

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2021**

**Adam Zeiner**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Genetická, biochemická a mikroskopická  
analýza regulace FSD1 pomocí SPL1  
u *Arabidopsis***

**Diplomová práce**

**Adam Zeiner**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2021**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.**  
**Konzultant: Mgr. Petr Dvořák**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Adam ZEINER  
Osobní číslo: R190071  
Studijní program: N1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Genetická, biochemická a mikroskopická analýza regulace FSD1 pomocí SPL1 u Arabidopsis  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

Vypracování literární rešerše na téma:

&#x2022; Vývojová a buněčná biologie SPL transkripčních faktorů

&#x2022; MAPK signalizace s důrazem na proteiny zapojené do generativní fáze ontogeneze

&#x2022; Superoxiddismutasy, regulace jejich aktivity a exprese

Experimentální cíle:

&#x2022; Fenotypová a biochemická analýza *sp1.1* a *sp1.2*

&#x2022; Příprava fúzního konstruktů *pSPL1::GFP::SPL1*

&#x2022; Lokalizace GFP-SPL1 pomocí konfokální mikroskopie

&#x2022; Příprava dvojitých mutantů *sp1mpk3* a *sp1mpk6*

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- 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.
- Liu Q, Harberd NP, Fu X (2016) SQUAMOSA Promoter Binding Protein-like Transcription Factors: Targets for Improving Cereal Grain Yield. Mol Plant. 9(6):765-7 a práce citované v seznamu citací.
- Alberts, B. Molecular Biology of the Cell.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.  
Centrum regionu Haná

Datum zadání diplomové práce: 12. října 2019  
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

L.S.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, ČR  
tel. +420 585 034 001

## Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Adam Zeiner
Název práce	Genetická, biochemická a mikroskopická analýza regulace FSD1 pomocí SPL1 u <i>Arabidopsis</i>
Typ práce	Diplomová práce
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky Přírodovědecká fakulta Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	

SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE 1 (SPL1) je členem rodiny transkripčních faktorů, které jsou specifické pro rostliny. Tyto proteiny regulují rostlinný vývoj a odpověď na odlišné podněty. SPL7, blízký protein SPL1, reguluje expresi některých isoform SUPEROXIDDISMUTAS (SOD). Dříve provedené bioinformatické analýzy umožňují uvažovat SPL1 jako transkripční faktor s potenciálem regulovat SOD. SOD jsou hlavní součástí buněčné obrany vůči oxidačnímu stresu a jsou regulovány mitogen aktivovanými protein kinasami (MAPK). MAPK hrají klíčovou signální roli v procesech odpovědi na různé biotické a abiotické podněty a v rostlinném vývoji.

Cílem teoretické části této práce bylo shrnout dosavadní znalosti o SPL, SOD a MAPK. Experimentální část je zaměřena na charakterizaci SPL1 a jeho genetickou interakci s MPK3 a MPK6. První část odhaluje nové potenciální SPL-regulované geny, jejichž genové produkty byly dříve ukázány jako proteiny spojené s FeSOD1 (FSD1) anebo MAPK. Dále byli připraveni dvojití mutanti *spl1.1/mpk3.1* a *spl1.1/mpk6.2*. Tito mutanti byli ověřeni pomocí genotypování a mohou sloužit k objasnění genetické interakce SPL1 a MPK3, nebo MPK6. Fenotypové a biochemické analýzy *spl1* mutantů odhalily potenciální význam SPL1 jako pozitivního regulátoru prodloužení primárního kořene, signalizace kyseliny abscisové a aktivity MnSOD1 (MSD1). SPL1 negativně reguluje prodloužení prýtu a kvetení. V rámci druhé části práce byly připraveny fúzní konstrukty *eGFP:SPL1* a byla provedena jejich tranzientní exprese v listech *Nicotiana benthamiana* pro pozorování pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie. Signál eGFP-SPL1 pod kontrolou nativního promotoru byl lokalizován v jádře a v plasmodesmatech. Nadexpresní konstrukt poskytl informace o specifické subcelulární lokalizaci v endoplasmatickém retikulu a pravděpodobně v jeho globulárních strukturách. Oba konstrukty byly použity pro stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*. Byly získány pouze rostliny nesoucí konstrukt *pSPL1::eGFP:SPL1*. Poslední část je věnována hodnocení homodimerizace SPL1 pomocí kvasinkového dvouhybridního systému. Výsledky ukázaly autoaktivaci reportérového genu, což znemožnilo hodnocení homodimerizace. Dále byly připraveny konstrukty pro bimolekulární fluorescenční komplementaci pro budoucí potvrzení SPL1 protein-proteinových interakcí.

SPL1 se slibně jeví jako MAPK-regulovaný protein, který má potenciál regulace antioxidační obrany a rostlinného vývoje.

Klíčová slova	SPL1, FSD1, MPK3, MPK6, signalizace, kvetení, superoxiddismutasy, <i>Arabidopsis thaliana</i> , MAP kinasy
Počet stran	99
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Adam Zeiner
Title	Genetic, biochemical and microscopic analysis of FSD1 regulation by SPL1 in <i>Arabidopsis</i>
Type of thesis	Master thesis
Department	Department of Cell Biology and Genetics Faculty of Science Palacký University Olomouc
Supervisor	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	

SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE 1 (SPL1) is a member of plant-specific family of transcription factors which regulate plant development and response to various stimuli. SPL7, protein closely related to SPL1, regulates the expression of some SUPEROXIDDISMUTASE (SOD) isoforms. Based on previous bioinformatic analyses, SPL1 is suggested as transcription factor potentially regulating SOD. SOD are major components of plant antioxidant defence which are subjected to regulation by mitogen activated protein kinases (MAPK). MAPK are also key signalling components involved in response to diverse biotic and abiotic stimuli and plant development.

Therefore, the theoretical part of the thesis summarizes the current knowledge on SPL, SOD and MAPK. Experimental part is focused on the characterisation of SPL1 and its genetic interaction with MPK3 and MPK6. Within the first part, new potential SPL-regulated genes were predicted out of genes encoding proteins previously found to be connected to FeSOD1 (FSD1) or MAPK. Next, *Arabidopsis thaliana* double mutants *spl1.1/mpk3.1* and *spl1.1/mpk6.2* were prepared and validated using genotyping. They will help to elucidate the genetic interaction between SPL1 and MPK3 or MPK6. Moreover, phenotypic and biochemical analysis of *spl1* mutants uncovered potential importance of SPL1 as positive regulator of primary root elongation, and abscisic acid signalling, as well as MnSOD1 (MSD1) activity. SPL1 negatively regulates shoot elongation and flowering. Within the second part, *eGFP:SPL1* fusion constructs have been prepared and transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves for confocal laser scanning microscopic observations. Signal of eGFP-SPL1 under the control of native promotor was localized in nucleus and plasmodesmata. Moreover, overexpression construct showed specific subcellular localization in endoplasmic reticulum and most likely endoplasmic reticulum aggregates. Both constructs were used for stable transformation of *Arabidopsis thaliana* plants. Only plants harbouring the construct *pSPL1::eGFP:SPL1* were obtained. Within the last part, possible homodimerization of SPL1 was tested using yeast two hybrid system. The results showed autoactivation of the reporter gene which hindered the evaluation of the homodimerization. In addition, constructs for bimolecular fluorescence complementation assay were prepared for future validation of SPL1 protein-protein interactions.

In conclusion, SPL1 appears as a promising protein regulated by MAPK with potential impact on antioxidant defence and plant development.

Keywords	SPL1, FSD1, MPK3, MPK6, signalling, flowering, superoxiddismutases, <i>Arabidopsis thaliana</i> , MAP kinases
Number of pages	99
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracoval samostatně, za použití uvedených literárních zdrojů, pod vedením doc. Ing. Tomáše Takáče, Ph.D. a s konzultační podporou Mgr. Petra Dvořáka.

V Olomouci dne 28. 4. 2021.

## Poděkování

Tímto bych rád poděkoval doc. Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, cenné rady, pomoc při zpracování literární rešerše a příležitost podílet se na dalších projektech. Rád bych také poděkoval Mgr. Petrovi Dvořákovi za vedení laboratorní části, trpělivost, ochotu, věnovaný čas a morální podporu. Můj dík patří také rodičům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.



## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce .....	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Transkripční faktory SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE.....	3
3.1.1	Velké SPL .....	4
3.1.1.1	SPL1 a SPL12 .....	5
3.1.1.2	SPL14 a SPL16 .....	5
3.1.1.3	SPL7 .....	6
3.1.2	Malé SPL.....	7
3.1.2.1	SPL8.....	7
3.1.2.2	SPL3, SPL4 a SPL5 .....	8
3.1.2.3	SPL2, SPL10 a SPL11 .....	9
3.1.2.4	SPL6, SPL9 a SPL15 .....	9
3.1.2.5	SPL13 .....	10
3.2	Superoxiddismutasy .....	10
3.2.1	SPL7 jako významný regulátor exprese <i>SOD</i> .....	12
3.2.2	Další možnosti regulace exprese <i>SOD</i> .....	13
3.2.3	Posttranslační modifikace a regulace aktivity <i>SOD</i> .....	15
3.3	Mitogen aktivované protein kinasy .....	16
3.3.1	Význam MAPK pro tvorbu květu .....	18
3.3.2	Regulace tvorby tyčinek a pylových zrn pomocí MAPK.....	18
3.3.3	MAPK a samičí fertilita .....	19
4	Materiál a metody.....	21
4.1	Biologický materiál.....	21
4.2	Chemikálie .....	21
4.3	Soupravy .....	24
4.4	Roztoky a jejich příprava .....	25
4.5	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	27
4.6	Seznam použitých programů a databází.....	28
4.7	Metodika .....	28
4.7.1	Bioinformatická analýza promotorových sekvencí.....	28
4.7.2	Příprava dvojitých mutantů <i>spl1.1/mpk3.1</i> a <i>spl1.1/mpk6.2</i> .....	29
4.7.3	Povrchová sterilizace semen <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	29
4.7.4	Kultivace <i>Arabidopsis thaliana in vitro</i> .....	30
4.7.5	Genotypová analýza .....	30
4.7.6	Horizontální elektroforetická separace v agarosovém gelu.....	31
4.7.7	Fenotypová analýza <i>in vitro</i> kultivovaných rostlin .....	31
4.7.8	Fenotypová analýza <i>ex vitro</i> kultivovaných rostlin.....	31
4.7.9	Extrakce proteinů pro biochemické analýzy .....	32
4.7.10	Měření koncentrace proteinů.....	32
4.7.11	Stanovení enzymatické aktivity <i>SOD</i> .....	33
4.7.12	Stanovení enzymatické aktivity peroxidasy .....	33
4.7.13	Elektroforetická separace proteinů za denaturujících podmínek.....	34
4.7.14	Imunoblotování .....	34
4.7.15	Izolace celkové RNA .....	35
4.7.16	Odstranění kontaminace ve formě DNA od vzorku izolované RNA .....	35
4.7.17	Reverzní transkripce.....	36
4.7.18	Kvantitativní real-time PCR.....	36
4.7.19	Vliv ABA na aperturu průduchů <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	37
4.7.20	Vliv ABA na klíčení <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	37
4.7.21	Izolace gDNA.....	38
4.7.22	Amplifikace parciální části T-DNA inserčního lokusu pomocí PCR .....	38
4.7.23	Purifikace PCR produktu .....	39

4.7.24	Sekvencování .....	40
4.7.25	Příprava fúzních konstruktů .....	40
4.7.26	Transformace chemokompetentních bakteriálních buněk <i>Escherichia coli</i> , One Shot TOP10 .....	41
4.7.27	Kultivace bakteriálních buněk <i>Escherichia coli</i> , One Shot TOP10 .....	42
4.7.28	Izolace plasmidové DNA .....	42
4.7.29	Purifikace plasmidové DNA .....	42
4.7.30	Štěpení pomocí restrikčních endonukleas .....	43
4.7.31	Transformace chemokompetentních bakteriálních buněk <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , GV3101 .....	43
4.7.32	Kultivace bakteriálních buněk <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , GW3101 .....	43
4.7.33	Tranzientní transformace <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	44
4.7.34	Konfokální mikroskopie .....	45
4.7.35	Stabilní transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	45
4.7.36	Selekce stabilně transformovaných <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	46
4.7.37	Kvasinkový dvouhybridní systém .....	46
4.7.38	Příprava konstruktů pro bimolekulární fluorescenční komplementace .....	47
5	Výsledky .....	49
5.1	Bioinformatická predikce SPL-regulovaných genů .....	49
5.2	Příprava linií dvojitých mutantů <i>spl1.1/mpk3.1</i> a <i>spl1.1/mpk6.2</i> .....	51
5.3	Fenotypová analýza mutantních rostlin <i>spl1.1</i> a <i>spl1.2</i> .....	53
5.4	Biochemická analýza mutantů <i>spl1.1</i> a <i>spl1.2</i> .....	55
5.5	Analýza změny exprese <i>FSD1</i> u mutantů <i>spl1</i> .....	59
5.6	Vliv mutace <i>SPL1</i> pro signalizaci ABA .....	59
5.7	Přesné určení pozice T-DNA inserce mutantní linie <i>spl1.2</i> .....	61
5.8	Příprava konstruktů <i>pSPL1::eGFP:SPL1</i> a <i>p35S::eGFP:SPL1</i> .....	62
5.9	Mikroskopická analýza listů <i>Nicotiana benthamiana</i> exprimující <i>eGFP:SPL1</i> .....	63
5.10	Stabilní transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	68
5.11	Hodnocení homodimerizace SPL1 .....	69
6	Diskuse .....	72
6.1	Regulace SPL1 pomocí MAPK .....	72
6.2	Význam SPL1 pro vývoj <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	74
6.3	SPL1 a signalizace ABA .....	75
6.4	Subcelulární lokalizace SPL1 .....	76
6.5	Homodimerizace .....	78
7	Závěr .....	80
8	Seznam použité literatury .....	81
9	Přílohy .....	99

## Seznam symbolů a zkratek

1-MCP	1-methylcyklopropen; inhibitor zrání
3AT	3-amino-1,2,4-triazol
ABA	Kyselina abscisová
ABRE	ABA responzivní element
<i>Am</i>	<i>Antirrhinum majus</i>
ANK	Ankyrin
ANP	HOMOLOG JADERNĚ A FRAGMOPLAST LOKALIZOVÉ KINASY <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ; <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> HOMOLOGUES OF NUCLEUS- AND PHRAGMOPLAST LOCALIZED KINASE
AP	APETALA
APS	Peroxodisíran amonný
BCP	1-bromo-3-chloropropan
BIFC	Bimolekulární fluorescenční komplementace; Bimolecular fluorescence complementation
BSA	Hovězí sérový albumin; Bovine serum albumin
CCS	COPPER CHAPERONE FOR SUPEROXID DISMUTASE
cDNA	Komplementární DNA; Complementary DNA
CDS	Kódující sekvence; Coding sequence
CCH	COPPER CHAPERONE
CNR	COLORLESS NON-RIPENING
<i>Cp</i>	<i>Carica papaya</i>
CPN	CHAPERONIN
CSD	Cu/Zn SUPEROXID DISMUTASA
DEWAX	DECREASE WAX BIOSYNTHESIS
DIA	o-Dianisidin
DLST	DIHYDROLIPOAMID SUKCINYLTRANSFERASA
dNTP	Deoxyribonukleotidy
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
eGFP protein	Zesílený zelený fluorescenční protein; Enhanced green fluorescent protein
EP	Extrakční pufr
ETH	Ethephon; induktor zrání
FIMO	Find Individual Motif Occurrences; bioinformatický nástroj
FSD	Fe SUPEROXID DISMUTASA
FUL	FRUITFULL
gDNA	Genomická DNA
GFP	Zelený fluorescenční protein; Green fluorescent protein
<i>Gm</i>	<i>Glycine max</i>
GRP	NA GLYCIN BOHATÝ PROTEIN; GLYCINE RICH PROTEIN
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HMP	HEAVY METAL ASSOCIATED PROTEIN
HY	ELONGATED HYPOCOTYL
ImageJ	Image Processing and Analysis on Java
LFY	LEAFY
MADS	MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS, SRF
MAPK, MPK	Mitogen aktivovaná protein kinasa
MAP2K, MEK, MKK	Mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa
MAP3K, MEKK	Mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa
MES	Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové
MMDH	MITOCHONDRIÁLNÍ MALÁT DEHYDROGENASA

MS	Murashige a Skoog; médium
MSD	Mn SUPEROXID DISMUTASA
MTE	MITOCHONDRIÁLNÍ PYRUVÁT DEHYDROGENASA, PODJEDNOTKA
NBT	Chlorid nitrotetrazoliové modři
NLS	Jaderná lokalizační sekvence; Nuclear localization sequence
OD <sub>600</sub>	Optická hustota při vlnové délce 600 nm; Optical density, 600 nm
PA	Polyakrylamid
PEG	Polyethylenglykol
PPT	Phosphinothricin
PVDF	Polyvinyliden difluorid
RF	Retenční faktor
RLCK	Cytoplasmatická receptoru podobná kinasa; Receptor-like cytoplasmic kinase
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály; Reactive oxygen species
SBP	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN
SDS	Dodecylsírán sodný
SIPK	SALICYLOVOU KYSELINOU INDUKOVANÁ PROTEIN KINASA
<i>Sly</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
SOD	Superoxiddismutasa
SPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE
SQUA	SQUAMOSA
TAE	Tris Acetát EDTA
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TBS-T	Tris buffer saline s přídatkem Tween 20
TE	Tris-EDTA; pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TF	Transkripční faktor
TMD	Transmembránová doména
YFP	Žlutý fluorescenční protein, Yellow fluorescent protein
ZAT	ZINKOVÝ PRST <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ; ZINC FINGER OF <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Rozdělení SPL <i>Arabidopsis thaliana</i> podle velikosti aminokyselinové sekvence ...	4
<b>Obrázek 2:</b> Popsané možnosti regulace SOD .....	12
<b>Obrázek 3:</b> Přehled MAPK zapojených do generativní fáze ontogeneze <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
<b>Obrázek 4:</b> Analýza promotorových oblastí genů kódující proteiny identifikované v interaktomu FSD1 a v diferenciálních proteomech mutantních rostlin <i>mpk3.1</i> , <i>mpk4</i> , <i>mpk6.2</i> .....	50
<b>Obrázek 5:</b> Identifikace T-DNA inserce v rostlinách F3 generace <i>spl1.1</i> x <i>mpk3.1</i> kříženců...	51
<b>Obrázek 6:</b> Identifikace T-DNA inserce v rostlinách F3 generace <i>spl1.1</i> x <i>mpk6.2</i> kříženců...	52
<b>Obrázek 7:</b> Fenotypová analýza kořenů semenáčků mutantů <i>spl1.1</i> a <i>spl1.2</i> .....	53
<b>Obrázek 8:</b> Fenotypová analýza třicetidenních mutantů <i>spl1.1</i> a <i>spl1.2</i> .....	55
<b>Obrázek 9:</b> Hodnocení enzymatické aktivity SOD a peroxidas desetidenních mutantů <i>spl1.1</i> a <i>spl1.2</i> .....	56
<b>Obrázek 10:</b> Kvantifikace abundance FSD1 pomocí specifické protilátky v desetidenních semenáčcích mutantů <i>spl1.1</i> a <i>spl1.2</i> .....	57
<b>Obrázek 11:</b> Kvantifikace abundance CSD1 a CSD2 v desetidenních semenáčcích mutantů <i>spl1.1</i> a <i>spl1.2</i> .....	58
<b>Obrázek 12:</b> Relativní kvantifikace exprese <i>FSD1</i> v desetidenních semenáčcích mutantů <i>spl1.1</i> a <i>spl1.2</i> .....	59
<b>Obrázek 13:</b> Identifikace responzivních elementů kyseliny abscisové v promotorových oblastech genů <i>SPL12</i> a <i>SPL15</i> .....	60
<b>Obrázek 14:</b> Analýza apertury průduchů mutantů <i>spl1.1</i> a <i>spl1.2</i> po aplikaci kyseliny abscisové .....	60
<b>Obrázek 15:</b> Vliv kyseliny abscisové na klíčení semen mutantů <i>spl1.1</i> a <i>spl1.2</i> .....	61
<b>Obrázek 16:</b> Lokalizace T-DNA inserce mutantní linie <i>spl1.2</i> .....	62
<b>Obrázek 17:</b> Ověření úspěšné přípravy konstruktů <i>pSPL1::eGFP:SPL1</i> a <i>p35S::eGFP:SPL1</i>	63
<b>Obrázek 18:</b> Mikroskopická analýza subcelulární lokalizace eGFP-SPL1 ( <i>pSPL1::eGFP:SPL1</i> ) v tranzientně transformovaných listech <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	64
<b>Obrázek 19:</b> Lokalizace eGFP-SPL ( <i>pSPL1::eGFP:SPL1</i> ) v blízkosti cytoplasmatické membrány v tranzientně transformovaných listech <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	65
<b>Obrázek 20:</b> Signál eGFP-SPL1 ( <i>p35S::eGFP:SPL1</i> ) pozorovaný v endoplasmatickém retikulu, jádru a artefaktech v tranzientně transformovaných listech <i>Nicotiana benthamiana</i> ....	66
<b>Obrázek 21:</b> Prodlužování tubulární struktury endoplasmatického retikula, která byla značena pomocí eGFP-SPL1 ( <i>p35S::eGFP:SPL1</i> ), v tranzientně transformovaných listech <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	67
<b>Obrázek 22:</b> Dynamika signálu eGFP-SPL1 ( <i>p35S::eGFP:SPL1</i> ) tečkovitých struktur v tranzientně transformovaných listech <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	67
<b>Obrázek 23:</b> Nekrózy pozorované na inokulovaném listu <i>Nicotiana benthamiana</i> čtvrtý den po inokulaci .....	68
<b>Obrázek 24:</b> Detekce přítomnosti konstruktů <i>pSPL1::eGFP:SPL1</i> v transformovaných rostlinách <i>Arabidopsis thaliana</i> Col0 a <i>spl1.1</i> .....	69
<b>Obrázek 25:</b> Analýza homodimerizace SPL1 pomocí kvasinkového dvouhybridního systému	70
<b>Obrázek 26:</b> Identifikace pozitivních klonů nesoucí vektory <i>SPL1</i> -pBIFC2 a <i>SPL1</i> -pBIFC3..	70
<b>Obrázek 27:</b> Návrh zkrácených verzí SPL1 pro budoucí experimenty .....	79

# 1 Úvod

SQUAMOSA PPROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) jsou unikátní rostlinné transkripční faktory (TF). SPL regulují nejrůznější vývojové pochody rostlin (Preston *et Hileman*, 2013), právě proto zažívají v posledních letech zvýšenou pozornost vědecké komunity. Tento zájem je spjat především s vysokým potenciálem pro biotechnologické aplikace (Miura *et al.*, 2010; Wang *et Wang*, 2017). Neméně významnými jsou pro rostlinný vývoj i antioxidantní enzymy, například superoxiddismutasy (SOD), které jsou významnou měrou s SPL propojeny. SPL7 a pravděpodobně další zástupci SPL jsou díky vlivu na expresi *SOD* uvažovány jako jeden z regulačních mechanismů antioxidantní obrany u rostlin (Yamasaki *et al.*, 2009; Chao *et al.*, 2017). Bioinformatické (Zeiner, 2019), biochemické (Birkenbihl *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2018) a fosfoproteomické analýzy (Zulawski *et al.*, 2013) odhalily možnost fosforylace SPL. To nastiňuje jejich potenciální regulaci prostřednictvím fosforylace, například prostřednictvím mitogen aktivovaných protein kinasových (MAPK) signálních drah, které by tak mohly významně ovlivnit jejich funkci.

Tato práce je proto zaměřena na poskytnutí literárního přehledu stávajících informací o těchto proteinech. Praktická část předložené diplomové práce je zaměřena na rozšíření znalostí o SPL1, který je potenciálně zapojen do MAPK signálních drah s ambicí regulace exprese *Fe* SUPEROXID DISMUTASY 1 (*FSD1*).

## 2 Cíle práce

Vypracování literární rešerše na téma:

- Vývojová a buněčná biologie SPL transkripčních faktorů
- MAPK signalizace s důrazem na proteiny zapojené do generativní fáze ontogeneze
- Superoxiddismutasy, regulace jejich aktivity a exprese

Experimentální cíle:

- Fenotypová a biochemická analýza *spl1.1* a *spl1.2*
- Příprava fúzního konstruktů *pSPL1::GFP:SPL1*
- Lokalizace GFP-SPL1 pomocí konfokální mikroskopie
- Příprava dvojitéch mutantů *spl1/mpk3* a *spl1/mpk6*

### 3 Literární přehled

#### 3.1 Transkripční faktory SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE

SPL tvoří proteinovou rodinu specifickou pro rostlinnou vývojovou linii (Guo *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Jedná se o TF, které vykazují přítomnost charakteristické SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN (SBP) domény (Birkenbihl *et al.*, 2005; Kropat *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2008). SBP doména je DNA vazebná doména, která zajišťuje stechiometrickou vazbu na rozpoznávaný GTAC motiv v promotorových sekvencích cílových genů (Cardon *et al.*, 1999; Birkenbihl *et al.*, 2005; Kropat *et al.*, 2005). Tato vazba je umožněna přítomností aminokyselin s pozitivním nábojem (Yamasaki *et al.*, 2004). Vysoký stupeň konzervace v rámci této domény vykazují především rezidua cysteinu a histidinu, která formují dvě struktury podobné zinkovému prstu (Yamasaki *et al.*, 2004; Birkenbihl *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2008). Právě ty jsou významné pro efektivní vazbu DNA (Yamasaki *et al.*, 2004; Birkenbihl *et al.*, 2005).

*Arabidopsis thaliana* obsahuje ve svém genomu 16 *SPL* genů (Guo *et al.*, 2008), některé publikace, které zohledňují *SPL13B*, uvádí 17 *SPL* genů (Yang *et al.*, 2008). Dále v tomto textu budou *SPL* pocházející z *Arabidopsis thaliana* diskutovány jako „*SPL*“, *SPL* jiných druhů budou specifikovány názvem daného druhu.

Funkce *SPL* je spojována nejen s regulací tvorby květu (Wang *et al.*, 2009a; Jorgensen *et al.*, 2014), prýtu a kořene (Garcia-Molina *et al.*, 2014a), ale také s odpovědí na stresové podmínky (Chao *et al.*, 2017). Pletivově specifická exprese *SPL* genů ve správné fázi ontogeneze je esenciální pro správný vývoj rostlin (Preston *et al.*, 2013). Především je vyzdvihována jejich regulace transkripce *MCM1*, *AGAMOUS*, *DEFICIENS*, *SRF (MADS)-box* genů (Cardon *et al.*, 1999; Birkenbihl *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2009), jejichž produkty jsou spojovány nejen s generativní fází životního cyklu, včetně kvetení (Smaczniak *et al.*, 2012; Aerts *et al.*, 2018), ale i s vývojem embrya a klíčením (Rounsley *et al.*, 1995) nebo s tvorbou kořene (Shao *et al.*, 2019).

Na základě fylogenetických analýz mohou být *SPL* děleny do několika skupin (Cardon *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2008). Pro účely této práce budeme *SPL Arabidopsis thaliana* dělit (Obrázek 1) na (a) velké *SPL*, charakteristické aminokyselinovou sekvencí větší než 500 aminokyselin, a (b) malé *SPL*, které jsou menší než 500 aminokyselin.





**Obrázek 1:** Rozdělení SPL *Arabidopsis thaliana* podle velikosti aminokyselinové sekvence. Uvedeny jsou i významné domény. SBP – SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN doména; ANK – ankyrinová repetice; TMD – transmembránová doména; měřítko – 100 aminokyselin. Vytvořeno na základě dat dostupných v databázi Simple Modular Architecture Research Tool (Letunic *et al.*, 2018).

### 3.1.1 Velké SPL

Velké SPL jsou skupina sekvencně blízkých SPL1, SPL12, SPL14 a SPL16 a SPL7 (Yang *et al.*, 2008). Tyto SPL mají C-terminální transmembránovou doménu (TMD; viz Obrázek 1; Garcia-Molina *et al.*, 2014b; Chao *et al.*, 2017). Eliminace TMD *Solanum lycopersicum* SBP12a (SlySBP12a), SPL rajčete, která je zodpovědná za jeho integraci do membrány endoplasmatického retikula, narušuje jeho lokalizaci a je lokalizován především v jádře (Kessens *et al.*, 2018). Přítomnost této domény, respektive subcelulární lokalizace těchto SPL, vybízí k úvahám o interakci s integrálními proteiny membrán (Wang *et al.*, 2009b). Strukturální podobnost je zachována i mimo vysoce konzervovanou SBP doménu. Podobnost je spojena se shodnou pozicí některých intronů (Guo *et al.*, 2008) a přítomností AHA motivu v N-terminální oblasti (Kropat *et al.*, 2005; Sommer *et al.*, 2010). AHA motiv je obecně spojován s transkripční aktivací proteinů (Döring *et al.*, 2000). U této skupiny se vyskytují i ankyriové (ANK) repetice (Guo *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008), které jsou klasicky uvažovány jako protein-proteinový interakční motiv (Islam *et al.*, 2018).

### 3.1.1.1 SPL1 a SPL12

SPL1 a SPL12 vykazují vysoký stupeň homologie, který je způsobený duplikací a translokací ancestrálního genu (Cardon *et al.*, 1999). To vysvětluje i případnou funkční redundanci (Chao *et al.*, 2017; Schulten *et al.*, 2019) a podobnou úroveň exprese jejich genů s konstitutivním charakterem (Cardon *et al.*, 1999; Jorgensen *et al.*, 2014), která byla u *Arabidopsis* pozorována ve všech pletivech. Vyšší exprese je však v květu, než ve vegetativních orgánech (Jorgensen *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2017). Gen *SPL1* je relativně více exprimován než *SPL12* (Cardon *et al.*, 1999; Jorgensen *et al.*, 2014), nicméně exprese genu *SPL12* je vyšší než *SPL1* ve vegetativním apikálním meristému prýtu (Jorgensen *et al.*, 2014). Tyto rozdíly mohou poukazovat na jejich odlišnosti. Exprese genu *SPL1* se navíc zvyšuje během zasolení (Kreps *et al.*, 2002). Na druhou stranu, exprese *Carica papaya SPL1* (*CpSPL1*) a *CpSPL12* byla snížena působením ethyphonu (ETH), který je užíván pro stimulaci dozrávání, ale indukována 1-methylcyklopropenem (1-MCP), inhibitorem zrání (Xu *et al.*, 2020).

Mutování pouze jednoho z těchto genů nemá významný vliv na fenotypový projev rostlin. Vyřazení genů *SPL1* a *SPL12* je spojováno se snížením fertility vlivem defektního vývoje květu, především s jeho otevíráním (Chao *et al.*, 2017), ale také se snížením množství šesulí a semen (Chao *et al.*, 2017; Schulten *et al.*, 2019). Tyto projevy jsou spojeny především s vyšší senzitivitou vůči zvýšeným teplotám (Chao *et al.*, 2017). Vyšší citlivost dvojitéch mutantů *spl1/spl12* potvrzuje funkční redundanci těchto genů (Chao *et al.*, 2017). Vyšší teploty vedou u *spl1/spl12*, v porovnání s rostlinami divokého typu a s mutanty *spl1* a *spl12*, k pozorování nižší aktivity SOD, zvýšení koncentrace kyslíkových radikálů a v konečném důsledku k buněčné smrti (Chao *et al.*, 2017). Při nedostatku mědi vykazuje trojitý mutant *spl1/spl7/spl12* defektní tvorbu semen, nižší v porovnání s rostlinami divokého typu, ale i s rostlinami *spl7* a *spl1/spl12* (Schulten *et al.*, 2019).

Transkripce *MADS-box* genu *APETALA 1* (*API*) může být regulována pomocí SPL1, jelikož byla experimentálně potvrzena interakce SBP domény SPL1 s promotorem tohoto genu (Birkenbihl *et al.*, 2005). Homologní *Glycine max* SPL12l (*GmSPL12l*) hraje roli jako negativní regulátor obranných reakcí sóji. Exprese genu *GmSPL12l* se významně snižuje po infekci rostliny patogenem *Phakopsora pachyrhizi*. Podobný význam v odpovědi na biotický stres byl pozorován i pro gen *NbSPL1* u *Nicotiana benthamiana*. Umlčení genu *GmSPL12l* negativně ovlivňuje schopnost růstu a vývoje rostliny (Qi *et al.*, 2016).

### 3.1.1.2 SPL14 a SPL16

Exprese genu *SPL14* je pozorována především ve vaskulárních pletivech listového řapíku a klíčnicích listů, hydatodách, základně trichomů a v blizně (Stone *et al.*, 2005). Exprese genu *SPL16* je popisována především v apexu prýtu a stonkových listech (Preston *et al.*, 2013)

a je zvýšena působením nízkých teplot (Vogel *et al.*, 2005). Záření UV-B indukuje snížení exprese genu *SPL14* (Saini *et al.*, 2020), exprese genu *CpSPL14* je naopak zvýšena aplikací 1-MCP (Xu *et al.*, 2020).

*SPL14* působí do jisté míry opačně vůči *SPL*, které hrají úlohu v přechodu z juvenilní do vegetativní fáze ontogeneze, tedy zpomaluje tento přechod (Telfer *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 2005). Mutantní rostliny *spl14* vykazují zvýšenou elongaci řapíku, výraznější zoubkování listové čepele a opožděné kvetení (Stone *et al.*, 2005).

### 3.1.1.3 *SPL7*

*SPL7* patří k nejlépe prostudovaným a nejintenzivněji studovaným *SPL*. Hladina transkriptu *SPL7* se zvyšuje v listech v průběhu vývoje s maximem dosaženým před kvetením (Garcia-Molina *et al.*, 2014a; Jorgensen *et al.*, 2014). K expresi *SPL7* dochází především v kořeni, stonku a květu (Yamasaki *et al.*, 2009; Garcia-Molina *et al.*, 2014a). Právě v kořeni byla pozorována specifická exprese ve vyvíjejících se primordiích laterálních kořenů (Araki *et al.*, 2018). Transkripce tohoto genu je stimulována zasolením (Kreps *et al.*, 2002) a u homologního genu *CpSPL10* je indukována 1-MCP (Xu *et al.*, 2020). Subcelulární lokalizace proteinu *SPL7*, který byl značen zeleným fluorescenčním proteinem (GFP; green fluorescent protein), je popsána nejen v jádře, ale zejména v membránovém systému endoplasmatického retikula (Garcia-Molina *et al.*, 2014b).

*SPL7* je spojen především s regulací exprese na měď bohatých proteinů a regulací antioxidační obrany, některých genů *SOD*, čemuž bude věnována jedna z následujících kapitol. Ovlivňuje ale expresi i dalších genů, jako například *FERRIC REDUCTASE OXIDASE* (Bernal *et al.*, 2012) anebo *COPT*, které kódují proteiny zapojené do transportu mědi (Jung *et al.*, 2012). *SPL7* v konečném důsledku vstupuje do distribuce kovů, čehož důkazem je redukované množství mědi v listové růžici mutantů *spl7* (Bernal *et al.*, 2012; Schulten *et al.*, 2019). Rostliny mutantů *spl7*, které rostou na médiu s nižším obsahem mědi, vykazují nižší čerstvou váhu (Yamasaki *et al.*, 2009; Bernal *et al.*, 2012; Garcia-Molina *et al.*, 2014a) a symptomy chlorózy (Bernal *et al.*, 2012). Současná mutace genů *SPL7* a *KIN17* zesiluje Cu-dependentní fenotyp mutantů *spl7*. U těchto rostlin je pozorován limitovaný růst a elongace kořene, zvýšený oxidační stres a snížený počet pylových zrn s redukovanou životaschopností (Garcia-Molina *et al.*, 2014a). *KIN17*, který patří do skupiny vysoce konzervovaných DNA vazebných proteinů (Mazin *et al.*, 1994), podporuje expresi Cu-responzivních genů díky fyzické interakci s *SPL7* (Garcia-Molina *et al.*, 2014a). *SPL7* ovlivňuje nejen transport mědi v kořenovém systému, ale také deficienci železa v prýtu (Bernal *et al.*, 2012).

### 3.1.2 Malé SPL

Malé *SPL* jsou charakteristické regulací pomocí miRNA (Preston *et al.*, 2013), to však neplatí pro gen *SPL8* (Xing *et al.*, 2010), což jej odlišuje od ostatních malých *SPL*. *SlySBP8b* má podobné charakteristiky jako výše uvedený *SlySBP12a*, přičemž se odlišuje v subcelulární lokalizaci, která je ovlivněna absencí TMD (Kessens *et al.*, 2018).

Tyto *SPL* geny, dělené na základě fylogenetických analýz do čtyř podskupin (i) *SPL3*, *SPL4* a *SPL5*; (ii) *SPL2*, *SPL10* a *SPL11*; (iii) *SPL6*, *SPL9* a *SPL15*; a (iv) *SPL13* (Chen *et al.*, 2010), jsou regulovány pomocí miR156 a miR157, které působí destabilizaci jejich transkriptu a translační represi (Wu *et al.*, 2006; Addo-Quaye *et al.*, 2008; German *et al.*, 2008; He *et al.*, 2018a). Obecně nejsou tyto *SPL* spjaty jen se správným vývojem prašníků (Xing *et al.*, 2010), ale především s přechodem rostliny z juvenilní do dospělé fáze ontogeneze (Wu *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2008; Usami *et al.*, 2009).

Vyřazení jednotlivých *MIR* genů má menší vliv na expresi těchto *SPL* genů než mutace jejich většího množství. Absence výše uvedených miRNA zapříčiňuje nárůst hladiny *SPL* (He *et al.*, 2018a). Jejich nadexprese má podobný efekt jako vyřazení anebo umlčení těchto *SPL* (Schwab *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2010). miR157 je více abundantní než miR156, má však menší efekt na morfologii prýtu a expresi *SPL* genů než miR156. Tento fakt je zapříčiněn chybným párováním při vzniku heteroduplexu a pravděpodobně méně efektivnější vazbou ARGONAUTE 1, proteinu spojeného s degradací cílových molekul (He *et al.*, 2018a). Exprese *MIR156* je nejvyšší v mladých semenáčcích při krátkém dni (Wang *et al.*, 2009a). Nadexprese *MIR156* působí opoždění kvetení (Schwarz *et al.*, 2008), rychlejší iniciaci tvorby listů listové růžice, potlačení apikální dominance, zvýšení počtu listů (Schwab *et al.*, 2005), zrychlení růstu primárního kořene a stimulaci tvorby laterálních kořenů (Yu *et al.*, 2015).

#### 3.1.2.1 *SPL8*

*SPL8* je zapojen do ranného vývoje rostlin (Zhang *et al.*, 2006), generativní fáze vývoje (Cardon *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2006; Jorgensen *et al.*, 2014) a zasahuje do regulačních drah giberelinů, které jsou důležité pro klíčení a elongaci kořene (Zhang *et al.*, 2006).

Mutantní rostliny *spl8* se vyznačují sníženou fertilitou (Unte *et al.*, 2003; Xing *et al.*, 2010), která je spojena s abnormálním vývojem mikrosporangii, premeiotickými aborty sporocytů a následným snížením počtu pylových zrn. Snížení samčí fertility je také přikládáno za vinu významnému zkrácení nitek prašníků, které nemohou dosáhnout relativně vyšší polohy vůči pestíku, což narušuje schopnost samoopylení (Unte *et al.*, 2003). Snížená fertilita, ne však absolutní sterilita, poukazuje na přítomnost funkčně podobné anebo podobných *SPL* (Unte *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2010). Tento semisterilní fenotyp mutantů *spl8* je spjat

s funkční redundancí SPL8 a miR156- a miR157-regulovaných SPL. Toto bylo potvrzeno nadexpresí *MIR156* v rostlinách mutantů *spl8*. Tato nadexprese *MIR156* působí úplnou sterilitu rostlin (Xing *et al.*, 2010).

### 3.1.2.2 SPL3, SPL4 a SPL5

Relativně vyšší exprese genu *SPL3* byla pozorována v květu (Cardon *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2015), šešulích (Yu *et al.*, 2015), listu (Wu *et Poethig*, 2006; Yu *et al.*, 2015), apexu prýtu a v expandujících listových primordiích (Wu *et al.*, 2009). Celkově však celá skupina těchto *SPL* genů má podobný expresní profil (Cardon *et al.*, 1999). Záření UV-B indukuje zvýšení exprese genu *SPL4* (Saini *et al.*, 2020) a exprese genu *CpSPL3* je indukována 1-MCP (Xu *et al.*, 2020). *SlySBP3* a *SlySBP4* jsou intenzivněji exprimovány v listech a v květu, konkrétně může být snadno exprese identifikována v tyčinkách. Exprese genu *COLORLESS NON-RIPENING (CNR)*, který je ortologní genu *SPL3*, je vyzdvihována především v průběhu tvorby plodu a jeho zrání (Salinas *et al.*, 2012). To poukazuje na jejich význam v rámci reprodukční fáze vývoje (Manning *et al.*, 2006; Salinas *et al.*, 2012). *SPL3*, který byl značen GFP, byl detekován v dospělých listech a v květním meristému (Yamaguchi *et al.*, 2009).

Funkčně redundantní proteiny *SPL3*, *SPL4* a *SPL5* pozitivně regulují změnu vegetativní fáze a kvetení (Wu *et Poethig*, 2006; Wang *et al.*, 2009a; Yamaguchi *et al.*, 2009), což může být spojeno s nadexpresí genů, kterými jsou *LEAFY (LFY)*, *FRUITFULL (FUL)* a *API* (Yamaguchi *et al.*, 2009). Exprese miRNA-resistentního *SPL3* vede ke zrychlení produkce abaxiálních trichomů bez výrazného vlivu na tvar listu. Nadexprese genů *SPL3*, *SPL4* a *SPL5* resistentních vůči regulaci pomocí miRNA má shodné fenotypové projevy jako nadexprese genu *MIR172b* (Wu *et al.*, 2009). *miR172* je spojena s indukcí kvetení, potlačením represorů kvetení (Aukerman *et Sakai*, 2003; Schmid *et al.*, 2003). Epimutace genu *CNR* je spojena se sníženou produkcí ethylenu (Thompson *et al.*, 1999), inhibicí zrání a omezenou pigmentací perikarpu (Thompson *et al.*, 1999; Manning *et al.*, 2006), která je způsobena inhibicí syntézy karotenoidů (Fraser *et al.*, 2001). Popsaným homologním genem této skupiny je i *Antirrhinum majus SBP1 (AmSBP1)*, jehož exprese v květu je klíčová pro indukcii kvetení a vývoj květu. Mutace tohoto genu působí zvýšení počtu listových nodů, je tedy zapojen i do regulace apikální dominance. Umlčení tohoto genu vede k opoždění kvetení, nebo absolutní ztrátě schopnosti kvést, což je způsobeno snížením exprese regulovaných genů *SQUA*, *DEFICIENS-HOMOLOG 28* a *FUL* (Preston *et Hileman*, 2010).

### 3.1.2.3 SPL2, SPL10 a SPL11

Expresce této skupiny *SPL* genů má konstitutivní charakter (Cardon *et al.*, 1999), majoritně jsou však exprimovány ve stonku a v květu (Shikata *et al.*, 2009). Navíc, pro *SPL11* byla významněji detekována expresce v prašnicích (Xing *et al.*, 2010). Kromě miR156 a miR157 může být expresce genu *SPL2* potenciálně regulována také miR391 (German *et al.*, 2008).

Především gen *SPL10*, ale i další miR156-regulované *SPL* geny, hrají úlohu při represí vývoje laterálních kořenů (Yu *et al.*, 2015). Regulace vývoje kořenového systému byla popsána i u rýže. *SPL3* rýže, který je homologním genem této fylogenetické skupiny (Yang *et al.*, 2008), vykazuje schopnost negativní regulace tvorby nodálních kořenů (Shao *et al.*, 2019). *SPL10* a *SPL11* mají téměř shodnou sekvenci, proto se dá předpokládat jejich překrývající se funkce (Yang *et al.*, 2008). Celkově však tato skupina *SPL* kontroluje vegetativní a reprodukční fázi vývoje. Gen *SPL2* má dvě sestříhové varianty. První varianta je spojena s produktem, jehož struktura je podobná *SPL10* a *SPL11*. Expresce je shodná s expresí genů *SPL10* a *SPL11*. Druhá varianta je spjata s tvorbou zkráceného proteinu, který vykazuje konstitutivní charakter výskytu. Expresce chimérického represoru genu *SPL10* způsobuje redukci apikální dominance a zvyšuje počet trichomů. Pozorované zvýšení počtu trichomů bylo také nalezeno u dvojitých mutantů *spl2/spl10* a *spl2/spl11* (Shikata *et al.*, 2009). Expresce miR156-resistentního genu *SPL10* vede naopak ke snížení počtu trichomů (Yu *et al.*, 2010). Rostliny nesoucí miR156-resistentní geny *SPL10* nebo *SPL11* vykazovaly předčasný přechod z juvenilní do dospělé fáze, což může být spojeno s popsanou zygotickou represí pomocí miR156 (Nodine *et al.*, 2010).

### 3.1.2.4 SPL6, SPL9 a SPL15

Specifická expresce genu *SPL9* je pozorována v centrálním válcí, klidovém centru hlavního kořene, buňkách pericyklu (Yu *et al.*, 2015), listových primordiích a v provaskulárních svazcích mladých listů (Wang *et al.*, 2009a). Expresce genu *SPL15* byla pozorována v prašnicích a na vnitřní placentální straně semeníku před zahájením tvorby vajíčka (Xing *et al.*, 2010). Hladiny transkriptů *SPL6*, *SPL9* (Cardon *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2008) a *SPL15* se zvyšují v průběhu ontogeneze. Porovnatelná expresce genů *SPL9* a *SPL15* v rannějších fázích vývoje je následně vystřídána preferenční expresí genu *SPL9* (Schwarz *et al.*, 2008). U tohoto genu byla navíc pozorována stimulace expresce při expozici rostlin světlu (Wang *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2019) a její indukce zářením UV-B (Saini *et al.*, 2020).

*SPL9* potlačuje formování internodálních trichomů přímou aktivací transkripce genů *TRICHOMELESS 1* a *TRIPTYCHON*, které ve svých promotorových sekvencích obsahují několik GTAC vazebných motivů (Yu *et al.*, 2010). Váže se také do promotorových oblastí genů *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*, *AGAMOUS-LIKE 42* (Wang *et al.*,

2009a) a *ECERIFERUM 1* (Li *et al.*, 2019). *ECERIFERUM 1* působí stimulaci syntézy vosků (Aarts *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2019). Tento proces je negativně ovlivněn heterodimerizací *SPL9* s *DECREASE WAX BIOSYNTHESIS* (*DEWAX*; Li *et al.*, 2019), který je TF regulující produkci vosků (Go *et al.*, 2014).

Vyřazení genu *SPL9* působí opoždění tvorby abaxiálních trichomů a zakulacenější tvar listů. Mutace genu *SPL15* však podobné fenotypové projevy nevyvolala (Wu *et al.*, 2009). Navíc, gen *SPL9* je spojen s elongací listové čepele, stimulací zoubkování listů, zvýšenou expresí genu *MIR172b* (Wu *et al.*, 2009) a negativním vlivem na vývoj laterálních kořenů (Yu *et al.*, 2015). Rostliny s mutovanými geny *SPL9* a *SPL15* vykazují zvýšený počet listů listové růžice, nižší vzrůst, kratší plastochron a větší počet postranních výhonů. U těchto rostlin je tedy pozorována tendence ztráty apikální dominance (Schwarz *et al.*, 2008). Pozorované fenotypové projevy jsou mírnější v porovnání s projevy *MIR156b* nadexpresních rostlin (Schwab *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2008).

*SPL6* pocházející z *Nicotiana benthamiana* a *SPL6* pozitivně regulují obranu vůči biotickému stresu (Padmanabhan *et al.*, 2013). Vyřazení genů *GmSPL9*, které jsou homologní genům *SPL9* a *SPL15*, zapříčiňuje zvýšení počtu nodulů, počtu větvení, zvýšení suché váhy rostliny a snížení délky plastochronu (Bao *et al.*, 2019).

### 3.1.2.5 *SPL13*

K expresi genu *SPL13* dochází především v hypokotylu, ale i ve vaskulárních pletivech bazální části děložních listů (Martin *et al.*, 2010). Slabá exprese *SPL13* byla také detekována v prašnicích (Xing *et al.*, 2010).

Transkript *miR156*-resistentního genu *SPL13* je akumulován v semenáčcích a je spojován s oddálením tvorby vegetativních listů. Tyto poznatky ukazují na význam *SPL13* pro vývoj listových primordií (Martin *et al.*, 2010). Vyřazení genu *SPL13* u rostlin s mutovanými geny pro *MIR156* a *MIR157* má za následek částečné potlačení fenotypových projevů pozorovaných u rostlin s vyřazenými *MIR156* a *MIR157*, které vykazují zvýšenou tvorbu abaxiálních trichomů a prodloužení tvaru listů. Produkce abaxiálních trichomů však byla v porovnání s rostlinami divokého typu stále vyšší (He *et al.*, 2018a).

## 3.2 Superoxiddismutasy

Antioxidační obrana živých organismů je jejich nepostradatelnou součástí, která jim pomáhá vyrovnat se s různými environmentálními podmínkami, které jsou spojeny s přítomností reaktivních kyslíkových radikálů (ROS; reactive oxygen species). Antioxidační obranu

organismů můžeme rozdělit na enzymatickou a neenzymatickou. I když obě tyto složky jsou svou povahou odlišné, obě se významnou měrou podílí na obraně vůči ROS. Právě SOD jsou klíčovou komponentou enzymatické obrany, která je spojena s přeměnou superoxidového aniontového radikálu na peroxid vodíku. Superoxidový aniontový radikál je tvořen jako vedlejší produkt metabolických pochodů, zejména v mitochondriích a chloroplastech (Foyer *et Noctor*, 2009), ale také pomocí NADPH oxidas v apoplastu (Kimura *et al.*, 2020).

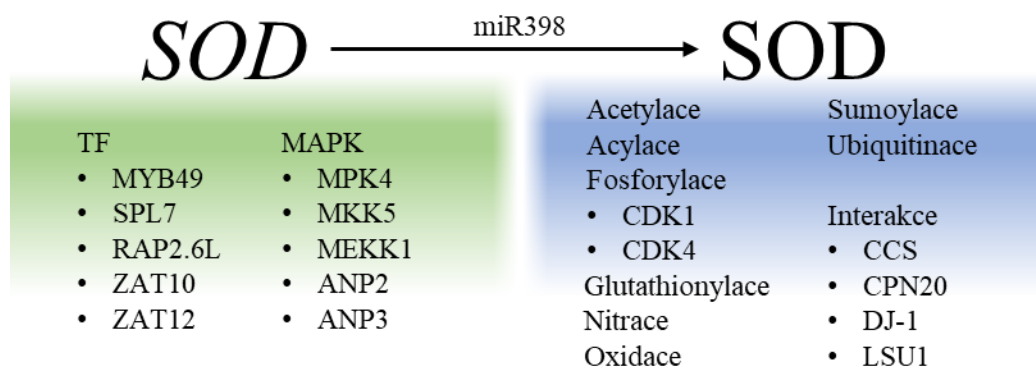
SOD jsou metaloenzymy, které jsou děleny do čtyř skupin podle přítomnosti specifického kofaktoru na (i) FeSOD, (ii) MnSOD, (iii) Cu/ZnSOD a (iv) NiSOD. NiSOD však nejsou přítomny ve vyšších rostlinách (Schmidt *et al.*, 2009; Abreu *et Cabelli*, 2010; Pilon *et al.*, 2011).

FSD1, FeSOD1 *Arabidopsis thaliana*, se vyskytuje ve stromě, ale nachází se také v jádře a cytosolu (Dvořák *et al.*, 2021a). V cytosolu se nachází i Cu/Zn SUPEROXID DISMUTASA 1 (CSD1; Kliebenstein *et al.*, 1998). Subcelulární lokalizace FSD2, FSD3 (Myouga *et al.*, 2008) a CSD2 (Kleffmann *et al.*, 2004) je popsána v chloroplastu, konkrétně tylakoidní membráně (Kleffmann *et al.*, 2004; Myouga *et al.*, 2008). CSD3 je lokalizována v peroxisomech (Kliebenstein *et al.*, 1998) a Mn SUPEROXID DISMUTASA 1 (MSD1) v mitochondriích (Morgan *et al.*, 2008). Právě specifická subcelulární lokalizace vyzdvihuje význam dané SOD pro určitý kompartment. Toto může být demonstrováno vyřazením genů *FSD2* a *FSD3*, které je spojeno s narušením fotosyntézy a zvýšením hladiny ROS. *FSD2* a *FSD3*, přes stejnou subcelulární lokalizaci a shodnou katalytickou aktivitu, nejsou funkčně zaměnitelné (Myouga *et al.*, 2008; Gallie *et Chen*, 2019).

SOD jsou zapojeny do procesů vývoje laterálních kořenů (Morgan *et al.*, 2008; Dvořák *et al.*, 2021a) a na buněčné úrovni přispívají například ke správnému vývoji chloroplastů (Myouga *et al.*, 2008). Jejich exprese se zvyšuje v odpovědi na abiotické faktory. Takovými faktory jsou například zvýšená salinita, sucho, suboptimální teploty (Yadav *et al.*, 2019) anebo expozice ozonu (Ederli *et al.*, 2011). Zvýšení abundance proteinů zapojených do detoxifikace ROS je spojeno s vyšší odolností vůči oxidačnímu stresu (Takáč *et al.*, 2014). ROS mají nejen cytotoxický vliv, ale i podíl na buněčné signalizaci jako signální molekuly (Farnese *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Kimura *et al.*, 2017). Příkladem může být signalizace spojená s klíčením a dormancí semen (El-Maarouf-Bouteau *et Bailly*, 2008). Vzhledem k signalizační povaze ROS, především peroxidu vodíku, jsou tedy i SOD zapojeny do signalizačních drah (Foyer *et Noctor*, 2009; Huang *et al.*, 2016).

Regulace SOD je komplexní problematika, které budou podrobněji věnovány následující kapitoly. Obrázek 2 shrnuje možnosti regulace exprese, posttranslačních modifikací a interakčních partnerů SOD. Tyto poznatky nepochází pouze ze studia rostlin, ale především živočichů, respektive kvasinek.





**Obrázek 2:** Popsané možnosti regulace SOD. Zelené pole ukazuje faktory, které ovlivňují expresi genů kódujících SOD. Posttranslační modifikace a proteiny, které ovlivňují samotné enzymy, jsou uvedeny v modrém poli. miR398 (Abdel-Ghany *et al.*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2009); MYB49 (Zhang *et al.*, 2020a); SPL7 – SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN 7 (Yamasaki *et al.*, 2009; Mermoud *et al.*, 2019); RAP2.6L – RELATED TO APETALA 2 6L (Liu *et al.*, 2012); ZAT – ZINKOVÝ PRST *ARABIDOPSIS THALIANA* (ZINC FINGER OF *ARABIDOPSIS THALIANA*), ZAT10 (Mittler *et al.*, 2006), ZAT12 (Davletova *et al.*, 2005); MAPK, MPK – mitogen aktivovaná protein kinasa, MPK4 (Pitzschke *et al.*, 2009; Gawroński *et al.*, 2014); MKK5 – MITOGEN AKTIVOVANÁ PROTEIN KINASA KINASA 5 (Xing *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2015); MEKK1 – MITOGEN AKTIVOVANÁ PROTEIN KINASA KINASA KINASA 1 (Pitzschke *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2015); ANP – HOMOLOG JADERNĚ A FRAGMOPLAST LOKALIZOVÉ KINASY *ARABIDOPSIS THALIANA* (*ARABIDOPSIS THALIANA* HOMOLOGUES OF NUCLEUS- AND PHRAGMOPLASTLOCALIZED KINASE; Takáč *et al.*, 2014); acetylase (Kaliszewski *et al.*, 2016); acylase (Banks *et al.*, 2017); fosforylase (Tsang *et al.*, 2014; Tsang *et al.*, 2018; Dvořák *et al.*, 2021b); CDK – CYKLIN DEPENDENTNÍ KINASA, CDK1 (Candas *et al.*, 2013), CDK4 (Jin *et al.*, 2015); glutathionylase (Wilcox *et al.*, 2009; Redler *et al.*, 2011); nitrace (Holzmeister *et al.*, 2015); oxidace (Coelho *et al.*, 2014); sumoylase (Fei *et al.*, 2006; Niikura *et al.*, 2014); ubiquitinase (Yonashiro *et al.*, 2009); CCS – COPPER CHAPERONE FOR SUPEROXID DISMUTASE (Rae *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2012); CPN20 – CHAPERONIN 20 (Kuo *et al.*, 2013); DJ-1 (Xu *et al.*, 2010); LSU1 – LOW SULPHUR UPREGULATED 1 (Garcia-Molina *et al.*, 2017).

### 3.2.1 SPL7 jako významný regulátor exprese SOD

Nakládání s mědí je spojeno s regulací exprese genů *MIR397*, *MIR398*, *MIR408* a *MIR857* pomocí SPL7 (Yamasaki *et al.*, 2009). Při nedostatku mědi dochází k expresi *MIR398*, ale i *MIR397*, *MIR408* a *MIR857*. Jejich genové produkty, miRNA, brání expresi *CSD* a dalších neesenciálních genů, které kódují proteiny bohaté na měď (Abdel-Ghany *et al.*, 2008; Addo-Quaye *et al.*, 2008; German *et al.*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2009). Dva na měď bohaté proteiny, *CSD* a plastocyanin, jsou významné pro rostlinný vývoj (Yamasaki *et al.*, 2008). Především plastocyanin je esenciální, proto je upřednostněn před *CSD* při nedostatku mědi (Abdel-Ghany *et al.*, 2008). Vyvolaný pokles aktivity *CSD* je následně zastupován aktivitou SPL7-regulované (Andrés-Colás *et al.*, 2013) *FSD1* (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Regulace genů *CSD1* a *CSD2* se odehrává na transkripční i translační úrovni. Opačný trend je pozorován při nadbytku mědi (Abdel-Ghany *et al.*, 2008; Mermoud *et al.*, 2019). Exprese genu *MIR398*, který reguluje expresi

genů *CSD1* a *CSD2*, je navíc stimulována sacharózou (Dugas *et al.*, 2008) a, spolu s *MIR397*, *MIR408* a *MIR857*, je ovlivněna nesprávnou farnesyací. Farnesylovaný HEAT SHOCK PROTEIN 40, který má vliv na expresi SPL7-regulovaných *MIR* genů (Barghetti *et al.*, 2017), je také spojován s odpovědí vůči teplotnímu stresu (Wu *et al.*, 2019), což by mohlo nastiňovat souvislost s SPL1 a SPL12 (Chao *et al.*, 2017). Distribuce mědi může být ovlivněna i dalšími faktory, jako například aktivitou dalších proteinů, jedním z nich je například P-type ATPasa *Arabidopsis* (Abdel-Ghany *et al.*, 2005), nebo změnou koncentrace dusíku v substrátu. Při nadbytku mědi neměly různé koncentrace dusíku žádný vliv na expresi genu *FSD1*. Pokud byla koncentrace mědi nižší, vyšší koncentrace dusíku měla pozitivní efekt na expresi *FSD1*. Stejný trend platí i na úrovni proteinů. Exprese *CSD* má opačný trend (Mermod *et al.*, 2019). Odpověď rostliny na nedostatek dusíku se liší v závislosti na pletivech a orgánech. Dochází k modifikaci metabolických drah, které, mimo jiné, vedou ke zvýšení exprese genů zapojených do procesů spojených s nakládáním s kovy (Krapp *et al.*, 2011).

SPL7 navíc může interagovat s ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5; Zhang *et al.*, 2014) a tím se zapojit do signalizace světla a mědi (Zhang *et al.*, 2014; Saini *et al.*, 2020). SPL7 a HY5 se simultánně váží do promotoru genu *MIR408*, do GTAC a G-box motivu, a tak stimulují jeho expresi. Konstitutivně exprimovaná *MIR408* může zvrátit defektní průběh ontogeneze mutantních rostlin *spl7*, *hy5* a *spl7/hy5*. HY5 navíc negativně působí na expresi genu *SPL7* (Zhang *et al.*, 2014) a reguluje produkci anthokyanů v odpovědi na UV-B represí genu *DEWAX*, který je negativním regulátorem jejich syntézy. Toto ukazuje na propojení s antioxidační obranou na další úrovni, na úrovni neenzymatické obrany (Saini *et al.*, 2020).

Gen *FSD1* vykazuje navíc cirkadiánní a diurnální regulaci. Exprese genu *SPL7* a SPL7-regulovaného genu *FSD1* není konstantní v průběhu periodického střídání světla a tmy. Maximální hladina transkriptu *SPL7* předchází dosažení maximální úrovně transkriptu *FSD1* v čase. Odlišné části světelného spektra nemají vliv na expresi genu *SPL7*. Exprese genu *FSD1* je negativně ovlivněna jeho modrou složkou (Perea-García *et al.*, 2016).

### 3.2.2 Další možnosti regulace exprese *SOD*

V reakci na záření UV-B byla v epidermálních buňkách apikálního meristému prýtu pozorována zvýšená exprese genů *CSD2* a COPPER CHAPERONE FOR SUPEROXID DISMUTASE (*CCS*), naopak snížení exprese bylo pozorováno pro gen *FSD1* (Saini *et al.*, 2020). Exprese genu *CCS* je významná díky schopnosti *CCS* regulovat aktivitu Cu/ZnSOD (Leitch *et al.*, 2012). Nicméně, geny *CSD1*, *CSD2* a *CCS* jsou také pozitivně ovlivněny nadexpresí TF ZINKOVÝ PRST ARABIDOPSIS THALIANA 12 (*ZAT12*; ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 12). Exprese genu *FSD1* je však opět snížena (Davletova *et al.*, 2005). Exprese genu

ZAT12 je zvýšena jako odpověď na peroxid vodíku (Rizhsky *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2016), zvýšenou teplotu, poranění pletiva (Rizhsky *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005) a methyl viologen (Rizhsky *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2017). ZAT12 je také spojen s negativním vlivem na vstřebávání železa, které je kofaktorem FeSOD (Le *et al.*, 2016). Studium toho TF tedy opět ukazuje význam TF, které mohou regulovat antioxidační obranu.

Nejen ZAT12 je zapojen do regulace *SOD*. Nadexprese genu *ZAT10* je spojena se zvýšením exprese genu *FSD1* a dalších genů spojených s antioxidační obranou. Zvýšená abundance antioxidačních enzymů následně posiluje odolnost rostlin vůči salinitě, zvýšené teplotě a osmotickému stresu (Mittler *et al.*, 2006). Navíc, nadexprese TF *RELATED TO APETALA 2 6L* vede ke zvýšení exprese genu *FSD1* a vyšší odolnosti rostlin k podmáčení. Mutace tohoto genu má opačný efekt (Liu *et al.*, 2012). Exprese genu *CSD2* je snížena u rostlin exprimující transkripční represor genu *MYB49*, především v podmínkách zvýšené salinity (Zhang *et al.*, 2020a).

MAPK jsou zapojeny do signálních drah, které regulují nejrůznější vývojové procesy. Regulují, mimo jiné, i *SOD*. Snížení abundance transkriptu *FSD1*, *FSD2* a *FSD3* v mutantech *mpk4* ukazuje na zapojení MITOGEN AKTIVOVANÉ PROTEIN KINASY 4 (MPK4) do regulace jejich exprese. Opačný trend byl pozorován pro gen *CSD2*. Změny se projeví i na úrovni jejich enzymatické aktivity, celková aktivita *SOD* však byla u *mpk4* mutantních rostlin vyšší (Gawroński *et al.*, 2014). U mutantů *mpk4* a *mek1* bylo navíc popsáno zvýšení exprese genu *CSD1*. MITOGEN AKTIVOVANÁ PROTEIN KINASA KINASA KINASA 1 (MEKK1), která může aktivovat MITOGEN AKTIVOVANOU PROTEIN KINASU KINASU 1 (MKK1) a MKK2, a MPK4 negativně regulují expresi genu *CSD1* (Pitzschke *et al.*, 2009). Zapojení MKK5 a MEKK1 do jedné dráhy, která reguluje expresi *SOD*, podporuje i zvýšení exprese genů *FSD2* a *FSD3* v odpovědi na zvýšenou salinitu. K této odpovědi však nedochází v mutantních rostlinách *mkk5* a *mek1* (Xing *et al.*, 2015). MKK5 navíc stimuluje expresi genů *CSD1* a *CSD2* při expozici nadměrnému ozáření (Xing *et al.*, 2013). Při vyřazení dvou genů HOMOLOG JADERNĚ A FRAGMOPLAST LOKALIZOVÉ KINASY ARABIDOPSIS THALIANA (*ANP2*; ARABIDOPSIS THALIANA HOMOLOGUES OF NUCLEUS- AND PHRAGMOPLAST LOCALIZED KINASE 2) a *ANP3* je pozorována zvýšená abundance *FSD1*, *MSD1* a CHAPERONIN 20 (*CPN20*; Takáč *et al.*, 2014), který je regulátorem aktivity *FSD1* (Kuo *et al.*, 2013). Exprese genu *MSD1* je navíc zvýšena při vývoji megagametofytu, kde *MSD1* reguluje homeostázi ROS (Martin *et al.*, 2013).

### 3.2.3 Posttranslační modifikace a regulace aktivity SOD

Jeden z nejvýznamnějších kroků regulace aktivity SOD je inserce katalyticky aktivního kovu, konverze apoenzymu na jeho enzymaticky aktivní formu (O'Halloran *et al.*, 2000; Culotta *et al.*, 2006). Konkrétním proteinem zapojeným do aktivace Cu/ZnSOD je CCS (Rae *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2012). Pozitivní regulace CCS-závislé aktivace je u Cu/ZnSOD *Saccharomyces cerevisiae* spojena s fosforylací serinu v pozici 38, ke které dochází při hypoxii anebo v podmínkách nedostatku mědi (Leitch *et al.*, 2012). Její další fosforylace (serin v pozici 60 a 99) po expozici peroxidu vodíku navíc stimuluje translokaci z cytoplasmy do jádra, kde se podílí na regulaci exprese genů spojených s resistencí proti oxidačnímu stresu a s opravami DNA (Tsang *et al.*, 2014). Fosforylace této SOD (serin v pozici 39) a lidské Cu/ZnSOD (threonin v pozici 40) reguluje vstup substrátu do aktivního místa, což působí snížení jejich aktivity (Tsang *et al.*, 2018). I cyklin dependentní kinasy se podílí na regulaci SOD. CYKLIN DEPENDENTNÍ KINASA 4 fosforyluje (serin v pozici 106) savčí mitochondriálně lokalizovanou MnSOD a zvyšuje její enzymatickou aktivitu (Jin *et al.*, 2015). Další fosforylace MnSOD prostřednictvím CYKLIN DEPENDENTNÍ KINASY 1 zvyšuje nejen její aktivitu, ale i stabilitu (Candas *et al.*, 2013). Snížení aktivity MnSOD fosforylací je popsáno u *Listeria monocytogenes* (Archambaud *et al.*, 2006). Výše popsaný význam fosforylace pro SOD tedy vyzdvihuje úlohu kinas a fosfatů v regulaci jejich aktivity. Experimentální údaje o modulaci celkové aktivity SOD, která je zvýšena v přítomnosti NaCl v *MKK5* nadexpresních rostlinách, naopak snížena v mutantech *mkk5*, ukazuje i na její propojení s MAPK (Xing *et al.*, 2015). U mutantních rostlin *anp2/anp3* bylo navíc pozorováno zvýšení aktivity FSD1 a MSD1 (Takáč *et al.*, 2014). Propojení SOD a MAPK bylo již výše nastíněno. Nedávná publikace shrnuje experimentálně získané údaje o fosforylaci SOD *Arabidopsis*, konkrétně MSD1, CSD2, CSD3 a FSD2 (Dvořák *et al.*, 2021b).

Interakce spojená s fosforylací však nemusí být jediná. Aktivita FSD, především FSD1, je pozitivně ovlivněna jejich interakcí s co-chaperoninem CPN20 (Kuo *et al.*, 2013). Bylo prokázáno, že enzymatická aktivita FSD2 je navíc stimulována fyzickou interakcí s proteinem LOW SULPHUR UPREGULATED 1 (Garcia-Molina *et al.*, 2017). Také AtDJ-1a pozitivně stimuluje aktivitu CSD1, tak jako homologní DJ-1/PARKINSON DISEASE PROTEIN 7 podobně reguluje aktivitu Cu/ZnSOD (Xu *et al.*, 2010).

Posttranslační modifikace SOD nejsou omezeny jen na fosforylaci, ale byly popsány i další modifikace (Yamakura *et al.*, 2010; Banks *et al.*, 2019). U *Arabidopsis thaliana* působí nitrace, která byla vyvolána peroxinitrem, inhibicí aktivity MSD1. Částečná inhibice aktivity byla pozorována i pro CSD3 a FSD3 (Holzmeister *et al.*, 2015). Inaktivace nitrací byla popsána i u lidské MnSOD (MacMillan-Crow *et al.*, 1996; Yamakura *et al.*, 1998). Další modifikace, které zejména souvisí s regulací kvarterní struktury SOD, byly popsány především u SOD nepocházejících z rostlin. Takovou modifikací je například glutathionylace Cu/ZnSOD

(Wilcox *et al.*, 2009; Redler *et al.*, 2011), oxidace (Coelho *et al.*, 2014), acetylace (Kaliszewski *et al.*, 2016) nebo acylace (Banks *et al.*, 2017). Lidská Cu/ZnSOD spojená s amyloidotropickou laterální sklerózou může být také sumoylována (Fei *et al.*, 2006; Niikura *et al.*, 2014) anebo ubiquitinylována (Yonashiro *et al.*, 2009).

Jak bylo výše v tomto textu předesláno, bylo u rostlin identifikováno relativně málo posttranslačních modifikací SOD. Právě na základě jejich výskytu u živočichů se dá ale usuzovat na jejich možnou přítomnost a biologický význam u rostlin. Laboratorní experimenty, s cílem ověřit možnost posttranslační modifikace, mohou být předcházeny bioinformatickými analýzami za účelem odhalení potenciální možnosti modifikace. Takto může být predikována například fosforylace pomocí PhosPhAt (Zulawski *et al.*, 2013) a GPS (Wang *et al.*, 2020) anebo nitrosylace pomocí GPS-SNO (Xue *et al.*, 2010), iSNO-PseAAC (Xu *et al.*, 2013) nebo dbSNO (Chen *et al.*, 2015).

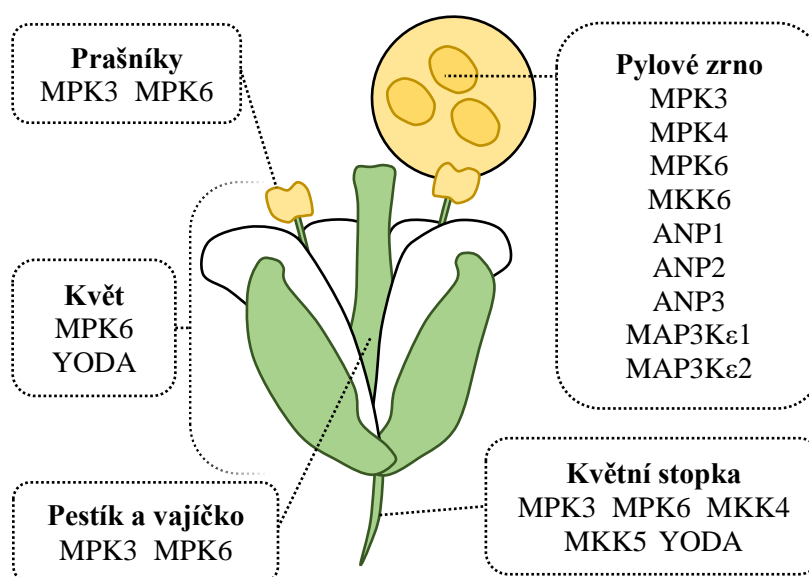
### 3.3 Mitogen aktivované protein kinasy

MAPK jsou součástí hierarchicky uspořádaných signálních kaskád, které jsou zapojeny do odpovědi na environmentální stimuly a vývojové procesy (Liu *et al.*, 2017; Bigeard *et al.*, 2018). MAPK (také označovány jako MPK) jsou aktivovány MAPK kinasami (MAP2K, v literatuře také jako MEK), které jsou aktivovány MAP2K kinasami (MAP3K, také uváděny jako MEKK), a tak tvoří signální kaskády (Komis *et al.*, 2018). MAPK kaskády jsou aktivovány receptorovými komplexy (He *et al.*, 2018b; Jose *et al.*, 2020). Konkrétním příkladem může být aktivace MAP3K YODA pomocí ERECTA v procesech regulace architektury květu (Meng *et al.*, 2012). MAPK mohou být aktivovány také cytoplasmatickými receptory podobnými kinasami (RLCK; receptor-like cytoplasmic kinase; Bi *et al.*, 2018) nebo prostřednictvím jiných protein kinas (Wang *et al.*, 2007a). Signální dráhy jsou propojené a jednotlivé MAPK často funkčně redundantní (Šamajová *et al.*, 2013). Příkladem takovéto funkční zaměnitelnosti může být MKK4 a MKK5 ve vývoji průduchů (Wang *et al.*, 2007b).

Zmíněná aktivace je spojena s jednou z nejčastějších posttranslačních modifikací – fosforylací. Fosforylace substrátu MAPK může modulovat jeho stabilitu (Zhao *et al.*, 2017), aktivitu (Lampard *et al.*, 2008) nebo subcelulární lokalizaci (Djamei *et al.*, 2007). Právě fosforylace, ale i další posttranslační modifikace, mohou znamenat významný faktor pro vývoj rostliny, který umožňuje rychlou reakci na změnu podmínek.

Na MAPK signalizaci se neméně podílí i fosfatasy, které jsou negativními regulátory těchto signálních drah. Fosfatasy ovlivňují nejen aktivitu (Gupta *et al.*, 1998), ale například i subcelulární lokalizaci proteinů (Zaïdi *et al.*, 2010).

Specificita jednotlivých drah je spojována s využitím tzv. scaffold proteinů, které integrují prvky signálních kaskád (Good *et al.*, 2011). To bylo demonstrováno pro Ste5 *Saccharomyces cerevisiae* (Malleshaiah *et al.*, 2010; Zalatan *et al.*, 2012) anebo RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE 1 u *Arabidopsis thaliana* (Cheng *et al.*, 2015). Významnou úlohu hraje také specifická subcelulární lokalizace komponent signální dráhy (Šamajová *et al.*, 2013). Nejen specifická lokalizace, ale i její samotná změna je významný faktor. MAPK se vyskytují v cytosolu, ale mohou i translokovat do jádra (Bigeard *et Hirt*, 2018), příkladem může být translokace MPK3 a MPK6 po vystavení rostliny ozonu (Ahlfors *et al.*, 2004).



**Obrázek 3:** Přehled MAPK zapojených do generativní fáze ontogeneze *Arabidopsis thaliana*. Prašníky: MPK3 (Zhao *et al.*, 2017), MPK6 (Bush *et Kryan*, 2007; Hord *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2017); Květ: MPK6 (Bush *et Kryan*, 2007), YODA (Lukowitz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007b); Pestík a vajíčko: MPK3 (Hord *et al.*, 2008) a MPK6 (Hord *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008); Pylové zrno: MPK3 (Guan *et al.*, 2014b), MPK4 (Zeng *et al.*, 2011), MPK6 (Bush *et Kryan*, 2007; Hord *et al.*, 2008; Guan *et al.*, 2014b; Hempel *et al.*, 2017), MKK6 (Soyano *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2011), ANP1, ANP2, ANP3 (Kryan *et al.*, 2002), MAP3K $\epsilon$ 1, MAP3K $\epsilon$ 2 (Chaiwongsar *et al.*, 2006); Květní stopka: MPK3, MPK6 (Meng *et al.*, 2012), MKK4, MKK5 (Meng *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017), YODA (Meng *et al.*, 2012). MPK – MITOGEN AKTIVOVANÁ PROTEIN KINASA; MKK – MITOGEN AKTIVOVANÁ PROTEIN KINASA KINASA; ANP – HOMOLOG JADERNĚ A FRAGMOPLAST LOKALIZOVÉ KINASY *ARABIDOPSIS THALIANA* (*ARABIDOPSIS THALIANA* HOMOLOGUES OF NUCLEUS- AND PHRAGMOPLASTLOCALIZED KINASE).

MAPK jsou zahrnuty do různých fyziologických procesů, jako je buněčné dělení (Smékalová *et al.*, 2014), růst a vývoj (Lu *et al.*, 2020), odpověď na patogeny (Menzel *et al.*, 2019), poranění pletiva (Sözen *et al.*, 2020) a signalizace zmíněných abiotických činitelů, jako je sucho (Li *et al.*, 2017), salinita (Teige *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2020) nebo chlad (Teige *et al.*, 2004). Analýza proteomů, respektive fosfoproteomů, pylových zrn *Zea mays* (Chao *et al.*, 2016) a *Arabidopsis thaliana* (Mayank *et al.*, 2012) poukazuje na význam MAPK také pro

rozmnožování. MAPK mohou být významné nejen pro vývoj pylového zrna, ale například i pro opylování rostlin *Medicago sativa* (Chen *et al.*, 2016). MAPK zapojené do generativní fáze ontogeneze jsou shrnuty v Obrázku 3 a jsou diskutovány níže.

### 3.3.1 Význam MAPK pro tvorbu květu

Nejen výše uvedené procesy jsou spjaty s MAPK signalizací. Literatura popisuje i řadu příkladů zapojení MAPK do generativní fáze vývoje *Arabidopsis thaliana*. Silný signál žlutého fluorescenčního proteinu (YFP; yellow fluorescent protein), který byl připojen k MPK6, byl pozorován v květních pletivech. Geneticky modifikovaná forma MPK6, MPK6AEF, která vykazuje alternaci v aminokyselinové sekvenci zapříčiňující nemožnost fosforylace nadřazenými kinasami, je spjata s abnormálním vývojem kalichu. Konkrétní pozorované znaky jsou redukce velikosti květu a jeho dřívější otevírání. Tyto znaky jsou připisovány snížené schopnosti prodlužování buněk epidermy kalichu (Bush *et Kryan*, 2007). Absence MPK6 vyvolává shlukované květenství, které je způsobeno tvorbou kratších květních stopek (Meng *et al.*, 2012).

Podobné fenotypové projevy vykazují i další MAPK deficientní rostliny. Příkladem těchto rostlin mohou být mutantní rostliny *mpk3<sup>+/-</sup>/mpk6<sup>-/-</sup>*, rostliny se sníženou expresí *MKK4* a *MKK5* (Meng *et al.*, 2012), mutantní *mkk4/mkk5* (Zhang *et al.*, 2017) anebo *yoda*, mutantní rostliny v genu pro jednu z MAP3K (Meng *et al.*, 2012).

Stejně fenotypové projevy vykazují i rostliny s vyřazeným genem *ERECTA*. Nejen MAPK jako takové, ale i jejich aktivátory jsou tedy důležité pro tvorbu květu (Meng *et al.*, 2012).

Konstitutivní aktivita *MKK4* a *MKK5* působí potlačení shlukování květů, které bylo pozorováno u mutantů *erecta*. Bylo prokázáno, že receptor *ERECTA* je nadřazený signalizační dráze *YODA-MKK4* a *MKK5-MPK3* a *MPK6* a reguluje růst květních stopek (Meng *et al.*, 2012). Rostliny s mutací v genu *YODA* produkují květy, které jsou malé a sterilní (Lukowitz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007b).

### 3.3.2 Regulace tvorby tyčinek a pylových zrn pomocí MAPK

Regulace MAPK není spjata jen s tvorbou květu jako takového, ale i s přímým vlivem na fertilitu rostlin. Příkladem mohou být *MPK3* a *MPK6* (Hord *et al.*, 2008; Guan *et al.*, 2014a), které pozitivně regulují správný vývoj prašníků (Hord *et al.*, 2008). Snížení fertility bylo pozorováno především u mutantních rostlin *mpk6*. Tyto rostliny vykazují vývoj menších prašníků a narušenou produkci pylových zrn. Obsažená pylová zrna jsou větší a s prašníky jsou těsněji asociována (Bush *et Kryan*, 2007; Hord *et al.*, 2008). Narušení genu *DWARF AND SMALL GRAIN 1*, který kóduje *MAPK6* rýže, vede také ke zmenšení prašníků (Liu *et al.*, 2015). Tato

skutečnost ukazuje na konzervovanou funkci MAPK a jejich zapojení do shodných vývojových pochodů. I MPK3 je zapojena do podobných procesů. Zmíněné MAPK fosforylují TF SPOROCTELESS, čímž zvyšují jeho stabilitu, tak přispívají ke správné diferenciaci archesporálních buněk v ranných fázích vývoje prašníků (Zhao *et al.*, 2017).

MKK6 fosforyluje MPK4 a zvyšuje její aktivitu (Kosetsu *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011). Rostliny mutantů *mpk4* vykazují sníženou samčí fertilitu. Mikrosporální mateřská buňka u mutantů *mpk4* není schopna vytvořit normální intersporální kalosovou stěnu v průběhu meiosis, což způsobuje narušení dělení buněk a vznik vícejaderných mikrospor. Vzniklá pylová zrna jsou větší, je snížen jejich celkový počet a jejich viabilita (Zeng *et al.*, 2011). Podobné projevy při vývoji pylových zrn vykazují také mutantní rostliny *mkk6* (Soyano *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2011). Regulace mikrosporogeneze je zprostředkována navrženou signální dráhou ANP-MKK6-MPK4 (Takahashi *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011). Vyřazení genů *ANP1*, *ANP2* a *ANP3* navíc vede k tvorbě nevitálních gamet (Krysan *et al.*, 2002).

Deficience funkčně redundantních MAP3K $\epsilon$ 1 a MAP3K $\epsilon$ 2, které jsou řazeny mezi MAP3K, způsobuje úplné snížení vitality pylových zrn. Snížení vitality pylových zrn je spojeno s abnormálním vývojem plasmatické membrány, který následuje po mitose I. MAP3K $\epsilon$ 1 a MAP3K $\epsilon$ 2 jsou navíc zapojeny do negativní regulace tvorby intiny (Chaiwongsar *et al.*, 2006).

*NTF4* (Wilson *et al.*, 1997; Voronin *et al.*, 2001) a *SALICYLOVOU KYSELINOU INDUKOVANÁ PROTEIN KINASA (SIPK)*, geny kódující MAPK pocházející z *Nicotiana tabacum* (Voronin *et al.*, 2004), jsou exprimovány v pylovém zrnu. Hydratace pylového zrna vede ke zvýšení aktivity NTF4 (Wilson *et al.*, 1997; Voronin *et al.*, 2004) a SIPK. Aktivace NTF4 je zprostředkována MEK2 a umožňuje klíčení pylového zrna (Voronin *et al.*, 2004).

MPK3 a MPK6 jsou navíc zapojeny do regulace vedení pylové láčky po opylování (Guan *et al.*, 2014b; Hempel *et al.*, 2017). MPK6 a její homolog SIPK inhibují fosforylací PHOSPHATIDYLINOSITOL 4-PHOSPHATE 5-KINASU 6, čímž regulují apikální růst pylové láčky (Ischebeck *et al.*, 2008; Hempel *et al.*, 2017). Pro opylování hraje roli také MAPK p56, která pochází z *Papaver rhoeas*. p56 se podílí na stimulaci programované buněčné smrti indukované nekompatibilitou pylového zrna. Tímto způsobem přispívá k zabránění samosprašení (Rudd *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007).

### 3.3.3 MAPK a samičí fertilita

Snížená abundance MPK3 a MPK6 mutantních rostlin *mpk3<sup>+/-</sup>/mpk6<sup>-/-</sup>* ústí v tvorbu kratšího pestíku (Hord *et al.*, 2008). Navíc byla pozorovaná haploinsuficience *MPK3* u *mpk6* mutantních rostlin, která je spjata s narušením tvorby vajíčka vlivem aberantního vývoje integumentu díky narušení proliferace buněk. Uvedený vývojový defekt zapříčiňuje samičí



sterilitu. Mutantní rostliny *mpk3*, které nesou jednu nefunkční alelu genu *MPK6*, jsou naopak haplosuficientní a rostliny nevykazují ztrátu fertility (Wang *et al.*, 2008).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

- *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101 (Lifeasible; ACC-100); GV3101 *p19* (*p19*; velkoryse poskytnuto Ing. Pavolem Vadovičem, Ph.D.)
- *Arabidopsis thaliana*: ekotyp Columbia (Col0; rostliny divokého typu); mutantní linie *spl1.1* (SALK\_134584), *spl1.2* (SALK\_058642; Zeiner, 2019), *mpk3.1* (SALK\_151594; Wang *et al.*, 2007b), *mpk6.2* (SALK\_073907; Smékalová *et al.*, 2014)
- *eGFP*-pDONR 221 (vektor nesoucí *eGFP* bez translačního stop; pEN-L1-F-L2; VIB, Gent, Belgie; Karimi *et al.*, 2007)
- *Escherichia coli*, One Shot TOP10 (Invitrogen; C404010)
- *Nicotiana benthamiana*
- *p35S*-pDONR P4-P1R (pEN-L4-2-R1; VIB, Gent, Belgie; Karimi *et al.*, 2007)
- pB7m34GW (VIB, Gent, Belgie; Karimi *et al.*, 2005)
- pBIFC2 (YFPn-GTW), pBIFC3 (YFPc-GTW; Azimzadeh *et al.*, 2008)
- pGADT7 AD (Clontech Laboratories; 630442)
- pGADT7 AD-*SPL1*, pGBKT7-*SPL1* (velkoryse poskytnuto Mgr. Petrem Dvořákem)
- pGADT7-T (T; Takara; 630489)
- pGBKT7 (Clontech Laboratories; 630443)
- pGBKT7-53 (p53; Takara; 630489)
- Proteinový extrakt rostlin *csd1.1* (velkoryse poskytnuto Mgr. Petrem Dvořákem)
- *Saccharomyces cerevisiae*, Y2HGold (Takara; 630498)

### 4.2 Chemikálie

- 1-bromo-3-chloropropan (BCP; Sigma Aldrich; B9673)
- 2-merkaptóethanol (Sigma Aldrich; M6250)
- 3-amino-1,2,4-triazol (3AT; Sigma Aldrich; A8056)
- 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina (HEPES; Sigma Aldrich; H3375)
- Acetosyringon (Sigma Aldrich; D134406)
- Adenin (Sigma Aldrich; A2786)
- Agarosa (Sigma Aldrich; A2576)
- Akrylamid/N,N'-methylenbisakrylamid, 40%, 37,5:1 (Bio-Rad; 1610148)
- Anti Cu/ZnSOD, primární protilátka (rabbit; Agrisera; AS06 170)
- Anti FeSOD, primární protilátka (rabbit; Agrisera; AS06 125)

- Anti Rabbit, sekundární protilátka (Thermo-Fischer; 31460)
- cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete; Roche; 11697498001)
- D-glukosa (Sigma Aldrich; G8270)
- Deoxyribonukleotidy (dNTP; 10 mmol·l<sup>-1</sup>)
- Dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na<sub>2</sub>EDTA; Sigma Aldrich; E5134)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Sigma Aldrich; S8282)
- Dithiothreitol (DTT; Sigma Aldrich; D0632)
- DNA Gel Loading Dye, 6X (Thermo Scientific; R0611)
- DNasa I (Invitrogen; 18047019)
- Dodecylsírán sodný (SDS; Sigma Aldrich; L3771)
- Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové (MES; Duchefa Biochemie; M1503)
- Dropout (Clontech laboratories; 630428)
- EcoRV (Thermo Scientific; ER0301)
- EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová; Sigma Aldrich; E5134)
- EDTA, 0,5 mol·l<sup>-1</sup> (Aplichem; A4892)
- Ethanol p.a., 99,8% (v/v) (PENTA; 70390-11001)
- Ethylen glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA; Sigma Aldrich; E3889)
- Fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1; Sigma Aldrich; 77617)
- Fluorid sodný (NaF; Sigma Aldrich; 201154)
- Gellan Gum (Alfa Aesar; Y28C036)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific; SM1331)
- Glycerol (Sigma Aldrich; G5516)
- Glycin (Sigma Aldrich; G8898)
- Histidin (Sigma Aldrich; H5659)
- Hovězí sérový albumin (BSA, Bovine serum albumin; Sigma Aldrich; A2153)
- Hydroxid draselný (KOH; Sigma Aldrich; 60130)
- Hydroxid sodný (NaOH; Sigma Aldrich; S8045)
- Chlorid draselný (KCl; Sigma Aldrich; P9541)
- Chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>; Sigma Aldrich; M8266)
- Chlorid nitrotetrazoliové modři (NBT; Sigma Aldrich; N6876)
- Chlorid sodný (NaCl; Sigma Aldrich; 31434)
- ImmoMix, 2X (Bioline; BIO-25020)

- Isopropanol (Sigma Aldrich; 278475)
- Kanamycin (Duchefa Biochemie; K0126.0025)
- Kvasniční extrakt (Sigma Aldrich; Y1625)
- Kyselina abscisová (ABA; Duchefa Biochemie; A0941)
- Kyselina chlorovodíková (HCl; Sigma Aldrich; 30721)
- Kyselina L-askorbová (Sigma Aldrich; A92902)
- Kyselina octová (Sigma Aldrich; 45726)
- Laemliho pufr, 4X (Bio-Rad; 1610747)
- LB Broth (Miller; Sigma Aldrich; L3522)
- LB Broth s agarem (Miller; Sigma Aldrich; L3147)
- Lithium acetát (LiAc; Sigma Aldrich; L4158)
- Methanol (Sigma Aldrich; 34860)
- Midori Green Advance DNA/RNA stain (Nippon Genetics; MG04)
- Murashige a Skoog (MS) médium, basal salt mixture (Duchefa Biochemie; M0221.0050)
- *Nde*I (Thermo Scientific; ER0581)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED; Sigma Aldrich; T9281)
- o-Dianisidin (DIA; Sigma Aldrich; D9143)
- Octan sodný (NaAc; Sigma Aldrich; S2889-1)
- Odtučněné sušené mléko, Blotting Grade Blocker (Bio-Rad; 1706404)
- P1, pufr (QIAGEN; 19051)
- P2, pufr (QIAGEN; 19052)
- P3, pufr (QIAGEN; 19053)
- Pepton (Sigma Aldrich; 91249)
- Peroxid vodíku (Sigma Aldrich; 216763)
- Peroxodisíran amonný (APS; Sigma Aldrich; A3678)
- Phosphinothricin (PPT; Duchefa Biochemie; P0159)
- PhosSTOP (Roche; 4906845001)
- Polyethylenglykol (PEG) 3350 (Sigma Aldrich; 88276)
- Ponceau S (Sigma Aldrich; 78376)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad; 1610374)
- Primery, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (sekvence uvedeny při specifickém použití; Eurofins Genomics; Německo)
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 5X (Bradfordovo činidlo; Bio-Rad; 5000006)
- *Pvu*II (Thermo Scientific; ER0631)
- Reakční pufr s  $\text{MgCl}_2$  pro DNasu I, 10X (Thermo Scientific; B43)

- Riboflavin (Applichem; A0968,0010)
- Rifampicin (Duchefa; R0146.0005)
- RNasa A (Fermentas; EN0531)
- RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega; N2111)
- ROX, 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Invitrogen; 12223012)
- Sacharosa (Sigma Aldrich; S8501)
- Sheared salmon sperm DNA, 10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Invitrogen; AM9680)
- Silwet STAR (AgroBio OPAVA; 07014)
- SOC médium (Invitrogen; 15544034)
- Sodná sůl N-Lauroylsarcosinu (AppliChem; A7402)
- Spektinomycin (Duchefa Biochemie; 007179.06)
- SYBR Green (Invitrogen; S7585)
- Tris (Roche; 10708976001)
- Tris Acetát EDTA (TAE), 10X (Sigma Aldrich; 574797)
- TRIzol Reagent (Invitrogen; 15596026)
- Tween 20 (Sigma Aldrich; P1379)
- UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda (Invitrogen; 10977015)
- YEB (PhytoTechnology Laboratories; Y8575)
- YNB (Sigma Aldrich; Y0626)

### 4.3 Soupravy

- Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad; 1705061)
- iProof High-Fidelity PCR Kit (Bio-Rad; 1725330)
- M-MLV reverzní transkriptasa (Invitrogen; M1705)
- MultiSite Gateway Three-Fragment Vector Construction Kit (Invitrogen; 12537-023)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (MACHEREY-NAGEL; 740609.250)
- Phire Green Hot Start II DNA Polymerasa (Thermo Scientific; F124S)
- Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific; F130WH)
- Polyvinyliden difluoridová (PVDF) membrána (GE Healthcare, GE10600023)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN; 27106)
- TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 12% (Bio-Rad; 1610185)

#### 4.4 Roztoky a jejich příprava

- 1% (w/v) agarosový gel (100 ml): 100 ml TAE, 1X; 1 g agarosa; a 5  $\mu$ l Midori Green Advance DNA/RNA stain
- 1/2MS médium (1000 ml): 10 g sacharosa; 1 g MES; 2,15 g MS médium, basal salt mixture; 10 g Gellan Gum; pH 5,8 (KOH); a doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou. Sterilizace autoklávováním
- 3AT, 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ : sterilizováno filtrací
- ABA, 5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ : rozpuštěno v 96% (v/v) ethanolu
- ABA, 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ : rozpuštěno v 96% (v/v) ethanolu
- Adenin, 0,2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ : sterilizováno filtrací
- APS, 10% (w/v)
- D-glukosa, 0,2  $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ : sterilizováno filtrací
- Dropout, 6  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ : sterilizováno filtrací
- DTT, 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
- E pufr (50 ml): 2,099 mg NaF; 0,595 g HEPES; pH 7,8 (NaOH); 0,215 g NaCl; 19 mg EGTA; 4,76 mg  $\text{MgCl}_2$ ; 5 ml glycerol; a doplnit do objemu 50 ml deionizovanou vodou. 5 tablet PhosSTOP; 5 tablet cOplete; a 50  $\mu$ l DTT, 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
- EDTA, 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
- Elektroforetický pufr (1000 ml): 3 g Tris; 14,4 g glycin; 1 g SDS; a doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou
- Extrakční pufr (EP) pro izolaci genomické DNA (gDNA; 250 ml): 2,5 g sodná sůl N-Lauroylsarcosinu; 3,0285 g Tris; pH 8 (HCl); 0,9306 g EDTA; 1,461 g NaCl; pH 8 (NaOH); a doplnit do objemu 250 ml deionizovanou vodou
- Histidin, 0,2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ : sterilizováno filtrací
- Kokultivační médium (100 ml): 195,24 mg MES; pH 5,6; 95,21 mg  $\text{MgCl}_2$ ; Acetosyringon (výsledná koncentrace 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); a doplnit do objemu 100 ml deionizovanou vodou
- LB médium, pevné (1000 ml): 40 g LB Broth s agarem (Miller); a doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou. Sterilizace autoklávováním
- LB médium, tekuté (1000 ml): 25 g LB Broth (Miller); pH 7,2 (KOH); a doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou. Sterilizace autoklávováním
- LiAc, 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
- LiAc, 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
- Na acetátový pufr (50 ml): 205,1 mg NaAc; pH 5 (kyselina octová); a doplnit do objemu 50 ml deionizovanou vodou

- Na fosfátový pufr (200 ml): 1,1998 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,8 (NaOH); 35,2 mg kyselina L-askorbová; 20 ml glycerol; a doplnit do objemu 200 ml deionizovanou vodou
- NaAc,  $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (10 ml): 2,4609 g NaAc; pH 5,2 (kyselina octová); a doplnit do objemu 10 ml deionizovanou vodou
- PEG 3350, 50% (w/v)
- Ponceau S, roztok (500 ml): 0,5 g Ponceau S; 25 ml kyselina octová; a doplnit do objemu 500 ml deionizovanou vodou
- Premix pro SYBR Green (2000  $\mu\text{l}$ ): 1000  $\mu\text{l}$  ImmoMix, 2X; 50  $\mu\text{l}$  ROX,  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; 3,2  $\mu\text{l}$  SYBR Green, 100X; a 946,8  $\mu\text{l}$  UltraPure DNase/RNase-Free destilované vody
- Pufr pro otevírání průduchů (500 ml): 0,9762 g MES; 1,1183 g KCl; pH 6,15 (KOH); a doplnit do objemu 500 ml deionizovanou vodou
- Rozdělovací gel, 10% (10 ml): 2,5 ml akrylamid/N,N'-methylenbisakrylamid; 2,5 ml Tris-Cl,  $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 8,8; 4,95 ml deionizovaná voda; 5  $\mu\text{l}$  TEMED; a 50  $\mu\text{l}$  APS, 10% (w/v)
- Rozdělovací gel, 12% (10 ml): 3 ml akrylamid/N,N'-methylenbisakrylamid; 2,5 ml Tris-Cl,  $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 8,8; 4,45 ml deionizovaná voda; 5  $\mu\text{l}$  TEMED; a 50  $\mu\text{l}$  APS, 10% (w/v)
- SD2 (200 ml): 1,34 g YNB; 2 g agarosa; 120 ml deionizované vody. Sterilizace autoklávováním. 20 ml dropout,  $6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; 20 ml D-glukosa,  $0,2 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 20 ml histidin,  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; a 20 ml adenin,  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
- SD3 (100 ml): 0,67 g YNB; 1 g agarosa; 70 ml deionizované vody. Sterilizace autoklávováním. 10 ml dropout,  $6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; 10 ml D-glukosa,  $0,2 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; a 10 ml adenin,  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
- SD3+AT (100 ml): 0,67 g YNB; 1 g agarosa; 65 ml deionizované vody. Sterilizace autoklávováním. 10 ml dropout,  $6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; 10 ml D-glukosa,  $0,2 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 10 ml adenin,  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; a 5 ml 3AT,  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
- SD4 (100 ml): 0,67 g YNB; 1 g agarosa; 80 ml deionizované vody. Sterilizace autoklávováním. 10 ml dropout,  $6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; a 10 ml D-glukosa,  $0,2 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$
- TAE, 1X
- Tris buffer saline s přidavkem Tween 20 (TBS-T; 1000 ml): 2,42 g Tris; 8,78 g NaCl; pH 7,4 (HCl); doplnit do objemu 999 ml deionizovanou vodou; a 1 ml Tween 20
- Tris-Cl,  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 6,8 (100 ml): 6 g Tris; pH 6,8 (HCl); a doplnit do objemu 100 ml deionizovanou vodou
- Tris-Cl,  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (100 ml): 12,11 g Tris; pH 8 (HCl); a doplnit do objemu 100 ml deionizovanou vodou
- Tris-Cl,  $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 8,8 (300 ml): 54,45 g Tris; pH 8,8 (HCl); a doplnit do objemu 300 ml deionizovanou vodou

- Tris-EDTA (TE) pufr (10 ml): 0,1 ml Tris-Cl, 1 mol·l<sup>-1</sup>; 0,02 ml EDTA, 0,5 mol·l<sup>-1</sup>; doplnit do objemu 10 ml deionizovanou vodou; a 10 µl RNasa A
- Tris-glycinový pufr (1000 ml): 3 g Tris; 14,4 g glycin; a doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou
- YEB médium (1000 ml): 16,3 g·l<sup>-1</sup> YEB; pH 7,2 (KOH); a doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou. Sterilizace autoklávováním
- YPD (100 ml): 1 g kvasniční extrakt; 2 g pepton; 2 g D-glukosa; a doplnit do objemu 100 ml deionizovanou vodou
- Zaostrňovací gel, 4% (5 ml): 0,5 ml akrylamid/N,N'-metylenbisakrylamid; 1,26 ml Tris-Cl, 0,5 mol·l<sup>-1</sup>, pH 6,8; 3,23 ml deionizovaná voda; 5 µl TEMED; a 25 µl APS, 10% (w/v)

#### 4.5 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Allegra 64R (Beckman Coulter; USA)
- AxioImager.M2 (Carl ZEISS, Německo)
- Digestoř (MERCİ; Česká republika)
- ES-20, Orbital Shaker-Incubator (Biosan; Litva)
- Fotoaparát (Nikon; Japonsko)
- Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad; USA)
- ChemiDoc MP Imaging Systém (BioRad; USA)
- Image Scanner III (GE Healthcare; USA)
- Infinite M Nano (TECAN; Švýcarsko)
- Kultivační místnost (WEISS Gallenkamp; Německo)
- Laminární box (MERCİ; Česká republika)
- LSM 710 (Axio Imager 2; Carl ZEISS; Německo)
- Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad; USA)
- Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad; USA)
- MR-12 (Biosan; Lotyšsko)
- NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific; USA)
- PCR cykler T100 Thermal Cyclor (Bio-Rad; USA)
- pH metr (Eutech Instruments; Singapur)
- PowerPac HV (BioRad; USA)
- ScanSpeed 1730R (LaboGene; Dánsko)
- Simplicity Water Purification System (Merk; Německo)
- SmartSpec Plus (Bio-Rad; USA)



- StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems; USA)
- ThermoCell MixingBlock (Bioer; Čína)
- ThermoStat C (Eppendorf; Německo)
- Vortex Genie 2Pulse (Genie; Holandsko)
- Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad; USA)
- XA110/2X (Radwag, Polsko)
- ZEISS Axio Zoom V16 (Carl ZEISS; Německo)

## 4.6 Seznam použitých programů a databází

- A plasmid editor (ApE; v2.0.61)
- Find Individual Motif Occurrences (FIMO; Grant *et al.*, 2011)
- Image Lab (verze 4.0.1 build 6; BioRad; USA)
- Image Processing and Analysis on Java (ImageJ; 1.51j8)
- Microsoft Excel (Microsoft; USA)
- StepOne Software (v2.3; Applied Biosystems, USA)
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>)
- ZEN Black a ZEN Blue (Carl ZEISS, Německo)

## 4.7 Metodika

### 4.7.1 Bioinformatická analýza promotorových sekvencí

Analýza promotorových sekvencí genů (1000 bp od translačního startu; sekvence získány z databáze TAIR, TAIR10), které kódují proteiny identifikované v proteomických analýzách mutantů *mpk3.1* (Takáč *et al.*, nepublikováno), *mpk4*, *mpk6.2* (Takáč *et al.*, 2016) a interaktomu FSD1 (Dvořák *et al.*, nepublikováno), byla provedena pomocí FIMO (Grant *et al.*, 2011) pro motivy GTAC (shoda p-hodnoty < 0,01; analyzovat pouze zadanou sekvenci, ne komplementární vlákno; Birkenbihl *et al.*, 2005; Andrés-Colás *et al.*, 2013), TNCGTACAA (shoda p-hodnoty < 0,001; Cardon *et al.*, 1999) a TGGTCCGTACAATGT (shoda p-hodnoty < 0,001; Birkenbihl *et al.*, 2005) s přednastavenými parametry, pokud není uvedeno jinak. Získaná data byla zpracována pomocí Microsoft Excel. Přítomnost jednoho GTAC motivu v analyzovaném promotoru byla vyhodnocena jako nedostatečná a analyzovaný gen byl z dané analýzy vyřazen.

Byl vytvořen datový soubor pro kontrolu analýzy s využitím možných SPL-regulovaných genů (*API*, Birkenbihl *et al.*, 2005; *FSD1*, Mermoud *et al.*, 2019; *FUL*, *LFY*, Yamaguchi *et al.*, 2009).

Při analýze ABA responzivních elementů (ABRE) byl využit konsensuální motiv MCACGTGTY (shoda p-hodnoty < 0,0001), který byl vytvořený na základě sekvencí dostupných z Takáč *et al.* (2017).

#### 4.7.2 Příprava dvojitých mutantů *spl1.1/mpk3.1* a *spl1.1/mpk6.2*

Pro přípravu dvojitých mutantů *spl1.1/mpk3.1* a *spl1.1/mpk6.2* byla semena linií *spl1.1*, *mpk3.1* a *mpk6.2* vyseta do květináčů a kultivována v kultivační místnosti (22 °C, denní režim: 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70% vlhkost, intenzita osvětlení: 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Po zahájení kvetení rostlin všech genotypů bylo přistoupeno ke křížení vybraných rostlin. Jako donor pylového zrna byl vždy volen mutant *mpk3.1*, nebo *mpk6.2*. Akceptorem pylového zrna byl vždy mutant *spl1.1*. Z donorové rostliny byl odňat čerstvě vykvetlý květ a pod lupou z něj byly pomocí preparační jehly a pinzety odebrány tyčinky. U mateřské rostliny, akceptor pylového zrna, byl vybrán neotevřený květ. Pomocí preparační jehly byl květ šetrně rozevřen a byly z něj odstraněny tyčinky. Následně bylo přistoupeno k opylení přiložením prašníků z dříve získaných tyčinek na bliznu. Přenos pylového zrna byl vizuálně zkontrolován pomocí lupy. Po opylení květů byly rostliny kultivovány a šešule sbírány (semena F1 generace). Semena F1 generace byla vyseta a rostliny následně kultivovány *in vitro* (kapitola 4.7.4 Kultivace *Arabidopsis thaliana in vitro*). Po zjištění genotypu (viz kapitola 4.7.5 Genotypová analýza) byly vybrané rostliny přeneseny do hlíny a ponechány samosprašit. Opět byl proveden sběr šešulí, potažmo semen (F2 generace). Toto bylo provedeno i pro F3 generaci.

#### 4.7.3 Povrchová sterilizace semen *Arabidopsis thaliana*

Semena *Arabidopsis thaliana* byla v laminárním boxu sterilizována 1 ml 70% (v/v) ethanolu po dobu 5 minut. Po uvedené době byl 70% (v/v) ethanol odstraněn a nahrazen 1 ml 96% (v/v) ethanolu. Po uplynutí 1 minuty byl ethanol odstraněn a nahrazen sterilní deionizovanou vodou. Sterilní deionizovaná voda byla odstraněna a nahrazena novou. Výměna vody byla provedena třikrát. Všechny kroky doprovázelo míchání obsahu mikrozkuřavky kývavými pohyby. Promytá semena byla rozprostřena na sterilní filtrační papír v Petriho misce. Po odpaření reziduální vody byla sterilizovaná semena uzavřena v Petriho misce. Semena byla dlouhodobě uchovávána ve 4 °C.

#### 4.7.4 Kultivace *Arabidopsis thaliana in vitro*

Dříve sterilizovaná semena *Arabidopsis thaliana* byla přenesena za sterilních podmínek z filtračního papíru, který byl umístěn v Petriho misce, na pevné 1/2MS médium. Semena byla následně stratifikována (přes noc, 4 °C, tma). Misky, které obsahovaly stratifikovaná semena, byly následně přemístěny do kultivační místnosti (22 °C, denní režim: 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70% vlhkost, intenzita osvětlení: 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a rostliny vertikálně kultivovány.

#### 4.7.5 Genotypová analýza

Desetidenní rostliny *Arabidopsis thaliana* byly využity pro genotypovou analýzu s cílem zjištění přítomnosti T-DNA inserce v genech *MPK3*, *MPK6* a *SPL1*. Fragment listu o ploše asi 2 mm<sup>2</sup> byl přenesen do mikrozkušavky, která obsahovala 30  $\mu\text{l}$  extrakčního pufru (Dilution Buffer; Phire Plant Direct PCR Kit), kde byl mechanicky rozrušen pomocí 10  $\mu\text{l}$  špičky. Homogenát obsahující extrahovanou DNA byl inkubován alespoň 30 minut v ledové tříšti. Takto připravený vzorek byl použit pro genotypovou analýzu.

Složení reakční směsi pro genotypovou analýzu pomocí PCR bylo následující (celkový objem reakce 10  $\mu\text{l}$ ): 2  $\mu\text{l}$  Phire Green Reaction Buffer, 5X (výsledná koncentrace 1X); 0,2  $\mu\text{l}$  Phire Hot Start II DNA polymerasa; 0,2  $\mu\text{l}$  dNTP, 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (výsledná koncentrace 0,2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); 0,5  $\mu\text{l}$  primer LP (při detekci alely divokého typu), nebo LB (při detekci T-DNA inserce), 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (výsledná koncentrace 0,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); 0,5  $\mu\text{l}$  primer RP, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (výsledná koncentrace 0,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); 6,4  $\mu\text{l}$  vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda); a 0,2  $\mu\text{l}$  izolované DNA. U slepého vzorku byl objem templátové DNA nahrazen shodným objemem vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda).

Sekvence použitých primerů byly následující: LBb1.3 (LB; 5'-ATTTTGCCGATTTTCGG AAC-3'); SALK\_134584-LP (LP; 5'-AAAGCCCAGACCATAATGACC-3'), SALK\_134584-RP (RP; 5'-GGAAAACTGACGTCCCCTAG-3'), SALK\_151594-LP (LP; 5'-ATTTTTGTCA ACAATGGCCTG-3'), SALK\_151594-RP (RP; 5'-TCTGCCTTTTCACGGAATATG-3'), SALK\_073907-LP (LP; 5'-CTCTGGCTCATCGCTTATGTC-3') a SALK\_073907-RP (RP; 5'-ATCTATGTTGGCGTTTGCAAC-3').

Pro PCR byl využit teplotní program: iniciační denaturace (5 minut, 98 °C); 30 cyklů, denaturace (5 sekund, 98 °C), anelace (5 sekund, 63 °C), extenze (23 sekund, 72 °C); finální extenze (1 minuta, 72 °C).

Získaný PCR produkt byl separován pomocí elektroforetické separace s využitím 1% (w/v) agarosového gelu (viz níže). Využití výše uvedeného pufru (Phire Green Reaction Buffer) umožňuje přímou aplikaci PCR reakce do jamek připraveného 1% (w/v) agarosového gelu. Pro

vyhodnocení platí, že přítomnost PCR produktu pro kombinaci primerů (i) LP a RP indikuje alelu divokého typu a (ii) kombinace LB a RP ukazuje na přítomnost T-DNA inserce na daném lokusu.

Předpokládaná velikost fragmentů pro primery LP a RP byla (i) 1093 bp (*SPLI*; SALK\_134584); (ii) 1229 bp (*MPK3*; SALK\_151594); a (iii) 1146 bp (*MPK6*; SALK\_073907). Velikost produktů LB a RP není uvedena z důvodu nepřesné lokalizace inserce.

#### 4.7.6 Horizontální elektroforetická separace v agarosovém gelu

Horizontální elektroforetická separace byla provedena při 90–120 V, 25–55 minut, dle velikosti použitého gelu. Při separaci v 1% (w/v) agarosovém gelu byl použit marker relativní molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (3  $\mu$ l). Při použití Phire Green Reaction Buffer není nutno přidávat ke vzorku adekvátní množství DNA Gel Loading Dye, 6X (výsledná koncentrace 1X). Vizualizace byla provedena pomocí dokumentační jednotky Gel Doc EZ Imager a získaný snímek zpracován pomocí Image Lab.

#### 4.7.7 Fenotypová analýza *in vitro* kultivovaných rostlin

Sterilní semena *Arabidopsis thaliana* byla kultivována podle výše uvedené metodiky (kapitola 4.7.4 Kultivace *Arabidopsis thaliana in vitro*). Specifikem kultivace pro fenotypové analýzy semenáčků je zakrytí Petriho misek neprůhlednou fólií na úroveň roviny semen. Fenotypová analýza byla provedena od třetího do desátého dne po přenesení Petriho misek do kultivační místnosti. Byla hodnocena délka primárního kořene pomocí ImageJ, respektive obrazového záznamu, který byl získán pomocí Image Scanner III (GE Healthcare). Počet laterálních kořenů, včetně viditelných kořenových primordií laterálních kořenů, byl hodnocen sedmý a desátý den pomocí ZEISS Axio Zoom V16 při zvětšení 80X v procházejícím světle.

Získaná data byla vyhodnocena a statisticky zpracována pomocí Microsoft Excel. Pro vyhodnocení statistické signifikance byl použit jednofaktorový ANOVA test. Počet rostlin pro daný genotyp byl Col0 (n = 58), *spl1.1* (n = 39) a *spl1.2* (n = 53).

#### 4.7.8 Fenotypová analýza *ex vitro* kultivovaných rostlin

Semena daných genotypů byla před použitím pro účely fenotypové analýzy uchovávána při pokojové teplotě. Semena byla vyseta do hlíny a kultivována při 22 °C, denním režimu: 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70% vlhkosti a intenzitě osvětlení 150  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. Hodnocení délky prýtu, kvetení a počtu listů listové růžice bylo vyhodnoceno třicátý den po vysetí semen do

hlíny. Experiment byl proveden ve dvou opakováních, počet kytek na jedno opakování byl  $n = 30$  pro každý genotyp.

Získaná data byla vyhodnocena a statisticky zpracována pomocí Microsoft Excel. Pro vyhodnocení statistické signifikance byl použit jednofaktorový ANOVA test.

#### 4.7.9 Extrakce proteinů pro biochemické analýzy

Celkem čtyři *in vitro* kultivované desetidenní rostliny *Arabidopsis thaliana*, pro jeden genotyp a jednu biologickou repliku, byly přeneseny do třecí misky a pomocí tloučku a tekutého dusíku homogenizovány. Homogenát byl kvantitativně přenesen do 1,5ml mikrozkušavky a převrstven 250  $\mu$ l extrakčního pufru. Pro účely stanovení enzymatických aktivit byl použit Na fosfátový pufr. Pro elektroforetickou separaci proteinů za denaturujících podmínek byl použit E pufr. Vzorek byl důkladně promíchán pomocí vířivé třepačky, inkubován alespoň 20 minut v ledové tříšti a centrifugován (18000 g, 20 minut, 4 °C). Supernatant byl přenesen do nové 1,5ml mikrozkušavky. V případě přítomnosti pevných částic byl krok centrifugace proveden opětovně. Vzorek byl po dobu přípravy a při následné manipulaci chlazen v ledové tříšti. Vzorek byl dlouhodobě uchováván při -80 °C.

#### 4.7.10 Měření koncentrace proteinů

Zjištění koncentrace proteinů bylo provedeno pomocí Bradfordovy metody (Bradford, 1976). Bradfordovo činidlo, 5X bylo naředěno pomocí deionizované vody na 1X. Při měření bylo použito 299  $\mu$ l Bradfordova činidla, 1X, které byly napipetovány do jamky 96jamkové mikrotitrační destičky. Do jamky mikrotitrační destičky, k 299  $\mu$ l Bradfordova činidla, 1X, byl přidán 1  $\mu$ l proteinového extraktu. Obsah jamky mikrotitrační destičky byl promíchán pipetováním. Po provedení inkubace (10 minut, laboratorní teplota) byl vzorek analyzován pomocí spektrofotometru s monochromátorem Infinite M Nano (TECAN) při vlnové délce 595 nm. Každý vzorek byl měřen ve 3 technických replikách, maximálně jedna odlehlá hodnota měření byla odstraněna pro daný vzorek. Kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky. Pro konstrukci kalibrační křivky byly použity roztoky BSA o známe koncentraci. Získaná data byla zpracována pomocí Microsoft Excel.

#### 4.7.11 Stanovení enzymatické aktivity SOD

Stanovení enzymatické aktivity SOD bylo provedeno podle Flohé *et* Otting (1984). Proteiny byly extrahovány pomocí pufru zajišťující nativní stav SOD, který je významný pro samotnou detekci enzymatické aktivity (Beauchamp *et* Fridovich, 1971).

Elektroforetická separace byla provedena za nedenedaturujících podmínek. Byl připraven 1,5mm polyakrylamidový (PA) gel ze 4% zaostřovacího a 12% rozdělovacího gelu. Pro stanovení aktivity SOD bylo použito 20 µg proteinů extrahovaných pomocí Na fosfátového pufru. Elektroforetická separace probíhala při konstantním proudu 20 mA na jeden gel, 120 minut. Jako elektrodový pufr byl využit tris-glycinový pufr. Po dokončení elektroforetické separace byl gel inkubován 10 minut v Na fosfátovém pufru bez kyseliny L-askorbové a glycerolu. Následně byl gel inkubován 20 minut ve tmě v Na fosfátovém pufru bez kyseliny L-askorbové a glycerolu s 0,6mmol·l<sup>-1</sup> NBT. Gel byl inkubován 15 minut ve tmě v Na fosfátovém pufru bez kyseliny L-askorbové a glycerolu s 5mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA, 0,25% (v/v) TEMED a 0,06mmol·l<sup>-1</sup> riboflavinem. Po provedení inkubace byl gel vystaven zdroji světla (150 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>). Po uplynutí expozice (5 minut, laboratorní teplota) byl inkubační roztok dekantován a nahrazen deionizovanou vodou.

Obrazová dokumentace byla provedena pomocí Image Scanner III (GE Healthcare) a zpracována pomocí ImageJ. Byla provedena normalizace získaných dat optické hustoty pásu dané isoformy na celkovou intenzitu, tedy součet intenzit všech pásů dané isoformy. Pro analýzu každého genotypu byly použity tři biologické repliky. Získaná data byla vyhodnocena a statisticky zpracována pomocí Microsoft Excel. Pro vyhodnocení statistické signifikance byl použit jednofaktorový ANOVA test.

#### 4.7.12 Stanovení enzymatické aktivity peroxidas

Elektroforetická separace při stanovování enzymatických aktivit peroxidas byla provedena za nedenedaturujících podmínek. Byl připraven 1,5mm PA gel z 4% zaostřovacího a 10% rozdělovacího gelu. Pro stanovení aktivit peroxidas bylo použito 40 µg proteinů extrahovaných pomocí Na fosfátového pufru. Elektroforetická separace probíhala při konstantním proudu 15 mA na jeden gel, 135 minut. Jako elektrodový pufr byl využit tris-glycinový pufr.

Po dokončení elektroforetické separace byl gel inkubován 15 minut v 50 ml Na acetátového pufru. Po uplynutí inkubační doby byl pufr nahrazen novými 50 ml Na acetátového pufru s přísadkou zahřátého (65 °C) roztoku 25 mg DIA, které byly rozpuštěny v 500 µl 96% (v/v) ethanolu, a 375 µl peroxidu vodíku. Gel byl v tomto pufru inkubován 1 hodinu za mírného třepání. Pufr byl následně dekantován a gel převrstven deionizovanou vodou.

Gel byl následně zdokumentován a analyzován jako u stanovení enzymatické aktivity SOD (4.7.11 Stanovení enzymatické aktivity SOD).

#### 4.7.13 Elektroforetická separace proteinů za denaturujících podmínek

Extrakt proteinů byl smíchán s Laemliho pufrem v poměru 3:1. Laemliho pufr, 4X byl dříve smíchán s 2-merkптоethanolem v poměru 9:1. Připravené vzorky byly pečlivě promíchány pomocí vířivé třepačky a inkubovány 10 minut při 95 °C.

Elektroforetická separace byla provedena za denaturujících podmínek. PA gel s tloušťkou 1 mm byl připraven s využitím soupravy TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 12% podle pokynů výrobce. Pro separaci bylo použito 15 µg proteinů, které byly separovány 10 minut při 100 V a následně 60 minut při 150 V. Jako elektrodový pufr byl použit elektroforetický pufr. Při využití soupravy TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 12% byl gel zdokumentován pomocí dokumentační jednotky ChemiDoc MP Imaging System s využitím protokolu pro Stain-Free gely.

#### 4.7.14 Imunoblotování

Po dokončení elektroforetické separace za denaturujících podmínek byl proveden přenos separovaných proteinů na PVDF membránu o délce 8,5 cm a výšce 7 cm. Před přenosem byla PVDF membrána rehydratována v methanolu (20 sekund) a inkubována 10 minut s houbičkami, filtračním papírem a PA gelem v tris-glycinovém pufru s obsahem 10% (v/v) methanolu.

Pečlivě složená kazeta byla vložena do jádra, respektive do vany, která byla umístěna v ledové tříšti. Přenos probíhal 17 hodin při konstantním napětí 24 V. Pro přenos byl využit tris-glycinový pufr s obsahem 10% (v/v) methanolu.

Membrána byla vyjmuta z kazety a několikrát opláchnuta deionizovanou vodou. Přenesené proteiny byly detekovány na membráně pomocí ChemiDoc MP Imaging System s využitím protokolu pro Stain-Free detekci proteinů na membráně. Všechny membrány byly obarveny roztokem Ponceau S, třikrát promyty deionizovanou vodou a zdokumentovány pomocí fotoaparátu. Odbarvení membrány bylo dosaženo promytím v TBS-T.

Pro detekci SOD byly membrány blokovány (přes noc, 4 °C) v 5% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS-T za pomalého třepání. Následující den byl blokovací roztok nahrazen roztokem primární protilátky (anti FeSOD, 1:3000; anti Cu/ZnSOD, 1:2000), která byla ředěna v 1% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS-T. Byla provedena inkubace membrány s roztokem primární protilátky přes noc ve 4 °C. Následující den byla membrána pětikrát promývána roztokem TBS-T po dobu 5 minut. Následně byla membrána inkubována v roztoku sekundární protilátky (anti rabbit protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou, 1:5000), která byla ředěna v 1% (w/v) roztoku BSA v TBS-T. Po inkubaci, která byla dlouhá 1,5 hodiny, byla membrána pětikrát promývána roztokem TBS-T po dobu 5 minut.

Pro vizualizaci značených proteinů byl použit komerční substrát Clarity Western ECL Substrate. Membrána byla inkubována v substrátu, který byl připraven podle pokynů výrobce (Bio-Rad), 2 minuty a následně snímána pomocí dokumentační jednotky ChemiDoc MP Imaging System s využitím protokolu Chemi s expozicí 0,1–20 sekund. Získaný obrazový materiál byl zpracován a vyhodnocen pomocí Image Lab. Data byla normalizována s pomocí pěti nejintenzivnějších pásů, které byly získány při kontrole nanášených proteinů (Stain-Free), a relativně kvantifikována s využitím Microsoft Excel. Pro analýzu každého genotypu byly použity tři biologické repliky. Pro vyhodnocení statistické signifikance byl použit jednofaktorový ANOVA test.

#### 4.7.15 Izolace celkové RNA

Čtyři desetidenní rostliny *Arabidopsis thaliana*, pro jeden genotyp a jedno opakování, byly homogenizovány pomocí tloučku, třecí misky a tekutého dusíku. Získaný homogenát byl kvantitativně přenesen do 2ml mikrozkušavky, převrstven a rozpuštěn v 800  $\mu$ l TRIzol Reagentu. Vzniklá suspenze byla inkubována (5 minut, laboratorní teplota) a následně centrifugována (12000 g, 10 minut, 4 °C). Supernatant byl přenesen do nové 2ml mikrozkušavky a převrstven 80  $\mu$ l BCP. Intenzivním třepáním (15 sekund) bylo dosaženo dostatečného stupně promíchání vzorku, následovala inkubace (10 minut, laboratorní teplota) a centrifugace (12000 g, 15 minut, 4 °C). Vodná fáze byla přenesena do 2ml mikrozkušavky a převrstvena 100% (v/v) isopropanolem v poměru 2:1, směs byla následně intenzivně promíchána vířivou třepačkou, inkubována (5 minut, laboratorní teplota) a centrifugována (12000 g, 8 minut, 4 °C). Supernatant byl odstraněn, pelet byl převrstven 1 ml 75% (v/v) ethanolu a centrifugován (7500 g, 5 minut, 4 °C). Ethanol by odstraněn a pelet krátce vysušen (5 minut, laboratorní teplota). Získaný pelet byl rozpuštěn v 50  $\mu$ l destilované vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda) a inkubován v ledové tříšti 30 minut.

Získaný vzorek RNA byl několikrát proměřen pomocí spektrofotometru (NanoDrop Lite Spectrophotometer) a byla upravena jeho koncentrace na přibližnou hodnotu 200  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  pomocí destilované vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda).

#### 4.7.16 Odstranění kontaminace ve formě DNA od vzorku izolované RNA

Složení enzymatické reakce (celkový objem reakce 20  $\mu$ l) pro odstranění nežádoucí gDNA pomocí DNasy I bylo následující: 2  $\mu$ l reakčního pufru s  $\text{MgCl}_2$  pro DNasu I, 10X (výsledná koncentrace 1X), 2  $\mu$ l DNasy I (1  $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; 2U v reakční směsi); x  $\mu$ l izolátu celkové



RNA (2000 ng; x je objem pro dosažení množství 2000 ng RNA); a y  $\mu\text{l}$  destilované vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda; y je objem použité destilované vody pro doplnění reakce na objem 20  $\mu\text{l}$ ).

Byla provedena inkubace (40 minut, 37 °C), následně byly do enzymatické reakce přidány 2  $\mu\text{l}$  roztoku EDTA, 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a vzorky byly dále inkubovány (10 minut, 70 °C). Vzorky ošetřené DNasou byly umístěny do ledové tříště. Kvalita izolované RNA, její integrita, byla hodnocena pomocí horizontální elektroforetické separace v 1% (w/v) agarosovém gelu (viz kapitola 4.7.6 Horizontální elektroforetická separace v agarosovém gelu).

#### 4.7.17 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce (celkový objem reakce 20  $\mu\text{l}$ ) byla provedena v 0,2ml mikrozkušavkách. V termocycleru byla inkubována (10 minut, 70 °C, 75 °C víko) reakční směs I (objem reakce 10  $\mu\text{l}$ ) obsahující: 0,5  $\mu\text{l}$  Oligo(dT)18 primer, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; 5  $\mu\text{l}$  dříve izolované RNA, která byla zbavena kontaminující DNA; a 4,5  $\mu\text{l}$  destilované vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda). Po uplynutí inkubační doby byla mikrozkušavka obsahující reakční směs I přenesena do ledové tříště a do reakční směsi I byla přidána reakční směs II (objem reakce 10  $\mu\text{l}$ ) obsahující: 4  $\mu\text{l}$  First Strand Puf, 5X (výsledná koncentrace 1X); 0,4  $\mu\text{l}$  RNasin Ribonuclease inhibitoru; 0,4  $\mu\text{l}$  M-MLV reverzní transkriptasy; 1  $\mu\text{l}$  dNTP, 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (výsledná koncentrace 0,5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); a 4,2  $\mu\text{l}$  destilované vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda). Byla provedena syntéza komplementární DNA (cDNA; complementary DNA) ve dříve použitém termocycleru (3 hodiny, 42 °C, 45 °C víko). Následně byla provedena inaktivace reverzní transkriptasy v použitém termocycleru (10 minut, 70 °C, 75 °C víko).

Získaná cDNA byla 4X naředěna destilovanou vodou s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda).

#### 4.7.18 Kvantitativní real-time PCR

Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR), která byla provedena pomocí StepOnePlus (StepOne Software) termocycleru, byla provedena s využitím reakční směsi (celkový objem reakce 10  $\mu\text{l}$ ) obsahující: 0,5  $\mu\text{l}$  F primeru, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (výsledná koncentrace 0,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); 0,5  $\mu\text{l}$  R primeru, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (výsledná koncentrace 0,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); 1,5  $\mu\text{l}$  vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda); 2,5  $\mu\text{l}$  dříve připravené cDNA; a 5  $\mu\text{l}$  premixu pro SYBR Green.

Byly použity primery qFSD1\_F (5'-TCACCGCAAACACTACGTCCTC-3'), qFSD1\_R (5'-TCATATGCGGCTCCAAAGCA-3'), qEF1 $\alpha$ \_F (5'-TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA-3') a qEF1 $\alpha$ \_R (5'-GGTGGTGGCATC CATCTTGTTACA-3').

Byl využit teplotní program: iniciační denaturace (10 minut, 95 °C); 40 cyklů, denaturace (15 sekund, 95 °C), anelace a extenze (1 minuta, 60 °C); analýza křivky tání byla provedena za podmínek: denaturace (15 sekund, 95 °C), anelace a extenze (1 minuta, 60 °C).

Kvantifikace s využitím 3 biologických a 3 technických replik byla provedena pomocí metody  $\Delta\Delta\text{CT}$  a statisticky vyhodnocena pomocí Microsoft Excel. Pro vyhodnocení statistické signifikance byl použit jednofaktorový ANOVA test. Jako referenční gen určený pro normalizaci byl zvolen *ELONGAČNÍ FAKTOR 1a*.

#### 4.7.19 Vliv ABA na aperturu průduchů *Arabidopsis thaliana*

Pravé listy desetidenních *in vitro* kultivovaných rostlin *Arabidopsis thaliana* byly odňaty a 2 hodiny inkubovány v pufru pro otevírání průduchů při konstantních světelných podmínkách (150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a laboratorní teplotě za mírného třepání. Po uplynutí inkubace byl pufr pro otevírání průduchů nahrazen novým pufrem pro otevírání průduchů s obsahem ABA (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Pro účely kontrolních podmínek byl použit roztok pro otevírání průduchů s objemem 96% (v/v) ethanolu, který byl roven objemu zásobního roztoku ABA, 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  použitého pro přípravu pufru pro otevírání průduchů s obsahem ABA (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Byla provedena inkubace za shodných podmínek. Po uplynutí inkubace byly listy přeneseny na podložní sklo a převrstveny roztokem, ve kterém byly inkubovány. Listy byly ihned mikroskopicky analyzovány pomocí epifluorescenčního mikroskopu AxioImager.M2 v procházejícím světle.

Pořízené snímky byly analyzovány programem ImageJ, pomocí kterého byla měřena šířka a délka šterbiny průduchů. Šířka a délka byla použita k výpočtu jejich podílu, hodnoty reflektující aperturu průduchů. Získaná data byla vyhodnocena a statisticky zpracována pomocí Microsoft Excel. Pro vyhodnocení statistické signifikance byl použit jednofaktorový ANOVA test. Experiment byl proveden ve dvou opakováních. Pro každé opakování byl využit alespoň jeden list z jedné rostliny a listy alespoň ze dvou rostlin. Celkově bylo analyzováno  $n = 100$  průduchů.

#### 4.7.20 Vliv ABA na klíčení *Arabidopsis thaliana*

Semena *Arabidopsis thaliana* na 1/2MS médium byla kultivována podle podmínek uvedených v kapitole 4.7.4 Kultivace *Arabidopsis thaliana in vitro*. Pro účely experimentu bylo

využito 1/2MS médium obsahující 0,5 a  $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ABA. Jako kontrola bylo použito 1/2MS médium bez ABA, kde objem roztoku ABA byl nahrazen objemem 96% (v/v) ethanolu, který byl roven objemu zásobního roztoku ABA o koncentraci  $10\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , nebo  $5\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , který byl použit pro přípravu 1/2MS média s koncentrací  $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , respektive  $0,5\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ABA. Klíčení bylo hodnoceno s využitím ZEISS Axio Zoom V16 při zvětšení 100X v procházejícím světle. Vyklíčení bylo hodnoceno první, druhý a třetí den po přenesení misek s rostlinami do kultivační místnosti na základě pozorování radikuly.

Získaná data byla vyhodnocena a statisticky zpracována pomocí Microsoft Excel. Pro vyhodnocení statistické signifikance byl použit jednofaktorový ANOVA test. Experiment byl proveden ve třech opakováních, kde počet semen na jedno opakování a jeden genotyp byl  $n = 30$ .

#### 4.7.21 Izolace gDNA

Čtyři *in vitro* kultivované desetidenní rostliny *Arabidopsis thaliana* byly přeneseny do třecí misky a pomocí tloučku a tekutého dusíku homogenizovány. Homogenát byl kvantitativně přenesen do 2ml mikrozkuřavky, převrstven 800  $\mu\text{l}$  EP a důkladně promíchán pomocí vířivé třepačky. K suspenzi bylo přidáno 800  $\mu\text{l}$  směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1), vzniklá suspenze byla promíchána pomocí vířivé třepačky (alespoň 30 sekund). Byla provedena centrifugace (6000 g, 3 minuty,  $4\ ^\circ\text{C}$ ) a supernatant byl přenesen do nové 2ml mikrozkuřavky. Do mikrozkuřavky obsahující supernatant bylo přidáno 80  $\mu\text{l}$  NaAc,  $3\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a obsah mikrozkuřavky byl intenzivně protřepán. Bylo přidáno 800  $\mu\text{l}$  ledového 99,8% (v/v) ethanolu, směs byla promíchána a centrifugována (14000 g, 10 minut,  $4\ ^\circ\text{C}$ ). Supernatant byl odstraněn, pelet byl převrstven 800  $\mu\text{l}$  70% (v/v) ethanolu a byla provedena centrifugace (14000 g, 10 minut,  $4\ ^\circ\text{C}$ ). Supernatant byl odstraněn, pelet vysušen (30 minut, laboratorní teplota), rozpuštěn ve 100  $\mu\text{l}$  TE pufru a inkubován (60 minut,  $37\ ^\circ\text{C}$ ). Vzorek byl dlouhodobě uchováván při  $-20\ ^\circ\text{C}$ .

#### 4.7.22 Amplifikace parciální části T-DNA inserčního lokusu pomocí PCR

gDNA mutantních rostlin linie *spl1.2*, která byla izolována podle výše popsaného postupu, byla použita jako templát pro PCR (celkový objem reakce 50  $\mu\text{l}$ ): 10  $\mu\text{l}$  iProof HF pufr, 5X (výsledná koncentrace 1X); 0,5  $\mu\text{l}$  iProof High Fidelity DNA polymerasa (výsledná koncentrace 1U); 1  $\mu\text{l}$  dNTP,  $10\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (výsledná koncentrace  $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); 2,5  $\mu\text{l}$  primer F,  $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (výsledná koncentrace  $0,5\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); 2,5  $\mu\text{l}$  primer R,  $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (výsledná koncentrace  $0,5\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); 32,9  $\mu\text{l}$  vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNase (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda); a 0,6  $\mu\text{l}$  izolované gDNA.

Byly použity primery LBb1.3 (viz kapitola 4.7.5 Genotypová analýza) a SALK\_058642-RP (5'-TCTGGATCTCTTAGCCTGCTG-3').

Byl využit teplotní program: iniciační denaturace (30 sekund, 98 °C); 30 cyklů, denaturace (8 sekund, 98 °C), anelace (17 sekund, 63 °C), extenze (30 sekund, 72 °C); finální extenze (5 minut, 72 °C). Velikost produktu není uvedena z důvodu nejisté polohy inserce.

Získaný PCR produkt byl elektroforeticky separován, purifikován a sekvencován.

#### 4.7.23 Purifikace PCR produktu

Purifikace PCR produktu byla provedena s využitím NucleoSpin Gel and PCR Clean-up soupravy s drobnými modifikacemi. PCR produkt byl izolován z gelové matrice po provedení horizontální elektroforetické separace. Fragment gelu, který obsahoval amplifikovaný PCR produkt, byl převrstven ve 2ml mikrozkušavce NTI pufrém v poměru 200 µl NTI pufru na 100 mg vyřezaného 1% (w/v) agarosového gelu. Obsah mikrozkušavky byl inkubován (50 °C) do dosažení bodu úplného rozpuštění gelové matrice. V průběhu inkubace byl obsah mikrozkušavky 2X–3X promíchán pomocí vířivé třepačky. Maximálně 700 µl získaného roztoku bylo nanášeno do kolony poskytnuté v uvedené soupravě.

Alternativně byl PCR produkt purifikován bez předřazené horizontální elektroforetické separace s využitím stejné soupravy a alternativního protokolu. Pokud byl objem PCR reakce menší než 50 µl, byl doplněn na objem 50 µl pomocí vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda). Následně byl PCR produkt smíchán s NTI pufrém v poměru 1:2 a krátce promíchán pomocí vířivé třepačky. Vzniklý roztok byl nanášen do kolony.

Po centrifugaci (11000 g, 30 sekund, laboratorní teplota) byl eluát ze sběrné zkumavky kolony nanášen opět do kolony a byla provedena centrifugace za stejných parametrů. Toto bylo provedeno ještě jednou. Tento postup byl proveden i pro případný zbytek roztoku rozpuštěné gelové matrice, respektive PCR produktu. Po odstranění eluátu ze sběrné zkumavky bylo do kolony nanášeno 700 µl NT3 pufru. Obsah kolony byl centrifugován (11000 g, 30 sekund, laboratorní teplota) a eluát byl následně odstraněn ze sběrné zkumavky. Kolona byla zbavena centrifugací (11000 g, 1 minuta, laboratorní teplota) reziduálních zbytků roztoků.

Pro eluci bylo použito 30 µl vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda). Po nanášení vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda) do kolony byla provedena inkubace (1 minuta, laboratorní teplota), následně byl proveden přenos kolony do nové 1,5ml mikrozkušavky a byla provedena centrifugace (11000 g, 1 minuta, laboratorní teplota). Eluát z 1,5ml mikrozkušavky

byl opět nanesen do kolony a byla provedena eluce za dříve uvedených parametrů. Toto bylo provedeno ještě jednou.

Izolovaná DNA byla dlouhodobě uchována při -20 °C.

#### 4.7.24 Sekvencování

Sekvencování bylo provedeno firmou SEQme (Česká republika). Výsledky sekvencování byly vyhodnoceny pomocí programu ApE.

#### 4.7.25 Příprava fúzních konstruktů

Izolovaná gDNA rostlin Col0 byla použita pro amplifikaci promotorové oblasti genu *SPL1* (*pSPL1*; fragment A) pomocí PCR s využitím iProof polymerasy (viz kapitola 4.7.22 Amplifikace parciální části T-DNA inserčního lokusu pomocí PCR) a primerů SPL1-Nter-frgA-F (5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCGGATTAGCTCTCCAAGTTTG-3') a SPL1-Nter-frgA-R (5'-GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGCCACTCGATCCAATTC AACAAAC-3'). Byla provedena změna teplotního programu v podobě teploty anelace (57 °C) a doby extenze (60 sekund). Očekávaná velikost PCR produktu *pSPL1* byla 2186 bp.

Pro amplifikaci genu *SPL1* (fragment C) byl využit pár primerů SPL1-Nter-frgC-cDNA-F (5'-GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGGATGGAAGCTAGAATTGATGAAG-3') a SPL1-Nter-frgC-cDNA-R (5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGGTCAGCTTGTC CATAGTCC-3'). Byla provedena změna teplotního programu v podobě teploty anelace (60 °C) a doby extenze (95 sekund). Očekávaná velikost PCR produktu *SPL1* byla 3464 bp. Získaný PCR produkt byl purifikován podle výše uvedeného postupu.

Pro rekombinaci do vstupních vektorů byla použita reakce (celkový objem 10 µl) o následujících parametrech: x µl *pSPL1* purifikovaného PCR produktu (72 ng; x je objem pro dosažení množství 72 ng daného PCR produktu), nebo x µl *SPL1* purifikovaného PCR produktu (114 ng; x je objem pro dosažení množství 114 ng daného PCR produktu); y µl vstupního vektoru (pDONR P4-P1R pro *pSPL1*; pDONR P2R-P3 pro *SPL1*; 150 ng; y je objem pro dosažení množství 150 ng daného plasmidu); z µl destilované vody (z je objem použité destilované vody pro doplnění reakce na objem 8 µl); a 2 µl BP clonasy. Před použitím byla BP clonasa vytažena z mrazicí jednotky (-20 °C), promíchána pomocí vířivé třepačky a krátce centrifugována.

Množství PCR produktu (50 fmol) pro rekombinační reakci bylo, podle návodu výrobce, zjištěno pomocí následující rovnice:

$$\text{DNA [ng]} = 50 \text{ [fmol]} \cdot \text{velikost fragmentu DNA [bp]} \cdot \left( \frac{660 \text{ [fg]}}{1 \text{ [fmol]}} \right) \cdot \left( \frac{1 \text{ [ng]}}{10^6 \text{ [fg]}} \right)$$

Po inkubaci rekombinační reakce (17 hodin, 18 °C) byl přidán 1 µl proteiny K a výsledná směs byla inkubována (10 minut, 37 °C). Rekombinační reakce byla použita pro transformaci chemokompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli*, One Shot TOP10 (viz níže). Úspěšnost klonování byla ověřena pomocí enzymatického štěpení restrikční endonukleasou (viz kapitola 4.7.30 Štěpení pomocí restrikčních endonukleas) a verifikována sekvencováním.

Připravené vstupní vektory obsahující klonovaný fragment DNA byly použity pro rekombinaci do destinačního vektoru. Pro rekombinaci do destinačního vektoru byla použita reakce (celkový objem 10 µl): v µl *pSPLI*-pDONR P4-P1R (31,53 ng; v je objem pro dosažení množství 31,53 ng daného plasmidu); w µl *SPLI*-pDONR P2R-P3 (39,94 ng; w je objem pro dosažení množství 39,94 ng daného plasmidu); x µl *eGFP*-pDONR 221 (21,56 ng; x je objem pro dosažení množství 21,56 ng daného plasmidu); y µl pB7m34GW (131,27 ng; y je objem pro dosažení množství 131,27 ng daného plasmidu); z µl destilované vody (z je objem použité destilované vody pro doplnění reakce na objem 8 µl); a 2 µl LR clonasy. Před použitím byla LR clonasa vytažena z mrazicí jednotky (-20 °C), promíchána pomocí vířivé třepačky a krátce centrifugována. Alternativně byl *pSPLI*-pDONR P4-P1R nahrazen *p35S*-pDONR P4-P1R (24,83 ng) při zachování stejných parametrů reakční směsi.

Množství vektorů pro rekombinační reakci bylo zjištěno pomocí dříve uvedené rovnice. Bylo použito 10 fmol vstupního vektoru a 20 fmol destinačního vektoru, podle návodu výrobce. Připravená LR reakce byla inkubována a dále zpracována jako při BP reakci.

#### 4.7.26 Transformace chemokompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli*, One Shot TOP10

50 µl bakteriální suspenze chemokompetentních buněk *Escherichia coli*, One Shot TOP10 bylo po přidání 6 µl dříve připravené rekombinační směsi inkubováno 30 minut v ledové tříšti. 1,5ml mikrozkuřavka obsahující transformační směs byla přemístěna do termobloku, kde byla inkubována 60 sekund při 42 °C a následně byla přemístěna do ledové tříště, kde byla inkubována 2–3 minuty. Po uplynutí doby inkubace bylo k bakteriální suspenzi potenciálně transformovaných buněk přidáno 300 µl SOC média. Byla provedena inkubace (220 RPM, 1 hodina, 37 °C).

#### 4.7.27 Kultivace bakteriálních buněk *Escherichia coli*, One Shot TOP10

Bakteriální suspenze potenciálně transformovaných buněk byla rozetřena na pevné LB médium obsahující adekvátní antibiotika s ohledem na resistenci specifického vektoru pDONR P4-P1R (*Kan*), pDONR P2R-P3 (*Kan*) a pB7m34GW (*Spe*). Výsledná koncentrace použitých antibiotik byla  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Bakteriální suspenze byla rozetřena na Petriho misky v množství 100  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$ . Bakterie byly kultivovány (přes noc, 37 °C, tma).

Bakterie pocházející z potenciálně pozitivních kolonií byly pomocí sterilního párátko přeneseny do 5 ml tekutého LB média (obsah antibiotik shodný s pevným LB médiem) a kultivovány (220 RPM, přes noc, 37 °C, tma). Bakteriální suspenze byla použita pro izolaci plasmidové DNA, případně pro dlouhodobé uchování formou alikvotů v 25% (v/v) glycerolu při -80 °C.

#### 4.7.28 Izolace plasmidové DNA

Plasmidová DNA byla izolována z 5 ml přes noc kultivované bakteriální kultury, která byla postupně centrifugována ve 2ml mikrozkuřavkách (8000 g, 1 minuta, 4 °C). Bakteriální pelet byl rozpuřten ve 300  $\mu\text{l}$  pufru P1 (obsah  $1 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$  RNasy A). Ke vzniklé bakteriální suspenzi bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  pufru P2. Obsah mikrozkuřavky byl promíchán kývavým pohybem mikrozkuřavky a inkubován (5 minut, laboratorní teplota). Bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  pufru P3, obsah mikrozkuřavky byl promíchán kývavým pohybem mikrozkuřavky a inkubován (5 minut, ledová třířt').

Byla provedena centrifugace (18000 g, 20 minut, 4 °C). Supernatant byl kvalitativně převeden do 1,5ml mikrozkuřavky obsahující 600  $\mu\text{l}$  isopropanolu. Po důkladném promíchání následovala centrifugace (18000 g, 20 minut, laboratorní teplota). Supernatant byl dekantován a pelet byl promyt 750  $\mu\text{l}$  vychlazeného 75% (v/v) ethanolu. Po centrifugaci (18000 g, 5 minut, laboratorní teplota) byl supernatant dekantován, pelet vysuřen (10 minut, laboratorní teplota) a rozpuřten v 50  $\mu\text{l}$  deionizované vody.

#### 4.7.29 Purifikace plasmidové DNA

V případě potřeby (sekvencování, transformace) byla izolovaná plasmidová DNA purifikována pomocí kolon soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit. Dřívě izolovaná plasmidová DNA byla smíchána s PB puřrem v poměru 1:5, aplikována do QIAprep kolony a centrifugována (18000 g, 1 minuta, laboratorní teplota). Eluát byl po centrifugaci opět nanesen do kolony. Totěž

bylo provedeno ještě jednou. Kolona byla promyta 750  $\mu\text{l}$  PE pufru (18000 g, 1 minuta, laboratorní teplota) a následně vysušena centrifugací (18000 g, 1 minuta, laboratorní teplota). Eluce plasmidové DNA bylo docíleno stejně jako při eluci popsané v kapitole 4.7.23 Purifikace PCR produktu.

#### 4.7.30 Štěpení pomocí restričních endonukleas

Izolovaná plasmidová DNA byla použita pro ověření úspěšnosti klonování pomocí enzymatického štěpení. Složení enzymatické reakce (celkový objem reakce 20  $\mu\text{l}$ ) pro štěpení bylo následující: 1  $\mu\text{l}$  restriční endonukleasy (specifikováno níže); 2  $\mu\text{l}$  pufru pro restriční endonukleasu (pufr doporučený výrobcem pro maximální efektivitu enzymu); x  $\mu\text{l}$  izolátu plasmidové DNA (1500–2000 ng; x je objem pro dosažení množství 1500–2000 ng plasmidové DNA); a y  $\mu\text{l}$  destilované vody (y je objem použité destilované vody pro doplnění reakce na objem 20  $\mu\text{l}$ ). Inkubace trvala 1 hodinu a byla provedena při 37 °C.

10  $\mu\text{l}$  reakční směsi bylo separováno pomocí horizontální elektroforetické separace, velikosti očekávaných fragmentů pro indikované konstrukty byly *pSPLI*-pDONR P4-P1R (*EcoRV*: 4777 bp), *SPLI*-pDONR P2R-P3 (*PvuII*: 2630, 2086, 1335 bp), *pSPLI::eGFP:SPLI*-pB7m34GW (*PvuII*: 10792, 2086, 1719 bp) a *p35S::eGFP:SPLI*-pB7m34GW (*NdeI*: 5580, 3649, 2489, 1864 bp).

#### 4.7.31 Transformace chemokompetentních bakteriálních buněk *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101

K 50  $\mu\text{l}$  bakteriální suspenze chemokompetentních buněk *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101 bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  purifikované plasmidové DNA. Transformační směs byla inkubována 30 minut v ledové tříšti. 1,5ml mikrozkuhavka obsahující transformační směs byla přemístěna na 5 minut do tekutého dusíku a následně inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace bylo k bakteriální suspenzi potenciálně transformovaných buněk přidáno 400  $\mu\text{l}$  SOC média. Byla provedena inkubace (180 RPM, 2 hodiny, 25 °C).

#### 4.7.32 Kultivace bakteriálních buněk *Agrobacterium tumefaciens*, GW3101

Dříve připravená bakteriální suspenze potenciálně transformovaných buněk *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101 byla rozetřena na pevné LB médium obsahující spektinomycin (50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; pB7m34GW) a rifampicin (50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; *Agrobacterium tumefaciens*,



GV3101). Bakteriální suspenze byla rozetřena na Petriho misky v množství 150  $\mu$ l. Bakterie byly kultivovány (2 dny, 25 °C, tma).

Bakterie pocházející z vybrané kolonie byly pomocí sterilního párátko přeneseny do 5 ml tekutého LB média (obsah antibiotik shodný s pevným LB médiem) a kultivovány (180 RPM, přes noc, 25 °C, tma). Bakteriální suspenze byla použita pro tranzientní transformaci *Nicotiana benthamiana*, stabilní transformaci *Arabidopsis thaliana*, případně pro dlouhodobé uchování formou alikvotů v 25% (v/v) glycerolu při -80 °C.

#### 4.7.33 Tranzientní transformace *Nicotiana benthamiana*

Do 20 ml tekutého LB média obsahující spektinomycin (50  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>; *pSPL1::eGFP:SPL1*-pB7m34GW, *p35S::eGFP:SPL1*-pB7m34GW), nebo kanamycin (50  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>; *p19*) a rifampicin (50  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>) bylo přeneseno 50  $\mu$ l bakteriální suspenze *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101, která byla uchovávána dlouhodobě v 25% (v/v) glycerolu při -80 °C. Byly přeneseny bakterie, které nesly *p19*, *pSPL1::eGFP:SPL1*-pB7m34GW, nebo *p35S::eGFP:SPL1*-pB7m34GW. Bakteriální kultura byla kultivována (180 RPM, přes noc, 25 °C, tma).

Rostliny *Nicotiana benthamiana* byly přeneseny z kultivační místnosti (22 °C, denní režim: 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70% vlhkost, intenzita osvětlení: 150  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) do laboratoře, kde byly zality vodou (minimálně 2 hodiny před samotnou transformací).

Bakteriální kultura byla centrifugována (3000 g, 30 minut, 4 °C), supernatant dekantován a nahrazen 400  $\mu$ l kokultivačního média. Byla změřena optická hustota při vlnové délce 600 nm (OD<sub>600</sub>; optical density, 600 nm): 10  $\mu$ l bakteriální suspenze bylo smícháno s 990  $\mu$ l kokultivačního média a měřeno pomocí spektrofotometru (SmartSpec Plus) při indikované vlnové délce. Zjištěná hodnota OD<sub>600</sub> byla použita pro získání infiltrační bakteriální suspenze, kde výsledná hodnota OD<sub>600</sub> byla 0,7 pro bakterie nesoucí daný konstrukt (*pSPL1::eGFP:SPL1*, nebo *p35S::eGFP:SPL1*) a 1 pro bakterie nesoucí *p19*, podle níže uvedené rovnice. Pro ředění bakteriální suspenze, doplnění na požadovaný objem, bylo použito kokultivační médium.

$$V = \frac{OD_{600\text{požadované}} \cdot V_1}{OD_{600\text{naměřené}} \cdot 100}$$

V je objem bakteriální suspenze s měřeným OD<sub>600</sub>; OD<sub>600</sub>požadované je výsledné požadované OD<sub>600</sub>; V<sub>1</sub> je výsledný objem bakteriální suspenze (10 ml); OD<sub>600</sub>naměřené je aktuálně naměřená hodnota OD<sub>600</sub>; a 100 je koeficient ředění.

Infiltrační bakteriální suspenze obsahující bakterie nesoucí daný konstrukt (*pSPL1::eGFP:SPL1*, nebo *p35S::eGFP:SPL1*) a *p19* byla inkubována (3–4 hodiny, laboratorní

teplota, tma). Po provedení inkubace byly pomocí 2ml injekční stříkačky infiltrovány listy *Nicotiana benthamiana*. Bakteriální kultura byla pomalu vtlačena do listu z jeho spodní strany. Jako negativní kontrola byla použita bakteriální suspenze bakterií nesoucí *p19*. Po provedení inokulace byla rostlina překryta černou fólií do druhého dne (laboratorní teplota) a následně přemístěna do kultivační místnosti (22 °C, denní režim: 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70% vlhkost, intenzita osvětlení: 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

#### 4.7.34 Konfokální mikroskopie

Třetí a čtvrtý den po inokulaci listů *Nicotiana benthamiana* (viz dříve) byla provedena mikroskopická analýza segmentů listů. Segment listu z transformované oblasti byl umístěn na podložní sklo, převrstven 150–200  $\mu\text{l}$  tekutého 1/2MS média (absence želírující látky) a překryt krycím sklem. Pro mikroskopickou analýzu byla vybrána oblast listu bez viditelných fytopatologických změn.

Konfokální mikroskopie byla provedena pomocí mikroskopu LSM 710 (Axio Imager 2) s použitým okulárem (10X) a objektivem (20X; Plan-Apochromat 20x/0.8 M27). Pro excitaci eGFP byl použit laser s vlnovou délkou 488 nm o intenzitě 2–4 %. Pro excitaci chlorofylu a byl použit laser s vlnovou délkou 633 nm o intenzitě 2 %. Emise eGFP byla detekována v rozmezí vlnových délek 493–555 nm, emise chlorofylu v rozmezí vlnových délek 649–721 nm. Získaný obrazový materiál (jednotlivé snímky, časosběrné série snímků a snímky odlišných rovin) byl zpracován pomocí ZEN Black a ZEN Blue.

#### 4.7.35 Stabilní transformace *Arabidopsis thaliana*

Do 20 ml tekutého LB média obsahující spektinomycin (50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a rifampicin (50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) bylo přeneseno 50  $\mu\text{l}$  bakteriální suspenze *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101, které neslo konstrukt *pSPL1::eGFP:SPL1*, nebo *p35S::eGFP:SPL1*, uchovávané dlouhodobě v 25% (v/v) glycerolu při -80 °C. Bakteriální kultura byla kultivována (180 RPM, přes noc, 25 °C, tma). 5 ml bakteriální suspenze bylo následně přeneseno do Erlenmayerovy baňky s 250 ml sterilního YEB média, bez, pro rostliny toxických, antibiotik a kultivováno (180 RPM, 25 °C, tma) do doby dosažení  $\text{OD}_{600}$  0,8 bakteriální kultury. Při vysoké hodnotě  $\text{OD}_{600}$  (větší než 0,8) byla hodnota  $\text{OD}_{600}$  bakteriální suspenze upravena pomocí YEB média na  $\text{OD}_{600}$  0,8 podle rovnice:

$$V = \left( \frac{V_1 \cdot OD_{600}}{OD_{600\text{požadované}}} \right) - V_1$$

V je objem přidaného YEB média nutného pro dosažení požadovaného OD<sub>600</sub>; V<sub>1</sub> je aktuální objem bakteriální kultury v YEB médiu (250 ml); OD<sub>600</sub> je aktuálně naměřená hodnota OD<sub>600</sub>; a OD<sub>600</sub>požadované je výsledné požadované OD<sub>600</sub> (0,8).

Rostliny *Arabidopsis thaliana* Col0 a *spl1.1* byly přeneseny z kultivační místnosti do laboratoře a byly z nich odstraněny již vytvořené šesule a opylené květy. Transformace byla provedena nejdříve po uplynutí 2 hodin.

Pro transformaci byla využita 500ml kádinka, do které byla přelita bakteriální kultura (nejméně 250 ml). K bakteriální kultuře bylo následně přidáno smáčedlo Silwet STAR (výsledná koncentrace byla 200 μl·l<sup>-1</sup> Silwet STAR) a obsah kádinky byl šetrně promíchán. Nadzemní část *Arabidopsis thaliana* byla následně ponořena na 8 sekund do připravené bakteriální kultury. Pomocí ubrousku byla z rostliny odstraněna nadbytečná tekutina. Transformované rostliny byly překryty černou fólií a umístěny do kultivační místnosti. Fólie byly z rostlin odstraněny následující den.

#### 4.7.36 Selekcce stabilně transformovaných *Arabidopsis thaliana*

Semena (generace T<sub>1</sub>) dříve transformovaných rostlin byla sklizena, pečlivě vysterilizována a vyseta na Petriho misku s 1/2MS médiem obsahující PPT (10 μg·ml<sup>-1</sup>). Rostliny byly kultivovány za podmínek uvedených v kapitole 4.7.4 Kultivace *Arabidopsis thaliana* *in vitro*. Konfirmace byla provedena u tří týdnů starých rostlin detekcí signálu eGFP (ZEISS Axio Zoom V16, 80X) a pomocí PCR.

PCR byla provedena s využitím Phire Hot Start II DNA polymerasy podle postupu, který je uveden v kapitole 4.7.5 Genotypová analýza, s odlišnou hodnotou teploty anelace (60,8 °C). Pro detekci byly použity primery eGFP\_C\_F (5'-GATCACATGGTCCTGCTG-3') a výše uvedený SALK\_134584-RP (viz 4.7.5 Genotypová analýza). Předpokládaná velikost fragmentu byla 244 bp. Horizontální elektroforetická separace byla provedena podle výše uvedeného postupu. Jako pozitivní kontrola byly použity 3 ng plasmidu *pSPL1::eGFP:SPL1-pB7m34GW*.

#### 4.7.37 Kvasinkový dvouhybridní systém

*Saccharomyces cerevisiae*, Y2HGold byly kultivovány (160 RPM, 1–2 dny, 30 °C) a následně transformovány podle následujícího postupu. Postupně byly centrifugovány (300 g, 1 minuta, laboratorní teplota) 3 ml suspenze kvasinkových buněk v YPD médiu v 1,5ml mikrozkuvkách. Pelet byl rozpuštěn v 1 ml LiAc, 100 mmol·l<sup>-1</sup>, inkubován (5 minut, 37 °C)

a následně centrifugován (300 g, 1 minuta, laboratorní teplota). Supernatant byl dekantován a nahrazen směsí pro kotransformaci kvasinek: 240 µl PEG 3350, 50% (w/v); 36 µl LiAc, 1 mol·l<sup>-1</sup>; 5 µl izolované plasmidové DNA (100 ng–5 µg; 1. vektor); 5 µl izolované plasmidové DNA (100 ng–5 µg; 2. vektor); 50 µl sterilní deionizované vody; a 5 µl Sheared salmon sperm DNA, 10 mg·ml<sup>-1</sup> (před použitím bylo inkubováno 5 minut při 90 °C a následně uchováno na ledě). Byly použity následující vektory: (i) pGADT7 AD-*SPL1*; (ii) pGBKT7; (iii) pGBKT7-*SPL1*; (iv) pGADT7 AD; (v) T; a (vi) p53. Mikrozkušavka obsahující pelet kvasinek a směs pro kotransformaci kvasinek byla intenzivně promíchána pomocí vířivé třepačky (1 minuta). Obsah mikrozkušavky byl inkubován (50 minut, 42 °C), centrifugován (1850 g, 1 minuta, laboratorní teplota) a supernatant následně odebrán. Pelet byl rozpuštěn ve 200 µl YPD. Vzniklá bakteriální suspenze byla rozprostřena na Petriho misku s obsahem SD2. Byla provedena kultivace kvasinkové kultury (2–4 dny, 30 °C).

Po provedení kultivace byly kvasinky narostlých kolonií přeneseny pomocí sterilního párátko do 3 ml tekutého SD2 (absence želírující látky). Pro každou kombinaci byly nezávisle odebrány a kultivovány (160 RPM, 1–2 dny, 30 °C) kvasinky pocházející ze 3 kolonií (3 biologické repliky).

Po provedení kultivace bylo 100 µl kvasinkové suspenze přemístěno do 1,5ml sterilní mikrozkušavky a 5X naředěno. Hodnota OD<sub>600</sub> byla upravena podle nejnižší hodnoty OD<sub>600</sub> měřené kvasinkové suspenze. 1 µl kvasinkové suspenze byl přenesen na médium (i) SD2; (ii) SD3; (iii) SD3+AT; a (iv) SD4, kde SD2 je médium pro selekci kvasinek a SD3, SD3+AT a SD4 jsou selektivní média určená pro hodnocení interakce, které jsou seřazeny podle vzrůstající hodnoty stringence. Pro každou kvasinkovou suspenzi byly provedeny právě 4 technické repliky.

Po čtyřech dnech kultivace byl pořízen obrazový záznam pomocí Image Scanner III (GE Healthcare) a bylo provedeno kvalitativní hodnocení přítomnosti kvasinkových kolonií.

#### 4.7.38 Příprava konstruktů pro bimolekulární fluorescenční komplementace

Pro bimolekulární fluorescenční komplementaci (BIFC; bimolecular fluorescence complementation) byla použita dříve izolovaná cDNA z *Arabidopsis thaliana* Col0. Fragment cDNA byl amplifikován pomocí PCR s využitím iProof polymerasy (viz kapitola 4.7.22 Amplifikace parciální části T-DNA inserčního lokusu pomocí PCR) a primerů BiFC\_SPL1\_F (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCATGGAAGCTAG AATTGATGAAG-3') a BiFC\_SPL1\_STOP\_R (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTGTCAGCTTGTTCATAGTCC-3'). Byla provedena změna teplotního programu v podobě teploty anelace (59,6 °C) a doby extenze (90 sekund). Očekávaná velikost PCR produktu fragmentu cDNA *SPL1* byla 2707 bp. Získaný PCR produkt byl purifikován a 89,3 ng

rekombinováno pomocí BP clonasy se vstupním vektorem pDONR 221 podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.25 Příprava fúzních konstruktů. Plasmidová DNA obsahující kódující sekvenci (CDS; coding sequence) *SPL1* (*SPL1*-pDONR 221) byla štěpena pomocí restriční endonukleasy podle metodiky uvedené výše (viz 4.7.30 Štěpení pomocí restričních endonukleas), pomocí enzymu *PvuII* (očekávaná velikost fragmentů: 2660, 1942, 591 bp).

Sekvencováním verifikovaný vektor byl použit pro LR rekombinaci do destinačních vektorů pBIFC2 (YFPn) a pBIFC3 (YFPc) pro N-terminální fúzi (celkový objem jedné reakce 10  $\mu$ l): x  $\mu$ l *SPL1*-pDONR 221 (80 ng; x je objem pro dosažení množství 80 ng daného plasmidu); y  $\mu$ l pBIFC2 (150 ng; y je objem pro dosažení množství 150 ng daného plasmidu); z  $\mu$ l destilované vody (z je objem použité destilované vody pro doplnění reakce na objem 8  $\mu$ l); a 2  $\mu$ l LR clonasy. Před použitím byla LR clonasa vytažena z mrazicí jednotky (-20 °C), promíchána pomocí vířivé třepačky a krátce centrifugována. Alternativně byl pBIFC2 nahrazen pBIFC3 při zachování stejných parametrů reakční směsi.

Dále bylo postupováno stejně jako ve výše uvedené metodice (4.7.25 Příprava fúzních konstruktů). Byla provedena verifikace vybraných klonů na základě provedení restričního štěpení s očekávanou velikostí fragmentů při použití restriční endonukleasy *PvuII* *SPL1*-pBIFC2 (8018, 4177, 1017 bp), pBIFC2 (prázdný vektor; 8018, 2333, 1867 bp), *SPL1*-pBIFC3 (8017, 3967, 1018 bp) a pBIFC3 (prázdný vektor; 8017, 2123, 1868 bp).

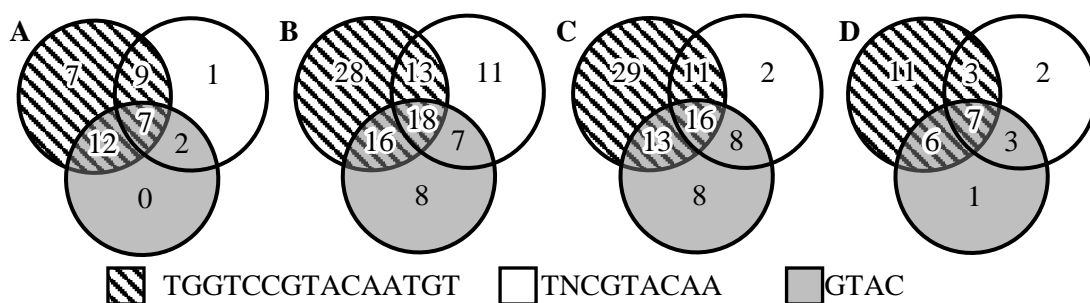
## 5 Výsledky

### 5.1 Bioinformatická predikce SPL-regulovaných genů

Bioinformatická analýza promotorů genů, které kódují proteiny identifikované v rámci dříve provedených proteomických analýz diferenciálních proteomů mutantů *Arabidopsis mpk3.1* (Takáč *et al.*, nepublikováno), *mpk4*, *mpk6.2* (Takáč *et al.*, 2016) a interaktomu FSD1 (Dvořák *et al.*, nepublikováno), byla provedena za účelem identifikace možných cílových genů SPL. Tyto geny by v rámci dráhy MPK-SPL-SOD, která byla nastíněna v bakalářské práci díky identifikaci MAPK jako potenciálních regulátorů SPL (Zeiner, 2019) a popsané regulace *FSD1* pomocí SPL7 (Mermod *et al.*, 2019), mohly být také regulovány právě pomocí SPL, respektive SPL1. Předpokladem je změna abundance proteinů na základě deregulace SPL v rostlinách s mutovaným výše uvedeným genem *MPK*. Využití interaktomu FSD1 naopak předpokládá zapojení interakčních partnerů do stejných biologických procesů, tedy jejich koexpresi a potenciální regulaci stejnými TF. Výsledky této analýzy jsou ukázány v příloze 1–4, kde jsou uvedeny i promotory genů, u kterých byla již dříve nastíněna regulace pomocí SPL (*API*, Birkenbihl *et al.*, 2005; *FSD1*, Mermod *et al.*, 2019; *FUL*, *LFY*, Yamaguchi *et al.*, 2009). V provedených analýzách sloužily jako kontrolní sekvence.

Získaná data mohou být využita při identifikaci cílových genů při studiu MPK-SPL-SOD signalizační dráhy. Pro každý datový soubor, kde byly identifikovány hledané motivy, vyplývá, že dochází k překryvu nezávislých analýz (Obrázek 4A–D; Příloha 1), které byly provedeny pro motivy získané z dostupné literatury. Pro regulaci exprese genů pomocí SPL se jeví esenciální přítomnost více GTAC motivů v rámci 65 bp v 500 bp promotorové sekvence od translačního startu (Andrés-Colás *et al.*, 2013). Proto jsou v Obrázku 4E uvedeny geny, které se vyznačují nejvyšší koncentrací GTAC motivů do relativně úzké oblasti promotoru. Tato koncentrace GTAC motivů je podobná jako u promotorové oblasti *FSD1* (Příloha 2, Datový soubor: Kontrola; Andrés-Colás *et al.*, 2013). Uvedeny jsou i další identifikované motivy, pokud obsahují GTAC klíčový motiv. Především identifikace motivu TGGTCCGTACAATGT, respektive podobné sekvence (Obrázek 4E; Příloha 4), může ukazovat na potenciální regulaci pomocí SPL1 (Birkenbihl *et al.*, 2005).

Na příkladu diferenciálního proteomu mutantu *mpk3.1* (dohromady 108 proteinů) může být demonstrován výběr kandidátních genů. Jako výsledek analýzy bylo identifikováno 49 genů, které obsahovaly dva a více GTAC motivů v analyzované sekvenci promotoru (Příloha 2). Na základě koncentrace tohoto motivu do úzké promotorové oblasti byl vybrán gen *HEAVY METAL ASSOCIATED PROTEIN 31* (*HMP31*; AT3G56240).



**E**

AGI	Gen	Datový soubor	Hledaný motiv	Relativní pozice k START [bp]		Identifikovaná sekvence
AT1G53240	<i>MMDHI</i>	FSD1 interaktom	GTAC	320	323	GTAC
				339	342	GTAC
				364	367	GTAC
				416	419	GTAC
				808	811	GTAC
AT3G56240	<i>HMP31</i>	<i>mpk3.1</i> proteom	GTAC	285	288	GTAC
				291	294	GTAC
				318	321	GTAC
				340	343	GTAC
				847	850	GTAC
AT4G13850	<i>GRP2</i>	<i>mpk3.1</i> a <i>mpk6.2</i> proteom	GTAC	291	294	GTAC
				468	471	GTAC
				489	492	GTAC
				510	513	GTAC
				547	550	GTAC
				565	568	GTAC
				966	969	GTAC
AT3G13930	<i>MTE2-2</i>	<i>mpk4</i> proteom	TGGTCCGTACAATGT	559	573	TTGAGTGTACGATGT
			GTAC	141	144	GTAC
			339	342	GTAC	
			354	357	GTAC	
			429	432	GTAC	
AT4G26910	<i>DLST</i>	<i>mpk4</i> proteom	TNAGTACAA	139	147	TGAGTACAA
			GTAC	451	454	GTAC
			552	555	GTAC	
			592	595	GTAC	
			753	756	GTAC	
			GTAC	941	944	GTAC

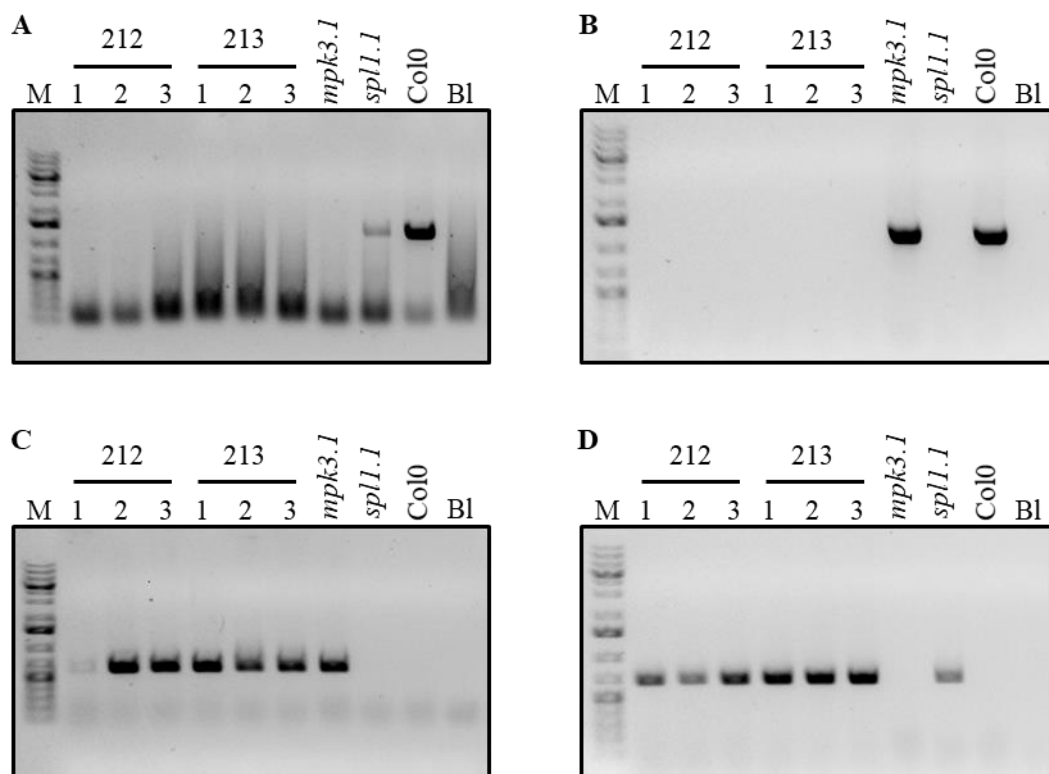
**Obrázek 4:** Analýza promotorových oblastí genů kódující proteiny identifikované v interaktomu FSD1 a v diferenciálních proteomech mutantních rostlin *mpk3.1*, *mpk4*, *mpk6.2*. Vennovy diagramy (A–D) ukazují překryv výsledků nezávislých analýz použitých motivů (TGGTCCGTACAATGT, TNCGTACAA, GTAC; Příloha 1). A – interaktom FSD1 (Dvořák *et al.*, nepublikováno); B – proteomická analýza mutantu *mpk3.1* (Takáč *et al.*, nepublikováno); C – proteomická analýza mutantu *mpk4* (Takáč *et al.*, 2016); D – proteomická analýza mutantu *mpk6.2* (Takáč *et al.*, 2016); E – tabulka vybraných genů. V tabulce jsou uvedeny u daných genů i další identifikované motivy obsahující GTAC motiv. AGI – identifikátor genu.

Gen *HMP31* se tak jeví jako zajímavý kandidát pro další studie. Analýzou bylo dále identifikováno 49 a 75 genů pro sekvenční dotazy TNCGTACAA (Příloha 3), respektive TGGTCCGTACAATGT (Příloha 4).

Výsledky této analýzy pro sekvenčně delší motivy, tedy TNCGTACAA (Příloha 3) a TGGTCCGTACAATGT (Příloha 4), poskytují informace, kde ne všechny záznamy obsahují klíčový GTAC motiv. Tyto motivy, potažmo geny obsahující v promotorové sekvenci tyto motivy, nicméně mohou být uvažovány jako potenciálně regulované i bez jeho přítomnosti v těchto sekvenčně delších elementech. Možný je význam přítomnosti těchto delších motivů bez nutnosti obsahu GTAC, který je však přítomen v jiné části promotoru.

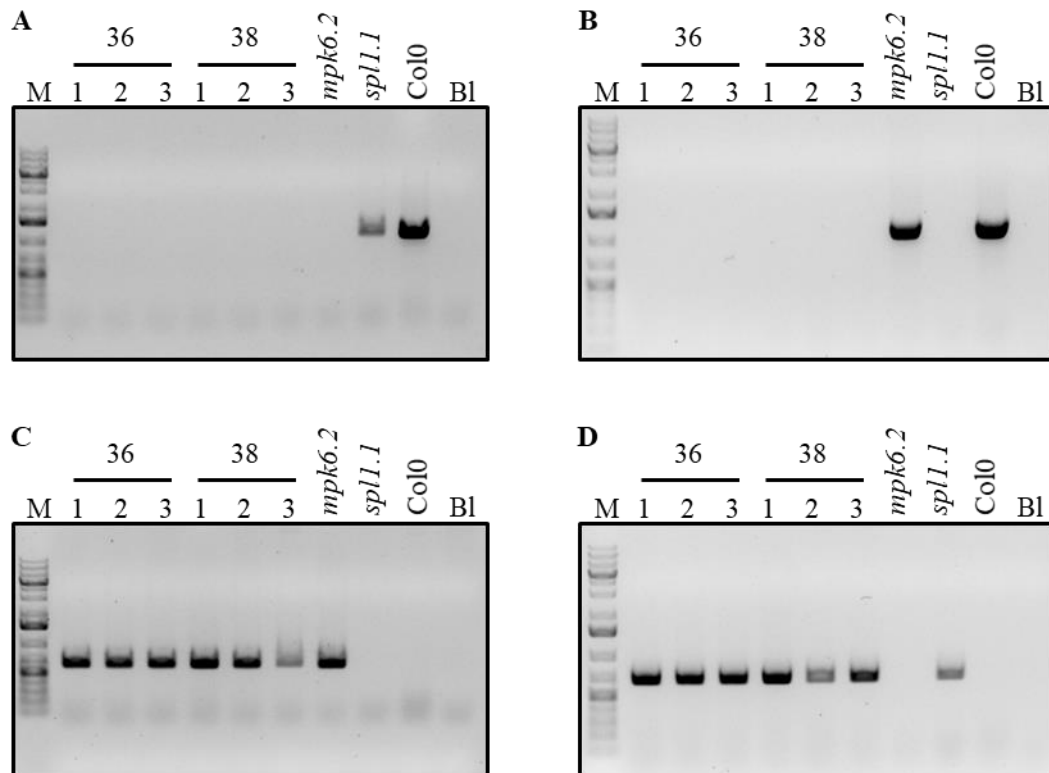
## 5.2 Příprava linií dvojitých mutantů *spl1.1/mpk3.1* a *spl1.1/mpk6.2*

Pro budoucí studium vztahu SPL1 a MPK3, nebo MPK6 byly připraveny linie dvojitých mutantů *spl1.1/mpk3.1* (Obrázek 5) a *spl1.1/mpk6.2* (Obrázek 6). Pro křížení byl vždy využit mutant *spl1.1* jako mateřská rostlina. Úspěšnému zisku hybridní F1 generace předcházela neúspěšný pokus s využitím mutantu *spl1.1* jako donora pylu. Při této možnosti nebyla získána hybridní F1 generace. To ukazuje na možnost snížení opylovací schopnosti pylových zrn *spl1.1*.



**Obrázek 5:** Identifikace T-DNA inserce v rostlinách F3 generace *spl1.1* x *mpk3.1* kříženců. A – detekce divoké alely genu *MPK3*; B – detekce divoké alely genu *SPL1*; C – detekce T-DNA inserce v genu *MPK3*; D – detekce T-DNA inserce v genu *SPL1*. M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 212, 213 – analyzované rostliny; 1–3 – technické repliky; Col0 – rostlina divokého typu; Bl – slepý vzorek.





**Obrázek 6:** Identifikace T-DNA inserce v rostlinách F3 generace *spl1.1* x *mpk6.2* kříženců. A – detekce divoké alely genu *MPK6*; B – detekce divoké alely genu *SPL1*; C – detekce T-DNA inserce v genu *MPK6*; D – detekce T-DNA inserce v genu *SPL1*. M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 36, 38 – analyzované rostliny; 1–3 – technické repliky; Col0 – rostlina divokého typu; Bl – slepý vzorek.

Po úspěšném zisku hybridní F1 generace byly rostliny následně kultivovány a samosprášeny. Byla provedena selekce F2 generace pomocí PCR a výběr rostlin pro další analýzy.

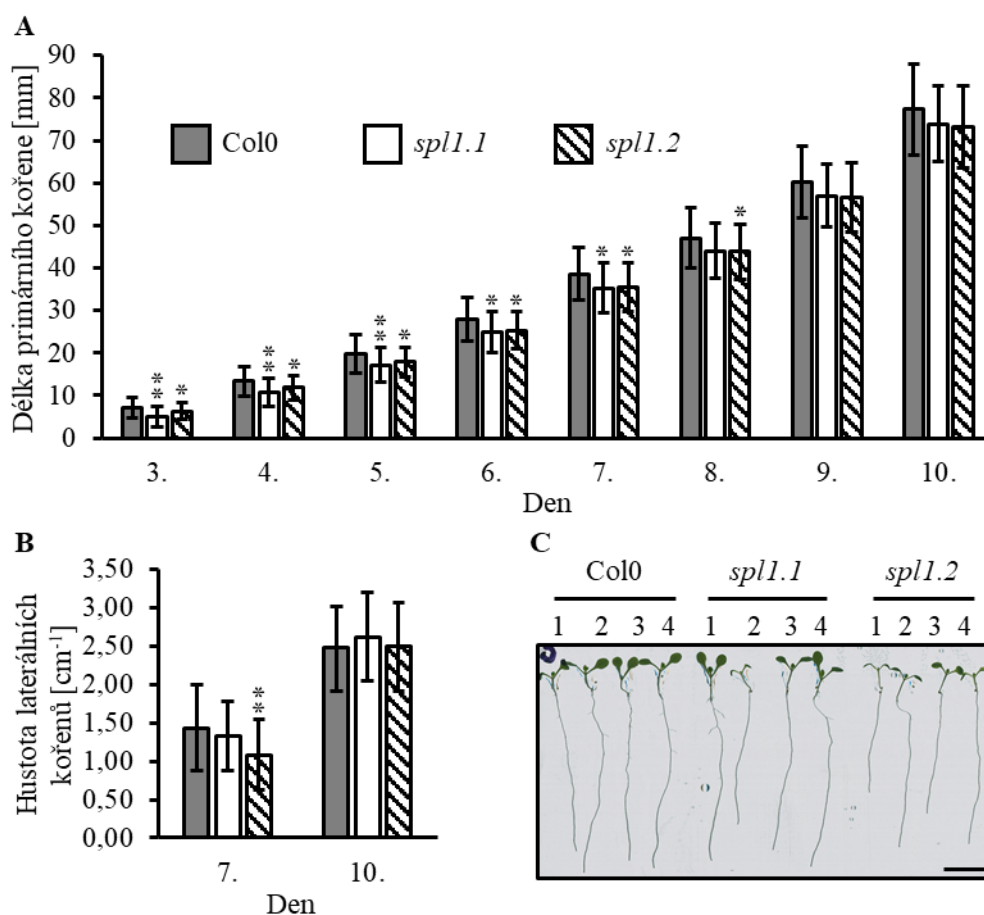
V F3 generaci byli získáni pro každou linii dva homozygotní jedinci s narušeným genem *SPL1* a *MPK3* (Obrázek 5), nebo *SPL1* a *MPK6* (Obrázek 6) T-DNA insercí na obou homologních chromosomech. Přítomnost T-DNA inserce v daném lokusu byla indikována přítomností specifického produktu při kombinaci primerů pro její detekci (Obrázek 5C, D a 6C, D). Velikost PCR produktu, která byla navíc shodná s velikostí fragmentu v pozitivní kontrole, ukazovala na úspěšnou detekci dané alely. U selektovaných rostlin nebyla detekována alela divokého typu (Obrázek 5A, B a 6A, B). Problematickým se může zdát pár primerů pro detekci alely divokého typu *MPK3* (Obrázek 5A), kde byly detekovány nespecifické produkty. Vznik nespecifických produktů byl pozorován i v rámci analýz předchozích generací F1 a F2. Jelikož však nedošlo k detekci specifického produktu (Obrázek 5A, dráha *spl1.1* a Col0), je tento výsledek považován za průkazný. Úspěšně byly připraveny linie dvojitých mutantů *spl1.1/mpk3.1* a *spl1.1/mpk6.2*.

Selektované rostliny byly přeneseny do hlíny (Příloha 5). Za zmínku stojí fenotypové rozdíly mezi dvojitými mutanty *spl1.1/mpk3.1* (Příloha 5A, C) a *spl1.1/mpk6.2* (Příloha 5B, D),

kteřé byly pozorované čtvrtý týden po vyklíčení. Fenotypové projevy obou mutantních rostlin *spl1.1/mpk3.1* 212 (Příloha 5A, C) a 213 byly shodné. Tyto rostliny vykazovaly trpasličí fenotyp a neschopnost produkce generativních orgánů. Shoda ve fenotypovém projevu byla pozorována i mezi rostlinami *spl1.1/mpk6.2* 36 (Příloha 5B, D) a 38.

### 5.3 Fenotypová analýza mutantních rostlin *spl1.1* a *spl1.2*

S cílem blíže charakterizovat selektované T-DNA inserční linie byla provedena fenotypová analýza, která se v první části zabývala vlivem absence SPL1 pro ranný vývoj rostlin (Obrázek 7).



**Obrázek 7:** Fenotypová analýza kořenů semenáčků mutantů *spl1.1* a *spl1.2*. A – délka primárního kořene třetí až desátý den po vyklíčení; B – analýza hustoty laterálních kořenů mutantů *spl1* sedmý a desátý den po vyklíčení; C – snímky rostlin sedmý den po vyklíčení. Měřitko – 10 mm. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Počet rostlin pro daný genotyp byl Col0 (n = 58), *spl1.1* (n = 39) a *spl1.2* (n = 53). Pro vyhodnocení statistické signifikance rozdílu mutantů (*spl1.1* a *spl1.2*) od rostlin divokého typu (Col0) byl použit jednofaktorový ANOVA test. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

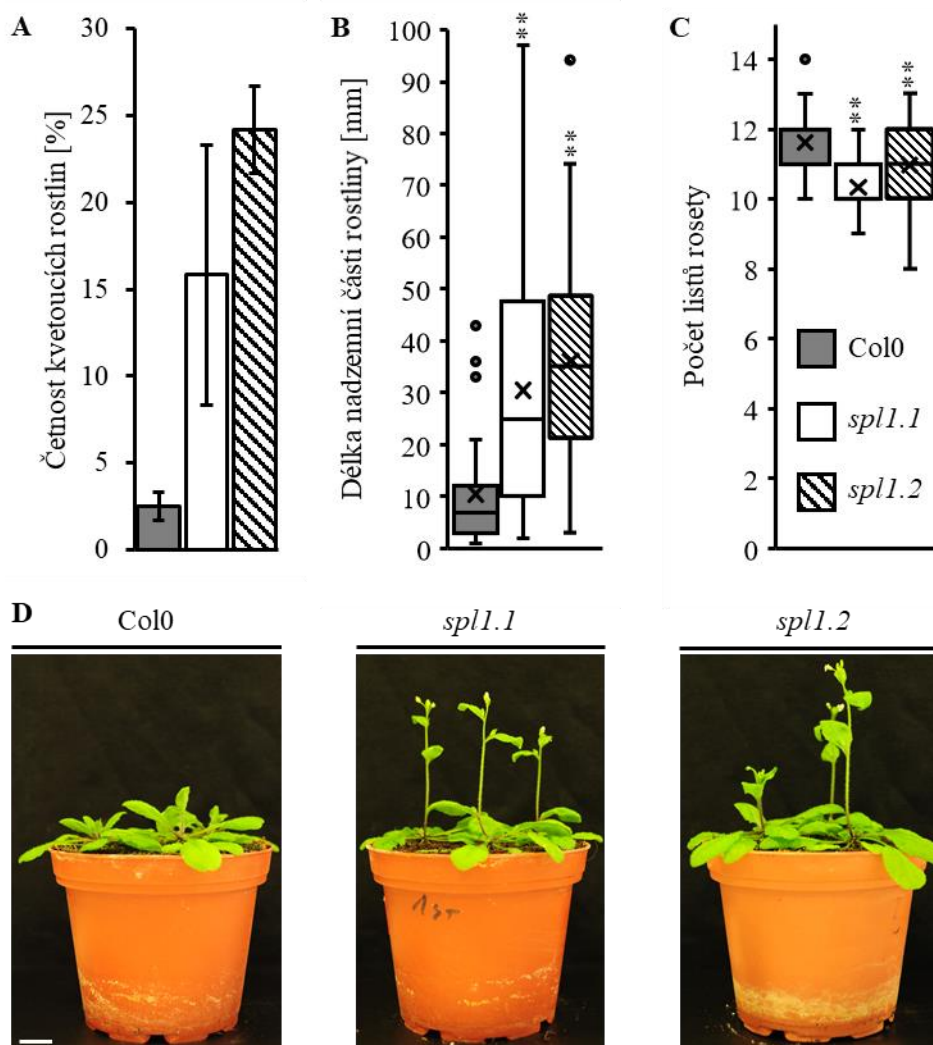
Byly využity dříve selektované linie mutantů *spl1* se dvěma nezávislými alelami *spl1.1* a *spl1.2* (Zeiner, 2019). Od prvního dne pozorování (Obrázek 7A), bylo pozorováno snížení délky primárního kořene u mutantů *spl1.1* v porovnání s rostlinami divokého typu průměrně o  $2,92 \pm 0,59$  mm a u mutantů *spl1.2* o  $2,62 \pm 0,69$  mm. Tento trend byl od třetího do sedmého dne statisticky podložen na minimální hladině statistického významu  $p < 0,05$ . U mutantů *spl1.2* bylo snížení délky hlavního kořene statisticky podloženo i osmý den. Zkrácená délka kořene se může jevit jako výrazná především v první dny pozorování. S prodlužující se délkou primárního kořene se však rozdíl mezi rostlinami Col0, rostlinami divokého typu, a mutanty *spl1* stal zanedbatelný, následně i statisticky nepodložený.

Hustota laterálních kořenů (Obrázek 7B) byla analyzována sedmý a desátý den. Byly pozorovány minimální rozdíly mezi rostlinami mutantů *spl1* a Col0 u obou indikovaných dnů. Sedmý den však bylo snížení hustoty laterálních kořenů *spl1.2* statisticky podloženo. Sedmý den nebylo u *spl1.1* pozorováno snížení hustoty laterálních kořenů ( $1,33 \pm 0,45 \text{ cm}^{-1}$ ) oproti Col0 ( $1,43 \pm 0,56 \text{ cm}^{-1}$ ). U mutantů *spl1.2* byla změna v hustotě laterálních kořenů nízká, v porovnání s rostlinami mutantů *spl1.1* však byla vyšší. Desátý den nebyly pozorovány žádné změny v hustotě laterálních kořenů.

Celkově malé rozdíly sledovaných znaků mohou být způsobeny přítomností funkčně redundantních SPL a/nebo malým významem SPL1 v ranných fázích ontogeneze. Z tohoto důvodu byla v další části práce věnována pozornost významu SPL1 pro pokročilejší vývojová stádia (viz Obrázek 8).

Třicátý den po vysetí semen do hlíny byla zjišťována četnost kvetoucích rostlin (Obrázek 8A). Četnost kvetoucích rostlin byla výrazně vyšší u mutantů *spl1.1* a *spl1.2* v porovnání s rostlinami Col0. Tyto výsledky však nemohou být statisticky podpořeny. To je spojováno s nízkým počtem opakování (dvě opakování), který zabraňuje zisku statistické podpory. Změna počtu kvetoucích rostlin byla reprodukovatelná v rámci opakování experimentu. Byla pozorována také významná elongace prýtu (Obrázek 8B) rostlin mutantů *spl1.1* a *spl1.2*, která nebyla pozorována u rostlin Col0, rostlin divokého typu. Elongace prýtu byla i statisticky podložena. Zajímavá je i penetrance a variabilita pozorovaného znaku. Tato data také odpovídají pozorováním populací rostlin použitých genotypů, u kterých délka prýtu umožňovala jednoznačně oddělit zástupce populací T-DNA inserčních linií od rostlin Col0 (Obrázek 8D).

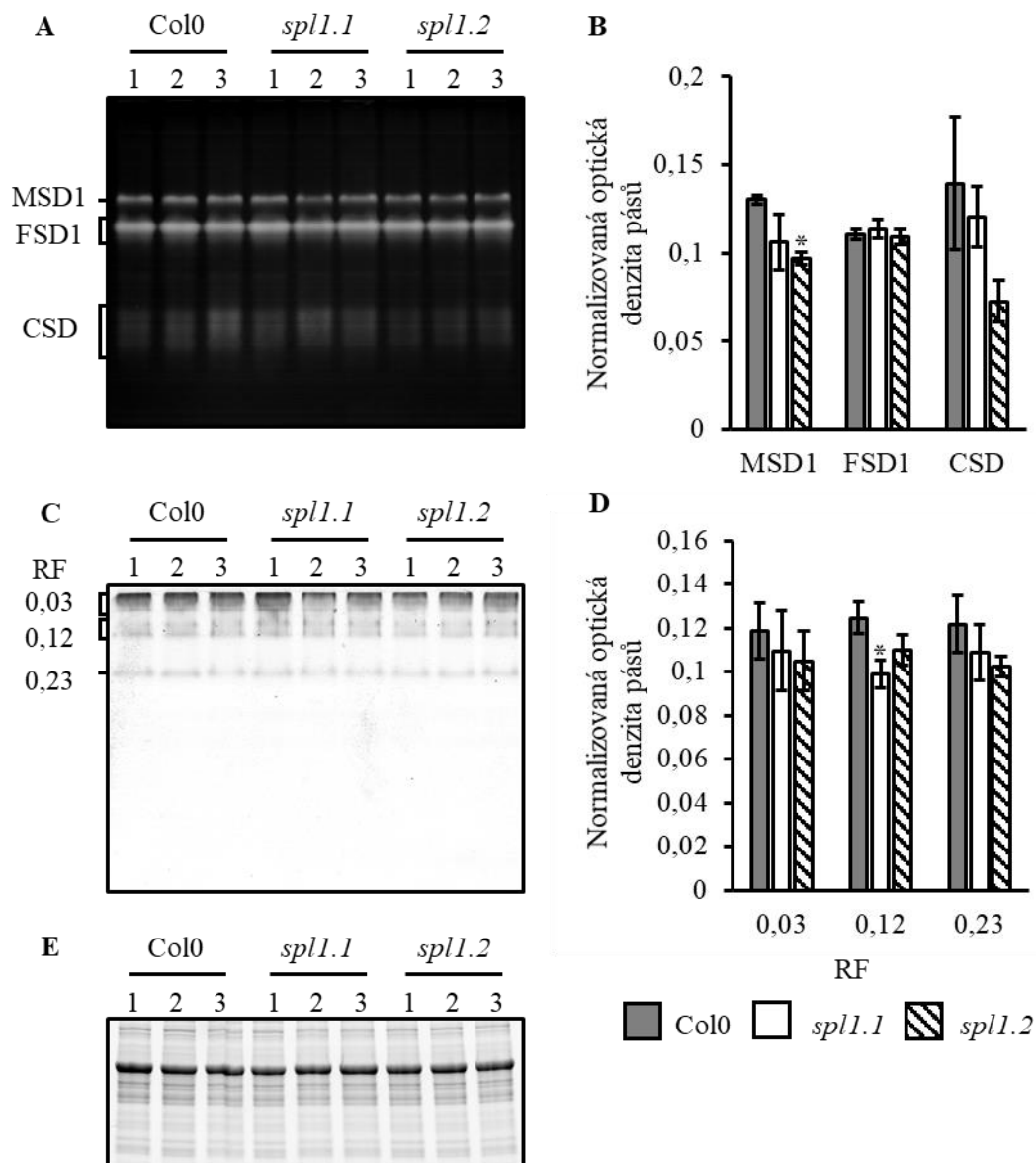
Informace o kvetení a elongaci prýtu bylo nutné vztáhnout k počtu listů listové růžice (Obrázek 8C), který slouží jako indikátor stupně ontogenetického vývoje, tedy zda rostliny třicátý den po vysetí vykazovaly stejný stupeň vývoje. Zde byl patrný vyšší počet listů listové růžice Col0 ( $11,6 \pm 0,9$ ). Počet listů listové růžice mutantních rostlin *spl1.1* ( $10,3 \pm 0,8$ ) a *spl1.2* ( $11,0 \pm 1,0$ ) byl nižší. Tento rozdíl byl také statisticky podložen. Toto dokazuje dřívější kvetení a elongaci prýtu mutantů *spl1*.



**Obrázek 8:** Fenotypová analýza třicetidenních mutantů *spl1.1* a *spl1.2*. A – četnost kvetoucích rostlin; B – délka nadzemní části rostliny; C – počet listů listové růžice; D – reprezentativní snímky rostlin Col0 a mutantů *spl1.1* a *spl1.2*. Měřitko – 10 mm. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Křížek představuje průměrnou hodnotu a horizontální čára medián. Počet rostlin pro jedno opakování byl n = 30; 2 opakování. Pro vyhodnocení statistické signifikance rozdílu mutantů (*spl1.1* a *spl1.2*) od rostlin divokého typu (Col0) byl použit jednofaktorový ANOVA test. \*\* p < 0,01.

#### 5.4 Biochemická analýza mutantů *spl1.1* a *spl1.2*

Byla provedena biochemická analýza dříve selektovaných T-DNA inserčních linií. Tato analýza měla za cíl základní charakterizaci vztahu SOD, zejména FSD1, a SPL1. V prvním kroku byla zkoumána enzymatická aktivita SOD (Obrázek 9A, B). Analýza byla provedena za účelem identifikace deregulace SOD, která by mohla být spojena s absencí SPL1. Použitá metoda umožňuje samostatnou detekci aktivity MSD1, FSD1 a CSD (Obrázek 9A). Pro účely kontroly nanášeného množství proteinů byla část extraktu odebrána a zpracována jako pro elektroforetickou separaci proteinů za denaturujících podmínek (Obrázek 9E).



**Obrázek 9:** Hodnocení enzymatické aktivity SOD a peroxidas desetidenních mutantů *spl1.1* a *spl1.2*. A, B – enzymatická aktivita SOD; A – vizualizace aktivit SOD; B – kvantifikace normalizované optické denzity pásů aktivit SOD; C, D – enzymatická aktivita peroxidas; C – detekce aktivity tří separovatelných izozymů peroxidas; D – kvantifikace normalizované optické denzity pásů aktivit peroxidas; E – kontrola nanášení množství proteinů na gel pomocí detekce v StainFree gelu. RF – retenční faktor; 1–3 – biologické repliky. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Pro vyhodnocení statistické signifikance rozdílu mutantů (*spl1.1* a *spl1.2*) od rostlin divokého typu (Col0) byl použit jednofaktorový ANOVA test. \* $P < 0,05$ .

Pomocí analýzy obrazového záznamu bylo identifikováno snížení aktivity MSD1 u mutantů *spl1.1* ( $0,1062 \pm 0,0160$ ) a *spl1.2* ( $0,0967 \pm 0,0035$ ) v porovnání s rostlinami divokého typu Col0 ( $0,1304 \pm 0,0025$ ). Snížení aktivity MSD1 u linie *spl1.2* bylo i statisticky významné.

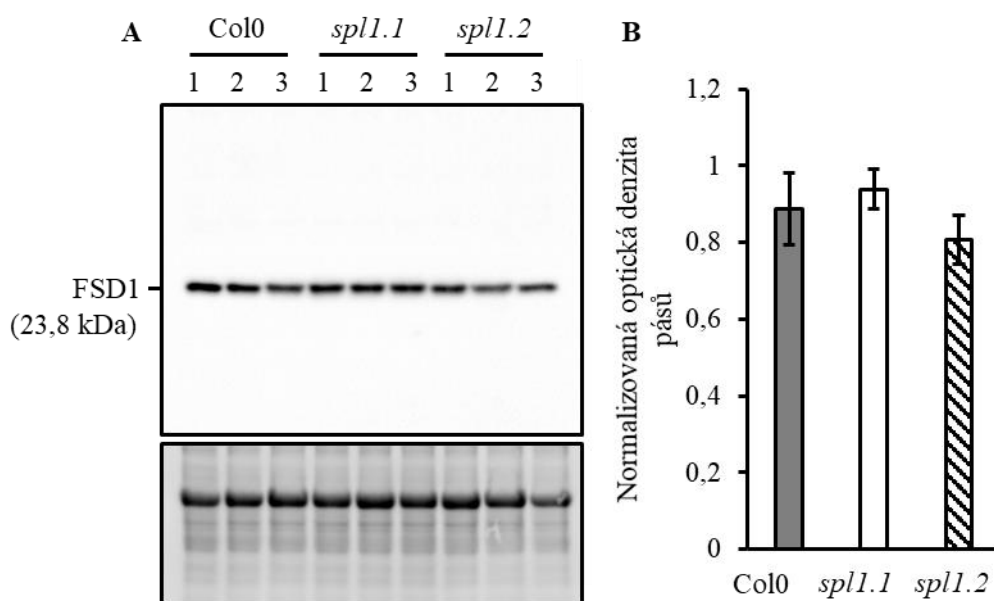
Nebyla pozorována změna enzymatické aktivity FSD1 u mutantů *spl1.1* ani *spl1.2*.

Pro CSD byly pozorovány nejvýraznější změny enzymatické aktivity, především u mutantu *spl1.2* ( $0,0728 \pm 0,0117$ ), kde došlo k významnému snížení normalizované hodnoty

optické denzity pásů asi na polovinu oproti divokému typu Col0 ( $0,1396 \pm 0,0380$ ). Méně výrazné snížení aktivity CSD bylo pozorováno i u mutantů *spl1.1* ( $0,1209 \pm 0,0172$ ). Ani u jednoho z T-DNA inserčních mutantů nebyla změna aktivity CSD statisticky významná. Absence statistického významu je spojována především s relativně velkým rozptylem získaných hodnot normalizované optické denzity pásů.

Získané informace o aktivitách SOD naznačují, že SPL1 má vliv na aktivitu MSD1, případně CSD, ne však FSD1, o které je uvažováno jako o potenciálně regulované pomocí SPL1. Zda dochází i ke změně na úrovni proteinové abundance bylo analyzováno dále.

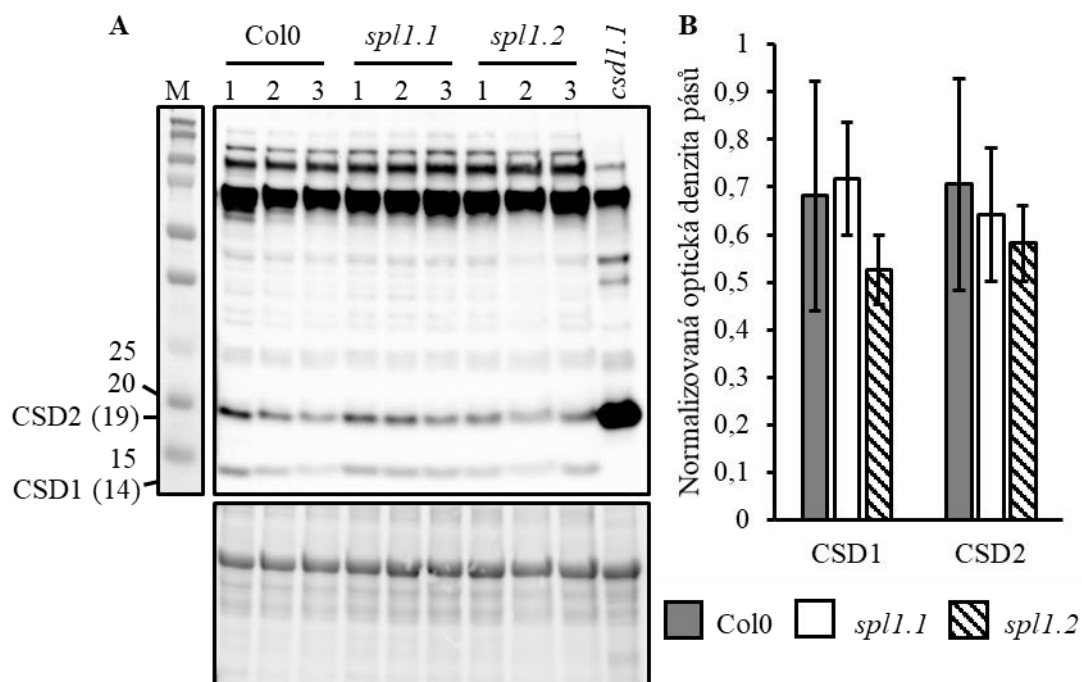
Na základě původního předpokladu, že SPL1 je zapojen do regulace exprese *FSD1*, byla analyzována abundance FSD1. Změna abundance FSD1 (Obrázek 10), analyzovaná pomocí imunoblotování (Obrázek 10A), neprokázala odlišnosti mezi rostlinami divokého typu Col0 a mutanty *spl1.1*, respektive *spl1.2* (Obrázek 10B). Potvrdil se předpoklad vytvořený na základě analýzy aktivit FSD1, že v *spl1* mutantech nedochází k deregulaci FSD1 na proteinové úrovni.



**Obrázek 10:** Kvantifikace abundance FSD1 pomocí specifické protilátky v desetidenních semenáčcích mutantů *spl1.1* a *spl1.2*. A – detekce FSD1. Dolní část ukazuje vyrovnanost naneseného množství proteinů vzorků v jednotlivých drahách pomocí detekce proteinů po přenosu na membránu (StainFree). 1–3 – biologické repliky. B – hodnocení normalizované optické denzity pásů. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Pro vyhodnocení statistické signifikance rozdílu mutantů (*spl1.1* a *spl1.2*) od rostlin divokého typu (Col0) byl použit jednofaktorový ANOVA test.

V návaznosti na zjištěnou změnu aktivity MSD1, především v mutantech *spl1.2* (viz Obrázek 9B), byla pomocí anti MSD protilátky detekována změna abundance MSD1 (data nejsou prezentována). Z důvodu nízké specifity použité protilátky a absence negativní kontroly (naše laboratoř nedisponuje *msd1* mutantem) kvantifikace nebyla provedena.

Pro stanovení proteinové abundance CSD byla použita anti CSD protilátka, která rozeznává CSD1 i CSD2 (Obrázek 11). CSD1 může být rozeznána díky komparativní analýze *csdl.1* T-DNA inserčního mutantu, absenci CSD1 v této linii (Obrázek 11A, dráha *csdl.1*). Pozorovaná zvýšená abundance CSD2 v *csdl.1* mutantech je spjata s kultivací rostlin, které byly použity pro tento vzorek, na médiu bohatém na měď (Mgr. Petr Dvořák, osobní korespondence). Vzorek *csdl.1* byl použit pouze pro potřeby kontroly protilátky.



**Obrázek 11:** Kvantifikace abundance CSD1 a CSD2 v desetidenních semenáčcích mutantů *spl1.1* a *spl1.2*. A – detekce CSD1 a CSD2. Dolní část ukazuje vyrovnanost naneseného množství proteinů vzorků v jednotlivých drahách pomocí detekce proteinů po přenosu na membránu (StainFree). 1–3 – biologické repliky; *csdl.1* – mutantní rostlina *csdl.1*, negativní kontrola protilátky; M – Precision Plus Protein Dual Color Standards (uvedeno v kDa). B – hodnocení normalizované optické denzity pásů CSD1 a CSD2. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Pro vyhodnocení statistické significance rozdílu mutantů (*spl1.1* a *spl1.2*) od rostlin divokého typu (Col0) byl použit jednofaktorový ANOVA test.

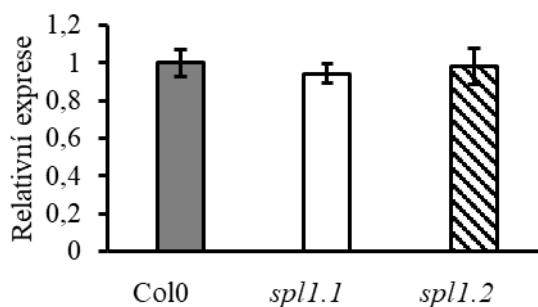
U mutantů *spl1.2* ( $0,5249 \pm 0,0731$ ) byla pozorována výraznější změna proteinové abundance CSD1 v porovnání s rostlinami *spl1.1* ( $0,7181 \pm 0,1185$ ), potažmo vůči rostlinám divokého typu Col0 ( $0,6811 \pm 0,2416$ ). Změna abundance CSD1 však nebyla výrazně odlišná, nebyla ani statisticky signifikantní (Obrázek 11B). Nebyla pozorována změna proteinové abundance CSD2. Hodnoty normalizované optické denzity pásů mutantů *spl1.1* ( $0,6415 \pm 0,1393$ ) a *spl1.2* ( $0,5813 \pm 0,0800$ ) se významně nelišily od Col0, rostlin divokého typu ( $0,7059 \pm 0,2219$ ; Obrázek 11B).

Vzhledem k zaměření této práce, studium propojení ROS a SPL, byla provedena analýza aktivit peroxidas (Obrázek 9C, D) pro charakterizaci mutantů *spl1*. Detekované isozymy byly

pojmenovány podle retenčního faktoru (RF). Nebylo pozorováno významné snížení aktivity peroxidas všech RF (Obrázek 9D). Nejvýznamnější změna aktivity byla pozorována pro izozym RF 0,12 mutanta *spl1.1* ( $0,0989 \pm 0,0064$ ). Snížení oproti rostlinám divokého typu Col0 ( $0,1246 \pm 0,0072$ ) bylo i statisticky významné. Z důvodu malé změny aktivit peroxidas jim dále nebyla věnována další pozornost.

## 5.5 Analýza změny exprese *FSD1* u mutantů *spl1*

Pro analýzu exprese *FSD1* byla využita metoda qRT-PCR. RNA izolovaná z desetidenních semenáčků *Arabidopsis thaliana* byla přepsána do cDNA. Po provedení ošetření RNA DNasou, pro minimalizaci kontaminace gDNA, byla provedena kontrola její integrity (Příloha 6). Izolovaná RNA byla využita pro přepis do cDNA, respektive kvantifikaci exprese *FSD1*. Po provedení vyhodnocení výsledků qRT-PCR nebyla zjištěna odlišná exprese genu *FSD1* u mutantních rostlin *spl1.1* ani *spl1.2* (Obrázek 12).



**Obrázek 12:** Relativní kvantifikace exprese *FSD1* v desetidenních semenáčcích mutantů *spl1.1* a *spl1.2*. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Pro vyhodnocení statistické signifikance rozdílu mutantů (*spl1.1* a *spl1.2*) od rostlin divokého typu (Col0) byl použit jednofaktorový ANOVA test.

## 5.6 Vliv mutace *SPL1* pro signalizaci ABA

S ohledem na poznatky Chao *et al.* (2017), které ukazují spojitost *SPL1* a *SPL12* s regulací signalizace ABA, byla studována odpověď *spl1* mutantů na exogenní aplikaci tohoto fytohormonu.

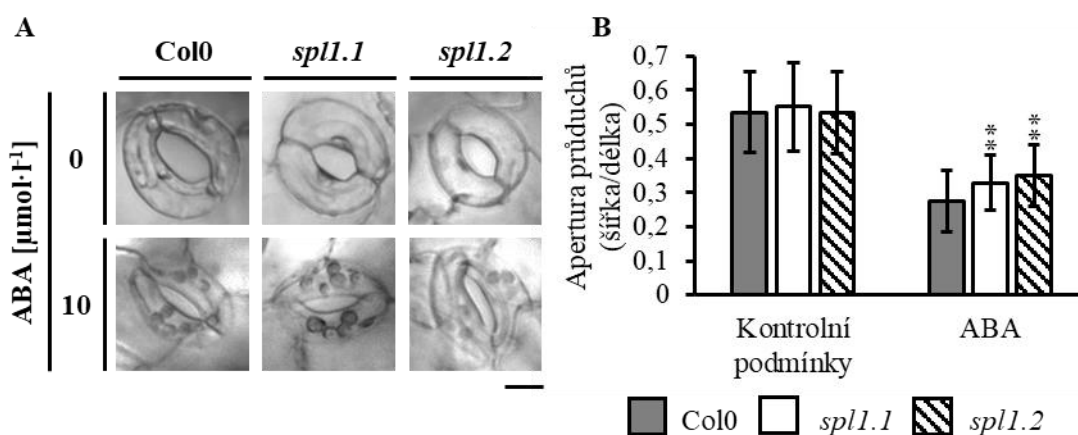
Nejprve byly analyzovány promotorové oblasti členů genové rodiny *SPL* s cílem identifikace ABRE (Obrázek 13). U dvou zástupců *SPL*, genů *SPL12* a *SPL15* (Obrázek 13B), byla identifikována přítomnost ABRE (Obrázek 13A), což by mohlo ukazovat na jejich vztah k signalizaci ABA. Zejména identifikace ABRE v promotorové oblasti genu *SPL12* je významný výsledek.





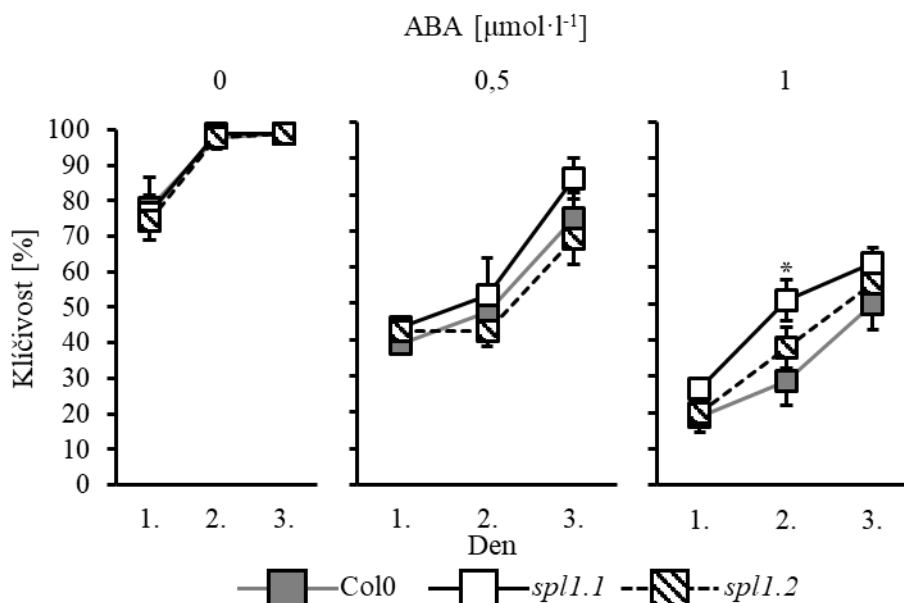
**Obrázek 13:** Identifikace responzivních elementů kyseliny abscisové v promotorových oblastech genů *SPL12* a *SPL15*. A – grafická reprezentace přiřazených sekvencí (MCACGTGTY; Takáč *et al.*, 2017), která byla vytvořena pomocí WebLogo (Crooks *et al.*, 2004); B – identifikované responzivní elementy kyseliny abscisové. AGI – identifikátor genu.

Vliv ABA na mutanty *spl1* byl hodnocen na základě apertury průduchů (Obrázek 14). ABA způsobila zavírání průduchů u všech linií, což bylo vyhodnoceno poměrem délky štěrbiny k její šířce (Obrázek 14A). Míra zavírání průduchů byla statisticky průkazně menší u obou mutantů (Obrázek 14B).



**Obrázek 14:** Analýza apertury průduchů mutantů *spl1.1* a *spl1.2* po aplikaci kyseliny abscisové (ABA). A – mikroskopické snímky reprezentativních průduchů. Col0 – rostlina divokého typu; měřítko – 10  $\mu\text{m}$ . B – hodnocení apertury. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Pro vyhodnocení statistické signifikance rozdílu mutantů (*spl1.1* a *spl1.2*) od rostlin divokého typu (Col0) byl použit jednofaktorový ANOVA test. Celkový počet průduchů pro každý genotyp byl  $n = 100$ . \*\*  $P < 0,01$ .

ABA nemá vliv pouze na regulaci průduchů, ale hraje i významnou úlohu při klíčení. Proto bylo analyzováno i klíčení za odlišných koncentrací ABA (Obrázek 15). Bylo pozorováno intenzivnější klíčení mutantů, především mutantů *spl1.1*, v porovnání s divokým typem Col0. Výjimkou je klíčení mutantu *spl1.2* při aplikaci  $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ABA. Nejvýznamnější rozdíly mezi semeny mutantů a semeny Col0 byly pozorovány při aplikaci  $1\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ABA druhý den, přičemž byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi divokým typem Col0 a *spl1.1* mutantem. Při kontrolních podmínkách nebylo zjištěno postižení klíčení ani u jedné z analyzovaných mutantních linií.



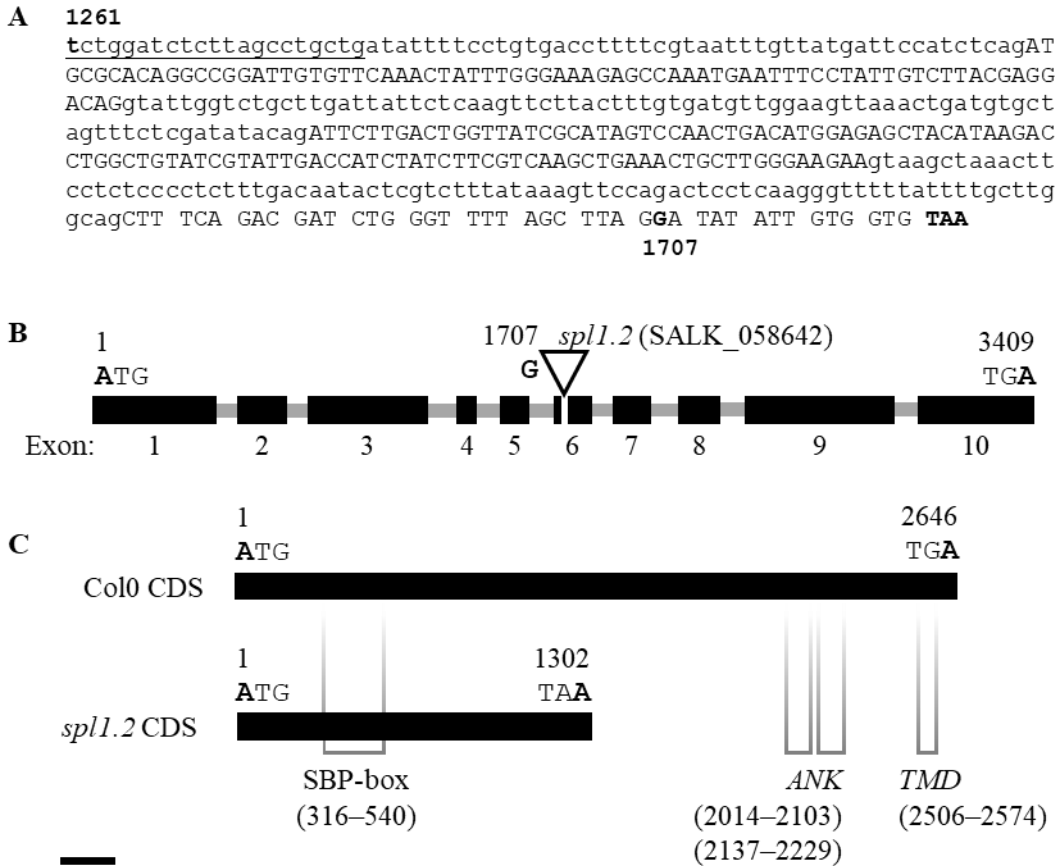
**Obrázek 15:** Vliv kyseliny abscisové (ABA) na klíčení semen mutantů *spl1.1* a *spl1.2*. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Pro vyhodnocení statistické signifikance rozdílu mutantů (*spl1.1* a *spl1.2*) od rostlin divokého typu (Col0) byl použit jednofaktorový ANOVA test. Celkový počet analyzovaných semen pro každý genotyp v rámci tří opakování byl  $n = 90$ . \*  $p < 0,05$ .

Z pozorovaných výsledků vlivu ABA na aperturu průduchů (Obrázek 14) a klíčení (Obrázek 15) vyplývá zapojení SPL1 do signalizace ABA.

## 5.7 Přesné určení pozice T-DNA inserce mutantní linie *spl1.2*

V předchozí práci (Zeiner, 2019) byla identifikována přítomnost částečného transkriptu *SPL1* v rostlinách mutantní linie *spl1.2* (SALK\_058642). Pro přesné určení polohy T-DNA inserce, která je indikována v databázi TAIR (Příloha 7; Bernardini *et al.*, 2015), byl sekvencován fragment gDNA, který byl amplifikován za pomoci primerů pro identifikaci T-DNA inserce (viz metodika). Amplifikovaný PCR produkt byl purifikován a sekvencován. Výsledek bidirekcionálního sekvencování byl analyzován pomocí programu ApE a graficky zpracován (Obrázek 16A).

Obrázek 16A ukazuje část sekvence odpovídající sekvenci gDNA amplifikované pomocí použitých primerů, respektive je zde vyznačena poloha jednoho z primerů. Poloha T-DNA inserce byla lokalizována do vzdálenosti 1708 bp od translačního startu, do šestého exonu *SPL1* (Obrázek 16B), což je spojeno s předčasným zavedením stop tripletu (1721 bp od translačního startu) a vznikem zkrácené CDS (Obrázek 16C). I když pravděpodobně dochází k degradaci vzniklého transkriptu, může docházet k produkci parciálního proteinu SPL1, který si, vzhledem k poloze inserce, může zachovávat aktivitu. Potenciální zachování aktivity je spojeno s přítomností SBP domény. Narušení funkce by mohlo být spojeno především s významem TMD pro regulaci *SPL1*.



**Obrázek 16:** Lokalizace T-DNA inserce mutantní linie *spl1.2*. A – sekvence odpovídající části *SPL1* mutanta *spl1.2*. Sekvenační výsledek ukazuje pozici použitého primeru (podtrženo) a poslední nukleotid (G1707) před lokalizovanou insercí, která zavádí translační stop (TAA; 1721 bp). Velká písmena – exon; malá písmena – intron. B – grafické znázornění polohy identifikované inserce v sekvenci genu *SPL1*, která je ohraničena translačním startem (ATG) a stopem (TGA); C – výsledná kódující sekvence (CDS) Col0 a *spl1.2*. SBP – SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN; ANK – ankyrinová repetice; TMD – transmembránová doména; černé bloky – exon/kódující sekvence; šedé bloky – intron; měřítko – 200 bp.

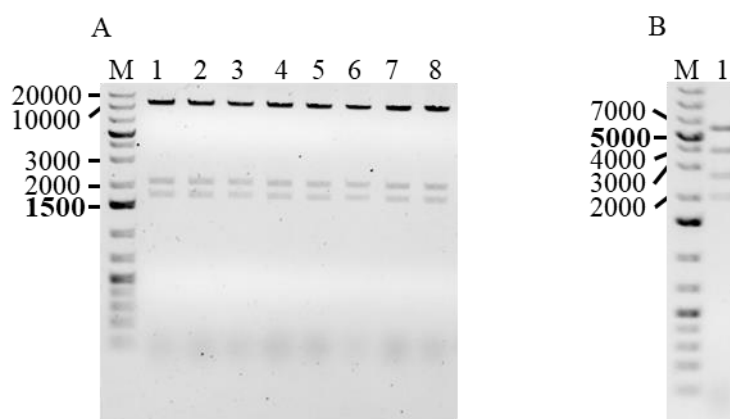
## 5.8 Příprava konstruktů *pSPL1::eGFP:SPL1* a *p35S::eGFP:SPL1*

Pro podrobnější studium *SPL1* byly připraveny eGFP fúzní konstrukty *pSPL1::eGFP:SPL1* a *p35S::eGFP:SPL1* (eGFP-*SPL1*). Výběr N-terminální fúze byl založen na poznatcích získaných z dostupné literatury. *SPL1* (Chao *et al.*, 2017) a další velké *SPL* jsou regulovány integrací do endomembránových komplexů. Odštěpení N-terminální části *SPL* umožňuje její translokaci do jádra (Garcia-Molina *et al.*, 2014b; Kessens *et al.*, 2018).

Izolovaná gDNA byla použita pro amplifikaci promotorové oblasti *SPL1* (*pSPL1*; Příloha 8A) a kódující oblasti *SPL1* (Příloha 8B). PCR produkt *pSPL1* byl po horizontální elektroforetické separaci izolován z gelové matrice. 10  $\mu$ l PCR produktu *SPL1* bylo elektroforeticky separováno. Absence nespecifických produktů umožnila přímou purifikaci PCR produktu. Předřazená elektroforetická separace nebyla nutná. Přímá purifikace umožňuje obecně

vyšší výtěžnost izolace DNA. Purifikovaná DNA byla použita pro rekombinaci do vstupních vektorů, tzv. BP reakci. Úspěšnost klonování byla ověřena pomocí enzymatického štěpení izolovaných bakteriálních plasmidů potenciálně pozitivních bakterií. Byly identifikovány klony nesoucí klonovaný fragment, tedy *pSPL1*-pDONR P4-P1R (Příloha 8C) a *SPL1*-pDONR P2R-P3 (Příloha 8D, dráha 2 a 7), na základě shody detekovaných fragmentů s *in silico* provedeným štěpením. Plasmidová DNA pozitivních klonů byla purifikována za použití soupravy, která je kompatibilní s aplikací pro sekvencování. Po vyhodnocení sekvenačních čtení nebyly identifikovány žádné problematické sekvence.

Sekvencováním verifikované purifikované plasmidy vstupních klonů byly použity pro rekombinaci, tzv. LR reakci, do destinačního vektoru pB7m34GW. Izolovaná plasmidová DNA klonů byla analyzována pomocí enzymatického štěpení s využitím restriční endonukleasy. Byly získány pozitivní klony nesoucí *pSPL1::eGFP:SPL1*-pB7m34GW (Obrázek 17A; 10792, 2086, 1719 bp) a *p35S::eGFP:SPL1*-pB7m34GW (Obrázek 17B; 5580, 3649, 2489, 1864 bp). Úspěšně byly klonovány požadované konstrukty.



**Obrázek 17:** Ověření úspěšné přípravy konstruktů *pSPL1::eGFP:SPL1* a *p35S::eGFP:SPL1*. A – ověření izolovaných klonů potenciálně nesoucích *pSPL1::eGFP:SPL1*-pB7m34GW (*PvuII*; 10792, 2086, 1719 bp); B – ověření izolovaného klonu potenciálně nesoucího *p35S::eGFP:SPL1*-pB7m34GW (*NdeI*; 5580, 3649, 2489, 1864 bp). M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (uvedeno v bp); 1–8 – analyzované pozitivní kolonie.

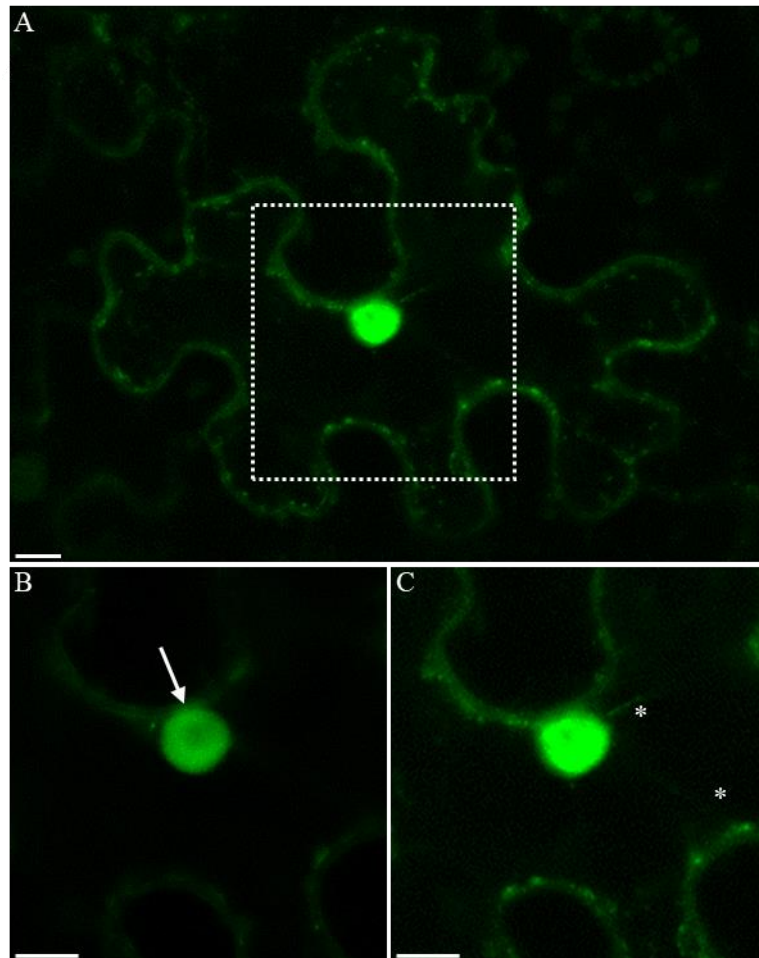
Pozitivní klony byly verifikovány pomocí sekvencování. Nebyly identifikovány sporné sekvence.

## 5.9 Mikroskopická analýza listů *Nicotiana benthamiana* exprimující *eGFP:SPL1*

Mikroskopická analýza tranzientně transformovaných listů *Nicotiana benthamiana* byla provedena zejména se záměrem ověřit funkčnost připravených konstruktů *pSPL1::eGFP:SPL1*

a *p35S::eGFP:SPL1*. Dalším cílem byl získání vstupních dat o subcelulární lokalizaci SPL1 v heterologním systému.

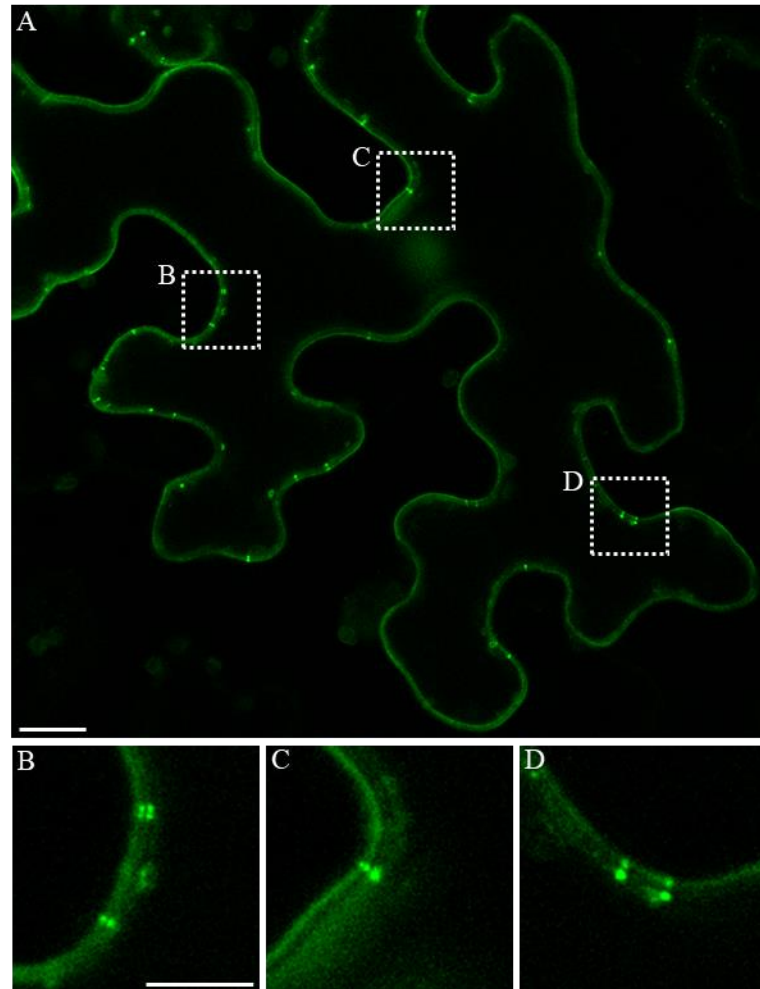
Byla pozorována jaderná lokalizace eGFP-SPL1, který byl exprimován pod kontrolou nativního promotoru (Obrázek 18A). Jaderná lokalizace odpovídá předpokládané lokalizaci, jelikož SPL jsou TF. Nezanedbatelný signál byl pozorován i na periferiích buňky, což by mohlo odpovídat lokalizaci na cytoplasmatické membráně. Zajímavý byl i výskyt kumulace signálu do specifických bodů na periferiích buněk.



**Obrázek 18:** Mikroskopická analýza subcelulární lokalizace eGFP-SPL1 (*pSPL1::eGFP:SPL1*) v tranzientně transformovaných listech *Nicotiana benthamiana*. A – transformovaná buňka *Nicotiana benthamiana*. Ortogonální projekce (3 snímky Z-pozice; 13,748  $\mu\text{m}$ ). B – 2. snímek vyňatý z ortogonální projekce A, přiblíženo v indikované oblasti. Šipka ukazuje na nápadné snížení intenzity signálu, které je spojeno s přítomností jádérka. C – zvětšená oblast indikovaná v A. Hvězdičky označují přítomnost cytoplasmatického proudění. Měřítko – 10  $\mu\text{m}$ .

Detailní pozorování ukázalo pokles intenzity signálu v centrální části jádra (Obrázek 18B, indikováno šipkou), který odpovídá jádérku. Slabý signál byl také pozorován v cytoplasmatickém proudění (Obrázek 18C, označeno hvězdičkou).

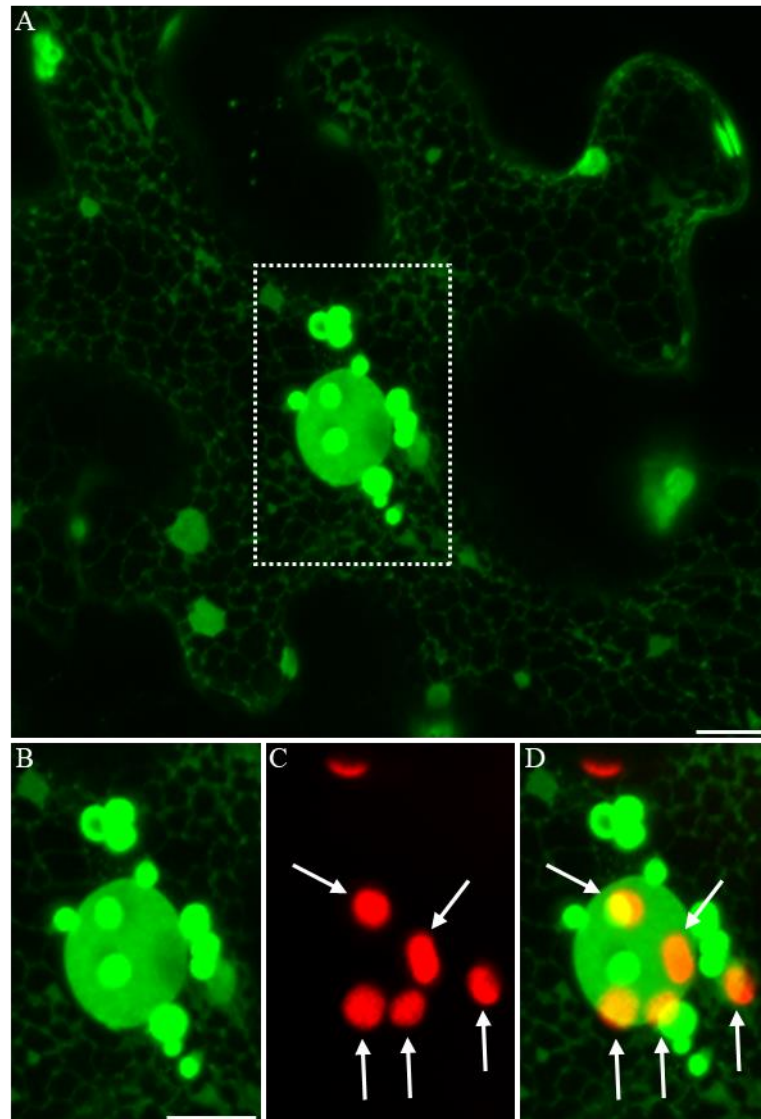
Zmíněné body, které byly pozorovány v Obrázku 18A, byly dále podrobněji studovány (Obrázek 19A). Opět byla pozorována kumulace signálu eGFP-SPL1 (*pSPL1::eGFP:SPL1*) v blízkosti plasmatické membrány. Při zvětšení indikovaných oblastí (Obrázek 19B–D) bylo pozorováno rozdělení signálu na dva oddělené body. Charakter těchto bodů odpovídá plasmodesmatům.



**Obrázek 19:** Lokalizace eGFP-SPL (*pSPL1::eGFP:SPL1*) v blízkosti cytoplasmatické membrány v tranzientně transformovaných listech *Nicotiana benthamiana*. A – transformovaná buňka *Nicotiana benthamiana*; B–D – zvětšení indikované oblasti z A, které ukazuje detail kumulace signálu. Snímek jedné roviny. Měřítka – 10  $\mu\text{m}$ .

Pozorování eGFP-SPL1, který byl pod kontrolou nadexpresního promotoru (Obrázek 20), poskytlo další informace o SPL1, které nebylo možné získat při využití konstruktu *pSPL1::eGFP:SPL1*. Především byl pozorován signál eGFP v endoplasmatickém retikulu (Obrázek 20A). Kromě dříve pozorované subcelulární lokalizace signálu byl potenciálně pozorován signál eGFP i v chloroplastech. Výskyt eGFP-SPL1 v chloroplastech byl vyloučen absencí překryvu (Obrázek 20D, indikováno šipkou) signálu eGFP (Obrázek 20B) a chlorofylu a (Obrázek 20C). Patrně dochází k tvorbě artefaktů, agregátů neznámého původu.

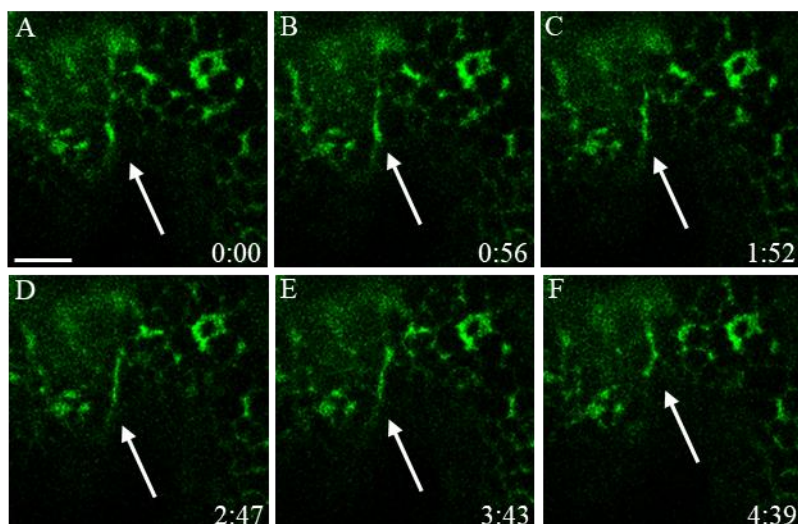
V průběhu mikroskopického pozorování eGFP-SPL1 pod kontrolou nativního promotoru nebyla podobná subcelulární lokalizace pozorována.



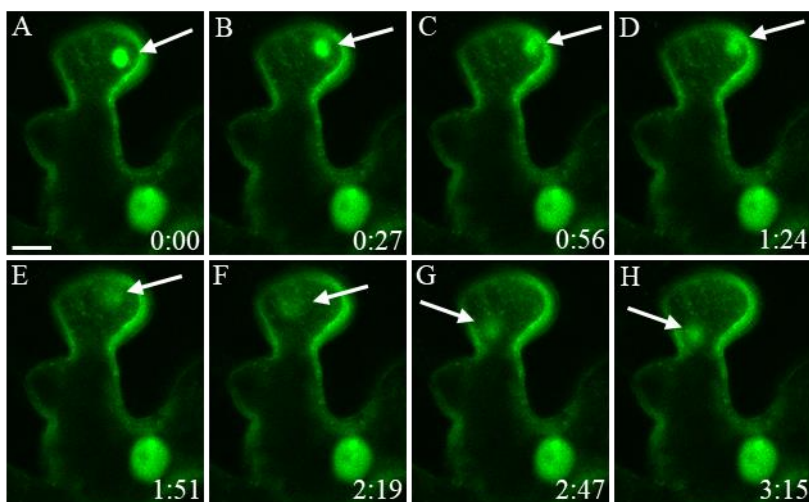
**Obrázek 20:** Signál eGFP-SPL1 (*p35S::eGFP:SPL1*) pozorovaný v endoplasmatickém retikulu, jádru a artefaktech v tranzientně transformovaných listech *Nicotiana benthamiana*. Ortogonální projekce (5 snímků Z-pozice; 4,406  $\mu\text{m}$ ). A – transformovaná buňka *Nicotiana benthamiana*; B–D – indikovaná zvětšená oblast snímku A, šipky indikují chloroplasty; B – kanál pro eGFP; C – kanál pro chlorofyl a; D – překryv kanálu pro eGFP (B) a chlorofyl a (C). Měřítko – 10  $\mu\text{m}$ .

Vyšší intenzita signálu umožnila i pozorování dynamického pohybu signálu eGFP-SPL1 v rámci struktury endoplasmatického retikula. Tento dynamický pohyb může být charakterizován jako prodlužování tubulární struktury endoplasmatického retikula (Obrázek 21, označeno šipkou). I výše popsané agregáty vykazovaly dynamický pohyb (Obrázek 22).





**Obrázek 21:** Prodlužování tubulární struktury endoplasmatického retikula, která byla značena pomocí eGFP-SPL1 (*p35S::eGFP:SPL1*), v tranzientně transformovaných listech *Nicotiana benthamiana*. Šipka ukazuje na výrazný pohyb signálu na snímcích A–F. Datový formát – minuty:sekundy; měřítko – 10  $\mu\text{m}$ .

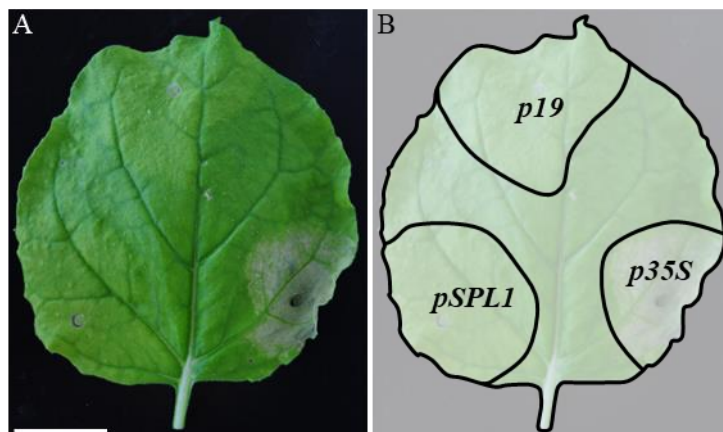


**Obrázek 22:** Dynamika signálu eGFP-SPL1 (*p35S::eGFP:SPL1*) tečkovitých struktur v tranzientně transformovaných listech *Nicotiana benthamiana*. Šipka ukazuje na výrazný pohyb signálu na snímcích A–H. Datový formát – minuty:sekundy; měřítko – 10  $\mu\text{m}$ .

Byly pozorovány fytopatologické změny na listech *Nicotiana benthamiana*, které byly transformovány bakteriemi nesoucí konstrukt *p35S::eGFP:SPL1*. Tyto změny byly pozorovány čtvrtý až pátý den po inokulaci listu. Pozorování na nezávisle transformovaných listech ukázala vznik nekrotických lézí. Pro ověření, že vznik nekrotických lézí je spjat s nadexpresí eGFP-SPL1, ne s relativně vysokou hodnotou  $\text{OD}_{600}$  bakteriální suspenze použité pro tranzientní transformaci (viz metodika), byl transformován právě jeden list bakteriemi nesoucí konstrukty *pSPL1::eGFP:SPL1* a *p35S::eGFP:SPL1* (Obrázek 23A). Pozorování prokázalo, že ke vzniku nekrotických lézí dochází pouze v oblasti inokulované *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101,



které neslo konstrukt *p35S::eGFP:SPL1* (Obrázek 23B; *p35S*), nikoli *pSPL1::eGFP:SPL1* (Obrázek 23B; *pSPL1*). Toto bylo pozorováno i v rámci dvou dalších nezávislých opakování (Příloha 9).



**Obrázek 23:** Nekrózy pozorované na inokulovaném listu *Nicotiana benthamiana* čtvrtý den po inokulaci. A – transformovaný list; B – indikované oblasti (*p19*, *pSPL1*, *p35S*) ukazují zónu transformovanou daným konstruktem. *p19* – kotransformační vektor *p19*; *pSPL1* – konstrukt *pSPL1::GFP:SPL1*; *p35S* – konstrukt *p35S::GFP:SPL1*; měřítko – 2,5 cm.

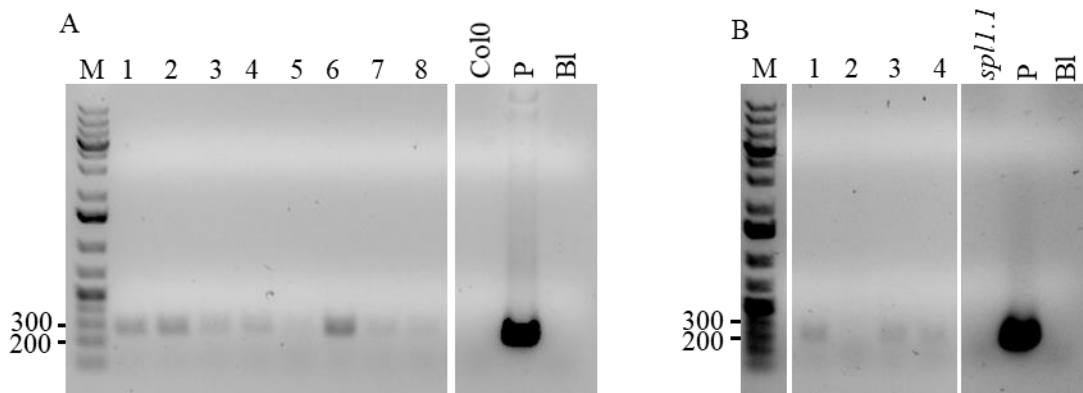
Potvrzení přítomnosti fúzního konstruktů bylo zamýšleno provést pomocí imunoblotování s využitím protilátky anti GFP (data nejsou prezentována). Nepodařilo se detekovat fúzní protein.

Data z těchto vstupních experimentů mohou sloužit pro směřování budoucího výzkumu. Je nutné brát v potaz, že heterologní exprese nemusí odpovídat pozorováním po stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*.

## 5.10 Stabilní transformace *Arabidopsis thaliana*

Po ověření funkčnosti konstruktů bylo přistoupeno ke stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*. Vybrané genotypy (Col0 a *spl1.1*) byly transformovány bakteriemi nesoucí dříve připravené konstrukty *pSPL1::eGFP:SPL1* a *p35S::eGFP:SPL1*. Semena generace T<sub>1</sub> (semena získaná z transformovaných rostlin) byla vyseta na 1/2MS médium s obsahem PPT. PPT umožňuje selekci úspěšně transformovaných rostlin. Selektované rostliny byly navíc pozorovány s využitím zoomovacího fluorescenčního mikroskopu ZEISS Axio Zoom V16. Záměrem byla detekce signálu eGFP. Detekce signálu eGFP nebyla úspěšná. Selektované rostliny byly testovány na přítomnost konstruktů *pSPL1::eGFP:SPL1* pomocí PCR (Obrázek 24). Byla detekována přítomnost konstruktů *pSPL1::eGFP:SPL1* ve vzorcích Col0 1–4, 6 a 7 (Obrázek 24A) a *spl1.1* 1, 3 a 4 (Obrázek 24B). Nemůže být však vyloučena potenciální možnost kontaminace i přes skutečnost, že (i) semena T<sub>1</sub> generace byla pečlivě sterilizována podle uvedeného

metodiky a (ii) na misce nebyla pozorována kontaminace. Vybrané rostliny byly přeneseny z 1/2MS média s obsahem PPT do hlíny a kultivovány pro potvrzení úspěšné transformace v T<sub>2</sub> generaci.



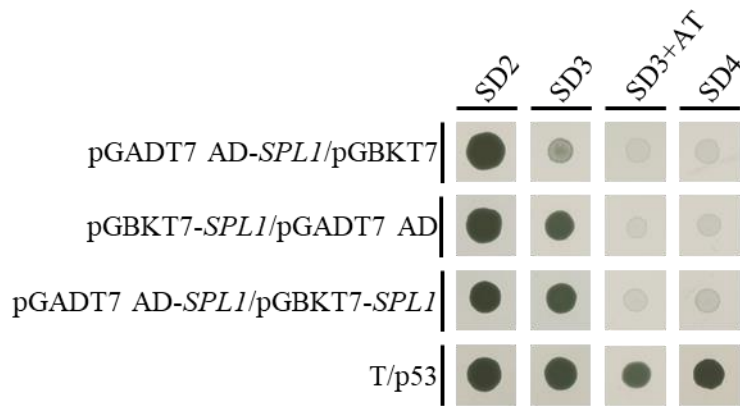
**Obrázek 24:** Detekce přítomnosti konstruktů *pSPL1::eGFP:SPL1* v transformovaných rostlinách *Arabidopsis thaliana* Col0 (A) a *spl1.1* (B). M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (uvedeno v bp); 1–9 – analyzované rostliny; Col0 – rostlina divokého typu; *spl1.1* – mutant *spl1.1*; P – pozitivní kontrola, *pSPL1::GFP:SPL1*-pB7m34GW; BI – slepý vzorek.

Nepodařilo se získat T<sub>1</sub> rostliny nesoucí konstrukt *p35S::eGFP:SPL1*. Tato skutečnost by mohla, spolu s přechozím pozorováním nekrotických lézí (Obrázek 23), indikovat letalitu rostlin nadexprimující *eGFP:SPL1*.

## 5.11 Hodnocení homodimerizace SPL1

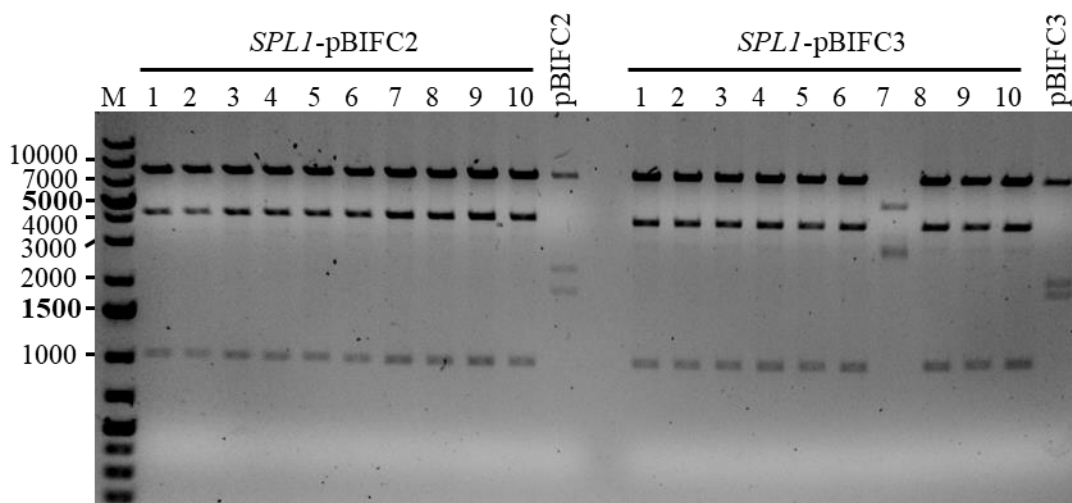
Na základě popisu homodimerizace SPL7 (Garcia-Molina *et al.*, 2014b) bylo zamýšleno provést ověření možnosti homodimerizace SPL1. Hodnocení bylo plánováno provést pomocí dvou nezávislých metod, které jsou zavedeny v naší laboratoři. První z těchto metod je kvasinkový dvouhybridní systém (Obrázek 25). Byly využity dříve připravené vektory pGADT7 AD-*SPL1* a pGBKT7-*SPL1*. Úspěšná transformace kvasinek byla ověřena pomocí média pro selekci kvasinek (Obrázek 25, SD2). Interakce proteinů byla ověřena pomocí médií pro hodnocení interakce (SD3, SD3+AT a SD4). Nárůst kolonií na SD3 (Obrázek 25, pGADT7 AD-*SPL1*/pGBKT7-*SPL1*), ne však na SD3+AT a SD4, vypovídá o potenciálně slabé interakci SPL1-SPL1. Problematický je výskyt kolonií u negativní kontroly pGADT7 AD-*SPL1*/pGBKT7 a pGBKT7-*SPL1*/pGADT7 AD (Obrázek 25, SD3), který vypovídá o autoaktivaci reportérového genu. Na základě těchto výsledků nemůže být hodnocena homodimerizace SPL1 s ohledem na vysokou pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku.

S ohledem na nedůvěryhodnost výsledků, které poskytnulo využití kvasinkového dvouhybridního systému (Obrázek 25), byly připraveny konstrukty pro ověření možnosti homodimerizace SPL1 pomocí BIFC.



**Obrázek 25:** Analýza homodimerizace *SPL1* pomocí kvasinkového dvouhybridního systému. SD2 – médium pro selekci kvasinek; SD3, SD3+AT a SD4 – médium pro hodnocení interakce, seřazeno podle vzrůstající stringence, respektive síly interakce; pGADT7 AD-*SPL1*/pGBKT7, pGBKT7-*SPL1*/pGADT7 AD – negativní kontrola; pGADT7 AD-*SPL1*/pGBKT7-*SPL1* – interakce; T/p53 – pozitivní kontrola.

Fragment cDNA *SPL1* ohraničený uvedenými primery byl amplifikován pomocí PCR (Příloha 10A) a úspěšně rekombinován do vstupního vektoru (Příloha 10B). Úspěšná rekombinace byla potvrzena získáním fragmentů o očekávané velikosti po provedení enzymatického štěpení pomocí restriční endonukleasy a následné elektroforetické separaci. Byly identifikovány dva negativní klony (Příloha 10B, dráha 2 a 4). Izolovaná plasmidová DNA pozitivních klonů byla sekvencována. Verifikovaný vektor byl použit pro rekombinaci do destinačních vektorů pBIFC2 a pBIFC3. Získání požadovaných konstruktů bylo ověřeno pomocí štěpení restriční endonukleasou *PvuII* za vzniku očekávaných fragmentů *SPL1*-pBIFC2 (8018, 4177, 1017 bp) a *SPL1*-pBIFC3 (8017, 3967, 1018 bp), které byly pozorovány po provedení horizontální elektroforetické separace (Obrázek 26).



**Obrázek 26:** Identifikace pozitivních klonů nesoucí vektory *SPL1*-pBIFC2 a *SPL1*-pBIFC3. Elektroforetická separace fragmentů získaných pomocí enzymatického štěpení enzymem *PvuII*. Očekávané fragmenty: *SPL1*-pBIFC2 (8018, 4177, 1017 bp); pBIFC2 (prázdný vektor; 8018, 2333, 1867 bp); *SPL1*-pBIFC3 (8017, 3967, 1018 bp); pBIFC3 (prázdný vektor; 8017, 2123, 1868 bp); M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1–10 – analyzované klony.

Ověřené destinační vektory *SPL1*-pBIFC2 a *SPL1*-pBIFC3 byly použity pro transformaci *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101.

## 6 Diskuse

Nedávné studie ukazují význam TF díky jejich schopnosti regulovat celé signální dráhy, nejen jednotlivé enzymy, a potenciálně tak zlepšovat vlastnosti rostlin s ohledem na odolnost vůči stresovým podmínkám (Cui *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020a). Proto je důležitý výzkum i SPL/SBP proteinů. SPL jsou významné regulátory biologických pochodů. Jejich studium umožňuje zjištění poznatků, které mohou najít uplatnění v aplikacích pro zemědělský průmysl. Tento význam je podložen nejen možným zvýšením výtěžku hospodářsky významných plodin, například rýže (Miura *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017) nebo pšenice (Cao *et al.*, 2021). Pro studium této problematiky mohou být využity T-DNA inserční linie, ale i další linie založené na alternativních přístupech, které využívají moderní nástroje molekulární biologie. Takovými nástroji jsou například genová editace pomocí CRISPR/Cas9 technologie, která byla již úspěšně využita při studiu genů *GmSPL9* (Bao *et al.*, 2019) a *Triticum aestivum SPL14* (Cao *et al.*, 2021), nebo využití RNA interference pro snížení genové exprese, která byla použita při studiu *SPL10* a *SPL11* (Nodine *et al.*, 2010).

### 6.1 Regulace SPL1 pomocí MAPK

V návaznosti na předchozí bakalářskou práci (Zeiner, 2019), kde byla predikována možnost fosforylace SPL pomocí MAPK, byla provedena bioinformatická analýza s cílem identifikace možných genů regulovaných pomocí SPL, které by mohly být zapojeny do dráhy MAPK-SPL. Možnost zapojení MAPK a SPL do stejných biologických procesů, zejména generativní fáze ontogeneze, podporují i informace poskytnuté v literárním přehledu.

Identifikované geny mohou sloužit v dalším studiu SPL, respektive SPL1. Bylo identifikováno několik genů, které se jeví jako významné. Tyto geny byly vybrány zejména na základě přítomnosti více GTAC motivů v jejich promotorové oblasti (Yamasaki *et al.*, 2009; Andrés-Colás *et al.*, 2013). Yamasaki *et al.* (2009) poukázali na význam čtyř GTAC motivů v oblasti asi 200 bp před translačním startem, respektive 30 bp za ním, které jsou dostatečné pro spuštění regulované exprese *MIR398c*. Další motivy, které jsou přítomné v promotorové oblasti asi do 650 bp, se mohou podílet na zesílení exprese (Yamasaki *et al.*, 2009). Vyloučení genů, v jejichž promotoru byl identifikován pouze jeden GTAC motiv, bylo provedeno s ohledem na snahu minimalizovat počet potenciálně regulovaných genů.

Prvním identifikovaným genem v rámci bioinformatické analýzy, který však není spojen s MAPK, ale s FSD1, byl gen *MITOCHONDRIÁLNÍ MALÁT DEHYDROGENASA 1 (MMDH1; AT1G53240; interakto FSD1)*, který kóduje MMDH1. MMDH1 je součástí citrátového cyklu a ovlivňuje proces fotorespirace (Tomaz *et al.*, 2010; Lindén *et al.*, 2016). Jeho absence má negativní vliv na klíčení (Sew *et al.*, 2016) a následný růst a vývoj *Arabidopsis* (Tomaz *et al.*,

2010; Lindén *et al.*, 2016; Sew *et al.*, 2016). Gen *HMP31* (AT3G56240; proteom mutanta *mpk3.1*), v literatuře uváděný jako COPPER CHAPERONE (*CCH*), kóduje metalochaperon participující na transportu mědi, jejíž nadbytek negativně působí na jeho expresi (Himmelblau *et al.*, 1998; Mira *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2012). NA GLYCIN BOHATÝ PROTEIN 2 (*GRP2*; GLYCINE RICH PROTEIN 2; AT4G13850; proteom mutanta *mpk3.1* a *mpk6.2*) vykazuje RNA chaperonovou aktivitu a reguluje ranné vývojové procesy, zejména v podmínkách snížených teplot (Vermel *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007) a při zvýšené salinitě (Kim *et al.*, 2007). MITOCHONDRIÁLNÍ PYRUVÁT DEHYDROGENASA, *PODJEDNOTKA 2-2* (*MTE2-2*; AT3G13930; proteom mutanta *mpk4*) je gen kódující nepostradatelnou funkční podjednotku mitochondriálního pyruvát dehydrogenázového komplexu (Broz *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2015), jejíž absence vede k embryonální letalitě (Song *et al.*, 2015). Také identifikovaná DIHYDROLIPOAMID SUKCINYLTRANSFERASA (*DLST*; AT4G26910; proteom mutanta *mpk4*) hraje nezastupitelnou úlohu v bazálním metabolismu.

Potenciální regulace těchto genů pomocí SPL ukazuje na jejich případnou schopnost alternace významných biochemických drah. Tato regulace by byla unikátní pro rostliny, jelikož SPL jsou jejich specifické TF.

Přípravení dvojité mutanti *spl1.1/mpk3.1* a *spl1.1/mpk6.2* budou dále sloužit pro studium navrženého vztahu MAPK-SPL. Z dostupných předběžných výsledků vyplývá, že alespoň čtyři týdny staré rostliny *spl1.1/mpk3.1* v porovnání s rostlinami *spl1.1/mpk6.2* vykazují významné fenotypové odchylky a nejsou schopny tvorby generativních orgánů. Systematické provedení fenotypových analýz bude zapotřebí pro potvrzení těchto předběžných pozorování. Za zmínku stojí, že v dostupné literatuře se pozorovaný fenotyp dvojité mutanti *spl1.1/mpk3.1* neprojevuje u jednoduchých mutantů *spl1* (Chao *et al.*, 2017), ale ani *mpk3* (Wang *et al.*, 2008).

Regulace pomocí fosforylace, která je zprostředkována kinasami, není u SPL naprosto neprozkoumaná oblast. Několik studií ukazuje na význam fosforylace SPL. U SPL8 a SPL3 byla popsána možnost fosforylace serinového rezidua, které se vyskytuje v SBP doméně. Tato fosforylace může vyústit ve snížení schopnosti vazby molekuly DNA a omezení importu SPL do jádra (Birkenbihl *et al.*, 2005). Zmíněná fosforylace by mohla mít vliv například na schopnost vazby importinů (Jans *et al.*, 2000; Nardozzi *et al.*, 2010). U *Oryza sativa* SPL14, který je blízký SPL9 a SPL15 (Yang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2018), byla prokázána fosforylace v průběhu infekce, která byla způsobena *Magnaporthe oryzae*. Tato fosforylace působí změnu exprese genů *WRKY45* a *DENSE AND ERECT PANICLE 1*. Fosfomimetický *Oryza sativa* SPL14 vykazuje redukovanou schopnost vazby na klíčový regulační element GTAC, který je přítomen v promotorové sekvenci genů *WRKY45* i *DENSE AND ERECT PANICLE 1*. Je u něj ale zvýšena vazba do motivu TGGGCC, který je přítomen pouze v promotorové oblasti genu *WRKY45*. Schopnost vazby fosfomutovaného proteinu do GTAC motivu byla zachována. Fosforylace *Oryza sativa* SPL14 stimuluje expresi *WRKY45*, přispívá tak k rostlinné obranyschopnosti.

Nefosforylovaný protein umožňuje expresi *DENSE AND ERECT PANICLE 1*, který je spjat s růstem a vyšším výnosem (Wang *et al.*, 2018).

Nezanedbatelné informace poskytují data dostupná v databázi PhosPhAt 4.0 (Zulawski *et al.*, 2013), která indikují experimentálně získané informace o fosforylaci dalších SPL. Tyto údaje vybízí k dalšímu studiu vlivu fosforylace pro jejich regulaci. Význam fosforylace vyzdvihuje úlohu kinas a fosfatas, nejen při fyziologických, ale především při stresových podmínkách (Takeo *et Ito*, 2017). I MAPK jsou často lokalizovány v jádře (Bigeard *et Hirt*, 2018). Případná fosforylace jaderně lokalizovanou MAPK by mohla zabránit, nebo naopak stimulovat translokaci SPL1 z jádra do cytoplasmy. Mohla by být případně ovlivněna schopnost vazby na molekulu DNA. Význam případné fosforylace SPL1 je nutno objasnit.

## 6.2 Význam SPL1 pro vývoj *Arabidopsis thaliana*

Relativně malé rozdíly v délce primárního kořene a hustotě laterálních kořenů při porovnání mutantních linií *spl1* a rostlin divokého typu mohou být spojeny s přítomností funkčně redundantních *SPL* genů v mutantních rostlinách *spl1*, zejména *SPL12* (Chao *et al.*, 2017; Schulten *et al.*, 2019). Nicméně, SPL1 může hrát určitou úlohu v ranných stádiích vývoje rostliny, elongace kořene a iniciace tvorby laterálních kořenů. V porovnání s popsányými fenotypovými projevy mutantů *fsd1* (Dvořák *et al.*, 2021a) se však pozorované fenotypové rozdíly jeví zanedbatelné. Analýza exprese nepotvrdila vliv mutace *SPL1* na expresi *FSD1*, stejně jako pro abundanci *FSD1* a její enzymatickou aktivitu. Další analýzy budou potřeba pro zjištění možných rozdílů specifické exprese v kořenech a prýtu. Exprese může být odlišná zejména ve stresových podmínkách. Exprese *ZAT12*, který reguluje expresi některých *SOD* (Davletova *et al.*, 2005), je zvýšena jako odpověď na stimuly abiotického původu (Rizhsky *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017). Její nadexprese indukuje navíc zvýšení exprese *SPL1* (Rizhsky *et al.*, 2004). Na základě tohoto poznatku se dá uvažovat o indukci exprese *SPL1* peroxidem vodíku, methyl viologenem (Rizhsky *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017) anebo poraněním pletiva (Rizhsky *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005) prostřednictvím *ZAT12*. Zvýšená teplota sice také působí zvýšení exprese *ZAT12* (Rizhsky *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005), bylo ale dokázáno, že neindukuje expresi genu *SPL1* v květu (Chao *et al.*, 2017). Směřování dalších experimentů by mělo vést navíc spíše k analýze generativních orgánů, kde by se absence *SPL1* mohla výrazněji projevit, například ovlivněním *SOD* (Chao *et al.*, 2017), konkrétně *MSD1*. Právě *MSD1* by mohla být, podle poskytnutých výsledků, potenciálně pozitivně regulována pomocí *SPL1*.

Pozorované dřívější kvetení mutantů *spl1* je v rozporu s předpokladem opačného efektu absence *SPL1* (Stone *et al.*, 2005; Preston *et Hileman*, 2010). Kvetení je pozitivně ovlivněno *SPL*.

Příkladem může být umlčení genu *Petunia × hybrida SBP1*, které vede k oddálení kvetení (Preston *et al.*, 2016). Tento výsledek poukazuje na komplexitu drah, které regulují tento proces. Kvetení je kontrolováno vzájemně se ovlivňujícími geny, vnitřními signály, délkou dne a procesem vernalizace (Kim, 2020). Právě další studie, které budou zohledňovat tyto faktory, by mohly přispět k odhalení komplexity SPL-regulovaných drah. Kvetení může být ovlivněno například *API* (Ferrándiz *et al.*, 2000; Benlloch *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2019), potenciálně SPL1-regulovaným genem (Birkenbihl *et al.*, 2005). I další geny se podílí na kvetení, například *FLOWERING LOCUS C*, *FLOWERING LOCUS T* nebo *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (Michaels *et Amasino*, 1999; Hepworth *et al.*, 2002; Searle *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007), který může být potenciálně regulován pomocí SPL9 (Wang *et al.*, 2009a). Tyto geny navíc mohou být ovlivněny dalšími faktory, především délkou dne, gibereliny nebo procesem vernalizace (Moon *et al.*, 2003; Eriksson *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008).

Připravené stabilně transformované linie *Arabidopsis thaliana*, které nesou konstrukty *pSPL1::eGFP:SPL1*, potenciálně *p35S::eGFP:SPL1*, by mohly být využity nejen pro potvrzení regulace genů, které byly identifikovány v rámci bioinformatické části, ale také pro identifikaci vazebných motivů, se kterými SPL1 interaguje. Chromatinová imunoprecipitace by mohla být provedena s GFP protilátkou. Příprava protilátky rozeznávající SPL1 by byla sice pravděpodobně možná (Birkenbihl *et al.*, 2005), otázkou je však její potenciální nespecificita. Tato nespecificita se může projevit z důvodu přítomnosti sekvenčně podobných SPL proteinů. Tyto informace by mohly pomoci vyjasnit mechanismus regulace kvetení ve spojitosti s SPL1.

Zajímavým výsledkem bylo také pozorování významné elongace prýtu mutantních rostlin *spl1*. Podstata tohoto jevu může být studována například ve spojitosti s *MADS-box* geny. Bylo ukázáno, že *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1a*, který pochází z *Medicago truncatula*, významně přispívá k elongaci stonku. Délka stonku pozitivně koreluje s větší velikostí epidermálních buněk (Jaudal *et al.*, 2018). Jak již bylo výše uvedeno, potenciální regulace *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 Arabidopsis* byla ukázaná pro SPL9 (Wang *et al.*, 2009a). Analýza velikosti buněk mutantních rostlin *spl1* by, s ohledem na tyto informace a získané údaje o zvýšené elongaci prýtu mutantů *spl1*, mohla poskytnout další hodnotná data.

### 6.3 SPL1 a signalizace ABA

Propojení SPL1 s ABA, které bylo dříve publikováno, bylo demonstrováno změnami exprese ABA-responzivních genů v rostlinách dvojitéch mutantů *spl1/spl12*. SPL1 a SPL12 navíc přispívají k termotoleranci květů *Arabidopsis*, která vyžaduje i zapojení *PYRABACTIN RESISTANCE* a příbuzných receptorů (Chao *et al.*, 2017). Tyto receptory jsou pozitivní



regulátory signalizace ABA (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009), které jsou také zapojeny do procesů klíčení a regulace pohybů průduchů (Gonzalez-Guzman *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2018; Dittrich *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2020). Nedávná studie spojuje miR156, miRNA regulující malé SPL, se signalizací ABA a regulací zavírání průduchů. Nadexprese *MIR156* je spojena se snížením vnitřní hladiny ABA, vyšší citlivostí rostlin vůči ABA a pozorovaným uzavřenějším pórem průduchů (Visentin *et al.*, 2020). Pohyb průduchů jako takový je ovlivněn ABA, ale i ROS nebo oxidem dusnatým (Farnese *et al.*, 2016).

Analýza promotorových sekvencí genů *SPL* ukázala možné zapojení *SPL1* fylogeneticky blízké *SPL12*, ale také *SPL15*, do odpovědi na ABA díky přítomnosti ABRE. Data, která jsou dostupná v databázi Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008), ukazují snížení exprese genu *SPL1* po aplikaci ABA (Příloha 11). Nicméně, Chao *et al.* (2017) neidentifikovali změnu exprese genů *SPL1* ani *SPL12* v závislosti na její aplikaci. Nicméně, narušení signalizace je patrné na změně odpovědi mutantních rostlin *spl1* na ABA při procesu otevírání průduchů a klíčení. Tyto údaje naznačují úlohu *SPL1* jako pozitivního regulátoru signalizace ABA. Další studie, zejména s využitím rostlin dvojitých mutantů, nejen připravených linií *spl1.1/mpk3.1* a *spl1.1/mpk6.2*, ale potenciálně i *spl1/spl12*, mohou poskytnout další hodnotné informace.

## 6.4 Subcelulární lokalizace *SPL1*

*SPL7*, řazený do skupiny velkých *SPL* jako *SPL1*, hraje úlohu především při nedostatečné koncentraci mědi v substrátu (Yamasaki *et al.*, 2009; Garcia-Molina *et al.*, 2014a), která je spojena s tzv. stresem endoplasmatického retikula, kdy pravděpodobně dochází ke štěpení *SPL7*, uvolnění N-terminální části a její translokaci do jádra. C-terminální část je lokalizována v membráně endoplasmatického retikula, což je umožněno přítomností TMD (Garcia-Molina *et al.*, 2014b). Podobný typ regulace se vyskytuje i u dalších proteinů (Slabaugh *et Brandizzi*, 2011), jako například NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 17 (Ng *et al.*, 2013). Přítomnost TMD v C-terminální části *SPL1* naznačuje, že by bylo významné připravit především N-terminální fúzi, v tomto případě eGFP-*SPL1*, která umožní analyzovat translokaci *SPL1* do jádra po expozici různým stimulům. Význam N-terminální fúze je navíc spjat s přítomností SBP domény (Yamasaki *et al.*, 2004; Birkenbihl *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008). SBP doména obsahuje jadernou lokalizační sekvenci (NLS; nuclear localization sequences), která se nachází v její C-terminální oblasti v překryvu s druhým motivem zinkového prstu (Birkenbihl *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2018). NLS je spjata s regulací transportu proteinů do jádra (Wirhmueller *et al.*, 2015). Narušení NLS, která má funkci signalačního peptidu, má negativní vliv na jadernou lokalizaci a funkci *SPL*, například správnou funkci *SPL9* (Zhang *et al.*, 2019). Jaderný import není závislý jen na přítomnosti NLS. Proteiny nesoucí takovéto signalační sekvence vyžadují kooperaci

proteinů, které jsou zapojeny do komunikace cytoplasma-jádro. O importu rozhoduje celá řada proteinů, které mezi sebou soupeří o transportovatelné proteiny, ale dochází i ke kompetici samotných transportních proteinů (Jans *et al.*, 2000; Tamura *et Hara-Nishimura*, 2014). Příkladem konkrétních proteinů zapojených do nukleocytoplasmického transportu jsou importiny  $\alpha$  (Smith *et al.*, 1997; Wirthmueller *et al.*, 2015), importiny  $\beta$  (Liu *et al.*, 2019) anebo nukleoporiny (Zhang *et al.*, 2020b). I když je NLS přítomna, studium možnosti pasivní difuze by mohlo odhalit další stupeň regulace, který je spjat s potenciální oligomerizací (Garcia-Molina *et al.*, 2014b). Pasivní difúze je obecně uznávána pro proteiny do 40–60 kDa, možná je však pravděpodobně difúze i větších proteinů. Translokace do jádra, která je spojena s volnou difuzí proteinů až 90 kDa, může být ovlivněna oligomerizací, nábojem anebo hydrofobicitou proteinu. Vliv může mít především prostorová konformace proteinu (Wang *et Brattain*, 2007). Z tohoto pohledu tedy bude významný popis interakčních partnerů pro identifikaci proteinů, které jsou potenciálně spojené s regulací translokace SPL1 do jádra.

Při tranzientní transformaci *Nicotiana benthamiana* byla pozorována jaderná lokalizace a specifická kumulace signálu eGFP-SPL1, který byl pod kontrolou nativního promotoru, na periferiích buňky. Podle povahy signálu, podobné jako pozorovali Hunter *et al.* (2019) pro CYS-RICH RECEPTOR-LIKE KINASU 2, je možné, že dochází ke kumulaci SPL1 v plasmodesmatech. V případě potvrzení shodné lokalizace i u stabilně transformovaných linií *Arabidopsis thaliana* bude potřeba validace plasmodesmatální lokalizace pomocí specifických markerů, jako například PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN 5 (Hunter *et al.*, 2019). Nutné je však zmínit, že tato specifická lokalizace, při využití podobného konstruktů, nebyla popsána při tranzientní transformaci *Nicotiana benthamiana* provedené Chao *et al.* (2017). Také je možné, že se jedná o výsledek spojený s podmínkami tranzientní transformace, kde bakteriální kultura a/nebo složky kokultivačního média mohly stimulovat změnu subcelulární lokalizace a soustředění eGFP-SPL1 (*pSPL1::eGFP:SPL1*) do plasmodesmat. Plasmodesmata jsou intercelulární kanály, které umožňují komunikaci sousedních rostlinných buněk. Asociované proteiny se mohou vyskytovat difusně v membráně, případně mohou být lokalizovány u hrdla plasmodesmat (Mongrand *et al.*, 2010; Sevillem *et al.*, 2015), tak jako to bylo pravděpodobně pozorováno v případě eGFP-SPL1 (*pSPL1::eGFP:SPL1*). Prostupnost plasmodesmat je ovlivněna depozicí kalosy a proteiny, které se v plasmodesmatech nachází. Může docházet k regulaci kvantity i kvality transportovaných molekul. Limit velikosti transportovaných molekul je 30–50 kDa, i když význam je přikládán především prostorovému uspořádání molekuly, tedy velikosti a tvaru (Sevillem *et al.*, 2015). Pozorovaná subcelulární lokalizace SPL1 vybízí k možnosti intercelulárního transportu tohoto proteinu. Intercelulární transport proteinů je možný (Lucas *et al.*, 1995; Sessions *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003).

Pohyb signálu eGFP-SPL1 (*p35S::eGFP:SPL1*) tranzientně transformovaných listů *Nicotiana benthamiana* byl pozorován v rámci struktury endoplasmatického retikula, ale

i pozorované artefakty vykazovaly značnou dynamiku pohybu. Zmíněné artefakty mohou být charakterizovány jako agregáty endoplasmatického retikula. To může být podpořeno potvrzenou subcelulární lokalizací SPL1 v endoplasmatickém retikulu. Dalším argumentem je výskyt podobných agregátů při expresi TMD pocházející z 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL KOENZYM A REDUKTASY. Tato TMD se specificky váže na membránu endoplasmatického retikula a vznikající kompartmenty byly identifikovány jako jeho agregáty (Ferrero *et al.*, 2015). Studium úlohy SPL1, případně membránové domény SPL1, pro morfogenezi endoplasmatického retikula by mělo být předmětem budoucích analýz.

Připravené stabilně transformované linie, které nesou připravený konstrukt *pSPL1::eGFP:SPL1*, mohou být využity pro studium za pomoci pokročilého mikroskopického vybavení. Tyto studie se mohou zaměřit na lokalizaci SPL1 během různých biotických a abiotických stresových podmínek. Toto může být spjato především se změnou subcelulární lokalizace z membrány endoplasmatického retikula do jádra, ale potenciálně i s dynamikou pohybu v rámci struktury samotného endoplasmatického retikula a lokalizací v plasmodesmatech.

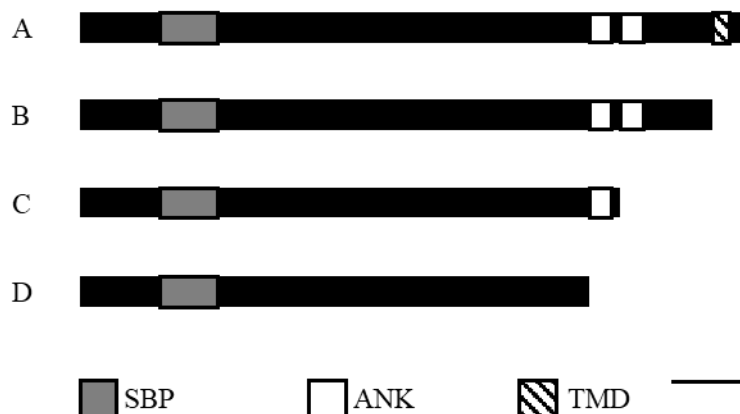
Nebyly získány stabilně transformované linie nesoucí konstrukt *p35S::eGFP:SPL1*. To by mohlo být způsobeno možnou letalitou nadexprese *SPL1*. Tato teorie může být podpořena pozorovanými nekrotizacemi při tranzientní transformaci listů *Nicotiana benthamiana*. Nekrotické léze pozorovali i Kessens *et al.* (2018), kteří indukovali buněčnou smrt při tranzientní transformaci listů *Nicotiana benthamiana* nadexpresí homologního genu *SlySBP12a*. Nadexprese *SPL1* by však měla být možná (Chao *et al.*, 2017). Zhang *et al.* (2014) byli navíc schopni úspěšně připravit linii nadexprimující *FLAG:SPL7*. I nadexprese dalšího zástupce velkých SPL je tedy možná. V případě potvrzení neslučitelnosti nadexprese *SPL1* s viabilitou bude vhodné využít inducibilní promotory, jako jsou například dexamethasonový (Acharya *et al.*, 2007), Gal4 (Aoyama *et Chua*, 1997) nebo XVE (Zuo *et al.*, 2000).

## 6.5 Homodimerizace

Dříve připravené konstrukty pro kvasinkový dvouhybridní systém byly využity pro hodnocení homodimerizace, která u SPL1 zatím nebyla studována. Homodimerizace SPL7, která byla popsána, pravděpodobně negativně ovlivňuje schopnost translokace SPL7 do jádra (Garcia-Molina *et al.*, 2014b). V prezentovaném experimentu byla pozorována autoaktivace reportérového genu, která zamezila hodnotit možnou proteinovou interakci SPL1-SPL1. Z tohoto důvodu, ale také z důvodu přítomnosti hydrofobní TMD, bude potřeba přípravy zkrácených verzí SPL1. TMD sice nemusí být zodpovědná za autoaktivaci reportérového genu, ale je zde vysoká pravděpodobnost narušení konformace, respektive biologické aktivity. Dalším významným faktem je, že TMD doména je integrální součástí SPL1 pouze při jeho uchycení v membráně

endoplasmatického retikula. Při potenciálním uvolnění SPL1 již není pravděpodobně přítomna. Zkrácená verze, která nebude obsahovat TMD, bude lépe odrážet nativní stav SPL1 (Garcia-Molina *et al.*, 2014b; Chao *et al.*, 2017).

Zkrácené verze (Obrázek 27), které budou postrádat kromě TMD i ANK repetice, mohou sloužit i k charakterizaci významu ANK repetic. Pro jejich přípravu budou sloužit již připravené vektory s využitím „site-directed“ mutagenese. Zkrácenou verzi SPL7 ostatně použili pro kvasinkový dvouhybridní systém i Garcia-Molina *et al.* (2014a).



**Obrázek 27:** Návrh zkrácených verzí SPL1 pro budoucí experimenty. A – SPL1; B–D – zkrácené, tzv. „truncated“, verze SPL1; B – SPL1 bez transmembránové domény (TMD); C – SPL1 bez TMD a ankyrinové repetice (ANK); D – SPL1 bez TMD a obou ANK. SBP – SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN doména; měřítko – 100 aminokyselin. Vytvořeno na základě dat dostupných v databázi Simple Modular Architecture Research Tool (Letunic *et Bork*, 2018).

Pro hodnocení dimerizace SPL1-SPL1 byly následně připraveny některé konstrukty pro BIFC. Tak jako konstrukty pro kvasinkový dvouhybridní systém, konstrukty pro BIFC budou sloužit i pro studium dimerizace s jinými proteiny. Například Qi *et al.* (2016) prokázali interakci NbSPL1-1 a SPL1 s *Phakopsora pachyrhizi* EFFECTOR CANDIDATE 23, který umožňuje modulaci odpovědi na přítomnost patogena.

Při zisku stabilně transformovaných linií rostlin *Arabidopsis thaliana*, které budou nést *pSPL1::eGFP:SPL1* a *p35S::eGFP:SPL1*, bude možné využít i alternativních technik pro studium homodimerizace a protein-proteinových interakcí obecně. Například využití koimunoprecipitace pro charakterizaci interaktomu SPL1, případně pro „pull-down“ analýzy interakčních partnerů.

## 7 Závěr

V první části předložené práce byl vypracován literární přehled, který byl zaměřen na SPL, SOD a MAPK. Procesy, ve kterých jsou tyto proteiny zahrnuty, nastiňují možné propojení těchto proteinů v rámci stejných drah, regulace antioxidantní obrany a generativní fáze ontogeneze.

Pro potvrzení tohoto předpokladu byla provedena bioinformatická analýza, která odhalila MMDH1, HMP3/CCH, GRP2, MTE2-2 a DLST, proteiny identifikované ve spojitosti s MAPK, potažmo FSD1, jako potenciálně regulované pomocí SPL. Byly úspěšně připraveny linie dvojímutantů *spl1.1/mpk3.1* a *spl1.1/mpk6.2*, které budou sloužit pro další analýzy vztahu SPL1 a MPK3, respektive MPK6. Fenotypové a biochemické analýzy mutantních rostlin *spl1.1* a *spl1.2* odhalily potenciální význam SPL1 jako pozitivního regulátoru prodloužení hlavního kořene, aktivity MSD1 a signalizace ABA. Opačný efekt by SPL1 mohl hrát v procesech spjatých s elongací prýtu a kvetením.

Byly připraveny konstrukty *pSPL1::eGFP:SPL1* a *p35S::eGFP:SPL1*, které byly následně použity pro tranzientní transformaci *Nicotiana benthamiana* a stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*. Předběžná data, která byla získána po mikroskopické analýze tranzientně transformovaných listů *Nicotiana benthamiana*, ukazují na možnost subcelulární lokalizace SPL1 v plasmodesmatech. Pro detailní a přesnou subcelulární lokalizaci SPL1 bude potřeba provést mikroskopii především s využitím připravených komplementovaných linií.

Autoaktivace reportérového genu zamezila hodnocení dimerizace SPL1 pomocí dříve připravených konstruktů pro kvasinkový dvouhybridní systém. Zkrácené verze SPL1 pro kvasinkový dvouhybridní systém, spolu s připravenými konstrukty pro BIFC, umožní odhalit nejen homodimerizaci, ale mohou být použity i pro hodnocení interakce s dalšími proteiny.

## 8 Seznam použité literatury

- Aarts MG, Keijzer CJ, Stiekema WJ, Pereira A (1995): Molecular characterization of the *CER1* gene of arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *The Plant cell* 7: 2115–2127
- Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T (2005): Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant cell* 17: 1233–1251
- Abdel-Ghany SE, Pilon M (2008): MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry* 283: 15932–15945
- Abreu IA, Cabelli DE (2010): Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et biophysica acta* 1804: 263–274
- Addo-Quaye C, Eshoo TW, Bartel DP, Axtell MJ (2008): Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the *Arabidopsis* degradome. *Current biology* 18: 758–762
- Aerts N, de Bruijn S, van Mourik H, Angenent GC, van Dijk ADJ (2018): Comparative analysis of binding patterns of MADS-domain proteins in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology* 18: 131
- Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Brosché M, Schlichting R, Scheel D, Kangasjärvi J (2004): Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *The Plant journal* 40: 512–522
- Acharya BR, Raina S, Maqbool SB, Jagadeeswaran G, Mosher SL, Appel HM, Schultz JC, Klessig DF, Raina R (2007): Overexpression of CRK13, an Arabidopsis cysteine-rich receptor-like kinase, results in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *The Plant journal* 50: 488–499
- Andrés-Colás N, Perea-García A, Mayo de Andrés S, Garcia-Molina A, Dorcey E, Rodríguez-Navarro S, Pérez-Amador MA, Puig S, Peñarrubia L (2013): Comparison of global responses to mild deficiency and excess copper levels in *Arabidopsis seedlings*. *Metallomics: integrated biometal science* 5: 1234–1246
- Aoyama T, Chua NH (1997): A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant journal* 11: 605–612
- Araki R, Mermod M, Yamasaki H, Kamiya T, Fujiwara T, Shikanai T (2018): SPL7 locally regulates copper-homeostasis-related genes in Arabidopsis. *Journal of plant physiology* 224: 137–143
- Archambaud C, Nahori MA, Pizarro-Cerda J, Cossart P, Dussurget O (2006): Control of *Listeria* superoxide dismutase by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 281: 31812–31822
- Aukerman MJ, Sakai H (2003): Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2-like* target genes. *The Plant cell* 15: 2730–2741
- Azimzadeh J, Nacry P, Christodoulidou A, Drevensek S, Camilleri C, Amiour N, Parcy F, Pastuglia M, Bouchez D (2008): *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *The Plant cell* 20: 2146–2159

- Banks CJ, Andersen JL (2019): Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications. *Redox biology* 26: 101270
- Banks CJ, Rodriguez NW, Gashler KR, Pandya RR, Mortenson JB, Whited MD, Soderblom EJ, Thompson JW, Moseley MA, Reddi AR, Tessem JS, Torres MP, Bikman BT, Andersen JL (2017): Acylation of Superoxide Dismutase 1 (SOD1) at K122 Governs SOD1-Mediated Inhibition of Mitochondrial Respiration. *Molecular and cellular biology* 37: e00354-17
- Bao A, Chen H, Chen L, Chen S, Hao Q, Guo W, Qiu D, Shan Z, Yang Z, Yuan S, Zhang C, Zhang X, Liu B, Kong F, Li X, Zhou X, Tran LP, Cao D (2019): CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmSPL9* genes alters plant architecture in soybean. *BMC plant biology* 19: 131
- Barghetti A, Sjögren L, Floris M, Paredes EB, Wenkel S, Brodersen P (2017): Heat-shock protein 40 is the key farnesylation target in meristem size control, abscisic acid signaling, and drought resistance. *Genes and development* 31: 2282–2295
- Beauchamp C, Fridovich I (1971): Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry* 44: 276–287
- Benlloch R, Berbel A, Serrano-Mislata A, Madueño F (2007): Floral Initiation and Inflorescence Architecture: A Comparative View. *Annals of botany* 100: 659–676
- Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E (2015): The Arabidopsis information resource: Making and mining the "gold standard" annotated reference plant genome. *Genesis* 53: 474–485
- Bernal M, Casero D, Singh V, Wilson GT, Grande A, Yang H, Dodani SC, Pellegrini M, Huijser P, Connolly EL, Merchant SS, Krämer U (2012): Transcriptome Sequencing Identifies SPL7-regulated Copper Acquisition Genes FRO4/FRO5 and the Copper Dependence of Iron Homeostasis in Arabidopsis. *The Plant cell* 24: 738–761
- Bi G, Zhou Z, Wang W, Li L, Rao S, Wu Y, Zhang X, Menke FLH, Chen S, Zhou JM (2018): Receptor-Like Cytoplasmic Kinases Directly Link Diverse Pattern Recognition Receptors to the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Arabidopsis. *The Plant cell* 30: 1543–1561
- Bigeard J, Hirt H (2018): Nuclear Signaling of Plant MAPKs. *Frontiers in plant science* 9: 469
- Birkenbihl RP, Jach G, Saedler H, Huijser P (2005): Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *Journal of molecular biology* 352: 585–596
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248–254
- Broz AK, Tovar-Méndez A, Mooney BP, Johnston ML, Miernyk JA, Randall DD (2014): A novel regulatory mechanism based upon a dynamic core structure for the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex? *Mitochondrion* 19 Pt B: 144–153
- Bush SM, Krysan PJ (2007): Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of experimental botany* 58: 2181–2191

- Cai C, Guo W, Zhang B (2018): Genome-wide identification and characterization of SPL transcription factor family and their evolution and expression profiling analysis in cotton. *Scientific reports* 8: 762
- Candas D, Fan M, Nantajit D, Vaughan AT, Murley JS, Woloschak GE, Grdina DJ, Li JJ (2013): CyclinB1/Cdk1 phosphorylates mitochondrial antioxidant MnSOD in cell adaptive response to radiation stress. *Journal of molecular cell biology* 5: 166–175
- Cao J, Liu K, Song W, Zhang J, Yao Y, Xin M, Hu Z, Peng H, Ni Z, Sun Q, Du J (2021): Pleiotropic function of the *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE* gene *TaSPL14* in wheat plant architecture. *Planta* 253: 44
- Cardon G, Höhmann S, Klein J, Nettekheim K, Saedler H, Huijser P (1999): Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* 237: 91–104
- Coelho FR, Iqbal A, Linares E, Silva DF, Lima FS, Cuccovia IM, Augusto O (2014): Oxidation of the Tryptophan 32 Residue of Human Superoxide Dismutase 1 Caused by Its Bicarbonate-dependent Peroxidase Activity Triggers the Non-amyloid Aggregation of the Enzyme. *The Journal of biological chemistry* 289: 30690–30701
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004): WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research* 14: 1188–1190
- Cui J, Jiang N, Zhou X, Hou X, Yang G, Meng J, Luan Y (2018): Tomato MYB49 enhances resistance to *Phytophthora infestans* and tolerance to water deficit and salt stress. *Planta* 248: 1487–1503
- Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV (2006): Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et biophysica acta* 1763: 747–758
- Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R (2005): The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 139: 847–856
- Dittrich M, Mueller HM, Bauer H, Peirats-Llobet M, Rodriguez PL, Geilfus CM, Carpentier SC, Al Rasheid KAS, Kollist H, Merilo E, Herrmann J, Müller T, Ache P, Hetherington AM, Hedrich R (2019): The role of *Arabidopsis* ABA receptors from the PYR/PYL/RCAR family in stomatal acclimation and closure signal integration. *Nature plants* 5: 1002–1011
- Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H (2007): Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* 318: 453–456
- Döring P, Treuter E, Kistner C, Lyck R, Chen A, Nover L (2000): The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *The Plant cell* 12: 265–278
- Dugas DV, Bartel B (2008): Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant molecular biology* 67: 403–417
- Dvořák P, Krasylenko Y, Ovečka M, Basheer J, Zapletalová V, Šamaj J, Takáč T (2021a): *In vivo* light-sheet microscopy resolves localisation patterns of FSD1, a superoxide dismutase with function in root development and osmoprotection. *Plant, cell and environment* 44: 68–87
- 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



- Ederli L, Madeo L, Calderini O, Gehring C, Moretti C, Buonauro R, Paolocci F, Pasqualini S (2011): The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinase CRK20 modulates host responses to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 infection. *Journal of plant physiology* 168: 1784–1794
- El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C (2008): Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant signaling and behavior* 3: 175–182
- Eriksson S, Böhlenius H, Moritz T, Nilsson O (2006): GA<sub>4</sub> is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *The Plant cell* 18: 2172–2181
- Farnese FS, Menezes-Silva PE, Gusman GS, Oliveira JA (2016): When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in plant science* 7: 471
- Fei E, Jia N, Yan M, Ying Z, Sun Q, Wang H, Zhang T, Ma X, Ding H, Yao X, Shi Y, Wang G (2006): SUMO-1 modification increases human SOD1 stability and aggregation. *Biochemical and biophysical research communications* 347: 406–412
- Ferrándiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF (2000): Redundant Regulation of Meristem Identity and Plant Architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development* 127: 725–734
- Ferrero S, Grados-Torrez RE, Leivar P, Antolín-Llovera M, López-Iglesias C, Cortadellas N, Ferrer JC, Campos N (2015): Proliferation and Morphogenesis of the Endoplasmic Reticulum Driven by the Membrane Domain of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase in Plant Cells. *Plant physiology* 168: 899–914
- Flohé L, Otting F (1984): Superoxide dismutase assays. *Methods in enzymology* 105: 93–104
- Foyer CH, Noctor G (2009): Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and redox signaling* 11: 861–905
- Fraser PD, Bramley P, Seymour GB (2001): Effect of the *Cnr* mutation on carotenoid formation during tomato fruit ripening. *Phytochemistry* 58: 75–79
- Gallie DR, Chen Z (2019): Chloroplast-localized iron superoxide dismutases FSD2 and FSD3 are functionally distinct in *Arabidopsis*. *PloS one* 14: e0220078
- Garcia-Molina A, Altmann M, Alkofer A, Epple PM, Dangl JL, Falter-Braun P (2017): LSU network hubs integrate abiotic and biotic stress responses via interaction with the superoxide dismutase FSD2. *Journal of experimental botany* 68: 1185–1197
- Garcia-Molina A, Xing S, Huijser P (2014a): A Conserved KIN17 Curved DNA-binding Domain Protein Assembles With SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE7 to Adapt *Arabidopsis* Growth and Development to Limiting Copper Availability. *Plant physiology* 164: 828–840
- Garcia-Molina A, Xing S, Huijser P (2014b): Functional characterisation of *Arabidopsis* SPL7 conserved protein domains suggests novel regulatory mechanisms in the Cu deficiency response. *BMC plant biology* 14: 231
- Gawroński P, Witoń D, Vashutina K, Bederska M, Betliński B, Rusaczonek A, Karpiński S (2014): Mitogen-activated protein kinase 4 is a salicylic acid-independent regulator of growth but not of photosynthesis in *Arabidopsis*. *Molecular plant* 7: 1151–1166

- German MA, Pillay M, Jeong DH, Hetawal A, Luo S, Janardhanan P, Kannan V, Rymarquis LA, Nobuta K, German R, De Paoli E, Lu C, Schroth G, Meyers BC, Green PJ (2008): Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nature biotechnology* 26: 941–946
- Go YS, Kim H, Kim HJ, Suh MC (2014): Arabidopsis Cuticular Wax Biosynthesis Is Negatively Regulated by the DEWAX Gene Encoding an AP2/ERF-Type Transcription Factor. *The Plant cell* 26: 1666–1680
- Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Antoni R, Vera-Sirera F, Merilo E, Bassel GW, Fernández MA, Holdsworth MJ, Perez-Amador MA, Kollist H, Rodriguez PL (2012): *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *The Plant cell* 24: 2483–2496
- Good MC, Zalatan JG, Lim WA (2011): Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* 332: 680–686
- Grant CE, Bailey TL, Noble WS (2011): FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* 27: 1017–1018
- Guan Y, Lu J, Xu J, McClure B, Zhang S (2014b): Two Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, Are Required for Funicular Guidance of Pollen Tubes in Arabidopsis. *Plant physiology* 165: 528–533
- Guan Y, Meng X, Khanna R, LaMontagne E, Liu Y, Zhang S (2014a): Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in *Arabidopsis*. *PLoS genetics* 10: e1004384
- Guo AY, Zhu QH, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J (2008): Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* 418: 1–8
- Gupta R, Huang Y, Kieber J, Luan S (1998): Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from *Arabidopsis*. *The Plant journal* 16: 581–589
- He J, Xu M, Willmann MR, McCormick K, Hu T, Yang L, Starker CG, Voytas DF, Meyers BC, Poethig RS (2018a): Threshold-dependent repression of *SPL* gene expression by miR156/miR157 controls vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* 14: e1007337
- He Y, Zhou J, Shan L, Meng X (2018b): Plant cell surface receptor-mediated signaling - a common theme amid diversity. *Journal of cell science* 131: jcs209353
- Hempel F, Stenzel I, Heilmann M, Krishnamoorthy P, Menzel W, Golbik R, Helm S, Dobritsch D, Baginsky S, Lee J, Hoehenwarter W, Heilmann I (2017): MAPKs Influence Pollen Tube Growth by Controlling the Formation of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in an Apical Plasma Membrane Domain. *The Plant cell* 29: 3030–3050
- Hepworth SR, Valverde F, Ravenscroft D, Mouradov A, Coupland G (2002): Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs. *The EMBO journal* 21: 4327–4337
- Himmelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Peñarrubia L, Amasino RM (1998): Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from Arabidopsis. *Plant physiology* 117: 1227–1234

- Holzmeister C, Gaupels F, Geerlof A, Sarioglu H, Sattler M, Durner J, Lindermayr C (2015): Differential inhibition of *Arabidopsis* superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Journal of experimental botany* 66: 989–999
- Hord CL, Sun YJ, Pillitteri LJ, Torii KU, Wang H, Zhang S, Ma H (2008): Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Molecular plant* 1: 645–658
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008): Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics* 2008: 420747
- Huang CH, Kuo WY, Weiss C, Jinn TL (2012): Copper chaperone-dependent and -independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 158: 737–746
- Huang S, Van Aken O, Schwarzländer M, Belt K, Millar AH (2016): The Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cellular Signaling and Stress Response in Plants. *Plant physiology* 171: 1551–1559
- Hunter K, Kimura S, Rokka A, Tran HC, Toyota M, Kukkonen JP, Wrzaczek M (2019): CRK2 Enhances Salt Tolerance by Regulating Callose Deposition in Connection with PLD $\alpha$ 1. *Plant physiology* 180: 2004–2021
- Chaiwongsar S, Otegui MS, Jester PJ, Monson SS, Krysan PJ (2006): The protein kinase genes *MAP3K $\epsilon$ 1* and *MAP3K $\epsilon$ 2* are required for pollen viability in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal* 48: 193–205
- Chao Q, Gao ZF, Wang YF, Li Z, Huang XH, Wang YC, Mei YC, Zhao BG, Li L, Jiang YB, Wang BC (2016): The proteome and phosphoproteome of maize pollen uncovers fertility candidate proteins. *Plant molecular biology* 91: 287–304
- Chao LM, Liu YQ, Chen DY, Xue XY, Mao YB, Chen XY (2017): *Arabidopsis* Transcription Factors SPL1 and SPL12 Confer Plant Thermotolerance at Reproductive Stage. *Molecular plant* 10: 735–748
- Chen L, Chen Q, Zhu Y, Hou L, Mao P (2016): Proteomic Identification of Differentially Expressed Proteins during Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flower Development. *Frontiers in plant science* 7: 1502
- Chen YJ, Lu CT, Su MG, Huang KY, Ching WC, Yang HH, Liao YC, Chen YJ, Lee TY (2015): dbSNO 2.0: a resource for exploring structural environment, functional and disease association and regulatory network of protein S-nitrosylation. *Nucleic acids research* 43: D503–D511
- Chen X, Zhang Z, Liu D, Zhang K, Li A, Mao L (2010): SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: star players for plant growth and development. *Journal of integrative plant biology* 52: 946–951
- Cheng Z, Li JF, Niu Y, Zhang XC, Woody OZ, Xiong Y, Djonović S, Millet Y, Bush J, McConkey BJ, Sheen J, Ausubel FM (2015): Pathogen-secreted proteases activate a novel plant immune pathway. *Nature* 521: 213–216
- Ischebeck T, Stenzel I, Heilmann I (2008): Type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases mediate *Arabidopsis* and *Nicotiana tabacum* pollen tube growth by regulating apical pectin secretion. *The Plant cell* 20: 3312–3330

- Islam Z, Nagampalli RSK, Fatima MT, Ashraf GM (2018): New paradigm in ankyrin repeats: Beyond protein-protein interaction module. *International journal of biological macromolecules* 109: 1164–1173
- Jans DA, Xiao CY, Lam MH (2000): Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *BioEssays* 22: 532–544
- Jaudal M, Zhang L, Che C, Li G, Tang Y, Wen J, Mysore KS, Putterill J (2018): A *SOCI-like* gene *MtSOC1a* promotes flowering and primary stem elongation in *Medicago*. *Journal of experimental botany* 69: 4867–4880
- Jin C, Qin L, Shi Y, Candas D, Fan M, Lu CL, Vaughan AT, Shen R, Wu LS, Liu R, Li RF, Murley JS, Woloschak G, Grdina DJ, Li JJ (2015): CDK4-mediated MnSOD activation and mitochondrial homeostasis in radioadaptive protection. *Free radical biology and medicine* 81: 77–87
- Jorgensen SA, Preston JC (2014): Differential *SPL* gene expression patterns reveal candidate genes underlying flowering time and architectural differences in *Mimulus* and *Arabidopsis*. *Molecular phylogenetics and evolution* 73: 129–139
- Jose J, Ghantasala S, Roy Choudhury S (2020): Arabidopsis Transmembrane Receptor-Like Kinases (RLKs): A Bridge between Extracellular Signal and Intracellular Regulatory Machinery. *International journal of molecular sciences* 21: 4000
- Jung HI, Gayomba SR, Rutzke MA, Craft E, Kochian LV, Vatamaniuk OK (2012): COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in Arabidopsis and is a novel target of SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7. *The Journal of biological chemistry* 287: 33252–33267
- Kaliszewski M, Kennedy AK, Blaes SL, Shaffer RS, Knott AB, Song W, Hauser HA, Bossy B, Huang TT, Bossy-Wetzel E (2016): SOD1 Lysine 123 Acetylation in the Adult Central Nervous System. *Frontiers in cellular neuroscience* 10: 287
- Karimi M, Bleys A, Vanderhaeghen R, Hilson P (2007): Building blocks for plant gene assembly. *Plant physiology* 145: 1183–1191
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P (2005): Modular cloning in plant cells. *Trends in plant science* 10: 103–105
- Kessens R, Sorensen N, Kabbage M (2018): An inhibitor of apoptosis (SfIAP) interacts with SQUAMOSA promoter-binding protein (SBP) transcription factors that exhibit pro-cell death characteristics. *Plant direct* 2: 1–17
- Kim DH (2020): Current understanding of flowering pathways in plants: focusing on the vernalization pathway in Arabidopsis and several vegetable crop plants. *Horticulture, environment and biotechnology* 61: 209–227
- Kim JY, Park SJ, Jang B, Jung CH, Ahn SJ, Goh CH, Cho K, Han O, Kang H (2007): Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *The Plant journal* 50: 439–451
- Kimura S, Hunter K, Vaahtera L, Tran HC, Citterico M, Vaattovaara A, Rokka A, Stolze SC, Harzen A, Meißner L, Wilkens MMT, Hamann T, Toyota M, Nakagami H, Wrzaczek M (2020): CRK2 and C-terminal Phosphorylation of NADPH Oxidase RBOHD Regulate Reactive Oxygen Species Production in Arabidopsis. *The Plant cell* 32: 1063–1080
- Kimura S, Waszczak C, Hunter K, Wrzaczek M (2017): Bound by Fate: The Role of Reactive Oxygen Species in Receptor-Like Kinase Signaling. *The Plant cell* 29: 638–654

- Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, Christopher W, Sjölander K, Gruissem W, Baginsky S (2004): The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current biology* 14: 354–362
- Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL (1998): Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant physiology* 118: 637–650
- 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
- Kosetsu K, Matsunaga S, Nakagami H, Colcombet J, Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Hirt H, Machida Y (2010): The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 22: 3778–3790
- Krapp A, Berthomé R, Orsel M, Mercey-Boutet S, Yu A, Castaigns L, Elftieh S, Major H, Renou JP, Daniel-Vedele F (2011): *Arabidopsis* roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant physiology* 157: 1255–1282
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF (2002): Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant physiology* 130: 2129–2141
- Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depège N, Huijser P, Merchant S (2005): A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 102: 18730–18735
- Krysan PJ, Jester PJ, Gottwald JR, Sussman MR (2002): An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *The Plant cell* 14: 1109–1120
- Kuo WY, Huang CH, Liu AC, Cheng CP, Li SH, Chang WC, Weiss C, Azem A, Jinn TL (2013): CHAPERONIN 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in *Arabidopsis* chloroplasts. *The New phytologist* 197: 99–110
- Lampard GR, Macalister CA, Bergmann DC (2008): *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* 322: 1113–1116
- Le CT, Brumbarova T, Ivanov R, Stoof C, Weber E, Mohrbacher J, Fink-Straube C, Bauer P (2016): ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA12 (ZAT12) Interacts with FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR (FIT) Linking Iron Deficiency and Oxidative Stress Responses. *Plant physiology* 170: 540–557
- Lee JH, Yoo SJ, Park SH, Hwang I, Lee JS, Ahn JH (2007): Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes and development* 21: 397–402
- Leitch JM, Li CX, Baron JA, Matthews LM, Cao X, Hart PJ, Culotta VC (2012): Post-translational modification of Cu/Zn superoxide dismutase under anaerobic conditions. *Biochemistry* 51: 677–685
- Letunic I, Bork P (2018): 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic acids research* 46: D493–D496
- Li Y, Cai H, Liu P, Wang C, Gao H, Wu C, Yan K, Zhang S, Huang J, Zheng C (2017): *Arabidopsis* *MAPKKK18* positively regulates drought stress resistance via downstream *MAPKK3*. *Biochemical and biophysical research communications* 484: 292–297

- Li RJ, Li LM, Liu XL, Kim JC, Jenks MA, Lü S (2019): Diurnal Regulation of Plant Epidermal Wax Synthesis through Antagonistic Roles of the Transcription Factors SPL9 and DEWAX. *The Plant cell* 31: 2711–2733
- Li S, Šamaj J, Franklin-Tong VE (2007): A Mitogen-Activated Protein Kinase Signals to Programmed Cell Death Induced by Self-Incompatibility in *Papaver* Pollen. *Plant physiology* 145: 236–245
- Liang X, Nazarenius TJ, Stone JM (2008): Identification of a consensus DNA-binding site for the *Arabidopsis thaliana* SBP domain transcription factor, AtSPL14, and binding kinetics by surface plasmon resonance. *Biochemistry* 47: 3645–3653
- Liang M, Xiao S, Cai J, Ow DW (2019): OXIDATIVE STRESS 3 regulates drought-induced flowering through *APETALA 1*. *Biochemical and biophysical research communications* 519: 585–590
- Lindén P, Keech O, Stenlund H, Gardeström P, Moritz T (2016): Reduced mitochondrial malate dehydrogenase activity has a strong effect on photorespiratory metabolism as revealed by <sup>13</sup>C labelling. *Journal of experimental botany* 67: 3123–3135
- Liu Y, He C (2017): A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants. *Redox biology* 11: 192–204
- Liu S, Hua L, Dong S, Chen H, Zhu X, Jiang J, Zhang F, Li Y, Fang X, Chen F (2015): OsMAPK6, a mitogen-activated protein kinase, influences rice grain size and biomass production. *The Plant journal* 84: 672–681
- Liu C, Chen H, Er HL, Soo HM, Kumar PP, Han JH, Liou YC, Yu H (2008): Direct interaction of *AGL24* and *SOCl* integrates flowering signals in *Arabidopsis*. *Development* 135: 1481–1491
- Liu P, Sun F, Gao R, Dong H (2012): *RAP2.6L* overexpression delays waterlogging induced premature senescence by increasing stomatal closure more than antioxidant enzyme activity. *Plant molecular biology* 79: 609–622
- Liu J, Wang X, Yang L, Nan W, Ruan M, Bi Y (2020): Involvement of active MKK9-MAPK3/MAPK6 in increasing respiration in salt-treated *Arabidopsis* callus. *Protoplasma* 257: 965–977
- Liu HH, Xiong F, Duan CY, Wu YN, Zhang Y, Li S (2019): Importin  $\beta 4$  Mediates Nuclear Import of GRF-Interacting Factors to Control Ovule Development in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 179: 1080–1092
- Lu X, Shi H, Ou Y, Cui Y, Chang J, Peng L, Gou X, He K, Li J (2020): RGF1-RGI1, a Peptide-Receptor Complex, Regulates *Arabidopsis* Root Meristem Development via a MAPK Signaling Cascade. *Molecular plant* 13: 1594–1607
- Lucas WJ, Bouché-Pillon S, Jackson DP, Nguyen L, Baker L, Ding B, Hake S (1995): Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* 270: 1980–1983
- Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D, Somerville C (2004): A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116: 109–119
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009): Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064–1068

- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA (1996): Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 93: 11853–11858
- Malleshaiah MK, Shahrezaei V, Swain PS, Michnick SW (2010): The scaffold protein Ste5 directly controls a switch-like mating decision in yeast. *Nature* 465: 101–105
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB (2006): A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature genetics* 38: 948–952
- Martin RC, Asahina M, Liu PP, Kristof JR, Coppersmith JL, Pluskota WE, Bassel GW, Goloviznina NA, Nguyen TT, Martínez-Andújar C, Kumar MBA, Pupel P, Nonogaki H (2010): The regulation of post-germinative transition from the cotyledon to vegetative-leaf stages by microRNA-targeted *SQUAMOSAPROMOTER-BINDING PROTEIN LIKE13* in *Arabidopsis*. *Seed science research* 20: 89–96
- Martin MV, Fiol DF, Sundaresan V, Zabaleta EJ, Pagnussat GC (2013): *oiwa*, a female gametophytic mutant impaired in a mitochondrial manganese-superoxide dismutase, reveals crucial roles for reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 25: 1573–1591
- Mayank P, Grossman J, Wuest S, Boisson-Dernier A, Roschitzki B, Nanni P, Nühse T, Grossniklaus U (2012): Characterization of the phosphoproteome of mature *Arabidopsis* pollen. *The Plant journal* 72: 89–101
- Mazin A, Timchenko T, Ménissier-de Murcia J, Schreiber V, Angulo JF, de Murcia G, Devoret R (1994): Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. *Nucleic acids research* 22: 4335–4341
- Meng X, Wang H, He Y, Liu Y, Walker JC, Torii KU, Zhang S (2012): A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates *Arabidopsis* inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. *The Plant cell* 24: 4948–4960
- Menzel W, Stenzel I, Helbig LM, Krishnamoorthy P, Neumann S, Eschen-Lippold L, Heilmann M, Lee J, Heilmann I (2019): A PAMP-triggered MAPK cascade inhibits phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate production by PIP5K6 in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist* 224: 833–847
- Mermod M, Takusagawa M, Kurata T, Kamiya T, Fujiwara T, Shikanai T (2019): SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 mediates copper deficiency response in the presence of high nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports* 38: 835–846
- Michaels SD, Amasino RM (1999): *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant cell* 11: 949–956
- Mira H, Martínez-García F, Peñarrubia L (2001): Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *The Plant journal* 25: 521–528
- Mittler R, Kim Y, Song L, Coutu J, Coutu A, Ciftci-Yilmaz S, Lee H, Stevenson B, Zhu JK (2006): Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS letters* 580: 6537–6542
- Miura K, Ikeda M, Matsubara A, Song XJ, Ito M, Asano K, Matsuoka M, Kitano H, Ashikari M (2010): OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. *Nature genetics* 42: 545–549

- Mongrand S, Stanislas T, Bayer EM, Lherminier J, Simon-Plas F (2010): Membrane rafts in plant cells. *Trends in plant science* 15: 656–663
- Moon J, Suh SS, Lee H, Choi KR, Hong CB, Paek NC, Kim SG, Lee I (2003): The *SOCI* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant journal* 35: 613–623
- Morgan MJ, Lehmann M, Schwarzländer M, Baxter CJ, Sienkiewicz-Porzucek A, Williams TC, Schauer N, Fernie AR, Fricker MD, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Finkemeier I (2008): Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant physiology* 147: 101–114
- Myouga F, Hosoda C, Umezawa T, Iizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, Shinozaki K (2008): A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 20: 3148–3162
- Nardozzi JD, Lott K, Cingolani G (2010): Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell communication and signaling* 8: 32
- Ng S, Ivanova A, Duncan O, Law SR, Van Aken O, De Clercq I, Wang Y, Carrie C, Xu L, Kmiec B, Walker H, Van Breusegem F, Whelan J, Giraud E (2013): A membrane-bound NAC transcription factor, ANAC017, mediates mitochondrial retrograde signaling in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 25: 3450–3471
- Niikura T, Kita Y, Abe Y (2014): SUMO3 modification accelerates the aggregation of ALS-linked SOD1 mutants. *PloS one* 9: e101080
- Nodine MD, Bartel DP (2010): MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes and development* 24: 2678–2692
- O'Halloran TV, Culotta VC (2000): Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *The Journal of biological chemistry* 275: 25057–25060
- Padmanabhan MS, Ma S, Burch-Smith TM, Czymbek K, Huijser P, Dinesh-Kumar SP (2013): Novel Positive Regulatory Role for the SPL6 Transcription Factor in the N TIR-NB-LRR Receptor-Mediated Plant Innate Immunity. *PLoS pathogens* 9: e1003235
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009): Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068–1071
- Perea-García A, Andrés-Bordería A, Mayo de Andrés S, Sanz A, Davis AM, Davis SJ, Huijser P, Peñarrubia L (2016): Modulation of copper deficiency responses by diurnal and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 67: 391–403
- Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011): The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et biophysica acta* 1807: 989–998
- Pitzschke A, Djamei A, Bitton F, Hirt H (2009): A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. *Molecular plant* 2: 120–137
- Preston JC, Hileman LC (2010): SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN 1 initiates flowering in *Antirrhinum majus* through the activation of meristem identity genes. *The Plant journal* 62: 704–712



- Preston JC, Hileman LC (2013): Functional Evolution in the Plant *SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* Gene Family. *Frontiers in plant science* 4: 80
- Preston JC, Jorgensen SA, Orozco R, Hileman LC (2016): Paralogous *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* genes differentially regulate leaf initiation and reproductive phase change in petunia. *Planta* 243: 429–440
- Qi M, Link TI, Müller M, Hirschburger D, Pudake RN, Pedley KF, Braun E, Voegelé RT, Baum TJ, Whitham SA (2016): A Small Cysteine-Rich Protein From the Asian Soybean Rust Fungus, *Phakopsora pachyrhizi*, Suppresses Plant Immunity. *PLoS pathogens* 12: e1005827
- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV (1999): Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805–808
- Redler RL, Wilcox KC, Proctor EA, Fee L, Caplow M, Dokholyan NV (2011): Glutathionylation at Cys-111 induces dissociation of wild type and FALS mutant SOD1 dimers. *Biochemistry* 50: 7057–7066
- Rizhsky L, Davletova S, Liang H, Mittler R (2004): The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry* 279: 11736–11743
- Rounsley SD, Ditta GS, Yanofsky MF (1995): Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *The Plant cell* 7: 1259–1269
- Rudd JJ, Osman K, Franklin FC, Franklin-Tong VE (2003): Activation of a putative MAP kinase in pollen is stimulated by the self-incompatibility (SI) response. *FEBS letters* 547: 223–227
- Saini P, Bhatia S, Mahajan M, Kaushik A, Sahu SK, Kumar A, Satbhai SB, Patel MK, Saxena S, Chaurasia OP, Lingwan M, Masakapalli SK, Yadav RK (2020): ELONGATED HYPOCOTYL5 negatively regulates DECREASE WAX BIOSYNTHESIS to increase survival during UV-B stress. *Plant physiology* 184: 2091–2106
- Salinas M, Xing S, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P (2012): Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. *Planta* 235: 1171–1184
- Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Kröber S, Amasino RA, Coupland G (2006): The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes and development* 20: 898–912
- Sessions A, Yanofsky MF, Weigel D (2000): Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science* 289: 779–782
- Sevilem I, Yadav SR, Helariutta Y (2015): Plasmodesmata: channels for intercellular signaling during plant growth and development. *Methods in molecular biology* 1217: 3–24
- Sew YS, Ströher E, Fenske R, Millar AH (2016): Loss of Mitochondrial Malate Dehydrogenase Activity Alters Seed Metabolism Impairing Seed Maturation and Post-Germination Growth in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 171: 849–863
- Shao Y, Zhou HZ, Wu Y, Zhang H, Lin J, Jiang X, He Q, Zhu J, Li Y, Yu H, Mao C (2019): OsSPL3, an SBP-Domain Protein, Regulates Crown Root Development in Rice. *The Plant cell* 31: 1257–1275

- Shikata M, Koyama T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M (2009): Arabidopsis SBP-box Genes *SPL10*, *SPL11* and *SPL2* Control Morphological Change in Association With Shoot Maturation in the Reproductive Phase. *Plant and cell physiology* 50: 2133–2145
- Shin LJ, Lo JC, Yeh KC (2012): Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis. *Plant physiology* 159: 1099–1110
- Schmid M, Uhlenhaut NH, Godard F, Demar M, Bressan R, Weigel D, Lohmann JU (2003): Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* 130: 6001–6012
- Schmidt A, Gube M, Schmidt A, Kothe E (2009): *In silico* analysis of nickel containing superoxide dismutase evolution and regulation. *Journal of basic microbiology* 49: 109–118
- Schulten A, Bytomski L, Quintana J, Bernal M, Krämer U (2019): Do Arabidopsis *Squamosa promoter binding Protein-Like* genes act together in plant acclimation to copper or zinc deficiency? *Plant direct* 3: e00150
- Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005): Specific Effects of microRNAs on the Plant Transcriptome. *Developmental cell* 8: 517–527
- Schwarz S, Grande AV, Bujdoso N, Saedler H, Huijser P (2008): The microRNA Regulated SBP-box Genes *SPL9* and *SPL15* Control Shoot Maturation in Arabidopsis. *Plant molecular biology* 67: 183–195
- Slabaugh E, Brandizzi F (2011): Membrane-tethered transcription factors provide a connection between stress response and developmental pathways. *Plant signaling and behavior* 6: 1210–1211
- Smaczniak C, Immink RG, Angenent GC, Kaufmann K (2012): Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* 139: 3081–3098
- Smékalová V, Luptovčíak I, Komis G, Šamajová O, Ovečka M, Doskočilová A, Takáč T, Vadovič P, Novák O, Pechan T, Ziemann A, Košútová P, Šamaj J (2014): Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in Arabidopsis post-embryogenic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *The New phytologist* 203: 1175–1193
- Smith HM, Hicks GR, Raikhel NV (1997): Importin  $\alpha$  from *Arabidopsis thaliana* is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. *Plant physiology* 114: 411–417
- Sommer F, Kropat J, Malasarn D, Grosseohme NE, Chen X, Giedroc DP, Merchant SS (2010): The CRR1 nutritional copper sensor in *Chlamydomonas* contains two distinct metal-responsive domains. *The Plant cell* 22: 4098–4113
- Song L, Liu D (2015): Mutations in the three *Arabidopsis* genes that encode the E2 subunit of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex differentially affect enzymatic activity and plant growth. *Plant cell reports* 34: 1919–1926
- Soyano T, Nishihama R, Morikiyo K, Ishikawa M, Machida Y (2003): NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes and development* 17: 1055–1067

- Sözen C, Schenk ST, Boudsocq M, Chardin C, Almeida-Trapp M, Krapp A, Hirt H, Mithöfer A, Colcombet J (2020): Wounding and Insect Feeding Trigger Two Independent MAPK Pathways with Distinct Regulation and Kinetics. *The Plant cell* 32: 1988–2003
- Stone JM, Liang X, Nekl ER, Stiers JJ (2005): Arabidopsis AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *The Plant journal* 41: 744–754
- Šamajová O, Komis G, Šamaj J (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in plant science* 18: 140–148
- Takáč T, Šamajová O, Pechan T, Luptovčiak I, Šamaj J (2017): Feedback Microtubule Control and Microtubule-Actin Cross-talk in *Arabidopsis* Revealed by Integrative Proteomic and Cell Biology Analysis of *KATANIN 1* Mutants. *Molecular and cellular proteomics* 16: 1591–1609
- Takáč T, Šamajová O, Vadovič P, Pechan T, Košútová P, Ovečka M, Husičková A, Komis G, Šamaj J (2014): Proteomic and biochemical analyses show a functional network of proteins involved in antioxidant defense of the Arabidopsis *anp2anp3* double mutant. *Journal of proteome research* 13: 5347–5361
- Takáč T, Vadovič P, Pechan T, Luptovčiak I, Šamajová O, Šamaj J (2016): Comparative proteomic study of Arabidopsis mutants *mpk4* and *mpk6*. *Scientific reports* 6: 28306
- Takahashi Y, Soyano T, Kosetsu K, Sasabe M, Machida Y (2010): HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology* 51: 1766–1776
- Takeo K, Ito T (2017): Subcellular localization of VIP1 is regulated by phosphorylation and 14-3-3 proteins. *FEBS letters* 591: 1972–1981
- Tamura K, Hara-Nishimura I (2014): Functional insights of nucleocytoplasmic transport in plants. *Frontiers in plant science* 5: 118
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Dóczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular cell* 15: 141–152
- Telfer A, Bollman KM, Poethig RS (1997): Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 645–654
- Thompson AJ, Tor M, Barry CS, Vrebalov J, Orfila C, Jarvis MC, Giovannoni JJ, Grierson D, Seymour GB (1999): Molecular and Genetic Characterization of a Novel Pleiotropic Tomato-Ripening Mutant. *Plant physiology* 120: 383–390
- Tomaz T, Bagard M, Pracharoenwattana I, Lindén P, Lee CP, Carroll AJ, Ströher E, Smith SM, Gardeström P, Millar AH (2010): Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in Arabidopsis. *Plant physiology* 154: 1143–1157
- Tsang CK, Chen M, Cheng X, Qi Y, Chen Y, Das I, Li X, Vallat B, Fu LW, Qian CN, Wang HY, White E, Burley SK, Zheng XFS (2018): SOD1 Phosphorylation by mTORC1 Couples Nutrient Sensing and Redox Regulation. *Molecular cell* 70: 502–515.e8
- Tsang CK, Liu Y, Thomas J, Zhang Y, Zheng XF (2014): Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature communications* 5: 3446

- Unte US, Sorensen AM, Pesaresi P, Gandikota M, Leister D, Saedler H, Huijser P (2003): *SPL8*, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 15: 1009–1019
- Usami T, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H (2009): The *more and smaller cells* mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* genes in the control of heteroblasty. *Development* 136: 955–964
- Vermel M, Guermann B, Delage L, Grienenberger JM, Maréchal-Drouard L, Gualberto JM (2002): A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 99: 5866–5871
- Visentin I, Pagliarani C, Deva E, Caracci A, Turečková V, Novák O, Lovisolo C, Schubert A, Cardinale F (2020): A novel strigolactone-miR156 module controls stomatal behaviour during drought recovery. *Plant, cell and environment* 43: 1613–1624
- Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG, Thomashow MF (2005): Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *The Plant journal* 41: 195–211
- Voronin V, Aionesei T, Limmongkon A, Barinova I, Touraev A, Laurière C, Coronado MJ, Testillano PS, Risueño MC, Heberle-Bors E, Wilson C (2004): The MAP kinase kinase NtMEK2 is involved in tobacco pollen germination. *FEBS letters* 560: 86–90
- Voronin V, Touraev A, Kieft H, van Lammeren AA, Heberle-Bors E, Wilson C (2001): Temporal and tissue-specific expression of the tobacco ntf4 MAP kinase. *Plant molecular biology* 45: 679–689
- Wang R, Brattain MG (2007): The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS letters* 581: 3164–3170
- Wang JW, Czech B, Weigel D (2009a): miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138: 738–749
- Wang Y, Hu Z, Yang Y, Chen X, Chen G (2009b): Function annotation of an SBP-box gene in *Arabidopsis* based on analysis of co-expression networks and promoters. *International journal of molecular sciences* 10: 116–132
- Wang H, Chevalier D, Larue C, Ki Cho S, Walker JC (2007a): The Protein Phosphatases and Protein Kinases of *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book* 5: e0106
- Wang H, Liu Y, Bruffett K, Lee J, Hause G, Walker JC, Zhang S (2008): Haplo-insufficiency of *MPK3* in *MPK6* mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in *Arabidopsis* ovule development. *The Plant cell* 20: 602–613
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S (2007b): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 19: 63–73
- Wang B, Wang H (2017): *IPAI*: A New "Green Revolution" Gene? *Molecular plant* 10: 779–781
- Wang C, Xu H, Lin S, Deng W, Zhou J, Zhang Y, Shi Y, Peng D, Xue Y (2020): GPS 5.0: An Update on the Prediction of Kinase-specific Phosphorylation Sites in Proteins. *Genomics, proteomics and bioinformatics* 18: 72–80
- Wang J, Zhou L, Shi H, Chern M, Yu H, Yi H, He M, Yin J, Zhu X, Li Y, Li W, Liu J, Wang J, Chen X, Qing H, Wang Y, Liu G, Wang W, Li P, Wu X, Zhu L, Zhou JM, Ronald PC,

- Li S, Li J, Chen X (2018): A single transcription factor promotes both yield and immunity in rice. *Science* 361: 1026–1028
- Wilcox KC, Zhou L, Jordon JK, Huang Y, Yu Y, Redler RL, Chen X, Caplow M, Dokholyan NV (2009): Modifications of superoxide dismutase (SOD1) in human erythrocytes: a possible role in amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of biological chemistry* 284: 13940–13947
- Wilson C, Voronin V, Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E (1997): A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. *The Plant cell* 9: 2093–2100
- Wirthmueller L, Roth C, Fabro G, Caillaud MC, Rallapalli G, Asai S, Sklenar J, Jones AM, Wiermer M, Jones JD, Banfield MJ (2015): Probing formation of cargo/importin- $\alpha$  transport complexes in plant cells using a pathogen effector. *The Plant journal* 81: 40–52
- Wu X, Dinneny JR, Crawford KM, Rhee Y, Citovsky V, Zambryski PC, Weigel D (2003): Modes of intercellular transcription factor movement in the *Arabidopsis* apex. *Development* 130: 3735–3745
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS (2009): The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138: 750–759
- Wu G, Poethig RS (2006): Temporal Regulation of Shoot Development in *Arabidopsis Thaliana* by *MiR156* and Its Target *SPL3*. *Development* 133: 3539–3547
- Wu JR, Wang TY, Weng CP, Duong NKT, Wu SJ (2019): AtJ3, a specific HSP40 protein, mediates protein farnesylation-dependent response to heat stress in *Arabidopsis*. *Planta* 250: 1449–1460
- 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
- Xing Y, Chen WH, 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
- Xing S, Salinas M, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P (2010): miR156-Targeted and Nontargeted SBP-Box Transcription Factors Act in Concert to Secure Male Fertility in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 22: 3935–3950
- Xu Y, Ding J, Wu LY, Chou KC (2013): iSNO-PseAAC: predict cysteine S-nitrosylation sites in proteins by incorporating position specific amino acid propensity into pseudo amino acid composition. *PLoS one* 8: e55844
- Xu XM, Lin H, Maple J, Björkblom B, Alves G, Larsen JP, Møller SG (2010): The *Arabidopsis* DJ-1a protein confers stress protection through cytosolic SOD activation. *Journal of cell science* 123: 1644–1651
- Xu J, Tran T, Padilla Marcia CS, Braun DM, Goggin FL (2017): Superoxide-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. *Plant physiology and biochemistry* 117: 51–60
- Xu Y, Xu H, Wall MM, Yang J (2020): Roles of Transcription Factor SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like Gene Family in Papaya (*Carica Papaya*) Development and Ripening. *Genomics* 112: 2734–2747

- Xue Y, Liu Z, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X, Ren J (2010): GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PloS one* 5: e11290
- Yadav S, Gill SS, Passricha N, Gill R, Badhwar P, Anjum NA, Francisco J-BJ, Tuteja N (2019): Genome-wide analysis and transcriptional expression pattern-assessment of superoxide dismutase (SOD) in rice and *Arabidopsis* under abiotic stresses. *Plant gene* 17: 100165
- Yamaguchi A, Wu MF, Yang L, Wu G, Poethig RS, Wagner D (2009): The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Developmental cell* 17: 268–278
- Yamakura F, Kawasaki H (2010): Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et biophysica acta* 1804: 318–325
- Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K (1998): Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *The Journal of biological chemistry* 273: 14085–14089
- Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T (2009): SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 21: 347–361
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2004): A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of Arabidopsis SBP-family transcription factors. *Journal of molecular biology* 337: 49–63
- Yamasaki H, Pilon M, Shikanai T (2008): How do plants respond to copper deficiency? *Plant signaling and behavior* 3: 231–232
- Yang Z, Wang X, Gu S, Hu Z, Xu H, Xu C (2008): Comparative study of SBP-box gene family in *Arabidopsis* and rice. *Gene* 407: 1–11
- Yonashiro R, Sugiura A, Miyachi M, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R, Ogata Y, Suzuki T, Dohmae N, Yanagi S (2009): Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation. *Molecular biology of the cell* 20: 4524–4530
- Yu N, Cai WJ, Wang S, Shan CM, Wang LJ, Chen XY (2010): Temporal Control of Trichome Distribution by MicroRNA156-Targeted *SPL* Genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 22: 2322–2335
- Yu N, Niu QW, Ng KH, Chua NH (2015): The role of miR156/SPLs modules in Arabidopsis lateral root development. *The Plant journal* 83: 673–685
- Zaidi I, Ebel C, Touzri M, Herzog E, Evrard JL, Schmit AC, Masmoudi K, Hanin M (2010): TMKP1 is a novel wheat stress responsive MAP Kinase phosphatase localized in the nukleus. *Plant molecular biology* 73: 325–338
- Zalatan JG, Coyle SM, Rajan S, Sidhu SS, Lim WA (2012): Conformational control of the Ste5 scaffold protein insulates against MAP kinase misactivation. *Science* 337: 1218–1222
- Zeiner A (2019): Selekcce homozygotních mutantních linií *Arabidopsis thaliana* s T-DNA inzercí v genech *SPL1* a *SPL7* a příprava expresních vektorů pro kvasinkový dvouhybridní systém. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

- Zeng Q, Chen JG, Ellis BE (2011): AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. *The Plant journal* 67: 895–906
- Zhang Y, Schwarz S, Saedler H, Huijser P (2006): SPL8, a local regulator in a subset of gibberellin-mediated developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* 63: 429–439
- Zhang A, Wang S, Kim J, Yan J, Yan X, Pang Q, Hua J (2020b): Nuclear pore complex components have temperature-influenced roles in plant growth and immunity. *Plant, cell and environment* 43: 1452–1466
- Zhang P, Wang R, Yang X, Ju Q, Li W, Lü S, Tran LP, Xu J (2020a): The R2R3-MYB transcription factor AtMYB49 modulates salt tolerance in *Arabidopsis* by modulating the cuticle formation and antioxidant defence. *Plant, cell and environment* 43: 1925–1943
- Zhang M, Wu H, Su J, Wang H, Zhu Q, Liu Y, Xu J, Lukowitz W, Zhang S (2017): Maternal control of embryogenesis by MPK6 and its upstream MKK4/MKK5 in *Arabidopsis*. *The Plant journal* 92: 1005–1019
- Zhang H, Zhang L, Han J, Qian Z, Zhou B, Xu Y, Wu G (2019): The nuclear localization signal is required for the function of *squamosa promoter binding protein-like gene 9* to promote vegetative phase change in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* 100: 571–578
- Zhang H, Zhao X, Li J, Cai H, Deng XW, Li L (2014): MicroRNA408 is critical for the *HY5-SPL7* gene network that mediates the coordinated response to light and copper. *The Plant cell* 26: 4933–4953
- Zhao H, Nie K, Zhou H, Yan X, Zhan Q, Zheng Y, Song CP (2020): ABI5 modulates seed germination via feedback regulation of the expression of the *PYR/PYL/RCAR* ABA receptor genes. *The New phytologist* 228: 596–608
- Zhao Y, Zhang Z, Gao J, Wang P, Hu T, Wang Z, Hou YJ, Wan Y, Liu W, Xie S, Lu T, Xue L, Liu Y, Macho AP, Tao WA, Bressan RA, Zhu JK (2018): *Arabidopsis* Duodecuple Mutant of PYL ABA Receptors Reveals PYL Repression of ABA-Independent SnRK2 Activity. *Cell reports* 23: 3340–3351.e5
- Zhao F, Zheng YF, Zeng T, Sun R, Yang JY, Li Y, Ren DT, Ma H, Xu ZH, Bai SN (2017): Phosphorylation of SPOROCTELESS/NOZZLE by the MPK3/6 Kinase Is Required for Anther Development. *Plant physiology* 173: 2265–2277
- Zulawski M, Braginets R, Schulze WX (2013): PhosPhAt goes kinases – searchable protein kinase target information in the plant phosphorylation site database PhosPhAt. *Nucleic acids research* 41: D1176–D1184
- Zuo J, Niu QW, Chua NH (2000): Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant journal* 24: 265–273

## Seznam příloh

- Příloha 1:** Přehled analyzovaných promotorů genů identifikovaných v rámci proteomických analýz interaktomu FSD1 a proteomů mutantů *mpk3.1*, *mpk4* a *mpk6.2* a jejich rozdělení podle překryvu hledaných motivů s cílem identifikace potenciálně SPL-regulovaných genů.
- Příloha 2:** Identifikace GTAC motivu v analyzovaných genech kódující proteiny identifikované v rámci proteomických analýz interaktomu FSD1 a proteomů mutantů *mpk3.1*, *mpk4* a *mpk6.2*.
- Příloha 3:** Identifikace TNCGTACAA motivu v analyzovaných genech kódující proteiny identifikované v rámci proteomických analýz interaktomu FSD1 a proteomů mutantů *mpk3.1*, *mpk4* a *mpk6.2*.
- Příloha 4:** Identifikace TGGTCCGTACAATGT motivu v analyzovaných genech kódující proteiny identifikované v rámci proteomických analýz interaktomu FSD1 a proteomů mutantů *mpk3.1*, *mpk4* a *mpk6.2*.
- Příloha 5:** Rostliny *Arabidopsis thaliana spl1.1/mpk3.1* a *spl1.1/mpk6.2* čtvrtý týden po vyklíčení.
- Příloha 6:** Hodnocení kvality izolované celkové RNA po aplikaci DNasy pro minimalizaci kontaminace gDNA.
- Příloha 7:** Lokalizace T-DNA inserce linie *spl1.2* (SALK\_058642).
- Příloha 8:** Příprava konstruktů *pSPL1*-pDONR P4-P1R a *SPL1*-pDONR P2R-P3.
- Příloha 9:** Nekrózy pozorované na inokulovaných listech *Nicotiana benthamiana* čtvrtý den po transformaci indikovaným konstruktem.
- Příloha 10:** Molekulární klonování kódující sekvence *SPL1* pro bimolekulární fluorescenční komplementaci.
- Příloha 11:** Změna exprese *SPL1* po aplikaci kyseliny abscisové, která byla zaznamenána v databázi Genevestigator (Hruz et al., 2008).



**Příloha 1:** Přehled analyzovaných promotorů genů identifikovaných v rámci proteomických analýz interaktomu FSD1 (Dvořák *et al.*, nepublikováno) a proteomů mutantů *mpk3.1*. (Takáč *et al.*, nepublikováno), *mpk4* a *mpk6.2* (Takáč *et al.*, 2016) a jejich rozdělení podle překryvu hledaných motivů s cílem identifikace potenciálně SPL-regulovaných genů. AGI – identifikátor genu.

Datový soubor	Motiv	Počet	AGI
FSD1 interaktom	GTAC TGGTCCGTACAATGT TNCGTACAA	7	AT1G11840 AT5G23080 AT3G16430 AT4G25100 AT4G10340 AT1G79200 AT1G20020
	TGGTCCGTACAATGT TNCGTACAA	9	AT1G56410 AT2G39390 AT5G42980 AT2G16360 AT1G44910 AT1G48830 AT1G54410 AT1G03910 AT2G05520
	GTAC TGGTCCGTACAATGT	12	AT5G02500 AT5G37780 AT1G78900 AT4G36690 AT5G20720 AT2G21660 AT1G13440 AT1G54000 AT1G53240 AT1G60900 AT2G47400 AT3G26650
	GTAC TNCGTACAA	2	AT5G64200 AT3G16450
	TGGTCCGTACAATGT	7	AT1G52570 AT1G66270 AT3G09680 AT1G23410 AT1G29920 AT2G25980 AT3G15730
	TNCGTACAA	1	AT5G38410
<i>mpk3</i> proteom	GTAC TGGTCCGTACAATGT TNCGTACAA	18	AT4G08770 AT5G26260 AT1G23820 AT4G23680 AT4G34050 AT2G02010 AT5G40370 AT1G66200 AT3G22890 AT1G21440 AT1G78300 AT3G16460 AT5G09500 AT4G25100 AT3G60750 AT2G01520 AT2G30870 AT1G12310
	TGGTCCGTACAATGT TNCGTACAA	13	AT2G05990 AT1G35720 AT3G48990 AT2G21170 AT1G62660 AT3G09820 AT1G11910 AT4G18100 AT3G17240 AT5G04430 AT3G02090 AT1G48830 AT2G20630
	GTAC TGGTCCGTACAATGT	16	AT4G37910 AT1G51980 AT4G35090 AT2G33150 AT4G13850 AT1G22530 AT2G36830 AT3G05020 AT2G47470 AT1G78900 AT5G09590 AT1G66240 AT5G17710 AT1G13440 AT5G64100 AT1G80230
	GTAC TNCGTACAA	7	AT4G04830 AT1G18080 AT3G55280 AT3G14790 AT2G01140 AT1G52400 AT1G56070
	TGGTCCGTACAATGT	28	AT4G23670 AT3G05900 AT2G21870 AT3G08590 AT1G01100 AT5G65020 AT3G09200 AT4G08390 AT1G13930 AT5G35590 AT5G10360 AT5G60390 AT5G20290 AT5G35360 AT2G43535 AT1G75950 AT2G47510 AT5G10860 AT1G72370 AT3G25520 AT4G39200 AT2G27710 AT2G33040 AT5G58290 AT3G13920 AT1G26550 AT3G58610 AT2G24200
	TNCGTACAA	11	AT4G16660 AT5G17920 AT5G11170 AT4G10480 AT3G03250 AT3G09260 AT5G39730 AT1G54630 AT3G16640 AT5G38410 AT3G18780
GTAC	8	AT3G19450 AT4G20260 AT3G16470 AT3G56240 AT3G51260 AT1G20440 AT4G11150 AT1G20450	

**Příloha 1: Pokračování.**

<b>Datový soubor</b>	<b>Motiv</b>	<b>Počet</b>	<b>AGI</b>
<i>mpk4</i> proteom	<b>GTAC</b> <b>TGGTCCGTACAATGT</b> <b>TNCGTACAA</b>	16	AT4G16260 AT5G26260 AT1G11840 AT4G23680 AT4G34050 AT1G53850 AT5G45775 AT3G16460 AT4G24190 AT2G45820 AT3G09440 AT5G47030 AT2G01520 AT3G43870 AT4G38740 AT4G13860
	<b>TGGTCCGTACAATGT</b> <b>TNCGTACAA</b>	11	AT3G32980 AT4G35830 AT1G35720 AT1G79550 AT2G21170 AT5G04430 AT1G78380 AT3G12580 AT4G34870 AT3G02090 AT3G52930
	<b>GTAC</b> <b>TGGTCCGTACAATGT</b>	13	AT3G14067 AT2G47130 AT4G37910 AT5G67500 AT1G51980 AT2G33150 AT5G43330 AT5G52840 AT5G14200 AT4G26910 AT3G04120 AT1G28290 AT1G13440
	<b>GTAC</b> <b>TNCGTACAA</b>	8	AT2G20420 AT5G16840 AT4G04830 AT3G13930 AT3G15950 AT2G43910 AT1G56070 AT1G58270
	<b>TGGTCCGTACAATGT</b>	29	AT5G56500 AT3G13300 AT3G01190 AT1G04410 AT1G63940 AT3G17210 AT3G09200 AT4G08390 AT1G54010 AT5G03630 AT4G24830 AT5G16050 AT5G20290 AT4G13940 AT2G21045 AT1G75950 AT4G02520 AT3G22110 AT1G73260 AT5G54640 AT2G33040 AT4G27090 AT2G30930 AT2G01530 AT3G13920 AT5G64350 AT3G23600 AT2G19760 AT2G24200
	<b>TNCGTACAA</b>	2	AT5G17920 AT4G09320
	<b>GTAC</b>	8	AT2G47730 AT2G32240 AT3G16470 AT4G15802 AT5G48230 AT4G11150 AT1G20620 AT1G20450
	<i>mpk6</i> proteom	<b>GTAC</b> <b>TGGTCCGTACAATGT</b> <b>TNCGTACAA</b>	7
<b>TGGTCCGTACAATGT</b> <b>TNCGTACAA</b>		3	AT5G19780 AT1G12000 AT3G09840
<b>GTAC</b> <b>TGGTCCGTACAATGT</b>		6	AT3G20050 AT1G28290 AT4G13850 AT1G13440 AT4G13930 AT2G36830
<b>GTAC</b> <b>TNCGTACAA</b>		3	AT4G31440 AT2G27720 AT1G18080
<b>TGGTCCGTACAATGT</b>		11	AT5G09810 AT1G55020 AT4G14960 AT2G36880 AT5G19510 AT3G52990 AT3G61440 AT3G13920 AT3G58610 AT3G15730 AT3G05530
<b>TNCGTACAA</b>		2	AT2G42100 AT4G10480
<b>GTAC</b>		1	AT5G26280

**Příloha 2:** Identifikace GTAC motivu v analyzovaných genech kódující proteiny identifikované v rámci proteomických analýz interaktomu FSD1 (Dvořák *et al.*, nepublikováno) a proteomů mutantů *mpk3.1* (Takáč *et al.*, nepublikováno), *mpk4* a *mpk6.2* (Takáč *et al.*, 2016). AGI – identifikátor genu.

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		p-hodnota	q-hodnota
<b>Kontrola</b>	AT1G69120	<b>API</b>	298	301	0,00383	0,763
			406	409	0,00383	0,763
			639	642	0,00383	0,763
			729	732	0,00383	0,763
			944	947	0,00383	0,763
	AT4G25100	<b>FSD1</b>	213	216	0,00383	0,635
			324	327	0,00383	0,635
			336	339	0,00383	0,635
			353	356	0,00383	0,635
			375	378	0,00383	0,635
	AT5G60910	<b>FUL</b>	652	655	0,00383	0,635
			449	452	0,00383	1
			454	457	0,00383	1
	AT5G61850	<b>LFY</b>	792	795	0,00383	1
			540	543	0,00383	1
776			779	0,00383	1	
			902	905	0,00383	1
<b>FSD1 interaktom</b>	AT1G11840	<b>GLX1</b>	471	474	0,00383	1
			476	479	0,00383	1
	AT1G13440	<b>GAPC2</b>	215	218	0,00383	1
			868	871	0,00383	1
	AT1G20020	<b>LFNR2</b>	675	678	0,00383	1
			851	854	0,00383	1
	AT1G53240	<b>MMDH1</b>	320	323	0,00383	1
			339	342	0,00383	1
			364	367	0,00383	1
			416	419	0,00383	1
			808	811	0,00383	1
	AT1G54000	<b>GLL22</b>	92	95	0,00383	1
			306	309	0,00383	1
			740	743	0,00383	1
	AT1G60900	<b>U2AF65B</b>	26	29	0,00383	1
			623	626	0,00383	1
			924	927	0,00383	1
	AT1G78900	<b>VHA-A</b>	335	338	0,00383	1
			938	941	0,00383	1
			409	412	0,00383	1
	AT1G79200	<b>SCI1</b>	507	510	0,00383	1
			606	609	0,00383	1
			950	953	0,00383	1
			797	800	0,00383	1
	AT2G21660	<b>GRP7</b>	918	921	0,00383	1
			137	140	0,00383	1
	AT2G47400	<b>CP12</b>	763	766	0,00383	1
			85	88	0,00383	1
	AT3G16430	<b>JAL31</b>	213	216	0,00383	1
			556	559	0,00383	1
			848	851	0,00383	1
			26	29	0,00383	1
	AT3G16450	<b>JAL33</b>	41	44	0,00383	1
			648	651	0,00383	1
			487	490	0,00383	1
	AT3G26650	<b>GAPA1</b>	775	778	0,00383	1
			640	643	0,00383	1
	AT4G10340	<b>LHCB5</b>	697	700	0,00383	1
			956	959	0,00383	1
			213	216	0,00383	1
	AT4G25100	<b>FSD1</b>	324	327	0,00383	1
			336	339	0,00383	1
			353	356	0,00383	1
			375	378	0,00383	1
			652	655	0,00383	1
AT4G36690	<b>ATU2AF65A</b>	514	517	0,00383	1	
		704	707	0,00383	1	
		803	806	0,00383	1	
AT5G02500	<b>HSP70-1</b>	268	271	0,00383	1	
		311	314	0,00383	1	
AT5G20720	<b>CPN21</b>	600	603	0,00383	1	
		961	964	0,00383	1	
AT5G23080	<b>TGH</b>	307	310	0,00383	1	
		461	464	0,00383	1	
AT5G37780	<b>CAM1</b>	513	516	0,00383	1	
		731	734	0,00383	1	
		737	740	0,00383	1	
AT5G64200	<b>SC35</b>	139	142	0,00383	1	
		297	300	0,00383	1	

**Příloha 2: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		p-hodnota	q-hodnota
<i>mpk3</i> proteom	AT1G12310	EF-hand family protein	68	71	0.00383	1
			552	555	0.00383	1
			893	896	0.00383	1
	AT1G13440	GAPC2	215	218	0.00383	1
			868	871	0.00383	1
			577	580	0.00383	1
	AT1G18080	RACK1A	672	675	0.00383	1
			742	745	0.00383	1
			746	749	0.00383	1
			379	382	0.00383	1
	AT1G20440	COR47	464	467	0.00383	1
			924	927	0.00383	1
	AT1G20450	ERD10	385	388	0.00383	1
			428	431	0.00383	1
	AT1G21440	PEPC-family protein	20	23	0.00383	1
			147	150	0.00383	1
			239	242	0.00383	1
	AT1G22530	PATL2	599	602	0.00383	1
			752	755	0.00383	1
			885	888	0.00383	1
	AT1G23820	SPDS1	957	960	0.00383	1
			221	224	0.00383	1
			382	385	0.00383	1
			403	406	0.00383	1
	AT1G51980	MPP-like protein	744	747	0.00383	1
			151	154	0.00383	1
			189	192	0.00383	1
	AT1G52400	BGLU18	447	450	0.00383	1
			235	238	0.00383	1
	AT1G56070	LOS1	450	453	0.00383	1
			494	497	0.00383	1
			164	167	0.00383	1
	AT1G66200	GLN1	843	846	0.00383	1
			115	118	0.00383	1
	AT1G66240	HMP14	975	978	0.00383	1
			10	13	0.00383	1
			17	20	0.00383	1
	AT1G78300	GRF2	385	388	0.00383	1
			852	855	0.00383	1
			713	716	0.00383	1
			776	779	0.00383	1
	AT1G78900	VHA-A	335	338	0.00383	1
			938	941	0.00383	1
	AT1G80230	Rd-like protein	908	911	0.00383	1
			985	988	0.00383	1
	AT2G01140	FBA3	6	9	0.00383	1
			17	20	0.00383	1
956			959	0.00383	1	
AT2G01520	ZCE1	313	316	0.00383	1	
		317	320	0.00383	1	
AT2G02010	GAD4	538	541	0.00383	1	
		477	480	0.00383	1	
		854	857	0.00383	1	
AT2G30870	GSTF10	533	536	0.00383	1	
		880	883	0.00383	1	
AT2G33150	KAT2	572	575	0.00383	1	
		978	981	0.00383	1	
AT2G36830	$\gamma$ -TIP1	213	216	0.00383	1	
		282	285	0.00383	1	
AT2G47470	PDI11	377	380	0.00383	1	
		966	969	0.00383	1	
AT3G05020	ACP1	64	67	0.00383	1	
		263	266	0.00383	1	
		858	861	0.00383	1	
AT3G14790	RHM3	169	172	0.00383	1	
		419	422	0.00383	1	
		851	854	0.00383	1	
AT3G16460	JAL34	83	86	0.00383	1	
		96	99	0.00383	1	
		556	559	0.00383	1	
		876	879	0.00383	1	
AT3G16470	JAC1	26	29	0.00383	1	
		259	262	0.00383	1	

**Příloha 2: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		p-hodnota	q-hodnota
<i>mpk3</i> proteom	AT3G19450	<b>CAD4</b>	280	283	0,00383	1
			582	585	0,00383	1
	AT3G22890	<b>APS1</b>	146	149	0,00383	1
			479	482	0,00383	1
	AT3G51260	<b>PAD1</b>	145	148	0,00383	1
			196	199	0,00383	1
			408	411	0,00383	1
			428	431	0,00383	1
			818	821	0,00383	1
			513	516	0,00383	1
	AT3G55280	<b>RPL23A2</b>	702	705	0,00383	1
			897	900	0,00383	1
	AT3G56240	<b>HMP31</b>	285	288	0,00383	1
			291	294	0,00383	1
			318	321	0,00383	1
			340	343	0,00383	1
	AT3G60750	<b>TKL1</b>	847	850	0,00383	1
			349	352	0,00383	1
	AT4G04830	<b>MSRB5</b>	895	898	0,00383	1
			74	77	0,00383	1
	AT4G08770	<b>PRX37</b>	274	277	0,00383	1
			221	224	0,00383	1
	AT4G11150	<b>EMB2448</b>	687	690	0,00383	1
			849	852	0,00383	1
			163	166	0,00383	1
			359	362	0,00383	1
			291	294	0,00383	1
			468	471	0,00383	1
	AT4G13850	<b>GRP2</b>	489	492	0,00383	1
			510	513	0,00383	1
			547	550	0,00383	1
			565	568	0,00383	1
			966	969	0,00383	1
			158	161	0,00383	1
	AT4G20260	<b>PCAP1</b>	188	191	0,00383	1
			188	191	0,00383	1
	AT4G23680	<b>PC/DLT-superfamily protein</b>	240	243	0,00383	1
			933	936	0,00383	1
	AT4G25100	<b>FSD1</b>	213	216	0,00383	1
			324	327	0,00383	1
			336	339	0,00383	1
			353	356	0,00383	1
			375	378	0,00383	1
			652	655	0,00383	1
	AT4G34050	<b>CCOAOMT1</b>	128	131	0,00383	1
			635	638	0,00383	1
	AT4G35090	<b>CAT2</b>	59	62	0,00383	1
294			297	0,00383	1	
483			486	0,00383	1	
AT4G37910	<b>MTHSC70-1</b>	849	852	0,00383	1	
		397	400	0,00383	1	
		853	856	0,00383	1	
AT5G09500	<b>RPS19-family protein</b>	135	138	0,00383	1	
		743	746	0,00383	1	
		917	920	0,00383	1	
AT5G09590	<b>MTHSC70-2</b>	995	998	0,00383	1	
		306	309	0,00383	1	
		358	361	0,00383	1	
AT5G17710	<b>CGE1</b>	733	736	0,00383	1	
		777	780	0,00383	1	
		809	812	0,00383	1	
AT5G26260	<b>TRAF-like family protein</b>	815	818	0,00383	1	
		332	335	0,00383	1	
		517	520	0,00383	1	
		727	730	0,00383	1	
		827	830	0,00383	1	
		973	976	0,00383	1	
AT5G40370	<b>GRXC2</b>	576	579	0,00383	1	
		745	748	0,00383	1	
AT5G64100	<b>PRX69</b>	346	349	0,00383	1	
		684	687	0,00383	1	
<i>mpk4</i> proteom	AT1G11840	<b>GLX1</b>	471	474	0,00383	1
			476	479	0,00383	1
	AT1G13440	<b>GAPC2</b>	215	218	0,00383	1
			868	871	0,00383	1
AT1G20450	<b>ERD10</b>	385	388	0,00383	1	
		428	431	0,00383	1	

**Příloha 2: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		p-hodnota	q-hodnota
<i>mpk4</i> proteom	AT1G20620	<b>ROG1</b>	140	143	0.00383	1
			910	913	0.00383	1
	AT1G28290	<b>AGP31</b>	162	165	0.00383	1
			206	209	0.00383	1
	AT1G51980	<b>MPP-like protein</b>	985	988	0.00383	1
			151	154	0.00383	1
			189	192	0.00383	1
	AT1G53850	<b>PAE1</b>	447	450	0.00383	1
			474	477	0.00383	1
			536	539	0.00383	1
			837	840	0.00383	1
	AT1G56070	<b>LOS1</b>	990	993	0.00383	1
			164	167	0.00383	1
			843	846	0.00383	1
	AT1G58270	<b>ZW9</b>	47	50	0.00383	1
			291	294	0.00383	1
			375	378	0.00383	1
			514	517	0.00383	1
	AT2G01520	<b>ZCE1</b>	313	316	0.00383	1
			317	320	0.00383	1
			538	541	0.00383	1
	AT2G20420	<b>ACL-family protein</b>	249	252	0.00383	1
			673	676	0.00383	1
			753	756	0.00383	1
	AT2G32240	<b>PICC</b>	616	619	0.00383	1
			711	714	0.00383	1
	AT2G33150	<b>KAT2</b>	572	575	0.00383	1
			978	981	0.00383	1
	AT2G43910	<b>HOL1</b>	470	473	0.00383	1
			995	998	0.00383	1
	AT2G45820	<b>REM1.3</b>	127	130	0.00383	1
			183	186	0.00383	1
			742	745	0.00383	1
177			180	0.00383	1	
AT2G47130	<b>SDR3</b>	792	795	0.00383	1	
		209	212	0.00383	1	
AT2G47730	<b>GSTF8</b>	497	500	0.00383	1	
		769	772	0.00383	1	
AT3G04120	<b>GAPC1</b>	915	918	0.00383	1	
		131	134	0.00383	1	
AT3G09440	<b>HSP70-family protein</b>	624	627	0.00383	1	
		926	929	0.00383	1	
		932	935	0.00383	1	
		141	144	0.00383	1	
AT3G13930	<b>MTE2-2</b>	339	342	0.00383	1	
		354	357	0.00383	1	
		429	432	0.00383	1	
		535	538	0.00383	1	
AT3G14067	<b>SASP</b>	688	691	0.00383	1	
		760	763	0.00383	1	
		606	609	0.00383	1	
AT3G15950	<b>TSA1</b>	612	615	0.00383	1	
		83	86	0.00383	1	
AT3G16460	<b>JAL34</b>	96	99	0.00383	1	
		556	559	0.00383	1	
		876	879	0.00383	1	
		26	29	0.00383	1	
AT3G16470	<b>JAC1</b>	259	262	0.00383	1	
		611	614	0.00383	1	
AT3G43870	<b>HP</b>	918	921	0.00383	1	
		951	954	0.00383	1	
		74	77	0.00383	1	
AT4G04830	<b>MSRB5</b>	274	277	0.00383	1	
		163	166	0.00383	1	
AT4G11150	<b>EMB2448</b>	359	362	0.00383	1	
		458	461	0.00383	1	
AT4G13860	<b>RNA-binding-family protein</b>	590	593	0.00383	1	
		248	251	0.00383	1	
AT4G15802	<b>HSBP</b>	924	927	0.00383	1	
		90	93	0.00383	1	
AT4G16260	<b>GH-family protein</b>	216	219	0.00383	1	
		188	191	0.00383	1	
AT4G23680	<b>PC/DLT-superfamily protein</b>	240	243	0.00383	1	
		933	936	0.00383	1	
		240	243	0.00383	1	

**Příloha 2: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		p-hodnota	q-hodnota
<i>mpk4</i> proteom	AT4G24190	<b>HSP90.7</b>	126	129	0,00383	1
			462	465	0,00383	1
	AT4G26910	<b>DLST</b>	451	454	0,00383	1
			552	555	0,00383	1
			592	595	0,00383	1
			753	756	0,00383	1
			941	944	0,00383	1
	AT4G34050	<b>CCOAOMT1</b>	128	131	0,00383	1
			635	638	0,00383	1
	AT4G37910	<b>MTHSC70-1</b>	397	400	0,00383	1
			853	856	0,00383	1
	AT4G38740	<b>ROC1</b>	807	810	0,00383	1
			856	859	0,00383	1
	AT5G14200	<b>IMD1</b>	63	66	0,00383	1
			285	288	0,00383	1
			711	714	0,00383	1
			825	828	0,00383	1
	AT5G16840	<b>BPA1</b>	92	95	0,00383	1
			915	918	0,00383	1
	AT5G26260	<b>TRAF-like family protein</b>	332	335	0,00383	1
			517	520	0,00383	1
			727	730	0,00383	1
			827	830	0,00383	1
			973	976	0,00383	1
			261	264	0,00383	1
	AT5G43330	<b>C-NAD-MDH2</b>	622	625	0,00383	1
			99	102	0,00383	1
	AT5G45775	<b>RL5P-family protein</b>	581	584	0,00383	1
			631	634	0,00383	1
			912	915	0,00383	1
			964	967	0,00383	1
			512	515	0,00383	1
AT5G47030	<b>ATPase-<math>\delta</math></b>	646	649	0,00383	1	
		781	784	0,00383	1	
		341	344	0,00383	1	
AT5G48230	<b>ACAT2</b>	963	966	0,00383	1	
		429	432	0,00383	1	
AT5G52840	<b>NADH-UOR-like protein</b>	939	942	0,00383	1	
		547	550	0,00383	1	
AT5G67500	<b>VDAC2</b>	620	623	0,00383	1	
		813	816	0,00383	1	
		250	253	0,00383	1	
<i>mpk6</i> proteom	AT1G12080	<b>VCBP-like protein</b>	735	738	0,00383	1
			215	218	0,00383	1
	AT1G13440	<b>GAPC2</b>	868	871	0,00383	1
			577	580	0,00383	1
	AT1G18080	<b>RACK1A</b>	672	675	0,00383	1
			742	745	0,00383	1
			746	749	0,00383	1
			162	165	0,00383	1
	AT1G28290	<b>AGP31</b>	206	209	0,00383	1
			985	988	0,00383	1
	AT1G30230	<b>EF1BB</b>	390	393	0,00383	1
			650	653	0,00383	1
	AT2G10450	<b>14-3-3-family protein</b>	73	76	0,00383	1
			586	589	0,00383	1
	AT2G27720	<b>60SRP-family protein</b>	41	44	0,00383	1
			163	166	0,00383	1
	AT2G36830	<b><math>\gamma</math>-TIP1</b>	213	216	0,00383	1
			282	285	0,00383	1
	AT3G09440	<b>HSP70-family protein</b>	131	134	0,00383	1
			624	627	0,00383	1
			926	929	0,00383	1
			932	935	0,00383	1
	AT3G20050	<b>CCT1</b>	184	187	0,00383	1
			347	350	0,00383	1
			703	706	0,00383	1
	AT3G23810	<b>SAHH2</b>	390	393	0,00383	1
			407	410	0,00383	1
	AT3G26520	<b><math>\gamma</math>-TIP2</b>	84	87	0,00383	1
491			494	0,00383	1	
539			542	0,00383	1	
662			665	0,00383	1	
724			727	0,00383	1	
750			753	0,00383	1	

**Příloha 2: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		p-hodnota	q-hodnota		
<i>mpk6</i> proteom	AT3G51840	<b>ACX4</b>	90	93	0.00383	1		
			704	707	0.00383	1		
			708	711	0.00383	1		
	AT4G13850	<b>GRP2</b>	860	863	0.00383	1		
			291	294	0.00383	1		
			468	471	0.00383	1		
			489	492	0.00383	1		
			510	513	0.00383	1		
			547	550	0.00383	1		
			565	568	0.00383	1		
			966	969	0.00383	1		
			AT4G13930	<b>SHM4</b>	577	580	0.00383	1
					983	986	0.00383	1
	AT4G31440	<b>SAGA-s protein</b>	176	179	0.00383	1		
			970	973	0.00383	1		
	AT5G26280	<b>TRAF-like family protein</b>	32	35	0.00383	1		
			64	67	0.00383	1		
			241	244	0.00383	1		
			566	569	0.00383	1		
			892	895	0.00383	1		
		970	973	0.00383	1			



**Příloha 3:** Identifikace TNCGTACAA motivu v analyzovaných genech kódující proteiny identifikované v rámci proteomických analýz interaktomu FSD1 (Dvořák *et al.*, nepublikováno) a proteomů mutantů *mpk3.1* (Takáč *et al.*, nepublikováno), *mpk4* a *mpk6.2* (Takáč *et al.*, 2016). AGI – identifikátor genu.

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		Identifikovaná sekvence	p-hodnota	q-hodnota		
<b>Kontrola</b>	AT1G69120	<b>API</b>	404	412	TCCGTACAA	8,06E-06	0,00766		
			727	735	TGCGTACAA	8,06E-06	0,00766		
			772	780	TACTTACAA	0,000438	0,208		
			942	950	AACGTACAA	0,000254	0,161		
	AT4G25100	<b>FSD1</b>	82	90	TCCTTACAA	0,000337	0,643		
AT5G60910	<b>FUL</b>	733	741	TGCTTACAA	0,000337	0,641			
		850	858	TACGTAAA	0,000438	0,813			
<b>FSD1 interaktom</b>	AT1G03910	<b>CTN</b>	689	697	TACTTACAA	0,000438	1		
			692	700	TAAGTACAA	0,000438	1		
	AT1G11840	<b>GLX1</b>	973	981	TTCATACAA	0,000438	1		
	AT1G20020	<b>LFNR2</b>	918	926	TACGTTCAA	0,000254	1		
	AT1G44910	<b>PRP40A</b>	450	458	TTAGTACAA	0,000438	1		
	AT1G48830	<b>RPS7e family protein</b>	447	455	TACTTACAA	0,000438	1		
			AT1G54410	<b>HIRD11</b>	974	982	TTCTTACAA	0,000438	1
			AT1G56410	<b>ERD2</b>	208	216	TTTGACAA	0,000438	1
			AT1G79200	<b>SCI1</b>	407	415	CTCGTACAA	0,000254	1
	604	612			TGCGTACAG	0,000124	1		
	AT2G05520	<b>GRP3</b>	947	955	TCCGTACAG	0,000124	1		
			234	242	TGCGTCCAA	0,000124	1		
	AT2G16360	<b>40SRPS25</b>	668	676	TTGTTCAA	0,000254	1		
	AT2G39390	<b>RL29 family protein</b>	223	231	TTGGTACAA	0,000438	1		
			AT3G16430	<b>JAL31</b>	83	91	TTAGTACAA	0,000438	1
	530	538	TTCTTACAA		0,000438	1			
	796	804	TACGAACAA		0,000254	1			
	AT3G16450	<b>JAL33</b>	24	32	TACGTACAG	0,000254	1		
	AT4G10340	<b>LHCB5</b>	945	953	TACGTAAA	0,000438	1		
			954	962	TTTGACAA	0,000438	1		
AT4G25100	<b>FSD1</b>	82	90	TCCTTACAA	0,000337	1			
AT5G23080	<b>TGH</b>	304	312	TCCGTACAA	8,06E-06	0,674			
AT5G38410	<b>RB CS3B</b>	502	510	TCCGGACAA	0,000124	1			
AT5G42980	<b>TRXH3</b>	807	815	TATGTACAA	0,000438	1			
AT5G64200	<b>SC35</b>	571	579	TACATACAA	0,000438	1			
<b>mpk3 proteom</b>	AT1G11910	<b>APA1</b>	250	258	TTTGACAA	0,000438	1		
	AT1G12310	<b>EF-hand family protein</b>	65	73	TCTGTACAA	0,000337	1		
			891	899	TTGGTACAA	0,000438	1		
			441	449	TTCGAACAA	0,000254	1		
	AT1G18080	<b>RACK1A</b>	505	513	TTCGAACAA	0,000254	1		
			574	582	TACGTACAT	0,000254	1		
			740	748	TACGTACTA	0,000254	1		
			743	751	TACGTACAT	0,000254	1		
			145	153	TCAGTACAA	0,000337	1		
	AT1G21440	<b>PEPC-family protein</b>	AT1G23820	<b>SPDS1</b>	336	344	TACTTACAA	0,000438	1
			931		939	TACATACAA	0,000438	1	
	AT1G35720	<b>ANN1</b>	739	747	TACATACAA	0,000438	1		
	AT1G48830	<b>RPS7e family protein</b>	447	455	TACTTACAA	0,000438	1		
	AT1G52400		<b>BGLU18</b>	555	563	TTCTTACAA	0,000438	1	
	AT1G54630	<b>ACP3</b>	453	461	TCCCTACAA	0,000337	1		
			787	795	TTCGTATAA	0,000438	1		
	AT1G56070	<b>LOS1</b>	358	366	TTCTTACAA	0,000438	1		
	AT1G62660	<b>VI1</b>	497	505	TGCATACAA	0,000337	1		
	AT1G66200	<b>GLN1</b>	973	981	GCCGTACAA	0,000124	1		
	AT1G78300	<b>GRF2</b>	774	782	TCAGTACAA	0,000337	1		
AT2G01140	<b>FBA3</b>	494	502	TACGTAAA	0,000438	1			
		953	961	TAGGTACAA	0,000438	1			

**Příloha 3: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		Identifikovaná sekvence	p-hodnota	q-hodnota	
<i>mp.k3 proteom</i>	AT2G01520	<b>ZCE1</b>	314	322	TACGTACAT	0,000254	1	
	AT2G02010	<b>GAD4</b>	852	860	TATGTACAA	0,000438	1	
	AT2G05990	<b>ENR1</b>	53	61	TTCTTACAA	0,000438	1	
	AT2G20630	<b>PIA1</b>	461	469	TTCGAACAA	0,000254	1	
	AT2G21170	<b>PDTPI</b>	379	387	TACCTACAA	0,000438	1	
	AT2G30870	<b>GSTF10</b>	338	346	TACTTACAA	0,000438	1	
				530	538	TGGGTACAA	0,000337	1
	AT3G02090	<b>MPPBETA</b>	602	610	TACATACAA	0,000438	1	
	AT3G03250	<b>UGP1</b>	485	493	TGCATACAA	0,000337	1	
	AT3G09260	<b>BGLU23</b>	217	225	TACGTACAT	0,000254	1	
				875	883	TGCTTACAA	0,000337	1
	AT3G09820	<b>ADK1</b>	467	475	TTCTTACAA	0,000438	1	
	AT3G14790	<b>RHM3</b>	166	174	TCAGTACAA	0,000337	1	
				416	424	GACGTACAA	0,000254	1
				849	857	TCGGTACAA	0,000337	1
	AT3G16460	<b>JAL34</b>	554	562	TTTGTACAA	0,000438	1	
	AT3G16640	<b>TCTP1</b>	306	314	TACGTATAA	0,000438	1	
	AT3G17240	<b>MILPD2</b>	451	459	TATGTACAA	0,000438	1	
	AT3G18780	<b>ACT2</b>	970	978	TTCATACAA	0,000438	1	
	AT3G22890	<b>APS1</b>	476	484	TATGTACAA	0,000438	1	
	AT3G48990	<b>AAE3</b>	760	768	TACATACAA	0,000438	1	
	AT3G55280	<b>RPL23A2</b>	511	519	TGGGTACAA	0,000337	1	
	AT3G60750	<b>TKL1</b>	893	901	AGCGTACAA	0,000124	1	
	AT4G04830	<b>MSRB5</b>	72	80	TAAGTACAA	0,000438	1	
	AT4G08770	<b>PRX37</b>	218	226	TCTGTACAA	0,000337	1	
	AT4G10480	<b>NACAs family protein</b>	482	490	TGCGTATAA	0,000337	1	
	AT4G16660	<b>HSP70</b>	276	284	TTCGTAGAA	0,000438	1	
	AT4G18100	<b>RPL32e</b>	38	46	TCCGTAAAA	0,000337	1	
	AT4G23680	<b>PC/DLT-</b>	930	938	TAAGTACAA	0,000438	1	
	AT4G25100	<b>FSD1</b>	82	90	TCCTTACAA	0,000337	1	
	AT4G34050	<b>CCOAOMT1</b>	983	991	TCCGAACAA	0,000124	1	
	AT5G04430	<b>BTR1</b>	715	723	ACCGTACAA	0,000124	1	
	AT5G09500	<b>RPS19-family protein</b>	915	923	CTCGTACAA	0,000254	1	
	AT5G11170	<b>UAP56A</b>	601	609	TTCGTCCAA	0,000254	1	
				735	743	TCCTTACAA	0,000337	1
	AT5G17920	<b>METS1</b>	894	902	TTCGTAGAA	0,000438	1	
	AT5G26260	<b>TRAF-like family protein</b>	247	255	TCCGTAGAA	0,000337	1	
				514	522	TGCGTACAT	0,000124	1
				986	994	TACGGACAA	0,000254	1
	AT5G38410	<b>RB CS3B</b>	502	510	TCCGGACAA	0,000124	1	
	AT5G39730	<b>AIG2-like family protein</b>	423	431	TGAGTACAA	0,000337	1	
				570	578	TGCGTTCAA	0,000124	1
	AT5G40370	<b>GRXC2</b>	573	581	TTCGTACAG	0,000254	1	
			743	751	AACGTACAA	0,000254	1	
<i>mp.k4 proteom</i>	AT1G11840	<b>GLX1</b>	973	981	TTCATACAA	0,000438	1	
	AT1G35720	<b>ANN1</b>	739	747	TACATACAA	0,000438	1	
	AT1G53850	<b>PAE1</b>	47	55	TTCGCACAA	0,000254	1	
	AT1G56070	<b>LOS1</b>	358	366	TTCTTACAA	0,000438	1	
	AT1G58270	<b>ZW9</b>	45	53	TACGTACAT	0,000254	1	
				288	296	TAAGTACAA	0,000438	1
				372	380	TTCGTACCA	0,000254	1
	AT1G78380	<b>GST8</b>	233	241	TACGTAAAA	0,000438	1	
				509	517	TTCTTACAA	0,000438	1
	AT1G79550	<b>PGK3</b>	10	18	TTCGTAAAA	0,000438	1	
			695	703	TTCGTATAA	0,000438	1	

**Příloha 3: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		Identifikovaná sekvence	p-hodnota	q-hodnota	
<i>mpk4</i> proteom	AT2G01520	<b>ZCE1</b>	314	322	TACGTACAT	0,000254	1	
	AT2G20420	<b>ACL-family protein</b>	644	652	TACTTACAA	0,000438	1	
	AT2G21170	<b>PDIP1</b>	379	387	TACCTACAA	0,000438	1	
	AT2G43910	<b>HOL1</b>	468	476	TTCGTACTA	0,000254	1	
	AT2G45820	<b>REM1.3</b>	181	189	TGGGTACAA	0,000337	1	
	AT3G02090	<b>MPPBETA</b>	602	610	TACATACAA	0,000438	1	
	AT3G09440	<b>HSP70-family protein</b>	622	630	TGTGTACAA	0,000337	1	
	AT3G12580	<b>HSP70</b>	707	715	TTCGAACAA	0,000254	1	
	AT3G13930	<b>MTE2-2</b>	139	147	TGAGTACAA	0,000337	1	
	AT3G15950	<b>TSA1</b>	610	618	TCTGTACAA	0,000337	1	
	AT3G16460	<b>JAL34</b>	554	562	TTTGTACAA	0,000438	1	
	AT3G32980	<b>PXR superfamily</b>	816	824	TTCGTGCAA	0,000254	1	
	AT3G43870	<b>HP</b>	609	617	CACGTACAA	0,000254	1	
				949	957	TCCGTACAC	0,000124	1
	AT3G52930	<b>FBA8</b>	3	11	TCCGTCCAA	0,000124	1	
	AT4G04830	<b>MSRB5</b>	72	80	TAAGTACAA	0,000438	1	
	AT4G09320	<b>NDK1</b>	555	563	TGCGTTCAA	0,000124	1	
	AT4G13860	<b>RNA-binding-family protein</b>	456	464	TTAGTACAA	0,000438	1	
	AT4G16260	<b>GH-family protein</b>	91	99	TACTTACAA	0,000438	1	
				244	252	TGCGTTCAA	0,000124	1
				645	653	TGCTTACAA	0,000337	1
	AT4G23680	<b>PC/DLT-HSP90.7</b>	930	938	TAAGTACAA	0,000438	1	
	AT4G24190		123	131	TGCGTACAC	0,000124	1	
				459	467	TTTGTACAA	0,000438	1
	AT4G34050	<b>CCOAOMT1</b>	983	991	TCCGAACAA	0,000124	1	
	AT4G34870	<b>CYP1</b>	504	512	TTCGAACAA	0,000254	1	
	AT4G35830	<b>ACO1</b>	732	740	TGGGTACAA	0,000337	1	
	AT4G38740	<b>ROC1</b>	853	861	TACGTACCA	0,000254	1	
	AT5G04430	<b>BTR1</b>	715	723	ACCGTACAA	0,000124	1	
	AT5G16840	<b>BPA1</b>	686	694	TACGTATAA	0,000438	1	
	AT5G17920	<b>METS1</b>	894	902	TTCGTAGAA	0,000438	1	
	AT5G26260	<b>TRAF-like family protein</b>	247	255	TCCGTAGAA	0,000337	1	
			514	522	TGCGTACAT	0,000124	1	
			986	994	TACGGACAA	0,000254	1	
AT5G45775	<b>RL5P-family protein</b>	628	636	TGTGTACAA	0,000337	1		
			741	749	TACCTACAA	0,000438	1	
AT5G47030	<b>ATPase-δ</b>	779	787	TGAGTACAA	0,000337	1		
<i>mpk6</i> proteom	AT1G12000	<b>PFK-family protein</b>	565	573	TGCTTACAA	0,000337	1	
	AT1G12080	<b>VCBP-like</b>	675	683	TTCGCACAA	0,000254	1	
	AT1G18080	<b>RACK1A</b>	441	449	TTCGAACAA	0,000254	1	
			505	513	TTCGAACAA	0,000254	1	
			574	582	TACGTACAT	0,000254	1	
			740	748	TACGTACTA	0,000254	1	
			743	751	TACGTACAT	0,000254	1	
	AT1G30230	<b>EF1BB</b>	648	656	TGAGTACAA	0,000337	1	
	AT2G10450	<b>14-3-3-family protein</b>	185	193	TTCGAACAA	0,000254	1	
			584	592	TACGTACAC	0,000254	1	
	AT2G27720	<b>60SRP-family protein</b>	650	658	TTCTTACAA	0,000438	1	

**Příloha 3: Pokračování.**

	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		Identifikovaná sekvence	p-hodnota	q-hodnota
<i>mpk6</i> proteom	AT2G42100	<b>ALATPase</b>	285	293	TACGTTCAA	0,000254	1
	AT3G09440	<b>HSP70-family protein</b>	622	630	TGTGTACAA	0,000337	1
	AT3G09840	<b>CDC48</b>	317	325	TTCGTTCAA	0,000254	1
			617	625	TTCATACAA	0,000438	1
	AT3G23810	<b>SAHH2</b>	387	395	TACGTACAA	1,79E-05	0,661
	AT3G26520	<b>γ-TIP2</b>	82	90	TACGTACAA	1,79E-05	0,661
			489	497	TCAGTACAA	0,000337	1
	AT3G51840	<b>ACX4</b>	702	710	TACGTACGA	0,000254	1
	AT4G10480	<b>NACAs family protein</b>	482	490	TGCGTATAA	0,000337	1
	AT4G31440	<b>SAGA-s protein</b>	605	613	TGCTTACAA	0,000337	1
	AT5G19780	<b>TUA5</b>	240	248	TTCGACAA	0,000254	1

**Příloha 4:** Identifikace TGGTCCGTACAATGT motivu v analyzovaných genech kódující proteiny identifikované v rámci proteomických analýz interaktomu FSD1 (Dvořák *et al.*, nepublikováno) a proteomů mutantů *mpk3.1* (Takáč *et al.*, nepublikováno), *mpk4* a *mpk6.2* (Takáč *et al.*, 2016). AGI – identifikátor genu.

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		Identifikovaná sekvence	p-hodnota	q-hodnota
<b>Kontrola</b>	AT1G69120	<b>API</b>	401	415	TGGTCCGTACAATGT	9,56E-10	1,88E-06
			817	831	AGATTTGGTCAATGT	0,000715	0,703
	AT4G25100	<b>FSD1</b>	647	661	TTTTAGGTACATTGT	0,000813	0,534
			843	857	TCGTCCCTCGATTGT	0,000715	0,534
			885	899	AAGTCCGTTTAAAGT	0,000449	0,534
			46	60	TGGTCATTTCAAGGT	0,000449	0,267
	AT5G60910	<b>FUL</b>	557	571	TAGTCGTTATAGTGT	0,000813	0,267
			727	741	TTGTAAGCACAAATGT	0,000115	0,118
			730	744	TTGTGCTTACAATTT	0,000119	0,118
			864	878	TGTTCCGTGTTATTT	0,000715	0,267
			901	915	TTTTCTTCCAATTT	0,000813	0,267
	AT5G61850	<b>LFY</b>	531	545	TGGTACAACAATGA	8,61E-05	0,163
			534	548	TTGTTTGTACCATGA	0,000715	0,676
	<b>FSD1 interaktom</b>	AT1G03910	<b>CTN</b>	317	331	TGGATCGAGCAAAGG	0,000998
686				700	TTGTACTTACAATTG	0,000813	1
689				703	TTGTAAGTACAATTT	0,000119	1
AT1G11840		<b>GLX1</b>	466	480	TGTACCGTACATCTT	0,000449	1
			519	533	TTGTGCCAACAATGA	0,000715	1
			761	775	TGTGTCCGCACACTGT	0,000449	1
			899	913	CAGTCCGTGAAATGG	0,000449	1
			701	715	TGGTTGGAGTAAATGT	0,000715	1
			456	470	TATACTTTACAATGT	0,000813	1
AT1G20020		<b>LFNR2</b>	471	485	GTGACCCGCACAATCT	0,000449	1
AT1G23410		<b>RPS27AA</b>	393	407	TGCTTTTTATAATGT	0,000823	1
AT1G29920		<b>CAB2</b>	893	907	TGCTTCGTGGAAGT	0,000715	1
			447	461	TACTTAGTACAATGG	0,000813	1
AT1G48830		<b>PRP40A</b>	27	41	TGCTCTGATCAAGGT	0,000449	1
		<b>RPS7e family protein</b>	479	493	TGAGCCGTTCAATGT	6,43E-06	0,558
			75	89	GGATCTGTAATAATGT	0,000115	1
			347	361	GGGTGTATAATAATGT	0,000813	1
AT1G53240		<b>MMDH1</b>	967	981	AGATCCGGACTATCT	0,000449	1
			245	259	TGAACACCACAATGT	0,000715	1
AT1G54000		<b>GLL22</b>	471	485	TGGGCCGTGAATGGG	0,000998	1
			83	97	TAGTACTTGCAATAT	0,000813	1
AT1G54410		<b>HIRD11</b>	644	658	TAGTCAGCAAATTT	0,000813	1
			219	233	TAATTTCTCCAATGT	0,000813	1
			381	395	TGATTTCTGACTATGT	0,000715	1
			746	760	TCGTCTTTATAATTT	0,000823	1
AT1G56410		<b>ERD2</b>	205	219	AGTTTTGTACAATTT	0,000813	1
AT1G60900		<b>U2AF65B</b>	716	730	TGGACCCGTAGCATTC	0,000449	1
AT1G66270		<b>BGLU21</b>	179	193	TGTTCCAAACTAAGT	0,000449	1
			310	324	TATTTCCGAAAAGGT	0,000715	1
AT1G78900		<b>VHA-A</b>	406	420	TGGGCTTTATAATAT	0,000813	1
			932	946	TGGGTTGTACTTTGT	0,000449	1
AT1G79200		<b>SCI1</b>	370	384	TGGTCGGAGCTATGG	0,000205	1
			374	388	AGCTCCGACCACCGT	0,000998	1
AT2G05520		<b>GRP3</b>	48	62	TGATGCATAAAATGT	0,000119	1
AT2G16360		<b>40SRPS25</b>	647	661	TATATCGTTCATGT	0,000715	1
AT2G21660		<b>GRP7</b>	913	927	TAAACTGTACAATGC	0,000715	1
AT2G25980		<b>MBL protein</b>	628	642	TAGTCCAAAACATGT	0,000715	1
AT2G39390		<b>RL29 family protein</b>	180	194	TGGCCCATAAAGATAT	0,000715	1
			714	728	GGACTCGTTCATGT	0,000449	1
AT2G47400		<b>CP12</b>	105	119	TGGTTCCTAGAAGAT	0,000813	1
AT3G09680		<b>RPS12/S23 family protein</b>	360	374	ACGGCCGGTCAACGT	0,000998	1
			598	612	TGGTTTTTAGAATTT	0,000823	1
		832	846	TTGTGAATAAAATGT	0,000823	1	
		782	796	TGTAACGTAAAATAT	0,000813	1	
AT3G15730	<b>PLDA1</b>	204	218	TAGTACGATCAATGA	0,000449	1	
AT3G16430	<b>JAL31</b>	843	857	TGAATTTGTACAATTT	0,000813	1	
		481	495	TCATCTGTACGATGT	0,000115	1	
AT3G26650	<b>GAPA1</b>	535	549	TGATATGGACAATGG	0,000715	1	
		476	490	CTGTTGATACAATGT	0,000813	1	
AT4G10340	<b>LHCB5</b>	766	780	TAGTCCGTATAGTGG	0,000715	1	
		647	661	TTTTAGGTACATTGT	0,000813	1	
AT4G25100	<b>FSD1</b>	843	857	TCGTCCCTCGATTGT	0,000715	1	
		885	899	AAGTCCGTTTAAAGT	0,000449	1	
AT4G36690	<b>ATU2AF65A</b>	192	206	TGGACCCGCCGTGTT	0,000998	1	
		315	329	TGGCCCAATCTGTGT	0,000998	1	
		648	662	GTGTTTGTATAATGT	0,000813	1	

**Příloha 4: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		Identifikovaná sekvence	p-hodnota	q-hodnota	
<b>FSD1 interaktom</b>	AT5G02500	<b>HSC70-1</b>	163	177	TTGACCGTCCGATGG	0,000205	1	
			332	346	TGGAGCGTATAGTCT	0,000715	1	
			722	736	TAATCCTTTTAATGT	0,000813	1	
			916	930	TCGTCCTTAGAAACT	0,000813	1	
	AT5G20720	<b>CPN21</b>	145	159	TTATCCGCCCAAAGT	0,000449	1	
			121	135	TGGGCCGAAAAGAGA	0,000998	1	
	AT5G23080	<b>TGH</b>	301	315	TATTCGGTACAATCC	0,000115	1	
			951	965	TGCTCCTGAGCATGT	0,000715	1	
			476	490	TGATATACACAATGT	0,000813	1	
	AT5G37780	<b>CAM1</b>	769	783	TGTTTCGACCACTGT	0,000449	1	
			204	218	TGGACCAAACCACGC	0,000998	1	
	AT5G42980	<b>TRXH3</b>	900	914	TAGTCTGGACAAATT	0,000715	1	
	<b>mpk3 proteom</b>	AT1G01100	<b>RPP1A</b>	721	735	TGATTTATACAATTT	0,000823	1
		AT1G11910	<b>APA1</b>	247	261	TAGTTTGTAACAATAT	0,000119	1
AT1G12310		<b>EF-hand family protein</b>	62	76	TTCTCTGTACAACGA	0,000715	1	
			870	884	GGGTCTGAATAGTGT	0,000449	1	
			888	902	TAGTTGGTACAATAA	0,000813	1	
			701	715	TGGTTGGAGTAATGT	0,000715	1	
AT1G13440		<b>GAPC2</b>	433	447	TTGTCTTAATAATGT	0,000813	1	
AT1G13930		<b>RSS</b>	799	813	AGCTCGATACAGTGT	0,000715	1	
			15	29	GGTTCGTACTATCT	0,000715	1	
			594	608	TTGATCGTACTTTGT	0,000449	1	
AT1G22530		<b>PATL2</b>	879	893	TGACATGTACTATGT	0,000715	1	
			233	247	TAGTCCGTCCATGTT	0,000449	1	
AT1G23820		<b>SPDS1</b>	617	631	TCGATCGTCAACTCT	0,000715	1	
AT1G26550		<b>FIPPI-family</b>	154	168	TGTTTCTTACACTTT	0,000813	1	
AT1G35720		<b>ANN1</b>	27	41	TGCTCTGATCAAGGT	0,000449	1	
AT1G48830		<b>RPS7e family protein</b>	479	493	TGAGCCGTTCAATGT	6,43E-06	1	
			145	159	TGCTACGTACTCGGT	0,000449	1	
			176	190	AGGCCCAATAATATGT	0,000449	1	
AT1G51980		<b>MPP-like protein</b>	877	891	TGGTATGTATAATAT	0,000119	1	
			49	63	TGGCAAGTCCAATAT	0,000715	1	
AT1G62660		<b>VII</b>	491	505	TTGTATGCAGAATGT	0,000813	1	
			380	394	TGTTACTTACCATT	0,000813	1	
AT1G66200		<b>GLN1</b>	587	601	TGGTCGATAGAATTA	0,000813	1	
			675	689	TTGTCAATAAAATTT	0,000823	1	
			173	187	AGATCATAACAATGT	0,000715	1	
AT1G66240		<b>HMP14</b>	638	652	AGGTTGGTAGAAAGT	0,000715	1	
AT1G72370		<b>RP40</b>	311	325	TGATCCGTTTAATTC	0,000715	1	
AT1G75950		<b>ASK1</b>	212	226	TGGGCCGTTGGATTT	0,000449	1	
AT1G78300		<b>GRF2</b>	406	420	TGGGCTTTATAATAT	0,000813	1	
			932	946	TGGGTTGTACTTTGT	0,000449	1	
AT1G80230		<b>Rd-like protein</b>	561	575	TGGTCCGGTGATCGA	0,000998	1	
			714	728	TGGACAGGGCAAGGT	0,000205	1	
AT2G01520		<b>ZCE1</b>	702	716	AGGTCCCGACCATAT	0,000449	1	
			828	842	TGACCCGTTCAAGTT	0,000449	1	
AT2G02010		<b>GAD4</b>	218	232	TGGTAAGGAAAAGGT	0,000715	1	
			455	469	TTACGCGTAAAATGT	0,000813	1	
			937	951	TTGTCTATAAAATCT	0,000823	1	
AT2G05990		<b>ENR1</b>	50	64	TCCTTCTTACAATGT	0,000119	1	
AT2G20630		<b>PIA1</b>	328	342	TGATCGGAAAATAT	0,000813	1	
			666	680	TGGTCCAACAAATTT	0,000715	1	
AT2G21170		<b>PDTP1</b>	971	985	TTGTCCAACATTGA	0,000449	1	
			979	993	TGGTGAAATCAATGT	0,000715	1	
AT2G21870		<b>MGP1</b>	776	790	TGGTCTTTTAACTGT	0,000715	1	
AT2G24200		<b>LAP1</b>	517	531	TGATCCTTAAAATCC	0,000813	1	
AT2G27710		<b>60SRP-family</b>	266	280	TGGGCCTAGCGATGA	0,000998	1	
AT2G30870		<b>GSTF10</b>	527	541	TGGTGGGTACAAGAA	0,000715	1	
AT2G33040		<b>ATP3</b>	231	245	TGGGCCTTATAAGAT	0,000715	1	
	422		436	AGGTTGGTGAAATGT	0,000715	1		
	442		456	TGGGCCTTCAATAA	0,000449	1		
	690		704	TGTCACGTGAAATGT	0,000715	1		
AT2G33150	<b>KAT2</b>	125	139	TTGCCGTTCCGGGT	0,000998	1		
AT2G36830	<b>γ-TIP1</b>	457	471	TGCTCCGTACTACTCA	0,000715	1		
AT2G43535	<b>DEFL-family protein</b>	101	115	TTGTCTTAACGATGA	0,000449	1		
		551	565	TGGTTTGTGTAATGA	0,000715	1		
			563	577	TGGCATGTATAATGG	0,000715	1	

**Příloha 4: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		Identifikovaná sekvence	p-hodnota	q-hodnota
<i>mpk3 proteom</i>	AT2G47470	<b>PDI11</b>	246	260	TTGTCCGTGAAATTA	0,000715	1
			522	536	TGATATCTACAAAGT	0,000813	1
	AT2G47510	<b>FUM1</b>	506	520	TTTTCTGTCTATGT	0,000715	1
			587	601	TTGTCTGTGTATGT	0,000715	1
			771	785	AGGACCGAACTGTTT	0,000998	1
	AT3G02090	<b>MPPBETA</b>	713	727	ATGTCTGTGAATGT	0,000715	1
			972	986	CGGTCTTCACAATGT	8,61E-05	1
	AT3G05020	<b>ACPI</b>	186	200	TGGCACGTGAAATGC	0,000449	1
			302	316	TGGTCAGAACTTAGA	0,000998	1
	AT3G05900	<b>NFP-like protein</b>	168	182	TGTTCCCACTTTTGT	0,000449	1
			769	783	TTGTCTATGGAATGT	0,000813	1
	AT3G08590	<b>IPGAM2</b>	286	300	GGGGCTTCACAATGT	0,000449	1
			381	395	TGGTGTGCGCCATGT	0,000449	1
			401	415	AGGTATATACAATTT	0,000813	1
	AT3G09200	<b>RPL10-family</b>	381	395	TGTTCACTAGAATGT	0,000119	1
	AT3G09820	<b>ADK1</b>	196	210	TGGGCAAATAATGT	0,000715	1
	AT3G13920	<b>EIF4A1</b>	917	931	TGGCTCGACAAGGT	3,98E-05	1
	AT3G16460	<b>JAL34</b>	77	91	TGGTTAGTACTATGA	8,61E-05	1
			485	499	TGGTCCGTAGTAAAT	0,000715	1
			526	540	TGGTCCACACAAGTA	0,000449	1
	AT3G17240	<b>MILPD2</b>	668	682	AGGAGGGCACAAATGT	0,000449	1
	AT3G22890	<b>APS1</b>	120	134	AGGACCGTATCTTGG	0,000998	1
			540	554	TGATACTTACTATGT	0,000115	1
	AT3G25520	<b>ATL5</b>	117	131	TGGGCTGAAAATGT	8,61E-05	1
	AT3G48990	<b>AAE3</b>	602	616	TGGTCAATTTAATTT	0,000813	1
	AT3G58610	<b>KARI</b>	235	249	TGGTCCATCAACTGC	0,000449	1
			615	629	TGATCCTGTGAATGT	0,000715	1
			663	677	TGCTCTGTCCAAGT	0,000449	1
	AT3G60750	<b>TKL1</b>	561	575	TGGGCCTTACATGT	8,61E-05	1
			890	904	AGAAGCGTACAATGG	0,000449	1
			927	941	TGATCCAACCCATGT	0,000449	1
	AT4G08390	<b>sAPX</b>	954	968	TTGACCGTATACTAT	0,000715	1
	AT4G08770	<b>PRX37</b>	215	229	GACTCTGTACAAAGT	0,000715	1
	AT4G13850	<b>GRP2</b>	559	573	TTGAGTGTACGATGT	0,000715	1
			748	762	TGGGCCATTCAATTGA	0,000205	1
			796	810	TGAATCATACAATTT	0,000813	1
	AT4G18100	<b>RPL32e</b>	937	951	TTGTTCCATAAATCT	0,000823	1
	AT4G23670	<b>PC/DLT-</b>	694	708	GGGCCCATACAATTG	0,000449	1
	AT4G23680	<b>PC/DLT-</b>	225	239	TCGTATAAATAATGT	0,000813	1
		<b>superfamily</b>	490	504	TTGGCCGAACACTACGT	0,000205	1
		<b>protein</b>	573	587	TTGCCCATACTATCT	0,000715	1
			706	720	TGGTCCATACTCGAT	0,000449	1
			714	728	TGGACCATTTCATCGA	0,000998	1
	AT4G25100	<b>FSD1</b>	647	661	TTTTAGGTACATTGT	0,000813	1
			843	857	TCGTCCCTCGATTGT	0,000715	1
			885	899	AAGTCCGTTTAAAGT	0,000449	1
	AT4G34050	<b>CCOAOMT1</b>	225	239	GGTCCCATAACAGTGT	0,000449	1
			380	394	TTGTGAGTATGATGT	0,000813	1
			977	991	TTGTTCCGAAAATAT	0,000813	1
			980	994	TTTTCCGAACAAAT	0,000715	1
	AT4G35090	<b>CAT2</b>	54	68	TCATCAGTACCATCT	0,000813	1
			634	648	TGGTCTGCCAAAT	0,000449	1
	AT4G37910	<b>MIHSC70-1</b>	252	266	TGGACCCCTACATGGG	0,000205	1
			620	634	TGATGCTTACCATCT	0,000813	1
	AT4G39200	<b>RPS25 family</b>	790	804	TGATCCAAAAATGA	0,000715	1
		<b>protein</b>					
	AT5G04430	<b>BTR1</b>	712	726	TCTACCGTACAATTT	0,000115	1
	AT5G09500	<b>RPS19-family</b>	759	773	TGGTCCCAAACTGA	0,000449	1
		<b>protein</b>					
	AT5G09590	<b>MIHSC70-2</b>	210	224	TGGTCTTCACGATTT	0,000715	1
AT5G10360	<b>EMB3010</b>	155	169	GGGCCCATAAAATGT	8,61E-05	1	
		566	580	TGTTATGTAGAATAT	0,000823	1	
		792	806	TGTTAAGAAAAATGT	0,000813	1	
AT5G10860	<b>CBSX3</b>	401	415	TTTTCTTAAAATAT	0,000823	1	
AT5G17710	<b>CGEI</b>	135	149	TCGTTTTTACTATGT	0,000813	1	
		146	160	CGGTCCGATCAACAT	0,000205	1	
AT5G20290	<b>RPS8e family</b>	110	124	TGGCCCATCCAGAGC	0,000998	1	
	<b>protein</b>	965	979	TGGGAAATACTATGT	0,000715	1	
AT5G26260	<b>TRAF-like family</b>	493	507	GGTTCGGTATTGTGT	0,000449	1	
	<b>protein</b>	630	644	TTAGCCATAAAAATGT	0,000813	1	
		660	674	CGGTCACTACAATAA	0,000715	1	

**Příloha 4: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		Identifikovaná sekvence	p-hodnota	q-hodnota
<i>mpk3</i> proteom	AT5G35360	<b>CAC2</b>	243	257	TGACCCATATAAATTT	0,000813	1
			317	331	TTATCAATATAATGT	0,000823	1
	AT5G35590	<b>PAA1</b>	676	690	TGGTCAATCCTCTGT	0,000449	1
	AT5G40370	<b>GRXC2</b>	472	486	TGGTCCATTCTATCC	0,000449	1
	AT5G58290	<b>RPT3</b>	163	177	TGGGCCTTACTATGA	3,98E-05	1
	AT5G60390	<b>EF1A</b>	666	680	TGGGCCTTCTATTT	0,000449	1
	AT5G64100	<b>PRX69</b>	120	134	TGCTCGTTACAATTG	0,000813	1
AT5G65020	<b>ANNA12</b>	687	701	ATGTCCAACAATTT	0,000715	1	
<i>mpk4</i> proteom	AT1G04410	<b>CNMDH1</b>	587	601	TTGTTCTTACAGTGC	0,000715	1
	AT1G11840	<b>GLX1</b>	466	480	TGTACCGTACATCTT	0,000449	1
			519	533	TTGTGCCAACAATGA	0,000715	1
			761	775	TGTGTGCGCACACTGT	0,000449	1
			899	913	CAGTCCGTGAAATGG	0,000449	1
	AT1G13440	<b>GAPC2</b>	701	715	TGGTTGGAGTAATGT	0,000715	1
	AT1G28290	<b>AGP31</b>	699	713	TGATCCATATAAAGT	0,000115	1
			812	826	TTGTCATTATAATTT	0,000823	1
	AT1G35720	<b>ANN1</b>	154	168	TGTTTCTTACACTTT	0,000813	1
	AT1G51980	<b>MPP-like protein</b>	145	159	TGCTACGTACTCGGT	0,000449	1
			176	190	AGGCCCAATAATATGT	0,000449	1
			877	891	TGGTATGTATAATAT	0,000119	1
	AT1G53850	<b>PAE1</b>	288	302	TGGGCCTAACATATAT	0,000449	1
	AT1G54010	<b>GLL23</b>	97	111	TAGTATTTACAATAT	0,000823	1
			804	818	TGGCCCGAAACTTGT	0,000205	1
	AT1G63940	<b>MDAR6</b>	783	797	TGGACAGGCCCATGT	0,000205	1
			787	801	GGGCCTGTCCAGAGT	0,000998	1
	AT1G73260	<b>KTI1</b>	217	231	ACGTGTGTAGAATGT	0,000813	1
			442	456	TGTTTCGCTCAATGG	0,000449	1
	AT1G75950	<b>ASK1</b>	311	325	TGATCCGTTTAATTC	0,000715	1
	AT1G78380	<b>GST8</b>	230	244	TGTTACGTAAAAGA	0,000715	1
			589	603	ATTTCCGCACAAATGT	0,000715	1
	AT1G79550	<b>PGK3</b>	566	580	TGGTACTCACCATT	0,000715	1
	AT2G01520	<b>ZCE1</b>	702	716	AGGTCCCGACCATAT	0,000449	1
			828	842	TGACCCGTTCAAGTT	0,000449	1
	AT2G01530	<b>MLP329</b>	349	363	TGGTTTGTTTAAGGT	0,000715	1
			901	915	AGGTAATTGCAATGT	0,000715	1
			956	970	TTGTCTATGCCATGT	0,000715	1
	AT2G19760	<b>PFN1</b>	257	271	TGGTATGTAATGGT	0,000715	1
			314	328	TGGATCATACAAAAGT	8,61E-05	1
			439	453	TATAGCTTACAATGT	0,000813	1
	AT2G21045	<b>ARQ1</b>	635	649	TGGCCTCTAAAATCT	0,000813	1
	AT2G21170	<b>PDTPI</b>	971	985	TTGTCCAACATGA	0,000449	1
			979	993	TGGTGAATCAATGT	0,000715	1
	AT2G24200	<b>LAP1</b>	517	531	TGATCCTTAAAATCC	0,000813	1
	AT2G30930	<b>HP</b>	531	545	TATTCACATCAATTT	0,000823	1
			732	746	TAGTGTGTTTCGATGT	0,000715	1
	AT2G33040	<b>ATP3</b>	231	245	TGGGCCTTATAAGAT	0,000715	1
			422	436	AGGTTGGTGAAATGT	0,000715	1
			442	456	TGGGCCTTCAATAA	0,000449	1
			690	704	TGTCACGTGAAATGT	0,000715	1
	AT2G33150	<b>KAT2</b>	125	139	TTGCCCGTCCGGGT	0,000998	1
	AT2G45820	<b>REMI.3</b>	121	135	TGGAGCGTACTACGC	0,000205	1
			770	784	TGGTATATGCAATTT	0,000813	1
	AT2G47130	<b>SDR3</b>	76	90	TGCTCCGTTCTCTGT	3,98E-05	1
	AT3G01190	<b>PXR superfamily protein</b>	492	506	TAGTTAAAACAATGT	0,000813	1
	AT3G02090	<b>MPPBETA</b>	713	727	ATGTCTGTTGAATGT	0,000715	1
		972	986	CGGTCTTCACAATGT	8,61E-05	1	
AT3G04120	<b>GAPC1</b>	390	404	TGCGCCGACCAGTGT	0,000205	1	
AT3G09200	<b>RPL10-family</b>	381	395	TGTTCACTAGAATGT	0,000119	1	
AT3G09440	<b>HSP70-family protein</b>	278	292	TGTTCCGGTTCGATGG	0,000449	1	
		619	633	TTGTGTGTACAATTC	0,000813	1	
AT3G12580	<b>HSP70</b>	359	373	TTATCTTTAAAATGT	0,000823	1	
		718	732	TGTTCCCFCCAATTA	0,000715	1	
AT3G13300	<b>VCS</b>	819	833	TGGTTGGTCTACGT	0,000449	1	
AT3G13920	<b>EIF4A1</b>	917	931	TGGCTCGGACAAGGT	3,98E-05	1	
AT3G14067	<b>SASP</b>	652	666	ACGCCGGTCCAATGT	0,000449	1	
AT3G16460	<b>JAL34</b>	77	91	TGGTTAGTACTATGA	8,61E-05	1	
		485	499	TGGTCCGTAGTAAAT	0,000715	1	
		526	540	TGGTCCACACAAGTA	0,000449	1	



**Příloha 4: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		Identifikovaná sekvence	p-hodnota	q-hodnota
<i>mpk4</i> proteom	AT3G17210	<b>HS1</b>	71	85	TCGACCGTCCATTTT	0,000449	1
	AT3G22110	<b>PAC1</b>	449	463	TTGTTCCTAGAATTT	0,000823	1
	AT3G23600	<b>ABH superfamily protein</b>	534	548	TGGTGAGTCTAATGG	0,000715	1
	AT3G32980	<b>PXR superfamily protein</b>	94	108	GGGTCCATAACATTT	0,000715	1
			103	117	TAGTTCACAAAATGT	0,000813	1
			645	659	TGGACTCTAAAATAT	0,000813	1
	AT3G43870	<b>HP</b>	946	960	TCCTCCGTACACCAT	0,000715	1
	AT3G52930	<b>FBA8</b>	313	327	TGGGCCGTCGTAAGG	0,000998	1
			962	976	TAGAACATACAATAT	0,000813	1
	AT4G02520	<b>GSTF2</b>	249	263	TGGACTGTTTAACGT	0,000449	1
			948	962	AGATCACTGCAATGT	0,000715	1
	AT4G08390	<b>sAPX</b>	954	968	TTGACCGTATACTAT	0,000715	1
	AT4G13860	<b>RNA-binding-</b>	627	641	TGGTGGATACAGTGG	0,000715	1
	AT4G13940		808	822	TGTTCTGAAATATGT	0,000715	1
	AT4G16260	<b>GH-family</b>	88	102	ATGTACTIONACAATTT	0,000813	1
	AT4G23680	<b>PC/DLT-superfamily protein</b>	225	239	TCGTCATAAAAATGT	0,000813	1
			490	504	TTGGCCGAACACGT	0,000205	1
			573	587	TTGCCATACTATCT	0,000715	1
			706	720	TGGTCCATACTCGAT	0,000449	1
			714	728	TGGACCATTTCATCGA	0,000998	1
	AT4G24190	<b>HSP90.7</b>	120	134	AGTTGCGTACACTTT	0,000715	1
			760	774	TGTTGCGTCCATTTT	0,000715	1
	AT4G24830	<b>ASS family</b>	416	430	TGGTCCGCTGTATAT	0,000715	1
	AT4G26910	<b>DLST</b>	30	44	TGTTCCGACCTGTGT	0,000205	1
			34	48	AGGTCGGAACAATTG	0,000449	1
			47	61	TGATCAGCAAAAATGA	0,000715	1
			422	436	TTTTTGGCACAAATGT	0,000813	1
	AT4G27090	<b>RPL14B</b>	14	28	TAGACCTTCCAATCT	0,000715	1
			160	174	TTGGGCGTTTAAATGT	0,000715	1
			934	948	TGTTCCGTGACATTGT	8,61E-05	1
			942	956	TGAACATTACAATGT	0,000115	1
	AT4G34050	<b>CCOAOMT1</b>	225	239	GGTCCCATACAGTGT	0,000449	1
			380	394	TTGTGAGTATGATGT	0,000813	1
			977	991	TTGTTCCGAAAATAT	0,000813	1
			980	994	TTTTCCGAACAATTT	0,000715	1
	AT4G34870	<b>CYP1</b>	501	515	TTCTTCGAACAATGA	0,000715	1
	AT4G35830	<b>ACO1</b>	736	750	TAGACCGAACCTGGGT	0,000998	1
	AT4G37910	<b>MIHSC70-1</b>	252	266	TGGACCCCTACATGGG	0,000205	1
			620	634	TGATGCTTACCATCT	0,000813	1
	AT4G38740	<b>ROC1</b>	623	637	TAGGCCCGCAGAAAGT	0,000449	1
			700	714	TGGGCCGCTCGTTGC	0,000832	1
			731	745	TGAGCCGAACATTTT	0,000449	1
			945	959	TGGACCGTCTTAAGT	0,000205	1
	AT5G03630	<b>MDAR2</b>	58	72	GGATCCGAGAAATGT	0,000449	1
	AT5G04430	<b>BTR1</b>	712	726	TCTACCGTACAATTT	0,000115	1
	AT5G14200	<b>IMD1</b>	387	401	TGGTTAGTCCAAGGA	0,000449	1
			575	589	TGATACGTATCATAT	0,000813	1
			692	706	TGTTCCAATAAATTT	0,000813	1
	AT5G16050	<b>GRF5</b>	340	354	GGAACCGTACCTTGA	0,000998	1
	AT5G20290	<b>RPS8e family protein</b>	110	124	TGGCCCATCCAGAGC	0,000998	1
		965	979	TGGGAAATACTATGT	0,000715	1	
AT5G26260	<b>TRAF-like family protein</b>	493	507	GGTTCCTGATTGTGT	0,000449	1	
		630	644	TTAGCCATAAAAATGT	0,000813	1	
		660	674	CGGTCACTACAATAA	0,000715	1	
AT5G43330	<b>C-NAD-MDH2</b>	256	270	TAGTCGGTACGATAA	0,000715	1	
		294	308	GGGGATGTTCAATGT	0,000449	1	
AT5G45775	<b>RLSP-family protein</b>	93	107	GGGTCCGTACTTAGG	0,000998	1	
		172	186	TGGGCTTTATAATAT	0,000813	1	
		945	959	AGGACTGTCCAGTGG	0,000998	1	
AT5G47030	<b>ATPase-δ</b>	52	66	TGCGACGTATAATTT	0,000813	1	
		862	876	TAGTTCACAACAACGT	0,000715	1	
AT5G52840	<b>NADH-UOR-like protein</b>	427	441	TGGTACATTAAATGC	0,000715	1	
		539	553	TGGTCCGTCCAGATT	0,000449	1	
		543	557	TGGACCGACCATAGT	0,000126	1	
AT5G54640	<b>HTA1</b>	599	613	TGGTGAACACAATTT	0,000813	1	
AT5G56500	<b>CPNB3</b>	302	316	TATTTCGATACAAGT	0,000813	1	
		743	757	TAGTCCCTCCAATGC	8,61E-05	1	
AT5G64350	<b>FKBP12</b>	125	139	TGGGCCCTAACATAA	0,000449	1	
AT5G67500	<b>VDAC2</b>	542	556	TCAAACGTACGATGT	0,000715	1	
		779	793	TAGGCCCTCCAATCT	0,000715	1	

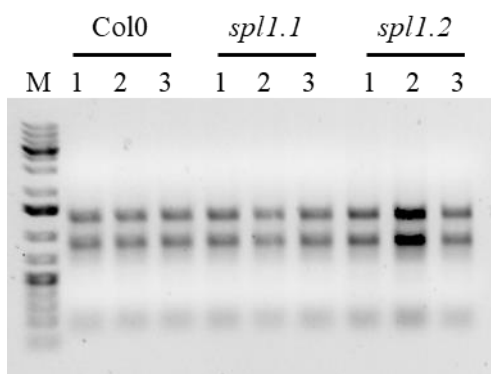
**Příloha 4: Pokračování.**

Datový soubor	AGI	Jméno	Relativní pozice k START		Identifikovaná sekvence	p-hodnota	q-hodnota
<i>mpk6</i> proteom	AT1G12000	<b>PFK-family protein</b>	229	243	TGGCCTGTTCATGA	0,000205	1
	AT1G12080	<b>VCBP-like protein</b>	427	441	TGTAACGTTCAATGA	0,000449	1
			476	490	TGTAACGTTCAATTT	0,000715	1
	AT1G13440	<b>GAPC2</b>	701	715	TGGTTGGAGTAATGT	0,000715	1
	AT1G28290	<b>AGP31</b>	699	713	TGATCCATATAAAGT	0,000115	1
			812	826	TTGTCATTATAAATTT	0,000823	1
	AT1G30230	<b>EF1BB</b>	645	659	TTCTGAGTACAATGC	0,000813	1
	AT1G55020	<b>LOX1</b>	779	793	TGTTCTGTGAAATAT	0,000813	1
	AT2G10450	<b>14-3-3-family protein</b>	179	193	TTGTTCCGAACATCT	0,000715	1
			182	196	TAGTTCGAACAATTA	0,000715	1
			206	220	TGATATTTACGATGT	0,000813	1
			736	750	TGGTCCCGATCGTGT	0,000449	1
	AT2G36830	<b>γ-TIP1</b>	457	471	TGCTCCGTACTACTCA	0,000715	1
	AT2G36880	<b>MAT3</b>	628	642	TGGACGGTGAGATGT	0,000449	1
	AT3G05530	<b>RPT5A</b>	354	368	AGGTTCTTGCAATTT	0,000715	1
	AT3G09440	<b>HSP70-family protein</b>	278	292	TGTTCCGTTTCGATGG	0,000449	1
			619	633	TTGTGTGTACAATTC	0,000813	1
	AT3G09840	<b>CDC48</b>	314	328	TTTTTCGTTCAATTT	0,000813	1
	AT3G13920	<b>EIF4A1</b>	917	931	TGGCTCGGACAAGGT	3,98E-05	1
	AT3G15730	<b>PLDA1</b>	782	796	TGTAACGTAAAATAT	0,000813	1
	AT3G20050	<b>CCT1</b>	341	355	TCTTCAGTACTTTGT	0,000715	1
			349	363	GGCACCCGACAAAAGT	0,000205	1
	AT3G23810	<b>SAHH2</b>	384	398	TAATACGTACAAATT	0,000813	1
			902	916	ATGACCCGAACATGA	0,000998	1
	AT3G26520	<b>γ-TIP2</b>	486	500	CGTTCAGTACAAACT	0,000715	1
	AT3G51840	<b>ACX4</b>	758	772	TTTTCCGTAGCATGT	0,000115	1
	AT3G52990	<b>PK-family protein</b>	579	593	TGGTCTTACAATCT	0,000115	1
	AT3G58610	<b>KARI</b>	235	249	TGGTCCATCAACTGC	0,000449	1
			615	629	TGATCCTGTGAATGT	0,000715	1
			663	677	TGCTCTGTCCAAGT	0,000449	1
	AT3G61440	<b>CYSC1</b>	184	198	TTGTTGGAACATATGT	0,000715	1
			221	235	TGGTAAGTGAAGTGT	0,000715	1
			812	826	TGCTCTTTACCATGT	0,000115	1
			839	853	TGGCCCTTCATTGG	0,000205	1
	AT4G13850	<b>GRP2</b>	559	573	TTGAGTGTACGATGT	0,000715	1
			748	762	TGGGCCATTCAATGA	0,000205	1
			796	810	TGAATCATACAATTT	0,000813	1
	AT4G13930	<b>SHM4</b>	839	853	AAGACCGTATAAAGT	0,000449	1
	AT4G14960	<b>TUA6</b>	458	472	CGGTCCCAACATTAT	0,000449	1
			808	822	TGGTCTCATCAATAT	0,000715	1
	AT5G09810	<b>ACT7</b>	941	955	TGGTTCGGACATCGT	3,98E-05	1
	AT5G19510	<b>TEF1B/RPS6 family protein</b>	174	188	GAGTCCGGAAAAAGT	0,000449	1
			684	698	TGTTCTTCCAAGTT	0,000715	1
			719	733	TGTAGTGTATAATGT	0,000813	1
	AT5G19780	<b>TUA5</b>	621	635	TGGTGTTTAAATGT	0,000813	1

**Příloha 5:** Rostliny *Arabidopsis thaliana spl1.1/mpk3.1* a *spl1.1/mpk6.2* čtvrtý týden po vyklíčení. A, C – *spl1.1/mpk3.1*; B, D – *spl1.1/mpk6.2*. Měřítko – 10 mm.



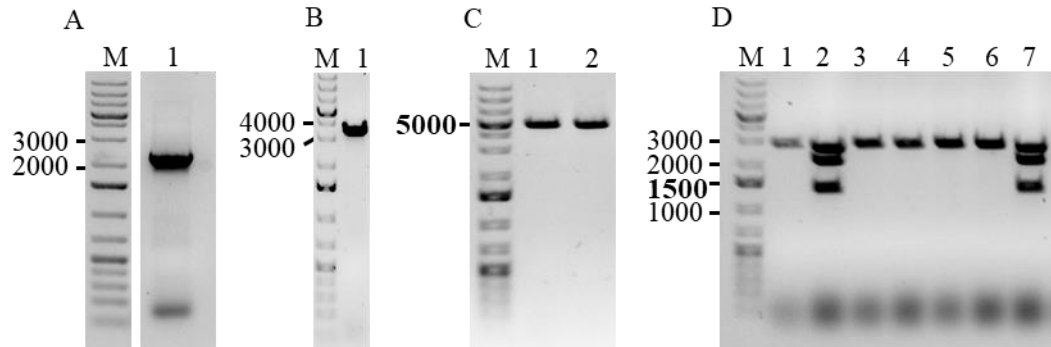
**Příloha 6:** Hodnocení kvality izolované celkové RNA po aplikaci DNasy pro minimalizaci kontaminace gDNA. 1–3 – biologické repliky; Col0 – rostlina divokého typu; *spl1.1* – mutant *spl1.1*; *spl1.2* – mutant *spl1.2*; M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.



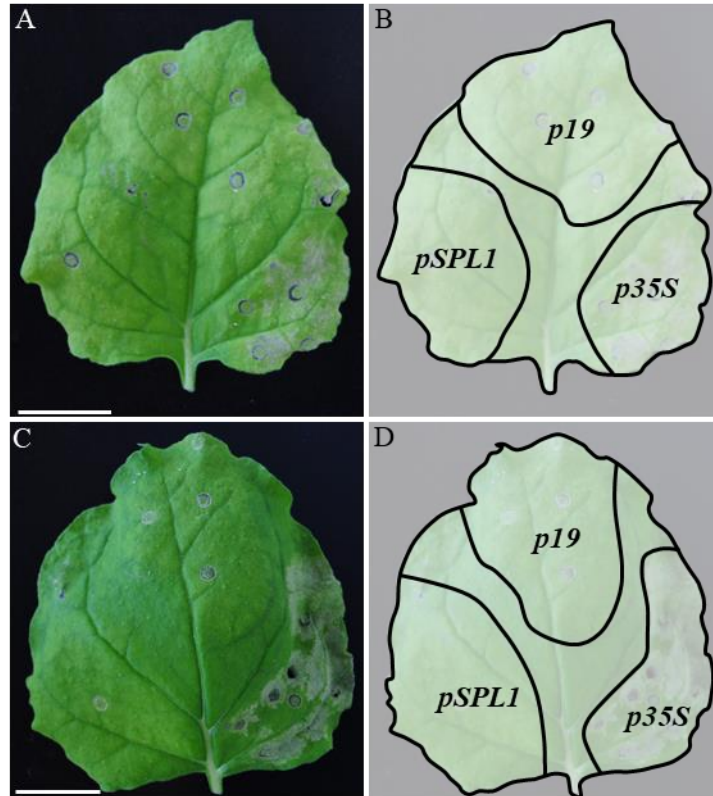
**Příloha 7:** Lokalizace T-DNA inserce linie *spl1.2* (SALK\_058642). Indikováno v databázi TAIR (Berardini *et al.*, 2015). Šipky ukazují polohu inserce.  
Upraveno.



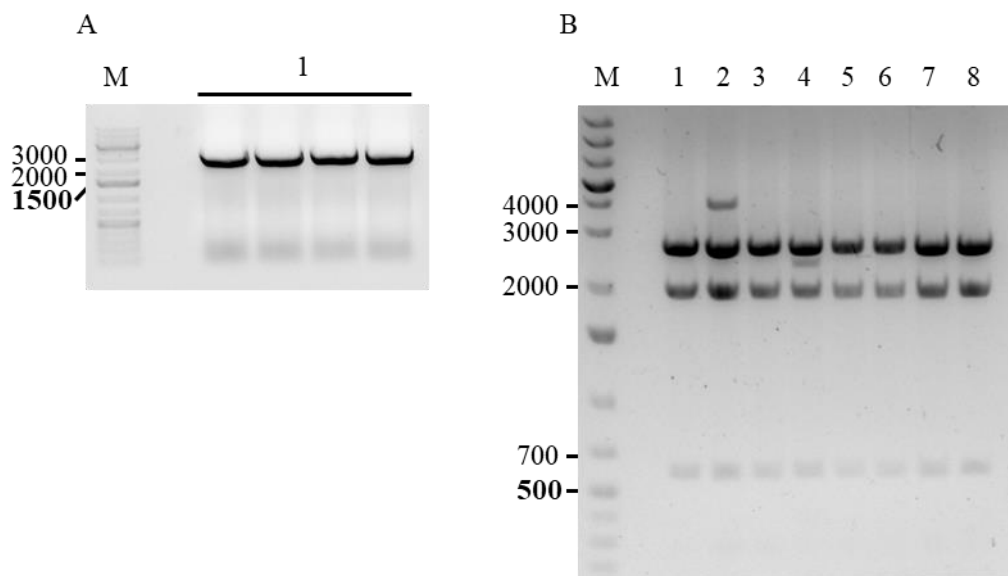
**Příloha 8:** Příprava konstruktů *pSPLI*-pDONR P4-P1R a *SPLI*-pDONR P2R-P3. A – PCR produkt *pSPLI* (fragment A; 2186 bp) určený pro pDONR P4-P1R. DNA byla izolována z gelové matrice. B – PCR produkt *SPLI* (fragment C; 3464 bp) určený pro pDONR P2R-P3. Kontrolní elektroforetická separace. PCR produkt byl přečištěn bez předřazené separace v gelové matrici. C – Restrikce *pSPLI*-pDONR P4-P1R (*EcoRV*: 4777 bp); D – Restrikce *SPLI*-pDONR P2R-P3 (*PvuII*: 2630, 2086, 1335 bp). M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (uvedeno v bp); 1–7 – analyzované vzorky (PCR produkt, nebo produkt restrikčního štěpení).



**Příloha 9:** Nekrózy pozorované na inokulovaných listech *Nicotiana benthamiana* čtvrtý den po transformaci indikovaným konstruktem. A, C – biologické repliky; B, D – indikované transformované oblasti (*p19*, *pSPL1*, *p35S*); *p19* – kotransformační vektor *p19*; *pSPL1* – konstruk *pSPL1::GFP:SPL1*; *p35S* – konstruk *p35S::GFP:SPL1*. Měřítko – 2,5 cm.



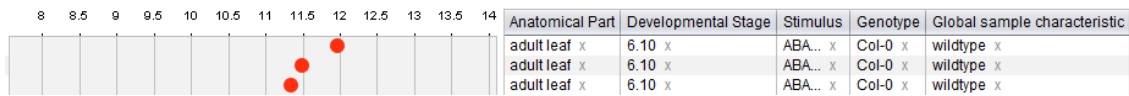
**Příloha 10:** Molekulární klonování kódující sekvence *SPLI* pro bimolekulární fluorescenční komplementaci. A – PCR produkt (2707 bp) určený pro rekombinaci do vektoru pDONR 221. PCR produkt (1) rozdělen do čtyř jamek. Produkt určený pro izolaci DNA z gelové matrice. B – restrikce vstupního vektoru pDONR 221 obsahující klonovanou kódující sekvenci *SPLI* (*SPLI*-pDONR 221). Štěpeno pomocí *Pvu*II (2660, 1942, 591 bp). 1–8 – analyzované klony; M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (uvedeno v bp).





**Příloha 11:** Změna exprese *SPL1* po aplikaci kyseliny abscisové, která byla zaznamenána v databázi Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008). Data získána 4. 12. 2020; identifikátor experimentu: AT-00433; uvedena absolutní exprese.

### Experimentální podmínky



### Kontrolní podmínky

