

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Kyselina salicylová – klíčový hormon rostlinných
odpovědí na biotické stresy**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Vincent Račuch
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Ph.D.
Rok:	2018

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

V Olomouci dne 14. 5. 2018

.....

Vincent Račuch

Děkuji svému školiteli panu doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, trpělivost, ochotu, veškeré cenné rady a čas věnovaný zpracování experimentální i teoretické části bakalářské práce. Děkuji též celému kolektivu Katedry biochemie za cenné rady a pomoc při experimentální činnosti.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Vincent Račuch
Název práce	Kyselina salicylová – klíčový hormon rostlinných odpovědí na biotické stresy
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Bakalářská práce je v úvodu teoretické části zaměřena na kyselinu salicylovou (SA) z historického hlediska a na její roli v odpovědích rostlin na biotický stres. Následující kapitoly jsou věnovány biosyntetickým drahám, jejich regulacím a metabolismu této malé fenolické sloučeniny. Vypracovaná literární rešerše shrnuje aktuální poznatky o signálních drahách SA v rostlinách a jejich propojení se signálními drahami ostatních fytohormonů. Závěr teoretické části je věnován analytickým metodám stanovení SA v rostlinném materiálu.

V praktické části byla provedena syntéza nanočástic TiO_2 a následně bylo testováno jejich využití pro detekci SA v roztoku, ale metodu se nepodařilo optimalizovat. Dále byla testována spektrofotometrická metoda kvantifikace SA založená na vzniku barevného komplexu s FeCl_3 . Byly vyzkoušeny extrakční metody na pevné fázi s laboratorně připravenými nanočásticemi Fe_3O_4 , a kyselá a enzymová hydrolýza pro stanovení SA vázané v glykosidech. S použitím komerčně dostupných protilátek byla zavedena metoda ELISA pro stanovení SA v rostlinném materiálu, kterou byly srovnány použité extrakční postupy a hladiny SA v extraktech rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom a v jeho mutantovi *nahG*.

Klíčová slova	Kyselina salicylová, <i>Solanum lycopersicum</i> , biotický stres, nanočástice
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Vincent Račuch
Title	Salicylic acid – A key hormone of plant responses to biotic stress
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

The beginning of the theoretical part of the bachelor thesis is focused on salicylic acid (SA) from the historical point of view and on its role in responses to biotic stress. The following chapters are dedicated to biosynthetic pathways, their regulation and metabolism of this small phenolic compound. The elaborated literary research summarizes the current knowledge about SA signaling pathways in plants and their connection to signaling pathways of other phytohormones. The conclusion of the theoretical part is dedicated to analytical methods of determination of SA in plant material.

In the practical part, the synthesis of TiO₂ nanoparticles was performed and their use was tested for detection of SA in solution, but the method was not optimized. Furthermore, a spectrophotometric method of quantification of SA based on the formation of color complex with FeCl₃ was tested. Solid phase extraction methods with laboratory-prepared Fe₃O₄ nanoparticles, acidic and enzymatic hydrolysis for the determination of SA bound in glycosides were tested. Using commercially available antibodies, an ELISA method was used to determine SA in plant material, comparing the extraction methods used and SA levels in plant extracts *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom and its mutant *nahG*.

Keywords	Salicylic acid, <i>Solanum lycopersicum</i> , biotic stress, nanoparticles
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	BIOSYNTÉZA A DEGRADACE KYSELINY SALICYLOVÉ V ROSTLINÁCH	3
2.1	Biosyntetické cesty.....	3
2.2	Regulace biosyntézy kyseliny salicylové.....	6
2.2.1	Transkripční regulace ICS1 a signální dráhy Ca ²⁺ iontů.....	6
2.2.2	Další proteiny v nepřímé regulaci biosyntézy SA.....	8
2.3	Metabolismus kyseliny salicylové	9
3	SIGNÁLNÍ DRÁHY KYSELINY SALICYLOVÉ V ROSTLINÁCH.....	10
3.1	Vnímání kyseliny salicylové	10
3.2	Signalizace SA závislá na NPR1.....	12
3.3	Signalizace SA nezávislá na NPR1	13
4	PROPOJENÍ SIGNÁLNÍCH DRAH KYSELINY SALICYLOVÉ SE SIGNÁLNÍMI DRAHAMÍ JINÝCH HORMONŮ	15
4.1	Signální dráhy kyseliny jasmonové a etylénu	16
4.1.1	Interakce signálních drah kyseliny jasmonové, etylénu a kyseliny salicylové	17
4.2	Interakce signální dráhy SA s dalšími fytohormony.....	18
4.2.1	Kyselina abscisová (ABA)	18
4.2.2	Auxiny	19
4.2.3	Cytokininy	20
4.2.4	Gibereliny	21
4.2.5	Brassinosteroidy	22
5	ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ KYSELINY SALICYLOVÉ.....	24
5.1	Příprava rostlinných vzorků	24
5.1.1	Extrakce volné a vázané SA	24
5.1.2	SPE extrakce SA s využitím nanočástic.....	24
5.2	Metody kvalitativní analýzy.....	24
5.3	Metody kvantitativní analýzy.....	25
5.3.1	Spektrální metody.....	25
5.3.1.1	Stanovení kyseliny salicylové spektrálními metodami	25
5.3.2	Chromatografické metody	26
5.3.2.1	Kapalinová chromatografie.....	26
5.3.2.2	Plynová chromatografie	27
5.3.3	Analýza SA s využitím biosenzoru	27
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
6.1	Materiál a chemikálie	30
6.1.1	Použité chemikálie	30
6.2	Přístrojové vybavení.....	32

6.3	Rostlinný materiál	32
6.4	Použité metody.....	32
6.4.1	Příprava roztoků a pufrů.....	32
6.4.1.1	Agarové médium pro kultivaci rostlin	32
6.4.1.2	Roztoky pro SDS-PAGE.....	33
6.4.1.3	Roztoky pro Western blotting	33
6.4.1.4	Roztoky pro imunochemickou detekci.....	33
6.4.1.5	Roztoky pro ELISA	33
6.4.2	Pěstování rostlin	34
6.4.2.1	In vitro sterilní kultivace semenáčků <i>S. lycopersicum</i>	34
6.4.3	Příprava extraktů pro analýzu SA	34
6.4.3.1	SPE extrakce SA na nanočástice Fe ₃ O ₄	34
6.4.3.2	Extrakce SA podle Verberne <i>et al.</i> (2002).....	35
6.4.3.3	Extrakce podle Lopéz-Gresa <i>et al.</i> (2016).....	36
6.4.4	Spektrofotometrické stanovení kyseliny salicylové	37
6.4.4.1	Metoda založená na tvorbě komplexu SA a FeCl ₃	37
6.4.4.2	Stanovení kyseliny salicylové metodou TiO ₂	37
6.4.5	Syntéza konjugátu SA s ovalbuminem a albuminem (4-ASA-OVA a 4-ASA-BSA)	37
6.4.6	Metoda SDS-PAGE elektroforézy	38
6.4.7	Western blot	39
6.4.8	Imunochemická detekce proteinů na membráně	39
6.4.9	Nepřímá kompetitivní ELISA	40
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
7.1	Metoda založená na tvorbě komplexu SA a FeCl ₃	41
7.2	SPE extrakce kyseliny salicylové na nanočástice Fe ₃ O ₄	42
7.3	Stanovení kyseliny salicylové metodou TiO ₂	43
7.4	Analýza konjugátů SA metodou SDS-PAGE a Western blottingu.....	44
7.5	Imunochemická detekce konjugátů SA.....	45
7.6	Nepřímá kompetitivní ELISA	46
8	ZÁVĚR	49
9	LITERATURA	50
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	57

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše shrnující dostupné poznatky o biosyntéze, metabolismu a signálních drahách kyseliny salicylové jako rostlinného hormonu, se zaměřením na úlohu kys. salicylové v rostlinných odpovědích na biotické stresy.

V experimentální části bakalářské práce byla cílem příprava nanočástic TiO_2 a Fe_3O_4 a testování jejich využití pro extrakci a detekci kys. salicylové. Dalším cílem práce bylo zavedení metody analýzy obsahu kys. salicylové v rostlinném materiálu a studium hladiny kys. salicylové v rostlinách *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom a jeho mutanta *nahG*.

1 ÚVOD

Fytohormon kyselina salicylová (SA, kyselina 2-hydroxybenzoová), jejíž název je odvozen z latinského názvu pro vrbu (*Salix*), je malá fenolická sloučenina, produkovaná širokou škálou prokaryotických a eukaryotických organismů včetně rostlin. Vrbovou kůru a listy již ve 4. století př.n.l. Hippocrates předepisoval pro úlevu od bolesti pro ženy během porodu (Weissman, 1991). Později se stalo podávání preparátů obsahujících SA běžnou metodou pro léčbu horečky či revmatismu. V dnešní době je kyselina salicylová (SA) velmi užívanou aktivní složkou kosmetických přípravků proti akné a mastné pleti, a díky tomu je známá více jako léčivo než rostlinný hormon. V této práci však bude popsána pouze její funkce v imunitním systému rostlin.

Dříve byly fenolické sloučeniny včetně SA syntetizované rostlinami považovány za látky, které nejsou nezbytné pro vývoj a růst rostlin, neboť netvoří stavební látky a jejich nedostatek nezpůsobuje okamžitou smrt, a proto také byly označovány jako tzv. sekundární metabolity (Hadacek a Chobot, 2011). Díky mnoha výzkumům a několika objevům zejména ze 70. let, byla tato teze postupně vyvrácena. První průlom ve výzkumu hormonální funkce SA v rostlinách nastal, když byla zjištěna SA v míze floému kvetoucí řepně durkomanu (*Xanthium strumarium*) a aplikace mízy vyvolala kvetení v okřehku hrbatém (*Lemna gibba*), díky tomu byla SA navržena jako endogenní signální molekula u rostlin (Cleland a Ajami, 1974). Za druhý zásadní objev, který dokládá význam této sloučeniny, je považována výrazná změna termogeneze v centrálním sloupci stonku užovníku skvrnitého (*Sauromatum guttatum*) při zvýšení hladiny SA. Kromě toho při vnějším ošetření SA docházelo k nárůstu teploty stonku (Raskin, 1992). Další klíčové zjištění spočívalo v tom, že SA hraje velkou roli v odpovědi rostlin na biotický stres (White, 1979).

Úloha SA při interakci rostlin a mikrobiálních patogenů je zcela zásadní pro zachování životaschopnosti konkrétní rostliny. V první fázi interakce dochází k rozpoznání molekulárních struktur typických pro povrch patogenních organismů (PAMP, „pathogen-associated molecular patterns“) a je vyvolána imunitní reakce (PTI, „PAMP-triggered immunity“), která zabraňuje kolonizaci rostliny patogenem. Během evolučního vývoje infekčních strategií v interakcích s rostlinami se podařilo patogenům vyvinout specifické efekty, které tlumí obranné mechanismy vyvolané PAMP, a hostitelské rostliny naopak vyvinuly proteiny rezistence (R), které detekují přítomnost patogenních efektorů a indukují druhou složku vrozené imunity vyvolané efekty (ETI,

„effector triggered immunity“)(Jones a Dangl, 2006). Aktivace signálních cest obranných mechanismů rostliny (PTI nebo ETI) vede k vytvoření mobilního signálu, který se pohybuje z lokálně infikované tkáně do distálních tkání, což vyvolává systémově získanou rezistenci (SAR). Imunitní odpovědi zprostředkované SA jsou důležitými součástmi PTI a ETI (Tsuda *et al.*, 2009) a jsou také nezbytné pro aktivaci SAR (Durrant a Dong, 2004). Studie u různých rostlinných druhů ukázaly, že infekce patogeny vede k akumulaci SA nejen u infikovaných listů, ale i v neinfikovaných listech, které vyvíjejí SAR (Malamy *et al.*, 1990).

SA se dále účastní regulace velké množství fyziologických pochodů, jako například klíčení semen, dýchání, buněčný růst, zavírání průduchů a stárnutí (Vlot *et al.*, 2009; Rivas-San Vicente a Plasencia, 2011). Také bylo zjištěno, že SA je společně s dalšími rostlinnými hormony nezbytným prvkem v odpovědích na abiotický stres, jako je teplo, chlad, sucho, zasolení nebo osmotický stres (Miura a Tada, 2014; Khan *et al.*, 2015).

SA však není jediný rostlinný hormon podílející se na rostlinné imunitě. Dochází k vzájemnému působení a ovlivňování konkrétních signálních drah mezi sebou. Mezi klasické fytohormony, které se účastní této interakce, byly kromě SA považovány kyselina jasmonová (JA) a etylén (ET) jako hlavní hormony podílející se na rezistenci proti herbivornímu hmyzu. V poslední době zjišťujeme, že i ostatní fytohormony jako např. auxiny, cytokininy, brassinosteroidy, kyseliny abscisová či gibberelová zaujímají v obraně rostlin důležité místo (An a Mou, 2011).

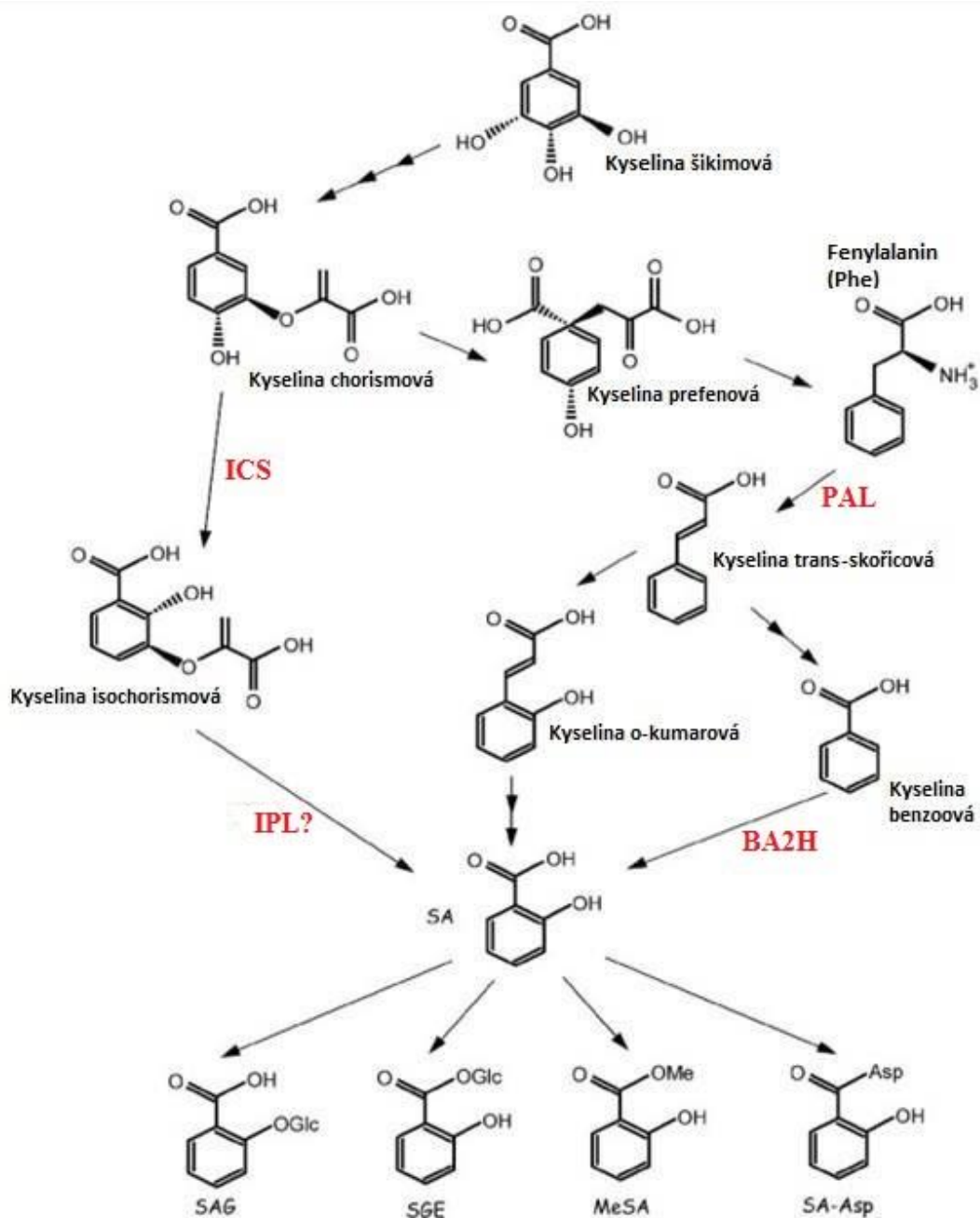
2 BIOSYNTÉZA A DEGRADACE KYSELINY SALICYLOVÉ V ROSTLINÁCH

2.1 Biosyntetické cesty

V současné době byly identifikovány dvě odlišné enzymové dráhy pro biosyntézu SA v rostlinách - dráha fenylalaninamoniaklyasy (PAL, EC 4.3.1.5) a isochorismátu (IC), přičemž ani jedna z nich není dodnes kompletně prozkoumána. První zmíněná dráha probíhá v cytoplasmě a vychází z fenylalaninu, který je konvertován působením PAL na kyselinu trans-skořicovou, kterou je hydroxylací přeměněna na kyselinu kumarovou a následně přímo na SA. Jinou možností této dráhy je konverze kyseliny trans-skořicové na benzaldehyd nebo cinnamoyl-CoA, které se metabolizují na kyselinu benzoovou. Činností benzoát-2-hydroxylasy (EC 1.14.13.12) je kyselina benzoová konvertována na výsledný produkt této dráhy, kterým je SA (Verberne *et al.*, 1999).

Obě cesty obecně využívají chorismát (obr. 1), výsledný produkt šikimátové dráhy, k syntéze SA (Miura a Tada, 2014). Isochorismátsyntasa (ICS, EC 5.4.4.2) a PAL jsou pro tyto dráhy kritickými enzymy. Jejich homology se vyskytují v celém rostlinné říši včetně *Arabidopsis thaliana*, tabáku, rajčat, slunečnic a papriky (Wildermuth *et al.*, 2001; Cochrane *et al.*, 2004; Uppalapati *et al.*, 2007; Catinot *et al.*, 2008; Kim a Hwang, 2014), což poukazuje na velký význam těchto biosyntetických drah pro přežití během evoluce.

Při studiu dráhy isochorismátu v *A. thaliana* byly nalezeny dva geny pro ICS. Předpokládá se, že biosyntéza SA drahou ICS probíhá v chloroplastech, protože ICS1 i ICS2 se nachází právě v této organelle (Serino *et al.*, 1995; Garcion *et al.*, 2008). Převážná část ICS aktivity pochází z isoformy ICS1. To také znamená, že mutace v *ics1* vedou k téměř úplné ztrátě akumulace SA indukované patogenem (Wildermuth *et al.*, 2001). Nicméně rostliny *A. thaliana*, nesoucí mutace ve čtyřech genech kódujících PAL (PAL 1-4), vykazují PAL aktivitu sníženou na 10 % oproti divokému typu, a také akumulaci SA při patogenní infekci sníženou zhruba na 50 % ve srovnání s divokým typem (Huang *et al.*, 2010). Přestože je patrný příspěvek dráhy PAL k rezistenci vůči bakteriím, cesta IC je bezpochyby hlavní drahou pro biosyntézu SA během aktivace rostlinné imunity.



Obr. 1 Schéma biosyntézy aktivních forem SA. SAG, 2-O-β-D-glukosid SA; SGE, ester glukosy a SA; MeSA, metylester SA; SA-Asp, SA konjugovaná s aspartátem (Převzato a upraveno z Miura a Tada, 2014).

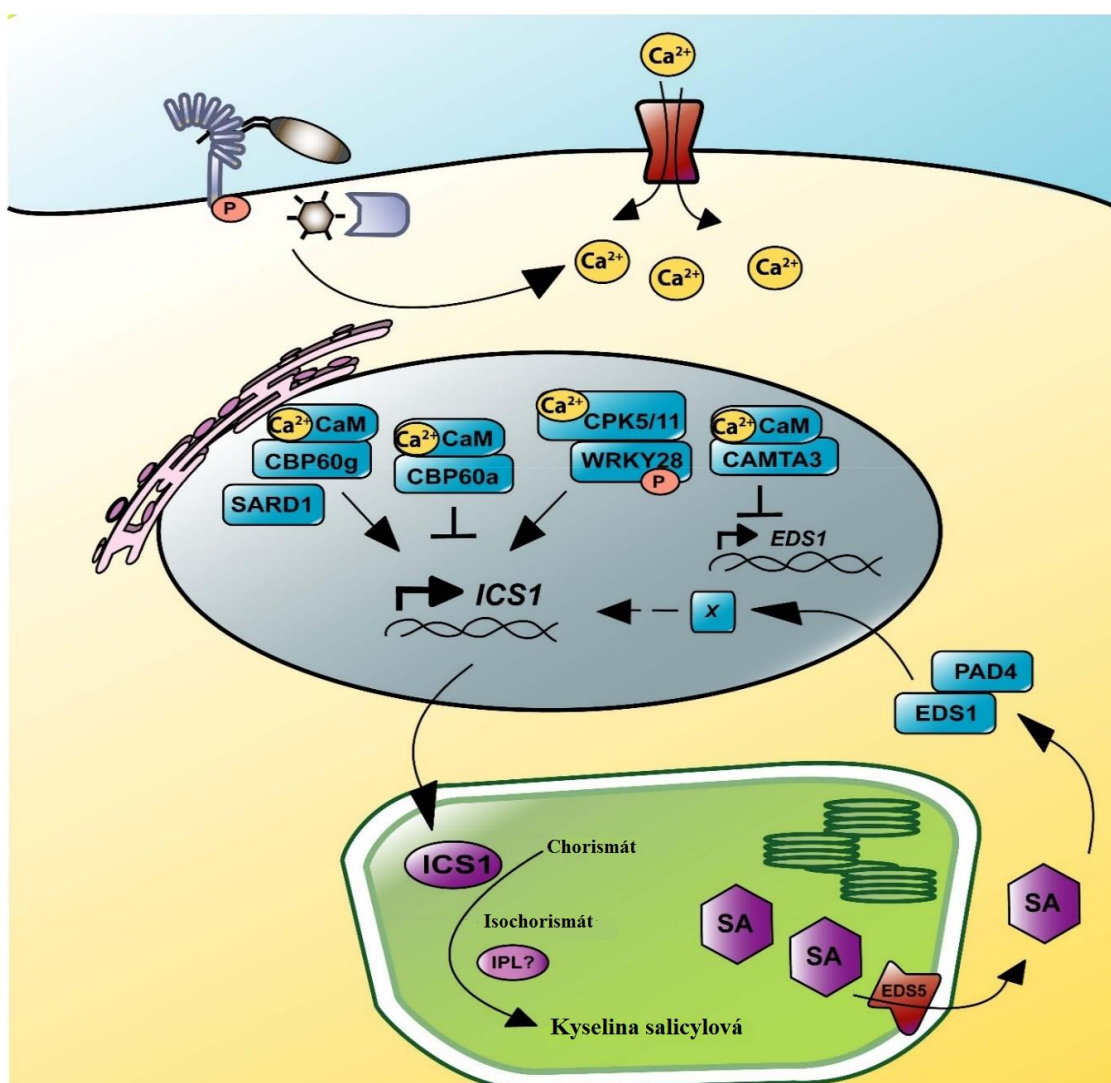
U některých bakterií katalyzuje konverzi IC na SA enzym isochorismátpyruvátlyasa (EC 4.2.99.21)(Serino *et al.*, 1995), avšak v rostlinných genomech nebyly nalezeny geny pro proteiny homologní s bakteriální IPL. Exprese bakteriálních enzymů katalyzujících tuto konverzi spolu s ICS v chloroplastech vede k bazální akumulaci SA (Verberne *et al.*, 2000; Mauch *et al.*, 2001). Je tedy zřejmé, že rostliny mají specifický gen či geny, jehož produkty vykazují IPL aktivitu v chloroplastu. Metabolické enzymy, jako je acylacidamidasyntetasa GH3.12/PBS3 (EC 6.3.2-)(Nobuta *et al.*, 2007; Okrent *et al.*, 2009) a acyltransferasa (EPS1, „enhanced pseudomonas susceptibility 1“, EC 2.3.1.1)(Zheng *et al.*, 2009), mohou na základě výrazně podobných mutantních fenotypů a předpokládaných enzymových aktivit fungovat v ICS dráze jako katalyzátory reakcí při přeměně isochorismátu na SA. Podobnost mutantů *eps1* a *pbs3* je patrná po infekci *Pseudomonas syringae*, kdy je výrazně snížena akumulace SA oproti divokému typu. V případě syntézy SA v *P. aeruginosa* IPL katalyzuje eliminaci enolpyruvylového postranního řetězce z isochorismátu za vzniku SA a pyruvátu. Bohužel zatím není zřejmé, jak může být aktivita PBS3 a acyltransferasy (EPS1) začleněna do reakcí vedoucích k eliminaci enolpyruvylového postranního řetězce z isochorismátu. Z toho vyplývá, že biosyntéza SA v rostlinách může být ve srovnání s bakteriemi složitější. Export SA z chloroplastů je zprostředkován transportérem MATE EDS5. Tento přenos je velmi důležitý pro akumulaci a distribuci SA v buňce, proto je u mutantů *eds5* hromadění SA ohroženo (Ishihara *et al.*, 2008).

Bylo prokázáno, že mnoho abiotických či biotických stresových faktorů moduluje hlavní enzymy, které se podílejí na biosyntéze SA v rostlinách. Nadprodukce SA prostřednictvím zvýšené aktivity enzymů biosyntetických drah SA (hlavně ICS a PAL) přispívá k obraně rostlin proti okolním stresům (Wildermuth *et al.*, 2001). Syntéza SA za vysoké aktivity ICS byla prokázána i po expozici ozonem (Ogawa *et al.*, 2005). Aplikace SA může pozitivně regulovat ICS1 a zlepšit toleranci při suchu u rostlin, jako je *A. thaliana* (Hunter *et al.*, 2013). Navíc studie na mutantech *A. thaliana* (*ics1* a *ics2*) potvrdila, že ICS2 může v nepřítomnosti ICS1 kódovat funkční ICS enzym, avšak v omezeném množství (Garcion *et al.*, 2008). Zapojení zvýšené aktivity PAL během tolerance na vysoké nebo nízké teploty, bylo dokumentováno u banánovníku (Chen *et al.*, 2008). Nedávno bylo zjištěno, že deficit vody i expozice UV-B záření způsobují akumulaci SA v důsledku zvýšené aktivity PAL a benzoát-2-hydroxylasy (Bandurska a Cieslak, 2013).

2.2 Regulace biosyntézy kyseliny salicylové

2.2.1 Transkripční regulace ICS1 a signální dráhy Ca²⁺ iontů

Biosyntéza SA je přísně regulována, jelikož bazální akumulace této kyseliny má negativní dopady na kondici rostlin (Ishihara *et al.*, 2008). Bylo jednoznačně prokázáno, že transkripční kontrola *ICS1* prostřednictvím signalizace vápníkem je klíčem k regulaci biosyntézy SA (obr. 2). Koncentrace iontů vápníku v cytosolu přechodně vzrůstá po aktivaci Ca²⁺ kanálů po aktivaci imunitních receptorů. Zvýšení intracelulárního Ca²⁺ je rozpoznáno senzorovými proteiny, jako jsou kalmodulin (CaM) a Ca²⁺-dependentní proteinkiny (CDPK, Boudsocq a Sheen, 2013).



Obr. 2 Regulace akumulace SA signální drahou vápenatých iontů (převzato a upraveno ze Seyfferth, 2014)

Během imunitní odpovědi *A. thaliana* je transkripce *ICS1* regulována transkripčním faktorem CBP60g („calmodulin binding protein 60g“) vázajícím CaM a jeho homologem SARD1 („systemic acquired resistance deficient 1“)(Zhang *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2012). Vazba CaM je pro funkci CBP60g nutná, protože jen tak schopen reagovat na změny koncentrace cytosolického vápníku, zatímco na SARD1 se CaM zřejmě neváže. Přes tento rozdíl jsou CBP60g a SARD1 zčásti redundantní pro expresi *ICS1* a akumulaci SA během imunitních odpovědí rostlin. Tato dvojitá regulace transkripce *ICS1* se jeví jako důležitá pro časovou dynamiku biosyntézy SA. CBP60g přispívá hlavně k biosyntéze SA v počátečních stádiích po infekci *P. syringae*, kdy dochází k influxu vápenatých iontů, oproti tomu SARD1 řídí biosyntézu až v pozdních stádiích, když koncentrace vápenatých iontů klesne (Wan *et al.*, 2012). Na druhou stranu existuje velmi blízký homolog CBP60g, který nese název CBP60a a je schopen negativně regulovat expresi *ICS1* při vazbě na CaM (Truman *et al.*, 2013). Je možné, že po napadení patogenem se CBP60g a SARD1 specificky váží na sekvenci GAAATTTTGG v promotoru *ICS1* a aktivují jeho expresi. Tímto spojením se ruší vazba mezi negativním regulátorem CBP60a a promotorem *ICS1* (Seyfferth a Tsuda, 2014). Indukce *ICS1* a tím i biosyntéza SA je inhibována v dvojitém mutantu *A. thaliana* pro CBP60g a SARD1, což vede k narušení aktivace systémově získané rezistence (Zhang *et al.*, 2010).

Mezi další regulátory, které mají vliv, i když pouze nepřímý, na transkripci *ICS1*, řadíme několik zástupců kinas, jejichž aktivita je zvýšená úměrně množství Ca^{2+} . Nedávno bylo prokázáno, že tyto CDP-kinasy, CPK4, 5, 6 a 11 jsou lokalizovány v jádře, kde ve vzájemném působení fosforylují transkripční faktory WRKY. WRKY8, WRKY28 a WRKY48 jsou regulovány CDP-kinasami během efektem vyvolané imunity (ETI) zprostředkované imunitními receptory asociovanými s plazmatickou membránou, jako jsou například RPS2 („resistance to *P. syringae* 2“) nebo RPM1 („resistance to *P. syringae* pv *maculicola* 1“)(Gao *et al.*, 2013). Rostliny s mutací WRKY8 nebo WRKY48 jsou ohroženy v patogenem vyvolané expresi *ICS1*. V případě WRKY28 probíhá interakce přímo s promotorem *ICS1* (van Verk *et al.*, 2011), tento transkripční faktor může být regulován fosforylovací prostřednictvím CPK4, CPK5, CPK6 nebo CPK11. Souhrně tyto výsledky naznačují, že během ETI tyto CDPK přenášejí signál zvýšené hladiny intracelulárního Ca^{2+} k aktivaci transkripce *ICS1* prostřednictvím transkripčních faktorů WRKY.

Signální dráhy vápenatých iontů kromě regulace *ICS1* ovlivňují také udržování akumulace SA prostřednictvím transkripční regulace *EDS1* („enhanced disease susceptibility 1“, Du *et al.*, 2009). Transkripční faktor vázající CAMTA3/SR1 („calmodulin binding transcription activator 3/signal-responsive gene“), se váže na promotor *EDS1* pro potlačení jeho transkripce. Mutanty CAMTA3/SR1 vykazují zvýšené hladiny SA, zvýšenou imunitu proti *P. syringae* a proti houbovému patogenu *Botrytis cinerea*. Kombinatorní mutantní analýza ukazuje, že CAMTA3/SR1 a jeho homology CAMTA1/2 potlačují expresi CBP60g, SARD1 a ICS1 (Kim *et al.*, 2013). Tři CAMTA homology tedy koordinovaně potlačují akumulaci SA, ale doposud není známo, jestli pro transkripční faktory CAMTA cílovými sekvencemi přímo promotory CBP60g, SARD1 a ICS1. Souhrnně tyto výsledky jasně ukazují význam signalizace Ca^{2+} při regulaci akumulace SA během aktivace rostlinné imunity přes transkripční regulaci genů zapojených do biosyntézy a udržování SA. Nicméně způsob, jakým rostliny prostorově koordinují pozitivní a negativní regulátory SA biosyntézy a akumulaci SA, ještě není zcela znám.

2.2.2 Další proteiny v nepřímé regulaci biosyntézy SA

Vedle proteinů, které se přímo zapojují do biosyntézy (ICS a PAL) nebo transportu (EDS5) SA bylo identifikováno množství dalších proteinů, které se nepřímo podílejí na akumulaci SA indukované patogenem, a tím také i regulaci SAR. Jedná se o *EDS1* („enhanced disease susceptibility 1“), *PAD4* („phytoalexin deficient 4“) a *NDR1* („non-race specific disease resistance 1“), (Knepper *et al.*, 2011). Mutace v *EDS1*, *PAD4* nebo *NDR1* způsobují částečné snížení hladin SA. *EDS1* a *PAD4* jsou „lipase-like“ proteiny, které společně s dalším „lipase-like“ proteinem *SAG101* („senescence associated gene 101“) tvoří binární a ternární komplexy (Zhu *et al.*, 2011).

Po napadení rostlin *A. thaliana* bakterií *P. syringae* nedochází u mutantních rostlin *eds1* či *pad4* k nárůstu transkripce *ICS1*. Hladina SA se téměř nemění v porovnání s hladinou u rostlin, jež nebyly bakterií napadeny. V případě těchto mutantů dojde po aplikaci SA k obnovení exprese genů spojených se signální dráhou SA, jako např. genu *PR-1* („pathogenesis related protein 1“)(Feys *et al.*, 2001). *EDS1*, *PAD4* a *SAG101* mohou mezi sebou v cytosolu vytvářet heterodimery, jejich tvorba funguje jako kladný regulátor kaskády SA. Uvnitř této dráhy, která byla iniciována působením výše zmíněných proteinů, je funkční pozitivní zpětná vazba, jelikož při vzrůstu úrovně SA dochází také k nárůstu exprese *EDS1*, *PAD4* a *SAG101* (Vlot *et al.*, 2009).

2.3 Metabolismus kyseliny salicylové

V případě SA dochází k její přeměně na množství různých produktů. Nejvýznamnější metabolickou drahou SA je glukosylace hydroxylové skupiny, katalyzovaná SA-glukosyltransferasou (SAGT, EC 2.4.1.35), za vzniku SA-O- β -glukosidu (SAG). Řadí se mezi zásobní formy salicylátu vyskytující se převážně ve vakuolách (Dean *et al.*, 2005). Dále může v menší míře docházet ke glukosylaci karboxylové skupiny za vzniku esteru SA, tato reakce je také katalyzována SAGT. Další metabolit SA vznikající po její methyloaci na karboxylové skupině je metylester kyseliny salicylové (MeSA), což je velmi těkavá látka, která se pravděpodobně podílí na šíření signálu o přítomnosti patogenu i na okolní rostliny (Sendon *et al.*, 2011). Mezi další přeměny SA patří konjugace s aminokyselinami, hydroxylace za vzniku kyseliny gentisové a pravděpodobně i sulfonace, kdy SA funguje jako substrát sulfotransferás za vzniku SA-2-sulfonátu, přičemž tato reakce zatím byla prokázáno pouze *in vitro*.

Některé chemicky příbuzné látky při vnějším ošetření rostlin indukují podobně jako SA expresi PR proteinů a na ni navazující obranu rostlin proti infekci. Tyto molekuly lze označit jako funkční analogy SA. Nejznámějším zástupcem je například kyselina 2-acetyloxybenzoová (acylpyrin, obchodní názvy Aspirin nebo Anopyrin), jež je využíván při léčbě horečnatých stavů, zánětů, bolestech hlavy apod.

Po ataku rostliny patogeny se zvyšuje hladina SA nejprve lokálně v infikovaných místech, poté prochází floémem mobilní chemický signál vyvolaný SA do dalších částí rostlin. V těchto vzdálených místech dochází působením mobilního signálu k vyvolání SAR, která není trvalá, setrvává pouze několik týdnů a její součástí je zvýšená produkce PR proteinů. V rámci studia signálních drah SA byly vytvořeny tzv. *nahG* rostliny (Friedrich *et al.*, 1995), do kterých byl přenesen bakteriální gen, kódující enzym salicyláthydroxylasu (EC 1.14.13.1). Salicyláthydroxylasa přeměňuje SA na katechol, proto se SA nemůže akumulovat v takové koncentraci jako u nemutantních jedinců a to vede k tomu, že se neakumulují alkalické formy PR proteinů, jejichž expresi SA spouští. Tyto rostliny jsou velice citlivé k napadení viry, bakteriemi a plísněmi.

3 SIGNÁLNÍ DRÁHY KYSELINY SALICYLOVÉ V ROSTLINÁCH

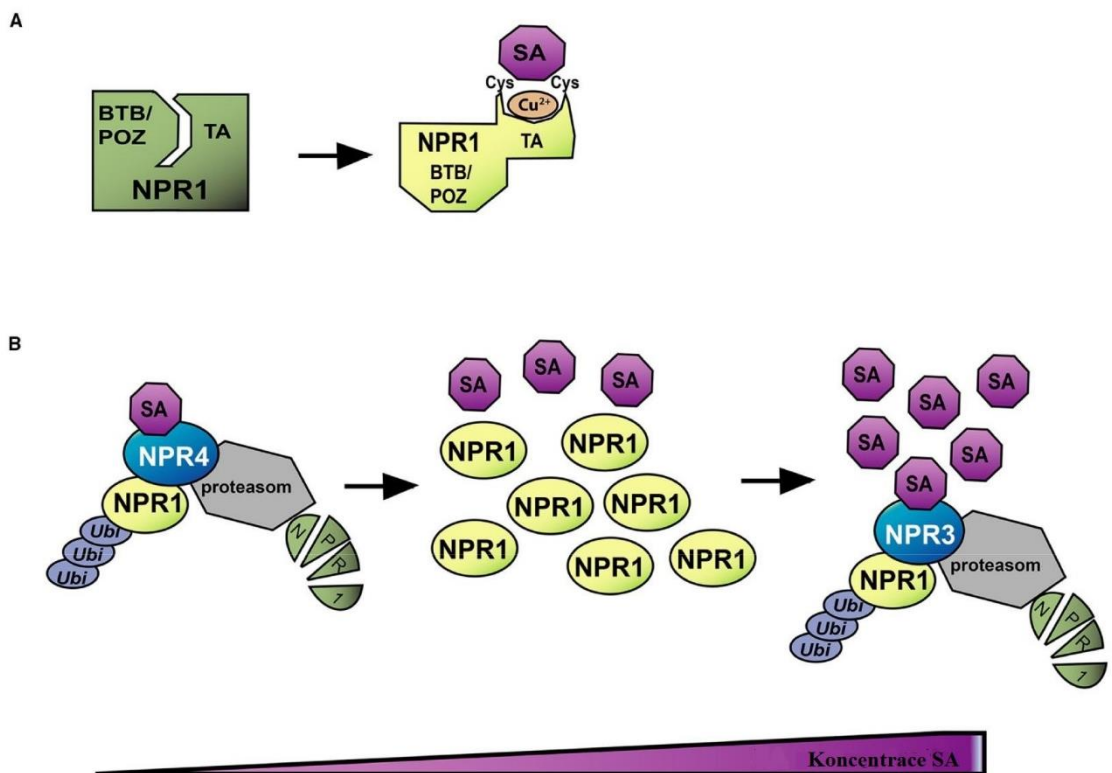
3.1 Vnímání kyseliny salicylové

Identifikace SA receptoru (receptorů) je jedním z hlavních výzkumných zájmů posledních dvou desetiletí. Vzhledem k různým funkcím v reakci na stres životního prostředí mohou mít rostliny několik SA receptorů. Biochemické přístupy identifikovaly množství proteinů interagujících s SA a aktivity těchto proteinů byly ovlivněny vazbou SA (Moreau *et al.*, 2013). Avšak tyto proteiny vázající SA zcela nevysvětlují odpověď SA včetně SA zprostředkované transkripční reprogramace. Nedávno byli tři členové rodiny NPR („non-expressor of pathogenesis-related genes“), NPR1, NPR3 a NPR4 identifikovány jako receptory SA v *A. thaliana* (Wu *et al.*, 2012).

NPR1 je hlavním regulátorem transkripční reprogramace a imunity zprostředkované SA, funguje jako transkripční koaktivátor (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2013). NPR1 obsahuje doménu BTB/POZ („broad complex, tramtrack a bric-à-brac / poxvirus a zinc-finger“) a motiv opakování ankyrinu. Mutace v NPR1 vedou k téměř úplné ztrátě transkripčního reprogramování zprostředkované SA a velké náchylnosti k (hemi)-biotrofním patogenům (Dong, 2004). Proto nebylo jen překvapující, ale senzační, že NPR1 byl popsán jako SA receptor (viz obr. 3A). Pomocí rovnovážné metody bylo určeno, že NPR1 přímo váže SA ($K_d = 140$ nM), ale pouze v případě, že jsou v reakci přítomné a na NPR1 navázané měďnaté ionty na cysteinech 521 a 529. Nicméně, Cys521/529 nejsou zachovány mezi všemi druhy rostlin, což vyvolává otázku evolučního významu mechanismu vnímání SA prostřednictvím NPR1. Kromě toho další studie ukázala, že při použití standardní metody („ligand-binding assay“) NPR1 neváže SA (Yan a Dong, 2014).

Fu *et al.* (2012) identifikovali dva homology NPR1, NPR3 a NPR4 jako SA receptory (viz obr. 3B). NPR1 v nepřítomnosti SA podléhá degradaci cestou proteasomu 26S (Spoel *et al.*, 2009). Jakmile se po infekci patogenem hladina SA zvyšuje, stabilizuje se NPR1. Regulace hladiny NPR1 proteinu je proto kritická pro odezvu SA. Fu *et al.* (2012) zjistili, že NPR3 a NPR4 interagují s NPR1 a jsou vyžadovány pro degradaci NPR1. NPR4 má vysokou afinitu vůči SA ($K_d = 46$ nM), zatímco NPR3 vykazuje nízkou afinitu ($K_d = 981$ nM), což naznačuje rozdílné regulace NPR1 pomocí NPR3 a NPR4. Je zajímavé, že vazba SA narušuje interakci NPR1-PR4,

ale usnadňuje interakci NPR1-NPR3. Tato pozorování podporují navržené schéma, ve kterém NPR3 a NPR4 vytvářejí koncentrační gradient NPR1 za účelem regulace transkripce zprostředkované NPR1. V nepřítomnosti SA degradaci NPR1 zprostředkovává NPR4 a tím zabraňuje akumulaci NPR1, zatímco vysoké hladiny SA také zabraňují akumulaci NPR1, ale prostřednictvím NPR3. Signál zprostředkovaný NPR1 je tedy aktivní pouze u střední hladiny SA. Tento model je v souladu s poznatkem, že protein NPR1 se vysoce akumuluje v blízkosti kolem místa infekce v listu (Seyfferth a Tsuda, 2014). Předpokládá se, že tyto oblasti obsahují střední hladinu SA, zatímco v zóně infekce se mohou hromadit příliš vysoké hladiny SA. Momentálně patří tento model signální dráhy SA závislé na NPR proteinech mezi nejpravděpodobnější, avšak je potřeba jeho další experimentální ověření.



Obr. 3A-B Modely pro vnímání kyseliny salicylové (převzato a upraveno ze Seyfferth, 2014)

3.2 Signalizace SA závislá na NPR1

NPR1 je klíčovým regulátorem, který řídí několik imunitních odpovědí včetně SAR (Dong, 2004). Mutant *npr1* byl poprvé identifikován při screeningu mutantů *A. thaliana*, které nebyly schopné aktivovat expresi *PR* genů nebo rezistenci na onemocnění (Cao *et al.*, 1994). Pozoruhodné je, že tento mutant vykazuje zvýšenou hladinu SA v čase po infekci na rozdíl od rostlin divokého typu (Defraia *et al.*, 2010).

Oblast promotoru genu NPR1 obsahuje sekvenci W-box, která je vazebným místem rodiny proteinů WRKY. Mutace ve W-box sekvencích promotoru genu NPR1 nepříznivě ovlivňují jeho expresi, což naznačuje, že transkripční faktory WRKY hrají důležitou roli při zprostředkování signalizace SA prostřednictvím NPR1 (Yu *et al.*, 2001). Při nedostatku SA nebo pokud nedojde k napadení patogenem se NPR1 nachází v cytosolu ve formě oligomeru, kdy jsou jednotky NPR1 spojeny prostřednictvím intermolekulárních disulfidových vazeb. Po zvýšení koncentrace SA a změně redoxního potenciálu v buňce se uvolňuje NPR1 jako monomer, který se po vazbě SA přesouvá do jádra, kde aktivuje transkripci obranných genů (Mou *et al.*, 2003).

Tímto mechanismem SA ovlivňuje aktivitu NPR1 ve dvou fázích, nejprve aktivuje expresi NPR1 a poté stimuluje translokaci NPR1 do jádra. Změny buněčného redoxního stavu indukované SA vedou k redukci disulfidových vazeb mezi cysteiny Cys82 a Cys216. Redoxní stav buňky je nejspíše kontrolován aktivitou cytosolických thioredoxinů TRXh5 a/nebo TRXh3. Mutace Cys82 nebo Cys216 zvyšuje hladinu monomerního, v jádře lokalizovaného NPR1, a následně reguluje expresi genu *PR-1* (Mou *et al.*, 2003). Aplikace SA a inokulace patogenem zvyšují expresi NPR1. Nadměrná exprese NPR1 nebo jeho homologů poskytuje širokou rezistenci proti různým patogenům u různých rostlinných druhů (Makandar *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). Navíc nadměrná exprese monomerního NPR1, vzniklého narušením tvorby disulfidové vazby, může být využita pro tvorbu transgenních rostlin se zvýšenou odolností vůči chorobám.

V buněčném jádru dochází k navázání NPR1 monomeru na transkripční faktory TGA, které se váží na sekvenci TGACG v DNA (Gatz, 2013). To umožňuje, aby TGA přímo interagovaly pomocí vazby na aktivační sekvenci (as-1). Tato sekvence se nachází v promotorech *PR* genů a jejím prostřednictvím se aktivuje jejich transkripce (Lebel *et al.*, 1998). Genetickou analýzou bylo prokázáno, že transkripční faktory

TGA2, TGA5 a TGA6 inhibují přepis *PR-1* genu bez presence SA, ale jsou nezbytné pro vyvolání transkripce *PR-1* genu za její přítomnosti, což naznačuje redundanci genů TGA v signalizaci SA (Mou *et al.*, 2003). Ačkoli NIMIN1, NIMIN2 a NIMIN3 jsou přechodně indukovány po ošetření *A. thaliana* SA, zdá se, že NIMIN1 negativně reguluje signalizaci SA/NPR1. Nadměrná exprese NIMIN1 vede k méně aktivní ETI a SAR, zatímco snížená exprese stejného genu zvyšuje indukci exprese *PR-1* pomocí SA. (Weigel *et al.*, 2005).

NPR1 je také regulován fosforylací, která probíhá v buněčném jádře. Tento proces přispívá k následné ubikvitinylaci a tím také k proteasomem řízené degradaci, která je nezbytná pro úspěšnou transkripční kontrolu prostřednictvím NPR1 (Spoel *et al.*, 2009)

3.3 Signalizace SA nezávislá na NPR1

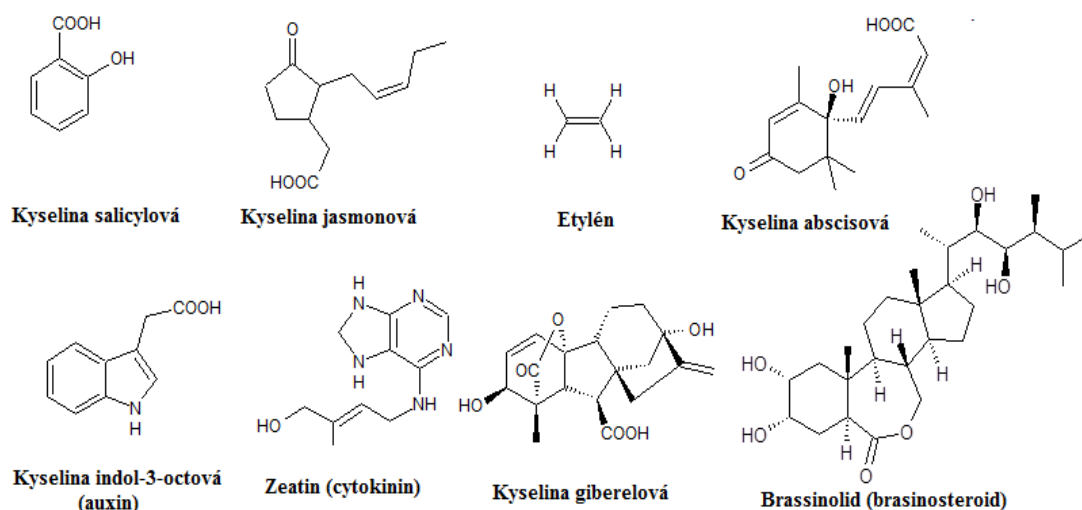
Další publikované výsledky naznačují, že některé aspekty obrany rostlin proti patogenům jsou řízeny signálními cestami závislými na SA, ale nezávislými na NPR1 (Clarke *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 2001). ETI byla potlačena expresí genu NahG, který kóduje salicyláthydroxylasu, ale k potlačení nedošlo v mutantovi *npr1*, což naznačuje zapojení signální dráhy SA nezávislé na NPR1 (Takahashi *et al.*, 2002). Existence tohoto mechanismu je dále podpořena studii různých mutantů *A. thaliana*, které konstitutivně akumulují SA a transkripty *PR* genů dokonce i v nepřítomnosti funkčního genu NPR1.

Předpokládaný negativní regulátor SAR, SNI1, byl identifikován screeningem supresorů mutantů *npr1-1* (Li *et al.*, 2001). Zdá se, že protein SNI1 je jaderný protein s omezenou podobností s myším retinoblastomovým proteinem, což je negativní regulátor transkripce. Více komponent v imunitní dráze nezávislé na NPR1 bylo identifikováno screeningem mutantů *npr1-5* mutovaných ethylmethansulfonátem (EMS) pro konstitutivní expresi *PR* genu. Ssi mutanti, *ssi1*, *ssi2* a *ssi4*, vykazují konstitutivní akumulaci SA a vykazují zvýšenou odolnost vůči různým patogenům (Shirano *et al.*, 2002). Důkaz funkční signální dráhy SA nezávislé na NPR1 byl získán také studii dvojitých mutantů *ssi1 npr1* a *ssi2 npr1*. *Ssi1* a *ssi2* mutantní rostliny, obsahující alelu NPR1 divokého typu, akumulují vyšší hladiny genových transkriptů PR1 než rostliny dvojitých mutantů *ssi1 npr1* a *ssi2 npr1*, což indikuje funkci NPR1 závislé dráhy aditivně s cestou nezávislou na NPR1 (Shah *et al.*, 2001).

Další supresorový mutant NPR1, *snc1*, vykazuje konstitutivní SA-závislou a NPR1-nezávislou obranu v důsledku mutace v TIR-NB-LRR typu R-proteinu. Mutantní rostliny *snc1* akumulují vysoké hladiny SA, konstitutivně exprimují *PR* geny a vykazují zvýšenou odolnost proti patogenům (Li *et al.*, 2001). Byly identifikovány a charakterizovány i další *snc* mutanti jako *snc2-1D* (Zhang *et al.*, 2010) a *snc4-1D* (Bi *et al.*, 2010). Kromě toho skupina genů, které mohou být zapojeny do signálních drah SA nezávislých na NPR1, jsou transkripční faktory jako WHIRLY (WHY) a MYB. WHY1 se váže jako transkripční faktor na DNA bez ohledu na protein NPR1 a pro rostliny mutované v tomto genu je typická inhibice transkripce *PR-1*. AtMYB30 pozitivně reguluje hypersenzitivní odpověď vyvolanou patogenem způsobem na SA závislým, ale nezávislým na NPR1 (Desveaux *et al.*, 2004).

4 PROPOJENÍ SIGNÁLNÍCH DRAH KYSELINY SALICYLOVÉ SE SIGNÁLNÍMI DRAHAMI JINÝCH HORMONŮ

Rostliny jsou napadány a infikovány širokou škálou mikrobiálních patogenů s různorodými efektorovými molekulami a těmito patogeny. Rostliny postupně vyvinuly specifický imunitní systém, pomocí něhož rozpoznávají nevlastní molekuly nebo signály z poraněných buněk a reagují aktivací účinných obranných odpovědí prostřednictvím signální kaskády SA a interakce s jinými fytohormony jako je kys. jasmonová (JA), ethylén (ET), kys. abscisová (ABA), auxiny, kys. giberelová (GA), cytokininy (CK) a brassinosteroidy (BR) (Obr. 4). Jejich dráhy na sebe vzájemně působí a dochází též k interakcím, kdy je možná aktivace či inhibice (Bari a Jones, 2009). V této bakalářské práci bude/je především popsáno propojení signální drah SA, kys. jasmonové a etylénu.



Obr. 4 Zástupci nejdůležitějších skupin růstových regulátorů

4.1 Signální dráhy kyseliny jasmonové a etylénu

Kyselina jasmonová (JA) je přirozený růstový regulátor, řadí se mezi rostlinné hormony ze skupiny jasmonátů. V roce 1971 byla JA izolována jako inhibitor růstu rostlin z filtrátu plísně *Botryodiplodia thebromae* (Aldridge *et al.*, 1971). Postupem času se podařilo nalézt JA a metyljasmonát v mnoha různých druzích jako látky, které podporují stárnutí a inhibují růst rostlin.

Mezi základní funkce jasmonátu patří zvyšování rezistence proti hmyzu a chorobám, zejména vůči nekrotrofním patogenům. V případě zranění či napadení rostliny hmyzem se z narušené buněčné stěny začínají uvolňovat různé oligosacharidy, např. oligogalakturonidy, jež fungují jako nespecifické elicitory a mohou spustit imunitní reakci. Buněčnou stěnu narušují především enzymy celulázy, které byly nalezeny u některých druhů parazitických hub. Z prekursoru prosysteminu dochází k tvorbě aktivní formy proteinu systeminu, který se rychle v rostlině translokuje, což umožňuje rychlou aktivaci obranných systémů. Aktivní systemin přispívá k uvolnění kyseliny linolenové z membránových lipidů za účasti fosfolipasy A2. JA vzniká z kyseliny linolenové za účasti enzymu lipooxygenasy katalýzou peroxidace mastných kyselin. Etylén a JA se mohou přemístit floémem a fungovat jako signální molekuly (Heil a Bostock, 2002). Dále JA ovlivňuje expresi obranných proteinů proti plísním, např. proteinů osmotinu a thioninu. Aktivace signální dráhy JA také vede k indukci inhibitorů proteas (cílených proti hmyzu i ve vzdálených listech), sekundárních metabolitů (alkaloidy a fenolické látky) a také inhibuje buněčné dělení.

Etylén je typický plynný hormon, poprvé byl identifikován v roce 1901 Dimitrijem Neljubovem jako aktivní složka svítiplynu, kdy docházelo ke žloutnutí stromů v bezprostřední blízkosti lamp na svítiplyn. Je to nejjednodušší olefin, hořlavý a lehčí než vzduch. Jeho tvorba v rostlinách je ovlivňována auxiny. Vysoká lokální hladina auxinu vede k lokální biosyntéze etylénu. Etylén pak naopak, mimo jiné, ovlivňuje transport auxinu z buněk.

Díky plynnému skupenství se ET snadno transportuje mezibuněčnými prostory a také bez problému uniká z rostlinných pletiv. ET plní řadu pro rostlinu životně důležitých funkcí. Indukuje tloušťnutí a zkracování stonku, tvorbu kořenů a kořenového vlášení. Stimuluje dlouhivý růst ponořených vodních rostlin, zrání plodů, senescenci květů a listů. Dále má také vliv na tvorbu apikálního háčku u etiolovaných klíčnicích

rostlin a je důležitý při reakci na vodní stres, mechanické poškození či napadení patogenem. Komerčně se často využívá pro opad listů bavlny nebo dozrávání plodů, hlavně u exotického ovoce, jako jsou např. banány.

4.1.1 Interakce signálních drah kyseliny jasmonové, etylénu a kyseliny salicylové

Tato trojice hormonů regulujících imunitní mechanismy rostlin je v dnešní době detailně prostudovaná jak z hlediska signálních drah jednotlivých hormonů, tak i jejich vzájemného působení. Uvádí se, že v *A. thaliana* jsou zapojeny signální dráhy SA převážně při obraně proti biotrofním a hemibiotrofním organismům, na druhou stranu dráhy JA a ET nejčastěji proti organismům nekrotrofním a herbivorním (Glazebrook, 2005). Obecně je působení mezi SA, JA a ET uváděno jako protichůdné, ovšem existuje mnoho prací, které uvádějí důkazy o synergickém vztahu těchto hormonů (Schenk *et al.*, 2000). Je totiž velmi důležité, v jaké fázi rostlinného vývoje dojde k aplikaci a také v jakém množství jsou hormony použity v konkrétním pokusu (Mur *et al.*, 2006). Pozoruhodné výsledky byly získány v práci Kim *et al.* (2014), kde byly použity mutanti v signálních drahách těchto tří fytohormonů. Podařilo se vytvořit mnohonásobné mutanty ve všech kombinacích, u kterých se testovala odpověď na bakteriální patogen *P. syringae*. Dle závěrů této studie se ukazuje, že při dodržení určitých podmínek může mít vztah mezi SA a JA podpůrný charakter, zatímco ET je vůči oběma antagonistický. Přes výsledky této studie je stále ve většině publikací uváděn vztah SA s JA a ET jako protichůdný, což odpovídá většině doposud zkoumaným situacím.

Mezi nejpodstatnější složky signálních drah těchto rostlinných hormonů se řadí transkripční faktory WRKY nebo MPK4 společně s proteiny EDS1, EDS4, PAD4, NPR1 a SSI2 (Petersen *et al.*, 2000; Ndamukong *et al.*, 2007). Signální kaskádu SA zahajují proteiny EDS1, EDS4 a PAD4. Rostliny modifikované v těchto genech jsou citlivé na molekuly spouštějící signální kaskádu JA, což naznačuje negativní interakci mezi SA a JA (Gupta *et al.*, 2000). Řízení přepisu genů transkripčních faktorů WRKY53, WRKY62 a WRKY70 je zprostředkováno NPR1. Tyto geny kódují proteiny zastavující přepis genů podléhajících dráze JA (Li *et al.*, 2007). To znamená, že NPR1 je klíčový v usměrňování a tlumení signalizace JA závislém na SA. Pozoruhodné je, že pro tuto situaci není nezbytná lokalizace NPR1 v oblasti jádra, ale výskyt v cytosolu (Yuan *et al.*, 2007). Inaktivace enzymu MPK4 v *A. thaliana* ruší signalizaci JA a na

druhou stranu aktivuje obranu proti biotrofním patogenům a spouští signální kaskádu SA (Petersen *et al.*, 2000).

Dalším příkladem, kdy je narušena signalizace JA a je naopak aktivovaná signální dráha SA, je zvýšená odolnost vůči chorobám pozorovaná u mutantů *ssi2* (Kachroo *et al.*, 2003), kde gen *ssi2* kóduje enzym stearyl-ACP-desaturasa (EC 1.14.19.2). Exprese tohoto genu závislá na JA je také narušena v případě dvojitých mutantů *mpk4 nahG* nebo *ssi2 nahG*, které neakumulují vysoké hladiny SA. To poukazuje na to, že narušení signalizace JA u jednotlivých mutantů není způsobeno inhibičním účinkem zvýšených hladin SA (Kunkel a Brooks, 2002). *Coil* kóduje F-box protein, který reguluje signalizaci JA tím, že inaktivuje negativní regulátory drah zprostředkovaných JA (Kloek *et al.*, 2001). Na rozdíl od *mpk4* a *ssi2* nevykazují mutantní rostliny *coil* konstitutivní expresi obrany závislé na SA, zatímco v reakci na infekci *P. syringae* je obrana zprostředkovaná SA hyperaktivována.

Stejnou negativní regulační interakci lze nalézt také mezi signálními drahami ET a SA. Genetická charakterizace mutantů *A. thaliana ein2* (mutant necitlivý na ET) ukázala, že základní hladina exprese markerového genu *PR-1*, která je regulována signální drahou SA, je významně vyšší než u rostlin divokého typu. Z toho se dá vyvodit, že modulace cesty SA vlivem ET je závislá na genu *EIN2* a funguje prostřednictvím signální dráhy ET (De Vos *et al.*, 2006).

4.2 Interakce signální dráhy SA s dalšími fytohormony

4.2.1 Kyselina abscisová (ABA)

ABA strukturně patří mezi seskviterpeny, je opticky aktivní a fyziologické účinky má pouze její S-enantiomer. Volná ABA se nachází v chloroplastech a v cytoplasmě. Je to negativní regulátor růstu, což znamená, že inhibuje růst rostliny a klíčení semen, kdy se podílí na udržování dormance semen. Díky působení tohoto rostlinného hormonu nedochází k vyklíčení dříve než za ideálního stavu, který se dá obvykle definovat dostatkem vlhkosti, slunečního záření a tepla. Při stresových podmínkách zastavuje zrání plodů, kdy v podmínkách intenzivního stresu dochází k rychlému zvýšení její hladiny, což může způsobit opadání nezralých plodů. ABA také zvyšuje odolnost vůči dehydrataci a desikaci. (Wasilewska *et al.*, 2008) Je velmi významná v obraně proti vodnímu deficitu, protože snižuje turgorový tlak v buňkách, průduchy se zavírají a nedochází ke ztrátám vody. Mechanismus působení ABA může být buď krátkodobý

prostřednictvím regulace uzavření průduchů, nebo dlouhodobý, kdy se týká změn exprese genů a potlačení růstu (Bari a Jones, 2009).

ABA má tedy zásadní úlohu při adaptaci rostlin na abiotický stres, zatímco její úloha při biotickém stresu je dosud vysvětlena a pochopena v mnohem menší míře. Většinou se uvádí, že při imunitní odpovědi má spíše záporné účinky. Vnější aplikace ABA brání hromadění SA a inhibuje odolnost proti patogenům, konkrétně proti *P. syringae* u *A. thaliana* (Mohr a Cahill, 2007). Podobné výsledky byly zjištěny i u jiných druhů rostlin, např. u rýže (Koga *et al.*, 2004). Působení ABA zabraňuje vzniku systémově získané rezistence, což znamená, že mutanti *A. thaliana* v drahách biosyntézy či signalizace ABA jsou více odolní proti patogenům ve srovnání s rostlinami *A. thaliana* divokého typu (Adie *et al.*, 2007). Dále byla popsána zvýšená produkce ABA a aktivace genů závislých na ABA během interakce rostlin s invazivními patogeny (de Torres-Zabala *et al.*, 2007). Z toho důvodu lze ABA označit jako negativní regulátor signálních kaskád pro obranu rostlin, zejména drah zprostředkovaných SA. Některé studie naznačují, že ABA působí na defenzivní odezvu prostřednictvím regulace ukládání kalosy (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007), tvorby reaktivních forem kyslíku (Xing *et al.*, 2008) nebo regulace transkripce obranných genů (Adie *et al.*, 2007, de Torres-Zabala *et al.*, 2007). Je možné, že antagonistické působení mezi ABA a SA je důsledek nepřímého účinku interakcí mezi ABA, JA a ET (Adie *et al.*, 2007), avšak mechanismus protichůdného působení na molekulární úrovni mezi signálními drahami SA a ABA ještě není přesně vysvětlen (An a Mou, 2011).

4.2.2 Auxiny

Auxiny jsou fytohormony, které ovlivňují většinu stránek rostlinného růstu a vývoje. Byly objeveny při studiu fototropismu, kdy dochází k ohybu rostlin za světlem či zdrojem energie. Jsou syntetizovány ve vrcholových částech stonků a odtud se dostávají dále do všech částí rostliny. Nejznámějším auxinem je kyselina indol-3-octová. Stimuluje buněčné dělení a tvorbu kořenů. Je zapojena také v gravitropismu, při akumulaci v nadzemní části způsobí růst a prodlužování buněk a to vede k ohybu. Naopak v kořenech vede akumulace auxinu k inhibici růstu. Auxin působí jako hlavní signální molekula během komplexní regulace rozmístění i směru růstu hlavních a postranních kořenů v prostoru.

Výsledky nedávných studií naznačují, že mnoho rostlinných patogenů buď může produkovat auxiny samotné, nebo může manipulovat s biosyntézou auxinů hostitele, aby interferovaly s normálním vývojovým procesem hostitelského organismu (Chen *et al.*, 2007). Naopak rostliny vyvinuly mechanismy pro potlačení signalizace auxinu během patogeneze. Rostliny, které nadprodukují obrannou signální molekulu SA, mají často morfologické fenotypy a ty připomínají auxin-deficitní nebo na auxin-necitlivé mutanty. Z toho lze vyvodit, že SA může ovlivňovat auxinovou odpověď. Aplikace SA vede ke globálnímu potlačení genů spojených s auxinem, přičemž tento účinek je možné sledovat i během systémově získané rezistence (Wang *et al.*, 2007). Kromě toho citlivost vůči ataku patogeny je zvýšena po aplikaci auxinu (Chen *et al.*, 2007). Na možnou odlišnou interakci ukazuje skutečnost, že některé enzymy, jež zodpovídají za konjugaci auxinu s aminokyselinami, mohou katalyzovat také jejich konjugaci s SA a působí tak na signální dráhu SA (Park *et al.*, 2007). Mutanty se ztrátou funkčnosti faktorů auxinové odpovědi (ARF), *arf6* a *arf8*, vykazují sníženou expresi genů podílejících se na biosyntéze JA a celkově nízké hladiny JA. Tento fakt potvrzuje závěr, že auxin ovlivňuje signální dráhu JA, a to může znamenat nepřímé ovlivňování dráhy SA (Nagpal *et al.*, 2005). Podle dosavadních znalostí lze usuzovat na to, že působení SA a auxinu je protichůdné (An a Mou, 2011).

4.2.3 Cytokininy

Již v padesátých letech minulého století byly cytokininy popsány jako látky stimulující buněčné dělení v přítomnosti auxinu (Miller *et al.*, 1955). K jejich syntéze dochází všude, kde je nezbytná rychlá cytokineze (embrya, kořeny či plody). Jsou to deriváty adeninu a nejrozšířenějším zástupcem je zeatin. Mezi jejich další funkce kromě stimulace buněčného dělení patří také stimulace diferenciaci chloroplastů a větvení (antagonismus s auxinem). Cytokininy zpomalují senescenci a degradaci chlorofylu. Účastní se klíčení semen, vývoje kořene a prýtu (zejména vodivých pletiv), řídí senescenci listů a velikost semen a odpověď na změny vnějšího prostředí a stresové podmínky (Muller a Sheen, 2007).

Ačkoli úloha CK v obraně rostlin je doposud omezeně známa, existují náznaky, že CK se podílí na regulaci obranných odpovědí rostlin proti některým patogenům. Vyšší hladina cytokininů je spojena s vyšší odolností rostlin vůči *P. syringae*, tvorbou SA a transkripcí *PR-1* (Naseem *et al.*, 2014). Ve studii, kde byl použit mutant s redukovanou tvorbou cytokininů, byl pozorován nárůst transkripce genů, jež jsou

spojené se signální kaskádou SA (Naseem a Dandekar, 2012). V poslední době se ukazuje, že infekce *Rhodococcus fascians* moduluje metabolismus cytokininů v *A. thaliana* (Depuydt *et al.*, 2008). Bylo prokázáno, že *A. tumefaciens* modifikuje biosyntézu CK vysláním klíčového enzymu do plastidů hostitelské rostliny pro podporu tumorogeneze (Sakakibara *et al.*, 2005). Pozoruhodným faktem také zůstává, že zastavení hromadění cytokininů u geneticky modifikovaných rostlin, které mají nefunkční cytokinindehydrogenasu 1 (CKX1, EC 1.5.99.12), vede k nižší transkripci *PR-1* (Choi *et al.*, 2010). Na druhou stranu transgenní rostliny, které nadměrně exprimují *CKX1*, vykazují rezistenci proti infekci *P. brassicae*, což naznačuje, že cytokinin působí jako klíčový faktor ve vývoji nádorovitosti u *A. thaliana* (Siemens *et al.*, 2006). Je známo, že velké množství biotrofních patogenů, na rozdíl od patogenů nekrotrofních, vytváří cytokininy. To podporuje hypotézu, že cytokininy přispívají k obraně proti patogenům hlavně díky podpůrnému vztahu s drahou SA. Navíc bylo zjištěno, že transkripční faktor ARR2, který je součástí signální dráhy cytokininů, se vzájemně ovlivňuje s transkripčním faktorem TGA3, který je zase důležitou složkou dráhy SA (Choi *et al.*, 2010).

4.2.4 Gibereliny

Gibereliny jsou skupinou fytohormonů odvozených od kys. giberelové (GA3). Jsou to látky s tetracyklickou strukturou a jejich tvorba probíhá obecně terpenoidní dráhou v plastidech. Gibereliny jsou produkovány nejen vyššími rostlinami, ale také houbami a bakteriemi. Byly objeveny v plísni *Gibberella fujikuroi*, důležitém patogenu rýže, který sekretuje látku stimulující dlouhivý růst rýže a eliminující tvorbu zrn (Kurosawa, 1926). V roce 1958 byl identifikován giberelin A1 ve vyšších rostlinách (*Phaseolus coccineus*). Pro gibereliny je typická stimulace dlouhivého růstu stonku, buněčného dělení a elongace buněk. Ovlivňují aktivitu amylasy v klíčících obilkách, čímž zprostředkovávají indukci klíčení. Dále gibereliny indukují kvetení, regulují embryogenezi a vývoj plodů.

Je známo, že mutanti defektní ve vnímání GA vykazují změněnou imunitní odpověď. *Gid1* mutant rýže, defektní ve vnímání GA, vykazuje zvýšenou odolnost proti houbovým patogenům (Tanaka *et al.*, 2006). V pokusech s *A. thaliana* se podařilo prokázat vzájemnou interakci signálních drah GA a SA, JA a ET prostřednictvím tzv. DELLA proteinů. Geneticky modifikované rostliny ve čtyřech DELLA proteinech s jejich sníženou expresí byly vysoce citlivé na napadení nekrotrofními patogeny

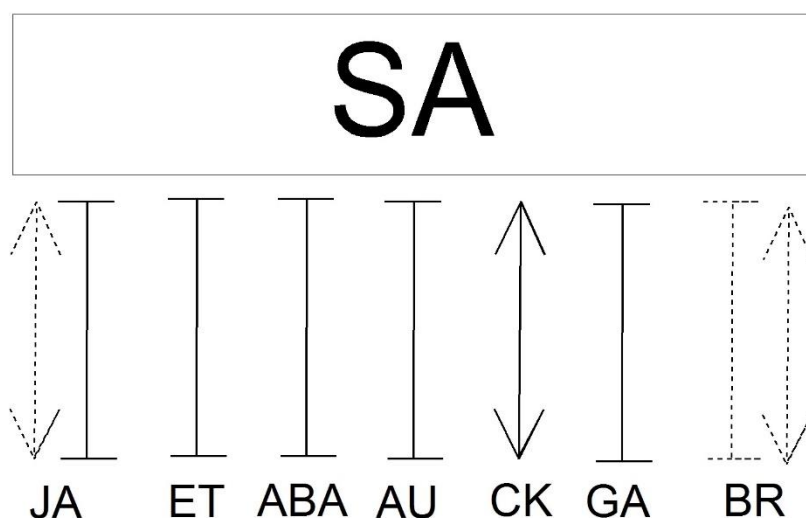
Alternaria brassicicola a *B. cinerea*. Na druhou stranu byly odolnější proti ataku biotrofních patogenů *Pst* DC3000 a *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Navarro *et al.*, 2008). Toto chování bylo objasněno transkriptomickou analýzou, při které bylo zjištěno, že markerové geny regulované SA jsou indukovány rychleji a silněji, ale transkripce genů závislých na JA/ET je zpomalena nebo úplně zastavena. To naznačuje, že DELLA proteiny podporují odolnost proti nekrotrofům a náchylnost k biotrofům, částečně modulací interakce mezi signálními cestami rostlinné obrany zprostředkovanými SA a JA/ET (Navarro *et al.*, 2008). Vzhledem k tomu, že GA stimuluje degradaci proteinů DELLA, lze vyvodit, že GA funguje při podpoře rezistence vůči biotrofům a náchylnosti k nekrotrofům. DELLA proteiny také stimulují expresi genů kódující antioxidantní enzymy katabolismu ROS, čímž regulují nárůst hladiny ROS při biotickém nebo abiotickém stresu (Achard *et al.*, 2008). Kromě toho aplikace SA tlumí signální dráhu GA a její vliv na růst rostlin (Gallego-Giraldo *et al.*, 2011).

4.2.5 Brassinosteroidy

Brassinosteroidy jsou jedinečnou třídou rostlinných hormonů, které jsou strukturálně příbuzné živočišným steroidním hormonům. Byly poprvé nalezeny v extraktu z pylu řepky olejky (*Brassica napus*). Je známo, že brassinosteroidy ovlivňují růstové i reprodukční procesy, stimulují růst i dělení buněk, růst mladých vegetativních pletiv (epikotylu, hypokotylu, koleoptilu), indukují kvetení, zrání plodů, klíčení semen, tvorbu a růst kořenů, růst pylových láček, podílejí se na diferenciaci systému vodivých pletiv, hrají spolu s dalšími fytohormony zásadní roli při senescenci, aktivují protonové pumpy v buněčných membránách, ovlivňují fotosyntézu, asimilaci uhlíku a fixaci dusíku, podporují produkci etylénu. Také mají vliv na abiotické stresové odpovědi u rostlin, ale na druhou stranu je velmi málo známo o jejich roli v reakcích na biotické stresy. (Ono *et al.*, 2000).

Důkazy z posledních let naznačují, že BR se podílejí na regulaci obranných reakcí rostlin. Bylo zjištěno, že BR zvyšují u tabáku odolnost vůči viru tabákové mozaiky, *P. syringae* a houbovým patogenům *Oidium* sp.. Podobně bylo prokázáno, že BR zvyšuje rezistenci rýžových rostlin proti infekci *M. grisea* a *Xanthomonas oryzae* (Nakashita *et al.*, 2003). BR indukovaná rezistence však nevyžaduje biosyntézu SA a aktivaci exprese *PR* genů, což svědčí o tom, že rezistence zprostředkovaná BR je nezávislá na obranné signalizaci zprostředkované SA. Bylo prokázáno, že exogenní aplikace 24-epibrasinolidu zabraňuje vzniku symptomů onemocnění na rostlinách

rajčat, které byly inokulovány *Verticillium dahliae*, zatímco neošetřené rostliny vykazovaly závažné projevy onemocnění (Krishna, 2003). Rostliny brambor, které byly ošetřeny BR, vykazovaly odolnost proti infekci *Phytophthora infestans* a tato rezistence byla spojena se zvýšením hladin ABA a ET (Krishna, 2003). To naznačuje, že existuje interakce mezi BR a jiným hormonálním signálem při zprostředkování obranných reakcí v rostlinách. Pokud jsou u rostlin narušeny signální dráhy BR, je u nich patrný zpomalený vývoj. Avšak pokud se provede aplikace BR, produktivita zemědělských plodin se zvýší nejen v množství, ale změna bude zjevná i v kvalitě. O tom, jak funguje interakce mezi BR a SA, není mnoho známo (viz obr. 5). Použití BR potlačuje rezistenci vyvolanou aplikací benzothiadiazolu (BTH), analoga SA, na rostliny rýže (*Oryza sativa*), z čehož vyplývá možný vliv na signální kaskádu SA (Huot *et al.*, 2014).



Obr. 5 Schéma vzájemného působení kyseliny salicylové a ostatních fytohormonů. Plná čára představuje komplexně popsany vztah, přerušovaná čára představuje zatím nevyjasněnou interakci. Šipka značí podpůrný vztah a úsečka vztah protichůdný (převzato a upraveno z Janda, 2016).

5 ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ KYSELINY SALICYLOVÉ

5.1 Příprava rostlinných vzorků

5.1.1 Extrakce volné a vázané SA

SA je součástí řady studií a mnoho z nich závisí na přesných měřeních hladiny SA a 2-O- β -D-glukosidu SA (neaktivní forma skladování SA v rostlinném materiálu). Většina aktuálních extrakčních protokolů SA je založena na metodě kterou publikovali Raskin *et al.* (1989). V této práci stanovovali SA ve zmijovci indickém. Při analýze SA v rostlinách je výtěžek extrakce často velmi nízký a variabilní. To je způsobené sublimací SA zejména při odpařování organických rozpouštědel. Optimalizovaný extrakční postup byl navržen v práci Verberne *et al.* (2002), kdy bylo sublimaci SA zabráněno přidáním hydroxidu sodného. K uvolnění SA z SAG se v současné době využívá kyselá hydrolýza nejčastěji přidavkem HCl a v nedávné době publikovaná enzymová hydrolýza mandlovou β -glykosidasou (EC 3.2.1.21)(Lopéz-Gresa *et al.*, 2016).

5.1.2 SPE extrakce SA s využitím nanočástic

Aktuálním trendem v kvantitativní analýze metabolitů v biologických matricích je nahrazení zdlouhavých extrakčních postupů využívajících organická rozpouštědla metodami extrakce na pevné fázi. Použití SPE metod založených na nanočásticích železa poskytuje výhodu jednoduché separace pomocí permanentního magnetického pole. Magnetické nanočástice oxidu železa byly použity k extrakci např. lidokainu z krysí plazmy (Chu *et al.*, 2011), estrogeneru z plazmy těhotných žen (Wang *et al.*, 2012) nebo fuchsinu z říční vody (Zargar *et al.*, 2009). Magnetické nanočástice byly použity k zakoncentrování a stanovení kyseliny salicylové v krevním séru (Parham a Rahbar, 2009). Metoda použitá v experimentální části bakalářské práce vychází z nedávno publikované práce (Chang *et al.*, 2017). SA obsažená v homogenizovaných vzorcích listů rostlin je absorbovaná na nanočástice Fe_3O_4 , ze kterých je po separaci pomocí magnetu desorbována roztokem acetonitril-hydroxid amonný.

5.2 Metody kvalitativní analýzy

V minulosti byly využívány převážně metody kvalitativní analýzy, např. pro detekci kyseliny salicylové a jejich metabolitů v moči nebo pro analýzu falšovaného aspirinu,

kteřá je založena na reakci kyseliny salicylové s bromovou vodou a tvorbě sraženiny (Watson, 1916).

Pro tuto bakalářskou práci jsou důležité poznatky týkající se metod kvantitativní analýzy.

5.3 Metody kvantitativní analýzy

5.3.1 Spektrální metody

Jejich principem je výměna energie mezi látkou a zářením. Základní rozdělení těchto metod je na metody emisní, založené na měření záření vysílaného vzorkem (plamenová fotometrie, plamenová spektrofotometrie a plamenová spektrografie), metody absorpční, sledující pohlcování záření vzorkem (kolorimetrie, fotometrie, spektrofotometrie a atomová absorpční spektrofotometrie), a na metody luminiscenční, které jsou velmi citlivé (fluorimetrie, laserem indukovaná fluorimetrie, luminometrie)

5.3.1.1 Stanovení kyseliny salicylové spektrálními metodami

Velmi jednoduchý a spolehlivý postup pro spektrofotometrické stanovení SA ve vzorku je založen na tvorbě komplexu SA s FeCl_3 , který má fialové zbarvení a jehož intenzitu lze spektrofotometricky kvantifikovat při 540 nm. Použitelnost této metody pro stanovení SA v rostlinném vzorku byla potvrzena u listů eukalyptu s použitím vody jako rozpouštědla pro extrakci SA (Warrier a Vineetha, 2013).

Mezi historické metody využívané pro detekci kyseliny salicylové a jejich metabolitů v moči lze uvést metodu Levyho a Procknala. Zjednodušeně lze její postup popsat jako smíchání moči s HCl a CCl_4 , protřepání, oddělení organické fáze a přidání roztoku $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Opětovná centrifugace a měření absorbance vodné fáze při 530 nm (Levy a Procknal, 1968). Tato metoda byla zrychlena a vylepšena Faridem. Mezi hlavní rozdíly Faridovy metody patří větší objem organické fáze, je tedy eliminován jeden centrifugační krok, a také proto je čas potřebný pro tuto metodu poloviční. Návratnost uvažované orální dávky salicylátu sodného v moči byla 105,4 %, původní neoptimalizovanou metodou byl výsledek 127,9 %. Použití techniky dvojité extrakce s každým organickým rozpouštědlem zajišťuje lepší návratnost a tím i přesnější výsledky (Farid, 1975).

Další jednoduchá metoda, která byla v nedávné době publikována, je založena na reakci SA s nanočásticemi TiO_2 . Dochází k navázání SA na povrch nanočástic, kdy

vzniká intenzivní žluté zbarvení při pH 5,5 v závislosti na koncentraci SA. Kvantifikaci lze provést spektrofotometricky při 420 nm. Rozsah této metody je od 0,02 do 1,0 mmol·l⁻¹ a detekční limit je 15,4 μmol·l⁻¹. Tato metoda zatím nebyla potvrzena dalšími autory (Tseng *et al.*, 2014).

5.3.2 Chromatografické metody

Tyto metody lze rozdělit na kapalinovou, plynovou, gelovou permeační, iontovou chromatografii a chromatografii na tenké vrstvě. V této práci bude blíže přiblížena chromatografie kapalinová a plynová, které jsou využívány pro analýzu SA.

5.3.2.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie patří mezi velmi účinné separační metody. Poprvé byla použita M. S. Cvětem, kterému se podařilo separovat pigmenty nacházející se u zelených rostlin. Použil kolony s křídovou, sacharosovou a aluminiovou náplní (Cvět, 1905). Principem těchto metod je rozdělení analytu mezi stacionární a mobilní fázi. Mobilní fáze unáší složky vzorku a obtéká fázi stacionární, opakovaně se ustanovuje rovnováha. V dnešní době se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), nebo ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC).

Detektory mohou být např. spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické a v poslední době nejcitlivější detektory hmotnostně spektrometrické, které se řadí mezi fyzikálně-chemické analytické metody využívající elektrické a magnetické pole k oddělení částic s nábojem k určení jejich hmotnosti. V principu jde o ionizaci analytu a oddělení vzniklých iontů podle poměru jejich hmotnosti a elektrického náboje v magnetickém nebo elektrickém poli (Vidová *et al.*, 2008).

HPLC spolu s fluorescenční detekcí nabízí vysokou citlivost, což je velmi příznivé a široce používané při detekci SA (Venema *et al.*, 1996). Jedním z omezení použití metody HPLC separace s fluorescenční detekcí pro analýzu SA je však rušení způsobené přítomností různých fluorescenčních sloučenin v poměrně vysokých koncentracích v rostlinných extraktech (Bowling *et al.*, 1994). Dalším problémem může být relativně dlouhá doba eluce (přibližně 30 min.). Použití vysoce účinné iontoměničové chromatografie komplexu SA s Fe³⁺ snížilo celkovou dobu analýzy na 15 min. s limitem detekce (LOD) 5 ng·g⁻¹ čerstvé hmotnosti (Rozhon *et al.*, 2005). Další možností je využití HPLC v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií s limitem detekce 1,45 nmol·l⁻¹ a rozsahem detekce 3,6-362 nmol·l⁻¹ (Li *et al.*, 2011).

5.3.2.2 Plynová chromatografie

Principem této separační metody je rovnovážné rozdělení složek vzorku mezi dvě fáze, plynnou (mobilní) a kapalnou nebo tuhoun (stacionární). K separaci dochází v plynné fázi a je vhodná hlavně pro organické a anorganické těkavé látky, které se ovšem nesmí při vypařování rozkládat. Používá se množství detektorů, mezi nejpopulárnější patří plamenový ionizační, elektronového záchytu nebo tepelně vodivostní. Dále se také využívá ve spojení s hmotnostním spektrometrem obdobně jako chromatografie kapalinová.

Vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) jsou dvě běžně používané metody pro kvantifikaci SA (Malamy a Klessig, 1992). GC/MS je technikou, která byla běžně používána ke kvantifikaci SA ve vzorcích rostlin. Je vysoce citlivá, robustní a automatizovaná. Yamamoto *et al.* (1994) byli schopni detekovat a kvantifikovat přirozeně se vyskytující SA v rýži derivatizací SA na methylovaný SA (Yamamoto *et al.*, 1994). Omezení GC/MS však spočívá v potřebě dalšího kroku, konkrétně purifikace vzorku, použití iontoměničové chromatografie nebo SPE na reverzní fázi za účelem snížení složitosti vzorku a odstranění lipidů a chlorofylu (Engelberth *et al.*, 2003). Tento nezbytný další krok zvyšuje celkový čas analýzy a snižuje možnost dalšího použití vzorku.

Identifikace mutantů deficientních v akumulaci SA z mutovaných populací byla prokázána jako účinný způsob, jak studovat mechanismy SA biosyntézy nebo signalizace. V dosud nejrozsáhlejší mutantní screeningové studii byla SA kvantifikována v přibližně 4 500 individuálních rostlinách *A. thaliana* metodami založenými na HPLC (Nawrath a Metraux, 1999). Nicméně za účelem identifikace genetických složek, které se podílejí na biosyntéze nebo signalizaci SA, je třeba zvýšit populaci pro screening mutantů. Proto je potřeba vyvinout vysoce výkonnou metodu s nižšími náklady a časovými nároky na kvantifikaci SA.

5.3.3 Analýza SA s využitím biosenzoru

Huang *et al.* (2006) vyvinuli transgenní bakterii *Acinetobacter* sp. ADPWH_lux, jako biosenzor pro kvantifikaci SA. Tento kmen pochází z *Acinetobacter* sp. ADP1 a obsahuje chromozomální integraci salicylátu indukovaného lux-CDABE operonu, který poskytuje jak substrát, tak enzym potřebný pro citlivou luminiscenční detekci SA.

Produkuje bioluminiscenci v reakci na salicyláty včetně SA, methyl-SA a syntetické deriváty SA jako například kyselinu acetylsalicylovou (Aspirin). Dobře korelované výsledky získané biosenzorem a metodou GC/MS na tabákových listech infikovaných TMV naznačují, že biosenzor je vhodný pro kvantifikaci SA jednoduchým, levným a rychlým způsobem. Detekční rozsah této metody je 0,1–400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a limit detekce je 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Je třeba zdůraznit, že není komerčně dostupný a je potřeba pracovat v laboratoři, kde je schválená práce s geneticky modifikovanými organismy. V tab. 1 je uvedeno srovnání v poslední době publikovaných metod pro detekci SA.

Tabulka 1. Různé detekční systémy pro kyselinu salicylovou

Metoda	Detekční systém	Čas reakce	Rozsah detekce	Limit detekce	Vzorek	Zdroj
Luminiscence	Acinetobacter sp. ADPWH_lux	2 h 37 °C	0,1–400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Tabák listy	Huang <i>et al.</i> , 2006
Absorbance	Myší protilátky	1,5 h 37 °C	0,4-400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Okurka listy	Wang <i>et al.</i> , 2002
	MIONs-based SPE/UV*	5 min.	0,18-9,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	39,8 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	Krevní sérum	Parham a Rahbar, 2009
	TiO ₂ NPs/UV [†]	5 min.	200-1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	15,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Tabák listy	Tseng <i>et al.</i> , 2014
Chromatografie	HF-LLLME-HPLC-UV [‡]	30 min.	0,14-14 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,3 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	Kokos mléko	Wu a Hu, 2009
	LE-MEKC-UV [§]	1 h	0,695-1,56 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	5,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Boryt barvířský	Gao <i>et al.</i> , 2010
	Soxhlet extraction- SPE-CE ^{**}	4 h	14,5-724 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	3,86 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Tabák listy	Xie <i>et al.</i> , 2010
	SPE-HPLC-ESI-MS/MS ^{††}	1 h	3,6-362 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1,45 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	Semena řepky	Li <i>et al.</i> , 2011
	LE-MEEKC-UV ^{‡‡}	1 h	0,72-36,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	86,9 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	Tabák listy	Chen <i>et al.</i> , 2012
	MS-LLLME-CE-UV ^{§§}	50 min.	1,45-3620 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,362 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	Banán, okurka a kapusta	Huang <i>et al.</i> , 2014
	MIONs-based SPE-MEKC-UV ^{***}	40 min.	0,01-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	3,8 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	Tabák listy, mast a šampon	Chang <i>et al.</i> , 2017

* Extrakce pevnou fází – spektrofotometrické stanovení SA s využitím nanočástic oxidu železa jako extrakčního materiálu – UV detekce

[†] Kolorimetrické stanovení SA s využitím nanočástic oxidu titaničitého

[‡] Mikroextrakce kapalina-kapalina-kapalina pomocí dutého vlákna – vysokoúčinná kapalinová chromatografie – UV detekce

[§] Výměna ligandu – micelární elektrokinetická chromatografie – UV detekce

^{**} Extrakce na Soxhletově přístroji – SPE – kapilární elektroforéza

^{††} Extrakce pevnou fází – vysokoúčinná kapalinová chromatografie – tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem

^{‡‡} Výměna ligandu – mikroemulzní elektrokinetická kapilární chromatografie – UV detekce

^{§§} Mikroextrakce kapalina-kapalina-kapalina pomocí membrány v kombinaci s aniontově selektivní kapilární elektroforézou – UV detekce

^{***} SPE s využitím nanočástic oxidu železa v kombinaci s online zakoncentrováním a oddělením SA za použití micelární elektrokinetické chromatografie – UV detekce

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Materiál a chemikálie

6.1.1 Použité chemikálie

- Aceton (Sigma-Aldrich, Německo)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich, Německo)
- Agar (Sigma-Aldrich, Německo)
- Akrylamid (Bio-Rad, USA)
- Bisakrylamid (MP Biomedicals, USA)
- Borohydrid sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Bromfenolová modř (Acros Organics, Belgie)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)
- Cyklohexan (Lachema, Česká republika)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu draselného (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ethyl-acetát (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hexahydrát chloridu železitého (Acros Organics, Belgie)
- Hexahydrát chloridu železnatého (Penta, Česká republika)
- Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydrogenuhlíčitán sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydroxid amonný (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydroxid draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Isopropoxid titanu (Sigma-Aldrich, Německo)

- Kyselina 4-aminosalicylová (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina citronová (Lachema, Česká Republika)
- Kyselina dusičná (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina chloristá (Lachema, Česká Republika)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina salicylová (Penta, Česká republika)
- MES hydrát (Sigma-Aldrich, Německo)
- Methanol (Lach-Ner, Česká republika)
- MS médium s vitaminy (Duchefa, Nizozemsko)
- N, N, N', N'- tetramethylethylendiamin (Sigma-Aldrich, Německo)
- n-butanol (Lach-Ner, Česká republika)
- N-N'-metylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, Německo)
- Octan sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Peroxid vodíku (Lach-Ner, Česká republika)
- Persíran amonný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ponceau S (Merck, Německo)
- Primární protilátka: králičí polyklonální anti-4-ASA (Agrisera, Švédsko)
- Sacharosa (Sigma-Aldrich, Německo)
- SAVO (Unilever, Česká republika)
- Sekundární protilátka: kozí proti králičím IgG značená křenovou peroxidasou (Sigma-Aldrich, USA)
- SERVALight EOS Luminol Solution Reagent A (Serva, Německo)
- SERVALight EOS Peroxide Solution Reagent B (Serva, Německo)
- Sušené nízkotučné mléko (AppliChem, Německo)
- Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MP Biomedicals, Francie)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, Německo)
- Uhličitan sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Vaječný albumin (Lachema, Česká Republika)
- β -glykosidasa (Sigma-Aldrich, Německo)

6.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga 6K15 (Sigma, Německo)
- Centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie)
- Centrifuga Rotanta 460R (Schoeller)
- Digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo)
- Digitální předvážky (KERN, Německo)
- Dokumentační zařízení Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)
- Elektroforetický systém Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA)
- Elektromagnetická míchačka (IKA, Německo)
- Rotační odparka Concentrator plus (Eppendorf, Česká republika)
- Chemiluminiscenční scanner (LI-COR, USA)
- Koncentrátor TurboVap LV (Biotage, Švédsko)
- Míchačka magnetická (IKA, Německo)
- Mikrodestičkový spektrofotometr Synergy H1 (BioTek Instruments, USA)
- Mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko)
- Nitrocelulózová membrána 0,45 μm (Bio-Rad, USA)
- Třepačka Bio Shaker 30 (Biosan, Litva)
- Třepačka vortex V-1 Plus (Biosan, Litva)
- Váhy Denver Summit (Biolink)
- Vortex (Stuart, UK)
- Zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA)

6.3 Rostlinný materiál

- Listy *S. lycopersicum* cv. Micro-tom
- Listy *S. lycopersicum* cv. Micro-tom mutant *nahG*

6.4 Použité metody

6.4.1 Příprava roztoků a pufrů

6.4.1.1 Agarové médium pro kultivaci rostlin

Na přípravu 1 l agarového média bylo naváženo 4,3 g MS média s vitamíny, 10 g sacharosy a 0,195 g MES. Následně bylo upraveno pH na 6,1 pomocí 1 M KOH

a doplněno do 1 l destilovanou vodou. Na 500 ml bylo naváženo 3,5 g agaru a roztok byl autoklávován. Takto připravený agar byl uchováván lednici.

6.4.1.2 Roztoky pro SDS-PAGE

- Elektrodový pufr – navážky 6,05 g Tris, 28,82 g glycin, 2 g SDS, pH 8,3, rozpuštěno v objemu 2 l deionizované vody
- Akrylamid-N,N'-metylenbisakrylamid – navážky 30 g akrylamid, 0,8 g N,N'-metylenbisakrylamid, objem 100 ml
- n-butanol nasycený vodou – smícháno 5 ml vody a 50 ml n-butanolu
- Vzorovací pufr – 2,5 ml 0,5 M Tris/HCl, 4 ml 10% SDS, 2 ml glycerolu, 2 mg bromfenolové modři, 0,31 g dithiothreitolu, objem 10 ml
- 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 – navážka 3 g Tris rozpuštěno v objemu 50 ml deionizované vody
- 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 – navážka 36,3 g Tris rozpuštěno v objemu 200 ml deionizované vody
- 10% persíran amonný – navážka 0,1 g rozpuštěno v objemu 1 ml deionizované vody
- 10% SDS – navážka 10 g SDS rozpuštěno v objemu 100 ml deionizované vody

6.4.1.3 Roztoky pro Western blotting

- Ponceau S – navážka 0,2 g Ponceau S rozpuštěno v objemu 10 ml kyseliny octové a 90 ml deionizované vody
- Blotovací pufr pH 8,3 – navážky 3,025 g Tris, 14,41 g glycinu rozpuštěno ve 200 ml methanolu a doplněno deionizovanou vodou na objem 1 l

6.4.1.4 Roztoky pro imunochemickou detekci

- 1% sušené mléko – navážka 1 g sušeného nízkotučného mléka rozpuštěného ve 100 ml TBS
- TBS pH 7,5 – navážky 4,84 g Tris, 58,44 g NaCl a doplněno deionizovanou vodou na objem 2 l
- Tween v TBS – 0,5 ml Tween-20 v 1 l TBS

6.4.1.5 Roztoky pro ELISA

- PBS pH 5,5 – navážky 1,81 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,203 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,85 g NaCl rozpuštěno v deionizované vodě o objemu 100 ml

- PBS-T – navážka 50 mg Tween 20 rozpštěno v PBS o objemu 100 ml
- Potahovací pufr

Bylo naváženo 0,35 g Na₂CO₃ a 0,84 g NaHCO₃, tyto navážky byly rozpuštěny v deionizované vodě a pH bylo upraveno pomocí NaOH na 9,8. Na závěr bylo deionizovanou vodou doplněno na objem 100 ml.

- Blokovací činidlo

Byl navážen 1 g sérového albuminu a rozpuštěn ve 100 ml deionizované vody.

- Substrát pro detekční HRPX reakci

Nejprve byl připraven acetátový pufr navážením 0,96 g kyseliny citronové a 0,41 g octanu sodného. Tyto navážky byly rozpuštěny v deionizované vody, pH bylo upraveno NaOH na 4,9 a doplněno na objem 100 ml deionizovanou vodou. Dále bylo naváženo 10 mg tetramethylbenzidinu, rozpuštěno v 1 ml DMSO a naředěno acetátovým pufrům v poměru 1:100. Před použitím bylo přidáno 20 µl 30% peroxidu vodíku.

6.4.2 Pěstování rostlin

Semena rajčete *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a mutantu *nahG* byla v menším množství rovnoměrně vyseta po květináči podlouhlého tvaru. Květináče, ve kterých byly rostliny pěstovány, obsahovaly zahradnický substrát a byly uchovávány při teplotě 25°C ve fytotronu. Pro přípravu extraktů byly využity listy 60denních rostlin pěstovaných ve fytotronu.

6.4.2.1 In vitro sterilní kultivace semenáčků *S. lycopersicum*

Semena byla nejprve sterilizována 20 min. v 3% chlornanu sodném a poté 10x propláchnuta destilovanou vodou. Do Petriho misek bylo nalito zahřáté agarové médium a pinzetou byla sterilizovaná semena přenesena na ztuhlý agar. Na jednu Petriho misku bylo vysázeno 10 semen, 2 dny byly inkubovány ve tmě při 25°C a následně přeneseny do fytotronu. Sklizeny byly 7denní a 10denní klíčky.

6.4.3 Příprava extraktů pro analýzu SA

6.4.3.1 SPE extrakce SA na nanočástice Fe₃O₄

Pro přípravu nanočástic bylo na 20 ml destilované vody naváženo 2,24 g FeCl₃.6H₂O (výsledná koncentrace 0,45 mol·l⁻¹) a 0,64 g FeCl₂.6H₂O (výsledná koncentrace 0,15

mol·l⁻¹). Roztok byl probubláván 10 min. dusíkem a za stálého míchání zahříván na 80°C. Pomalu byl přidáván NH₄OH o koncentraci 5 mol·l⁻¹ až do vzniku černého precipitátu. Po vychladnutí byl roztok pomocí magnetu 3x promýván destilovanou vodou a 1x acetonem. Sraženina byla sušena po dobu 12 h při 50°C.

Schopnost nanočástic vázat kyselinu salicylovou byla testována následovně. Byla připravena kalibrační řada roztoků SA o koncentracích 0; 10; 20; 50; 100; 150; 200 a 250 µg·ml⁻¹, do každého bylo přidáno 0,05 g nanočástic. Roztoky obsahující nanočástice se nechaly 10 min. protřepávat a následně 15 min. centrifugovat při 12 000 xg. Supernatant byl separován pomocí magnetu a odlit. K pelletu nanočástic byl přidán 1 ml desorpčního roztoku (methanol a NH₄OH v poměru 6:4) a nechal se inkubovat 30 min., tento krok byl ještě jednou opakován. Po ukončení druhé inkubace byl supernatant separován pomocí magnetu a přepipetován do 2ml mikrozkušavky, odpařen do sucha na třepačce vyhřívané na 80°C nebo na rotační vakuové odparce při teplotě 60°C pro porovnání stability SA při vyšších teplotách. Pro analýzu byl odparek rozpuštěn v 1 ml destilované vody. Obsah SA v jednotlivých standardech po odpaření byl kvantifikován pomocí tvorby komplexu s FeCl₃.

Vzorky listů byly zamrazeny v tekutém dusíku a rozetřeny na prášek v třecí misce, následně byl vzorek přenesen do zkumavky a zvážen. Hmotnost listů se pohybovala okolo 0,5 g. Přidala se suspenze obsahující nanočástice Fe₃O₄, případně standard SA a vzorek se nechal 10 min. protřepávat a následně 15 min. centrifugovat při 12 000 xg. Supernatant se odseparoval pomocí magnetu a odlil. K pelletu nanočástic se přidal desorpční roztok (methanol a NH₄OH v poměru 6:4) a nechal se inkubovat 30 min. Tento krok byl proveden 2x. Spojené supernatanty se separovaly opět pomocí magnetu a nechaly odpařit na rotační odparce do sucha (Chang *et al.*, 2017).

6.4.3.2 Extrakce SA podle Verberne *et al.* (2002)

V prvním kroku bylo 0,5 g vzorku listů rozetřeno v tekutém dusíku na jemný prášek. Dále byl přidán 1 ml 90% methanolu, vzorek byl 1 min. vortexována a 5 min. sonikován na ultrazvukové lázni. Následně byla centrifugována 15 min. při 15 000 xg. Supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky. K pelletu se přidalo 0,5 ml 100% methanolu a opět byla směs sonikována a centrifugována. Supernatant se přidal k první frakci, ke které se přidalo 10 µl NaOH o koncentraci 0,2 mol·l⁻¹. Tato směs byla odpařena do sucha na rotační vakuové odparce. Odparek se nechal rozpustit ve 250 µl

5% kyseliny trichloroctové a následně byla dvakrát provedena extrakce 800 μl roztokem ethylacetátu a cyklohexanu 1:1.

K analýze volné SA se ke spojeným organickým vrstvám přidalo 60 μl acetátové pufru o pH 5,5 a organické fáze se nechal odpařit na rotační vakové odparce při teplotě 40°C.

Pro analýzu glukosidu kyseliny salicylové se k vodní fázi po extrakci přidalo 300 μl HCl o koncentraci 8 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a vzorek byl zahříván 1 h při 80°C. Po ochlazení byla provedena dvojitá extrakce roztokem ethylacetátu a cyklohexanu v poměru 1:1 o objemu 800 μl . Ke spojeným organickým vrstvám se přidalo 60 μl acetátového pufru o pH 5,5 a na rotační vakuové odparce bylo odpařena organická fáze.

6.4.3.3 Extakce podle López-Gresa *et al.* (2016)

Vzorky listů o hmotnosti 0,5 g byly rozetřeny v tekutém dusíku na jemný prášek, následně se ke každému přidalo 1,5 ml 100% methanolu a dále se homogenizovalo. Extrakt byl přenesen do 2ml mikrozkušavky a sonikován na ultrazvukové lázni po dobu 10 min. Následně proběhla centrifugace vzorku 15 min. při 15 000 xg. Do 2 čistých mikrozkušavek bylo odebráno po 0,5 ml supernatantu a odpařeno v proudu dusíku při 40°C.

Vzorek v první zkumavce byl rozpuštěn v 900 μl acetátového pufru (o koncentraci 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 4,5) se 100 μl destilované vody pro analýzu volné SA. Vzorek ve druhé zkumavce byl rozpuštěn v 900 μl (o koncentraci 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 4,5) se 100 μl destilované vody obsahující 10 U β -glykosidasy (EC 3.2.1.21) pro analýzu celkové SA. Směs v druhé zkumavce byla inkubována při 37°C přes noc. Následující den byla reakce zastavena přidáním 5 μl kyseliny chloristé (výsledná koncentrace 5 %). Dále byl vzorek vortexován a inkubován 1 h při 4°C v lednici. Po ukončení inkubace byl centrifugován 15 min. při 15 000 xg a celý objem supernatantu přenesen do 5ml zkumavky. Bylo přidáno 2,5 ml extrakčního činidla (cyklohexan/ethylacetát 1:1). Organická vrstva byla odebrána do čisté zkumavky a odpařena do sucha v proudu dusíku při 40°C.

6.4.4 Spektrofotometrické stanovení kyseliny salicylové

6.4.4.1 Metoda založená na tvorbě komplexu SA a FeCl_3

Byla připravena řada roztoků kyseliny salicylové ve vodě o koncentracích 0; 10; 20; 50; 100; 150; 200 a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dále byl připraven zásobní roztok 5% FeCl_3 . Jednotlivé koncentrace byly v triplikátech pipetovány na mikrodestičku ve 200 μl objemech, následně byl přidán 10x zředěný zásobní roztok FeCl_3 o objemu 50 μl do každé jamky a byla měřena absorbance při 540 nm.

6.4.4.2 Stanovení kyseliny salicylové metodou TiO_2

V prvním kroku byly syntetizovány nanočástice TiO_2 . Do 60 ml destilované vody bylo pomalu za míchání přidáváno 375 μl koncentrované kyseliny dusičné. Za intenzivního míchání na míchače se pomalu přidávalo 10 ml isopropoxidu titanu a vznikla bílá sraženina. Roztok byl zahříván na 80°C a míchán dalších 8 h. Postupně docházelo ke tvorbě solů a poté koloidního roztoku. Vznikl koloid TiO_2 o předpokládané koncentraci 240 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Pro samotnou analýzu SA byla připravena kalibrační řada standardů o koncentracích 0; 10; 25; 50; 100; 250; 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do 1,5 ml mikrozkušavek bylo napipetováno 100 μl jednotlivých standardů, ke každému byl přidán roztok TiO_2 10x zředěný v acetátovém pufru o pH 5,5. Vzorčky byly promíchány na vortexu, následně inkubovány 5 min. při laboratorní teplotě a jejich absorbance byla měřena při 420 nm.

6.4.5 Syntéza konjugátu SA s ovalbuminem a albuminem (4-ASA-OVA a 4-ASA-BSA)

Bylo naváženo 55 mg kyseliny 4-aminosalicylové (4-ASA) a rozpuštěno v 1,43 ml acetonitrilu a 0,14 ml destilované vody. Za stálého míchání bylo po kapkách přidáváno 0,15 ml roztoku glutaraldehydu (množství 2,5 mmol v 0,29 ml acetonitrilu). Tato reakční směs byla míchána dalších 30 min. Za stálého míchání byla reakční směs přidána do roztoku ovalbuminu nebo hovězího sérového albuminu (0,1 g OVA/BSA v 10 ml destilované vody). Bylo opraveno pH na 6,0 s použitím Na_2CO_3 o koncentraci 2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a směs byla míchána dalších 60 min. Za stálého míchání bylo během 30 min. po malých množstvích přidáno 100 mg $\text{Na}(\text{BH}_4)$ a následovalo dalších 30 min. míchání. Reakční směs byla přes noc dialyzována ve fosfátovém pufru o koncentraci 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 7,2 při 4°C. Vzorčky byly rozpipetovány na alikvoty a uchovávány v mrazáku.

6.4.6 Metoda SDS-PAGE elektroforézy

K naředěným vzorkům proteinů (albuminu a ovalbuminu) a k derivátům 4-ASA-OVA a 4-ASA-BSA byl přidán vzorkovací pufr v poměru 1:1. Tyto roztoky byly promíchány na vortexu a umístěny na 5 min. do termobloku nastaveného na teplotu 95°C. Poté byly vzorky ochlazeny v ledové lázni a dále byla provedena centrifugace trvající 5 min. při laboratorní teplotě a 6000 xg. Po ukončení centrifugace byly vzorky připraveny k nanášení do jamek gelu.

Byl připraven 10% dělicí gel a 4% zaostřovací gel. Polymerace byla zahájena přidáním persíranu amonného. Dělicí gel byl připraven jako první a pro vyrovnání hladiny převrstven *n*-butanolem. Po ztuhnutí dělicího gelu byl *n*-butanol odsát filtračním papírem a byl nanášen gel zaostřovací, ve kterém byly vytvořeny jamky pomocí hřebínku. Po ztuhnutí gelu zaostřovacího byla skla s gely přenesena do elektroforetické komůrky s elektrodoým pufrem.

Vzorky byly nanášeny po 10 µl na jamku. Dělení proteinů v zaostřovacím gelu probíhalo při konstantním napětí 120 V, v dělicím gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V. Po doputování zóny bromfenolové modři na úroveň dolního okraje skla elektroforéza běžela dalších 45 minut a následně byla komůrka od zdroje odpojena.

Po ukončení elektroforézy a vyjmutí gelů byly proteiny vizualizovány inkubací asi 30 min. ve fixačním roztoku a poté inkubací přes noc s barvicím roztokem Coomassie Blue G-250. Po odlití barvicího roztoku byly gely opakovaně inkubovány v odbarvovacím roztoku po dobu cca 2 h. Gel byl omyt deionizovanou vodou a focen přístrojem Gel Doc EZ Imager.

Tab. 2 Složení dělicího a zaostřovacího gelu, objemy konkrétních složek jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris HCl 1,5 mol·l ⁻¹ , pH 8,8	Tris HCl 0,5 mol·l ⁻¹ , pH 6,8	H ₂ O	10% SDS	TEMED	10% APS
Dělicí 10%	3,4	2,5	-	3,8	0,1	0,01	0,07
Zaostřovací 4%	1,3	-	2,5	5,9	0,2	0,02	0,12

6.4.7 Western blot

Gely po ukončení elektroforézy, které nebyly použity pro detekci proteinů v gelu, byly použity pro přenos proteinů z gelu na membránu. V prvním kroku byla vystřižena nitroceluloseová membrána zhruba o velikosti gelu. Membrána a všechny další potřeby pro blotování jako je gel, filtrační papíry a porézní houbičky byly před skládáním inkubovány nejméně 10 min v blotovacím pufru. Dále byly potřebné komponenty skládány na černou stranu blotovací kazety v následujícím pořadí: porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír a porézní houbička. Kazeta byla uzavřena a následně vložena do blotovací komůrky, do které se nalil blotovací pufr. Uzavřelo se víko, celá aparatura byla vložena do ledničky a připojena ke zdroji proudu. Velikost potřebného proudu byla spočítána na základě velikosti membrány (na 1 cm² připadá 0,8 mA). Přenos proteinů na membránu probíhal přes noc. Po jeho ukončení byla membrána vyjmuta z kazety a přenos proteinů kontrolován barvením roztokem Ponceau S. Poté byla pro odbarvení membrána opláchnuta deionizovanou vodou a dále použita pro imunochemickou detekci.

6.4.8 Imunochemická detekce proteinů na membráně

Na začátku byl připraven 5% roztok sušeného mléka v TBS, který byl použit pro blokaci membrány. Blokace byla prováděna inkubací membrány v tomto roztoku po dobu 2 h. Po ukončení inkubace byla membrána dvakrát promyta roztokem Tweenu v TBS o objemu 50 ml a to po dobu 10 min. Po důkladném promytí byla inkubována 2 h s 3 μl primární protilátky (králičí polyklonální anti-4-ASA) v 30 ml 1% roztoku sušeného mléka v TBS-T (ředění 1:10000). Dále bylo provedeno dvojité promytí v 50 ml roztoku Tweenu v TBS po dobu 10 min. a následně byla membrána inkubována s 3 μl sekundární protilátky (kozí proti králičím IgG značená křenovou peroxidasou) ve 30 ml 1% roztoku sušeného mléka (ředění 1:10000). Membrána byla inkubována přes noc a následující den byla dvakrát promyta stejně jako v krocích uvedených výše. Membrána byla umístěna na podložku a bylo na ni napipetováno 6 ml roztoku, který obsahoval SERVALight EOS Luminol Solution Reagent A a SERVALight EOS Peroxide Solution Reagent B v poměru 1:1. Vzniklý chemiluminiscenční signál byl zachycen chemiluminiscenčním scannerem.

6.4.9 Nepřímá kompetitivní ELISA

ELISA je v dnešní době řazena mezi nejběžnější imunoanalýzy v biochemických laboratořích. Její specifčnost a citlivost je srovnatelná s radioimunoanalýzou, ale její použití je mnohem bezpečnější. Detekce zahrnuje přeměnu chromogenního substrátu enzymem konjugovaným se sekundární protilátkou (alkalická fosfatasa, křenová peroxidasa).

Všechny kroky byly provedeny při 37°C. Na začátek bylo provedeno potahování destiček. Do jamek 96jamkové mikrotitrační destičky byl nanesen objem 100 µl derivátu 4-ASA-OVA nebo 100 µl 4-ASA-OVA a potahovacího pufru v poměru 1:1. Destičky byly inkubovány přetažené parafínovou folií na třepačce přes noc.

Následující den byly destičky promyty 3x 200 µl PBS a nechaly se volně vyschnout na vzduchu. Poté se do jamek pipetovalo 300 µl blokačního roztoku BSA a blokace probíhala 60 min. při laboratorní teplotě. Po skončení inkubace byl obsah destiček vylit a jamky byly propláchnuty 3x 200 µl PBS.

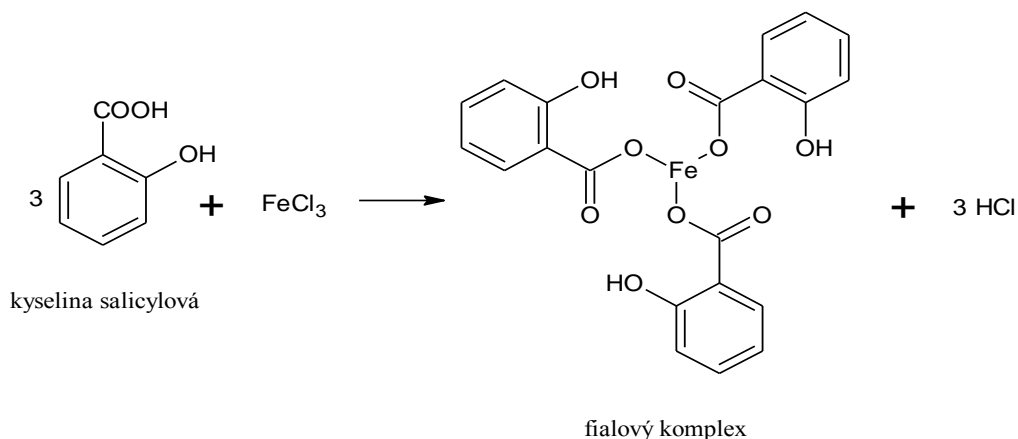
Před stanovením hladiny SA v rostlinném materiálu byla vytvořena kalibrační křivka. Nejprve byla připravena řada standardů SA o koncentracích 0; 0,4; 1; 2; 3; 4 a 5 µg·ml⁻¹. Ke standardům byla přidána v poměru 1:1 primární polyklonální protilátka anti-4-ASA v ředění 1:7500 a standardy s protilátkou byly 2h inkubovány na třepačce. Následně bylo 100 µl každého vzorku přeneseno do jamek připravené ELISA destičky s navázaným konjugátem. Inkubace probíhala 2 h na třepačce, poté byl obsah destiček vylit a jamky byly propláchnuty 3x 200 µl PBS-T. Do každé jamky bylo přidáno 100 µl roztoku sekundární protilátky (kozí proti králíčím IgG značená křenovou peroxidasou). Inkubace probíhala 1 h na třepačce, poté byl obsah opět vylit a jamky byly propláchnuty 3x 200 µl PBS-T. Do každé jamky bylo přidáno 100 µl detekčního roztoku tetrametylbenzidinu. Reakce pozorovaná jako vývoj modrého zbarvení byla po 15 min. zastavena přidávkem 50 µl H₂SO₄ o koncentraci 2 mol·l⁻¹. Absorbance byla měřena při 450 nm.

Při měření hladiny SA v rostlinných vzorcích byly použity extrakty připravené třemi různými extrakčními postupy (viz kapitola 6.4.4). Jednotlivé extrakty byly odpařeny rotační vakuovou odparkou při teplotě 45°C a rozpuštěny v roztoku obsahujícím 50 ng SA v 50 µl. Dále byl postup totožný jako v případě měření kalibrační řady standardů SA.

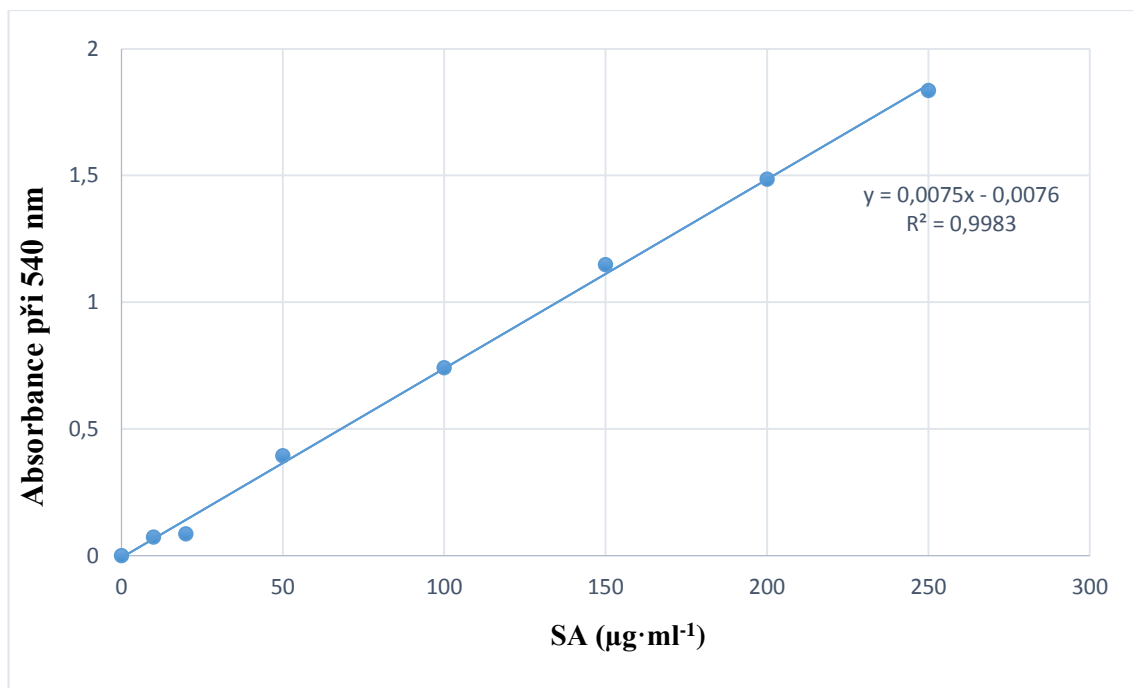
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Metoda založená na tvorbě komplexu SA a FeCl₃

Nejprve byla vytvořena koncentrační řada roztoků SA ve vodě a zásobní roztok 5% FeCl₃. Roztoky byly v triplikátech pipetovány na mikrodestičku ve 200 μl objemech, poté byl k nim přidán 10x zředěný zásobní roztok 5% FeCl₃ o objemu 50 μl. Vznikl fialový komplex (obr. 6), který byl spektrofotometricky kvantifikován při 540 nm. Intenzita zbarvení roztoků rostla s rostoucí koncentrací SA v roztoku. Pomocí koncentrační řady a znalosti tvorby komplexu byla vytvořena kalibrační přímka závislosti absorbance komplexu na koncentraci SA v roztoku (viz obr. 7). Jelikož se pohybujeme v poměrně vysokých hladinách SA, limit detekce je okolo 10 μg·ml⁻¹, a v rostlinách je očekávána hodnota zhruba 0,1 μg·g⁻¹ čerstvé hmotnosti, je tato metoda využitelná spíše ve farmacii než při studiu SA v rostlinách.



Obr. 6 Vznik barevného komplexu při reakci kyseliny salicylové a FeCl₃.

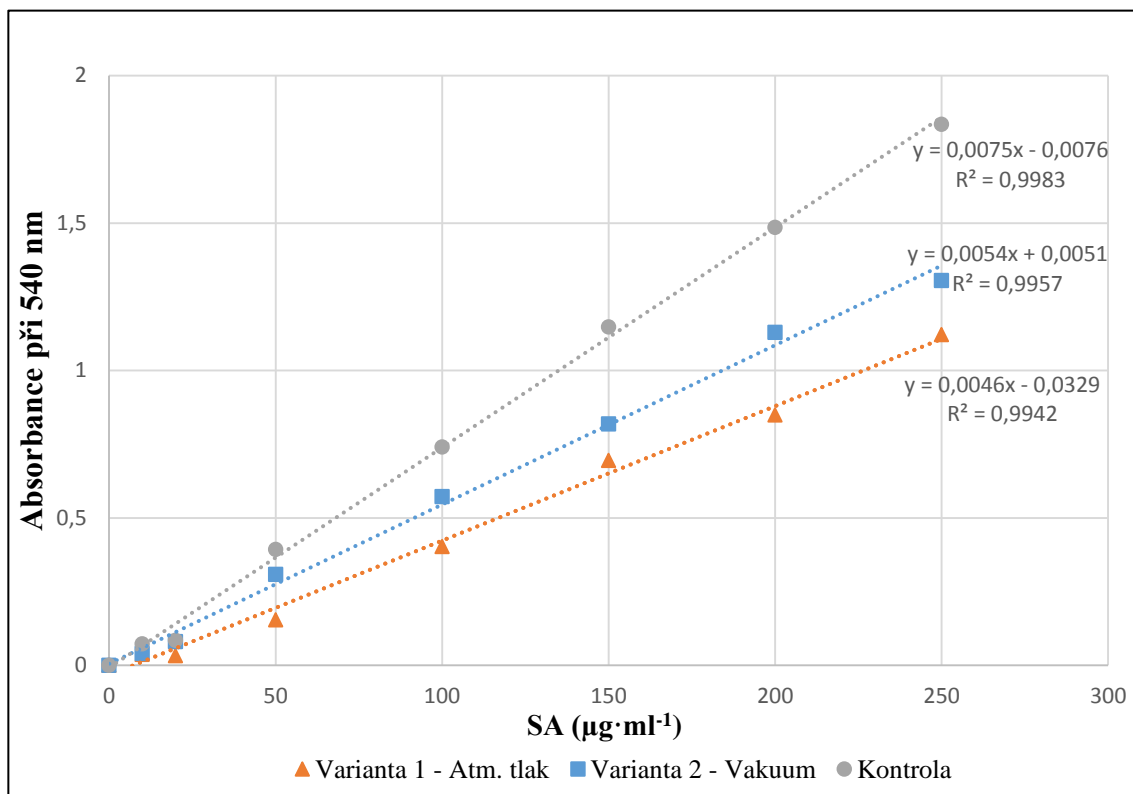


Obr. 7 Kalibrace metody stanovení SA pomocí závislosti absorpce komplexu SA a FeCl₃ na koncentraci SA.

7.2 SPE extrakce kyseliny salicylové na nanočástice Fe₃O₄

Nanočástice byly využity k navázání SA z roztoků o různých koncentracích, které tvořily kalibrační řadu. Jednotlivé roztoky obsahující nanočástice se nechaly třepat a centrifugovat. Pomocí magnetu byl odlit supernatant a k pelletu nanočástic byl 2x napipetován desorpční roztok (methanol a NH₄OH v poměru 6:4), supernatant se nechal odpařit do sucha na vyhřívané třepačce nebo rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml deionizované vody, jednotlivé koncentrace byly v triplikátech pipetovány na mikrodestičku ve 200 µl objemech a před měřením absorpce při 540 nm byl do každé jamky přidán 10x zředěný 5% roztok FeCl₃ o objemu 50 µl (viz kapitola 7.1).

Ze získané kalibrační přímky (viz obr. 8) lze vypočítat, že návratnost navázání kyseliny salicylové na nanočástice a její následná desorpce se u nejvyšší koncentrace a v případě odpařování na vyhřívané třepačce při atmosférickém tlaku a teplotě 80°C pohybuje okolo 60 %, v případě odpaření rotační vakuovou odparkou při teplotě 60°C je účinnost u nejvyšší koncentrace víc než 70 %. Částečné ztráty SA lze vysvětlit těkavostí této sloučeniny. Díky této znalosti lze nanočástice využít pro extrakci a pro zahuštění. Nespornou výhodou použití nanočástic je jednoduchost a rychlost, mezi nevýhody můžeme zařadit možné navázání chemicky podobných látek.

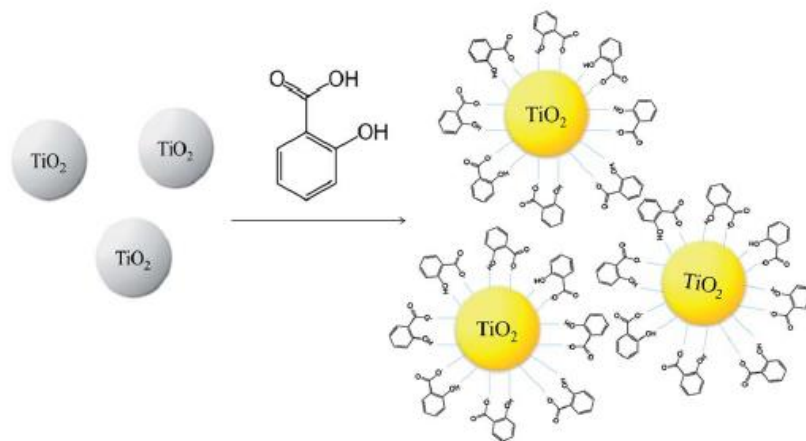


Obr. 8 Kalibrační přímka závislosti absorpce komplexu SA a FeCl_3 na koncentraci SA po desorpci z nanočástic (Kontrola – bez nanočástic, Varianta 1 - thermoshaker, Varianta 2 - rotační vakuová odparka).

7.3 Stanovení kyseliny salicylové metodou TiO_2

V prvním kroku byl připraven koloid nanočástic TiO_2 a řada standardů o různých koncentracích SA. K jednotlivým standardům byl přidán roztok TiO_2 zředěný v acetátovém pufru. Vzorky byly míchány, inkubovány a byla měřena jejich absorpce při 420 nm.

Podle článku Tseng a *et al.* (2014) mělo dojít k navázání SA na nanočástice (viz obr. 8) a vzniku žlutého zbarvení, které lze spektrofotometricky kvantifikovat při 420 nm. V našem případě docházelo k vločkovatění nanočástic a zákalu, který narušoval měření absorpce. K jemně žlutému zbarvení docházelo až kolem koncentrace SA $7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, proto bylo dále od testování této metody upuštěno.

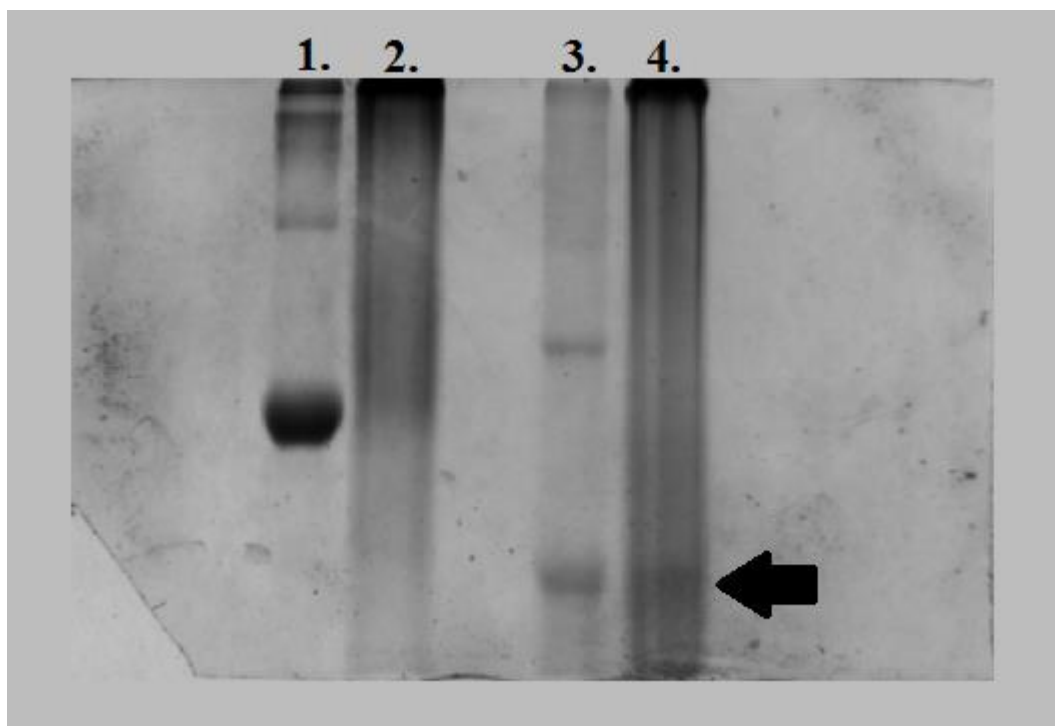


Obr. 9 Schéma kolorimetrického stanovení kyseliny salicylové pomocí nanočástic TiO_2 (Převzato z Tseng *et al.*, 2014).

7.4 Analýza konjugátů SA metodou SDS-PAGE a Western blottingu

Pro elektroforézu byly použity roztoky albuminu a ovalbuminu ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a připravené deriváty 4-ASA-OVA/BSA. Do jamek bylo nanášeno $10 \mu\text{l}$ od každého vzorku. Gel s rozdělenými proteiny po provedené SDS-PAGE se dále využíval pro Western blotting, jehož součástí byla také imunochemická detekce proteinů na membráně.

Byla provedena detekce proteinů v SDS-PAGE gelech (obr. 10). Vizualně lze vyhodnotit, že derivát 4-ASA-BSA se nepodařilo úspěšně připravit, zatímco v případě vzorku konjugátu 4-ASA-OVA je na gelu pozorován proužek s obdobnou molekulovou hmotností jako pro nederivatizovaný OVA.

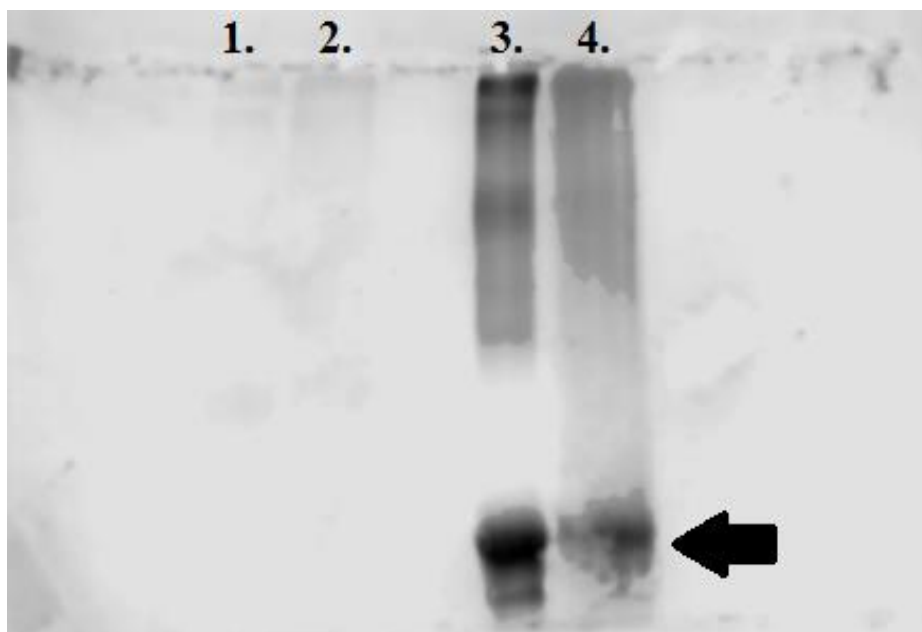


Obr. 10 Detekce proteinů činidlem CBB v SDS-PAGE gelech po separaci vzorků konjugátů 4-ASA-OVA a 4-ASA-BSA. Jamka 1 roztok BSA; 2 4-ASA-BSA; 3 OVA; 4 4-ASA-OVA.

7.5 Imunochemická detekce konjugátů SA

Nejprve byla provedena SDS-PAGE elektroforéza vzorků roztoku albuminu a derivátu 4-ASA-BSA a roztoku ovalbuminu a derivátu 4-ASA-OVA . Následně byl proveden přenos proteinů na membránu a provedena imunochemická detekce s využitím komerční polyklonální králičí protilátky pro SA

Výsledek imunochemické detekce potvrzuje závěr z detekce celkových proteinů v gelu, že se podařilo připravit derivát ovalbuminu, ale derivát se sérovým albuminem již nikoli (obr. 11). Pozorovaná interakce primární protilátky s nederivatizovaným ovalbuminem je pravděpodobně způsobena použitím konjugátu 4-ASA-OVA pro imunizaci, zkušební vzorek komerčního preparátu králičího séra tedy může obsahovat také imunoglobuliny proti vlastnímu ovalbuminu. Tento závěr neznamená omezení při využití protilátky pro detekci SA v rostlinných vzorcích, jelikož ovalbumin se zde přirozeně nevyskytuje.



Obr. 11 Imunochemická detekce konjugátů SA s využitím polyklonální králičí protilátky. Jamka 1 roztok BSA; 2 4-ASA-BSA; 3 OVA; 4 4-ASA-OVA.

7.6 Nepřímá kompetitivní ELISA

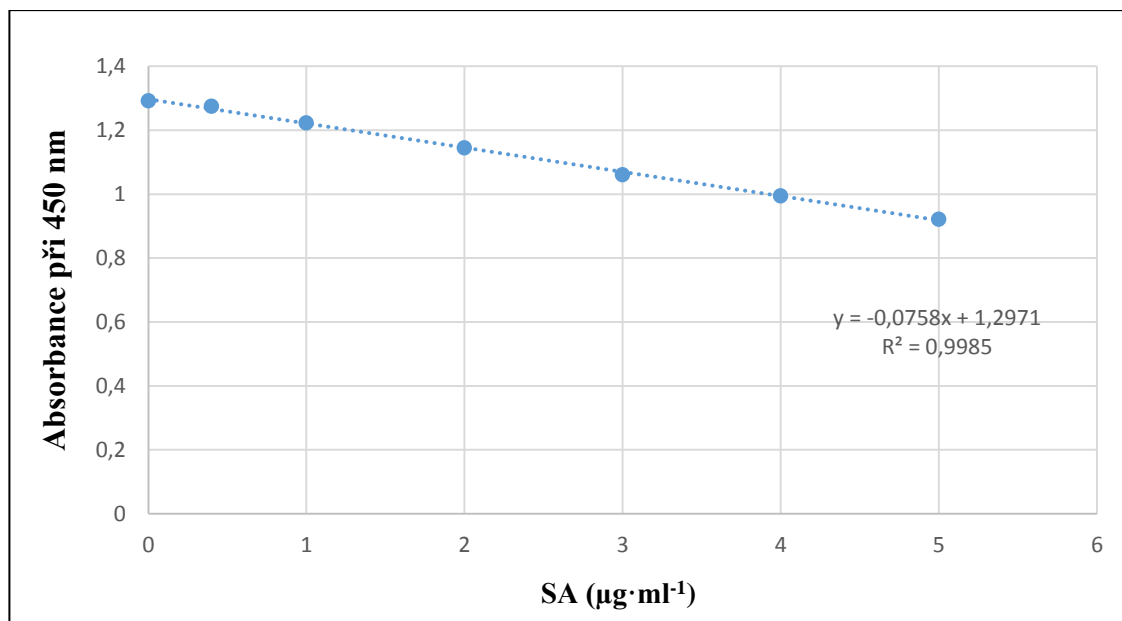
Nejprve byl do jamek 96jamkové mikrotitrační destičky nanesen derivát 4-ASA-OVA. Destička byla inkubována na třepačce přes noc a následující den byly jamky promyty PBS, dále byl použit blokační roztok BSA a proběhla blokace stěn jednotlivých jamek. Byla připravena řada standardů o různých koncentracích kvůli kalibraci metody. Ke standardům byla přidána primární polyklonální protilátka a proběhla inkubace. Poté byl každý vzorek napipetován do jamek ELISA destičky s již navázaným konjugátem, proběhla další inkubace a promytí jamek PBS-T. Následně byla napipetována sekundární protilátka, opět inkubace a po jejím ukončení promytí jamek PBS-T. Nakonec byl přidán detekční roztok tetrametylbenzidinu. Reakce byla po 15 min. zastavena přidáním H_2SO_4 a měřena absorbance při 450 nm. Při měření hladiny SA v extraktech z rostlin, byly extrakty připravené různými extrakčními postupy odpařeny rotační vakuovou odparkou a rozpuštěny v roztoku obsahujícím definované množství SA. Dále byl postup stejný jako v případě řady standardů SA.

Za použití připraveného antigenu 4-ASA-OVA a protilátek byla vytvořena kalibrační přímka, která ukazuje, že čím více bylo SA, tím více primární protilátky se navázalo na ni a ne na antigen navázaný v jamce. Dále se navázalo i méně sekundární protilátky a proto má absorbance s rostoucí koncentrací SA klesající trend (obr. 12). Nejnižší

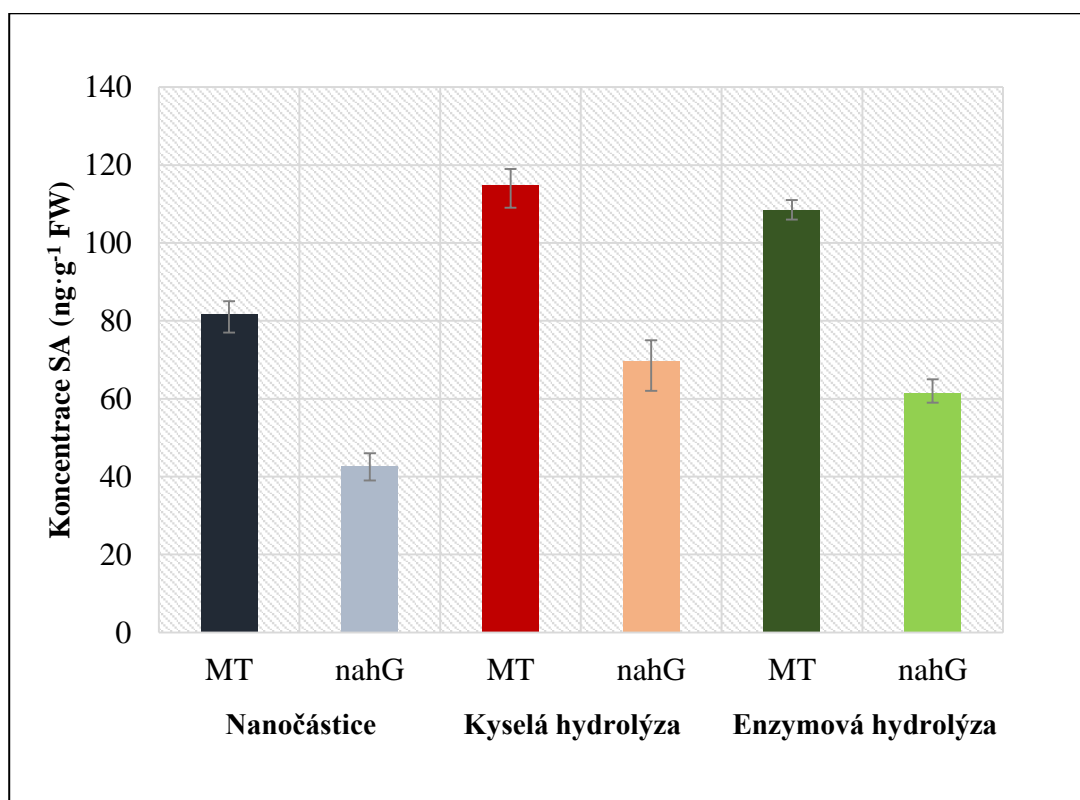
naměřené hodnoty se pohybovaly okolo $40 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ čerstvé hmotnosti a nejvyšší okolo $120 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ čerstvé hmotnosti. V porovnání se spektrofotometrickou metodou využívající vznik komplexu FeCl_3 s SA, kde se limit detekce pohyboval okolo $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ je ELISA mnohem citlivější a vhodnější pro měření hladiny SA v rostlinných vzorcích.

Je třeba zmínit, že i přesto že byl antigen připravován opakovaně a stejným postupem, tak pro následující měření se ukázal jako vhodný pouze jediný. Z toho vyplývá, že pro další aplikace této metody je třeba optimalizovat přípravu a purifikaci derivátu 4-ASA-OVA. Rutinní použití této metody by vyžadovalo především kvalitnější a optimálně monoklonální protilátky.

Metodou ELISA byla porovnávána účinnost různých extrakčních metod (viz kapitola 6.4.4). Měření byla provedena u listů *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom a mutanta *nahG* (obr. 13). Z výsledků lze vyvodit, že nejvhodnější metodou pro extrakci SA z rostlinného materiálu je metoda podle Verberne *et al.* (2002), která zahrnuje extrakci volné SA do methanolu a extrakci SA vázané v glykosidech pomocí HCl o koncentraci $8 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, tato extrakce je také poměrně rychlá a finančně nenáročná. Enzymová hydrolýza vykazovala srovnatelné výsledky, ale její nevýhodou je cenová nedostupnost enzymu. Extrakce pomocí nanočástic nabízela nejnižší účinnost, nejspíše proto že se navázala jenom volná SA a již méně konjugované formy. Nanočástice byly připraveny bez předešlých zkušeností s jejich přípravou pouze dle postupu v publikaci bez další optimalizace a charakterizace nanočástic. Mohlo docházet k jejich precipitaci či shlukování, které snižuje jejich vazebnou kapacitu. Výhodou extrakce pomocí nanočástic je časová nenáročnost, a proto se dá zařadit mezi alternativní postupy extrakce z rostlinného materiálu. Ve všech měřeních byla hladina SA u genotypu Micro-Tom téměř dvojnásobně vyšší než u mutanta *nahG*, který obsahuje bakteriální gen, kódující enzym salicyláthydroxylasu (EC 1.14.13.1). Tento enzym katalyzuje konverzi SA na katechol a proto se SA nemůže hromadit v takovém množství jako u nemutantních rostlin. Výsledky měření jsou tedy v souladu s tímto předpokladem.



Obr. 12 Kalibrační přímka pro stanovení SA metodou nepřímé kompetitivní ELISA.



Obr. 13 Stanovení hladiny celkové SA v rostlinných vzorcích metodou ELISA a srovnání extrakčních metod. MT – Micro-Tom; mutant *nahG*.

8 ZÁVĚR

V teoretické části byla zpracována literární rešerše týkající se významu kyseliny salicylové jako rostlinného hormonu a jejího zařazení do kontextu ostatních rostlinných hormonů a regulátorů. Dále byly zpracovány aktuální poznatky o biosyntéze a signálních drahách kyseliny salicylové v rostlinných buňkách. Závěrem byly shrnuty publikované metody detekce a kvantifikace kyseliny salicylové v rostlinném materiálu.

V rámci experimentální části práce byly získány následující výsledky:

- Nepodařilo se optimalizovat publikovanou metodu detekce SA v roztoku pomocí nanočástic TiO_2 , zatímco spektrofotometrická analýza SA s využitím činidla FeCl_3 se ukázala jako velmi rychlá a snadná metoda použitelná při vyšších koncentracích SA ($10\text{-}250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a při vysoké čistotě analyzovaných vzorků.
- Byla testována extrakce SA navázáním na nanočástice Fe_3O_4 a následnou desorpci s návratností 70 % a využití této extrakční metody pro přípravu vzorků rostlinného materiálu pro analýzu SA.
- Bylo ověřeno použití kyselé a enzymové hydrolyzy pro kvantitativní analýzu celkové a vázané SA
- Byly připraveny konjugáty SA s albuminem a ovalbuminem a testována imunochemická detekce připravených derivátů na blotovací membráně po SDS-PAGE. Z výsledku je patrné, že testovaný preparát polyklonální protilátky anti-4-ASA nevykazuje specifickou detekci pouze derivátu 4-ASA, ale také reaktivitu vůči nederivatizovanému ovalbuminu. Ovalbumin se v rostlinách nevyskytuje, a proto je možné využít testovaný preparát i pro další detekci.
- Byla zavedena metoda analýzy SA v rostlinném materiálu. Jako vhodnější metoda ve srovnání se spektrofotometrickým měřením SA s využitím činidla FeCl_3 byla určena nepřímá kompetitivní ELISA.
- Byla studována hladina SA v rostlinách *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a v jeho mutanta *nahG* s využitím různých extrakčních metod. Mutant dle předpokladů a dostupné literatury vykazoval sníženou klidovou hladinu SA.

V budoucnu bude mezi naše hlavní studijní zájmy patřit především role SA při biotickém stresu, biosyntetické dráhy SA v rostlinách a konkrétně konverze isochorismátu na SA, která se u rostlin stále nepodařila experimentálně prokázat.

9 LITERATURA

- Adie B.A., Perez-Perez J., Perez-Perez M.M., Godoy M., Sanchez-Serrano J.J., Schmelz E.A. a Solano R. (2007): ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1665-1681.
- Achard P., Renou J.P., Berthome 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.
- Alldridge D.C., Galt S., Giles D., Turner W.B. (1971): Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society* **0**, 1623-1627.
- An C. a Mou Z. (2011): Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of Integrative Plant Biology* **53**, 412-428.
- Bandurska H. a Cieslak, M. (2013): The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves. *Environmental and Experimental Botany* **94**, 9–18.
- Bari R. a Jones J. D. (2009): Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**, 473-488.
- Bi D., Cheng Y., Li X., Zhang Y. (2010): Activation of plant immune responses by a gain-of-function mutation in an atypical receptor-like kinase. *Plant Physiology* **153**, 1771–1779.
- Boudsoq M. a Sheen J. (2013): CDPKs in immune and stress signaling. *Trends in Plant Science* **18**, 30-40
- Bowling S.A., Guo A., Cao H., Gordon A.S., Klessig D.F., Dong X.I. (1994): A Mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired-resistance. *Plant Cell* **6**, 1845-1857.
- Cao H., Bowling S.A., Gordon A.S. a Dong X. (1994): Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1583-1592.
- Catinot J., Buchala A., Abou-Mansour E., Metraux, J.P. (2008): Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochlorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters* **582**, 473–478.
- Clarke J.D., Liu Y., Klessig D.F., Dong X. (1998): Uncoupling *PR* gene expression from *NPR1* and bacterial resistance: Characterization of the dominant *Arabidopsis cpr6-1* mutant. *Plant Cell* **10**, 557–569.
- Cleland C.F. a Ajami A. (1974): Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. *Plant Physiology* **54**, 904-906.
- Cochrane F.C., Davin L.B., Lewis N.G. (2004): The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* **65**, 1557–1564.
- de Torres-Zabala M., Truman W., Bennett M. H., Lafforgue G., Mansfield J. W., Rodriguez Egea P., Bogre L. a Grant M. (2007): *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO Journal* **26**, 1434-1443.
- De Vos M., Van Zaanen W., Koornneef A., Korzelius J.P., Dicke M., Van Loon L.C., Pieterse C.M. (2006): Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **142**, 352-363.
- Dean J.V., Mohammed L.A., Fitz Patrick T. (2005): The formation, vacuolar localization and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* **221**, 287-296.
- DeFraia C.T., Zhang X., Mou Z. (2010): Elongator subunit 2 is an accelerator of immune responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **64**, 511-523.
- Depuydt S., Dolezal K., Van Lijsebettens M., Moritz T., Holsters M., Vereecke D. (2008): Modulation of the hormone setting by *Rhodococcus fascians* results in ectopic KNOX activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**, 1267–1281.
- Desveaux D., Subramaniam R., Despres C., Mess J.N., Levesque C., Fobert P.R., Dangl J.L. a Brisson N. (2004): A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **6**, 229-240.
- Dong, X. (2004): NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 547–552.

- Du L., Ali G.S., Simons K.A., Hou J., Yang T., Reddy A.S. *et al.* (2009): Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* **457**, 1154–1158.
- Durrant W. E. a Dong X. (2004): Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 185-209.
- Engelberth J., Schmelz E.A., Alborn H.T., Cardoza Y.J., Huang J., Tumlinson J.H. (2003): Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **312**, 242-250.
- Farid N.A. (1975): Improved colorimetric determination of salicylic acid and its metabolites in urine. *Clinical chemistry* **21**, 1167-1168.
- Fey s B.J., Moisan L.J., Newman M.A., Parker J.E. (2001): Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO Journal* **20**, 5400-5411.
- Friedrich L., Vernooij B., Gaffney T., Morse A., Ryals J. (1995): Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Molecular Biology* **29**, 959-968.
- Fu Z.Q., Yan S., Saleh A., Wang W., Ruble J., Oka N., Mohan R., Spoel S.H., Tada Y., Zheng N., Dong X. (2012): NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**, 228-232.
- Gallego-Giraldo L., Escamilla-Trevino L., Jackson L.A., Dixon R.A. (2011): Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* **108**, 20814-20819.
- Gao S.Y., Li H., Wang L., Yang L.N. (2010): Simultaneous separation and determination of benzoic acid compounds in the plant medicine by high performance capillary electrophoresis. *Journal of the Chinese Chemical Society* **57**, 1374–1380.
- Gao X., Chen X., Lin W., Chen S., Lu D., Niu Y., Li L., Cheng C., McCormack M., Sheen J., Shan L. a He P. (2013): Bifurcation of *Arabidopsis* NLR immune signaling via Ca(2)(+)-dependent protein kinases. *PLoS Pathogens* **9**(1): e1003127.
- Garcion C., Lohmann A., Lamodiè re E., Catinot J., Buchala A., Doermann P., Metraux J.P. (2008): Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**, 1279-1287.
- Gatz C. (2013): From pioneers to team players: TGA transcription factors provide a molecular link between different stress pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **26**, 151-159.
- Glazebrook J. (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 205-227.
- Gupta V., Willits M.G., Glazebrook J. (2000): *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **13**, 503-511.
- Hadacek F. a Chobot V. (2011): New synthesis-systems chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology* **37**, 1165.
- Heil M. a Bostock, R.M. (2002): Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences, *Annals of Botany* **89**, 503-512.
- Hernandez-Blanco C., Feng D.X., Hu J., Sanchez-Vallet A., Deslandes L., Llorente F., Berrocal-Lobo M., Keller H., Barlet X., Sanchez-Rodriguez C., Anderson L.K., Somerville S., Marco Y., Molina A. (2007): Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* **19**, 890-903.
- Huang J., Gu M., Lai Z., Fan B., Shi K., Zhou Y.H., Yu J.Q., Chen Z. (2010): Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology* **153**, 1526-1538.
- Huang L.F., He M., Chen B.B., Hu B. (2014): Membrane-supported liquid-liquid–liquid microextraction combined with anion-selective exhaustive injection capillary electrophoresis-ultraviolet detection for sensitive analysis of phytohormones. *Journal of Chromatography A* **1343**, 10–17.

- Huang W.E., Huang L., Preston G.M., Martin N., Carr J.P., Li Y., Singer A.C., Whiteley A.S., Wang H. (2006): Quantitative *in situ* assay of salicylic acid in tobacco leaves using a genetically modified biosensor strain of *Acinetobacter* sp. ADP1. *Plant Journal* **46**, 1073–1083.
- Hunter L.J., Westwood J.H., Heath G., Macaulay K., Smith A.G., Macfarlane S.A. *et al.* (2013): Regulation of RNA-dependent RNA polymerase 1 and isochorismate synthase gene expression in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **8**(6):e66530.
- Huot B., Yao J., Montgomery B.L., He S.Y. (2014): Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant* **7**, 1267-1287.
- Chang Y. (2017): Determination of salicylic acid using a magnetic iron oxide nanoparticle-based solid-phase extraction procedure followed by an online concentration technique through micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A* **1479** 62–70.
- Chen J.Y., He L.H., Jiang Y.M., Wang Y., Joyce D.C., Ji Z.L. *et al.* (2008): Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. *Physiologia Plantarum* **132**, 318–328.
- Chen Z., Agnew J.L., Cohen J.D., He P., Shan L., Sheen J., Kunkel B.N. (2007): *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **104**, 20131-20136.
- Chen Z.B., Lin Z.A., Zhang L., Cai Y., Zhang L. (2012): Analysis of plant hormones by microemulsion electrokinetic capillary chromatography coupled with on-line large volume sample stacking. *Analyst* **137**, 1723–1729.
- Choi J., Huh S.U., Kojima M., Sakakibara H., Paek K.H., Hwang I. (2010): The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Developmental cell* **19**, 284-295.
- Chu B., Lou D., Yu P., Hu S., Shen S. (2011): Development of an on-column enrichment technique based on C₁₈-functionalized magnetic silica nanoparticles for the determination of lidocaine in rat plasma by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1218**, 7248–7253.
- Ishihara T., Sekine K.T., Hase S., Kanayama Y., Seo S., Ohashi Y. *et al.* (2008): Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* EDS5 gene enhances resistance to viruses. *Plant Biology* **10**, 451–461.
- Jones J.D. a Dangl J.L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kachroo P., Kachroo A., Lapchyk L., Hildebrand D. a Klessig D.F. (2003): Restoration of defective cross talk in *ssi2* mutants: role of salicylic acid, jasmonic acid, and fatty acids in SSI2-mediated signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **16**, 1022-1029.
- Khan M.I.R., Fatma M., Per T.S., Anjum N.A., Khan N.A. (2015): Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**, 462.
- Kim D.S. a Hwang B.K. (2014): An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2295–2306.
- Kim Y., Park S., Gilmour S.J. a Thomashow M.F. (2013): Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **75**, 364-376.
- Kim Y., Tsuda K., Igarashi D., Hillmer R.A., Sakakibara H., Myers C.L., Katagiri F. (2014): Mechanisms underlying robustness and tunability in a plant immune signaling network. *Cell Host Microbe* **15**, 84-94.
- Kloek A.P., Verbsky M.L., Sharma S.B., Schoelz J.E., Vogel J., Klessig D.F., Kunkel B.N. (2001): Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanism. *Plant Journal* **26**, 509-522.
- Knepper C., Savory E.A., Day B. (2011): *Arabidopsis* NDR1 is an integrin-like protein with a role in fluid loss and plasma membrane-cell wall adhesion. *Plant Physiology* **156**, 286–300.
- Koga H., Dohi K., Mori M. (2004): Abscisic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection of *Magnaporthe grisea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**, 3–9.
- Krishna P. (2003): Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**, 289–297.

- Kunkel B.N. a Brooks D.M. (2002): Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 325–331.
- Kurosawa E. (1926): Experimental studies on the nature of the substance secreted by the “bakanae” fungus. *Natural History Society of Formosa* **16**, 213–227.
- Lebel E., Heifetz P., Thorne L., Uknes S., Ryals J., Ward E. (1998): Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **16**, 223–233.
- Levy G. a Procknal J.A. (1968): Drug biotransformation interactions in man I. Mutual inhibition in glucuronide formation of salicylic acid and salicylamide in man. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **57**, 1330.
- Li G., Lin F., Xue H.W. (2007): Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of PLD beta 1 in seed germination. *Cell Research* **17**, 881–894.
- Li X., Clarke J.D., Zhang Y., Dong X. (2001): Activation of an EDS1-mediated R-gene pathway in the *sncl* mutant leads to constitutive, NPR1-independent pathogen resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **14**, 1131–1139.
- Li Y.H., Wei F., Dong X.Y., Peng J.H., Liu S.Y., Chen H. (2011): Simultaneous analysis of multiple endogenous plant hormones in leaf tissue of oilseed rape by solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* **22**, 442–449.
- Lopéz-Gresa M.P., Lison P., Yenush L., Conejero V., Rodrigo I., Bellés J.M. (2016): Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to citrus exocortis viroid and tomato spotted wilt virus. *PLoS ONE* **11**(11): e0166938.
- Makandar R., Essig J.S., Schapaugh M.A., Trick H.N., Shah J. (2006): Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of *Arabidopsis NPR1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **19**, 123–129.
- Malamy J. a Klessig D.F. (1992): Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant Journal* **2**, 643–654.
- Malamy J., Carr J.P., Klessig D. F., Raskin I. (1990): Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**, 1002–1004.
- Mauch F., Mauch-Mani B., Gaille, C., Kull B., Haas D., Reimann C. (2001): Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. *Plant Journal* **25**, 67–77.
- Miller C.O., Skoog F., Okumura F.S., von Saltza M.H., Strong F.M. (1955): Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society* **78**, 2662–2663.
- Miura K. a Tada Y. (2014) Regulation of water, salinity, and col dstress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science* **5**, 4.
- Mohr P.G. a Cahill D.M. (2007): Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Functional and Integrative Genomics* **7**, 181–191.
- Moreau M., Westlake T., Zampogna G., Popescu G., Tian M., Noutsos C. *et al.* (2013): The *Arabidopsis* oligopeptidases TOP1 and TOP2 are salicylic acid targets that modulate SA-mediated signaling and the immune response. *Plant Journal* **76**, 603–614.
- Mou Z., Fan W. a Dong X. (2003): Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**, 935–944.
- Muller B. a Sheen J. (2007): Advances in cytokinin signaling. *Science* **318**, 68–69.
- Mur L.A., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C. (2006): The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* **140**, 249–262.
- Nagpal P., Ellis C.M., Weber H., Ploense S.E., Barkawi L.S., Guilfoyle T.J., Hagen G., Alonso J.M., Cohen J.D., Farmer E.E., Ecker J.R. a Reed J.W. (2005): Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**, 4107–4118.
- Nakashita H., Yasuda M., Nitta T. *et al.* (2003): Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant Journal* **33**, 887–898.

- Naseem M. a Dandekar T. (2012): The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLoS Pathogens* **8**(11): e1003026.
- Naseem M., Wolfling M., Dandekar T. (2014): Cytokinins for immunity beyond growth, galls and green islands. *Trends in Plant Science* **19**, 481-484.
- Navarro L., Bari R., Achard P., Lison P., Nemri A., Harberd N.P., Jones J.D. (2008): DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology* **18**, 650-655.
- Nawrath C. a Metraux J.P. (1999): Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393– 1404.
- Ndamukong I., Abdallat A.A., Thurow C., Fode B., Zander M., Weigel R., Gatz C. (2007): SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant Journal* **50**, 128-139.
- Nobuta K., Okrent, R.A., Stoutemyer M., Rodibaugh N., Kempema L., Wildermuth M.C. *et al.* (2007): The GH3 acyl adenylase family member PBS3 regulates salicylic acid-dependent defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **144**, 1144–1156.
- Ogawa D., Nakajima N., Sano T., Tamaoki M., Aono M., Kubo A. *et al.* (2005): Salicylic acid accumulation under O₃ exposure is regulated by ethylene in tobacco plants. *Plant Cell Physiology* **46**, 1062–1072.
- Okrent R.A., Brooks M.D., Wildermuth M.C. (2009): *Arabidopsis* GH3.12 (PBS3) conjugates amino acids to 4-substituted benzoates and is inhibited by salicylate. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 9742–9754.
- Ono E.O., Nakamura T., Machado S.R., Rodriguez J.D. (2000): Application of brassinosteroid to *Tabebuia alba* (Bignoniaceae) plants. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **12**, 187-194.
- Pajerowska-Mukhtar K.M., Emerine D.K., Mukhtar M.S. (2013): Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends in Plant Science* **18**, 402–411.
- Parham H. a Rahbar N. (2009): Solid phase extraction- spectrophotometric determination of salicylic acid using magnetic iron oxide nanoparticles as extractor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **50**, 58–63.
- Park J.E., Park J.Y., Kim Y.S., Staswick P.E., Jeon J., Yun J., Kim S.Y., Kim J., Lee Y.H., Park C.M. (2007): GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 10036-10046.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H.B., Lacy M., Austin M.J., Parker J.E., Sharma S.B., Klessig D.F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A.B., Mundy J. (2000): *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.
- Raskin I. (1992): Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiology* **99**, 799-803.
- Raskin I., Turner I.M., Melander W.R. (1989): Regulation of Heat-Production in the Inflorescences of an Arum Lily by Endogenous Salicylic Acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **86**, 2214-2218.
- Rivas-San Vicente M. a Plasencia J. (2011): Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3321-3338.
- Rozhon W., Petutschnig E., Wrzaczek M., Jonak C. (2005): Quantification of free and total salicylic acid in plants by solid-phase extraction and isocratic high-performance anion-exchange chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **382**, 1620-1627.
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N. *et al.* (2005): *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **102**, 9972–9977.
- Scott I.M. a Yamamoto H. (1994): Mass spectrometric quantification of salicylic acid in plant tissues. *Phytochemistry* **37**, 335-336.
- Sendon P.M., Seo H.S., Song J.T. (2011): Salicylic acid signalling: biosynthesis, metabolism, and crosstalk with jasmonic acid. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **54**, 501-506.

- Serino L., Reimann C., Baur H., Beyeler M., Visca P., Haas D. (1995): Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular & General Genetics* **249**, 217–228.
- Seyfferth C. a Tsuda K. (2014): Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science* **5**, 697.
- Shah J., Kachroo P., Nandi A., Klessig D.F. (2001): A recessive mutation in the *Arabidopsis* *SSI2* gene confers SA- and *NPR1*-independent expression of *PR* genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *Plant Journal* **25**, 563–574.
- Shirano Y., Kachroo P., Shah J., Klessig D.F. (2002): A gain-of-function mutation in an *Arabidopsis* toll interleukin1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich repeat type *R* gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *Plant Cell* **14**, 3149–3162.
- Schenk P.M., Kazan K., Wilson L., Anderson J. P., Richmond T., Somerville S.C., Manners J.M. (2000): Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* **97**, 11655-1166.
- Siemens J., Keller I., Sarx J. *et al.* (2006): Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 480–494.
- Spoel S.H., Mou Z., Tada Y., Spivey N.W., Genschik P., Dong X. (2009): Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* **137**, 860-872.
- Takahashi H., Miller J., Nozaki Y., Takeda M., Shah J., Hase S., Ikegami M., Ehara Y., Dinesh-Kumar S.P. (2002): *RCY1*, an *Arabidopsis thaliana* *RPP8/HRT* family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant Journal* **32**, 655– 667.
- Tanaka N., Matsuoka M., Kitano H., Asano T., Kaku H. a Komatsu S. (2006): *gid1*, a gibberellin-insensitive dwarf mutant, shows altered regulation of probenazole-inducible protein (PBZ1) in response to cold stress and pathogen attack. *Plant, Cell and Environment* **29**, 619-631.
- Truman W., Sreekanta S., Lu Y., Bethke G., Tsuda K., Katagiri F. a Glazebrook J. (2013): The CALMODULIN-BINDING PROTEIN60 family includes both negative and positive regulators of plant immunity. *Plant Physiology* **163**, 1741-1751.
- Tseng P., Wang Ch., Huang T., Chuang Y., Fu S., Lin Y., (2014): A facile colorimetric assay for determination of salicylic acid in tobacco leaves using titanium dioxide nanoparticles. *Analytical Methods* **6**, 1759-1765.
- Tsuda K., Sato M., Stoddard T., Glazebrook J. a Katagiri F. (2009): Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genetics* **5**(12): e1000772.
- Tswett M.S. (1905): On a new category of adsorption phenomena and on its application to biochemical analysis. *Proceedings of the Warsaw Society of Naturalists* **14**, 20–39.
- Uppalapati S.R., Ishiga Y., Wangdi T., Kunkel B.N., Anand A., Mysore K.S. *et al.* (2007): The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 955–965.
- van Verk M.C., Bol J.F., Linthorst H.J. (2011): WRKY transcription factors involved in activation of SA biosynthesis genes. *BMC Plant Biology* **11**, 89.
- Venema D.P., Hollman P.C.H., Janssen K.P.L.T.M., Katan M.B. (1996): Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in foods, using HPLC with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1762-1767.
- Verberne M.C., Brouwer N., Delbianco F., Linthorst H.J.M., Bol J.F., Verpoorte R. (2002): Method for the extraction of the volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material. *Phytochemical Analysis* **13**, 45-50.
- Verberne M.C., Budi Muljono R.A., Verpoorte R. (1999): Salicylic acid biosynthesis. *New comprehensive biochemistry* **33**, 295–312.
- Verberne M.C., Verpoorte R., Bol J.F., Mercado-Blanco J., Linthorst H.J. (2000): Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology* **18**, 779–783.

- Vidová L., Lemr K., Havlíček V. (2008): Recent trends in mass spectrometry. *Chemické Listy* **102**, 957-959.
- Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. (2009): Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 177-206.
- Wan D., Li R., Zou B., Zhang X., Cong J., Wang R., Xia Y., Li G. (2012): Calmodulin-binding protein CBP60g is a positive regulator of both disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* **31**, 1269-1281.
- Wang D., Pajerowska-Mukhtar K., Culler A.H., Dong X. (2007): Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology* **17**, 1784-1790.
- Wang S., Wang R., Wu X., Wang Y., Xue C., Wu J. *et al.* (2012): Magnetic molecularly imprinted nanoparticles based on dendritic-grafting modification for determination of estrogens in plasma samples. *Journal of Chromatography B* **905**, 105-112.
- Wang S., Xu L., Li G., Chen P., Xia K., Zhou X. (2002): An ELISA for the determination of salicylic acid in plants using a monoclonal antibody. *Plant Science* **162**, 529-535.
- Warrier R.R., Paul M., Vineetha M.V. (2013): Estimation of salicylic acid in eucalyptus leaves using spectrophotometric methods. *Genetics and Plant Physiology* **3**, 90-97.
- Wasilewskaa A., Vlad F., Sirichandra C. *et al.* (2008): An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant* **1**, 198-217.
- Watson G.N. (1916): A Method for the quantitative determination of salicylic acid in the presence of acetyl salicylic acid. *Transactions of the Kansas Academy of Science* **28**, 175-176.
- Weigel R.R., Pfitzner U.M., Gatz C. (2005): Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates *PR* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 1279-1291.
- Weissman G. (1991): Aspirin. *Scientific American*. **264**, 84-90.
- White R.F. (1979): Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* **99**, 410-412.
- Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F.M. (2001): Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.
- Wu Y.L. a Hu B. (2009): Simultaneous determination of several phytohormones innatural coconut juice by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1216**, 7657-7663.
- Xie F.W., Yu A.A., Cheng Y.A., Qi R.B., Li Q.Y., Liu H.M., Zhang S.S. (2010): Rapid separation and determination of five phenolic acids in tobacco by CE. *Chromatographia* **72**, 1207-1212.
- Xing Y., Jia W., Zhang J. (2008): AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **54**, 440-451.
- Yan S. a Dong X. (2014): Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current Opinion in Plant Biology* **20**, 64-68.
- Yu D., Chen C., Chen Z. (2001): Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell* **13**, 1527-1540.
- Yuan Z.C., Edlind M.P., Liu P., Saenkham P., Banta L.M., Wise A.A., Ronzone E., Binns A.N., Kerr K., Nester E.W. (2007): The plant signal salicylic acid shuts down expression of the vir regulon and activates quormone-quenching genes in *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **104**, 11790-11795.
- Zargar B., Parham H., Hatamie A. (2009): Modified iron oxide nanoparticles as solid phase extractor for spectrophotometric determination and separation of basic fuchsin. *Talanta* **77**, 1328-1331.
- Zhang X., Chen S., Mou Z. (2010): Nuclear localization of NPR1 is required for regulation of salicylate tolerance, isochorismate synthase 1 expression and salicylate accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* **167**, 144-148.
- Zheng Z., Qualley A., Fan B., Dudareva N., Chen, Z. (2009): An important role of a BAHD acyl transferase-like protein in plant innate immunity. *Plant Journal* **57**, 1040-1053.
- Zhu S., Jeong R.D., Venugopal S.C., Lapchyk L., Navarre D., Kachroo A. *et al.* (2011): SAG101 forms a ternary complex with EDS1 and PAD4 and is required for resistance signaling against Turnip crinkle virus. *PLoS Pathogens* **7**(11):e1002318.

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AA/BIS - Akrylamid-N,N'-bisakrylamid
- ABA – kyselina abscisová
- APS – persíran amonný
- ASA – kyselina aminosalicyllová
- AU - auxiny
- BR - brassinosteroidy
- BSA – hovězí sérový albumin
- BTH - benzothiadiazol
- CK - cytokininy
- DMSO - dimethylsulfoxid
- ELISA - Enzymově značený imunotest s využitím pevné fáze
- ET – etylén
- FW – čerstvá hmotnost
- GA – kyselina gibberelová
- GC – plynová chromatografie
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- HRP – křenová peroxidasa
- IgG – imunoglobulin G
- JA – kyselina jasmonová
- LOD – mez detekce
- MES - 2-(N-morfolin) ethansulfonová kyselina
- MS – hmotnostní spektrometrie
- MS médium – Murashige a Skoog médium
- OVA - ovalbumin
- PBS – fosfátem pufrovaný fyziologický roztok
- PBS-T – tween v PBS
- SA - kyselina salicylová
- SAR - systémově získaná rezistence
- SDS – dodecylsulfát sodný
- SDS-PAGE – SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
- TBS – fyziologický roztok pufrovaný tris
- TBS-T – tween v TBS
- TEMED - N,N,N',N' - tetramethylendiamin
- TMV – virus tabákové mozaiky

- UHPLC – ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
- UV – ultrafialové záření