

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Fluorescenční mikroskopie kyslíkových radikálů v
kořenech rostlin během působení abiotického stresu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Pavel Čížek**
Studijní program: B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D**
Rok: 2022

Prohlášení

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/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Poděkování

Děkuji svému školiteli, panu docentu Tomáši Takáčovi, za ochotný přístup a pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Také děkuji celému oddělení Katedry biotechnologií za umožnění pracovat ve skvělém kolektivu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Pavel Čížek
Název práce: Fluorescenční mikroskopie kyslíkových radikálů v kořenech rostlin během působení abiotického stresu
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Katedra biotechnologií
Vedoucí práce: doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce 2022

Abstrakt:

V současné době zvýšená koncentrace soli v půdě vážně omezuje růst a produktivitu důležitých druhů plodin. Je známo, že solný stres indukovaný NaCl vyvolává u rostlin akumulaci reaktivních kyslíkových radikálů, a jejich koncentrace musí být přísně regulována pomocí enzymatických anebo neenzymatických antioxidantů. Superoxiddismutáza FSD1 je antioxidační enzym důležitý pro regulaci hladin jednoho z kyslíkových radikálů, superoxidu, v chloroplastech, cytosolu a jádře. Její abundance závisí na expresi signálního proteinu MITOGENEM AKTIVOVANÁ PROTEINKINÁSA 3 (MPK3). Cílem této práce bylo zjistit, vliv chybějící exprese FSD1 a MPK3 na tvorbu kyslíkových radikálů v mutantech *Arabidopsis thaliana* *fsd1* a *mpk3-1* během zasolení. Kvantitativní fluorescenční stereomikroskopie pomocí fluorescenční barvičky CM-H2DCFDA ukázala mnohem dřívější tvorbu ROS u obou sledovaných mutantů v porovnání s divokým typem Col-0, což koresponduje s jejich citlivostí na solný stres. Dynamika akumulace ROS se nelišila jenom mezi divokým typem a mutanty, zaznamenali jsme také odlišnosti mezi mutanty. Pozorování pomocí konfokální mikroskopie s rotujícím diskem potvrdilo vyšší akumulaci ROS v mutantech a ukázalo také určité změny v subcelulární distribuci ROS mezi mutanty. Akumulace ROS v tečkovitých, vezikulám podobných strukturách byla výraznější u mutantu *fsd1-1* v porovnání s *mpk3-1*. Naše pozorování tedy ukázali, že MPK3 a FSD1 jsou důležité pro raní fáze odpovědi rostlin na tvorbu ROS indukovanou NaCl. MPK3 pravděpodobně hraje roli v hromadění ROS ve vezikulám podobných strukturách. Pozorování odhalují možnou roli FSD1 v toleranci rostlin vůči hypoxii a také přinášejí důkazy o možném propojení MKP3 a FSD1.

Klíčová slova: solný stres, reaktivní kyslíkové radikály, superoxiddismutázy, mitogenem aktivované proteinkinázy, fluorescenční mikroskopie, *Arabidopsis*

Počet stran: 61

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Pavel Čížek
Title: Fluorescence microscopy of oxygen radicals in plant roots during abiotic stress
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of Biotechnology
Supervisor: doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
The year of presentation: 2022

Abstract:

Currently, the increased concentration of salt in soil seriously restricts the growth and productivity of many important crop species. It is well known, that salt stress induced by NaCl, evokes the accumulation of reactive oxygen radicals (ROS) in plants, and their levels have to be strictly regulated by enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Superoxide dismutase FSD1 is an antioxidant enzyme important for regulation of ROS called superoxide in chloroplasts, cytosol and nucleus. FSD1 abundance depends on the expression of a signaling protein MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 3 (MPK3). This bachelor thesis aimed to examine the influence of the missing expression FSD1 and MPK3 on ROS generation in *fsd1-1* and *mpk3-1 Arabidopsis thaliana* mutants during salt stress. The quantitative fluorescence stereomicroscopy combined with ROS labeling using a fluorescent dye CM-H₂DCFDA showed much earlier accumulation of ROS in both mutants compared to wild type, which corresponds with their sensitivity to the salt stress. We also obtained some differences in the dynamics of ROS accumulation between the mutants. Spinning disc microscopy observation proved the higher ROS accumulation in mutants and pointed to some differences in subcellular ROS distribution between the mutants. *Arabidopsis mpk3-1* mutant showed attenuated accumulation of ROS in vesicle-like structures compared to *fsd1-1* mutant. In summary, our analyses showed that FSD1 and MPK3 are important for early ROS generation in plants in response to NaCl. MPK3 might regulate the ROS accumulation in vesicle-like structures. The observations reveal the possible role of FSD1 in the plant tolerance to hypoxia, and bring evidence about the possible functional link between MKP3 and FSD1.

Keywords: salt stress, superoxide dismutases, reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, fluorescent microscopy, *Arabidopsis*

Number of pages: 61

Number of appendices: 0

Language: Czech

OBSAH

1 TEORETICKÁ ČÁST.....	2
1.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS)	2
1.1.1 Hydroxylový radikál (HO·).....	2
1.1.2 Singletový kyslík (¹ O ₂).....	3
1.1.3 Peroxid vodíku (H ₂ O ₂)	4
1.1.4 Superoxidový anion (O ₂ ⁻)	4
1.2 Tvorba ROS.....	5
1.2.1 Chloroplast	5
1.2.2 Peroxisomy	6
1.2.3 Mitochondrie	7
1.2.4 Apoplast.....	7
1.3 Antioxidační obrana u rostlin	9
1.3.1 Superoxiddismutázy (SOD).....	10
1.3.2 Kataláza (CAT).....	12
1.3.3 Askorbát-glutathionový (Asc-GSH) cyklus	12
1.4 Tvorba ROS a antioxidační obrana během solného stresu u rostlin.....	14
1.5 Fluorescenční metody detekce ROS.....	17
1.5.1 2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetát (DCFH-DA)	18
1.5.2 CM-H2DCFDA (5-(α-6)-chlormethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát, acetyléster).....	18
1.5.3 Zelený fluorescenční protein (GFP).....	19
1.5.4 HyPer.....	20
2 Experimentální část	21
2.1 Biologický materiál	21
2.2 Chemikálie.....	21
2.3 Přístroje	21

2.4 Softwary	21
2.5 Metody.....	21
2.5.1 Příprava ½ Murashige a Skoog (MS) média	21
2.5.2 Sterilizace semen	22
2.5.3 Kultivace rostlin	22
2.5.4 Příprava barvicích roztoků:	22
2.5.5 Příprava preparátu a mikroskopické pozorování.....	22
2.5.6 Fluorescenční mikroskopie.....	23
2.5.7 Kvantifikace fluorescenčního signálu	23
3 VÝSLEDKY	24
3.1 Pozorování akumulace ROS v primárním kořenu Col-0 a mutantů <i>fsd1-1</i> a <i>mpk3-1</i>	24
3.2 Akumulace ROS v epidermálních buňkách kořene Col-0 a mutantů <i>fsd1-1</i> a <i>mpk3-1</i>	34
4 Diskuze.....	41
5 Závěr.....	44
6 Literatura	45
7 Seznam použitých zkratk.....	60

Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma: Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a jejich role u rostlin; tvorba ROS během osmotického stresu; antioxidační obrana s důrazem na superoxiddismutázy, mikroskopické metody detekce ROS.
2. Získání dovedností s prací s rostlinami v *in vitro* podmínkách a ve fluorescenční mikroskopii
3. Kvantitativní vyhodnocení tvorby ROS v rostlinách divého typu *Arabidopsis* a mutantech v genu pro vybranou isoformu superoxiddismutás pomocí fluorescenční mikroskopie během osmotického stresu

ÚVOD

Stres ze zasolení patří v současnosti k významným faktorům, které omezují růst a produktivitu rostlin. Ke zdrojům solí v půdě patří nejčastěji anionty, jako jsou: SO_4^{2-} , Cl^- , CO_3^{2-} a kationty: Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ a v kyselých půdách také Al^{3+} , Fe^{3+} . V reakci na signály solného stresu se tedy rostliny přizpůsobili prostřednictvím různých mechanismů, včetně regulace iontové homeostázy, aktivace signálních drah osmotického stresu, rostlinných hormonů, regulace dynamiky cytoskeletu a složení buněčné stěny. Způsoby obrany rostlin vůči zasolení nejsou úplně prostudovány.

Během stresu ze zasolení dochází k produkci tzv. reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Tyto vysoce reaktivní molekuly mají důležité signální role, ale při nadměrných koncentracích mohou způsobovat ireverzibilní oxidace biomolekul jako proteiny, sacharidy nebo lipidy. Jejich koncentrace musí být, proto přísně regulována pomocí enzymatických anebo neenzymatických antioxidantů.

Superoxiddismutázy (SODs; EC 1.15.1.1) jsou jedny z klíčových antioxidantních enzymů, které katalyzují dismutaci O_2^- na H_2O_2 a molekulární kyslík. Tento enzym vyžaduje ke své aktivitě kov jako kofaktor. Superoxiddismutázy FeSOD a Cu/ZnSOD jsou isoenzymy nacházející se v chloroplastech vyšších rostlin. Tyto enzymy jsou zodpovědné za účinné odstraňování superoxidu vzniklého během fotosyntetického transportu elektronů a fungují v metabolismu ROS.

Je známo, že MITOGENEM AKTIVOVANÉ PROTEINKINÁSY (MAPK) jsou důležitými signálními proteiny, které se zúčastňují aktivace obranných mechanismů také během zasolení. Mimo jiných funkcí mohou přispívat k regulaci antioxidantní obrany. Nedávné proteomické studie odhalili možnou regulaci FeSOD1 pomocí MPK3.

Cílem předkládané práce bylo zjistit, vliv chybějící exprese *FSD1* a *MPK3* na tvorbu kyslíkových radikálů v mutantech *fsd1* a *mpk3-1* během zasolení.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

ROS jsou vedlejšími produkty aerobního metabolismu (Das & Roychoudhury, 2014). Mají důležitou roli v signálních drahách (Finkel, 2011). Na druhé straně ve vysokých koncentracích mohou mít destruktivní účinky na biomolekuly, jako jsou nukleové kyseliny, proteiny a lipidy, což může vést až k buněčné smrti (Bhattacharyya et al., 2014; Hussain et al., 2016). ROS jsou radikály kyslíku, které jsou schopny nezávislé existence, přičemž obsahují jeden nebo více nepárových elektronů. Mezi ROS se také řadí reaktivní sloučeniny kyslíku bez nepárových elektronů, jako je peroxid vodíku (H_2O_2) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$; Handa et al., 2016). ROS mají vyšší chemickou reaktivitu než vzdušný kyslík (O_2 ; Freinbichler et al., 2011). Spotřeba a využití O_2 v různých fyziologických procesech vede ke vzniku ROS, která se zintenzivňuje při nepříznivých podmínkách životního prostředí. Nadměrná akumulace ROS je regulována rostlinnými antioxidantními systémy. Když koncentrace ROS překročí schopnost je neutralizovat a eliminovat, dochází k oxidačnímu stresu (Handa et al., 2016). Existuje spousta forem ROS, ale v rostlinách jsou hlavními formami $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , superoxidový anion (O_2^-) a hydroxylový radikál ($\text{HO}\cdot$; Mittler et al., 2004).

ROS také mají roli v regulaci a signalizaci při vývoji rostlin (Mittler, 2017; Mhamdi and Van Breusegem, 2018). Podílí se na prodlužování buněk (Liszka et al., 2003), tvorbě kořenových vlásků (Foreman et al., 2003), regulaci buněčného cyklu (Fehér et al., 2008), klíčení semen (Oracz et al., 2009), embryogenezi (Rodríguez Serrano et al., 2012), prodlužování kořene (Schopfer et al., 2002), gravitropismu (Joo et al., 2005) a také na tvorbě laterálních kořenů (Orman-Ligeza et al., 2016).

1.1.1 Hydroxylový radikál ($\text{HO}\cdot$)

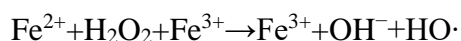
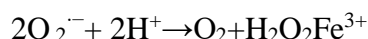
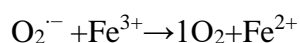
$\text{HO}\cdot$ patří mezi nejsilnější oxidační činidla, která jsou schopny reagovat neselektivně a téměř okamžitě s okolními molekulami. $\text{HO}\cdot$ radikály v biologických systémech kromě negativních rolí, také ovlivňují imunitní metabolismus a řadu signálních reakcí (Gligorovski et al., 2015).

Při velmi nízkém pH se $\text{HO}\cdot$ přeměňuje na svou konjugovanou bázi oxidového radikálu ($\text{pK}_a(\text{HO}\cdot/\text{O}^-) = 11,9$), který je méně reaktivní. Reakce $\text{HO}\cdot$ radikálů s většinou substrátů jsou difúzně řízené, jako např. s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), aromatickými aminokyselinami, albuminem, hemoglobinem, linoleátem, popř.

askorbátem (Asc). HO· radikály se tedy účastní rychlých reakcí s aktivační energií blízkou nule, což znamená, že nejsou schopny difundovat. Mají velmi krátkou životnost (několik 10^{-6} s) a jsou slabě selektivní vůči molekulárním cílům (Collins, 2019).

Jedním z hlavních mechanismů vzniku HO· je tzv. Fentonova reakce, kdy H_2O_2 reaguje s železnatým iontem (Fe^{2+}), za vzniku HO·.

Fentonova reakce:



(Halliwell B., 2006)

Má schopnost poškozovat různé buněčné složky peroxidací lipidů, poškozením proteinů a destrukcí membrán. Nadměrné hromadění HO· způsobuje buněčnou smrt (Pinto et al., 2003).

1.1.2 Singletový kyslík (1O_2)

1O_2 je nevyhnutelným vedlejším produktem fotosyntézy. Vzniká při reakcích přenosu energie z excitovaného tripletového stavu molekul chlorofylu nebo jejich prekurzorů na O_2 . 1O_2 je vysoce reaktivní a snadno reaguje s řadou biomolekul, zejména s těmi, které obsahují dvojně vazby, což vede ke snížení účinnosti fotosyntézy, a nakonec k buněčné smrti (Triantaphylidès & Havaux, 2009). 1O_2 je považován za hlavní radikál produkovaný v chloroplastech při stresu a nadbytku světla (Triantaphylidès et al., 2008). Rostliny vyvinuly různé systémy, aby se chránily před toxickými účinky 1O_2 . Zásadní roli při zhášení 1O_2 hrají neenzymatické antioxidanty jako karotenoidy, tokoferoly a plastochinony, které jsou přítomné v thylakoidních membránách (Krieger-Liszkay et al., 2008; Triantaphylidès & Havaux, 2009).

Zatímco intracelulární signalizační funkce H_2O_2 a jeho implikace v regulaci buněčné smrti byly již nějakou dobu stanoveny (Thordal-Christensen et al., 1997), podobná funkce pro 1O_2 byla v rostlinách rozpoznána později (Camp et al., 2003; Wagner et al., 2004). Tyto opožděné poznatky pramení ze skutečnosti, že studium specifické biologické aktivity 1O_2 v rostlinách je ztíženo zaprvé vysokou reaktivitou a krátkou životností 0,5–1 μ s v rostlinných buňkách a za druhé současnou produkcí jiných ROS při fotooxidačním stresu (Telfer, 2014). Nicméně pochopení buněčných odpovědí na 1O_2 v rostlinách pokročilo, a to díky použití mutantů *Arabidopsis thaliana* s podmíněnou akumulací 1O_2 v chloroplastu. Tento mutantní přístup odhalil, že kromě své přímé toxicity může 1O_2

fungovat také jako signální molekula důležitá pro indukci programované buněčné smrti a aklimaci na vysoké ozáření (Zhang et al., 2014).

1.1.3 Peroxid vodíku (H_2O_2)

H_2O_2 je jedna z nejznámějších ROS. Je známo, že hraje důležitou roli v rostlinách při působení biotického i abiotického stresu (Dat et al., 2000). Podílí se na mnoha mechanismech rezistence rostlin vůči těmto stresům, včetně posílení buněčné stěny rostlin a produkce fytoalexinu (Petrov & Van Breusegem, 2012). Působí také jako klíčový regulátor v široké škále fyziologických procesů, jako je senescence (Peng et al., 2005), fotorespirace a fotosyntéza (Noctor & Foyer, 1998), pohyby průduchů (Bright et al., 2006), buněčný cyklus (Mittler et al., 2004), růst a vývoj (Foreman et al., 2003).

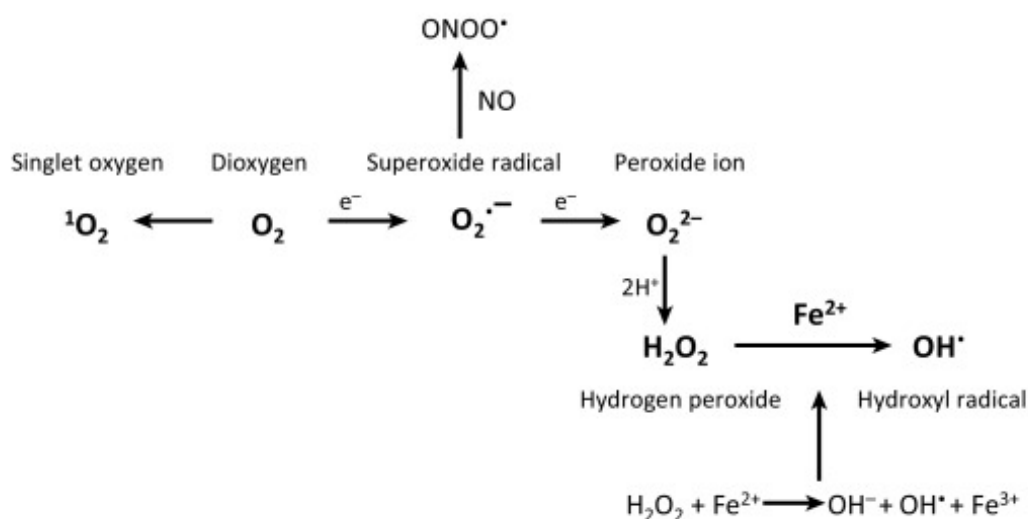
Nadměrná akumulace H_2O_2 může vést k oxidačnímu stresu v rostlinách, který pak spouští buněčnou smrt (Arora et al., 2002). Hromadění H_2O_2 je pro buňku vysoce toxické, protože H_2O_2 je jediným radikálem, který může projít biologickými membránami a napadnout další subcelulární kompartmenty. Dále může H_2O_2 také vést k produkci vysoce reaktivních $HO\cdot$ v přítomnosti dvojmocných kationtů.

Udržování koncentrace H_2O_2 ve vhodné úrovni může podpořit vývoj rostlin a posílit odolnost vůči environmentálním stresorům. H_2O_2 ovlivňuje expresi různých genů důležitých pro stresové odpovědi, metabolismus, transport proteinů a buněčnou organizaci (Desikan et al. 2001). Další studie ukázaly, že H_2O_2 aktivuje signální dráhy mnoho dalších důležitých signálních molekul jako vápník (Ca^{2+} ; Wurzinger et al. 2011), kyselina salicylová (SA; Yuan & Lin 2008), kyselina abscisová (ABA), kyselina jasmonová (JA; Wang & Wu, 2013), ethylen (Vandenabeele et al., 2003) a oxid dusnatý (NO; Wang et al., 2014). Tyto signální molekuly fungují společně a hrají komplexní roli v signální transdukcii, jako odpovědi na rezistenci, růst a vývoj rostlin. Ve srovnání s $\cdot OH$ je H_2O_2 slabší oxidační činidlo. Za normálních podmínek je poločas rozpadu H_2O_2 pravděpodobně 1 ms a poločasy ostatních forem ROS jsou mnohem kratší, asi 2–4 μs (Bhattacharjee, 2005).

1.1.4 Superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$)

$O_2^{\cdot-}$ je vysoce reaktivní nukleofilní radikál s poločasem rozpadu přibližně 1 μs , který se tvoří hlavně ve fotosystému I (PSI) během necyklického elektronového transportního řetězce (ETR). Obvykle se jedná o první formu ROS, která se v organismu vytvoří. Z ní se pak mohou tvořit další ROS, především H_2O_2 a $HO\cdot$. Oba tyto ROS mají potenciál být toxičtější a způsobovat peroxidaci membránových lipidů. $O_2^{\cdot-}$ přednostně reaguje

v thylakoidních membránách s jinými radikálovými sloučeninami, včetně NO a složkami bílkovin obsahujícími hemová i nehemová železná centra (Halliwell, 2006). Reaktivita $O_2^{\cdot-}$ nevede vždy ke škodlivému účinku na biomolekuly (Muñoz-Rugeles et al., 2018). Jeho význam na druhé straně zvyšuje fakt, že je zdrojem důležité signální ROS, H_2O_2 (Grace, 2005).



Obrázek 1 Přehled forem ROS a jedné z reaktivních forem dusíku a jejich vznik. Zdroj: (Mittler, 2017).

1.2 Tvorba ROS

1.2.1 Chloroplast

Hlavním místem tvorby ROS v tylakoidech chloroplastů jsou reakční centra PSI a fotosystému II (PSII). Fotosyntetické štěpení molekul vody (H_2O) na molekulární O_2 je zásadní proces pro veškerý aerobní život na Zemi. Světlem řízená oxidace H_2O se vyskytuje v pigment-proteinovém komplexu PSII v thylakoidní membráně rostlin, řas a sinic. Transport elektronů přes thylakoidní membránu ukončený tvorbou nikotinamidadeninindinukleotidfosfátem (NADPH) a adenosintrifosfát (ATP) je spojen s tvorbou ROS, jako je především $O_2^{\cdot-}$. Tvorba $O_2^{\cdot-}$ probíhá hlavně na PSI. Za určitých okolností však PSII přispívá k celkové tvorbě ROS v thylakoidní membráně. Za omezeného transportu elektronů mezi oběma fotosystémy, dochází k fotoredukci O_2 redukující stranou PSII a generuje se $O_2^{\cdot-}$. Následně dochází k jeho dismutaci na H_2O_2 a může nastat tvorba HO^{\cdot} . Na straně elektronového donoru PSII je částečná nebo úplná inhibice enzymatické aktivity komplexu manganu štěpícího H_2O spojena s neúplnou oxidací H_2O na H_2O_2 (Pospíšil, 2009).

Fotoprodukce ROS je do značné míry ovlivněna fyziologickými a environmentálními faktory a její rychlost se zvyšuje za podmínek, kdy intenzita fotonů převyšuje intenzitu potřebnou pro asimilaci oxid uhličitý (CO_2 ; Asada, 2006).

Methylviologen (MV) je herbicid, který se v experimentech využívá jako induktor tvorby $\text{O}_2^{\cdot-}$ na akceptorové straně PSI (Hiyama et al., 1993). U izolovaných thylakoidů MV způsoboval největší poškození na úrovni aktivity štěpení H_2O v PSII, zatímco PSI nebyl tvořícím se $\text{O}_2^{\cdot-}$ téměř ovlivněný. MV snížil kvantový výtěžek PSII. Tato data ukazují, že PSII je citlivější na $\text{O}_2^{\cdot-}$ než PSI (Krieger-Liszkay et al., 2011).

$\text{O}_2^{\cdot-}$ lze detekovat mimo thylakoidní membránu, ale není známo, jak daleko je schopný transportu *in vivo* a zda dosáhne PSII jako $\text{O}_2^{\cdot-}$ nebo spíše jako H_2O_2 (Tjus et al., 2001).

Chloroplasty působí nejen jako orgány odpovědné za fotosyntézu, ale také jako senzory environmentálních stresů, jako je vysoká intenzita osvětlení, UV záření, teplo, chlad nebo sucho. Za stresových podmínek se transport elektronů opírá o jinou dráhu, a to o Mehlerovu reakci (Roach and Krieger-Liszkay, 2014). V Mehlerově dráze jsou elektrony transportovány z ferredoxinu na O_2 , spíše než na NADP^+ a produkují $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Kromě $\text{O}_2^{\cdot-}$ se v chloroplastech tvoří také $^1\text{O}_2$, a to přenosem elektronu z excitovaného chlorofylu, který přechází do základního stavu (Apel and Hirt, 2004).

Fyziologické procesy v chloroplastech úzce souvisejí s generací ROS v mitochondriích (Cui et al., 2019).

Produkce ROS v chloroplastech je zásadní pro toleranci vůči suchu a zasolení u rostlin (Tseng, Liu & Yiu 2007). Naproti tomu nedostatek mechanismů vychytávání ROS zvýšil citlivost na stres, a to jak na slanost, tak na sucho (Serrato et al., 2004; Wang et al., 2005).

1.2.2 Peroxisomy

Rostlinné peroxisomy jsou místem mnoha klíčových metabolických drah, jako je například β -oxidace mastných kyselin, fotorespirace, metabolismus ureidů a detoxikace xenobiotik. Značné množství ROS je produkováno v peroxizomálních reakčních drahách. Peroxisomy proto patří mezi hlavní intracelulární zdroje rostlinných ROS, hlavně H_2O_2 (del Río and López-Huertas, 2016). V peroxizomální membráně se nachází krátký ETR obsahující cytochrom b a NADH-dependentní železitý chelát. V tomto řetězci dochází na cytochromu b k tvorbě $\text{O}_2^{\cdot-}$. Xanthinoxidáza (XO, EC 1.17.3.2) přispívá k tvorbě ROS v peroxisomech. Tvoří se $\text{O}_2^{\cdot-}$ vzniklý během oxidace xanthinu nebo hypoxantinu na kyselinu močovou (Janků et al., 2019). $\text{O}_2^{\cdot-}$ produkováno v peroxisomech je dismutováno Cu/ZnSOD, čímž se v peroxisomech tvoří H_2O_2 .

Během fotorespirace vzniká H_2O_2 v peroxisomech jako výsledek aktivity glykolát oxidázy (GOX, EC 1.1.3.15), která navazuje na oxygenační aktivitu ribuloso-1,5-bisfosfát-oxygenasy (RuBisCO, EC 4.1.1.39) v chloroplastech (Fahnenstic et al., 2008). H_2O_2 může být produkován také aktivitami několika flavinoxidás (EC 1.14.13.8). Kromě toho jsou v peroxisomech také přítomny enzymy účastnící se katabolismu H_2O_2 , jako je kataláza (CAT, EC 1.11.1.6) nebo monodehydroaskorbátoreduktáza (MDAR, EC 1.6.5.4; Corpas et al., 2001).

1.2.3 Mitochondrie

Mitochondrie v porovnání s peroxisomy a chloroplasty produkují u rostlin menší množství ROS. Ty se v mitochondriích tvoří v ETR v komplexu I a komplexu III. Ubisemichinonový meziprodukt vytvořený v komplexu I a III odevzdá elektrony O_2 a generuje O_2^- , který je redukován na H_2O_2 (Raha & Robinson 2000; Rhoads et al., 2006).

K tvorbě O_2^- dochází přímou redukcí O_2 na O_2^- ve flavoproteinové oblasti segmentu NADH dehydrogenázy (EC 1.6.99.3; komplex I) dýchacího řetězce (Arora et al., 2002). Když jsou substráty vázané na NAD^+ pro komplex I omezené, může dojít k transportu elektronů z komplexu II do komplexu I (reverzní tok elektronů). Ukázalo se, že tento proces zvyšuje produkci ROS na komplexu I a je regulován hydrolýzou ATP (Turrens, 2003). Ubichinon-cytochromová oblast (komplex III) ETR také produkuje O_2^- . Předpokládá se, že plně redukováný ubichinon daruje elektron cytochromu C1 a zanechává nestabilní vysoce redukující ubichinonový radikál, který je příznivý pro únik elektronů na O_2 , a tím i pro tvorbu O_2^- (Murphy, 2009). ROS může produkovat několik enzymů přítomných v mitochondriální matrix. Některé z nich produkují ROS přímo, například akonitáza (akonitát hydratáza, EC 4.2.1.3), zatímco jiné, jako 1-galaktono- γ -laktondehydrogenáza (GAL, EC 1.3.2.3), jsou schopny dodávat elektrony do ETR a tím generovat tvorbu O_2^- (Andreyev et al., 2005; Rasmusson et al., 2008).

1.2.4 Apoplast

Apoplastické ROS jsou produkovány hlavně NADPH oxidásami (EC 1.6.3.1) lokalizovanými v plazmatické membráně, peroxidásami (EC 1.11.1.7) buněčné stěny a aminoroxidásami (EC 1.4.3.2; Kadota et al., 2015). NADPH oxidázy u rostlin, známé také jako respiratory burst oxidase homologues (RBOH), jsou transmembránové flavoproteiny, které oxidují cytoplazmatickou NADPH, translokují elektrony přes plazmatickou membránu a redukují extracelulární okolní kyslík (triplet) za vzniku O_2^- v apoplastu. O_2^- není díky svému náboji schopen pasivně procházet lipidovou

dvojvrstvou a zůstává v apoplastu, kde se rychle přeměňuje na H_2O_2 , buď spontánně, nebo v reakci katalyzované SOD (Browning et al., 2012). Funkce rostlinných NADPH oxidás přesahují stresové reakce a zahrnují role i ve vývoji (Takeda et al., 2008), v transportu sodíku v xylémové míze (Jiang et al., 2012) a také v dálkové („systémové“) signalizaci ROS (Miller et al., 2009).

Rostlinné RBOH mají cytosolové flavinadeninukleotidy ($FADs^-$) a NADPH vazebné domény v C-terminální oblasti a transmembránové domény, které odpovídají těm v savčích NADPH oxidásách (Suzuki et al., 2011). Rostlinné RBOH mají navíc cytosolické N-terminální rozšíření, které obsahuje regulační oblasti, jako jsou EF-hand domény vázající vápník a fosforylační cílová místa, která jsou důležitá pro funkci a regulaci rostlinných NADPH oxidás (Oda et al., 2010; Suzuki et al., 2011). Stále více výzkumů prokázalo, že NADPH oxidásy jsou klíčovými signálními uzly, které integrují četné signální transdukční dráhy se signalizací ROS a zprostředkovávají řadu důležitých biologických procesů, včetně buněčného růstu, vývoje rostlin, reakce a adaptace na abiotický stres (Suzuki et al., 2011; Marino et al., 2012).

NADPH oxidásy se účastní signalizačního procesu zvaného vlna ROS („ROS wave“). V rámci ní dochází k snímání oxidačního vzplanutí sousedními buňkami. Ty ho mohou převést na cytosolickou signalizaci. Apoplastická produkce ROS není omezená pouze na obranu proti patogenům, ale také se podílí na uzavření průduchů indukovaném ABA (X. Zhang et al., 2001) a signalizaci v reakci na abiotické stresy (Suzuki et al., 2011).

Apoplastické peroxidásy třídy III hrají klíčovou roli v reakci rostlin na infekci patogeny a abiotické stresy. Mechanické poškození rostliny obvykle okamžitě vyvolá rychlou aktivaci apoplastických peroxidás a oxidační vzplanutí, následované zvýšenou expresí genů kódujících peroxidásy. Studie naznačují, že počáteční oxidační vzplanutí vzniká z komplexní souhry peroxidás s jinými apoplastickými enzymy. Pozdější reakce po poranění zahrnují různé formy hojení tkáně, například prostřednictvím suberinizace závislé na peroxidáse nebo buněčné smrti. Omezené údaje naznačují, že signalizace smrti zprostředkovaná ROS během reakce na poranění může zahrnovat peroxidásovou síť spolu s dalšími redoxními molekulami. Závěrem lze říci, že schopnost peroxidás je jak generovat, tak vychytávat ROS (Minibayeva et al., 2015).

Tabulka 1. Souhrn vlastností jednotlivých ROS.

ROS	$t_{1/2}$	Migrační vzdálenost	Režim akce	Místo vzniku	Způsob odbourání
Superoxid	1-4 μ s	30 nm	Reaguje s Fe-S proteiny, dismutuje na H_2O_2	Apoplast, chloroplast, mitochondrii, peroxizomy	SOD, askorbát, flavonoidy
Hydroxylový radikál	1 ns	1 nm	Extrémně reaktivní se všemi biomolekulami	závisí na přítomnosti železa a H_2O_2	Prolin, cukry, askorbát, flavonoidy
Peroxid vodíku	>1 ms	>1 μ m	reaguje s proteiny napadáním cysteinových a methioninových zbytků	Apoplast, chloroplast, mitochondrii, peroxizom, cytosol	APX, CAT, GPX, PER, PRX, askorbát
Singletový kyslík	1-4 μ s	30 nm	oxiduje lipidy, proteiny a DNA	Jádra, membrány, chloroplast	Karotenoidy

Zdroj: (Mittler, 2017)

1.3 Antioxidační obrana u rostlin

Nadměrná oxidace a redukce buněčných složek je stejně škodlivé, takže udržení redoxní homeostázy je klíčové pro základní metabolické funkce (Foyer & Shigeoka, 2011). Z tohoto důvodu jsou rostliny extrémně bohaté na sloučeniny s antioxidační aktivitou (Wachter et al., 2005). Antioxidanty jsou molekuly schopné inhibovat nebo uhasit reakce volných radikálů a oddálit nebo zabránit poškození buněk (Nimse & Pal, 2015).

Hladina ROS je přísně kontrolována systémem enzymatických a neenzymatických antioxidantů, které podléhají přísné kompartmentalizaci (Foyer a Noctor, 2020). Neenzymatická antioxidační obrana je zprostředkována především nízkomolekulárními metabolity, jako Asc, glutathion (GSH), α -tokoferol, karotenoidy a flavonoidy (Smirnoff, 2018; Zechmann, 2018; Muñoz a Munné-Bosch 2019; Foyer a Noctor, 2020). Mezi hlavní antioxidační enzymy patří SOD, CAT, askorbátperoxidázy (APX, EC 1.11.1.11), dehydroaskorbátreduktázy (DHAR, EC 1.8.5.1), MDAR a glutathionreduktázy (GRs, EC 1.8.1.7). Kromě toho mají antioxidační aktivitu také glutathionperoxidázy (GPXs, EC 1.11.1.12), peroxidázy a thio-, gluta- a peroxiredoxiny (Prxs; EC 1.11.1.25; EC 1.11.1.26; Dietz, 2011; Kang et al., 2019; Foyer a Noctor, 2020).

Antioxidanty s nízkou relativní molekulovou hmotností odstraňují ROS nepřímo i přímo. Nepřímým mechanismem je například chelace přechodných kovů, která brání účasti na Haber-Weissově nebo Fentonově reakci, zatímco přímý mechanismus zahrnuje odevzdání nebo přijímání elektronů, vychytávání radikálů a následně zabránění jejich reakci s biologickými molekulami (Kehrer, 2000). Výhodou neenzymatických antioxidantů oproti enzymatickým antioxidantům je jejich malá velikost, která jim umožňuje difundovat přes buněčné membrány a mohou se tak nacházet v blízkosti biologických molekul, které jsou potenciálními cíli ROS (Kohen & Nyska, 2002).

Nejvýznamnějším rostlinným antioxidantem, přítomným v milimolárních koncentracích v chloroplastech, je Asc, následovaný GSH, který je přítomen v 1000krát nižší koncentraci než Asc, ale je také životně důležitý (Noctor et al., 2018). Nejenže tyto antioxidanty vychytávají ROS odděleně, ale také spolupracují v rámci takzvaného cyklu voda-voda (Asada, 1999) a Asc-GSH (Foyer & Halliwell, 1976), aby metabolizovaly H_2O_2 a udržovaly dostatečnou excitační energii v chloroplastech (Foyer & Shigeoka, 2011).

1.3.1 Superoxiddismutázy (SOD)

SOD jsou klíčové antioxidační enzymy, které katalyzují dismutaci $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 a molekulární O_2 , (Sheng et al., 2014). Tento enzym vyžaduje ke své aktivitě kov jako kofaktor, proto se řadí mezi metaloezzymy (Dringen et al., 2005). SOD mohou využívat kovové ionty jako je železo (Fe), zinek (Zn), měď (Cu) a mangan (Mn). Podle typu kovu tak rozeznáváme FeSOD (u prokaryot a rostlin zejména v chloroplastech), Cu/Zn SOD (exprimována především u eukaryot, a to v cytosolu a chloroplastech), MnSOD (převládá v prokaryotech a v mitochondriích eukaryot) (Kliebenstein et al., 1998). U *Arabidopsis* jsou exprimovány tři geny pro Cu/ZnSOD (*CSD1*, *CSD2*, *CSD3*), jeden pro MnSOD (*MSD1*) a tři pro FeSOD (*FSD1*, *FSD2*, *FSD3*) (Pilon et al., 2011). Geny kódující SOD jsou citlivé na environmentální stresory a zvýšená aktivita obvykle koreluje se zvýšenou tolerancí rostlin vůči environmentálnímu stresu (Sharma et al., 2012).

Subcelulární lokalizace jednotlivých SOD souvisí s požadavky na detoxikaci (Kliebenstein et al., 1998). FSD2 je vázána na tylakoidní membránu chloroplastů, zatímco FSD3 je kolokalizována s chloroplastovými nukleoidy a chrání je před $O_2^{\cdot-}$ prostřednictvím tvorby heterodimerního proteinového komplexu s FSD2 (Myouga et al., 2008). Cytosolická lokalizace je uváděna pro FSD1 (Kliebenstein et al., 1998). Kromě toho fúze s GFP naznačují, že se FSD1 může také lokalizovat v chloroplastech a jádře

(Kuo et al., 2013; Dvořák et al., 2021a). Delece 11 amino-koncových nukleotidů sekvence cDNA FSD1 omezila tento protein na cytosol (Kuo et al., 2013). Všechny izoformy FSD *Arabidopsis* jsou tedy lokalizovány v chloroplastu, zatímco FSD1 vykazuje také lokalizaci v cytosolu a jádře. Za podmínek solného stresu se FSD1 akumulovala v Hechtových řetězcích a retikulu, které spojují protoplast s buněčnou stěnou plazmolizovaných buněk. Kromě toho produkce ROS indukovaná solí korelovala s lokalizací FSD1 v kořenech a byla zvýšena u rostlin mutantů *fsd1* (Dvořák et al., 2021a).

Hlavním faktorem ovlivňujícím expresi *FSD1* je dostupnost mědi v kultivačním médiu, a tuto závislost exprese *FSD1* reguluje transkripční faktor SQUAMOSA promoter-binding-like protein 7 (SPL7; Yamasaki et al., 2009). Při nedostatku mědi se SPL7 přímo váže na motivy GTAC v promotoru *FSD1*, čímž spouští její expresi. SPL7 také zároveň zprostředkovává snížení hladiny mRNA *CSD* pomocí miR398 (Yamasaki et al., 2009). Toto pozorování naznačuje, že aktivita a exprese *CSD* je při nedostatku mědi nahrazena FSD1, zatímco při nízké dostupnosti železa byl zjištěn opačný trend (Waters et al., 2012). Exprese genů *SPL7* a *FSD1* je také regulována cirkadiálními a diurnálními rytmy (Perea-García et al., 2016). Kromě toho je aktivita FSD1 zprostředkována přímou interakcí s chloroplastovým chaperoninem 20 (CNP20; Kuo et al., 2013) a také MAPK (Takáč et al., 2014; Dvořák et al., 2021b). Bioinformatická analýza na základě koexprese a analýze fosforylačních míst ukázala, že FSD1 může být regulována pomocí MPK 3 (Dvořák et al., 2021b).

Mutanty *fsd1* vykazují přecitlivělost na oxidativní stres vyvolaný MV (Dvořák et al., 2021a). V souladu se známou regulací exprese, abundance a aktivity FSD1 u *Arabidopsis thaliana* zjištění prokázala, že antioxidační funkce FSD1 závisí na dostupnosti Cu^{2+} v růstovém médiu. Mutanty *Arabidopsis fsd1* vykazovaly nižší schopnost rozkládat O_2^- při nízkých koncentracích Cu^{2+} v médiu. Prodloužená expozice MV vedla ke snížení hladin Asc a vyšší karboxylaci proteinu v mutantech *fsd1* a transgenních rostlinách postrádajících plastidový FSD1 “pool” ve srovnání s divokým typem. MV vyvolal rychlý nárůst aktivity FSD1, následovaný poklesem po 4 hodinách dlouhé expozice. Genetické narušení FSD1 negativně ovlivnilo APX rozkládající H_2O_2 v mutantech *fsd1*. Chloroplastická lokalizace FSD1 je zásadní pro udržení redoxní homeostázy. Proteomická analýza ukázala, že citlivost mutantů *fsd1* na MV se shodovala se sníženým množstvím ferredoxinu a PSII světlosběrných komplexních proteinů. (Melicher et al., 2022).

1.3.2 Kataláza (CAT)

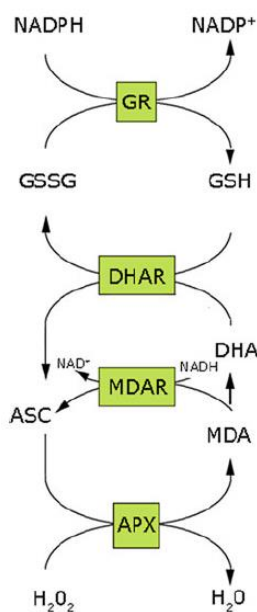
CAT je homotetramerní protein obsahující železo, který katalyzuje rozklad H_2O_2 na H_2O a O_2 a hraje ústřední roli v antioxidantní metabolické síti prokaryotických a eukaryotických buněk (Kirkman & Gaetani, 2007). CAT díky svým kinetickým vlastnostem udržuje hladiny H_2O_2 pod určitými limity, a proto je považována za jeden z hlavních antioxidantních enzymů s klíčovou rolí ve vývojových procesech a stresových podmínkách (Nandi et al., 2019). Vezmeme-li v úvahu buněčnou kompartmentalizaci, CAT lze nalézt ve velkém množství v peroxisomech, zatímco tento enzym nebyl nalezen v chloroplastech. Zachycuje H_2O_2 vznikající v peroxisomech během procesu fotorespirace a β -oxidace mastných kyselin. CATs obsahují čtyři hemové podjednotky s Fe^{2+} ionty, které procházejí oxidací a katalyzují disociaci dvou molekul H_2O a O_2 (Arora et al., 2002). CAT vycytává také H_2O_2 generovaný během mitochondriálního transportu elektronů (Scandalios et al., 1997). V rostlině *Arabidopsis thaliana* byly popsány tři geny CATs (*CAT1*, *CAT2* a *CAT3*) (Du et al., 2008). *CAT1* je exprimován hlavně v pylu a semenech, *CAT2* ve fotosyntetických tkáních, ale také v kořenech a semenech. *CAT3* je poté spojen s vaskulárními tkáněmi a také se senescentními listy (Mhamdi et al., 2010; Su et al., 2018).

1.3.3 Askorbát-glutathionový (Asc-GSH) cyklus

Asc-GSH cyklus představuje jeden z nejdůležitějších mechanismů odbourávání H_2O_2 u rostlin. Důležitost této dráhy lze posoudit ze skutečnosti, že je přítomna v cytosolu, chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech (Jimenez a Hernandez, 1997). Detoxifikace ROS prostřednictvím Asc-GSH cyklu způsobuje přechodné změny hladin většiny meziproductů této dráhy (Foyer a Shigeoka, 2011). Centrálním enzymem Asc-GSH cyklu je APX.

APX patří do rodiny peroxidás obsahujících hem, které katalyzují odbourávání H_2O_2 závislé na Asc. Je přítomna v širokém spektru rostlinné říše a hraje klíčovou roli v regulaci růstu. APX se liší od ostatních peroxidás ve své závislosti na Asc jako zdroji redukční síly a v jeho nepřítomnosti se stává nestabilní (Shigeoka et al., 2002). U *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno osm členů rodiny genů *AtAPX*, které kódují tři cytosolové (*AtAPX1*, -2 a -6), tři peroxizomální (*AtAPX3*, -4 a -5) a dva chloroplastické (*AtsAPX* a *AttAPX*) proteiny (Narendra et al., 2006), z nichž *AtsAPX* se váže jak na chloroplastovou matici, tak na mitochondrie (Chew et al., 2003). APX, které jsou

klasifikovány na základě jejich subcelulární lokalizace, vykazují různé strukturní a kinetické vlastnosti, včetně přítomnosti specifických konzervovaných domén a signálních peptidů. Uvádí se, že thylakoidální isoforma je první, která zachycuje molekulu H_2O_2 , protože se nachází v blízkosti akceptoru PSI (Huseynova et al., 2014). Protože APX jsou oxidoreduktázy závislé na hemu, je železo kritické pro katalytickou aktivitu a nedostatek železa jeho aktivitu snižuje. Bylo zjištěno, že aktivita APX se zvyšuje v přítomnosti dalších antioxidantních enzymů, jako je SOD a GR, což ukazuje na funkční propojení mezi různými antioxidantními enzymy. APX není schopna vylučovat hydroperoxydy lipidů a je inhibována kyanidem, azidem a thiolovými modifikátory (Zhang et al., 2014). Isoformy APX jsou důležité pro toleranci rostlin na stres, ale také pro vývojové procesy (Shigeoka et al., 2002). APX jsou aktivně exprimovány při biotických stresech (napadení patogeny, herbivory, fyzické poškození) i při abiotických stresech (sůl, sucho, teplo, chlad, UV záření, oxidační stres atd.). Rozsah exprese APX přímo koreluje s délkou trvání a intenzitou působícího stresu (Shigeoka et al., 2002).



Obrázek 2 Schéma askorbát-glutathionového cyklu (zkratky: APX, askorbát peroxidáza; MDAR, monodehydroaskorbát reduktáza; DHAR, dehydroaskorbát reduktáza; GR, glutathion reduktáza; MDA, monodehydroaskorbát; DHA, dehydroaskorbát; GSH, redukovaný glutathion; a GSSG, glutathion disulfid.). Zdroj: (Trchounian et al., 2016)

APX detoxikuje H_2O_2 , přičemž dochází k oxidaci dvou molekul Asc, který slouží jako specifický donor elektronů. Současně dochází k tvorbě radikálu s krátkou životností, monodehydroaskorbátu ($MDA\cdot$), který může být spontánně přeměněn na Asc a dehydroaskorbát (DHA) nebo může být rychle redukován na Asc pomocí NAD(P)H-

závislé MDAR (Foyer & Shigeoka, 2011). Na rozdíl od Asc, DHA postrádá antioxidační schopnost a je přeměněn zpět na Asc přidáním dvou elektronů z GSH pomocí DHAR (Nimse & Pal, 2015). GSH se regeneruje ze svého oxidovaného stavu, glutathiondisulfidu, působením GR pomocí elektronů z NAD(P)H, čímž se uzavírá regenerační cyklus Asc a GSH (Noctor & Foyer, 1998).

Rostlinné GPXs jsou přítomny v různých rostlinných tkáních a vývojových stádiích (Yang et al., 2005, 2006). U rostlin může být GSH-dependentní peroxidásová aktivita spojena s izoenzymy glutathion transferázy (GST, EC 2.5.1.18). Jejich role při detoxikaci lipidových hydroperoxidů a dalších reaktivních molekul byla prokázána u různých druhů a za různých stresových podmínek (Dixon & Edwards, 2009). Rostlinné GPX obsahují ve svém aktivním místě cystein namísto selenocysteinu, což může být důvodem jejich nižší aktivity ve srovnání s jejich savčími protějšky (Navrot et al., 2006). U některých rostlinných GPX bylo prokázáno, že mají jak GSH, tak thioredoxin peroxidásu, ale thioredoxinový regenerační systém je mnohem účinnější než GSH systém (Herbette et al., 2002).

CAT vykazují nízkou aktivitu proti organickým peroxidům. Ve srovnání s peroxidásami mají vyšší specifitu pro H_2O_2 , proto by peroxidázy mohly odstranit H_2O_2 , i když jsou přítomny v nízkých koncentracích (Sharma et al., 2012). Na druhou stranu reakce řízené peroxidásami využívají antioxidanty s nízkou relativní molekulovou hmotností. Tudíž odstranění H_2O_2 pomocí této cesty může být pro buňku velmi energeticky náročné, jelikož využívá důležité molekuly z buněčného prostředí, a to konkrétně dvě molekuly GSH, které jsou potřeba na odstranění jedné molekuly H_2O_2 (Kohen & Nyska, 2002).

1.4 Tvorba ROS a antioxidační obrana během solného stresu u rostlin

Zvýšený obsah solí v půdě je velmi nepříznivým environmentálním faktorem, který ovlivňuje klíčení semen, růst plodin a produktivitu. Více než 800 milionů hektarů půdy (cca 6 % celkové světové rozlohy) je zasaženo nadměrnou koncentrací soli (Munns & Tester, 2008) a tento problém se stále zhoršuje.

Solný stres je běžně způsoben vysokými koncentracemi sodných (Na^+) a chloridových (Cl^-) iontů v půdě (Ismail et al., 2014). Vysoké koncentrace solí v půdě vyvolávají u rostlin kromě iontového stresu také osmotický stres. Nadbytek rozpustných solí v půdě snižuje vodní potenciál (to znamená, že snižuje dostupnost H_2O pro rostlinu) na povrchu kořene, čímž snižují příjem H_2O rostlinou (Hasegawa et al., 2000). To vede k deficitu

H₂O u rostlin a osmotickému stresu. Iontový stres je důsledkem toxického účinku iontů soli uvnitř rostlinných buněk. Soli absorbované kořeny procházejí transpiračním proudem na velkou vzdálenost k výhonkům, a nakonec se hromadí v listech (Munns & Tester, 2008). Vysoké koncentrace Na⁺ v cytoplazmě narušují příjem dalších iontů do rostlinných buněk, což má nepříznivé účinky na mnoho metabolických drah. Například draslík (K⁺) je důležitý pro katalytické aktivity mnoha enzymů (Fu & Luan, 1998; Lazof & Bernstein, 1999). Osmotický a iontový stres může způsobit sekundární stres v rostlinách, včetně hromadění toxických sloučenin a narušení rovnováhy živin. ROS, jako jsou HO[•], H₂O₂ a O₂⁻, se hromadí v rostlinných buňkách při stresu ze soli (Li et al., 2015).

Klíčovým hráčem v signalizaci ROS při solním stresu u rostlin je NADPH oxidáza (Demidchik & Shabala, 2018). NADPH oxidáza je enzymový komplex vázaný na plazmatickou membránu z rodiny NOX (Lambeth & Neish, 2014). NADPH oxidáza, kódovaná geny RBOH, produkuje po aktivaci extracelulární O₂⁻ (Foreman et al., 2003). Většina rostlinných druhů má více isoform RBOH (např. deset RBOH v *Arabidopsis*; Sagi & Fluhr, 2006). NADPH oxidázy jsou aktivovány solným stresem, a to jak na transkripční, tak na funkční úrovni (Ma et al., 2012).

Jednou z prvních projevů solného stresu v rostlinných buňkách je zvýšení koncentrace volného Ca²⁺ v cytosolu (Wang et al., 2019). NADPH oxidáza má dvě vazebná místa pro Ca²⁺ (tzv. doména „EF-hand“) na N-konci (Marino et al., 2012). Vazba Ca²⁺ na EF-hand doménu následně spouští konformační změnu, která má za následek aktivaci přenosu elektronů (Miller et al., 2010). Generovaný O₂⁻ je pak rychle přeměněn na H₂O₂ v apoplastě pomocí SOD, což vede k aktivaci ROS-senzitivních Ca²⁺ permeabilních kanálů (Demidchik et al., 2018). Zvýšený průchod Ca²⁺ přes plazmatickou membránu má za následek další aktivaci NADPH oxidázy (Demidchik & Shabala, 2018). Tento samoamplifikační mechanismus může prodloužit trvání a amplitudu slabých signálů a převést je do široké škály reakcí, od transkripčních změn v hladinách exprese klíčových genů (Hu et al., 2016; Nath et al., 2019), až po změny v aktivitě (Shabala & Shabala, 2017) a intracelulární distribuci klíčových membránových transportérů (Martiniere et al., 2019). Takový samoamplifikační mechanismus je spojen výhradně s NADPH oxidázami (Liu et al., 2020).

Jak už bylo zmíněno, tak genom *Arabidopsis* obsahuje 10 genů kódujících NADPH oxidázy, označených *AtRbohA* až *J*, které vykazují různý průběh exprese během vývoje rostliny a reakci na faktory prostředí (Fluhr, 2009; Marino et al., 2012). Například

AtRbohA, *B* a *C* jsou exprimovány pouze v kořenech, zejména v elongační zóně. *AtRbohC* byl specificky identifikován jako protein, který hraje roli ve vývoji kořenových vlásků (Foreman et al., 2003). Uvádí se, že *AtRbohH* a *J* jsou exprimovány pouze v pylu. *AtRbohD* i *AtRbohF* jsou exprimovány ve všech rostlinných orgánech a jsou hlavními isoformami zapojenými do obranných reakcí patogenů (Torres et al., 2002), ABA-indukovaného zavírání průduchů (Kwak et al., 2003), signalizace JA (Maruta et al., 2011) a ROS-dependentní regulace homeostázy Na^+/K^+ při solném stresu (Ma et al., 2012). Bylo prokázáno, že mírný solný stres způsobuje rychlou a přechodnou akumulaci ROS v *A. thaliana* (maximum po 1 hodině) následovaný druhým oxidativním vzplanutím (po 6 hodinách) (Xie et al., 2011). HY1 hemoxygenáza (EC 1.14.99.3) hraje důležitou roli v signalizaci během solného stresu a vyžaduje účast ROS tvořených pomocí *AtRbohD*. Bylo také zjištěno, že *AtRbohF* plní klíčovou roli při ochraně buněk výhonků před akumulací Na^+ (Jiang et al., 2012).

K překonání osmotického stresu se v rostlinách akumulují osmoticky aktivní látky (osmolyty), které podporují příjem a udržení H_2O v pletivech (Chen & Jiang, 2010). Akumulace organických osmolytů, jako je prolin, glycinbetain, cukerné alkoholy, polyaminy a proteiny (např. „Late embryogenesis abundant“ (LEA) proteiny) v cytoplazmě vyrovnává osmotické potenciály a udržuje nízký intracelulární vodní potenciál rostlin. Vzhledem ke své kompatibilní povaze tyto osmolyty působí proti škodlivým účinkům osmotického a iontového stresu (Verslues et al., 2006). Prolin patří mezi nejběžnější volné aminokyseliny, které se akumulují v rostlinách vystavených stresu z nedostatku H_2O . Prolin má však více rolí, které se nemusí týkat jenom osmotické rovnováhy. Může totiž stabilizovat proteinové komplexy, zachycovat volné radikály a být zdrojem uhlíku a dusíku pro růst po úlevě od stresu (Szabados & Saviouré, 2010).

Významnou signální roli při solném stresu zastávají také MAPK. MAPK jsou signální bílkoviny uspořádané do kaskád, které zprostředkovávají indukci obranných mechanismů rostlin po vystavení stresu, přes fosforylaci transkripčních faktorů, nebo jiných důležitých proteinů (Komis et al., 2018).

U *Arabidopsis* byly identifikovány dvě signální dráhy indukované NaCl : MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6 a MKK9-MPK3/MPK6 (Teige et al., 2004; Xu et al., 2008). MPK6, jako poslední MAPK v kaskádě se váže s e signálním fosfolipidem kyselinou fosfatidovou, která stimuluje její aktivitu. MPK6 fosforyluje a aktivuje SOS1 (salt overly sensitive 1), což je antiporter Na^+/H^+ (Yu et al., 2010). Pozdější práce ukázala, že MPK3,

kteřá je částečně redundantní ke MPK6, interaguje s fosfolipázou D alfa 1, která katalyzuje reakci vedoucí ke tvorbě kyseliny fosfatidové. Tato interakce je důležitá pro odolnost vůči solnému stresu a také ABA signalizaci (Vadovič et al., 2019). TDNA inserční mutant s chybějící expresí *MPK3* vykazuje senzitivitu na solný stres (Persak & Pitzschke, 2013; Pitzschke et al., 2014). MAPK také regulují expresi antioxidantních enzymů během solného stresu. Expese *MKK5*, která je fosforylována pomocí MEKK1 a sama fosforyluje MPK6, je nevyhnutná pro expresi chloroplastových *FSD2* a *FSD3* během solného stresu (Xing et al., 2015). Expese CAT je aktivována pomocí MKK1 v těchto podmínkách (Xing et al., 2007).

1.5 Fluorescenční metody detekce ROS

Objasnění buněčných funkcí regulovaných redoxními změnami a rovnováhou mezi ROS a antioxidanty získávají stále větší pozornost. Je proto nezbytné detekovat, lokalizovat a identifikovat specifické radikály produkované v buňce, pochopit jejich roli v regulaci rostlinných procesů. ROS však vykazují komplexní prostorovou a časovou dynamiku, mají omezenou životnost a jsou vystaveny aktivitě buněčného antioxidantního systému. Tyto komplikace činí *in vivo* monitorování ROS náročným úkolem v rostlinných buňkách (Suzuki et al., 2012).

Fluorescenční metody jsou obecně citlivější, než jsou metody kolorimetrické. Jejich hodnocení je také rychlejší než u chemiluminiscenčních metod a obvykle vyžaduje nižší koncentrace sondy kvůli velmi příznivému poměru signálu k šumu (Stockert & Blázquez-Castro, 2017). Fluorescenční metody méně zasahují do biologických procesů oproti kolorimetrickým a chemiluminiscenčním metodám, což umožňuje jednodušší a selektivnější detekci ROS *in vivo* v buňkách a intaktních tkáních (Gomes et al., 2005). Vysoké množství endogenních fluorescenčních sloučenin činí zobrazování ROS v rostlinných buňkách náročným (Talamond et al., 2015). V pletivech je hlavním přispěvatelem k autofluorescenci chlorofyl, i když významná interference pochází také ze složek buněčné stěny, jako je např. celulóza a lignin. K autofluorescenci také přispívají další barevné molekuly a pigmenty (např. karoteny, xantofyly, flavonoidy, antokyany a alkaloidy; Roshchina, 2012). Všechny tyto sloučeniny mají odlišná excitační a emisní spektra, která se mohou překrývat s exogenními fluorescenčními markery a bránit jejich detekci, což činí spolehlivou kvantifikaci fluoroforů v rostlinách náročnější. Použitím mikroskopických technik, které jsou založeny na spektrálním zobrazování, jako je

konfokální a dvoufotonová mikroskopie, může pomoci vyřešit problém autofluorescence (Mylle et al., 2013; Mizuta et al., 2015).

Fluorescenční barviva (sondy) jsou chemicky čisté syntetizované molekuly, které lze použít pro detekci redoxního potenciálu nebo ROS v rostlinách. V ideálním případě by takové sondy měly být netoxické, vykazovat zanedbatelnou fotochemii, nízkou emisi na pozadí, být co nejméně citlivé na jiné parametry prostředí a také by měly být membránově propustné. Fluorescenční barviva by také měla být specifická, vysoce reaktivní při nízkých koncentracích, produkovat stabilní a kvantifikovatelné nedifuzní produkty, mít rychlou a reverzibilní kinetiku s vysokým poměrem signálu k šumu a nesmí reagovat s buněčnými antioxidanty (Wang et al., 2008).

1.5.1 2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetát (DCFH-DA)

DCFH-DA je jedním z nejčastěji používaných barviv při kvantifikaci a detekci ROS a oxidačního stresu v rostlinných buňkách. Patří do rodiny barviv s redukovaným fluoresceinem (dihydrofluorescein), ve které přidání diacetátového esteru usnadňuje pronikání do buněk přes plasmatickou membránu, což umožňuje lepší barvení (Wiederschain, 2011). Oxidace DCFH se jeví jako dvoustupňová reakce. Nejprve se po ztrátě jednoho elektronu vytvoří radikál $DCF^{\cdot-}$, a poté proběhne druhá jednoelektronová oxidace, jejímž výsledkem je 2,7-dichlorfluorescein (DCF; Wardman, 2007), který je zadržen v buňce, což umožňuje vizualizaci fluorescenční mikroskopii a průtokovou cytometrií (Li & Xing, 2011).

Aby se zabránilo pasivnímu úniku DCFH-DA přes plasmatickou membránu, což zkracuje dobu, po kterou lze toto barvivo zaznamenat, byly vyvinuty varianty DCFH-DA. Pro chlormethyl DCFH-DA derivát (CM-DCFH-DA) je zadržení oxidovaného fluorescenčního produktu v živých buňkách zvýšeno, kvůli kovalentní vazbě vytvořené mezi chlormethylovou skupinou a intracelulárními thiolovými skupinami (Cristina Ortega-Villasante et al., 2018).

1.5.2 CM-H2DCFDA (5-(a-6)-chlormethyl-2',7'-dichlordihydrofluorescein diacetát, acetyléster)

CM-H2DCFDA je chlormethylový derivát H2DCFDA. CM-H2DCFDA se často využívá na detekci H_2O_2 v neporušených buňkách. Specifita pro ROS u této sondy je však mnohem širší. CMH2DCFDA volně proniká plasmatickou membránou a je hydrolyzován v cytosolu za vzniku DCFH karboxylátového aniontu (Kalyanaraman et al., 2012). Oxidace má za následek tvorbu fluorescenčního DCF, který je excitován při 495 nm a

emituje při 520 nm (Kalyanaraman et al., 2012). Oxidace H₂DCF může být zprostředkován různými druhy radikálů: HO·, uhličitanovým radikálem a oxidem dusičitým, stejně jako thiylovými radikály, které jsou výsledkem oxidace thiolu (Halliwell & Whiteman, 2004; Kalyanaraman et al., 2012; Winterbourn, 2014). H₂O₂ nereaguje s H₂DCF přímo, ale vyžaduje přítomnost peroxidás nebo jiných enzymů obsahujících přechodné kovy (Winterbourn, 2014).

Barvení pomocí CM-H₂DCFDA je poměrně snadné a lze ho použít u většiny typů buněk. Pokud je fluorescence kvantifikována pomocí spektrofotometru nebo pomocí konfokálního skenovacího mikroskopu, je dobré, aby intenzita excitačního světla byla co nejnižší, protože tak se minimalizuje fotooxidace (Koopman et al., 2006). Ve srovnání s H₂DCFDA oxidace CM varianty indukuje tvorbu fluorescenčního CM-DCF, který vykazuje nižší pasivní únik z buňky (Forkink et al., 2010).

1.5.3 Zelený fluorescenční protein (GFP)

GFP se často používá jako fluorescenční značka pro genovou expresi a pro značení proteinů jak v prokaryotických, tak i v eukaryotických buňkách (M. Ormo et al., 1996). GFP nevyžaduje dodávku exogenních substrátů nebo kofaktorů. Byly vytvořeny modifikované verze proteinu, které nabízejí jedinečné excitační a emisní charakteristiky, umožňující koexpresi a současnou detekci modifikovaných FP proteinů s odlišnými barvami (Shaner et al., 2005; Stepanenko et al., 2011).

Reportérové molekuly ROS na bázi FP v rostlinách mohou nabízet několik výhod oproti fluorescenčním sondám na bázi barviva (Pouvreau, 2014). Jelikož FP nevyžadují permeaci substrátů, tak lze k monitorování metabolického procesu *in vivo* po akumulaci ROS použít neinvazivní techniky. Podle zvolené strategie ROS buď ovlivní hladinu nebo lokalizaci použitého FP, nebo změní jeho fluorescenční vlastnosti, aby se vytvořil signál, který koreluje s množstvím ROS. Geny kódující FP mohou být exprimovány v rostlinných buňkách, buď po stabilní integraci do genomu rostlinné buňky, nebo přechodně pomocí expresních vektorů (Quatresous et al., 2012)

Autofluorescence rostlinných buněk však může do značné míry bránit vizualizaci FP exprimovaných ve specifických typech buněk (Misra et al., 2012). V zelených tkáních je chlorofyl hlavním přispěvatelem k autofluorescenci s účinnou absorbcí v modrém spektru do 500 nm a fluorescenci od 600 do 800 nm. Ačkoli většina fluorescenčních reportérových proteinů má emisní maxima pod 600 nm, obrovské množství chlorofylu

a dalších pigmentů v zelených buňkách může podstatně rušit detekci FP (Shaner et al., 2005; Stepanenko et al., 2011).

Druhá generace redox-citlivých FP sond patří do třídy GPF (roGFP) citlivých na redukci. Tyto sondy vykazují dva odlišné excitační maxima (405 nm pro neutrální stav a 488 nm pro aniontovou formu), jejichž relativní amplitudy závisí na redoxním stavu fluoroforu (Choi et al., 2012). Tento postupný posun v excitačním spektru podstatně zlepšuje kvantifikaci fluorescence, protože umožňuje poměrovou analýzu (488exc/405exc), která umožňuje přesnější kvantifikaci buněčného redoxního stavu (Hanson et al., 2004). Bylo vytvořeno a charakterizováno několik variant roGFP, nejčastěji používané jsou roGFP1 a roGFP2. Kromě mutačních změn provedených ve variantě roGFP1 (C48S, S147C a Q204C) obsahuje roGFP2 další mutaci (S65T), která generuje mírný posun v maximálním excitačním spektru, což umožňuje větší dynamický poměr mezi oxidovanými a redukovanými formami (Dooley et al., 2004). Přestože je roGFP1 méně citlivý na pH než roGFP2, větší dynamický rozsah roGFP2 poskytuje výhodu, při jeho použití v konfokální laserové skenovací mikroskopii (Ortega-Villasante et al., 2016).

1.5.4 HyPer

H₂O₂ senzor HyPer je založen na inzerci cpYFP do redox-aktivní regulační domény OxyR proteinu *Escherichia coli* (Belousov et al., 2006). OxyR je transkripční faktor, který reguluje expresi redox-responzivních genů v bakteriích. Obsahuje několik cysteinových zbytků, z nichž některé jsou důležité pro specifické snímání H₂O₂. Cystein na pozici 199 (C199) má nízkou pK_a, což umožňuje jeho přímou reakci s H₂O₂. Po expozici H₂O₂ se na C199 vytvoří kyselina sulfenová, která kondenzuje s C208 za vzniku reverzibilní disulfidové vazby, produkující konformační změny, které podporují vazbu oxidovaného OxyR na DNA, čímž se aktivuje transkripce antioxidantních genů. Specifita snímání OxyR byla testována s různými molekulami i jinými, než je H₂O₂. Vzhledem k tomu, že Cys pár se nachází v hydrofobní kapse, dostupnost jiných oxidantů, jako je například O₂⁻, je omezená, což ukazuje vysokou specifitu pro H₂O₂. Inzerce cpYFP do domény OxyR proto značně zvyšuje její H₂O₂ specifitu, čímž se HyPer stává H₂O₂ specifickým senzorem (Choi et al., 2001; Belousov et al., 2006; Zheng et al., 1998).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Biologický materiál

Jako rostlinný materiál byla použita semena *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia-0 (Col-0) a semena mutantů *A. thaliana fsd1-1* (Dvořák et al., 2021a) a *mpk3-1* (Vadovič et al., 2019).

2.2 Chemikálie

Komerční směs živin pro přípravu Murashige a Skoog média (MS basal salt mixture, Duchefa)

Sacharóza (Sigma-Aldrich)

Draselná sůl kyseliny 2-(N-morflino)ethansulfonové (MES; Sigma-Aldrich)

Gellan Gum (Sigma-Aldrich)

Ethanol (Sigma-Aldrich)

Hypochlorid sodný (Sigma-Aldrich)

Chlorid sodný (Sigma-Aldrich)

5-(a-6)-chlormethyl-2',7'-dichlordihydrofluorescein diacetát, acetyléster (Thermo Scientific)

Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

2.3 Přístroje

Zoomovací stereomikroskop ZEISS Axio Zoom V16 (Carl Zeiss)

Konfokální laserový mikroskop s rotujícím diskem (Cell Observer SD, Carl Zeiss)

2.4 Softwary

ZEN 3.5 (blue edition; Carl Zeiss)

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

MS Excel (Microsoft), MS Powerpoint (Microsoft)

2.5 Metody

2.5.1 Příprava ½ Murashige a Skoog (MS) média

Do 500 ml MilliQ vody v kádince bylo přidáno 5 g sacharózy, 0,5 g MES a 1,075 g MS basal salt mixture. Po důkladném rozpuštění všech složek bylo pH upraveno na 5,8 pomocí 0,1M KOH. V případě přípravy pevného ½ MS média bylo přidáno 3 g Gellan Gum. Následně bylo médium autoklávováno.

2.5.2 Sterilizace semen

Sterilizace probíhala v sterilním boxu. Semena byla nejprve inkubována v 1 ml 70% ethanolu po dobu 5 min v plastové zkumavce za stálého protřepávání. Následně byl po sedimentaci semen 70% ethanol odpipetován a nahrazen stejným objemem 96% ethanolu, ve kterém byla semena inkubována po dobu 3 min za stálého protřepávání. V poslední části sterilizace byl ethanol odstraněn pipetováním a semena byla promyta sterilní vodou MilliQ (objem min. 1 ml) a to po dobu 30 sekund. Tímto způsobem byla semena promyta 4 krát. Následně byla semena přenesena na sterilní filtrační papír v Petriho misce pomocí pipety a po odpaření H₂O byly semena v uzavřené Petriho misce uchovány v lednici při 4°C ve tmě.

2.5.3 Kultivace rostlin

Semena byla pomocí sterilního párátko přenesena na povrch předem připraveného pevného ½ MS média v Petriho miskách. Po přenesení semen na médium byla semena ponechána jeden den v lednici při 4°C ve tmě a následně byla dána do fytotronu (21°C, 16/8h-světlo/tma, fotoperioda s osvětlením o intenzitě 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) na 4 dny.

2.5.4 Příprava barvicích roztoků:

Barvička CM-H2DCFDA (5-(a-6)-chlormethyl-2',7'-dichlordihydrofluorescein diacetát, acetyléster; 50 μg) byla rozpuštěna ve 20 μL dimethylsulfoxidu (DMSO) a byla 5 minut opatrně promíchávána vortexováním, aby došlo k úplnému rozpuštění. Následně byla barvička naředěna tekutým ½ MS médiem na koncentraci 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a byla krátce promíchána na vortexu. Poté byla polovina obsahu přepipetována do další zkumavky a bylo přidáno NaCl, aby koncentrace soli byla 200mM. Takto byl připraven barvicí roztok se solí a beze soli. Barvicí roztoky jsme uchovávali do doby použití v lednici při -20°C ve tmě.

2.5.5 Příprava preparátu a mikroskopické pozorování

Rostliny jsou opatrně přeneseny do 100 μl barvicího roztoku bez přídavku NaCl na podložní sklíčko, na kterého delší okraje byl předem nalepen tenký pruh (cca 2 mm široký) oboustranné lepicí pásky. Rostlina v roztoku byla přikryta krycím sklíčkem tak, aby se přilepilo na oboustranní lepicí pásku. Následně byl pod krycí sklo doplněn barvicí roztok pro vytlačení vzduchu. Vytvořený preparát byl ponechán 20 minut ve tmě při pokojové teplotě, aby došlo k penetraci barvičky do rostlinných pletiv.

2.5.6 Fluorescenční mikroskopie

Po 20 min inkubace rostliny v barvicím roztoku bylo provedeno mikroskopické pozorování. Fluorescenční signál byl nejprve detekován pomocí zoomovacího fluorescenčního stereomikroskopu (ZEISS Axio Zoom V16). Bylo použito dvojí zvětšení (32x a 112x), aby byla vidět distribuce signálu podél všech zón primárního kořene a také v kořenové špičce. Signál pro CM-H2DCFDA byl detekován s použitím filtru pro detekci GFP, přičemž byl zachycen také obraz z přecházejícího světla (brightfield).

Detailní akumulace ROS byla pozorována na konfokálním laserovém mikroskopu s rotujícím diskem (Cell Observer SD). Bylo použito zvětšení (400x), intenzita laseru 50% a expoziční čas 70 ms. Fluorescence byla excitována laserem 488 nm a emise byla detekována v 509 nm. Byly pozorovány epidermální buňky kořene pomocí tzv. Z-stack metody (pozorování více optických rovin v osi Z) tak, aby byl zachycen signál napříč 1 buňky. Následně byla pomocí softwaru ZEN vygenerována ortogonální projekce všech optických rovin.

Poté byl roztok odsán pomocí filtračního papíru a zároveň byl pipetováním pod krycí sklo doplněn barvicí roztok s NaCl. Signál byl dokumentován každých 5 minut po dobu 1 hodiny.

Kontrolní pozorování probíhalo obdobně, s tím rozdílem, že namísto barvicího roztoku s NaCl byl použit roztok bez NaCl.

Oba mikroskopy byly ovládány pomocí softwaru ZEN 3.5 Blue edition. Výsledné obrázky byly při nastavení identických hodnot histogramu exportovány do formátu tiff.

Experiment byl prováděn ve třech biologických opakováních.

2.5.7 Kvantifikace fluorescenčního signálu

Intenzita fluorescenčního signálu byla kvantifikována pomocí softwaru ImageJ. Obrázky ze zoomovacího stereomikroskopu pořízené při menším zvětšení byly transformovány na 8 bitový formát v stupních šedi. Následně byl fluorescenční signál na obrázku s největší intenzitou fluorescence (senzitivní linie *mpk3-1*, ovlivnění NaCl, 60 min) detekován na základě prahové hodnoty, která se nastavila pomocí funkce “threshold”. Následně byly stejné prahové hodnoty nastaveny pro každý obrázek. Intenzita fluorescence byla vyhodnocena jako integrovaná hustota pomocí ImageJ. Tyto data byla exportována do programu Excel a z průměru 3 opakování byly sestaveny grafy.

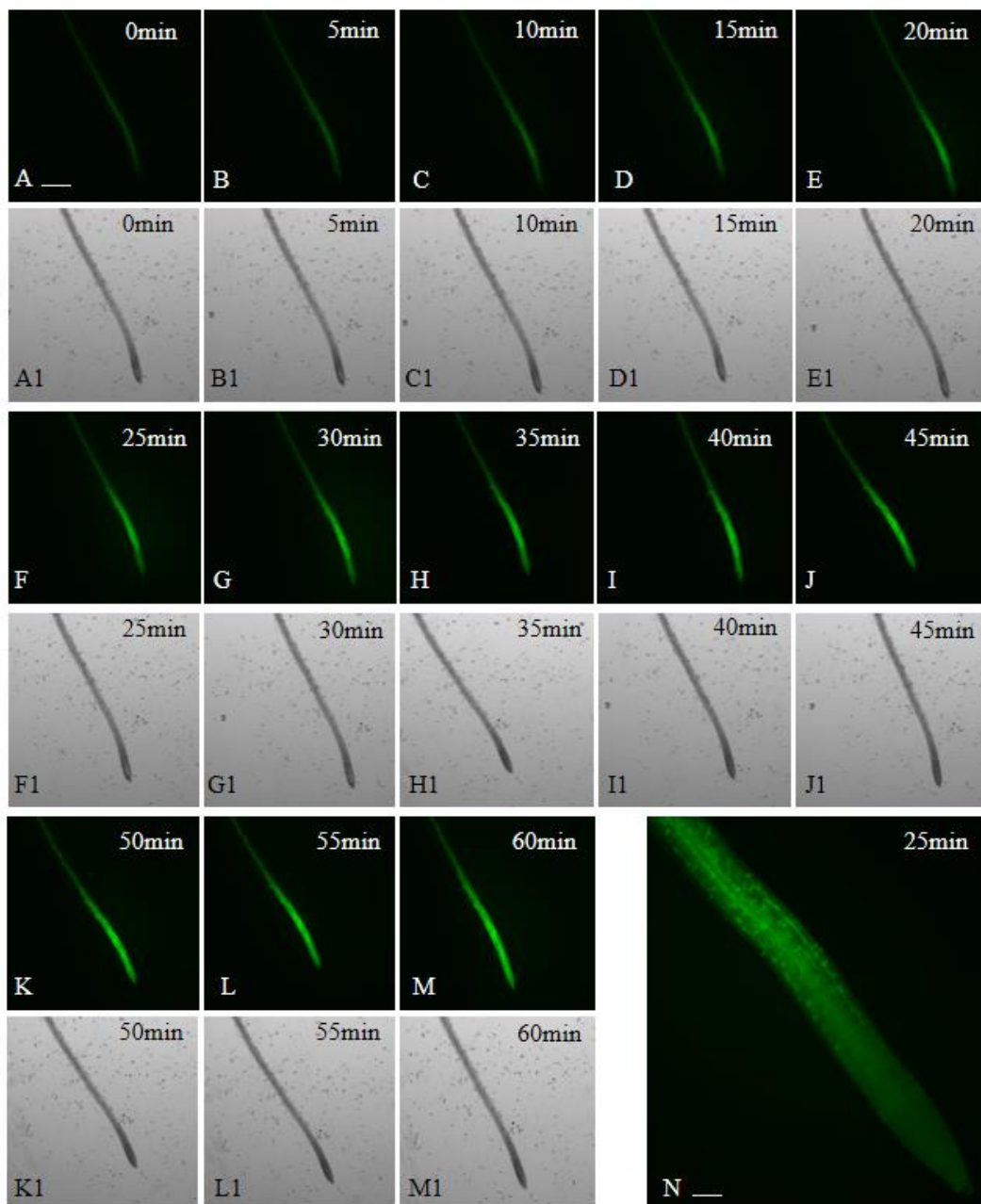
3 VÝSLEDKY

3.1 Pozorování akumulace ROS v primárním kořenu Col-0 a mutantů *fsd1-1* a *mpk3-1*

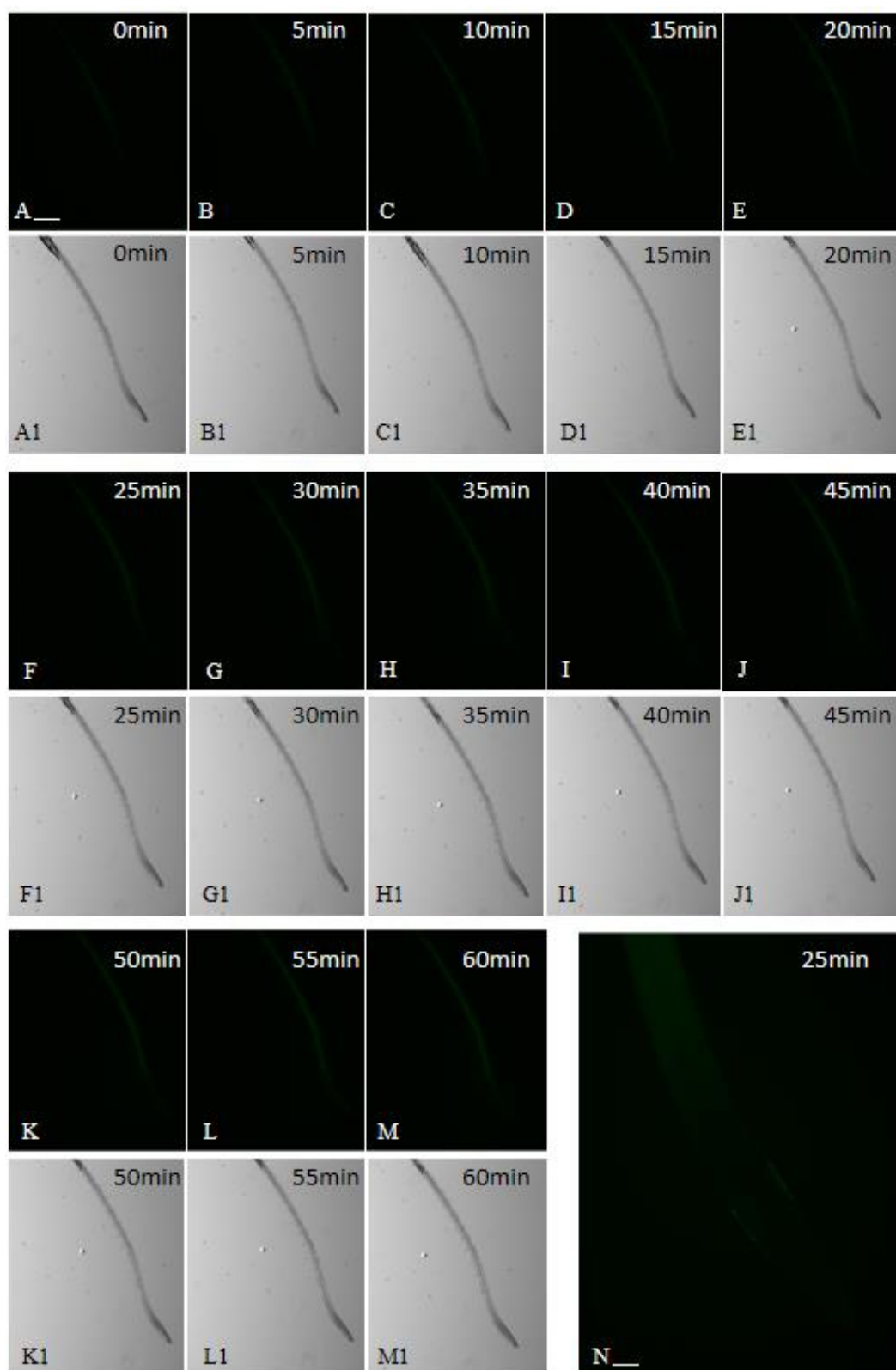
V první části práce jsme se snažili zjistit vhodnou koncentraci NaCl, která vyvolá požadovaný efekt v podobě tvorby ROS. Koncentraci NaCl po prvním pokusu s 250 mmol.l⁻¹ jsme upravili na 200 mmol.l⁻¹, protože docházelo brzy k plazmolýze, což nebyl požadovaný efekt. Koncentrace jsme proto upravili na 200 mmol.l⁻¹.

Pozorováním na stereomikroskopu jsme zjistili, že v kořenech rostlin divého typu Col-0 docházelo k postupnému nárůstu intenzity signálu po ovlivnění 200 mmol.l⁻¹ NaCl, po celou dobu 60 minut. Největší nárůst intenzity signálu byl zaznamenán mezi 0 až 5 minutou. Rozdíl intenzit signálů mezi 30 a 60 minutou byl menší, jako mezi 0 a 30 minutou (Obrázky 3A-M, 5). Signál bylo možné nejprve pozorovat v diferenciacní zóně kořene, zatímco v ostatních částí kořene se signál objevil později a byl méně výrazný (Obrázek 3N).

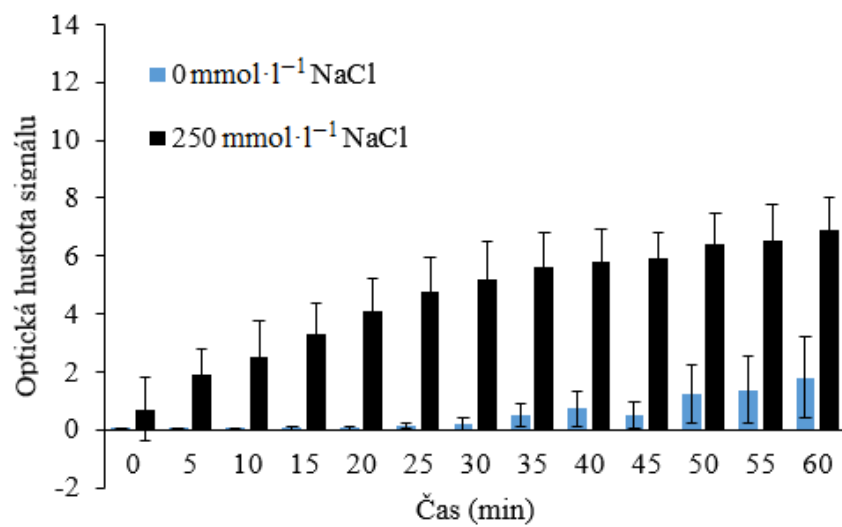
Po kontrolním ošetření bylo možné detekovat fluorescenci až po 35 minutách snímání (Obrázky 4H a 5), přičemž signál dosáhl po 60 minutách asi 25% intenzity signálu získaném ve stresovém ovlivnění (Obrázky 4A-M, 5). Podobně jako u stresového ovlivnění bylo signál možné také vidět v diferenciacní zóně kořene, avšak tento signál měl minimální intenzitu (Obrázek 4N).



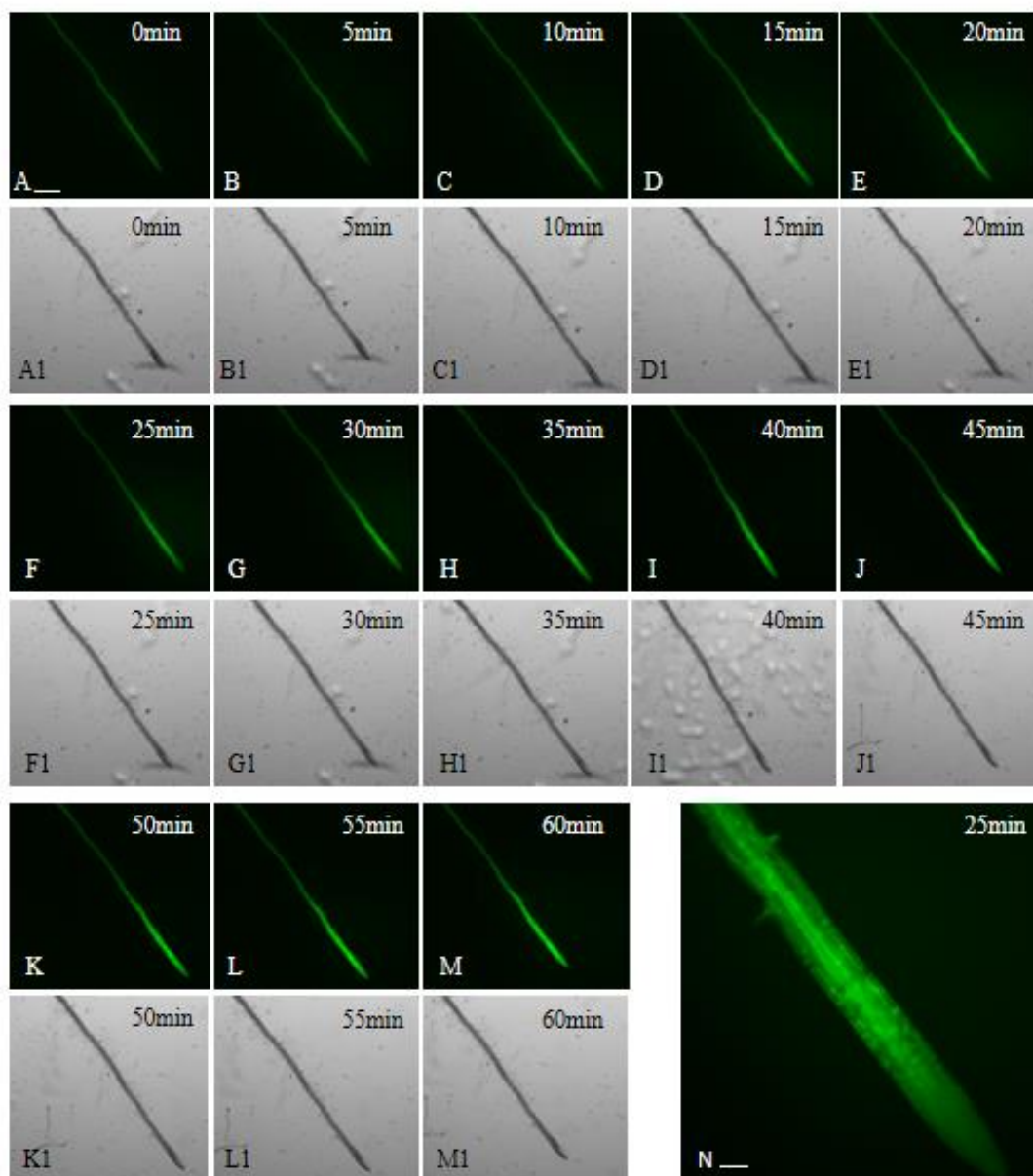
Obrázek 3 Mikroskopické pozorování distribuce reaktivních kyslíkových radikálů v primárním kořenu rostlin divého typu *Arabidopsis thaliana* Col-0 pomocí barvičky CM-H2DCFDA během ovlivnění tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiem s přidavkem $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl. Obrázky byly pořízeny zoomovacím stereomikroskopem ZEISS Axio Zoom V16 (Carl Zeiss). Obrázky A-M fluorescenční signál. Obrázky A1-M1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek N je detail fluorescenčního signálu v kořenové špičce po 25min experimentu. Měřítka: A-M $500 \mu\text{m}$; N $100 \mu\text{m}$.



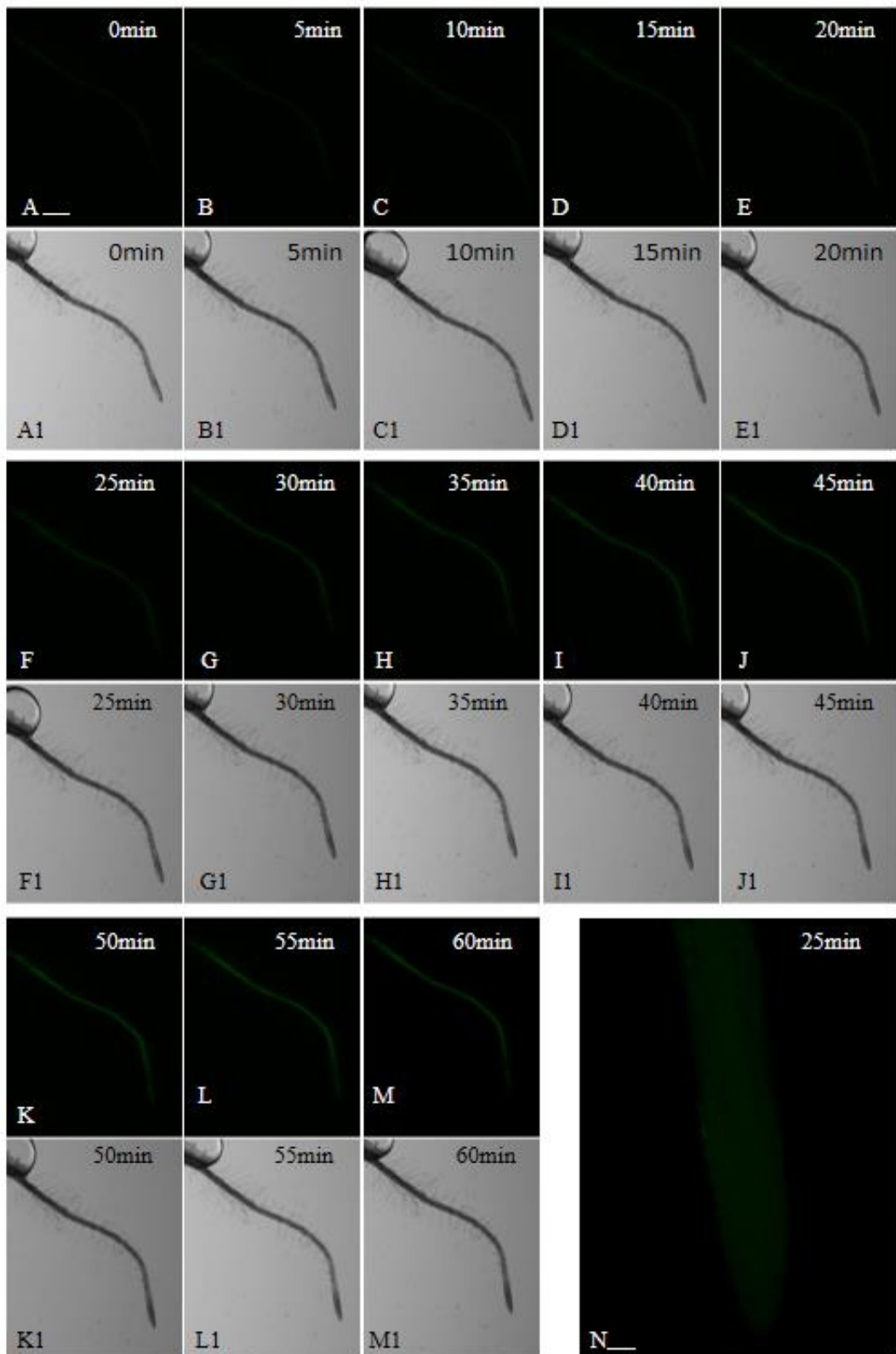
Obrázek 4 Mikroskopické pozorování distribuce reaktivních kyslíkových radikálů v primárním kořenu rostlin divého typu *Arabidopsis thaliana* Col-0 pomocí barvičky CM-H2DCFDA během kontrolního ovlivnění tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiem. Obrázky byly pořízeny zoomovacím stereomikroskopem ZEISS Axio Zoom V16 (Carl Zeiss). Obrázky A-M fluorescenční signál. Obrázky A1-M1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek N je detail fluorescenčního signálu v kořenové špičce po 25min experimentu. Měřítko: A-M 500 μ m; N 100 μ m.



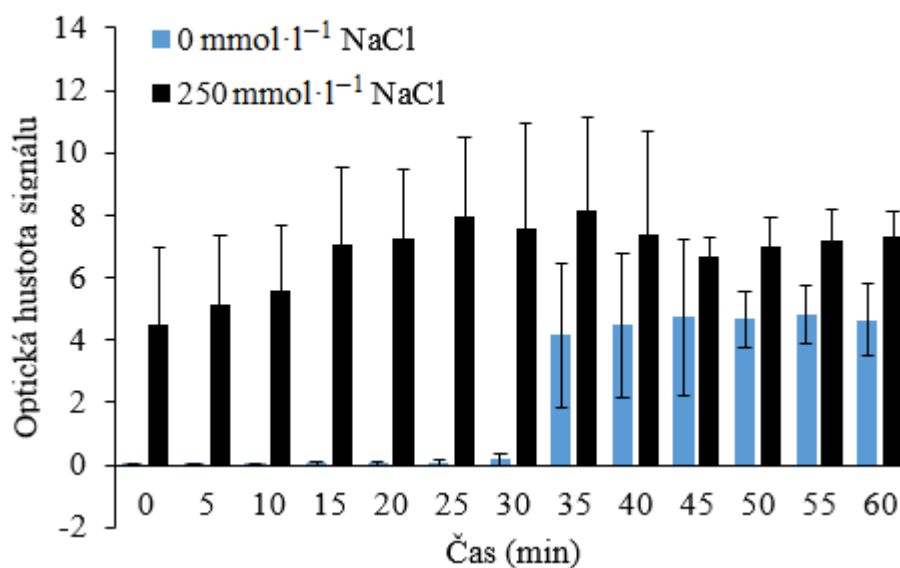
Obrázek 5 Kvantifikace intenzity fluorescenčního signálu získaného barvením barvičkou CM-H2DCFDA v primárním kořenu rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0 po vystavení 200 mmol·l⁻¹ NaCl (černé sloupce) a po kontrolním ovlivnění tekutým MS médiem (modré sloupce).



Obrázek 6 Mikroskopické pozorování distribuce reaktivních kyslíkových radikálů v primárním kořenu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* *fsd1-1* pomocí barvičky CM-H2DCFDA během ovlivnění tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiem s přidavkem $200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. Obrázky byly pořízeny zoomovacím stereomikroskopem ZEISS Axio Zoom V16 (Carl Zeiss). Obrázky A-M fluorescenční signál. Obrázky A1-M1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek N je detail fluorescenčního signálu v kořenové špičce po 25min experimentu. Měřítka: A-M $500 \mu\text{m}$; N $100 \mu\text{m}$.



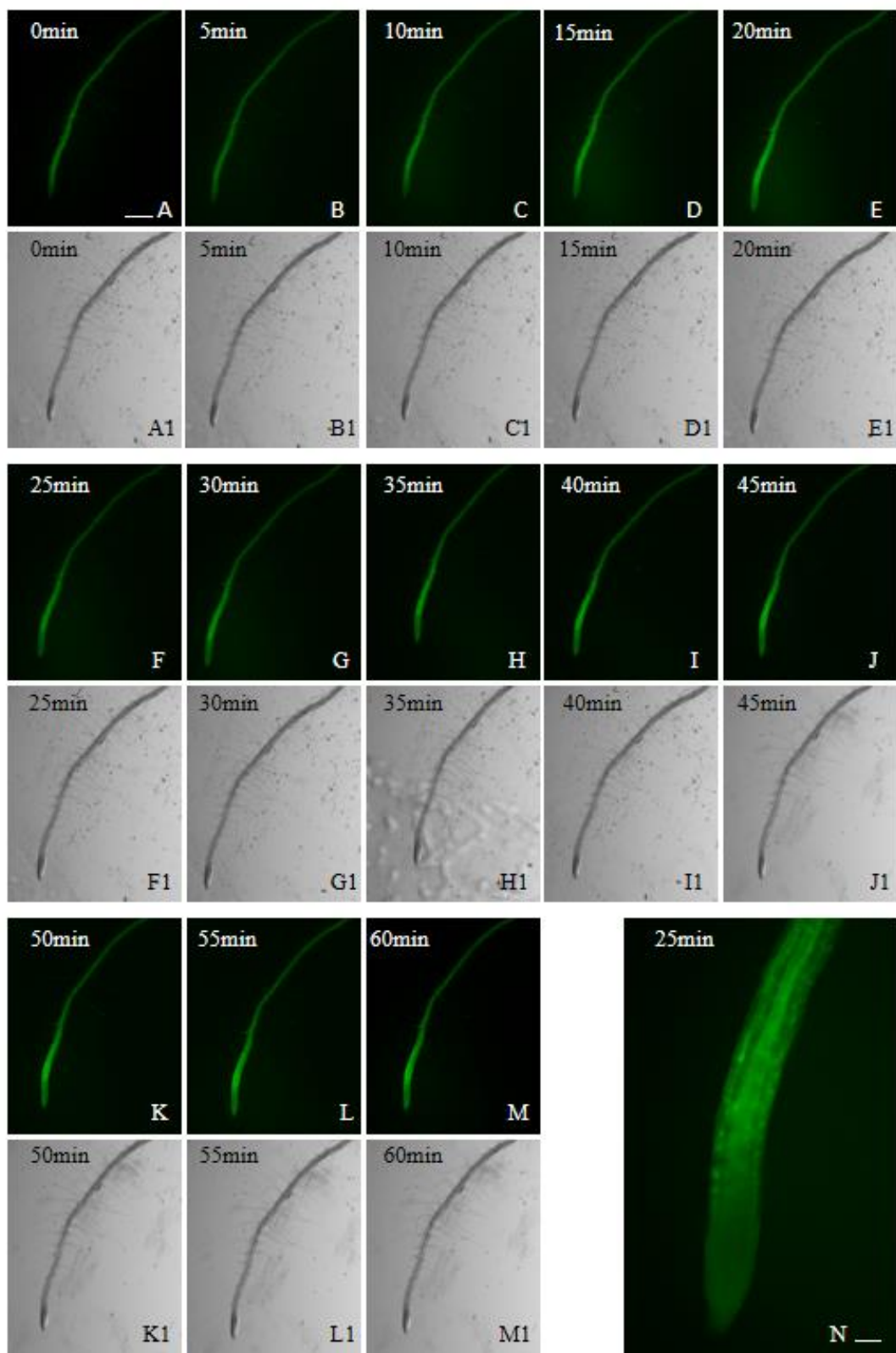
Obrázek 7 Mikroskopické pozorování distribuce reaktivních kyslíkových radikálů v primárním kořenu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana fsd1-1* pomocí barvičky CM-H2DCFDA během kontrolního ovlivnění tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiem. Obrázky byly pořízeny zoomovacím stereomikroskopem ZEISS Axio Zoom V16 (Carl Zeiss). Obrázky A-M fluorescenční signál. Obrázky A1-M1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek N je detail fluorescenčního signálu v kořenové špičce po 25min experimentu. Měřítka: A-M 500 μm ; N 100 μm .



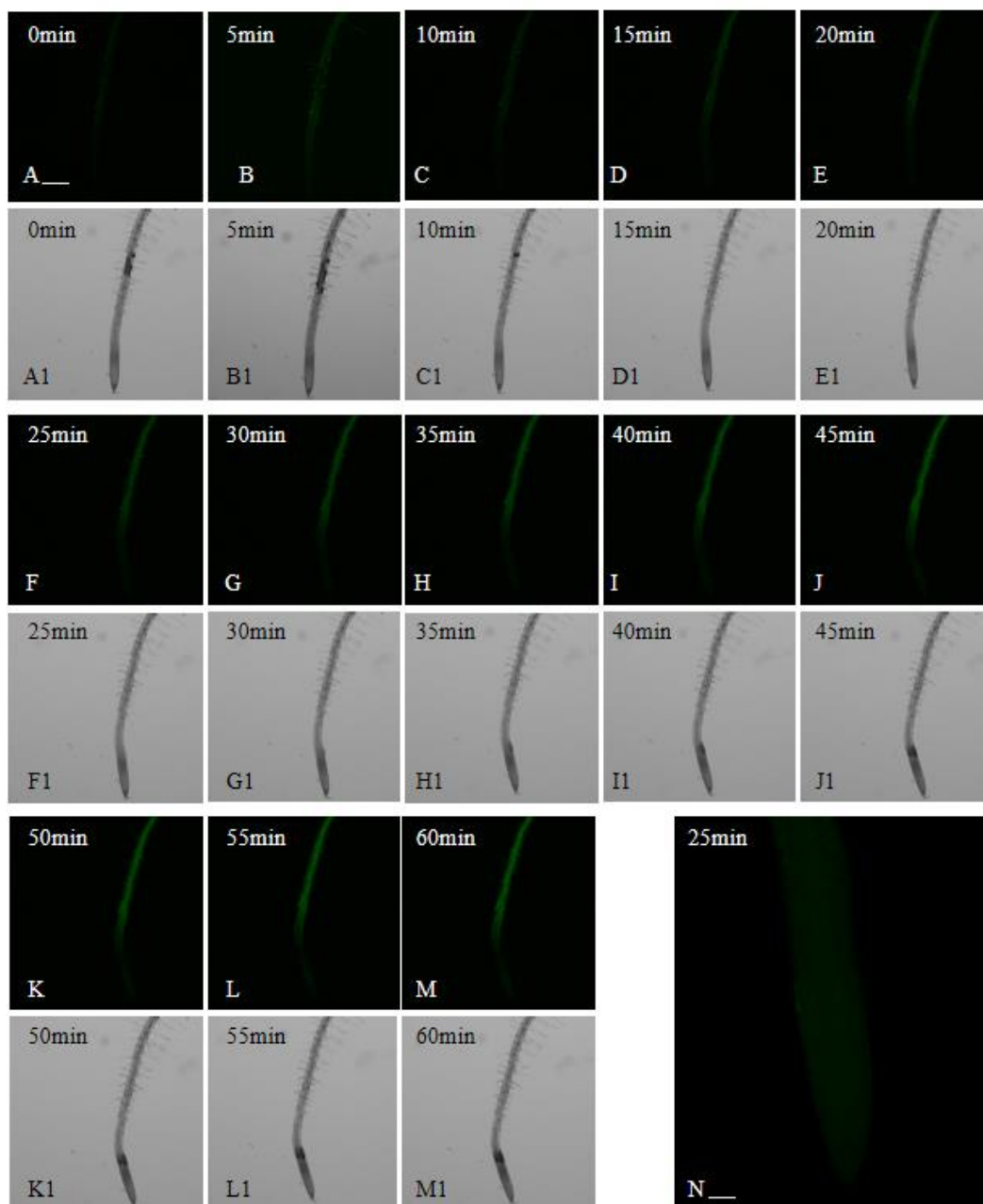
Obrázek 8 Kvantifikace intenzity fluorescenčního signálu získaného barvením barvičkou CM-H2DCFDA v primárním kořenu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana fsd1-1* po vystavení 200 mmol·l⁻¹ NaCl (černé sloupce) a po kontrolním ovlivnění tekutým MS médiem (modré sloupce).

Průběh nárůstu fluorescence se u mutantů lišila v porovnání s Col-0. V případě mutantu *fsd1-1* byla intenzita signálu hned po aplikaci CM-H2DCFDA s přídavkem NaCl značně vyšší v porovnání s Col-0 (Obrázky 3A, 5, 6A a 8). Intenzita signálu stoupala do 35 minut pozorování, kdy dosáhla maxima (Obrázek 6H a 8). Signál byl následně konstantní nebo se mírně snižoval (Obrázek 8). Porovnání hodnot intenzity signálu ukazuje, že maximum intenzity signálu je u *fsd1-1* přibližně 8,5, zatímco u Col-0 stoupá intenzita po hodnotu 7 a zdá se, že do 60 min experimentu nedošlo k jeho saturaci (Obrázek 5 a 8). Intenzita fluorescence CM-H2DCFDA v kořenech *fsd1-1* v kontrolních podmínkách vykazovala hodnoty porovnatelné s Col-0 do 30 minuty experimentu (Obrázek 7G a 8). Následně došlo k markantnímu zvýšení intenzity, přičemž dosáhla 50-75% intenzity signálu pozorovaném v podmínkách NaCl (Obrázek 8).

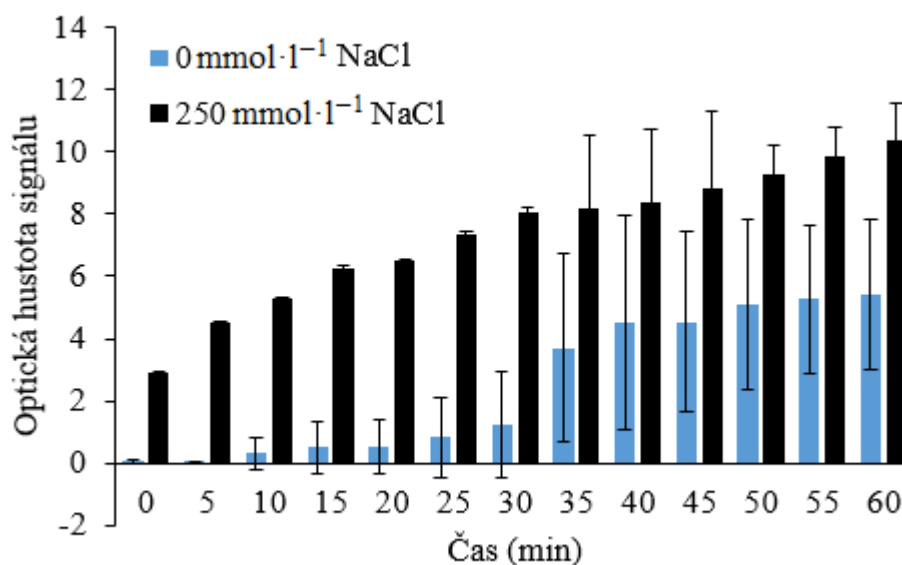
Nejvyšší intenzitu signálu CM-H2DCFDA v podmínkách solného stresu bylo opět možné pozorovat v diferenciační zóně kořene, jako tomu bylo u Col-0, s minimem v tranzientní zóně (Obrázek 6N). U kontrolního ošetření se signál začal akumulovat rovnoměrně v celém kořeni s výjimkou kořenové špičky a prodlužovací zóny (Obrázek 7N). Tento signál byl však výrazně slabší, než při působení 200 mmol.l⁻¹ NaCl.



Obrázek 9 Mikroskopické pozorování distribuce reaktivních kyslíkových radikálů v primárním kořenu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-1* pomocí barvičky CM-H2DCFDA během ovlivnění tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiem s přidavkem $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl. Obrázky byly pořízeny zoomovacím stereomikroskopem ZEISS Axio Zoom V16 (Carl Zeiss). Obrázky A-M fluorescenční signál. Obrázky A1-M1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek N je detail fluorescenčního signálu v kořenové špičce po 25min experimentu. Měřítka: A-M $500 \mu\text{m}$; N $100 \mu\text{m}$.



Obrázek 10 Mikroskopické pozorování distribuce reaktivních kyslíkových radikálů v primárním kořenu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-1* pomocí barvičky CM-H2DCFDA během kontrolního ovlivnění tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiem. Obrázky byly pořízeny zoomovacím stereomikroskopem ZEISS Axio Zoom V16 (Carl Zeiss). Obrázky A-M fluorescenční signál. Obrázky A1-M1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek N je detail fluorescenčního signálu v kořenové špičce po 25min experimentu. Měřítko: A-M 500 μ m; N 100 μ m.



Obrázek 11 Kvantifikace intenzity fluorescenčního signálu získaného barvením barvičkou CM-H2DCFDA v primárním kořenu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-1* po vystavení 200 mmol.l⁻¹ NaCl (černé sloupce) a po kontrolním ovlivnění tekutým MS médiem (modré sloupce).

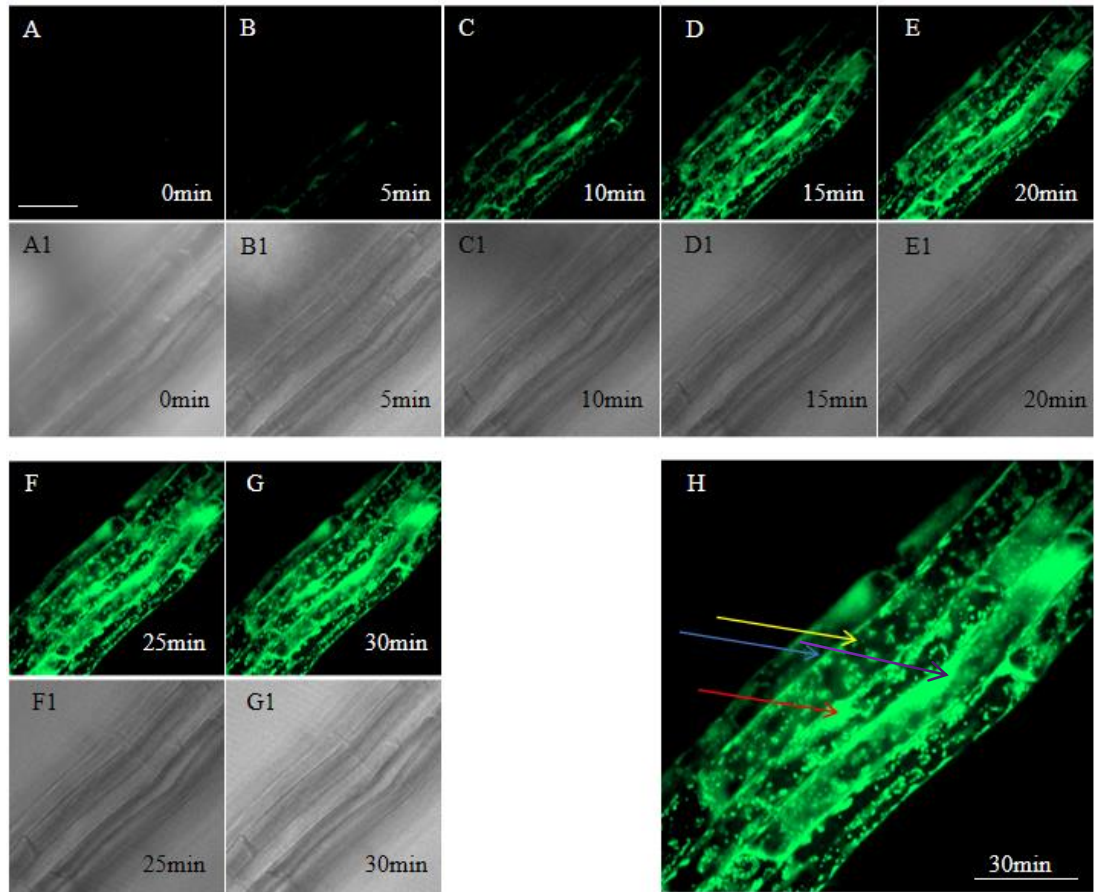
U mutantu *mpk3-1* můžeme pozorovat podobný vývoj signálu jako u mutantu *fsd1-1* (Obrázek 9, Obrázek 1). Po aplikaci NaCl byl maximální signál CM-H2DCFDA vyšší než u obou dosud zmíněných linií. Intenzita se výrazně zvyšovala do 35 minuty, a poté už docházelo k pouze k minimálnímu nárůstu, avšak nedošlo k saturaci stejně jako u Col-0 a maxima dosáhla v 60 minutě (Obrázek 1). Signál CM-H2DCFDA dosáhl v kořenech mutantu *mpk3-1* nejvyšších hodnot ze všech tří studovaných linií (Obrázky 5, 8 a 11). Intenzita fluorescence CM-H2DCFDA v kořenech *mpk3-1* v kontrolních podmínkách vykazovala zvýšené hodnoty intenzity signálu po 35 minutách, což bylo pozorováno také u *fsd1-1* mutantu. Tato intenzita dosáhla zhruba 50% intenzity signálu pozorovaném v stresových podmínkách NaCl.

I u *mpk3-1* stejně jako u Col-0 a *fsd1-1* dochází k akumulaci signálu především v diferenciační zóně a méně intenzivní signál lze pozorovat v kořenové čepičce (Obrázek 9N). U kontrolního opakování je možné pozorovat nejsilnější signál, oproti kontrolám z dvou předešlých linií. Tento signál je možné pozorovat v celém kořeni, ale žádný nelze vidět v kořenové čepičce a prodlužovací zóně (Obrázek 10N). Tato vlastnost platí pro všechny 3 linie.

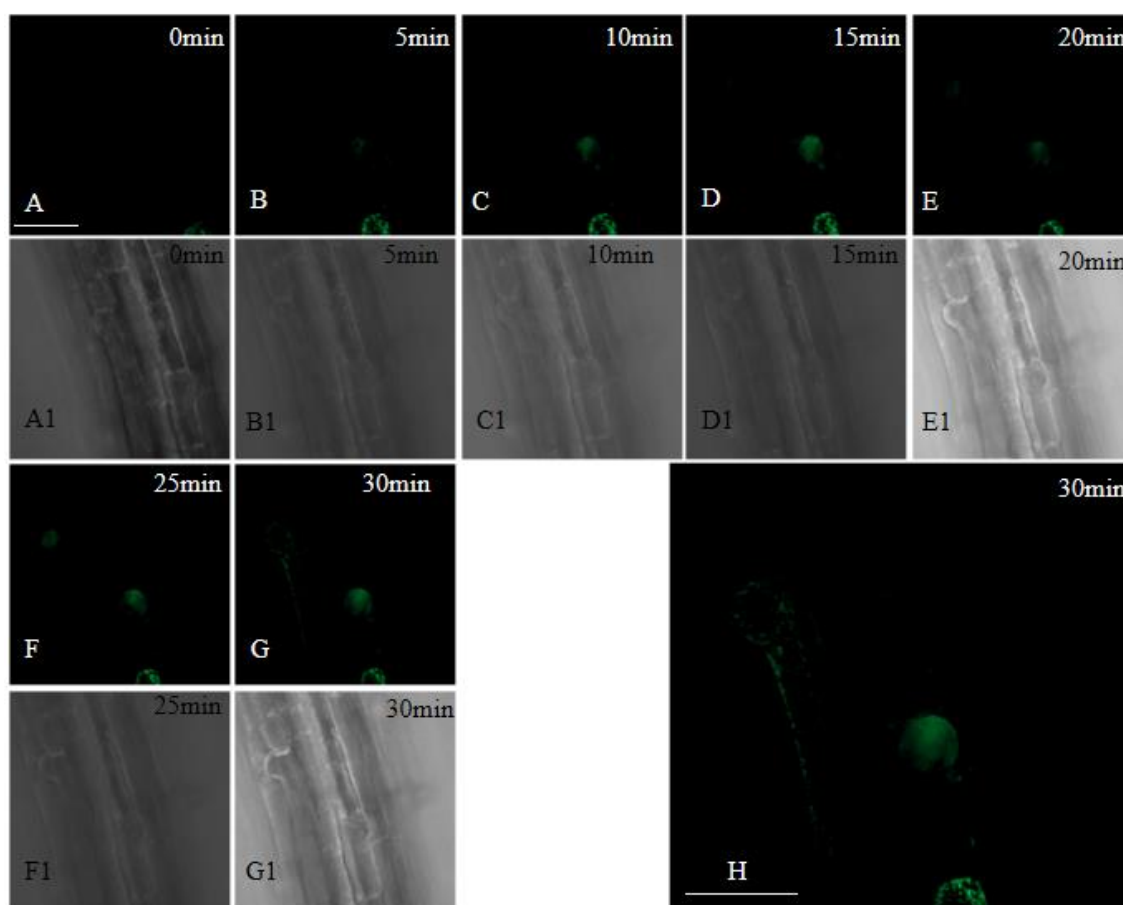
3.2 Akumulace ROS v epidermálních buňkách kořene Col-0 a mutantů *fsd1-1* a *mpk3-1*

Pomocí konfokální laserového mikroskopu s rotujícím diskem (Cell Observer SD, Carl Zeiss) byla detailně zkoumána akumulace ROS v epidermálních buňkách kořene po ovlivnění solným stresem. Na základě pozorování ze zoomovacího stereomikroskopu, kde došlo po 30 minutách k intenzivnímu nárůstu signálu v kontrolních podmínkách, jsou v případě konfokální mikroskopie prezentovány jenom obrázky do 30 minuty (Obrázky 12-17).

Po aplikaci 200 mmol.l^{-1} NaCl dochází k postupné intenzivní tvorbě signálu u rostlin divého typu Col-0. Signál byl detekovatelný již po 5 minutách ovlivnění, přičemž byl nejprve pozorovatelný v blízkosti plazmatické membrány (Obrázek 12B). Později, 15 minut po aplikaci soli je signál také viditelný v podobě malých tečkovitých struktur podobných vezikulám a v cytoplasmě (Obrázek 12D). V některých případech dochází k jejich shlukování (Obrázek 12H, fialová šipka). Také dochází k větším difuzním shlukům signálů, které jsou pozorovatelné v cytoplasmě (Obrázek 12H, červená šipka). Dochází k postupnému zintenzivnění signálu na všech zmíněných místech. Při kontrolním ošetření u Col-0 je intenzita signálu téměř nepozorovatelná (Obrázek 13).



Obrázek 12 Mikroskopické pozorování reaktivních kyslíkových radikálů v epidermálních buňkách primárního kořenu rostlin divého typu *Arabidopsis thaliana* Col-0 pomocí barvičky CM-H₂DCFDA během ovlivnění tekutým ½ MS médiem s přidavkem 200 mmol·l⁻¹ NaCl. Obrázky byly pořízeny konfokálním laserovým mikroskopem s rotujícím diskem. Obrázky A-G fluorescenční signál. Obrázky A1-G1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek H je zvětšená kopie obrázku G. Na obrázku H modrá šipka značí fluorescenční signál v blízkosti plazmatické membrány, červená shluky fluorescenčního signálu a žlutá šipka značí fluorescenční signál v malých tečkovitých strukturách. Měřítko: 50 μm.

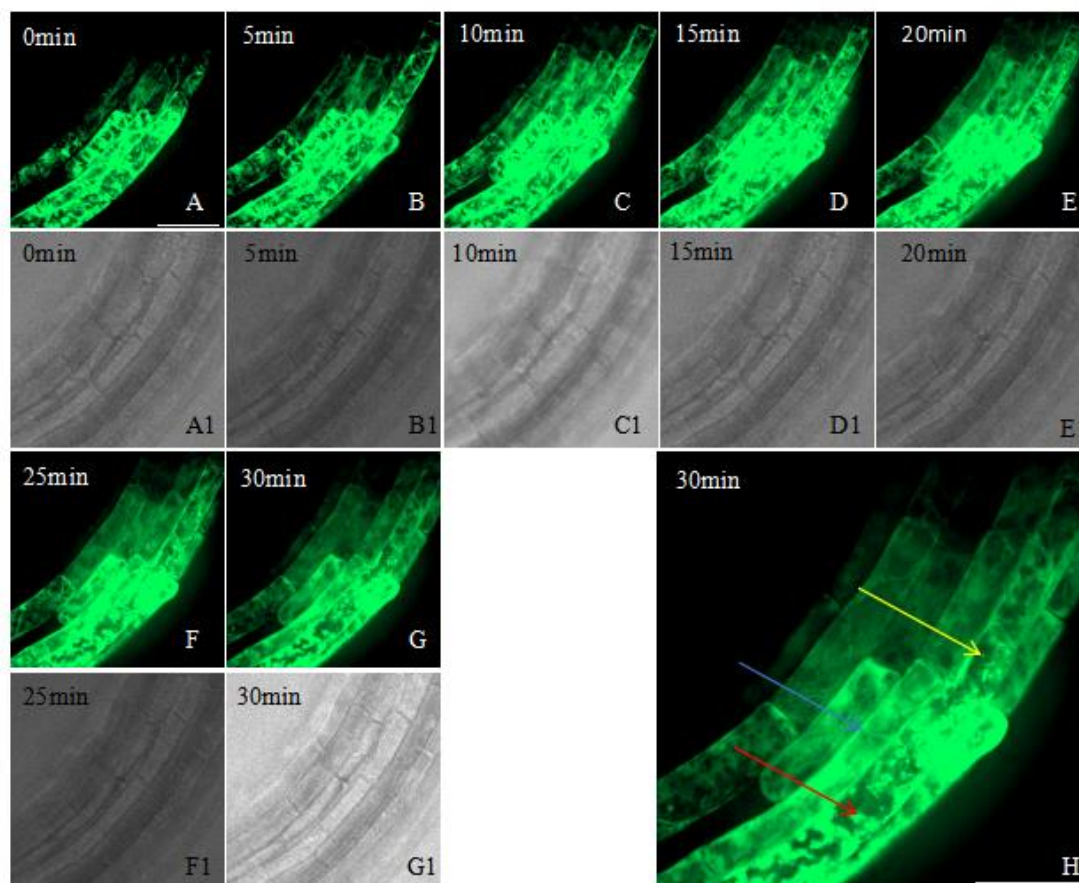


Obrázek 13 Mikroskopické pozorování reaktivních kyslíkových radikálů v epidermálních buňkách primárního kořenu rostlin divého typu *Arabidopsis thaliana* Col-0 pomocí barvičky CM-H2DCFDA během ovlivnění kontrolním tekutým ½ MS médiem. Obrázky byly pořízeny konfokálním laserovým mikroskopem s rotujícím diskem. Obrázky A-G fluorescenční signál. Obrázky A1-G1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek H je zvětšená kopie obrázku G. Měřitko: 50 μm .

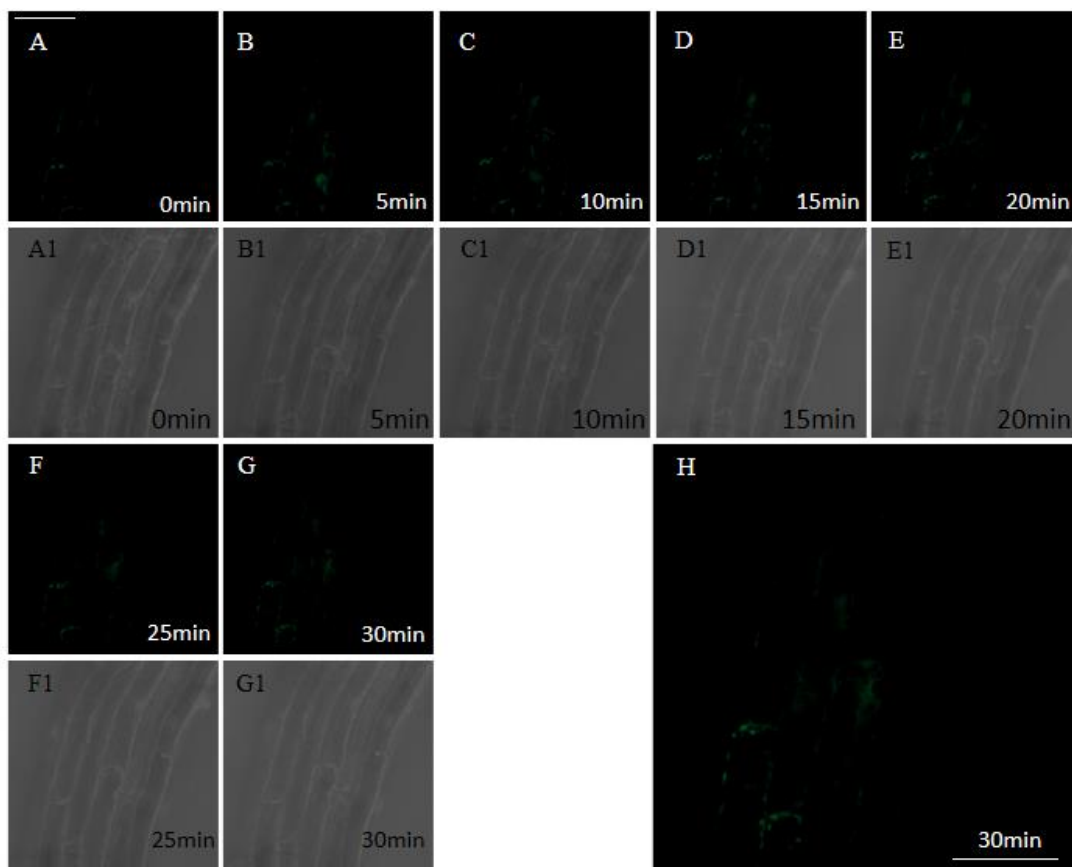
Podobně jako tomu bylo při pozorování na zoomovacím fluorescenčním stereomikroskopu, intenzita signálu u mutantů *fsd1-1* a *mpk3-1* byla markantní již na začátku ovlivnění solí. U mutantu *fsd1-1* nedocházelo k dalšímu intenzivnímu nárůstu signálu, přičemž byl podobně jako u Col-0 signál pozorován v blízkosti plasmatické membrány, v cytoplasmě a na tečkovitých strukturách, přičemž dochází k jejich častějšímu shlukování (Obrázky 14A-H). Oproti Col-0, jsou mnohem častěji také pozorovány cytoplasmatické difuzní shluky signálu (Obrázek 14H, červená šipka). U rostlin mutantu *fsd1-1*, který byl ovlivněn kontrolním roztokem, je opět možné pozorovat pouze mírný signál (Obrázek 15).

V epidermálních buňkách mutantu *mpk3-1* byla pozorována plazmolýza. V plazmolyzovaných buňkách *mpk3-1* je pozorovatelný brzký nárůst fluorescence,

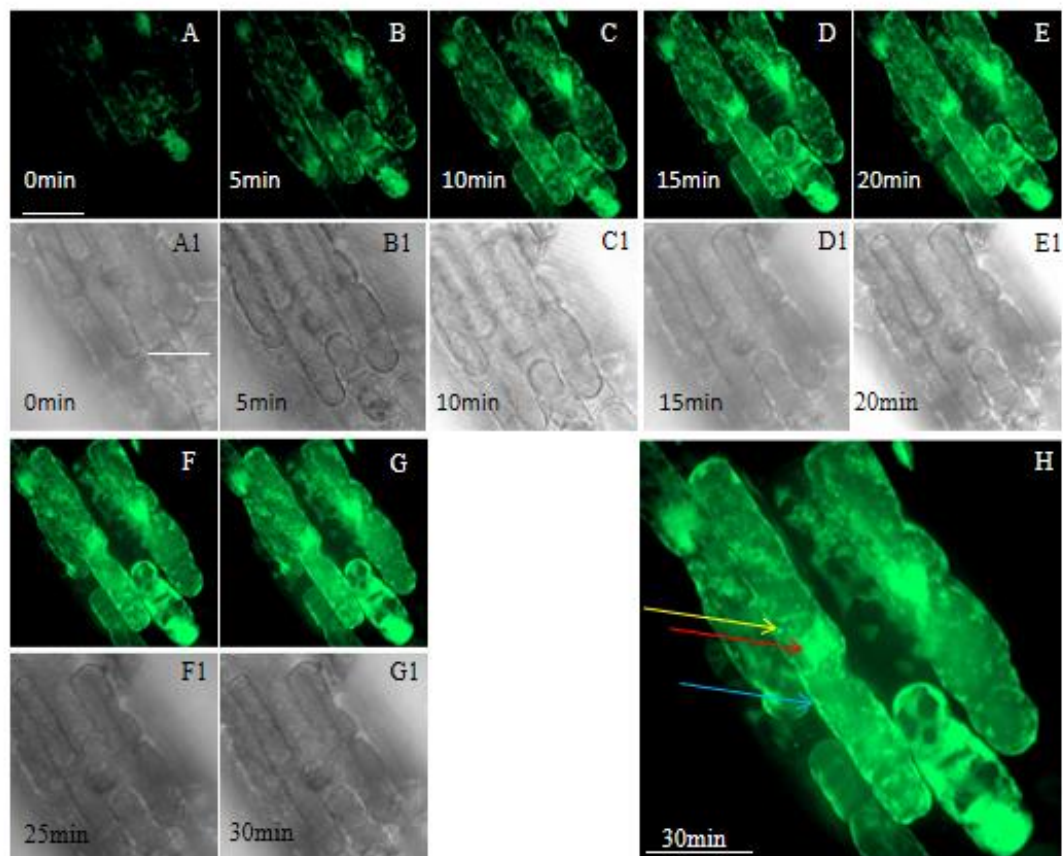
přičemž je signál od počátku pozorovatelný v blízkosti PM, cytoplasmě a tečkovitých strukturách. Dochází také k tvorbě difuzních shluků. V porovnání s Col-0 a mutantem *fsd1-1* je výskyt tečkovitých struktur menší, jejich shlukování méně časté. Intenzita těchto struktur se jeví jako slabší jako tomu bylo u Col-0 a *fsd1-1* mutantu (Obrázek 16). U *mpk3-1* při kontrolním ošetření je možné pozorovat slabý difuzní signál (Obrázek 17).



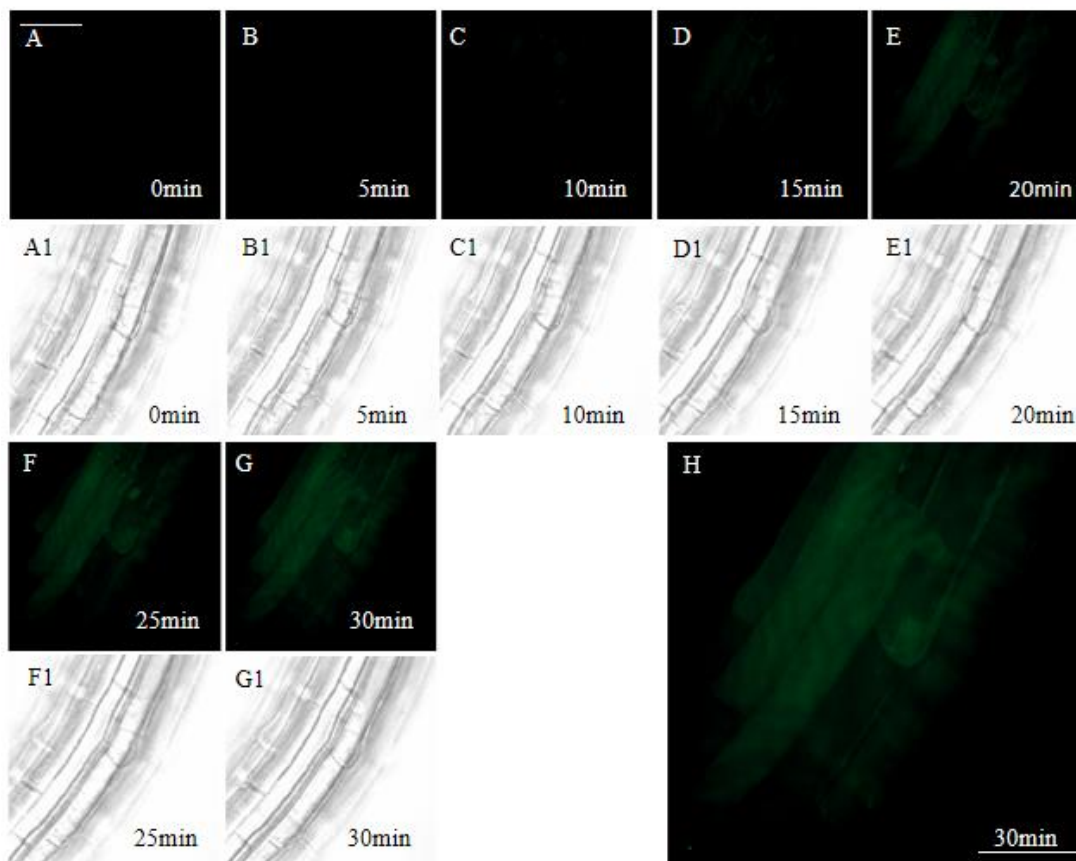
Obrázek 14 Mikroskopické pozorování reaktivních kyslíkových radikálů v epidermálních buňkách primárního kořenu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana fsd1-1* pomocí barvičky CM-H2DCFDA během ovlivnění tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiem s přidavkem $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl. Obrázky byly pořízeny konfokálním laserovým mikroskopem s rotujícím diskem. Obrázky A-G fluorescenční signál. Obrázky A1-G1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek H je zvětšená kopie obrázku G. Na obrázku H modrá šipka značí fluorescenční signál v blízkosti plazmatické membrány, červená shluky fluorescenčního signálu a žlutá šipka značí fluorescenční signál v malých tečkovitých strukturách. Měřítko: $50 \mu\text{m}$.



Obrázek 15 Mikroskopické pozorování reaktivních kyslíkových radikálů v epidermálních buňkách primárního kořenu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* *fsd1-1* pomocí barvičky CM-H₂DCFDA během ovlivnění kontrolním tekutým ½ MS médiem. Obrázky byly pořízeny konfokálním laserovým mikroskopem s rotujícím diskem. Obrázky A-G fluorescenční signál. Obrázky A1-G1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek H je zvětšená kopie obrázku G. Měřítka: 50 μ m.



Obrázek 16 Mikroskopické pozorování reaktivních kyslíkových radikálů v epidermálních buňkách primárního kořenu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* *mpk3-1* pomocí barvičky CM-H₂DCFDA během ovlivnění tekutým 1/2 MS médiem s přidavkem 200 mmol·l⁻¹ NaCl. Obrázky byly pořízeny konfokálním laserovým mikroskopem s rotujícím diskem. Obrázky A-G fluorescenční signál. Obrázky A1-G1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek H je zvětšená kopie obrázku G. Na obrázku H modrá šipka značí fluorescenční signál v blízkosti plazmatické membrány, červená shluky fluorescenčního signálu a žlutá šipka značí fluorescenční signál v malých tečkovitých strukturách. Měřítko: 50 μm.



Obrázek 17 Mikroskopické pozorování reaktivních kyslíkových radikálů v epidermálních buňkách primárního kořenu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* *mpk3-1* pomocí barvičky CM-H₂DCFDA během ovlivnění kontrolním tekutým ½ MS médiem. Obrázky byly pořízeny konfokálním laserovým mikroskopem s rotujícím diskem. Obrázky A-G fluorescenční signál. Obrázky A1-G1 obrázky pořízené pomocí procházejícího světla. Obrázek H je zvětšená kopie obrázku G. Měřitko: 50 μ m.

4 DISKUZE

Kořeny jsou prvním místem kontaktu rostliny s nepříznivými půdními podmínkami, mezi které patří také zasolení. Jedním z prvních projevů solného stresu u rostlin je masivní tvorba ROS. Rostliny si vyvinuli mnoho mechanismů regulace ROS, mezi které patří také antioxidační enzym FeSOD1 (Dvořák et al., 2021). Kontrola exprese isoformů *FSD* není dostatečně známa. *FSD2* a *FSD3* jsou exprimovány v závislosti na MAPK kaskádě složené z MEKK1, MKK5 a MPK6. *FSD1* není touto kaskádou ovlivňována (Xing et al., 2015). Expres *FSD1* silně závisí na koncentraci Cu^{2+} v médiu. Není ale vyloučeno, že také *FSD1* podléhá kontrole MAPK, konkrétně *MPK3* (Takáč et al., 2014, Dvořák et al., 2021b). Na podporu této hypotézy bylo cílem této bakalářské práce porovnat akumulaci ROS v kořenech mutantů *fsd1-1* a *mpk3-1* v podmínkách solného stresu. Oba tyto mutanty vykazují citlivost na solný stres (Dvořák et al., 2021a; Persak & Pitzschke, 2013; Pitzschke et al., 2014). Navíc oba mutanty jsou citlivé na stres ze zasolení také během klíčení (Vadovič et al., 2019, Dvořák et al., 2021a).

Je třeba zmínit, že obsah Cu^{2+} v ½ MS médiu je relativně nízké a umožňuje vysokou míru abundance a aktivity FeSOD1 (Melicher et al., 2022).

Naše pozorování ukazují na podobnost intenzity tvorby ROS mezi mutantem *fsd1-1* a *mpk3-1*. Oba mutanty vykazovali výraznou tvorbu ROS již v prvních minutách experimentu. To naznačuje jejich důležitou úlohu pro regulaci tvorby ROS již v ranních fázích stresu ze zasolení.

Nadměrná akumulace ROS u mutantu *fsd1-1* během solného stresu byla nedávno ukázána v práci Dvořák et al., (2021a). Na detekci ROS byla využita barvička CellROX Deep Red Reagent, která je specifická pro $\text{O}_2^{\cdot-}$ a $\text{HO}\cdot$ (Alves et. al, 2015). Pro CM-H2DCFDA, která byla použita v naší práci je známo, že má širší specifitu s preferencí pro H_2O_2 . Vyšší intenzita signálu CM-H2DCFDA u *fsd1-1* mutantu naznačuje, že u tohoto mutantu dochází k výrazné tvorbě ROS. Logicky, jestli je FSD1 nevyhnutná pro toleranci vůči solnému stresu (Dvořák et al., 2021a), za fluorescenci pocházející z CM-H2DCFDA zodpovídá pravděpodobně hromadící se $\text{O}_2^{\cdot-}$ anebo $\text{HO}\cdot$, který se může tvořit Mehlerovou reakcí. Nedá se ale vyloučit také přítomnost H_2O_2 , který se může také tvořit jinými cestami, jako např. přes SOD, cytoplasmatickými oxidázami, anebo pomocí neenzymatických antioxidantů jako je Asc (Foyer a Noctor, 2020).

Jednou z nejdůležitějších signálních kaskád fungujících při přenosu stresových podnětů je kaskáda MAPK. Kaskáda MAPK se skládá ze tří složek MAPKKK, MAPKK

a MAPK pronášejících fosforylační reakce z receptoru na cílové proteiny (Hamel et al., 2006). Je známo, že MAPK jsou nejen aktivovány vazbou ligandu, ale jsou také aktivovány molekulami ROS (Son et al., 2011). Na druhé straně mají tyto fosforylační kaskády také schopnost tvorbu ROS ovlivňovat (Asai et al., 2002). U MKK4-MPK3/6 je známo, že hraje roli při produkci ROS tím, že reguluje expresi NADPH oxidázy a je známo, že produkovaný H_2O_2 aktivuje MPK3 a MPK6 (Kovtun et al., 2000). Proto je možné že intenzita fluorescenčního signálu u *mpk3-1* mutanta je výsledkem také změněné exprese NADPH oxidázy. Z tohoto důvodu je na potvrzení výše uvedené hypotézy nutno provést další experimenty, jako je například kvantitativní PCR pro analýzu transkripce *RBOHD* a *FSD1* nebo využití inhibitoru NADPH oxidás difenyléniodonium.

Silná závislost exprese *FSD1* na Cu^{2+} naznačuje, že případná regulace její exprese prostřednictvím MPK3 bude funkční jenom v podmínkách nedostatku mědi. V podmínkách saturace koncentrace Cu^{2+} v médiu bude funkce FSD1 alternována CSD1 (Melicher et al., 2022). Při vysoké intenzitě světla a hypersalinitě (Xing et al., 2015) je exprese *SOD* regulována pomocí MKK5 (MAP2K). Exprese *CSD1* a *CSD2* se zvyšuje při zvýšené expozici světlu. Je zajímavé, že hladiny transkriptů obou *CSD* genů zůstávají za těchto podmínek nezměněny v transgenní linii *Arabidopsis* s potlačenou expresí *MKK5*, která je přecitlivělá na vysoké světlo. Naproti tomu transgenní linie *Arabidopsis* nadměrně exprimující *MKK5* je odolná vůči vysokému světelnému stresu a vykazuje zvýšenou aktivitu obou CSD. Kromě toho snížená exprese *MKK5* negativně ovlivňuje aktivaci MPK3 a MPK6 za těchto podmínek, což znamená, že tyto dvě MAPK působí v kaskádě za MKK5 (Xing et al., 2013). Proto se při snížené expresi *MPK3* očekává zvýšená tvorba ROS. Zároveň má MPK3 zřejmě schopnost regulovat expresi a abundanci obou *SOD*, *FSD1* a *CSD1*.

Oba mutanti vykazovali značných hodnot fluorescence CM-H2DCFDA také v kontrolních podmínkách. Toto mohlo být pravděpodobně způsobeno nízkým obsahem O_2 v roztoku, ve kterém byly rostliny na podložním sklíčku a pod krycím sklem. Hypoxie vede k energetické krizi vyplývající z nedostatku O_2 a hromadění toxických metabolitů, které narušují růst a vývoj rostlin. Důkazy ukazují, že na reakcích rostlin na hypoxický stres se podílí více regulačních složek, včetně rostlinných hormonů, transkripčních faktorů a proteinkináz (Sasidharan et al., 2018; Schmidt et al., 2018). Kyselina fosfatidová je důležitým lipidem nezbytným pro několik aspektů vývoje rostlin a reakce na biotický a abiotický stres (Zhou et al., 2022). Kyselina fosfatidová se *in vitro* váže

na MPK3 a MPK6 a přispívá k jejich fosforylaci indukované hypoxií. Navíc mutanty *mpk3* a *mpk6* byly citlivější k hypoxii ve srovnání s divokým typem. Z toho vyplývá, že námi pozorované hromadění ROS v kontrolních podmínkách u mutantu *mpk3-1* mohlo být způsobeno jeho citlivostí na hypoxii. Naše výsledky naznačují že FSD1 by mohla být také důležitá pro toleranci rostlin na hypoxii.

Leshem et al. (2007) pozoroval produkci ROS a reakci na solný stres v kořenech *Arabidopsis thaliana*. Semenačky *Arabidopsis* byly pěstovány na 1/2 MS médiu po 7 dnů. Při aplikaci 150 mmol.l⁻¹ NaCl s barvičkou H2DCFDA došlo k tvorbě signálu již po 5 minutách, tak jako se stalo i při námi prováděném experimentu s mutantními liniemi *fsd1-1* a *mpk3-1*, které také tvořili pozorovatelnou tvorbu ROS již po 5 minutách. I přesto, že námi pozorovatelné rostliny byly pouze 4 dny pěstovány na 1/2MS a byly vystaveny 200 mmol.l⁻¹ docházelo k podobnému efektu, kdy signál byl pozorovatelný již po 5 minutách a signál poté rostl.

Následná shoda v našem experimentu proběhla i v lokalizaci tvorby ROS. Kdy u Leshem et al. (2007) bylo možné signál pozorovat především u plazmatické membrány a k tvorbě shluků signálu, jak tomu bylo i u našich vybraných mutantních linií *fsd1-1* a *mpk3-1*. Podobně jako v našich experimentech se tvořili malé tečkovité struktury, které kolokalizovali s fluorescenční barvou FM4-64. Tato barvička specificky barví plasmatickou membránu a endosomy (Jurgens, 2004). Je tedy pravděpodobné, že jsme také pozorovaly hromadění ROS v endosomech ve všech liniích. Zjistili jsme rozdíly v hromadění ROS v těchto strukturách mezi mutanty, přičemž jejich výskyt byl nižší u mutantu *mpk3-1*. To by naznačovalo možné zapojení MPK3 v regulaci ROS právě v těchto strukturách. Je třeba ale brát v potaz, že toto méně intenzivní hromadění ROS může být také důsledkem plazmolýzy, ke které v mutantu *mpk3-1* došlo. Proto je nutné naši hypotézu potvrdit pozorováním ROS při nižších koncentracích NaCl.

5 ZÁVĚR

Hlavním úkolem bylo ověřit u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*, zda je zvýšená citlivost mutantů *fsd1-1* a *mpk3-1* na stres vyvolaný NaCl doprovázena zvýšenou tvorbou ROS. Kvantitativní pozorování pomocí fluorescenční barvičky ukázalo mnohem dřívější tvorbu ROS u obou sledovaných mutantů, což koresponduje s jejich citlivostí na solný stres. Jejich přítomnost je patrně důležitá pro raní fáze odpovědi rostlin na tvorbu ROS indukovanou NaCl. Průběh akumulace ROS a jejich subcelulární distribuce ale v mutantech vykazoval určité rozdíly, akumulace ROS v blízkosti PM byla ale podobná.

Naše pozorování také indikovali možnou roli FSD1 v toleranci rostlin vůči hypoxii, a to na základě tvorby ROS u kontrolních opakování po 30 minutách.

Naše výsledky také přinášejí další důkazy k možnému propojení MPK3 a FSD1.

6 LITERATURA

Alves, M. B. R., Andrade, A. F. C., Arruda, R. P., Batissaco, L., Florez-Rodriguez, S. A., & Lançon, R. (2015). An efficient technique to detect sperm reactive oxygen species: The CellRox deep red fluorescent probe. *Biochemistry and Physiology*, *4*, 157. doi: 10.4172/2168-9652.1000157

Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*, *70*(2), 200–214. doi: 10.1007/s10541-005-0102-7.

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *55*, 373–399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.

Arora, A., Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science*, *82*(10), 1227–1238.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., & Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, *415*(6875), 977–983. doi: 10.1038/415977.

Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and plant molecular biology*, *50*, 601–639. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.601

Asada K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, *141*(2), 391–396. doi: 10.1104/pp.106.082040.

Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V., & Lukyanov, S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature Methods*, *3*(4), 281–286. doi: 10.1038/nmeth866.

Bhattacharjee, S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 1113-1121.

Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews*, *94*(2), 329–354. doi: 10.1152/physrev.00040.2012.

Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S., & Neill, S. J. (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant journal*, *45*(1), 113–122. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02615.x.

Browning, E. A., Chatterjee, S., & Fisher, A. B. (2012). Stop the flow: a paradigm for cell signaling mediated by reactive oxygen species in the pulmonary endothelium. *Annual Review of Physiology*, *74*, 403–424. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153324.

Chen, H., & Jiang, J. G. (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews*, *18*, 309-319. doi: 10.1139/A10-014.

Chew, O., Whelan, J., & Millar, A. H. (2003). Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 46869–46877. doi: 10.1074/jbc.M307525200.

- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., & Ryu, S. E. (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell*, *105*(1), 103–113. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00300-2.
- Collin F. (2019). Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10), 2407. doi: 10.3390/ijms20102407.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., & del Río, L. A. (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science*, *6*(4), 145–150. doi: 10.1016/s1360-1385(01)01898-2.
- Cui, F., Brosché, M., Shapiguzov, A., He, X.-Q., Vainonen, J. P., Leppälä, J., et al. (2019). Interaction of methyl viologen-induced chloroplast and mitochondrial signalling in Arabidopsis. *Free Radical Biology and Medicine*, *134*, 555–566. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.006.
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, *2*, 53. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *57*, 779–795. doi: 10.1007/s000180050041
- del Río, L. A., & López-Huertas, E. (2016). ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling. *Plant and Cell Physiology*, pcw076. doi: 10.1093/pcp/pcw076.
- Demidchik, V., & Shabala, S. (2018). Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated 'ROS-Ca²⁺ Hub'. *Functional Plant Biology*, *45*(2), 9–27. doi: 10.1071/FP16420.
- Demidchik V. (2018). ROS-Activated Ion Channels in Plants: Biophysical Characteristics, Physiological Functions and Molecular Nature. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4), 1263. doi: 10.3390/ijms19041263.
- Desikan, R., A-H-Mackerness, S., Hancock, J. T., & Neill, S. J. (2001). Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*, *127*(1), 159–172. doi: 10.1104/pp.127.1.159.
- Dietz K. J. (2011). Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(4), 1129–1159. doi: 10.1089/ars.2010.3657.
- Dixon, D. P., & Edwards, R. (2009). Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(32), 21249–21256. doi: 10.1074/jbc.M109.020107.
- Dooley, C. T., Dore, T. M., Hanson, G. T., Jackson, W. C., Remington, S. J., & Tsien, R. Y. (2004). Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(21), 22284–22293. doi: 10.1074/jbc.M312847200.
- Dringen, R., Pawlowski, P. G., & Hirrlinger, J. (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research*, *79*(1-2), 157–165. doi: 10.1002/jnr.20280.

- Du, Y. Y., Wang, P. C., Chen, J., & Song, C. P. (2008). Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1318-1326. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00741.
- Dvořák, P., Krasylenko, Y., Ovečka, M., Basheer, J., Zapletalová, V., Šamaj, J., & Takáč, T. (2021).. In vivo light-sheet microscopy resolves localisation patterns of FSD1, a superoxide dismutase with function in root development and osmoprotection. *Plant, Cell & Environment*, 44, 68–87. doi: 10.1111/pce.13894.
- Dvořák, P., Krasylenko, Y., Zeiner, A., Šamaj, J., & Takáč, T. (2021b). Signaling Toward Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 618835. doi: 10.3389/fpls.2020.618835.
- Fahnenstich, H., Scarpeci, T. E., Valle, E. M., Flügge, U. I., & Maurino, V. G. (2008). Generation of hydrogen peroxide in chloroplasts of *Arabidopsis* overexpressing glycolate oxidase as an inducible system to study oxidative stress. *Plant Physiology*, 148(2), 719–729. doi: 10.1104/pp.108.126789.
- Fehér, A., Otvös, K., Pasternak, T. P., & Szandtner, A. P. (2008). The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G(0)-to-G(1) transition) of plant cells. *Plant Signaling & Behavior*, 3(10), 823–826. doi: 10.4161/psb.3.10.5908.
- Finkel T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, 194(1), 7–15. doi.: 10.1083/jcb.201102095.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D., Davies, J. M., & Dolan, L. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422(6930), 442–446. doi: 10.1038/nature01485.
- Forkink, M., Smeitink, J. A., Brock, R., Willems, P. H., & Koopman, W. J. (2010). Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6-7), 1034–1044. doi: 10.1016/j.bbabo.2010.01.022.
- Foyer, C. H., & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21–25. doi: 10.1007/BF00386001.
- Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155, 93–100. doi: 10.1104/pp.110.166181.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2020). Redox Homeostasis and Signaling in a Higher-CO₂ World. *Annual Review of Plant Biology*, 71, 157–182. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-095955.
- Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155, 93–100. doi: 10.1104/pp.110.166181.
- Freinbichler, W., Colivicchi, M. A., Stefanini, C., Bianchi, L., Ballini, C., Misini, B., Weinberger, P., Linert, W., Varešlija, D., Tipton, K. F., et al. (2011). Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(12), 2067–2079. doi: 10.1007/s00018-011-0682-x.

Fu, H. H., & Luan, S. (1998). AtKuP1: a dual-affinity K⁺ transporter from Arabidopsis. *Plant Cell*, *10*(1), 63–73. doi: 10.1105/tpc.10.1.63.

Gligorovski, S., Strekowski, R., Barbati, S., & Vione, D. (2015). Environmental Implications of Hydroxyl Radicals ((•)OH). *Chemical Reviews*, *115*(24), 13051–13092. doi: 10.1021/cr500310b.

Grace, S. C. (2005). Phenolics as antioxidants. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, *141*, 168. doi: 10.1002/9780470988565.ch6.

Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *65*(2-3), 45–80. doi: 10.1016/j.jbbm.2005.10.003.

Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, *141*(2), 312–322. doi: 10.1104/pp.106.077073.

Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*, *142*(2), 231–255. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776.

Hamel, L. P., Nicole, M. C., Sritubtim, S., Morency, M. J., Ellis, M., Ehling, J., Beaudoin, N., Barbazuk, B., Klessig, D., Lee, J., et al. (2006). Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in Plant Science*, *11*(4), 192–198. doi: 10.1016/j.tplants.2006.02.007.

Handa, N., Bhardwa, R., Kaur, H., Poonam, Kapoor, D., Rattan, A., Kaur, S., Thukral, A.K., Kaur, S., Arora, S., et al. (2016). Selenium: an antioxidative protectant in plants under stress. *Plant Metal Interaction*, (pp. 179-207). doi: 10.1016/B978-0-12-803158-2.00007-2.

Hanson, G. T., Aggeler, R., Oglesbee, D., Cannon, M., Capaldi, R. A., Tsien, R. Y., & Remington, S. J. (2004). Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 13044–13053. doi: 10.1074/jbc.M312846200.

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *51*, 463–499. doi: 10.1146/annurev.arplant.51.1.463.

Herbette, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J. L., Drevet, J. R., & Roeckel-Drevet, P. (2002). Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *European Journal of Biochemistry*, *269*(9), 2414–2420. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02905.x.

Huseynova, I. M., Aliyeva, D. R., & Aliyev, J. A. (2014). Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. *Plant Physiology and Biochemistry*, *81*, 54–60. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.01.018.

Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 7432797. doi: 10.1155/2016/7432797.

Hiyama, T., Ohinata, A., & Kobayashi, S. I. (1993). Paraquat (methylviologen): its interference with primary photochemical reactions. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 48(3-4), 374-378. doi: 10.1515/znc-1993-3-442.

Ismail, A., Takeda, S., & Nick, P. (2014). Life and death under salt stress: same players, different timing?. *Journal of Experimental Botany*, 65(12), 2963–2979. doi: 10.1093/jxb/eru159.

Janků, M., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2019). On the Origin and Fate of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Compartments. *Antioxidants*, 8(4), 105. doi: 10.3390/antiox8040105.

Jiang, C., Belfield, E. J., Mithani, A., Visscher, A., Ragoussis, J., Mott, R., Smith, J. A., & Harberd, N. P. (2012). ROS-mediated vascular homeostatic control of root-to-shoot soil Na delivery in Arabidopsis. *EMBO Journal*, 31(22), 4359–4370. doi: 10.1038/emboj.2012.273.

Jimenez, A., Hernandez, J. A., Del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1997). Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant Physiology*, 114(1), 275–284. doi: 10.1104/pp.114.1.275.

Joo, J. H., Yoo, H. J., Hwang, I., Lee, J. S., Nam, K. H., & Bae, Y. S. (2005). Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Letters*, 579(5), 1243–1248. doi: 10.1016/j.febslet.2005.01.018.

Jurgens G. (2004). Membrane trafficking in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 481–504. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.082503.103057.

Kadota, Y., Shirasu, K., & Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant and Cell Physiology*, 56(8), 1472–1480. doi: 10.1093/pcp/pcv063.

Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts, L. J., & Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 1–6. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030.

Kang, Z., Qin, T., & Zhao, Z. (2019). Thioredoxins and thioredoxin reductase in chloroplasts: A review. *Gene*, 706, 32–42. doi: 10.1016/j.gene.2019.04.041.

Kehrer J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43–50. doi: 10.1016/s0300-483x(00)00231-6.

Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 44–50. doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.003.

Kliebenstein, D. J., Monde, R. A., & Last, R. L. (1998). Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology*, 118, 637–650. doi: 10.1104/pp.118.2.637.

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650. doi: 10.1080/01926230290166724.

Komis, G., Šamajová, O., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2018). Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 237–265. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040314.

Koopman, W. J., Verkaart, S., van Emst-de Vries, S. E., Grefte, S., Smeitink, J. A., & Willems, P. H. (2006). Simultaneous quantification of oxidative stress and cell spreading using 5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorofluorescein. *Cytometry Part A: Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69(12), 1184-1192. doi 10.1002/cyto.a.20348.

Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., & Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 2940–2945. doi: 10.1073/pnas.97.6.2940

Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C., & Trebst, A. (2008). Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*, 98(1-3), 551–564. doi: 10.1007/s11120-008-9349-3.

Krieger-Liszkay, A., Kós, P. B., & Hideg, É. (2011). Superoxide anion radicals generated by methylviologen in photosystem I damage photosystem II. *Physiologia Plantarum*, 142, 17–25. doi: 10.1111/j.1399-3054.2010.01416.x.

Kuo, W. Y., Huang, C. H., Liu, A. C., Cheng, C. P., Li, S. H., Chang, W. C., et al. (2013). CHAPERONIN 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in Arabidopsis chloroplasts. *New Phytologist*, 197, 99–110. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04369.x.

Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., Bloom, R. E., Bodde, S., Jones, J. D., & Schroeder, J. I. (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO Journal*, 22(11), 2623–2633. doi: 10.1093/emboj/cdg277.

Lambeth, J. D., & Neish, A. S. (2014). Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annual Review of Pathology*, 9, 119–145. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104651.

Lazof DB, Bernstein N. 1999. The NaCl induced inhibition of shoot growth: the case for distributed nutrition with special consideration of calcium. *Advances in Botanical Research* 29: 113–189.

Li, J., Liu, J., Wang, G., Cha, J. Y., Li, G., Chen, S., Li, Z., Guo, J., Zhang, C., Yang, Y., et al. (2015). A chaperone function of no catalase activity1 is required to maintain catalase activity and for multiple stress responses in Arabidopsis. *Plant cell*, 27(3), 908–925. doi: 10.1105/tpc.114.135095.

Li, Z., & Xing, D. (2011). Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 331–343. doi.org/10.1093/jxb/erq279.

Liszkay, A., Kenk, B., & Schopfer, P. (2003). Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217(4), 658–667. doi: 10.1007/s00425-003-1028-1.

- Liu, M., Yu, H., Ouyang, B., Shi, C., Demidchik, V., Hao, Z., Yu, M., & Shabala, S. (2020). NADPH oxidases and the evolution of plant salinity tolerance. *Plant, Cell & Environment*, *43*(12), 2957–2968. doi: 10.1111/pce.13907.
- Ma, L., Zhang, H., Sun, L., Jiao, Y., Zhang, G., Miao, C., & Hao, F. (2012). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺homeostasis in Arabidopsis under salt stress. *Journal of Experimental Botany*, *63*(1), 305–317. doi: 10.1093/jxb/err280.
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., & Pauly, N. (2012). A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Science*, *17*, 9–15. doi: 10.1016/j.tplants.2011.10.001.
- Martinière, A., Fiche, J. B., Smokvarska, M., Mari, S., Alcon, C., Dumont, X., Hematy, K., Jaillais, Y., Nollmann, M., & Maurel, C. (2019). Osmotic Stress Activates Two Reactive Oxygen Species Pathways with Distinct Effects on Protein Nanodomains and Diffusion. *Plant Physiology*, *179*(4), 1581–1593. doi: 10.1104/pp.18.01065.
- Maruta, T., Inoue, T., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2011). Arabidopsis NADPH oxidases, AtrbohD and AtrbohF, are essential for jasmonic acid-induced expression of genes regulated by MYC2 transcription factor. *Plant science*, *180*(4), 655–660. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.01.014.
- Melicher, P., Dvořák, P., Krasylenko, Y., Shapiguzov, A., Kangasjärvi, J., Šamaj, J., & Takáč, T. (2022). Arabidopsis Iron Superoxide Dismutase FSD1 Protects Against Methyl Viologen-Induced Oxidative Stress in a Copper-Dependent Manner. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 823561. doi: 10.3389/fpls.2022.823561.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, *61*(15), 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282.
- Mhamdi, A., & Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development*, *145*, dev164376. doi: 10.1242/dev.164376.
- Minibayeva, F., Beckett, R. P., & Kranner, I. (2015). Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. *Phytochemistry*, *112*, 122–129. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.06.008.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., Dangl, J. L., & Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, *2*(84), ra45. doi: 10.1126/scisignal.2000448.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, *33*(4), 453–467. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x.
- Misra, A. N., Misra, M., & Singh, R. (2012). Chlorophyll fluorescence in plant biology. *Biophysics*, *7*, 171–92.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, *9*(10), 490–498. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.009.
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, *22*, 11–19. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002.

- Mizuta, Y., Kurihara, D., & Higashiyama, T. (2015). Two-photon imaging with longer wavelength excitation in intact Arabidopsis tissues. *Protoplasma*, 252(5), 1231–1240. doi: 10.1007/s00709-014-0754-5.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
- Muñoz, P., & Munné-Bosch, S. (2019). Vitamin E in Plants: Biosynthesis, Transport, and Function. *Trends in Plant Science*, 24(11), 1040–1051. doi: 10.1016/j.tplants.2019.08.006.
- Muñoz-Rugeles, L., Galano, A., & Alvarez-Idaboy, J. R., (2018). The other side of the superoxide radical anion: its ability to chemically repair DNA oxidized sites. *Chemical Communications*, 54(97), 13710–13713. doi: 10.1039/C8CC07834C.
- Murphy M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. doi: 10.1186/1746-4811-9-10.
- Mylle, E., Codreanu, M. C., Boruc, J., & Russinova, E. (2013). Emission spectra profiling of fluorescent proteins in living plant cells. *Plant Methods*, 9(1), 10. doi: 10.1186/1746-4811-9-10.
- Myouga, F., Hosoda, C., Umezawa, T., Iizumi, H., Kuromori, T., Motohashi, R., et al. (2008). A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 3148–3162. doi: 10.1105/tpc.108.061341.
- Nath, M., Bhatt, D., Jain, A., Saxena, S.C., Saifi, S.K., Yadav, S., Negi, M., Prasad, R., & Tuteja, N.K. (2019). Salt stress triggers augmented levels of Na⁺, Ca²⁺ and ROS and alter stress-responsive gene expression in roots of CBL9 and CIPK23 knockout mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 265-276. doi: 10.1016/J.ENVEXPBOT.2018.10.005.
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 9613090. doi: 10.1155/2019/9613090.
- Narendra, S., Venkataramani, S., Shen, G., Wang, J., Pasapula, V., Lin, Y., Korniyeyev, D., Holaday, A. S., & Zhang, H. (2006). The Arabidopsis ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for Arabidopsis growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 3033–3042. doi: 10.1093/jxb/erl060.
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D. B., Issakidis, E., Jacquot, J. P., & Rouhier, N. (2006). Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*, 142(4), 1364–1379. doi: 10.1104/pp.106.089458.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 5, 27986–28006. doi: 10.1039/C4RA13315C.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249–279. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.249.

Noctor, G., Reichheld, J. P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & dDevelopmental Biology*, 80, 3–12. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013.

Oda, T., Hashimoto, H., Kuwabara, N., Akashi, S., Hayashi, K., Kojima, C., et al. (2010). Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 1435–1445. doi: 10.1074/jbc.M109.058909.

Son, Y., Cheong, Y. K., Kim, N. H., Chung, H. T., Kang, D. G., & Pae, H. O. (2011). Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?. *Journal of Signal Transduction*, 792639. doi: 10.1155/2011/792639.

op den Camp, R. G., Przybyla, D., Ochsenein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Göbel, C., Feussner, I., Nater, M., & Apel, K. (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15(10), 2320–2332. doi: 10.1105/tpc.014662.

Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F., & Bailly, C. (2009). The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology*, 150(1), 494–505. doi: /10.1104/pp.109.138107.

Orman-Ligeza, B., Parizot, B., de Rycke, R., Fernandez, A., Himschoot, E., Van Breusegem, F., Bennett, M. J., Périlleux, C., Beeckman, T., & Draye, X. (2016). RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in Arabidopsis. *Development*, 143(18), 3328–3339. doi: 10.1242/dev.136465

Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., & Remington, S. J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273(5280), 1392–1395. doi:10.1126/science.273.5280.1392.

Ortega-Villasante, C., Burén, S., Barón-Sola, Á., Martínez, F., & Hernández, L. E. (2016). In vivo ROS and redox potential fluorescent detection in plants: Present approaches and future perspectives. *Methods*, 109, 92–104. doi 10.1016/j.ymeth.2016.07.009.

Ortega-Villasante, C., Burén, S., Blázquez-Castro, A., Barón-Sola, Á., & Hernández, L. E. (2018). Fluorescent in vivo imaging of reactive oxygen species and redox potential in plants. *Free Radical Biology & Medicine*, 122, 202–220. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.005.

Pouvreau S. (2014). Genetically encoded reactive oxygen species (ROS) and redox indicators. *Biotechnology Journal*, 9(2), 282–293. doi: 10.1002/biot.201300199.

Peng, L. T., Jiang, Y. M., Yang, S. Z., & Pan, S. Y. (2005). The signaling pathways of plant defense response and their interaction. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 31(5), 527–532.

Perea-García, A., Andrés-Bordería, A., Mayo de Andrés, S., Sanz, A., Davis, A. M., Davis, S. J., Huijser, P., & Peñarrubia, L. (2016). Modulation of copper deficiency responses by diurnal and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(1), 391–403. doi: 10.1093/jxb/erv474.

- Persak, H., & Pitzschke, A. (2013). Tight interconnection and multi-level control of Arabidopsis MYB44 in MAPK cascade signalling. *Plos One*, 8(2), e57547. doi: 10.1371/journal.pone.0057547.
- Petrov, V. D., & Van Breusegem, F. (2012). Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB PLANTS*, 2012, pls014. doi: 10.1093/aobpla/pls014.
- Pilon, M., Ravet, K., & Tapken, W. (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et biophysica acta*, 1807, 989–998. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.11.002.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T. C., Leitao, M. A., Okamoto, O. K., Morse, D., & Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae 1. *Journal of Phycology*, 39(6), 1008-1018. doi: 10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x.
- Pitzschke, A., Datta, S., & Persak, H. (2014). Salt stress in Arabidopsis: lipid transfer protein AZI1 and its control by mitogen-activated protein kinase MPK3. *Molecular Plant*, 7(4), 722–738. doi: 10.1093/mp/sst157.
- Pospíšil, P. (2009). Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787, 1151–1160. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.05.005.
- Quatresous, E., Legrand, C., & Pouvreau, S. (2012). Mitochondria-targeted cpYFP: pH or superoxide sensor?. *Journal of General Physiology*, 140(5), 567–570. doi: 10.1085/jgp.201210863.
- Vadovič, P., Šamajová, O., Takáč, T., Novák, D., Zapletalová, V., Colcombet, J., et al. (2019). Biochemical and Genetic Interactions of Phospholipase D Alpha 1 and Mitogen-Activated Protein Kinase 3 Affect Arabidopsis Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 10, 275. doi: 10.3389/fpls.2019.00275.
- Vandenabeele, S., Van Der Kelen, K., Dat, J., Gadjev, I., Boonefaes, T., Morsa, S., Rottiers, P., Slooten, L., Van Montagu, M., Zabeau, M., et al. (2003). A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 16113–16118. doi: 10.1073/pnas.2136610100.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, 45(4), 523–539. doi: 10.1111/j.1365-3113.2005.02593.x.
- Raha, S., & Robinson, B. H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10), 502-508. doi: 10.1016/S0968-0004(00)01674-1.
- Rasmusson, A. G., Geisler, D. A., & Møller, I. M. (2008). The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion*, 8(1), 47–60. doi: 10.1016/j.mito.2007.10.004.
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C., & Siedow, J. N. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiology*, 141, 357–366. doi: 10.1104/pp.106.079129.
- Roshchina, V. V. (2012). Vital autofluorescence: application to the study of plant living cells. *International Journal of Spectroscopy*, 2012. doi:10.1155/2012/124672.

Roach, T., & Krieger-Liszkay, A. (2014). Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. *Current Protein & Peptide Science*, 15, 351–362. doi: 10.2174/1389203715666140327105143.

Rodríguez-Serrano, M., Bárány, I., Prem, D., Coronado, M. J., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2012). NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *Journal of Experimental Botany*, 63(5), 2007–2024. doi: 10.1093/jxb/err400.

Sagi, M., & Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*, 141(2), 336–340. doi: 10.1104/pp.106.078089.

Sasidharan, R., Hartman, S., Liu, Z., Martopawiro, S., Sajeev, N., van Veen, H., Yeung, E., & Voesenek, L. (2018). Signal Dynamics and Interactions during Flooding Stress. *Plant Physiology*, 176(2), 1106–1117. doi: 10.1104/pp.17.01232.

Scandalios, J. G., Guan, L., & Polidoros, A. N. (1997). Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. *Cold Spring Harbor Monograph Series*, 34, 343–406. doi:10.1101/087969502.34.343.

Schmidt, R. R., Weits, D. A., Feulner, C., & van Dongen, J. T. (2018). Oxygen Sensing and Integrative Stress Signaling in Plants. *Plant Physiology*, 176(2), 1131–1142. doi:10.1104/pp.17.01394.

Schopfer, P., Liszkay, A., Bechtold, M., Frahry, G., & Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, 214(6), 821–828. doi: 10.1007/s00425-001-0699-8.

Serrato, A. J., Pérez-Ruiz, J. M., Spínola, M. C., & Cejudo, F. J. (2004). A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43821–43827. doi: 10.1074/jbc.M404696200.

Shabala S. (2017). Signalling by potassium: another second messenger to add to the list?. *Journal of Experimental Botany*, 68(15), 4003–4007. doi: 10.1093/jxb/erx238.

Shaner, N. C., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12), 905–909. doi: 10.1038/nmeth81.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012. doi: 10.1155/2012/217037.

Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A. F., Teixeira, M., & Valentine, J. S. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical Reviews*, 114(7), 3854–3918. doi: 10.1021/cr4005296.

Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., et al. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1305–1319. doi: 10.1093/jxb/53.372.1305.

Smirnoff N. (2018). Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology & Medicine*, 122, 116–129. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.

Stepanenko, O. V., Stepanenko, O. V., Shcherbakova, D. M., Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K., & Verkhusha, V. V. (2011). Modern fluorescent proteins: from

chromophore formation to novel intracellular applications. *BioTechniques*, 51(5), 313–passim. doi: 10.2144/000113765.

Stockert, J. C., & Blázquez-Castro, A. (2017). Fluorescence microscopy in life sciences. *Bentham Science Publishers*. doi: 10.2174/97816810851801170101.

Su, T., Wang, P., Li, H., Zhao, Y., Lu, Y., Dai, P., Ren, T., Wang, X., Li, X., Shao, Q., et al. (2018). The Arabidopsis catalase triple mutant reveals important roles of catalases and peroxisome-derived signaling in plant development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(7), 591–607. doi: 10.1111/jipb.12649.

Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A., & Mittler, R. (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(6), 691–699. doi: 10.1016/j.pbi.2011.07.014.

Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., & Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 259–270. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x.

Szabados, L., & Savouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89–97. doi: 10.1016/j.tplants.2009.11.009.

Takáč, T., Šamajová, O., Vadovič, P., Pechan, T., Košútová, P., Ovečka, M., et al. (2014). Proteomic and biochemical analyses show functional network of proteins involved in antioxidant defense of Arabidopsis *anp2anp3* double mutant. *Journal of Proteome Research*, 13, 5347–5361. doi: 10.1021/pr500588c.

Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., & Dolan, L. (2008). Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science*, 319(5867), 1241–1244. doi: 10.1126/science.1152505.

Talamond, P., Verdeil, J. L., & Conéjéro, G. (2015). Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. *Molecules*, 20(3), 5024–5037. doi: 10.3390/molecules20035024.

Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L., & Hirt, H. (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 15(1), 141–152. doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.023.

Telfer A. (2014). Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of β -carotene. *Plant & Cell Physiology*, 55(7), 1216–1223. doi: 10.1093/pcp/pcu040.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., & Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *Plant Journal*, 11(6), 1187–1194. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11061187.x.

Tjus, S. E., Scheller, H. V., Andersson, B., & Møller, B. L. (2001). Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiology*, 125, 2007–2015. doi: 10.1104/pp.125.4.2007.

Torres, M. A., Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 517–522. doi: 10.1073/pnas.012452499.

Trchounian, A., Petrosyan, M., & Sahakyan, N. (2016). Plant cell redox homeostasis and reactive oxygen species. In *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses*, (25-50). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-44081-12.

Triantaphylidès, C., Krischke, M., Hoeberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusegem, F., & Mueller, M. J. (2008). Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology*, *148*(2), 960–968. doi: 10.1104/pp.108.125690.

Triantaphylidès, C., & Havaux, M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, *14*(4), 219–228. doi: 10.1016/j.tplants.2009.01.008.

Tseng, M. J., Liu, C. W., & Yiu, J. C. (2007). Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*, *45*(10-11), 822–833. doi: 10.1016/j.plaphy.2007.07.011.

Turrens J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, *552*(Pt 2), 335–344. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478.

Wachter, A., Wolf, S., Steiniger, H., Bogs, J., & Rausch, T. (2005). Differential targeting of GSH1 and GSH2 are achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the *Brassicaceae*. *Plant Journal*, *41*, 15–30. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02269.x.

Wang, F. Z., Wang, Q. B., Kwon, S. Y., Kwak, S. S., & Su, W. A. (2005). Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology*, *162*(4), 465–472. doi: 10.1016/j.jplph.2004.09.009.

Wang, W., Fang, H., Groom, L., Cheng, A., Zhang, W., Liu, J., Wang, X., Li, K., Han, P., Zheng, M., et al. (2008). Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell*, *134*(2), 279–290. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.017.

Wang, L., & Wu, J. (2013). The essential role of jasmonic acid in plant-herbivore interactions--using the wild tobacco *Nicotiana attenuata* as a model. *Journal of Genetics and Genomics*, *40*(12), 597–606. doi: 10.1016/j.jgg.2013.10.001.

Wang, L., Guo, Y., Jia, L., Chu, H., Zhou, S., Chen, K., Wu, D., & Zhao, L. (2014). Hydrogen peroxide acts upstream of nitric oxide in the heat shock pathway in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, *164*(4), 2184–2196. doi: 10.1104/pp.113.229369.

Wang, C., Teng, Y., Zhu, S., Zhang, L., & Liu, X. (2019). NaCl- and cold-induced stress activate different Ca²⁺-permeable channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, *87*, 217–225. doi: 10.1007/s10725-018-0464-7.

Wardman P. (2007). Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology & Medicine*, *43*(7), 995–1022. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.026.

Waters, B. M., McInturf, S. A., & Stein, R. J. (2012). Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, *63*, 5903–5918. doi: 10.1093/jxb/ers239.

Wiederschain, G. Y. (2011). The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies. *Biochemistry*, 76(11), 1276-1277.

Winterbourn C. C. (2014). The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(2), 730–738. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.004.

Wurzinger, B., Mair, A., Pfister, B., & Teige, M. (2011). Cross-talk of calcium-dependent protein kinase and MAP kinase signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 6(1), 8–12. doi: 10.4161/psb.6.1.14012.

Xie, Y. J., Xu, S., Han, B., Wu, M. Z., Yuan, X. X., Han, Y., Gu, Q., Xu, D. K., Yang, Q., & Shen, W. B. (2011). Evidence of Arabidopsis salt acclimation induced by up-regulation of HY1 and the regulatory role of RbohD-derived reactive oxygen species synthesis. *Plant Journal*, 66(2), 280–292. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04488.x.

Xing, Y., Jia, W., & Zhang, J. (2007). AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 58(11), 2969–2981. doi: 10.1093/jxb/erm144.

Xing, Y., Cao, Q., Zhang, Q., Qin, L., Jia, W., & Zhang, J. (2013). MKK5 regulates high light-induced gene expression of Cu/Zn superoxide dismutase 1 and 2 in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 54, 1217–1227. doi: 10.1093/pcp/pct072.

Xing, Y., Chen, W. H., Jia, W., & Zhang, J. (2015). Mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5)-mediated signalling cascade regulates expression of iron superoxide dismutase gene in Arabidopsis under salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, 66, 5971–5981. doi: 10.1093/jxb/erv305.

Xu, J., Li, Y., Wang, Y., Liu, H., Lei, L., Yang, H., Liu, G., & Ren, D. (2008). Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 26996–27006. doi: 10.1074/jbc.M801392200.

Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y., & Shikanai, T. (2009). SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21(1), 347–361. doi: 10.1105/tpc.108.060137.

Yang, X. D., Dong, C. J., & Liu, J. Y. (2006). A plant mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: its precise localization and higher enzymatic activity. *Plant Molecular Biology*, 62(6), 951–962. doi: 10.1007/s11103-006-9068-0.

Yuan, S., & Lin, H. H. (2008). Role of salicylic acid in plant abiotic stress. *Journal of Biosciences*, 63(5-6), 313–320. doi: 10.1515/znc-2008-5-601.

Yu, L., Nie, J., Cao, C., Jin, Y., Yan, M., Wang, F., Liu, J., Xiao, Y., Liang, Y., & Zhang, W. (2010). Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, 188(3), 762–773. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03422.x.

Zechmann B. (2018). Compartment-Specific Importance of Ascorbate During Environmental Stress in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(15), 1488–1501. doi: 10.1089/ars.2017.7232.

Zhang, X., Zhang, L., Dong, F., Gao, J., Galbraith, D. W., & Song, C. P. (2001). Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology*, 126(4), 1438–1448. doi: 10.1104/pp.126.4.1438.

Zhang, S., Apel, K., & Kim, C. (2014). Singlet oxygen-mediated and Executer-dependent signalling and acclimation of *Arabidopsis thaliana* exposed to light stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological sciences*, 369, 20130227. doi: 10.1098/rstb.2013.0227.

Zheng, M., Aslund, F., & Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*, 279(5357), 1718–1721. doi: 10.1126/science.279.5357.1718.

Zhou, Y., Zhou, D. M., Yu, W. W., Shi, L. L., Zhang, Y., Lai, Y. X., Huang, L. P., Qi, H., Chen, Q. F., Yao, N., et al. (2022). Phosphatidic acid modulates MPK3- and MPK6-mediated hypoxia signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 34(2), 889–909. doi: 10.1093/plcell/koab289.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	Adenosintrifosfát
ABA	Kyselina abscisová
Asc	Askorbát
Asc-GSH	Askorbát-glutathionový cyklus
APX	Askorbátperoxidáza
Ca ²⁺	Vápenatý ion
CAT	Kataláza
Cl ⁻	Chloritý anion
CM-H2DCFD	(5-(a-6)-chlormethyl-2',7'-dichlordihydrofluorescein diacetát, acetyléster)
CNP20	Chaperonin 20
CO ₂	Oxid uhličitý
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> ekotyp Columbia
Cu ²⁺	Měďnatý ion
DCF	2,7- Dichlorfluorescein
DCFH-DA	2'- 7' -Dichlorodihydrofluorescein diacetát
DHA	Dehydroaskorbát
DHAR	Dehydroaskorbátreduktáza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ETR	Elektronový transportní řetězec
FAD ⁻	Flavinadenindinukleotid
Fe ²⁺	Železitý ion
GFP	Zelený fluorescenční protein
GOX	Glykolát oxidáza
GPX	Glutathionperoxidáza
GR	Glutathionreduktáza
GSH	Glutathion
GST	Glutathion transferáza
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
H ₂ O	Voda
HO [·]	Hydroxylový radikál
JA	Kyselina jasmonová

K ⁺	Draselný ion
LEA	Late embryogenesis abundant
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MDA	Monodehydroaskorbátu
MDAR	Monodehydroaskorbátoreduktáza
Mn	Mangan
MPK3	Mitogenem aktivovaná proteinkináza3
MS	Murashige a Skoog
MV	Methylviologen
Na ⁺	Sodný ion
NO	Oxid dusnatý
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
O ₂	Kyslík
¹ O ₂	Singletový kyslík
O ₂ ⁻	Superoxidový anion
Prxs	Peroxiredoxiny
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
RBOH	Respiratory burst oxidase homologues
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály
RuBisCO	Ribulosa-1,5-bisfosfát-oxygenasa
SA	Kyselina salicylová
SOD	Superoxiddismutáza
SOS1	Salt overly sensitive 1
SPL7	Promoter-binding-like protein 7
XO	Xanthinoxidáza
Zn	Zinek