem – např. vitálním barvivem FM4-64 (Novák *et al.*, 2018).

Naše výsledky naznačují, že regulace hladiny apoplastického superoxidu se zúčastňují jiné mechanismy než FSD1. Do úvahy přichází také spontánní rozklad superoxidu, který je ovšem závislý na pH (Fridovich, 1983). Další možností je možná redundance FSD1 s CSD1, k níž dochází především při vysoké koncentraci mědi. Obsah Cu v ½ MS médiu je 0,1 μM, což se považuje za nízkou koncentraci, ale při této koncentraci dochází také k expresi CSD1, což nevylučuje možné nahrazení FSD1 pomocí CSD1 (Yamasaki *et al.*, 2009; CoHu *et al.*, 2009).

6 ZÁVĚR

V této práci jsme se zabývali analýzou fenotypu kořenů rostlin *A. thaliana* divého typu Col-0 a mutantních linií *fsd1-1* a *fsd1-2* při modulaci PAT. Byla pozorována délka primárních kořenů, délka a počet kořenových vlásků a vzdálenost prvního kořenového vlásku od kořenového apexu. PAT byl modulován pomocí inhibitoru NPA.

Zjistili jsme, že FSD1 neovlivňuje změny v prodlužování kořene v odpovědi na inhibici PAT, což je pravděpodobně způsobeno absencí FSD1 v klidovém centru. Naopak FSD1 může mít význam pro regulaci tvorby a prodlužování kořenových vlásků regulovaných pomocí PAT. Avšak je pravděpodobné, že ROS jsou během těchto procesů primárně kontrolovány jinými mechanismy a FSD1 se na redoxní regulaci podílí malým dílem. Absence FSD1 také ovlivňuje pletivovou organizaci kořenového apexu v odpovědi na PAT a způsobuje posunutí diferenciační zóny dále od apexu.

FSD1 má tedy specifický vliv na reakci rostlin na modulaci PAT, ale přesné poznání její role v tomto procesu vyžaduje další experimenty.

7 LITERATURA

- Abas L., Kolb M., Stadlmann J., Janacek D.P., Lukic K., Schwechheimer C., Sazanoc L.A., Mach L., Friml J., Hammes U.Z. (2021): Naphthylphthalamic acid associates with and inhibits PIN auxin transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**, e2020857118.
- Abdel-Ghany S.E., Müller-Moulé P., Niyogi K.K., Pilon M., Shikanai T. (2005): Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant Cell* **17**, 1233-1251.
- Achard P., Renou J., Berthomé R., Harberd N.P., Genschik P. (2008): Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology* **18**, 656-660.
- Adamowski M., Friml J. (2015): PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *The Plant Cell* **27**, 20-32.
- Agrawal G.K., Jwa N.-S., Iwahashi H., Rakwal R. (2003): Importance of ascorbate peroxidases *OsAPX1* and *OsAPX2* in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. *Gene* **322**, 93-103.
- Almagro L., Gómez Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barceló A., Pedreño M.A. (2009): Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* **60**, 377-390.
- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1331-1341.
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399.
- Asada K. (2006): Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* **141**, 391-396.
- Bailly A., Sovero V., Vincenzetti V., Santelia D., Bartnik D., Koenig B.W., Mancuso S., Martinoia E., Geisler M. (2008): Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 21817-21826.
- Bela K., Horváth E., Gallé Á., Szabados L., Tari I., Csiszár J. (2015): Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* **176**, 192-201.
- Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inzé D., Asada K. (1994): Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**, 199-218.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P.J., Bennett M. (2001): Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell* **13**, 843-852.
- Casanova-Sáez R., Mateo-Bonmatí E., Ljung K. (2021): Auxin metabolism in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **13**, a039867.
- 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**, 370-396.
- Chaouch S., Queval G., Vanderauwera S., Mhamdi A., Vandorpe M., Langlois-Meurinne M., Van Breusegem F., Saindrenan P., Noctor G. (2010): Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by ISOCHORISMATE SYNTHASE1 in a daylength-related manner. *Plant Physiology* **153**, 1692-1705.
- Che Y., Zhang N., Zhu X., Li S., Wang S., Si H. (2020): Enhanced tolerance of the transgenic potato plants overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase to low temperature. *Scientia Horticulturae* **261**, 108949.
- Chen Q., Dai X., De-Paoli H., Cheng Y., Takebayashi Y., Kasahara H., Kamiya Y., Zhao Y. (2014): Auxin overproduction in shoots cannot rescue auxin deficiencies in *Arabidopsis* roots. *Plant and Cell Physiology* **55**, 1072-1079.

- Chen R., Hilson P., Sedbrook J., Rosen E., Caspar T., Masson P.H. (1998): The *Arabidopsis thaliana* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 15112-15117.
- Chu C.-C., Lee W.-C., Guo W.-Y., Pan S.-M., Chen L.-J., Li H.-M., Jinn T.-L. (2005): A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**, 425-436.
- Cohu C.M., Abdel-Ghany S.E., Gogolin Reynolds K.A., Onforio 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**, 1336-1350.
- Corpas F.J., Barroso J.B. (2017): Lead-induced stress, which triggers the production of nitric oxide (NO) and superoxide anion (O²⁻) in *Arabidopsis* peroxisomes, affects catalase activity. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **68**, 103-110.
- Correa-Aragunde N., Foresi N., Delledonne M., Lamattina L. (2013): Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3339-3349.
- Das K., Roychoudhury A. (2014): Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* **2**:53.
- Davies P.J. (2010): The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* 3rd ed., (Davies P.J. ed), Springer, Dordrecht, Netherlands, 1-15.
- Davletova S., Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Oliver D.J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K., Mittler R. (2005): Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**, 268-81.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Weijers D., Lechner E., Yamada M., Hobbie L., Ehrismann J.S., Jürgens G., Estelle M. (2005): Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental Cell* **9**, 109-119.
- Di Pietro A., Conseil G., Pérez-Victoria J.M., Dayan G., Baubichon-Cortay H., Trompier D., Steinfels E., Jault J.-M., De Wet H., Maitrejean M., Comte G., Boumendjel A., Mariotte A.-M., Dumontet C., McIntosh D.B., Goffeau A., Castanys S., Gamarro F., Barron D. (2002): Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **59**, 307-322.
- Dietz K.-J. (2011): Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling* **15**, 1129-1159.
- Ding Z., Wang B., Moreno I., Dupláková N., Simon S., Carraro N., Reemmer J., Pěňčík A., Chen X., Tejos R., Skůpa P., Pollmann S., Mravec J., Petrášek J., Zažímalová E., Honys D., Rolčík J., Murphy A., Orellana A., Geisler M., Friml J. (2012): ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nature Communications* **3**, 941.
- Djiana R., Berthe T., Burel C., Schaumann A., Bruyant P., Balange A.P. (1996): Partial purification and characterization of basic peroxidases from flax cell-culture medium. *Plant Physiology and Biochemistry* **34**, 771-778.
- Doll J., Muth M., Riester L., Nebel S., Bresson J., Lee H.C., Zentgraf U. (2020): *Arabidopsis thaliana* *WRKY25* transcription factor mediates oxidative stress tolerance and regulates senescence in a redox-dependent manner. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1734.
- Duan Q., Kita D., Li C., Cheung A.Y., Wu H.-M. (2010): FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 17821-17826.

- Dubiella U., Seybold H., Durian G., Komander E., Lassig R., Witte C.-P., Schulze W.X., Romeis T. (2013): Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 8744–8749.
- Dubrovsky J.G., Napsucially-Mendivil S., Duclercq J., Cheng Y., Shishkova S., Ivanchenko M.G., Friml J., Murphy A.S., Benková E. (2011): Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *New Phytologist* **191**, 970–983.
- Dvořák P., Krasylenko Y., Zeiner A., Šamaj J., Takáč T. (2021a): *In vivo* light-sheet microscopy resolves localisation patterns of FSD1, a superoxide dismutase with function in root development and osmoprotection. *Plant, Cell & Environment* **44**, 68–87.
- Dvořák P., Krasylenko Y., Ovečka M., Basheer J., Zapletalová V., Šamaj J., Takáč T. (2021b): Signaling toward reactive oxygen species-scavenging enzymes in plants. *Frontiers in Plant Science* **11**:618835.
- Eastmond P.J. (2007): *MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE4* is required for seed storage oil hydrolysis and postgerminative growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 1376–1387.
- Eltayeb A.E., Kawano N., Badawi G.H., Kaminaka H., Sanekata T., Shibahara T., Inanaga S., Tanaka K. (2007): Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* **225**, 1255–1264.
- Enders T.A., Strader L.C. (2015): Auxin activity: past, present, and future. *American Journal of Botany* **102**, 180–196.
- Farmer E.E., Mueller M.J. (2013): ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 429–450.
- Feher A., Ötvös K., Pasternak T., Pettkó-Szandtner A. (2008): The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G₀-to-G₁ transition) of plant cells. *Plant Signaling & Behavior* **3**, 823–826.
- Fini A., Brunetti C., Di Ferdinando M., Ferrini F., Tattini M. (2011): Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 709–711.
- Fischer U., Ikeda Y., Grebe M. (2007): Planar polarity of root hair positioning in *Arabidopsis*. *Biochemical Society Transactions* **35**, 149–151.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J.M., Dolan L. (2003): Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**, 442–446.
- Foyer C.H., Bloom A.J., Queval G., Noctor G. (2009): Photorespiratory metabolism: Genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 455–484.
- Foyer C.H., Noctor G. (2011): Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**, 2–18.
- Fridovich I. (1983): Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **23**, 239–257.
- Fridovich I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* **64**, 97–112.
- Friml J., Wiśniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. (2002): Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* **415**, 806–809.
- Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L., McCourt P., McPeck M.A., Thomas T.L., McClung C.R. (1996): Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* **112**, 327–336.
- Fryer M.J., Ball L., Oxborough K., Karpinski S., Mullineaux P.M., Baker N.R. (2003): Control of *Ascorbate Peroxidase 2* expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* **33**, 691–705.
- Fu X., Harberd N.P. (2003): Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**, 740–743.

- Fujita H., Syono K. (1996): Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **37**, 1094-1101.
- Gälweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K. (1998): Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**, 2226-2230.
- Ganguly A., Park M., Kesawat M.S., Cho H.-T. (2014): Functional analysis of the hydrophilic loop in intracellular trafficking of *Arabidopsis* PIN-FORMED proteins. *The Plant Cell* **26**, 1570–1585.
- Gechev T.S., Gadjev I.Z., Hille J. (2004): An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **61**, 1185–1197.
- Geisler M., Girin M., Brandt S., Vincenzetti V., Plaza S., Paris N., Kobae Y., Maeshima M., Billion K., Kolukisaoglu Ü.H., Shulz B., Martinoia E. (2004): *Arabidopsis* immunophilin-like TWD1 functionally interacts with vacuolar ABC transporters. *Molecular Biology of the Cell*. **15**, 3393-3405.
- Geisler M., Bailly A., Ivanchenko M. (2016): Master and servant: regulation of auxin transporters by FKBP and cyclophilins. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* **245**, 1-10.
- Geisler M., Aryal B., Di Donato M., Hao P. (2017): A critical view on ABC transporters and their interacting partners in auxin transport. *Plant and Cell Physiology* **58**, 1601–1614.
- Granlund I., Storm P., Schubert M., García-Cerdán J.G., Funk C., Schröder W.P. (2009): The TL29 protein is lumen located, associated with PSII and not an ascorbate peroxidase. *Plant and Cell Physiology* **50**, 1898–1910.
- Greenwood M.S., Cui X., Xu F. (2001): Response to auxin changes during maturation-related loss of adventitious rooting competence in loblolly pine (*Pinus taeda*) stem cuttings. *Physiologia Plantarum* **111**, 373–380.
- Grieneisen V.A., Xu J., Maree A.F., Hogeweg P., Scheres B. (2007): Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**, 1008-1013.
- Guilfoyle T.J., Hagen G. (2007): Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 453–460.
- Guo B., Liu C., Li H., Yi K., Ding N., Li N., Lin Y., Fu Q. (2016): Endogenous salicylic acid is required for promoting cadmium tolerance of *Arabidopsis* by modulating glutathione metabolisms. *Journal of Hazardous Materials* **316**, 77-86.
- Hackenberg T., Juul T., Auzina A., Gwizdź S., Małolepszy A., Van Der Kelen K., Dam S., Bressendorff S., Lorentzen A., Roepstorff P., Nielsen K.L., Jørgensen J.-E., Hofius D., Van Breusegem F., Petersen M., Andersen S.U. (2013): Catalase and *NO CATALASE ACTIVITY1* promote autophagy-dependent cell death in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**, 4616–4626.
- Hagen G., Guilfoyle T. (2002): Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology* **49**, 373–385.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2015): *Free radicals in biology and medicine*. 5th ed., Oxford University Press, New York, 944 stran.
- Hao H., Fan L., Chen T., Li R., Li X., He Q., Botella M.A., Lin J. (2014): Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**, 1729–1745.
- Hao P., Xia J., Liu J., Di Donato M., Pakula K., Bailly A., Jasinski M., Geisler M. (2020): Auxin-transporting ABC transporters are defined by a conserved D/E-P motif regulated by a prolyl isomerase. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 13094–13105.
- Harrison B.R., Masson P.H. (2008): ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *The Plant Journal* **53**, 380-392.
- Hernández J.A., Ferrer M.A., Jiménez A., Ros Barceló A., Sevilla F. (2001): Antioxidant systems and O²⁻/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* **127**, 817-831.

- Hertel R., Lomax T.L., Briggs W.R. (1983): Auxin transport in membrane vesicles from *Cucurbita pepo* L. *Planta* **157**, 193–201.
- Huang S., Van Aken O., Schwarzländer M., Belt K., Millar A.H. (2016): The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. *Plant Physiology* **171**, 1551–1559.
- Hull A.K., Vij R., Celenza J.L. (2000): *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 2379–2384.
- Hussain N., Irshad F., Jabeen Z., Shamsi I.H., Jiang L. (2013): Biosynthesis, structural, and functional attributes of tocopherols in plants; past, present, and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 6137–6149.
- Chew O., Whelan J., Millar A.H. (2003): Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 46869–46877.
- Iglesias M.J., Terrile M.C., Bartoli C.G., D'Ippólito S., Casalengué C.A. (2010): Auxin signaling participates in the adaptative response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **74**, 215–222.
- Janda T., Szalai G., Rios-Gonzales K., Veisz O., Páldi E. (2003): Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science* **164**, 301–306.
- Jones M.A., Schen J.-J., Fu Y., Li H., Yang Z., Grierson C.S. (2002): The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *The Plant Cell* **14**, 763–776.
- Jones M.A., Raymond M.J., Yang Z., Smirnov N. (2007): NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1261–1270.
- Kadota Y., Goh T., Tomatsu H., Tamauchi R., Higashi K., Muto S., Kuchitsu K. (2004): Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: pharmacological characterization of molecular relationship among cytosolic Ca²⁺ transients, anion efflux and production of reactive oxygen species. *Plant and Cell Physiology* **45**, 160–170.
- Kadota Y., Shirasu K., Zipfel C. (2015): Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant and Cell Physiology* **56**, 1472–1480.
- Kamimoto Y., Terasaka K., Hamamoto M., Takanashi K., Fukuda S., Shitan N., Sudiyama A., Suzuki H., Shibata D., Wang B., Pollmann S., Geisler M., Yazaki K. (2012): *Arabidopsis* ABCB21 is a facultative auxin importer/exporter regulated by cytoplasmic auxin concentration. *Plant and Cell Physiology* **53**, 2090–2100.
- Kangasjärvi S., Lepistö A., Hännikäinen K., Piippo M., Luomala E.-M., Aro E.-M., Rintamäki E. (2008): Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochemical Journal* **412**, 275–285.
- Kärkönen A., Kuchitsu K. (2015): Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* **112**, 22–32.
- Katekar G.F., Geissler A.E. (1980): Auxin transport inhibitors: IV. evidence of a common mode of action for a proposed class of auxin transport inhibitors: the phytotropins. *Plant Physiology* **66**, 1190–1195.
- Kawano T. (2003): Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports* **21**, 829–837.
- Kerr I.D., Bennett M.J. (2007): New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *The Biochemical Journal* **401**, 613–622.
- 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**, 637–650.

- König J., Muthuramalingam M., Dietz K.-J. (2012): Mechanisms and dynamics in the thiol/disulfide redox regulatory network: transmitters, sensors and targets. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 261–268.
- Korasick D.A., Enders T.A., Strader L.C. (2013): Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2541–2555.
- Kubeš M., Yang H., Richter G.L., Cheng Y., Młodzińska E., Wang X., Blakeslee J.J., Carraro N., Petrášek J., Zažímalová E., Hoyerová K., Peer W.A., Murphy A.S. (2012): The *Arabidopsis* concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. *The Plant Journal* **69**, 640–654.
- Kuo W.Y., Huang C.H., Liu A.C., Cheng C.P., Li S.H., Chang W.C., Weiss C., Azem A., Jinn T.J. (2013): CHAPERONIN 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in *Arabidopsis* chloroplasts. *New Phytologist* **197**, 99–110.
- Laskowski M.J., Dreher K.A., Gehring M.A., Abel S., Gensler A.L., Sussex I.M. (2002): *FQR1*, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase. *Plant Physiology* **128**, 578–590.
- Leshem Y., Seri L., Levine A. (2007): Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **51**, 185–197.
- Li K., Pang C.-H., Ding F., Sui N., Feng Z.-T., Wang B.-S. (2012): Overexpression of *Suaeda salsa* stroma ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* chloroplasts enhances salt tolerance of plants. *South African Journal of Botany* **78**, 235–245.
- Li L., Li M., Yu L., Zhou Z., Liang X., Liu Z., Cai G., Gao L., Zhang X., Wang Y., Chen S., Zhou J.-M. (2014): The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host & Microbe* **15**, 329–338.
- Lin C.-T., Lin M.-T., Chen Y.-T., Shaw J.-F. (1995): Subunit interaction enhances enzyme activity and stability of sweet potato cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase purified by a His-tagged recombinant protein method. *Plant Molecular Biology* **28**, 303–311.
- Liu F., Zhang Z., Csanády L., Gadsby D.C., Chen J. (2017): Molecular structure of the human CFTR ion channel. *Cell* **169**, 85–95.
- Mangano S., Denita-Juarez S.P., Choi H.-S., Marzol E., Hwang Y., Ranocha P., Velasquez S.M., Borassi C., Barberini M.L., Aptekmann A.A., Muschietti J.P., Nadra A.D., Dunand C., Cho H.-T., Estevez J.M. (2017): Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 5289–5294.
- Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S., Ishikawa T. (2016): Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: more than just a classical antioxidant enzyme? *Plant and Cell Physiology* **57**, 1377–1386.
- 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**, 1573–1591.
- McKersie B.D., Murnaghan J., Jones K.S., Bowley S.R. (2000): Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiology* **122**, 1427–1438.
- Menand B., Yi K., Jouannic S., Hoffmann L., Ryan E., Linstead P., Schaefer D.G., Dolan L. (2007): An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science* **316**, 1477–1480.
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. (2010): Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4197–4220.

- Miao Y., Laun T., Zimmermann P., Zentgraf U. (2004). Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **55**, 853–867
- Michalke W., Katekar G.F., Geissler A.E. (1992): Phytotropin-binding sites and auxin transport in *Cucurbita pepo*: evidence for two recognition sites. *Planta* **187**, 254–260.
- Mignolet-Spruyt L., Xu E., Idänheimo N., Hoeberichts F.A., Mühlenbock P., Brosché M., Van Breusegem F., Kangasjärvi J. (2016): Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany* **67**, 3831–3844.
- Millenaar F.F., Lambers H. (2003): The alternative oxidase: in vivo regulation and function. *Plant Biology* **5**, 2–15.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004): Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 490–498.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16**, 300–309.
- Mittler R. (2017): ROS are good. *Trends in Plant Science* **22**, 11–19.
- Molendijk A.J., Bischoff F., Rajendrakumar C.S.V., Friml J., Braun M., Gilroy S., Palme K. (2001): *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *The EMBO Journal* **20**, 2779–2788.
- Morales M., Ros Barceló A. (1997): A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell wall of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* **45**, 229–232.
- Morgan M.J., Lehmann M., Schwarzländer M., Baxter C.J., Sienkiewicz-Porzucek A., Williams T.C.R., Schauer N., Fernie A.R., Fricker M.D., Ratcliffe R.G., Sweetlove L.J., Finkemeier I (2008): Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant Physiology* **147**, 101–114.
- Mravec J., Skůpa P., Bailly A., Hoyerová K., Křeček P., Bielach A., Petrášek J., Zhang J., Gaykova V., Stierhof Y.-D., Dobrev P.I., Schwarzerová K., Rolčík J., Seifertová D., Luschnig C., Benková E., Zažímalová E., Geisler M., Friml J. (2009): Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**, 1136–1140.
- Muday G.K., Brunn S.A., Haworth P., Subramanian M. (1993): Evidence for a single naphthylphthalamic acid binding site on the Zucchini plasma membrane. *Plant Physiology* **103**, 449–456.
- Müller-Schüssele S.J., Wang R., Gütle D.D., Romer J., Rodriguez-Franco M., Scholz M., Buchert F., Lüth V.M., Kopriva S., Dörmann P., Schwarzländer M., Reski R., Hippler M., Meyer A.J. (2020): Chloroplasts require glutathione reductase to balance reactive oxygen species and maintain efficient photosynthesis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **103**, 1140–1154.
- Murphy A.S., Hoogner K.R., Peer W.A., Taiz L. (2002): Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **128**, 935–950.
- 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**, 3148–3162.
- Noctor G., Reichheld J.-P., Foyer C.H. (2018): ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **80**, 3–12.
- Normanly J., Cohen J.D., Fink G.R. (1993): *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 10355–10359.

- Normanly J., Grisafi P., Fink G.R., Bartel B. (1997): *Arabidopsis* mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the *NIT1* gene. *The Plant Cell* **9**, 1781–1790.
- Noshi M., Yamada H., Hatanaka R., Tanabe N., Tamoi M., Shigeoka S. (2017): *Arabidopsis* dehydroascorbate reductase 1 and 2 modulate redox states of ascorbate-glutathione cycle in the cytosol in response to photooxidative stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **81**, 523-533.
- Novák D., Vadovič P., Ovečka M., Šamajová O., Komis G., Colcombet J., Šamaj J. (2018): Gene expression pattern and protein localization of *Arabidopsis* phospholipase D alpha 1 revealed by advanced light-sheet and super-resolution microscopy. *Frontiers in Plant Science* **9**:371.
- Okada K., Ueda J., Komaki M.K., Bell C.J., Shimura Y. (1991): Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *The Plant Cell* **3**, 677-684.
- Orman-Ligeza B., Parizot B., De Rycke R., Fernandez A., Himschoot E., Van Breusegem F., Bennett M.J., Périlleux C., Beeckman T., Draye X. (2016): RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in *Arabidopsis*. *Development* **143**, 3328–3339.
- Oury T.D., Crapo J.D., Valnickova Z., Enghild J.J. (1996): Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochemical Journal* **317**, 51-57.
- Paiva A.L.S., Passaia G., Lobo A.K.M., Jardim-Messeder D., Silveira J.A.G., Margis-Pinheiro M. (2019): Mitochondrial glutathione peroxidase (*OsGPX3*) has a crucial role in rice protection against salt stress. *Environmental and Experimental Botany* **158**, 12-21.
- Park S.-Y., Ryu S.-H., Jang I.-C., Kwon S.-Y., Kim J.-G., Kwak S.-S. (2004): Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweetpotato and its expression in response to stress. *Molecular Genetics and Genomics* **271**, 339-346.
- Passaia G., Queval G., Bai J., Margis-Pinheiro M., Foyer C.H. (2014): The effects of redox controls mediated by glutathione peroxidases on root architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1403-1413.
- Pasternak T., Potters G., Caubergs R., Jansen M.A.K. (2005): Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1991–2001.
- Peer W.A., Hosein F.N., Bandyopadhyay A., Makam S.N., Otegui M.S., Lee G.-J., Blakeslee J.J., Cheng Y., Titapiwatanakun B., Yakubov B., Bangari B., Murphy A.S. (2009): Mutation of the membrane-associated M1 protease APM1 results in distinct embryonic and seedling developmental defects in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 1693–1721.
- Perea-García A., Andrés-Bordería A., Mayo De Andrés S., Sanz A., Davis A.M., Davis S.J., Huijser P., Peñarrubia L. (2016): Modulation of copper deficiency responses by diurnal and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **67**, 391–403.
- Petersson S.V., Johansson A.I., Kowalczyk M., Makoveychuk A., Wang J.Y., Moritz T., Grebe M., Benfey P.N., Sandberg G., Ljung K. (2009): An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *The Plant Cell* **21**, 1659–1668.
- Petrášek J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee J.J., Abas M., Seifertová D., Wiśniewska J., Tadele Z., Kubeš M., Čovanová M., Dhonukshe P., Skůpa P., Benková E., Perry L., Křeček P., Lee O.R., Fink G.R., Geisler M., Murphy A.S., Luschnig C., Zažímalová E., Friml J. (2006): PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**, 914–918.
- Pilon M., Ravet K., Tapken W. (2011): The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**, 989-998.
- Pitts R.J., Cernac A., Estelle M. (1998): Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **16**, 553-560.

- Pollmann S., Neu D., Weiler E.W. (2003): Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* **62**, 293–300.
- Pospíšil P. (2016): Production of reactive oxygen species by photosystem II as a response to light and temperature stress. *Frontiers in Plant Science* **7**:1950.
- Potters G., Pasternak T.P., Guisez Y., Palme K.J., Jansen M.A.K. (2007): Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* **12**, 98–105.
- Potters G., Pasternak T.P., Guisez Y., Jansen M.A.K. (2009): Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, Cell & Environment* **32**, 158-169.
- Queval G., Issakidis-Bourguet E., Hoerberichts F.A., Vandorpe M., Gakière B., Vanacker H., Miginiac-Maslow M., Van Breusegem F., Noctor G. (2007): Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *The Plant Journal* **52**, 640-657.
- Remy E., Duque P. (2014): Beyond cellular detoxification: a plethora of physiological roles for MDR transporter homologs in plants. *Frontiers in Physiology* **5**:201.
- Rizhsky L., Liang H., Mittler R. (2003): The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 38921-38925.
- Růžická K., Strader L.C., Bailly A., Yang H., Blakeslee J., Łangowski Ł., Nejedlá E., Fujita H., Itoh H., Syōno K., Hejátko J., Gray W.M., Martinoia E., Geisler M., Bartel B., Murphy A.S., Friml J. (2010): *Arabidopsis PIS1* encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 10749-10753.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P., Scheres B. (1999): An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**, 463-472.
- Sagi M., Fluhr R. (2006): Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* **141**, 336–340.
- Šamaj J., Müller J., Beck M., Böhm N., Menzel D. (2006): Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends in Plant Science* **11**, 594-600.
- Santelia D., Vincenzetti V., Azzarello E., Bovet L., Fukao Y., Düchtig P., Mancuso S., Martinoia E., Geisler M. (2005): MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Letters* **579**, 5399-5406.
- Seo M., Akaba S., Oritani T., Delarue M., Bellini C., Caboche M., Koshiba T. (1998): Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot1 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **116**, 687-693.
- Sgherri C., Quartacci M.F., Navari-Izzo F. (2007): Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1152-1160.
- Simon S., Skůpa P., Viaene T., Zwiewka M., Tejos R., Klíma P., Čarná M., Rolčik J., De Rycke R., Moreno I., Dobrev P.I., Orellana A., Zažímalová E., Friml J. (2016): PIN6 auxin transporter at endoplasmic reticulum and plasma membrane mediates auxin homeostasis and organogenesis in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **211**, 65–74.
- Smykowski A., Zimmermann P., Zentgraf U. (2010): G-Box binding factor1 reduces *CATALASE2* expression and regulates the onset of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **153**, 1321-1331.
- Stepanova A.N., Robertson-Hoyt J., Yun J., Benavente L.M., Xie D.-Y., Doležal K., Schlereth A., Jürgens G., Alonso J.M. (2008): *TAA1*-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**, 177–191.

- Stepanova A.N., Yun J., Robles L.M., Novak O., He W., Guo H., Ljung K., Alonso J.M. (2011): The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *The Plant Cell* **23**, 3961–3973.
- Su C., Liu L., Liu H., Ferguson B.J., Zou Y., Zhao Y., Wang T., Wang Y., Li X. (2016): H₂O₂ regulates root system architecture by modulating the polar transport and redistribution of auxin. *Journal of Plant Biology* **59**, 260–270.
- Sugawara S., Hishiyama S., Jikumaru Y., Hanada A., Nishimura T., Koshiba T., Zhao Y., Kamiya Y., Kasahara H. (2009): Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 5430-5435.
- Sun T., Yuan H., Cao H., Yazdani M., Tadmor Y., Li L. (2018): Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. *Molecular Plant* **11**, 58-74.
- Sun W.-H., Duan M., Shu D.-F., Yang S., Meng Q.-W. (2010a): Over-expression of StAPX in tobacco improves seed germination and increases early seedling tolerance to salinity and osmotic stresses. *Plant Cell Reports* **29**, 917-926.
- Sun W.-H., Duan M., Shu D.-F., Yang S., Meng Q.-W. (2010b): Overexpression of tomato tAPX gene in tobacco improves tolerance to high or low temperature stress. *Biologia plantarum* **54**, 614-620.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R. (2011): Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 691–699.
- Takáč T., Šamajová O., Vadovič P., Pechan T., Košútová P., Ovečka M., Husičková A., Komis G., Šamaj J. (2014): Proteomic and biochemical analyses show a functional network of proteins involved in antioxidant defense of the *Arabidopsis anp2anp3* double mutant. *Journal of Proteome Research* **13**, 5347-5361.
- Takáč T., Obert B., Rolčík J., Šamaj J. (2016): Improvement of adventitious root formation in flax using hydrogen peroxide. *New Biotechnology* **33**, 728–734.
- Tam Y.Y., Epstein E., Normanly J. (2000): Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiology* **123**, 589–596.
- Tan S. (2021): Action mode of NPA: direct inhibition on PIN auxin transporters. *Molecular Plant* **14**, 199.
- Teale W.D., Paponov I.A., Palme K. (2006): Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 847–859.
- Teale W.D., Pasternak T., Dal Bosco C., Dovzhenko A., Kratzat K., Bildl W., Schwörer M., Falk T., Ruperti B., Schaefer J.V., Shahriari M., Pilgermayer L., Li X., Lübben F., Plückthun A., Schulte U., Palme K. (2021): Flavonol-mediated stabilization of PIN efflux complexes regulates polar auxin transport. *The EMBO Journal* **40**, e104416.
- Teixeira F.K., Menezes-Benavente L., Galvão V.C., Margis R., Margis-Pinheiro M. (2006): Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* **224**, 300-314.
- Thomson K.-S., Leopold A.C. (1974): *In-vitro* binding of morphactins and 1-N-naphthylphthalamic acid in corn coleoptiles and their effects on auxin transport. *Planta* **115**, 259–270.
- Tognetti V.B., Van Aken O., Morreel K., Vandenbroucke K., Van De Cotte B., De Clercq I., Chiwocha S., Fenske R., Prinsen E., Boerjan W., Genty B., Stubbs K.A., Inzé D., Van Breusegem F. (2010): Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase *UGT74E2* modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance. *The Plant Cell* **22**, 2660–2679.
- Tognetti V.B., Mühlhenck P., Van Breusegem F. (2012): Stress homeostasis - the redox and auxin perspective: Stress homeostasis. *Plant, Cell & Environment* **35**, 321–333.
- Tsukagoshi H. (2016): Control of root growth and development by reactive oxygen species. *Current Opinion in Plant Biology* **29**, 57-63.

- Ushimaru T., Nakagawa T., Fujioka Y., Daicho K., Naito M., Yamauchi Y., Nonaka H., Amako K., Yamawaki K., Murata N. (2006): Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *Journal of Plant Physiology* **163**, 1179-1184.
- Van Camp W., Bowler C., Villarroel R., Tsang E.W., Van Montagu M., Inzé D. (1990): Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 9903-9907.
- Vandelle E., Delledonne M. (2011): Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science* **181**, 534–539.
- Vandenabeele S., Vanderauwera S., Vuylsteke M., Rombauts S., Langebartels C., Seidlitz H.K., Zabeau M., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. (2004): Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **39**, 45–58.
- Vanderauwera S., Zimmermann P., Rombauts S., Vandenabeele S., Langebartels C., Gruijssem W., Inzé D., Van Breusegem F. (2005): Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology* **139**, 806-821.
- Vanneste S., Friml J. (2009): Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**, 1005-1016.
- Vansuyt G., Lopez F., Inzé D., Briat J.-F., Fourcroy P. (1997): Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. *FEBS Letters* **410**, 195-200.
- Verbruggen N., Hermans C. (2008): Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **35**, 753–759.
- Verrier P.J., Bird D., Burla B., Dassa E., Forestier C., Geisler M., Klein M., Kolukisaoglu Ü., Lee Y., Martinoia E., Murphy A., Rea P.A., Samuels L., Schulz B., Spalding E.J., Yazaki K., Theodoulou F.L. (2008): Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science* **13**, 151-159.
- Wang B., Chu J., Yu T., Xu Q., Sun X., Yuan J., Xiong G., Wang G., Wang Y., Li J. (2015): Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 4821–4826.
- Wang F.-Z., Wang Q.-B., Kwon S.-Y., Kwak S.-S., Su W.-A. (2005): Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology* **162**, 465-472.
- Wang F.-Z., Wisniewski M., Meilan R., Uratsu S.L., Cui M., Dandekar A., Fuchigami I. (2007): Ectopic expression of Mn-SOD in *Lycopersicon esculentum* leads to enhanced tolerance to salt and oxidative stress. *Journal of Applied Horticulture* **130**, 167-173.
- Wang Y., Jiao Y. (2018): Auxin and above-ground meristems. *Journal of Experimental Botany* **69**, 147–154.
- Waszczak C., Carmody M., Kangasjärvi J. (2018): Reactive oxygen species in plant signaling. *Annual Review of Plant Biology* **69**, 209-236.
- Wiśniewska J., Xu J., Seifertová D., Brewer P.B., Růžička K., Blilou I., Rouquié D., Benková E., Scheres B., Friml J. (2006): Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**, 883–883.
- Woodward A.W., Bartel B. (2005): Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**, 707–735.
- Wrzaczek M., Brosché M., Kangasjärvi J. (2013): ROS signaling loops — production, perception, regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 575–582.
- Xia Q.-Z., Zhang X.-L., Nie Y.-C., Guo X.-P. (2005): Withdrawal of exogenous auxin induces programmed cell death of cotton embryogenic suspension cultures. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*. **31**, 78–84.

- Xing Y., Cao Q., Zhang Q., Qin L., Jia W., Zhang J. (2013): MKK5 regulates high light-induced gene expression of Cu/Zn superoxide dismutase 1 and 2 in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **54**, 1217-1227.
- 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**, 347–61.
- Yang L., Zhang J., He J., Qin Y., Hua D., Duan Y., Chen Z., Gong Z. (2014): ABA-mediated ROS in mitochondria regulate root meristem activity by controlling *PLETHORA* expression in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics* **10**, e1004791.
- Yang Y., Xu R., Ma C., Vlot A.C., Klessig D.F., Pichersky E. (2008): Inactive methyl indole-3-acetic acid ester can be hydrolyzed and activated by several esterases belonging to the *AtMES* esterase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**, 1034–1045.
- Yang Z. (2002): Small GTPases: Versatile Signaling Switches in Plants. *The Plant Cell* **14**, 375-388.
- Yang Z., Mhamdi A., Noctor G. (2019): Analysis of catalase mutants underscores the essential role of CATALASE2 for plant growth and daylength-dependent oxidative signalling. *Plant, Cell & Environment* **42**, 688–700.
- Yoda H., Hiroi Y., Sano H. (2006): Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiology* **142**, 193-206.
- Yu X., Pasternak T., Eiblmeier M., Ditengou F., Kochersperger P., Sun J., Wang H., Rennenberg H., Teale W., Paponov I., Zhou W., Li C., Li X., Palme K. (2013): Plastid-localized glutathione reductase2-regulated glutathione redox status is essential for *Arabidopsis* root apical meristem maintenance. *The Plant Cell* **25**, 4451–4468.
- Zhang Y., He P., Ma X., Yang Z., Pang C., Yu J., Wang G., Friml J., Xiao G. (2019): Auxin-mediated statolith production for root gravitropism. *New Phytologist* **224**, 761-774.
- Zhao Y. (2018): Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental changes. *Annual Review of Plant Biology* **69**, 417–435.
- Zhu J., Bailly A., Zwiewka M., Sovero V., Di Donato M., Ge P., Oehri J., Aryal B., Hao P., Linnert M., Burgardt N.I., Lücke C., Weiwad M., Michel M., Weiergräber O.H., Pollmann S., Azzarello E., Mancuso S., Ferro N., Fukao Y., Hoffmann C., Wedlich-Söldner R., Friml J., Thomas C., Geisler M. (2016): TWISTED DWARF1 mediates the action of auxin transport inhibitors on actin cytoskeleton dynamics. *The Plant Cell* **28**, 930–948.

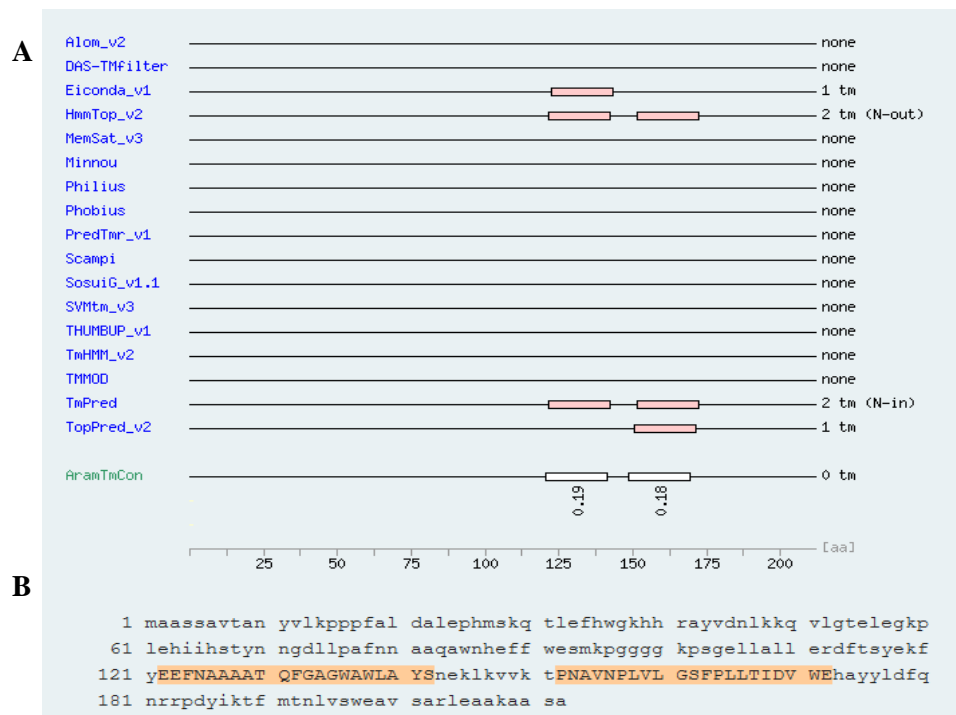
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ABC	ATP vázající kazetový transportér
AMI1	amidasa 1
AO	aldehydoxidasa
AOX	alternativní oxidasa
APM1	aminopeptidasa 1
APX	askorbátperoxidasa
ARF	faktory auxinové odpovědi
ASC	askorbát
ASC-GSH	askorbát-glutathionový cyklus
AUX1/LAX	AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1 přenašeče
CAT	katalasa
CPN20	co-chaperon 20
CSD	Cu/Zn superoxiddismutasa
DHA	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
DPI	diphenyleneiodonium
ER	endoplazmatické retikulum
Fd	ferredoxin
FNR	ferredoxin NADP ⁺ reduktasa
FSD	Fe superoxiddismutasa
FTR	ferredoxin dependentní thioredoxinreduktasa
GBF1	G-box vázající faktor 1
GOX	glykolát oxidasa
GPX	glutathion peroxidasa
GPXL	enzymy podobné glutathionperoxidase
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
IAA	kyselina indol-3-octová
IAA-AA	amidové konjugáty kyseliny indol-3-octové
IAAld	indol-3-acetaldehyd
IAM	indol-3-acetamid

IAN	indol-3-acetonitril
IAOx	indol-3-acetaldoxim
IBA	kyselina indol-3-máselná
IPyA	kyselina indol-3-pyrohroznová
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinasa
MDA	monodehydroaskorbát
MDAR	monodehydroaskorbátreduktasa
MeIAA	metylester kyseliny indol-3-octové
MP	mezimembránový prostor
MSD	Mn superoxiddismutasa
MV	methylviologen
NAA	kyselina 1-naftyloctová
NIT	nitrolasa
NPA	kyselina N-1-naftylftalamová
NTR	NADPH dependentní thioredoxinreduktasa
OPPP	oxidativní pentosa-fosfátová dráha
PAO	polyaminoxidasa
PAT	polární transport auxinu
PCD	programová buněčná smrt
PIN	Plant-specific pin-formed protein
PILS	proteiny podobné PIN proteinům
<i>PLT</i>	<i>PLETHORA</i> gen
PRX	peroxidasa
Prxr	peroxiredoxin
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
RAM	kořenový apikální meristém
RBOH	NADPH-oxidasa lokalizovaná na plazmatické membráně
ROS	reaktivní formy kyslíku
RSL4	ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE 4 transkripční faktor
SA	kyselina salicylová
sAPX	stromální askorbátperoxidasa
SIMRs	stresem indukované morfogenetické odpovědi
SOD	superoxiddismutasa

SPL7	SQUAMOSA promotor vázající protein-like 7
tAPX	tylakoidní askorbátperoxidasa
TF	transkripční faktor
TIBA	2,3,5-trijodobenzoová kyselina
TIR1/AFB	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX receptor
Trx	thioredoxin
TWD1	chaperon TWISTED DWARF1
XO	xantinoxidasa
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová

9 PŘÍLOHY



Příloha 1 Predikce transmembránových domén podle databáze Aramemnon (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>; A), lokalizace transmembránových domén predikovaných v Obr. A (B).

TMpred output for UNKNOWN

[EMBnet-Server] Date: Sun May 16 14:59:55 2021

TMpred prediction output for : TMPRED.5561.4299.seq

Sequence: MAA...ASA length: 212
Prediction parameters: TM-helix length between 17 and 33

1.) Possible transmembrane helices

=====

The sequence positions in brackets denominate the core region.
Only scores above 500 are considered significant.

Inside to outside helices : 2 found

from	to	score	center
124 (124)	141 (141)	815	133
151 (151)	171 (171)	531	161

Outside to inside helices : 2 found

from	to	score	center
124 (124)	141 (141)	489	133
153 (153)	171 (171)	538	161

2.) Table of correspondences

=====

Here is shown, which of the inside->outside helices correspond to which of the outside->inside helices.
Helices shown in brackets are considered insignificant.
A "+" symbol indicates a preference of this orientation.
A "++" symbol indicates a strong preference of this orientation.

inside->outside	outside->inside
124- 141 (18) 815 ++	(124- 141 (18) 489)
151- 171 (21) 531	153- 171 (19) 538

3.) Suggested models for transmembrane topology

=====

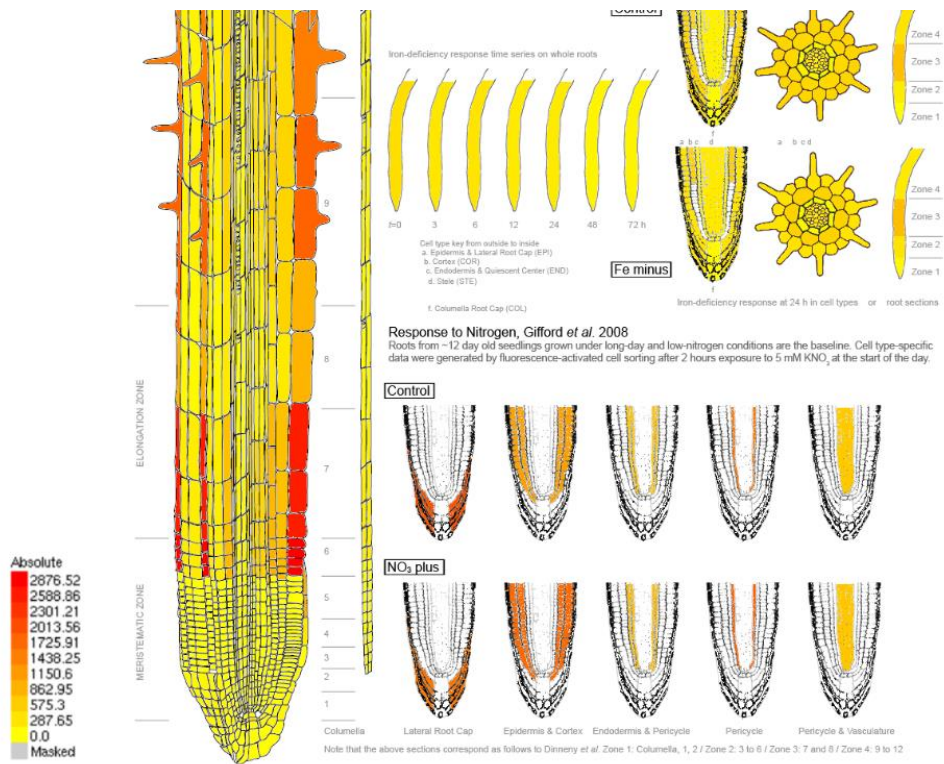
These suggestions are purely speculative and should be used with EXTREME CAUTION since they are based on the assumption that all transmembrane helices have been found.
In most cases, the Correspondence Table shown above or the prediction plot that is also created should be used for the topology assignment of unknown proteins.

2 possible models considered, only significant TM-segments used

*** the models differ in the number of TM-helices ! ***

-----> STRONGLY preferred model: N-terminus inside
2 transmembrane helices total ----- 1350

Příloha 2 výstup predikce transmembránových domén podle programu TmPred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html).



Příloha 3 Expres RBOHC v buňkách primárního kořene *Arabidopsis thaliana*.
 Zdroj: <https://bar.utoronto.ca/>