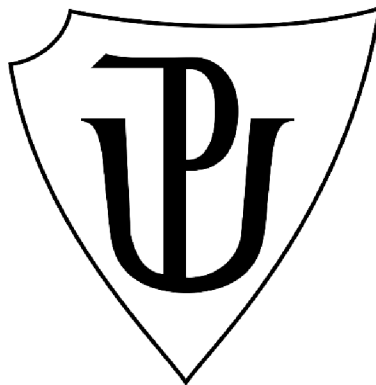


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



## Fenotypová a biochemická analýza odpovědí mutantů *Arabidopsis spl1-1* a *spl1-2* na exogénne ovplyvnenie kyselinou salicylovou

Autor: **Lukáš Mlynár**  
Studijní program: B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství  
Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **doc. Ing Tomáš Takáč, Ph.D.**  
Rok: 2023

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne s vyznačením všetkých použitých zdrojov. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bol som oboznámený s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 9.5.2023

Lukáš Mlynár

## **Pod'akovanie**

Touto cestou by som sa chcel osobitne poďakovať môjmu školiteľovi doc. Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D., za jeho cenné rady, odborné vedenie a za pomoc a ochotu pri spracovávaní bakalárskej práce. Taktiež by som chcem poďakovať Mgr. Pavlovi Melicherovi a Bc. Jánovi Řehákovi za pomoc a rady v laboratóriu.

## Bibliografická identifikace

Meno a priezvisko autora	Lukáš Mlynár
Názov práce	Fenotypová a biochemická analýza odpovedí mutantov <i>Arabidopsis spl1-1</i> a <i>spl1-2</i> na exogénne ovplyvnenie kyselinou salicylovou
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biotechnológií
Vedoucí práce	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

### Abstrakt:

SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE 1 (SPL1) patrí do skupiny transkripčných faktorov špecifických pre rastliny, ktoré regulujú rast, vývin a odpoveď na biotický a abiotický stres. Kyselina salicylová (SA) je rastlinný hormón, ktorý má dôležitú úlohu v signalizácii a odpovedi rastlín na biotický a abiotický stres. V tejto práci sa venujeme odpovedi mutantov *Arabidopsis thaliana spl1-1* a *spl1-2* na exogénnu aplikáciu SA. Zistili sme, že sa mutanty *spl1* nelíšia v dĺžke koreňa a gravitropizme od rastlín divého typu. Mutanty vykazovali menšiu klíčivosť semien v porovnaní s divým typom, čo naznačuje zapojenie SPL1 do klíčenia. Časť experimentov je zameraná na biochemickú analýzu aktivity antioxidantných enzýmov superoxid-dismutáz (SOD) a peroxidáz, a aktivitu obranných enzýmov chitináz. Absencia expresie *SPL1* znižuje aktivitu všetkých izozýmů SOD v odpovedi na SA. Niektoré izozýmy chitináz vykazovali po ošetrení SA zvýšenú aktivitu u rastlín divého typu, zatiaľ čo u mutantov bolo toto zvýšenie miernejšie. Žiadnu zmenu aktivitu peroxidáz sme nezaznamenali. Naše výsledky ukázali, že transkripčný faktor SPL1 môže byť dôležitý pre odpoveď rastlín na tvorbu superoxidových kyslíkových radikálov indukovaných SA, ale aj pre obranné reakcie rastlín podmienené signalizáciou sprostredkovanou SA.

Klíčová slova	SPL1, FeSOD1, kyselina salicylová, superoxid-dismutázy, chitinázy, <i>Arabidopsis thaliana</i> ,
Počet stran	67
Počet príloh	0
Jazyk	Slovensky

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Lukáš Mlynár
Title	Phenotypic and biochemical analysis of <i>Arabidopsis spl1-1</i> and <i>spl1-2</i> mutants response to salicylic acid
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
The year of presentation	2023

### Abstract:

SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE 1 (SPL1) belongs to a group of plant-specific transcription factors that regulate growth, development, and response to biotic and abiotic stress. Salicylic acid (SA) is a plant hormone that plays an important role in signaling and plant responses to biotic and abiotic stresses. In this work, we focus on the response of *Arabidopsis thaliana spl1-1* and *spl1-2* mutants to exogenous SA application. We have found that *spl1* mutants do not differ in root length and gravitropism compared to wild type. Germination of the mutants was reduced, suggesting the involvement of SPL1 in germination. Part of experiments focused on the biochemical analysis of activity of antioxidant enzymes superoxide dismutases (SOD) and peroxidases, as well as important defense related enzymes chitinases. The absence of SPL1 expression reduced the activities of SOD izozymes after exposure to SA. Some chitinases izozymes showed increased activity after SA treatment, while the increase was milder in the mutants. We did not notice any change in the activity of peroxidases. Our results showed, that transcription factor SPL1 might be important for plant responses to SA-induced superoxide radical formation and for plant defense responses controlled by SA signalling.

Keywords	SPL1, FeSOD1, salicylic acid, superoxide dismutases, chitinases, <i>Arabidopsis thaliana</i>
Number of pages	67
Number of appendices	0
Language	Slovak

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Súčasný stav riešenej problematiky .....	2
2.1 Kyselina salicylová.....	2
2.1.1 Úloha SA pri raste a vývine .....	4
2.1.2 Úloha SA v senescencii rastlín.....	5
2.1.3 Úloha SA počas odpovedí rastlín na abiotický stres .....	5
2.1.4 Funkcie SA v odpovedí rastlín na biotický stres.....	8
2.1.5 Interakcia SA s ostatnými rastlinnými hormónmi.....	11
2.1.6 Chitinázy .....	12
2.2 Superoxiddizmutázy .....	12
2.3 Transkripčné faktory SQUAMOSA promoter-binding protein-like .....	13
2.3.1 Zapojenie SPL do obrany proti biotickému stresu .....	15
3. Experimentálna časť .....	17
3.1 Biologický materiál .....	17
3.2 Chemikálie.....	17
3.3 Použité prístroje.....	18
3.4 Použité softvéry .....	18
3.5 Roztoky a ich príprava .....	19
3.6 Metódy práce.....	21
3.6.1 Sterilizácia semien .....	21
3.6.2 Kultivácia <i>Arabidopsis thaliana</i> in vitro.....	21
3.6.3 Fenotypová analýza odpovede mutantov <i>spl1</i> na SA .....	21
3.6.4 Biochemická analýza mutantov <i>spl1</i> po krátkodobom ošetrení SA.....	22
3.6.5 Homogenizácia.....	22
3.6.6 Extrakcia proteínov pre stanovenie aktivít SID a peroxidáz.....	22
3.6.7 Extrakcia proteínov pre stanovenie aktivity chitináz.....	22
3.6.8 Stanovenie množstva proteínov pomocou Bradfordovej metódy .....	23
3.6.9 Natívna polyakrylamídová elektroforéza .....	23
3.6.10 Stanovenie aktivity superoxiddizmutáz .....	24
3.6.11 Stanovenie aktivity peroxidáz.....	24
3.6.12 Stanovenie aktivity chitináz .....	25
3.6.13 Štatistické vyhodnotenie výsledkov.....	25

4.	<b>Výsledky</b> .....	26
4.1	Klíčenie semien mutantov <i>spl1</i> .....	26
4.2	Fenotypová analýza odpovede mutantov <i>spl1</i> na SA.....	27
4.3	Biochemická analýza mutantov <i>spl1-1</i> po ošetrovaní SA.....	29
4.3.1	Biochemické stanovenie aktivity peroxidáz.....	29
4.3.2	Zmeny v aktivite izozýmů superoxiddizmutáz po ovplyvnení SA .....	30
4.3.2.1	MnSOD .....	31
4.3.2.2	FeSOD1 .....	32
4.3.2.3	Cu/ZnSOD .....	34
4.3.3	Zmeny v aktivite izozýmů chitináz po ovplyvnení SA.....	36
5.	<b>Diskusia</b> .....	42
6.	<b>Záver</b> .....	45
7.	<b>Literatúra</b> .....	46
8.	<b>Zoznam použitých symbolov a skratiek</b> .....	57

## **Ciele práce**

### **Vypracovať teoretickú rešerš na témy:**

- Kyselina salicylová a jej úloha u rastlín počas biotického a abiotického stresu.
- Funkcia kyseliny salicylovej vo vývine rastlín.
- SQUAMOSA promoter-binding protein-like proteíny (SPL) u rastlín a ich regulácia, úloha v biotickom a abiotickom strese.

### **Experimentálne ciele :**

- Získať zručnosti v metódach kultivácie rastlín in vitro, fenotypovej analýze a špecifickom farbení enzymatickej aktivity na natívnych géloch.
- Analýza aktivity vybraných enzýmov (napr. peroxidáz a chitináz) v mutantoch *spl1-1* a *spl1-2* počas odpovedi na exogénne ovplyvnenie kyselinou salicylovou.
- Fenotypová analýza odpovedí mutantov *spl1-1* a *spl1-2* na exogénne ovplyvnenie kyselinou salicylovou.



## 1. Úvod

SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SPL) sú špecifické transkripčné faktory, ktoré sú známe predovšetkým vďaka ich funkciám vo vývine (Chen et al., 2010). Ich úlohy v odpovedi na biotický a abiotický stres nie sú ešte dostatočne preštudované.

Predchádzajúce výsledky naznačujú, že transkripčný faktor SPL1 môže byť dôležitý pre odpoveď rastlín na kyselinu salicylovú (SA; Zeiner et al., 2021) a že by mohol regulovať expresiu superoxiddizmutázy FeSOD1 (Dvořák et al., 2021b).

SA je dôležitá fenolová signálna molekula, ktorá je dôležitá pre viaceré fyziologické procesy. SA je radená do kategórie rastlinných hormónov, ktoré majú kľúčovú rolu pri regulácii vývinu a tolerance voči biotickému a abiotickému stresu.

Preto bolo cieľom tejto práce zistiť vplyv a úlohu SA v regulácii SOD a zapojenie transkripčného faktoru SPL1 do odpovede rastlín na SA. V rámci tejto bakalárskej práce boli analyzované mutanty *spl1-1* a *spl1-2* počas exogénnej aplikácie SA. Bol kvantitatívne analyzovaný fenotyp primárneho koreňa v odpovedi na SA. Zamerali sme sa tiež na vplyv SA na aktivitu izozým MnSOD, FeSOD, Cu/ZnSOD a chitináz, dôležitých obranných enzýmov v odpovedi na SA.

## 2. Súčasný stav riešenej problematiky

### 2.1 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová (SA) je prirodzene sa vyskytujúca fenolová zlúčenina obsahujúca sedem uhlíkov, ktorá je dôležitou endogénnou signálnou molekulou. V rastlinách je syntetizovaná hlavne biochemickou dráhou kyseliny šikimovej. Dráha kyseliny šikimovej je hlavnou dráhou pre biosyntézu väčšiny rastlinných fenolových zlúčenín, vrátane SA. Táto dráha využíva sacharidové prekursor, ako je fenylalanín, ktorý slúži ako prekursor pre SA (Averesch & Krömer, 2018).

Biosyntéza SA môže byť realizovaná dvomi dráhami, a to izochorizmatovou a fenylalanínovou dráhou. V izochorizmatovej dráhe sa izochromát, ktorý je produktom metabolizmu aminokyseliny tryptofán, mení na SA (Mustafa et al., 2009). Druhou dráhou je fenylalanínová dráha, ktorá je najbežnejšou cestou pre syntézu SA. V tejto dráhe je fenylalanín premenený na kyselinu benzoovú a tá je premenená na SA v dôsledku chemických reakcií, ktoré sú katalyzované rôznymi enzýmami. Jedným z takýchto enzýmov je 2-hydroxyláza, ktorá katalyzuje hydroxyláciu kyseliny benzoovej na SA (Lefevre et al., 2020).

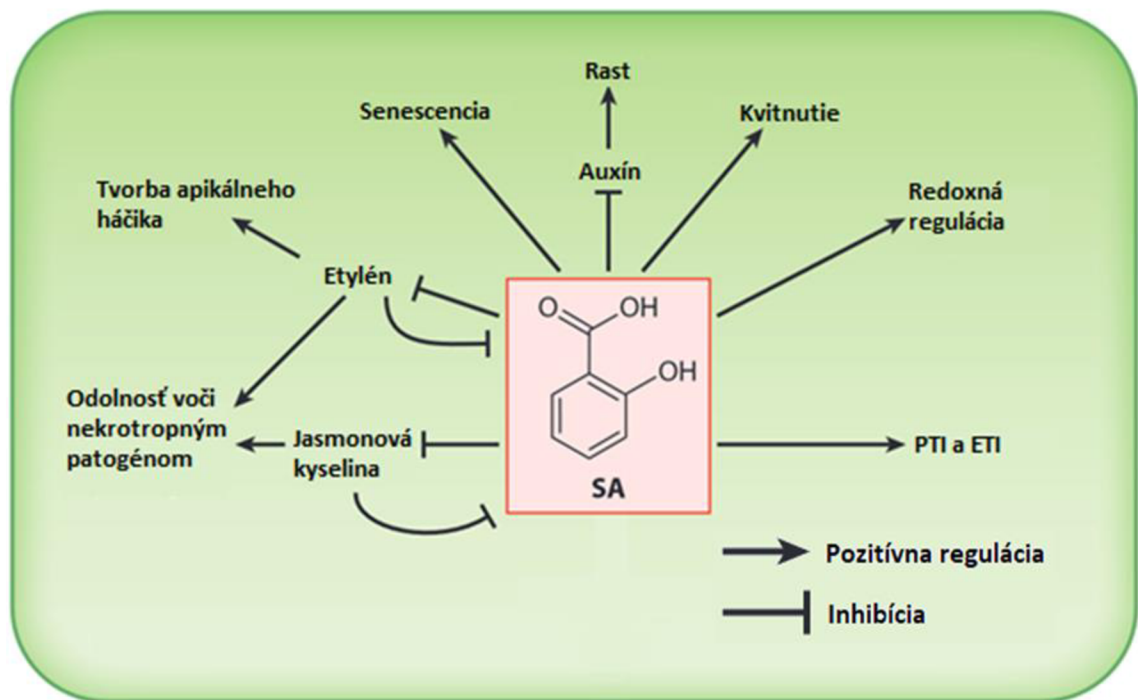
Biosyntéza SA je ovplyvnená mnohými regulátormi, medzi ktorými sú reaktívne formy kyslíka (ROS), najmä peroxid vodíka. Ten tvorí spolu s SA spätnoväzobnú slučku, kde peroxid vodíka podporuje jej tvorbu a SA zase spôsobuje hromadenie peroxidu vodíka inhibíciou jeho odbúravania (Li et al., 2020).

SA má úlohu pri regulácii rastu a vývoja rastlín a taktiež pri ich odpovedi na biotické a abiotické stresové faktory (Khan et al., 2012). Zohráva kľúčovú úlohu v regulácii významných fyziologických procesov v rastlinách, vrátane fotosyntézy, metabolizmu dusíka, produkcie prolínu a glycínbetaínu, antioxidantného obranného systému a vzťahov rastlín s vodou za stresových podmienok. Týmto spôsobom poskytuje rastlinám ochranu pred negatívnymi účinkami abiotického stresu. (Khan et al., 2010) Ďalšie jej úlohy sú zobrazené na Obrázku 1.

Výskumy ukázali, že SA môže zlepšiť odolnosť rastlín voči hlavným abiotickým stresom, ako sú soli (Khan et al., 2014), kovy (Zhang et al., 2015), sucho (Fayez & Bazaid, 2014), osmotický stres (Alavi et al., 2014), a tepelný stres (Khan et al., 2013). SA býva uvádzaná ako induktor viacerých génov, ktoré kódujú čaperóny, proteíny

tepelného šoku (*heat shock proteins*, HSP), antioxidanty a sekundárne metabolity (Jumali et al., 2011).

SA môže v rastline prejsť rôznymi modifikáciami, ktoré väčšinou vedú k inaktivácii SA. Keď je SA glukozylovaná, môže sa vytvoriť SA glukozid (SAG), ktorý sa môže ukladať vo vakuole vo veľkých množstvách (Dean et al., 2003). Ďalšou modifikáciou SA je glukozylácia esterom SA, ktorá vedie k tvorbe ďalšieho konjugátu cukru SA, ktorý sa môže vytvárať v rastlinách. Metylácia zvyšuje membránovú permeabilitu SA a robí ju prchavejšou, čím sa tento derivát môže uvoľniť z rastliny a slúži ako podnet na interakciu medzi rastlinami a hmyzom (Snoeren et al., 2010). Ďalšou hlavnou modifikáciou je konjugácia s aminokyselinami, ktorá sa môže podieľať na katabolizme SA (Mackelprang et al., 2017). Ďalšia modifikácia je výsledkom hydroxylácie SA za tvorby kyseliny 2,3- a 2,5-dihydroxybenzoovej (Dempsey et al., 2011). V nedávnej dobe bola identifikovaná glykozytransferáza, ktorá dokáže previesť metylovanú SA (MeSA) na MeSA glukozid (Chen et al., 2019).



Obrázok 1 Úloha kyseliny salicylovej (SA) v rôznych biologických procesoch. Prevzaté a následne upravené z Peng et al., 2021.

### 2.1.1 Úloha SA pri raste a vývine

Transport auxínov je prísne kontrolovaný pomocou transportérov auxínu PIN, ktoré sú umiestnené v membránach (Adamowski & Friml, 2015). Väčšina PIN proteínov sa nachádza na plazmatickej membráne (Vieten et al., 2007). Aby sa udržala efektívna výmena auxínu, rastliny stále internalizujú PIN proteíny z plazmatickej membrány pomocou klatrínom sprostredkovanej endocytózy (Adamowski & Friml, 2015). Hromadenie SA v rastline má inhibičný účinok na endocytózu PIN proteínov a ovplyvňuje štruktúru koreňových buniek v závislosti od koncentrácie (Pasternak et al., 2019). Tým že SA obmedzuje dynamiku PIN proteínov a spôsobuje ich hyperklastovanie na plazmatickej membráne, narušuje gravitropizmus koreňa (Ke et al., 2020). Výsledky analýzy transkriptómu ukazujú, že ošetrovanie SA vedie k potlačeniu expície 21 génov, ktoré sú zapojené do auxínovej signalizácie (Wang et al., 2007).

Aplikácia SA, môže mať rôzne účinky na rast a vývoj rastlín, ktoré závisia od druhu rastliny, jej vývojového štádia a koncentrácie SA (Rivas-San Vicente & Plasencia, 2011). Aj keď použitie nízkych koncentrácií SA môže stimulovať rast niektorých druhov rastlín, príliš vysoké dávky SA majú takmer vždy negatívny vplyv. Toto sa prejavuje napríklad v prípade aplikácie 1000 mM SA, ktorá vedie k výraznému spomaleniu rastu semenáčikov *Arabidopsis* (Rajjou et al., 2006). Mutanty s poruchou imunitného systému, ktoré majú konštitutívne zvýšené hladiny SA, často prejavujú zníženú rastovú schopnosť (van Wersch et al., 2016). SA ovplyvňuje rast koreňov tým, že reguluje aktivitu koreňového apikálneho meristému (*root apical meristem*, RAM) (Xu et al., 2017). Výskum ukázal, že prítomnosť 30  $\mu$ M SA znižuje počet buniek, ktoré exprimujú CYCLIN B1, marker bunkového delenia, v proximálnom meristeme. To znamená, že delenie buniek v proximálnom meristeme je inhibované po ošetrovaní SA, čo má za následok zníženie dĺžky koreňa. Keď sa korene ošetrili vyššími koncentraciami SA (150  $\mu$ M), proximálne meristémové bunky sa zväčšia, ale CYCLIN B1 sa nenachádzal vo viac ako polovici ošetrovaných koreňov (Pasternak et al., 2019).

Pri exogénnej aplikácii nízkych dávok SA dochádza k výraznému zlepšeniu klíčenia semien *Arabidopsis* v rôznych podmienkach abiotického stresu (Rajjou et al., 2006). Pri stresových podmienkach spôsobených soľou (100-150 mM NaCl) vyklíči len 50 % semien *Arabidopsis*, ale v prítomnosti SA (0,05-0,5 mM) sa zvyšuje klíčivosť semien na 80 %. Tieto zistenia sú v súlade s pozorovaným fenotypom oneskoreného klíčenia u mutanta *Arabidopsis sid2* pri vysokej koncentracii soli (Alonso-Ramírez et al.,

2009). Tento mutant sa vyznačuje chýbajúcou expresiou génu *IZOCHORIZMÁTSYNTÁZA 1 (ISOCHORISMATE SYNTHASES1, ICS1)*, čo vedie k zníženiu hladín SA. Transgénné línie *Arabidopsis NahG* exprimujúce bakteriálnu salicyláthydroxylázu majú podobne nižšie hladiny SA. Avšak, v tomto prípade klíčenie semien za vysokej salinity nie je ovplyvnené, ako tomu bolo u mutantu *sid2* s nízkymi hladinami SA (Borsani et al., 2001). Tento rozpor v pozorovaných účinkoch sa vysvetľuje prítomnosťou katecholu, ktorý vzniká pri pôsobení salicyláthydroxylázy a má antioxidantné vlastnosti (Lee et al., 2010). Takže SA zlepšuje klíčenie semien v podmienkach vysokého obsahu soli tým, že redukuje oxidačné poškodenie (Saidi et al., 2013). Taktiež boli zistené zmeny, ktoré naznačujú indukciu dvoch superoxiddizmutáz pod vplyvom SA v klíčiach semenách *Arabidopsis*, čo môže prispieť k zvýšenej schopnosti rastlín eliminovať ROS (Rajjou et al., 2006).

### 2.1.2 Úloha SA v senescencii rastlín

Podrobná analýza génovej expresie v starnúcich listoch *Arabidopsis* potvrdila účasť signálnej dráhy SA v senescencii. Až 20 % génov, ktorých expresia bola zvýšená počas senescencie, vykazuje aspoň dvojnásobné zníženie ich expresie v SA-deficientných *NahG* transgénnych rastlinách. Väčšina týchto génov, ktoré sú zosilnené senescenciou a závisia na dráhe SA, kódujú kinázy, transferázy a hydrolázy (Buchanan-Wollaston et al., 2005). Senescencia sa vyznačuje poklesom fotosyntetickej aktivity a zvýšenými hladinami ROS kvôli strate antioxidantnej kapacity (Procházková et al., 2001). Je pravdepodobné, že tieto udalosti sú čiastočne spôsobené hromadením SA. V starnúcich listoch *Arabidopsis* dochádza k 4-násobnému zvýšeniu hladín SA. Rastlinné mutanty, v ktorých je prerušená signálna dráha SA, ako je napríklad *npr1* (deficientné v expresii *NPRI, NON EXPRESSOR OF PR 1*), prejavujú oneskorenú senescenciu. Toto zahŕňa oneskorené žltnutie a menší výskyt nekróz (Yu et al., 2021).

### 2.1.3 Úloha SA počas odpovedí rastlín na abiotický stres

Bolo potvrdené, že exogénna aplikácia SA zlepšuje rast a fotosyntetické vlastnosti plodín vystavených ťažkým kovom, vrátane *Oryza sativa (O. sativa)* vystavenej olovu (Chen et al., 2007) a *Zea mays* vystavenej kadmiumu (Krantev et al., 2008). Taktiež bolo preukázané, že aplikácia SA ovplyvňuje komponenty antioxidantného systému a významne redukuje peroxidáciu membránových lipidov u *Phaseolus vulgaris*

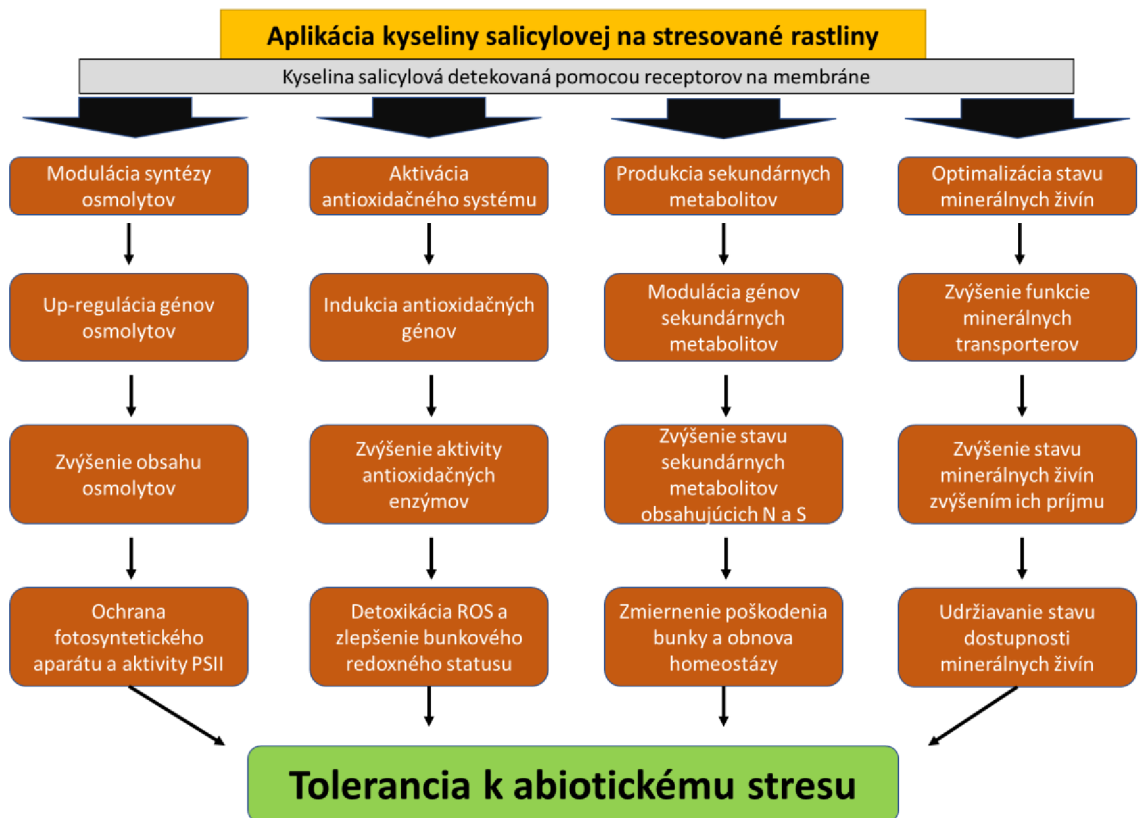
vystavenej medi (Zengin, 2014). Výskumy ukazujú, že SA má dôležitú úlohu v regulácii procesov súvisiacich s fotosyntézou, ako je fotosystém II (PSII), fotosyntetické pigmenty a aktivity enzýmov, ako napríklad ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza (RuBisCO) a karboanhydráza, pri stresových podmienkach z ťažkých kovov (Zhang et al., 2015).

SA má významnú úlohu pri posilňovaní schopnosti rastlín znášať stres spôsobený vysokou koncentráciou soli v pôde. Tento efekt bol úspešne preukázaný u mnohých plodín, ako napríklad *Vicia faba* (Azooz, 2009), *Brassica juncea* (Nazar et al., 2011), *Medicago sativa* (Palma et al., 2013) a *Vigna radiata* (Khan et al., 2014). Podľa Li et al. (2014) SA môže zvýšiť toleranciu rastlín voči soľnému stresu a zlepšiť rast *Torreya grandis*. Tento účinok je spôsobený zvýšením množstva chlorofylu a aktivitou antioxidantných enzýmov, ktoré podporili proces fotosyntézy a zmiernili oxidačný stres. Výskum Cao et al. (2009) naznačuje, že nedostatok SA v rastlinách môže byť hlavnou príčinou zvýšených poškodení spôsobených soľným stresom a zníženej aktivity antioxidantných enzýmov. Toto bolo potvrdené v *NahG* transgénnych líniiach *Arabidopsis*, kde bola zistená nízka hladina SA a zhoršená tolerancia voči soli. Na základe štúdie Fayed & Bazaid (2014) redukovala 50  $\mu$ M koncentrácia SA oxidačný stres spôsobený soľou v rastline *Hordeum vulgare* prostredníctvom zníženia množstva bunkového malondialdehydu (MDA), ktorý slúži ako marker membránovo-lipidovej peroxidácie, ale aj prostredníctvom zníženia produkcie ROS.

Podľa dostupných údajov SA môže mať rôzne účinky na rastliny vystavené tepelnému stresu. Pri teplote 38 °C sa ukázalo, že SA v koncentracii 0,5 mM<sup>1</sup> zlepšuje aktivitu antioxidantných enzýmov ako sú napríklad peroxidázy, superoxiddizmutázy (SOD) a katalázy a taktiež zvyšuje obsah chlorofylu v *Medicago sativa* (Wassie et al., 2020). U *Hordeum vulgare* (*H. vulgare*) sa po exogénnej aplikácii SA zvýšila tolerancia k chladu prostredníctvom zvýšenia aktivity antioxidantných enzýmov a zmenou usporiadania apoplastických proteínov (Mutlu et al., 2013). Zvýšená tolerancia k chladu bola taktiež preukázaná pri plode paradajok (*Solanum lycopersicum*, *S. lycopersicum*) v dôsledku vystavenia nízkej koncentracie kyseliny metylsalicylovej (MeSA), ktorá sa podieľa na syntéze niektorých stresových proteínov, ako sú napríklad PR proteíny (pathogen-related proteins) (Ding et al., 2002). Taktiež aplikácia SA môže pomôcť rastlinám druhu *Triticum aestivum* (*T. aestivum*) zmierniť účinky tepelného stresu. Tento

účinnok bol dosiahnutý následkom zvýšenia produkcie prolínu a obmedzením tvorby etylénu počas stresu (Khan et al., 2013).

Aplikácia SA na rastliny *H. vulgare*, ktoré boli vystavené stresu zo sucha, viedla k nárastu asimilácie CO<sub>2</sub> v dôsledku zvýšenej prieduchovej vodivosti a k zvýšeniu suchej hmoty rastlín (Habibi, 2012). U rastlín *T. aestivum* vystavených suchu a ošetrovaných SA boli zistené nižšie hodnoty peroxidácie membránových lipidov a rastliny zároveň dosahovali vyššiu výšku a väčšiu suchú hmotnosť a listy nevykazovali žiadne výrazné príznaky vädnutia (Kang et al., 2012). Ďalší výskum ukázal, že aplikácia 5 μM SA viedla k aktivácii génov v rastline *Mitragyna speciosa*. Z náhodnej analýzy 292 exprimovaných génov sa ukázalo, že väčšina génov kódujúcich čaperóny, HSP, antioxidanty a enzýmy biosyntézy sekundárnych metabolitov reagovala na aplikáciu SA (Jumali et al., 2011). Sadenice *T. aestivum*, ktoré boli ošetrované 0,5 mM SA počas troch dní pred vyvolaním stresu, prejavili výrazné zvýšenie rastu a zlepšenie tolerancie voči stresu zo sucha. Tieto zmeny sa prejavili zvýšenými hodnotami absolútneho obsahu vody, suchej hmotnosti a čerstvej hmotnosti, a tiež zníženou peroxidáciou lipidov. Proteomická analýza odhalila, že SA reguluje 76 rôznych proteínových dráh, ktoré sa podieľajú na prenose signálu, obrane proti stresu, fotosyntéze, metabolizme sacharidov, metabolizme bielkovín a na produkcii energie. Pri obrane voči stresu výsledky naznačujú, že aplikácia SA tri dni pred vyvolaním stresu zvýšila antioxidantný obranný systém, čím sa znížilo oxidačné poškodenie spôsobené stresom. Predošetrovanie aplikáciou SA s nasledujúcim vyvolaním stresu zo sucha má synergický účinok na zvýšenie RuBisCO, čím je zvýšená aj fotosyntéza. SA taktiež zvýšila metabolizmus sacharidov a produkciu energie prostredníctvom zvýšenia kľúčových enzýmov glykolýzy a citrátového cyklu (Kang et al., 2012). Schéma potenciálnych mechanizmov pre vytvorenie tolerancie voči abiotického stresu prostredníctvom SA je zobrazená na Obrázku 2.



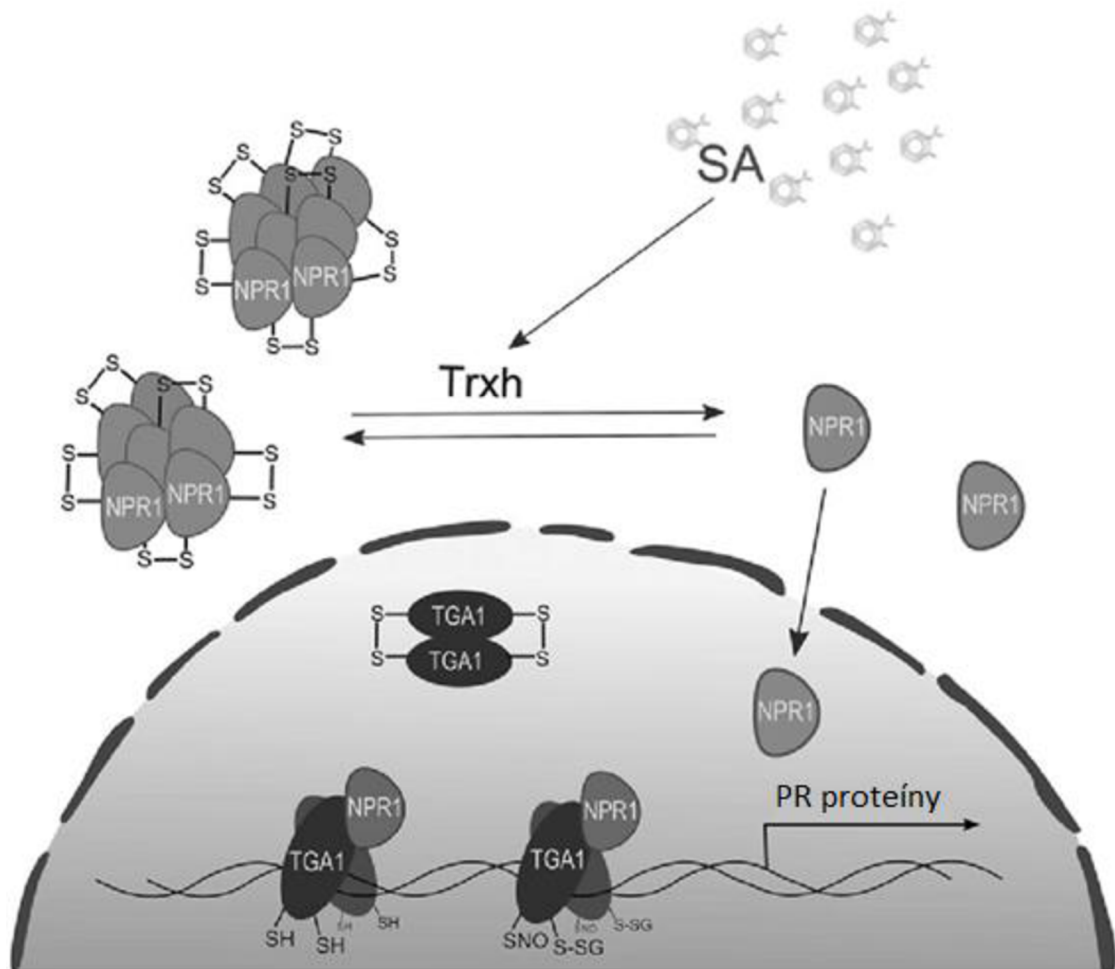
Obrázok 2 Zjednodušené schémy predstavujúce potenciálne mechanizmy, ktoré sú základom tolerancie rastlinného abiotického stresu sprostredkovaného kyselinou salicylovou (SA). Prevzaté a upravené z Khan et al., 2015.

#### 2.1.4 Funkcie SA v odpovedí rastlín na biotický stres

Rastliny si vyvinuli imunitný systém, ktorý sa skladá z dvoch vrstiev, ktoré slúžia na detekciu a zvládanie biotických útokov. Prvá vrstva sa aktivuje po rozpoznaní molekulárnych vzorov spojených s patogénmi, ktoré sú detekované pomocou špecifických receptorov (*pattern-recognition receptors*, PRR) na bunkovom povrchu, čím sa aktivuje primárna imunita (*pattern-triggered immunity*, PTI). Ak rastlina rozpozna efekty, ktoré sú sekretované patogénmi, môže sa aktivovať druhá, silnejšia vrstva imunitnej signalizácie známa ako efektorom spustená imunita (*effector-triggered immunity*, ETI) (Jones & Dangl, 2006). Po týchto udalostiach môžu ETI a PTI spôsobiť imunitné reakcie v neinfikovaných častiach rastlín, ktoré sú vystavené napadnutiu patogénom. Táto širokospektrálna rezistencia na veľkú vzdialenosť sa nazýva systémová získaná rezistencia (*systemic acquired resistance*, SAR). SAR je primárne regulovaná endogénnou akumuláciou SA a charakterizovaná aktiváciou génov PR a proteínmi s antimikrobiálnou aktivitou (Shine et al., 2019).



SA hrá dôležitú úlohu pri obrane rastlín voči patogénom. Pri infekcii biotrofnými patogénmi, ktoré potrebujú živé hostiteľské pletivo, sa aktivujú komplexné siete kľúčových zložiek, ktoré zabezpečujú obranu rastlín. SA pôsobí prostredníctvom NPR1, ktorý je základným prvkom signalizácie obrany rastlín a jeho úlohou je aktivovať obrannú odpoveď rastlín a produkciu PR proteínov (Withers & Dong, 2016). V *Arabidopsis* existuje multigénna rodina proteínov NPR1 až NPR6 (Kuai & Després, 2016). Proteín NPR1 je lokalizovaný najmä v cytoplazme a väčšinou zostáva neaktívny v oligomérskej forme, kým hostiteľská rastlina nie je infikovaná patogénom. Po infekcii sa začne v rastline akumulovať SA, a vyšší obsah SA spôsobuje zmenu bunkového redoxného potenciálu, v dôsledku čoho sa oligomér NPR1 redukuje na biologicky aktívne monoméry. Monomérny NPR1 sa potom premiestňuje do jadra, kde interaguje s *TGACC MOTIF-BINDING PROTEIN* (TGA). Na základe tejto interakcie je vyvolaná expresia PR proteínov (Seo et al., 2020). Tento mechanizmus monomerizácie je zobrazený na Obrázku 3. Vyskytujú sa špeciálne situácie, kde jadrová lokalizácia NPR1 nie je potrebná na reguláciu génov ovplyvnených SA (Skelly et al., 2019). Toto naznačuje, že cytoplazmatická forma NPR1 aktivovaná SA má inú funkciu, ktorá je mimo jej tradičnej role ako transkripčný koaktivátor v jadre (Zhou et al., 2023). SA má kľúčovú úlohu v aktivácii obranných reakcií rastlín proti patogénom prostredníctvom regulácie niekoľkých biochemických a morfofyziologických procesov (War et al., 2011). Po infekcii patogénom sa biosyntéza SA mnohonásobne zvyšuje, čo je dôležité pre spustenie hypersenzitívnej odpovede (*hypersensitive response*, HR) v rastlinách (Huang, et al., 2020).



Obrázok 3 Schematické znázornenie rastlinnej imunitnej signalizácie založenej na NPR1. Patogenom vyvolaná akumulácia kyseliny salicylovej (SA), vedie k monomerizácii *NON EXPRESSOR OF PR 1* (NPR1), ktorá za normálnych okolností zostáva v cytosóle ako oligomér stabilizovaný disulfidovými väzbami. Proces monomerizácie NPR1 je regulovaný tioredoxínom (Trx). Nukleárny import NPR1 spôsobí interakciu s TGA transkripčnými faktormi, čo následne aktivuje expresiu génov zodpovedných za obranu rastliny (Kerchev et al., 2015).

Aj keď ROS reguluje imunitu rastlín, biotický stres môže spôsobiť ich nadmerné hromadenie, ktoré spôsobuje oxidatívny stres (Huang et al., 2019). SA je známa ako dôležitý regulátor ROS (Saleem et al., 2021). Úloha SA a miesto, kde interferuje so signalizáciou ROS, závisí od pôvodu ROS a patosystému. Jedným z hlavných cieľov SA v sprostredkovaní indukcie ROS je NADPH oxidáza (Liu & He, 2016). NADPH oxidázy sú enzýmy lokalizované na plazmatickej membráne produkujúce superoxid. V rastlinách sú kódované génmi *RBOH* (*RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGs*) (Qin et al., 2020). Niektoré výskumy naznačujú spojenie funkcií RBOH a SA v regulácii bunkovej smrti. Napríklad RBOH spúšťa bunkovú smrť v poškodených bunkách infikovaných hubou v *Arabidopsis*. Zároveň však inhibuje bunkovú smrť

v susedných bunkách potlačením hladín SA a etylénu, avšak táto regulácia sa zdá byť závislá na patosystéme (Pogány et al., 2009).

SA v rastlinách môže podstúpiť chemické modifikácie, ako je napríklad hydroxylácia, ktorá prispieva k regulácii hladiny SA v rastline a zohráva úlohu pri udržiavaní jej homeostázy (Zhang et al., 2017). Patogény môžu modifikovať SA tak, aby podporila ich virulenciu. Niektoré baktérie a hubové patogény majú enzýmy, ako sú SA hydroxylázy, ktoré slúžia na inaktiváciu SA (Qi et al., 2018). SA môže byť degradovaná na kyselinu gentisovú a následne degradovaná na fumarát a pyruvát baktériou *Ralstonia solanacearum* (Lowe-Power et al., 2016).

### **2.1.5 Interakcia SA s ostatnými rastlinnými hormónmi**

SA reguluje rôzne aspekty reakcií rastlín v optimálnych aj stresových podmienkach prostredníctvom signalizačných interakcií s inými fytohormónmi. Pod normálnymi aj stresovými podmienkami bola zistené interakcie medzi SA a inými fytohormónmi, ako sú auxíny, cytokiníny, gibberelíny, kyselina abscisová, etylén, oxid dusnatý a brassinosteroidy. Interakcie SA s inými fytohormónmi môžu viesť k synergickému alebo antagonistickému vzťahom (Kaya et al., 2023).

SA spôsobuje hromadenie kyseliny abscisovej v rastlinách, ktoré sa nachádzajú v optimálnych podmienkach, aj v podmienkach pôsobenia soľného stresu. Toto hromadenie vedie k lepšej adaptácii na osmotický stres, k zvýšeniu obsahu fotosyntetických pigmentov a k zlepšeniu rastu rastlín *S. lycopersicum* (Szepesi et al., 2009).

Je preukázané, že SA a etylén v interakcii medzi sebou pôsobia antagonisticky. Signalizácia SA bráni tvorbe etylénu tým, že potláča aktivitu transkripčného faktoru EIN3 (*ethylene insensitive*) prostredníctvom NPR1 (Huang et al., 2020).

SA patrí medzi hlavné fytohormóny, ktoré interagujú s oxidom dusnatým, a slúži ako druhý posol, ktorý riadi otváranie a zatváranie prieduchov u vyšších rastlín (Hao et al., 2010). Výskumy naznačujú, že oxid dusnatý môže byť účinným prostriedkom na zníženie oxidačného poškodenia v rastlinách *T. aestivum*, ktoré sa nachádzajú pod osmotickým stresom, a to prostredníctvom SA signalizácie (Alavi et al., 2014). Okrem toho môže SA stimulovať tvorbu oxidu dusnatého zvýšením aktivity enzýmov, ktoré ho syntetizujú (Zottini et al., 2007).

SA a kyselina jasmonová majú antagonistické interakcie na úrovni signalizácie a biosyntézy mitogénom aktivovaných proteínkináz (MAPK, MPK) (Khan et al., 2012). Tento antagonizmus ovplyvňuje expresiu PR génov, pričom SA a kyselina jasmonová indukujú alebo inhibujú ich expresiu (Wang et al., 2001).

### **2.1.6 Chitinázy**

Chitinázy sú proteíny, ktoré majú enzymatickú aktivitu a ich hlavnou funkciou je rozklad chitínu, ktorý je štruktúrnou zložkou húb, hmyzu, nematód a kôrovcov (Singh et al., 2021). V rastlinách majú chitinázy dôležitú úlohu v ochrane pred patogénmi, pretože dokážu rozkladať chitínovú stenu baktérií a húb. Rastlinné chitinázy sa zvyčajne klasifikujú do rodín PR proteínov 3, 4, 8 a 11 (Filyushin et al., 2021). Chitinázy sú jedným z najhojnejších PR proteínov v rastlinách a sú prítomné konštitutívne v nízkych koncentráciách, ale sú špecificky indukované pri stretnutí s určitými biotickými a abiotickými faktormi (van Loon et al., 2006; Kumudini et al., 2018). Rastlinné chitinázy sa však tiež podieľajú na rôznych procesoch rastu a vývoja, ako je embryogenéza, klíčenie semien, mikrosporogenéza, dehiscencia peľnice, vývoj koreňov a abscisia (Wu et al., 2001; van Loon et al., 2006). Rastlinné chitinázy sa vyskytujú v jednoklíčnolistových aj dvojklíčnolistových druhoch a sú distribuované v rôznych orgánoch, vrátane semien, listov, koreňov a kvetov (Singh et al., 2021) a sú indukované v reakcii na rôzne biotické stresy, ako sú baktérie, huby, vírusy a abiotické stresy, ako sú zranenia, osmotický tlak, sucho, salinita, ťažké kovy, teplo a chlad (Cletus et al., 2013; Jain & Khurana, 2018). Podľa Takáč et al. (2021) HvMPK3 proteínová kináza sa po stimulácii flagelínom 22 (flg22) podieľa na pozitívnej regulácii chitináz, a to pravdepodobne špecifickým spôsobom pre jednotlivé izoformy enzýmu. Taktiež podľa analýzy sa zistilo, že HvMPK3 ovplyvňuje imunitnú odpoveď u jačmeňa po indukcii flg22 a to najmä prostredníctvom regulácie nadbytku PR proteínov, vrátane chitináz. Týmto spôsobom sa zvyšuje aktivita obrany indukovanej flg22.

## **2.2 Superoxiddizmutázy**

Rastliny sa s toxicitou ROS vysporiadávajú pomocou sofistikovaných a účinných antioxidantných systémov, ktoré zahŕňajú syntézu molekúl s nízkou relatívnou molekulovou hmotnosťou, ako je napríklad kyselina L-askorbová, glutatión, a rôzne enzýmy. Medzi tieto enzymatické zložky patria SOD. SOD patria do skupiny metaloenzýmov, ktoré tvoria prvú obrannú líniu proti ROS tým, že katalyzujú premenu

superoxidu na peroxid vodíka a vodu (Alscher et al., 2002). Izoformy SOD boli objavené v koreňoch, listoch plodoch a v semenách rastlín, kde plnia dôležitú funkciu v ochrane buniek pred poškodením spôsobeným oxidáciou (Feng et al., 2016). V rastlinách existuje niekoľko izoformiem SOD, ktoré sú klasifikované do troch typov na základe ich kovového kofaktoru a subcelulárnej distribúcie. Týmito typmi sú Cu/ZnSOD, MnSOD a FeSOD, (Alscher et al., 2002; Perry et al., 2010). Cu/ZnSOD sú hlavne distribuované v cytosóle, chloroplastoch, peroxizómoch a extracelulárnom priestore, zatiaľ čo FeSOD sa vyskytuje predovšetkým v chloroplastoch, ale aj v cytosóle, a MnSOD sú lokalizované hlavne v mitochondriách, ale aj v peroxizómoch (Wang et al., 2016). CuZnSOD a FeSOD sú dôležité pre obranu rastlín voči oxidatívne stresu v chloroplastoch (Dvořák et al., 2021a), pričom MnSOD1 odbúrava superoxid v mitochondriách (O'Brien et al., 2004). Ich aktivita je regulovaná pomocou proteín-proteínových interakcií (Melicher et al., 2022), posttranslačných modifikácií (Dvořák et al., 2021b) a MAPK (Takáč et al., 2014). Je známe, že ich transkripcia je riadená pomocou transkripčného faktoru SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 a miRNA (Cohu et al., 2009).

### **2.3 Transkripčné faktory SQUAMOSA promoter-binding protein-like**

SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SPL) sú špecifické rastlinné transkripčné faktory, ktoré plnia funkcie pri raste a vývoji rastlín (Chen et al., 2010). Aminokyselinové sekvencie týchto transkripčných faktorov sú charakterizované vysoko konzervovanou oblasťou, ktorá pozostáva zo 76 aminokyselín a je označovaná ako SQUAMOSA promoter binding protein (SBP) doména (Yang et al., 2008).

Doména SBP je kľúčovým faktorom v procesoch jadrového importu a väzby s DNA s vysokou sekvenčnou špecifitou. Jej hlavnou funkciou je väzba na konsenzuálne väzbové miesto v promótorovej oblasti cieľových génov, obsahujúce nukleotidový motív GTAC a génovo špecifické príbahlé oblasti (Birkenbihl et al., 2005; Yamasaki et al., 2006; Liang et al., 2008).

SPL proteíny majú od 131 (*AtSPL3*) do 927 aminokyselín (*AtSPL12*; Cardon et al., 1999). Gény kódujúce proteíny SPL sa skladajú z rôzneho počtu exónov, avšak pre suchozemské rastliny, doména SBP je kódovaná prvým a druhým exónom a miesta intrónov medzi nimi sú konzervované (Guo et al., 2007).

*SPL* tvoria pomerne veľkú rodinu génov so 17 zástupcami v *Arabidopsis* (*AtSPL*) (Obrázok 4A) a 19 zástupcami v ryži (*OsSPL*). Tieto transkripčné faktory sa podieľajú na

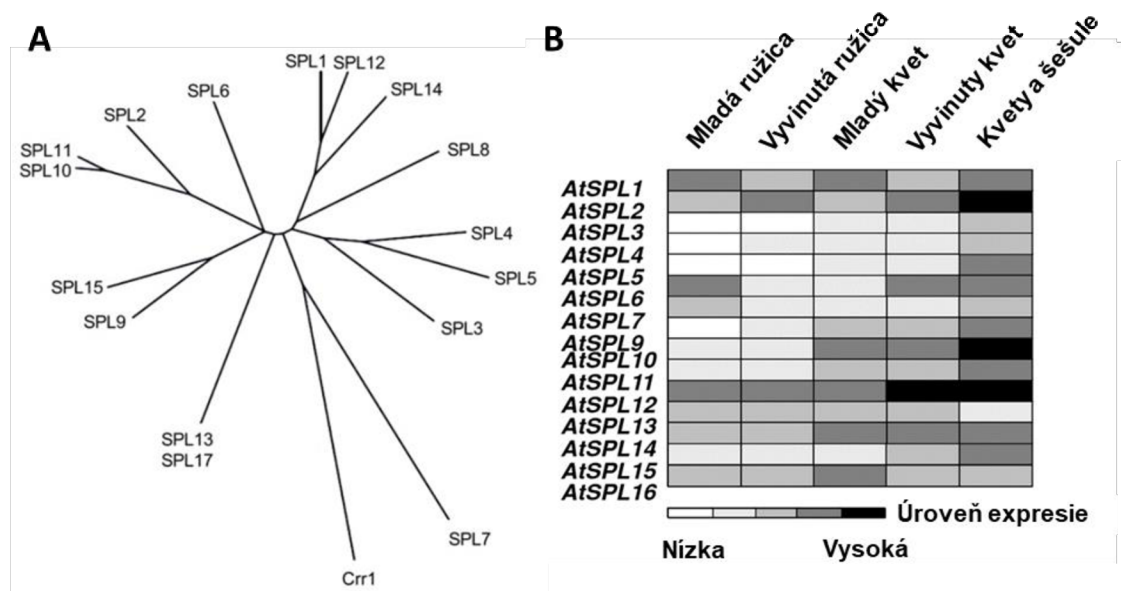
regulácii iných transkripčných faktorov a zohrávajú dôležitú úlohu v metabolických procesoch, ktoré ovplyvňujú produkciu glukózy, anorganických solí, adenozintrifosfátu (ATP) (Wang et al., 2009a) a reakcie na meď a plesňový toxín (Eriksson et al., 2004; Stone et al., 2005).

SPL tiež regulujú viaceré dôležité vývinové procesy, ako napríklad vývin listov (Wu & Poething, 2006), kvetov a plodov (Klein et al., 1996; Cardon et al., 1997; Wang et al., 2005; Manning et al., 2006), prechod z vegetatívneho na generatívny rast (Usami et al., 2009) a sporogénu (Unte et al., 2003).

V *Arabidopsis* sú *SPL* gény exprimované v rôznych pletivách v rôznych štádiách vývoja. Rôznu úroveň expície *SPL* génov v rozličných vývojových štádiách je zobrazená na Obrázku 4B. Na mnohých transkriptoch génov *SPL* sa nachádza miRNA responzívny prvok (*microRNA response element*, MRE), čo naznačuje rozsiahle interakcie s miRNA. (Rhoades et al., 2002). Väčšina MREs tvorí súčasť kódujúcej sekvencie v poslednom exóne, s výnimkou *SPL3*, *SPL4* a *SPL5*, kde sa MREs nachádzajú na 3' nepreloženej oblasti (Gandikota et al., 2007).

Gény *SPL* u *A. thaliana* sú rozdelené do dvoch hlavných skupín. Prvá skupina tvorí veľké proteíny majúce 800 a viac aminokyselinových zvyškov. Sem patria *SPL1*, *SPL7*, *SPL12*, *SPL14* a *SPL17*. Druhú skupinu tvorí ostávajúcich 12 členov, ktoré majú menej ako 400 aminokyselinových zvyškov (Xing et al., 2010). Medzi 17 génmi kódujúcimi proteíny *SPL* v rastline *A. thaliana* sú *SPL1* a *SPL12* geneticky najpodobnejšie a majú v porovnaní s inými *SPL* proteínmi identickú sekvenciu na úrovni 72 %. Podieľajú sa na termotolerancii a to najmä reprodukčných pletív (Chao et al., 2017). V experimente z roku 2019 od Schulten et al., boli zistené rastové defekty pri mutante *spl7* v situácii nedostatku medi, ktoré sa prejavili zníženou čerstvou biomasou a nižšími hladinami chlorofylu. Trojitý mutant *spl1/spl7/spl12*, ktorý bol kultivovaný na médiu bez pridaného Cu, vykazoval podobné vlastnosti ako *spl7*, zatiaľ čo dvojité mutant *spl1/spl12* bol neodlíšiteľný od divého typu. Bolo pozorované, že napriek zníženému obsahu Cu na gram suchej hmoty pri raste divého typu a mutantu *spl1/spl12* nedochádzalo k jeho narušeniu, čo môže byť spôsobené tým, že *SPL7* ovplyvňuje subcelulárnu distribúciu Cu, čím ekonomizuje jeho použitie pri niektorých funkciách. (Bernal et al., 2012). Z tohto vyplýva, že úloha *SPL1* alebo *SPL12* nie je v reakciách na nedostatok Cu u sadeníc kritickejšia dôležitá (Schulten et al., 2019).

SPL7 je jedným z najpreštudovanejších SPL a jedným z hlavných známych transkripčných faktorov, ktoré sprostredkovávajú reakcie vyvolané nedostatkom medi (Yamasaki et al., 2009). SPL7 sa viaže na motív GTAC v promótoře génu miR398 a aktivuje jeho expresiu. miR398 je mikroRNA, ktorá ovplyvňuje expresiu génov kódujúcich rôzne proteíny v rastlinách. Jedným z proteínov, ktoré miR398 reguluje, sú Cu/ZnSOD (*CSD1* a *CSD2*) (Zhu et al., 2011), ktoré zabezpečujú ochranu rastliny pred ROS (Alscher et al., 2002). Keď je k dispozícii dostatok medi, Cu/ZnSOD majú zvýšenú aktivitu a zabraňujú tvorbe reaktívnych foriem kyslíka. Ak je koncentrácia medi nízka, tak rastlina musí využiť iné SOD, ktoré nie sú závislé na jej koncentrácii. SPL7 aktivuje miR398 a tým sa zvyšuje produkcia FeSOD (*FSD*), ktorá je schopná plniť rovnakú úlohu ako *CSD*, ale bez nutnosti medi. Tento proces zabezpečuje ochranu rastlín aj v prostredí s nízkou koncentráciou medi. (Yamasaki et al., 2007).



Obrázok 4 A: Fylogenetická štruktúra rodiny SPL. B: Úroveň expresie u jednotlivých *Arabidopsis* SPL génov v rôznych vývojových štádiách. Obrázok spracovaný a upravený od autorov Yamasaki et al. (2009) a Chen et al. (2010)

### 2.3.1 Zapojenie SPL transkripčných faktorov do obrany proti biotickému stresu

Transkripčné faktory SPL sú zapojené k mechanizmom obrany voči biotickému stresu prostredníctvom mikroRNA156 (miR156). Táto miRNA patrí do konzervovanej rodiny miRNA, ktorá reguluje nástup zmeny vegetatívnej fázy (Poethig, 2013). MiR156 sa zameriavajú na SBP box pre jadrový import a väzbu DNA v génoch kódujúcich SPL. V štádiu juvenilných listov dochádza k akumulácii vysokej hladiny miR156. Zmenu vegetatívnej fázy iniciuje dočasný pokles hladiny miR156, po ktorom nasleduje vysoká

expresia SPL. (Wu & Poethig, 2006, Wu et al., 2009). Celkovo 11 génov *SPL* v *Arabidopsis* je potlačených miR156 prostredníctvom štiepenia mRNA alebo translačnej represie (Cardon et al., 1999; Rhoades et al., 2002). Nové výskumy ukazujú, že dráha regulácie génov *miR156-SPL* je zapojená do obranných mechanizmov rastlín. Porušenie funkcie *miR156* v rastline *Arabidopsis* pomocou mutácie SQUINT (SQN) spôsobilo narušenie signalizácie kyseliny jasmónovej a zníženú rezistenciu voči nekrotrofickému patogénu *Botrytis cinerea* (Sun et al., 2022). Nadmerná expresia SPL9, ktorá je cieľom miR156, v juvenilných rastlinách zvyšuje hladiny reaktívnych foriem kyslíka a spôsobuje signalizáciu kyseliny salicylovej, čo vedie k zvýšenej rezistencii *Arabidopsis* proti bakteriálnemu patogénu *Pseudomonas syringae* (Yin et al., 2019). V inej štúdií zistili, že downregulácia miR-156 a nadmerná expresia *Ideal Plant Architecture1* (IPA1) a *OsSPL7*, dvoch cieľových génov miR-156, zvýšila odolnosť voči chorobám proti bakteriálnej plesni spôsobenej *Xanthomonas oryzae*, ale zároveň znížila výnos ryže (Liu et al., 2019).

V rámci výskumu boli systematicky analyzované hladiny expresie *PfSPL* v semenáčikoch *Paulownia fortunei* postihnutých ochorením *Paulownia witches' broom* (PaWB), pričom pre liečbu tohto ochorenia boli použité rôzne exogénne činidlá. Komplexná analýza ukázala, že niektoré gény *PfSPL* majú úlohu v súvislosti s výskytom ochorenia PaWB. Konkrétne gény *PfSPL17/18* boli identifikované ako gény súvisiace s výskytom ochorenia PaWB, zatiaľ čo gény *PfSPL4/5/9/13* boli identifikované ako supresorové gény, ktoré by mohli pomôcť potlačiť rozvoj ochorenia (Yang et al., 2023).

V *O. sativa* boli identifikované miRNA, ktoré majú úlohu v regulácii imunitného systému rastlín. Jednou z týchto miRNA je Osa-miR535, ktorá sa zameriava na promótor *OsSPL14*. (Wang et al., 2021). V štúdií podľa Zhang et al. (2022) transgénne línie *O. sativa*, ktoré vykazujú nadmernú expresiu *OsSPL4* (*oxspl4*), zároveň vykazujú zvýšenú odolnosť voči blastickým chorobám a taktiež prejavujú zvýšenú imunitnú odpoveď, ktorá zahŕňa zvýšenú expresiu génov súvisiacich s obranou a nahromadenie peroxidu vodíka. Naopak je to pri mutante *osspl4*, kde dochádza k deaktivácii tohto génu, pričom prejavuje citlivosť na ochorenia (Zhang et al., 2022).



### 3. Experimentálna časť

#### 3.1 Biologický materiál

- *Arabidopsis thaliana*: ekotyp Columbia (Col-0; rastlina divého typu); mutantné línie *spl1-1* (SALK\_134584), *spl1-2* (SALK\_058642)

#### 3.2 Chemikálie

- 2-merkptoethanol (Sigma Aldrich, USA)
- Akrylamid/N,N'-metylenbisakrylamid, 40%, 37,5:1 (Bio-Rad, USA)
- Bradfordovo činidlo Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, USA)
- Deionizovaná voda (MiliQ voda)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )(Sigma Aldrich, USA)
- Dihydrát disodnej soli kyseliny ethylendiamín tetraoctovej ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , Sigma Aldrich, USA)
- Dihydrogen fosforečnan sodný ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )(Sigma Aldrich, USA)
- DMSO (Dimethyl suloxid, Sigma Aldrich, USA)
- EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová, Sigma Aldrich, USA)
- Ethanol p.a. 99,8% (v/v) (PENTA)
- Gellan Gum (Alfa Aesar)
- Glycerol,  $\geq 99\%$  (Sigma Aldrich)
- Glycín (Sigma Aldrich, USA)
- Hydroxid draselný (KOH, Sigma Aldrich, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH, Sigma Aldrich, USA)
- Chlorid nitrotetrazoliovej modrej (NBT) (Carl Roth, Nemecko)
- Isopropanol (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina L-askorbová (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina salicylová (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina octová (Sigma Aldrich, USA)
- Murashige a Skoog (MS) médium, basal salt mixture (Duchefa Biochemie, Holandsko)
- MES (2-(N-morpholino)etánsulfonová kyselina, Sigma Aldrich, USA)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED; Sigma Aldrich, Čína)

- o-Dianisidin (DIA; Sigma Aldrich, USA)
- Octan sodný (CH<sub>3</sub>COONa; Sigma Aldrich, USA)
- Peroxid vodíka (Sigma Aldrich, USA)
- Polyvinylpyrolidón (PVP)(Sigma Aldrich, USA)
- Proteinový štandard Precision Plus Protein Dual Standards (Bio-Rad, USA)
- Riboflavín BioChemica (AppliChem, Nemecko)
- Sacharosa (Sigma Aldrich, USA)
- Tekutý dusík (Messer Technogas, Česká Republika)
- Tetramethylendiaminium (TEMED, Sigma Aldrich, USA)
- TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 10% (Bio-Rad, USA)
- Tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris) (Sigma Aldrich, USA))
- Tween 20 (Sigma Aldrich, USA)

### 3.3 Použité prístroje

- Analytické váhy xA110/2X (Radwag, Poľsko)
- Centrifuga Allegra 64R (Beckman Coulter, USA)
- Dokumentačný prístroj ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, USA)
- Digestor (Merci, Česká Republika)
- Elektroforetická aparátúra (Bio-Rad, USA)
- Elektromagnetická miešačka (Boeco, Nemecko)
- Fotoaparát (Nikon, Japonsko)
- Fytotron (WEISS Gallenkamp, Nemecko)
- Laminárny box (Biohazard, Taliansko)
- pH meter (Eutech Instruments. Singapur)
- Skener Image Scanner III (GE Healthcare, Švédsko)
- Spektrofotometer Infinite M Nano (TECAN, Čína)
- Vortex (Genie, Holandsko)
- Výkyvná trepačka (Biosan, Lotyšsko)
- Zdroj napätia pre elektroforézu PowerPaC HV (Bio-Rad, USA)

### 3.4 Použité softvéry

- ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)
- ImageLab (Bio-Rad)

- Microsoft Excel (Microsoft)
- Microsoft Powerpoint (Microsoft)

### **3.5 Roztoky a ich príprava**

#### **½ MS médium (1000 ml)**

- 10 g sacharóza
- 2,15 g MS basal mixture
- 1 g MES
- úprava pH na 5,8 pomocou KOH
- 6 g Gellan Gum

#### **Elektroforetický pufor (1000 ml)**

- 3 g Tris
- 14,4 g glycínu

#### **Na acetátový pufor 50 mmol.l<sup>-1</sup> (50 ml)**

- 205,1 mg CH<sub>3</sub>COONa
- úprava pH na 5 pomocou kyseliny octovej

#### **Na fosfátový pufor 50 mmol.l<sup>-1</sup> (200 ml)**

- 1,22 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1,78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- úprava pH na 7,8 pomocou NaOH
- 5 mg kyseliny L-askorbovej
- 20 ml glycerolu

#### **Tris-HCl, 0,5 mol.l<sup>-1</sup>, pH 6,8 (100 ml)**

- 6 g Tris
- úprava pH pomocou HCl na 6,8

#### **Tris-HCl, 1 mol.l<sup>-1</sup>, pH 8 (100 ml)**

- 12,1 g Tris
- úprava pH pomocou HCl na 8

### **Tris-HCl, 1,5 mol.l<sup>-1</sup>, pH 8,8 (300 ml)**

- 54,45 g Tris
- úprava pH pomocou HCl na 8,8

### **Rozlišovací 10% polyakrylamídový gél (7 ml)**

- 1,875 ml 40% v/v roztoku akrylamidu a N,N-metylénbisakrylamidu v pomere 37,5:1
- 1,875 ml 1,5 mol.l<sup>-1</sup> roztoku Tris-HCl (pH 8,8)
- 3,138 ml MiliQ vody
- 3,75 µl 99% v/v tetrametyletyléndiamínu (TEMED)
- 37,5 µl 10% w/v APS

### **Zaostrovaní 4% polyakrylamídový gél (4,1 ml)**

- 250 µl 40% v/v roztoku akrylamidu a N,N-metylénbisakrylamidu v pomere 37,5:1
- 630 ml 0,5 mol.l<sup>-1</sup> roztoku Tris-HCl (pH 6,8)
- 3,21 ml MiliQ vody
- 2,5 µl TEMED
- 12,5 µl 10% w/v APS

## 3.6 Metódy práce

### 3.6.1 Sterilizácia semien

Semená boli sterilizované v laminárnom boxe v Ependorfovej skúmavke inkubáciou v 1 ml 70% etanolu po dobu piatich minút. Po uplynutí času bol 70% etanol odpipetovaný a do skúmavky bol napipetovaný 96% etanol a semená v ňom boli inkubované po dobu troch minút. Po troch minútach bol etanol odpipetovaný a semená boli päťkrát premyté pomocou sterilnej redestilovanej (MiliQ, Millipore) vody. Takto vysterylizované semená boli spolu s vodou napipetované na sterilný filtračný papier do Petriho misky. Po odparení vody bola Petriho miska prikrytá vekom, vzduchotesne uzavretá parafilmom a uschovaná v tme pri teplote 4 °C pre ďalšie použitie.

### 3.6.2 Kultivácia *Arabidopsis thaliana* in vitro

Sterilizované semená *Arabidopsis thaliana*, boli v laminárnom boxe prenesené pomocou sterilného dreveného špáradla na povrch pevného ½ MS média v Petriho miske (a=14cm). Semená (25ks) boli uložené v rade, približne 2 cm od horného okraja misky. Po uzavretí misky boli semená uchované cez noc pri teplote 4 °C kvôli stratifikácii. Po stratifikácii boli misky so semenami premiestnené do fytotronu a rastliny boli kultivované v podmienkach 22 °C, 16 hodín svetlo, 8hodín tma, 70% vlhkosť, intenzita osvetlenia: 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  vo vertikálnej polohe.

### 3.6.3 Fenotypová analýza odpovede mutantov *spl1-1* a *spl1-2* na SA

Rastliny kultivované 4 dni boli prenesené na ½ MS médium s prídavkom 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny salicylovej, ktorá bola rozpustená v DMSO. Pre kontrolné ovplyvnenie bol rovnaký počet rastlín prenesený na ½ MS médium s rovnakým obsahom DMSO. Na 1 miske (a=14cm) bolo umiestnených 8 rastlín divého typu Col-0, 8 rastlín mutanta *spl1-1* a 8 rastlín mutanta *spl1-2*. Rastliny boli rozložené na Petriho misku do jedného radu asi 2 cm od povrchu misky. Boli uskutočnené 3 biologické opakovania a v rámci jedného biologického opakovania bolo pripravených 6 misiek. Následne boli misky s rastlinami prenesené do fytotronu s teplotou 21 °C s intervalom 16 hodín svetlo 8 hodín tma. Po dobu siedmich dní boli rastliny každý deň skenované skenerom Image Scanner III (GE, Healthcare). Následne boli na základe fotografií vyhodnotené dĺžky koreňov pomocou softwaru ImageJ. Dáta boli následne spracované v programe Microsoft Excel (Microsoft)

#### **3.6.4 Biochemická analýza mutantov *spl1-1* a *spl1-2* po krátkodobom ošetrení SA**

Pre analýzu aktivity enzýmov boli použité 14 dňové rastliny Col-0, *spl1-1* a *spl1-2*, kultivované vo fytotróne na 1/2MS médiu ktoré boli ošetrené postrekom obsahujúcim 0,5 mM koncentráciu kyseliny salicylovej, ktorá bola rozpustená v DMSO a následne v 50 ml MilliQ vody. Ako kontrola bol použitý roztok rovnakého množstva DMSO v 50 ml MilliQ vody. Celé rastliny boli odobrané pomocou pinzety 4 a 24 hodín po postreku a okamžite zmrazené pomocou tekutého dusíka. Materiál bol uschovaný pri teplote -80 °C pre následnú homogenizáciu.

#### **3.6.5 Homogenizácia**

Homogenizácia prebehla mechanicky pomocou tekutého dusíka. Materiál bol z mrazničky prenesený do vychladenej trecej misky a k nemu bol priliaty tekutý dusík. Materiál bol následne rozdrvený tľičkom. Takto rozdrvený materiál sa preniesol do zamrazenej Ependorfovej skúmavky. Počas manipulácie bol materiál uchovaný v permanentnom chlade.

#### **3.6.6 Extrakcia proteínov pre stanovenie aktivít superoxid-dizmutáz a peroxidáz**

K objemu homogenátu bol pridaný jeden násobok extrakčného pufru, ktorý bol pripravený z 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,5% (w/v) PVP, 10% (v/v) glycerolu a 0,2% (v/v) merkaptoetanolu. Po dôkladnom premiešaní pomocou vortexu bola zmes inkubovaná na ľade 30 minút a následne centrifugovaná pri 12 000 g po dobu 20 minút pri teplote 4 °C. Supernatant bol následne opatrne prepipetovaný do nových skúmaviek a prenesený na ľad, v prípade neskoršieho použitia bol uchovaný v mrazničke pri teplote -80 °C.

#### **3.6.7 Extrakcia proteínov pre stanovenie aktivity chitináz**

K objemu homogenátu bol pridaný jeden násobok extrakčného pufru., ktorý bol pripravený z 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,5% (w/v) PVP, 10% (v/v) glycerolu a 0,2% (v/v) merkaptoetanolu. Po dôkladnom premiešaní pomocou vortexu bola zmes inkubovaná na ľade 30 minút a následne centrifugovaná pri 12 000 g po dobu 20 minút pri teplote 4 °C. Supernatant bol následne opatrne prepipetovaný do nových skúmaviek a prenesený na ľad, v prípade neskoršieho použitia bol uchovaný v mrazničke pri teplote -80 °C.

### **3.6.8 Stanovenie množstva proteínov pomocou Bradfordovej metódy**

Stanovenie množstva proteínov prebehlo pomocou Bradfordovej metódy (Bradford, 1976). Do každej použitej jamky v 96 jamkovej mikrotitračnej doštičke bolo napipetovaných 239  $\mu\text{l}$  miliQ vody, kde bol pridaný 1  $\mu\text{l}$  extraktu a následne bolo pridaných 60  $\mu\text{l}$  Bradfordovho činidla. Pre každú vzorku boli spravené 3 opakovania. Ako slepý pokus bolo namiesto vzorky napipetovaný 1  $\mu\text{l}$  extrakčného Na fosfátového pufru. Každá jamka bola následne pomocou pipety premiešaná a mikroplatnička bola ponechaná po dobu 20 minút pri izbovej teplote. Na odmeranie absorbancie pri vlnovej dĺžke 595 nm bol použitý spektrofotometer s monochromátorom Infinite M Nano (TECAN). Aritmetický priemer absorbancií získaných z 3 opakovaní sa odčítal od absorbancie získanej zo slepého pokusu. Obsah proteínov ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bol kalkulovaný pomocou regresnej rovnice kalibračnej krivky zostavenej prostredníctvom meraní absorbancie známych koncentrácií hovädzieho sérového albumínu.

### **3.6.9 Natívna polyakrylamídová elektroforéza**

Pre natívnu elektroforézu bol použitý 1 mm hrubý nenedaturujúci polyakrylamidový gél, ktorý sa skladal z 4% zaostrovacieho gélu a 10% rozlišovacieho gélu. V prípade stanovenia aktivity chitináz bol do rozlišovacieho gélu pridaný ešte 1% glykol chitín. Tento roztok bol naliaty medzi sklá a následne bol navrstvený 1 ml 2-propanolu. Gél polymerizoval po dobu 40 minút pri laboratórnej teplote. Následne bola vrstva 2-propanolu pomocou papierových vreckoviek odstránená a povrch gélu bol trikrát premytý MiliQ vodou. Následne bol pripravený zaostrovací gél, roztok bol premiešaný a pomocou pipety prenesený na rozlišovací gél medzi sklíčka a hneď bola medzi sklíčka vložená forma (tzv. hrebeň) pre vytvorenie jamiek. Gél sa nechal spolymerizovať pri laboratórnej teplote po dobu 40 minút.

Následne bola poskladaná elektroforetická aparátúra a do jamiek boli nanesené vzorky, ktoré obsahovali 50  $\mu\text{g}$  proteínov. Elektroforéza prebehla pri konštantnom prúde 20 mA na jeden gél za neustáleho chladenia v ľadovom kúpeli po dobu 1 hodiny a 45 minút v prípade superoxiddizmutáz a chitináz. V prípade stanovenia aktivity peroxidáz prebehla elektroforéza pri konštantnom prúde 15 mA na jeden gél po dobu 2 hodín a 45 minút. Táto elektroforéza prebehla v elektródovom pufri.

### 3.6.10 Stanovenie aktivity superoxiddizmutáz

Princípom metódy je potlačenie produkcie nerozpustného formazánu z nitrotetrazóliovej modrej (NBT) pôsobením superoxiddizmutáz. V mieste, kde pôsobí SOD na géli, sa objaví svetlý bezfarebný pás, zatiaľ čo zvyšok gélu zostane modro-fialový.

Po dokončení natívnej elektroforézy sa gél inkuboval v 50 mM Na fosfátovom tlmivom roztoku s pH 7,8 10 minút na kmitajúcej doske pri pomalom miešaní. Následne bol gél premiestnený do roztoku obsahujúceho NBT s koncentráciou 0,6 mM v 50 mM Na fosfátovom tlmivom roztoku s pH 7,8 a inkuboval sa 20 minút v tme na kmitajúcej doske pri pomalom miešaní. V ďalšom kroku sa gél inkuboval v 50 mM Na fosfátovom tlmivom roztoku s pH 7,8 a s prídavkom 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 4,6 μM riboflavínu (z vopred pripraveného zásobného roztoku obsahujúceho 38,25 mM riboflavínu v 96% v/v etanole) a 0,324% v/v TEMED a inkuboval sa 15 minút v tme na kmitajúcej doske pri pomalom miešaní. Po inkubácii bol gél v roztoku vystavený priamemu osvetleniu počas 20 minút, a keď sa gél sfarbil na tmavo modro, bol premývaný MiliQ vodou. Gél bol zdokumentovaný pomocou skenera Image Scanner III (GE Healthcare).

Softvér ImageJ bol použitý na kvantifikáciu intenzity pásov. Experimenty boli vykonané v troch biologických opakovaníach. Optická hustota pásov jednotlivých izozýmův SOD bola vypočítaná pomocou softvéru a normalizovaná na celkovú intenzitu získanú súčtom všetkých detekovaných intenzít danej izoformy vo všetkých líniiach a vo všetkých podmienkach. Získané údaje z analýzy boli následne spracované v programe Microsoft Excel (Microsoft).

### 3.6.11 Stanovenie aktivity peroxidáz

Princípom metódy špecifického farbenia peroxidáz je oxidácia *o*-dianizidínu v prítomnosti peroxidu vodíka a peroxidáz, v dôsledku čoho dôjde ku zmene sfarbenia na tmavo oranžovo.

Po dokončení natívnej elektroforézy sa gél inkuboval v 50 mM Na acetátovom tlmivom roztoku (pH 5,0) po dobu 15 minút na kmitajúcej doske. Následne prebehla inkubácia gélu v roztoku obsahujúcom 50 mM Na acetátu, pH 5,0 a 2 μM *o*-dianizidínu (*o*-dianizidín bol rozpustený v 500 μl 96% etanolu pri teplote 65 °C) a doplnené na objem 50 ml pomocou 50 mM Na acetátu pH 5,0). Tesne pred inkubáciou bol do roztoku



pridaných 250 µl 30% peroxidu vodíka. Inkubácia prebiehala až pokým neboli jasne vizualizované všetky dráhy gélu. Po vizualizácii prebehlo viacnásobné premývanie v MiliQ vode na kmitajúcej doske (Rocker Shaker, Biorad). Následne bol gél zdokumentovaný pomocou skenera Image scanner II (GE Healthcare).

### **3.6.12 Stanovenie aktivity chitináz**

Po elektroforéze bol gél prenesený a inkubovaný po dobu 1 hodiny v 50 mM Na acetátovom tlmivom roztoku (pH 5,0) pri teplote 37 °C. Ďalším krokom bola inkubácia gélu pri izbovej teplote, v tme a v 50 mM Tris-HCl tlmivom roztoku (pH 8,9), ktorý obsahoval 0,01% (w/v) fluorescent brightener 28 po dobu 20 minút. Následne prebehlo viacnásobné premývanie v MiliQ vode v tme po dobu niekoľkých dní pri teplote 4 °C. Najskôr po treťom dni premývania bol gél vizualizovaný pomocou detekcie UV svetla na dokumentačnom prístroji Chemidoc MP (Biorad), kde aktivita chitináz predstavovala tmavé pásy na bielom pozadí.

Experiment bol vykonaný v troch biologických opakovaniach a optická denzita pásov bola nameraná pomocou ImageJ a normalizovaná na celkovú intenzitu získanú súčtom všetkých detekovaných intenzít danej izoformy vo všetkých líniiach a vo všetkých podmienkach. Získané údaje boli pomocou programu Microsoft Excel (Microsoft).

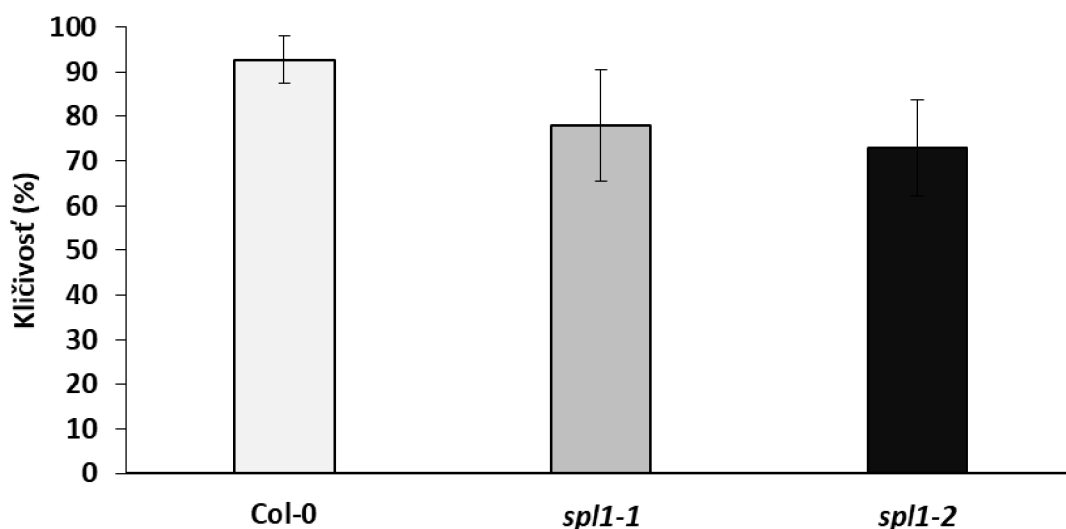
### **3.6.13 Štatistické vyhodnotenie výsledkov**

Štatistické vyhodnotenie výsledkov prebehlo v programe MS Excel pomocou jednocestného ANOVA testu, pričom výsledok bol považovaný za signifikantný v prípade že hodnota  $P \leq 0,05$ .

## 4. Výsledky

### 4.1 Klíčenie semien mutantov *spl1*

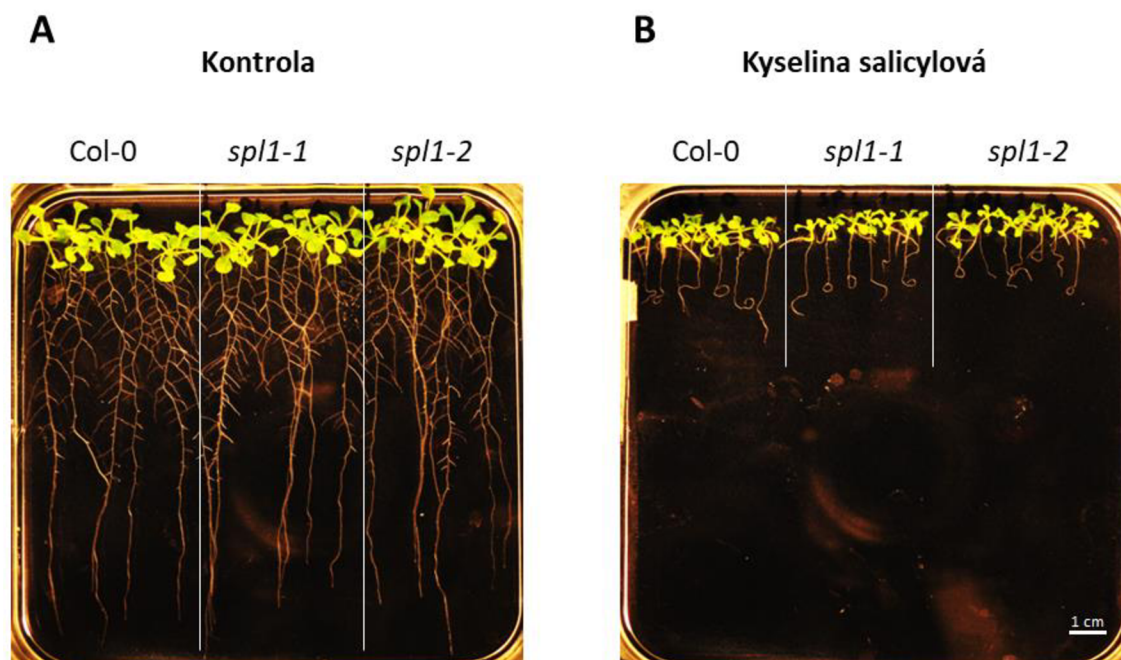
Po vysadení semien na ½ MS médium a po stratifikácii cez noc v chladničke bol na tretí deň po kultivácii vo fytotronu pri štandardných podmienkach zaznamenaný počet vyklíčených a nevyklíčených semien pomocou binokulárneho zoomovacieho mikroskopu. Rastliny divého typu vykazovali klíčivosť s priemernou hodnotou 92,75 % a so štandardnou odchýlkou  $\pm 5,35$  %. Mutant *spl1-1* vykazoval nižšiu klíčivosť v štandardných podmienkach v porovnaní s divým typom, a to 77,97 % so štandardnou odchýlkou  $\pm 12,48$  %. Mutant *spl1-2* taktiež vykazoval zníženú klíčivosť v porovnaní s divým typom, a to 73,04 % so štandardnou odchýlkou  $\pm 10,76$  % (Obrázok 5). Pre obidva mutanty teda platí, že majú zníženú klíčivosť v porovnaní s divým typom a toto zníženie je podľa jednocestného ANOVA testu pre oba štatisticky signifikantné.



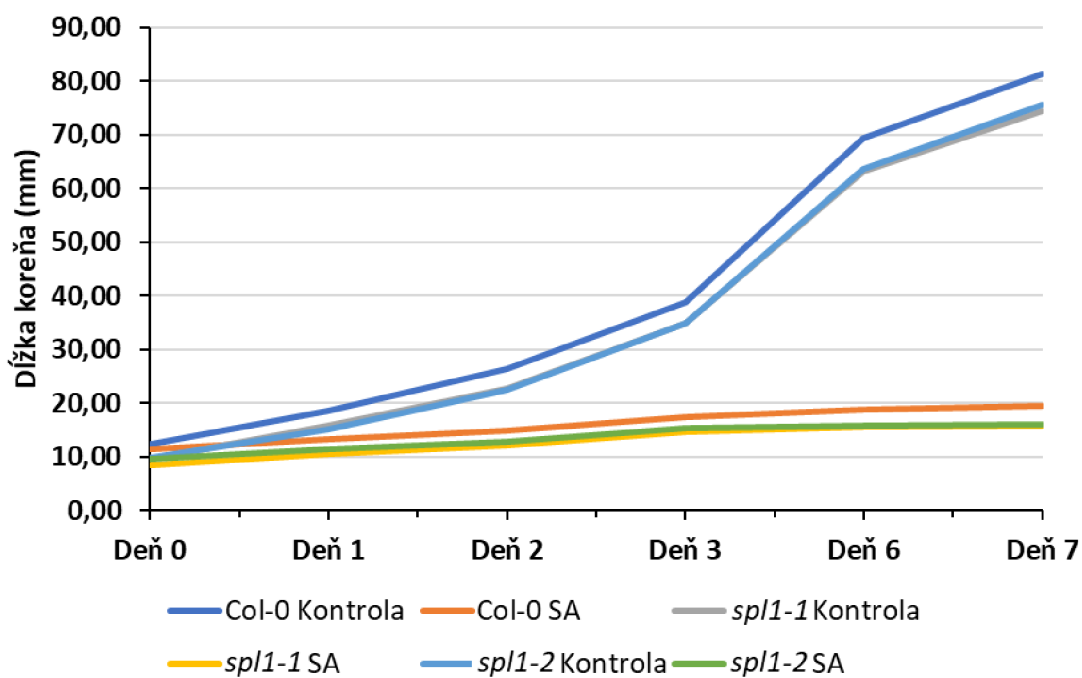
Obrázok 5 Graf znázorňujúci klíčivosť semien *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a semien mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v štandardných podmienkach, ktorá bola zaznamenaná na tretí deň po vyložení do fytotronu. Chybové úsečky predstavujú štandardnú odchýlku.

#### 4.2 Fenotypová analýza odpovede mutantov *spl1-1* a *spl1-2* na SA

Pre tento experiment boli použité rastliny Col-0 a mutanty *spl1-1* a *spl1-2*, ktoré po vyložení do štandardných podmienok rástli 4 dni a následne boli preložené na  $\frac{1}{2}$  MS médium s prídavkom 30  $\mu$ M SA, kde boli kultivované 14 dní. Pomocou softwaru ImageJ boli zmerané dĺžky koreňov bezprostredne po preložení, prvý, druhý, tretí a siedmy deň po preložení. Iniciálna (po preložení rastlín) dĺžka koreňov divého typu bola mierne väčšia (o 22,70 % pre *spl1-1* a 19,47 % pre *spl1-2*) v porovnaní s mutantami, pričom rozdiely medzi oboma mutantami a divým typom neboli štatisticky preukazné (Obrázok 6 a 7). Po 7 dňoch kultivácie pri kontrolných podmienkach bola dĺžka primárneho koreňa mutantov o 8,59 %, resp. o 6,97 % kratšia v porovnaní s divým typom, pričom nebola pozorovaná štatistická preukaznosť rozdielov. Ovplyvnenie SA spôsobilo spomalenie rastu primárnych koreňov všetkých 3 línií (Obrázok 6 a 7), pričom sme pozorovali ich agravitropický rast. Rozdiely v agravitropickom raste medzi mutantami a divým typom neboli pozorované (Obrázok 6B). Dĺžka koreňov u divého typu na siedmy deň po pôsobení SA je o 19,61 %, resp. 18,62 % väčšia než u mutantov a tento rozdiel je signifikantný. Naše výsledky ukazujú, že odpovede mutantov v géne *SPL1* na SA sa nelíšili od odpovedí divého typu. Štandardné odchylky sú prezentované v Tabuľke 1.



Obrázok 6 Reprezentatívne fotografie prenesených rastlín *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* odfotených na 7. deň po preložení; **A**: rastliny prenesené na kontrolné  $\frac{1}{2}$  MS médium s prídavkom DMSO; **B**: rastliny prenesené na  $\frac{1}{2}$  MS médium s prídavkom DMSO a 30  $\mu$ M kyselinou salicylovou, Mierka 1 cm.



Obrázok 7 Graf dĺžky koreňov rastlín *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* po kontrolnom ošetrení aj po ošetrení kyselinou salicylovou zaznamenaných tesne po preložení, a v prvý, druhý, tretí, šiesty a siedmy deň po prenose.

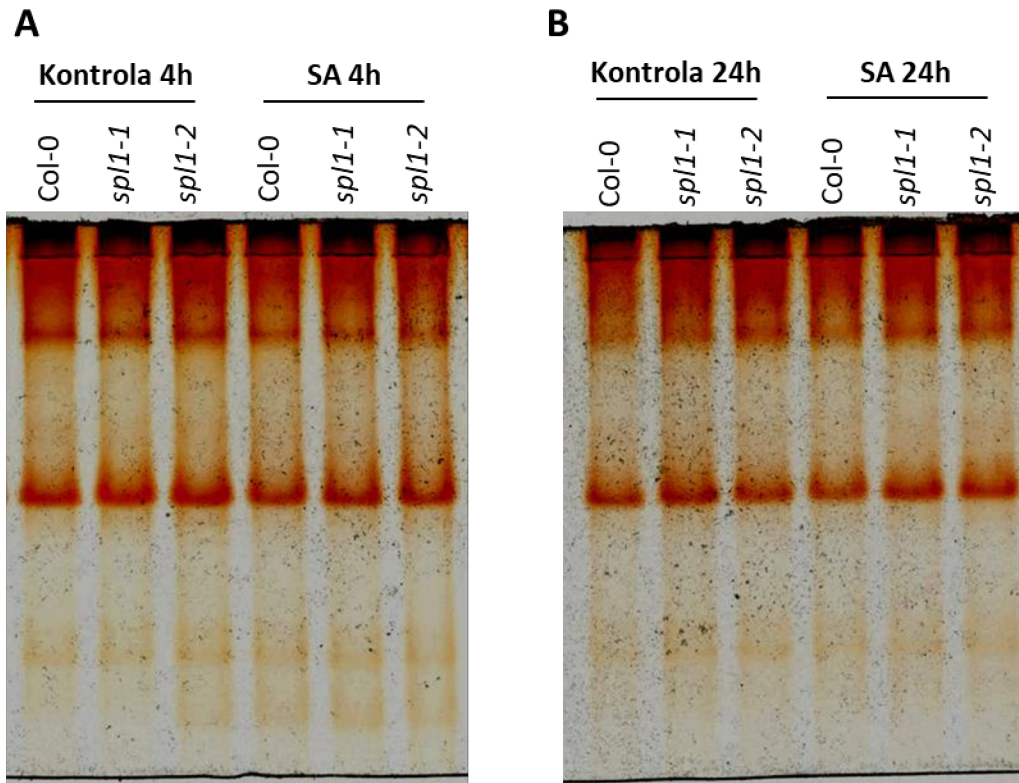
Tabuľka 1 Štandardné odchýlky pre dĺžky koreňov rastlín *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* z Obrázku 7. SA – kyselina salicylová.

		Deň 0	Deň 1	Deň 2	Deň 3	Deň 6	Deň 7
Col-0	Kontrola	12,28±1,39	18,46±1,99	26,65±3,73	38,70±2,13	69,30±10,68	81,39±10,02
	SA	11,53±1,66	13,34±1,70	14,94±2,02	17,46±1,86	18,88±2,66	19,60±2,24
<i>spl1-1</i>	Kontrola	9,49±1,19	15,71±2,43	22,60±4,41	35,00±1,60	63,18±12,97	74,40±13,52
	SA	8,57±1,69	10,61±1,64	12,23±1,82	14,55±1,91	15,57±2,57	15,76±2,43
<i>spl1-2</i>	Kontrola	9,89±1,33	15,08±1,94	22,56±4,06	34,88±0,58	63,69±11,96	75,71±12,17
	SA	9,53±1,16	11,43±1,12	12,90±1,72	15,33±0,77	15,75±2,86	15,95±2,72

### 4.3 Biochemická analýza mutantov *spl1-1* a *spl1-2* po ošetrení SA

#### 4.3.1 Biochemické stanovenie aktivity peroxidáz

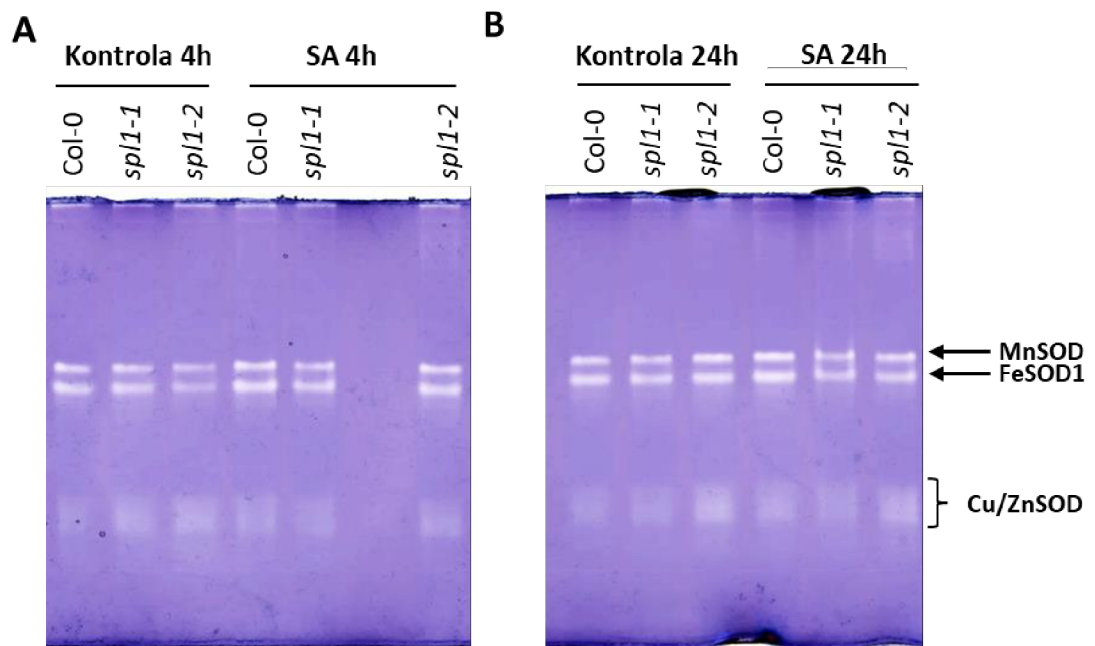
Na základe špecifického farbenia pre aktivitu peroxidáz môžeme povedať, že 4 a 24 hodinové vystavenie rastlín kyseline salicylovej nespôsobilo viditeľné zmeny v aktivite izozýmov peroxidáz v divom type a ani v *spl1* mutantoch (Obázok. 8).



Obrázok 8, Farbenie aktivity peroxidáz na natívnych polyakrylamidových géloch v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po ošetrení kyselinou salicylovou (SA). **A**: ošetrenie kontrolným roztokom a roztokom s prídavkom 0,5 mM kyseliny salicylovej po dobu štyroch hodín; **B**: ošetrenie kontrolným roztokom a roztokom s prídavkom 0,5 mM kyseliny salicylovej po dobu 24 hodín.

#### 4.3.2 Zmeny v aktivite izozýmov superoxididizmutáz po ovplyvnení SA

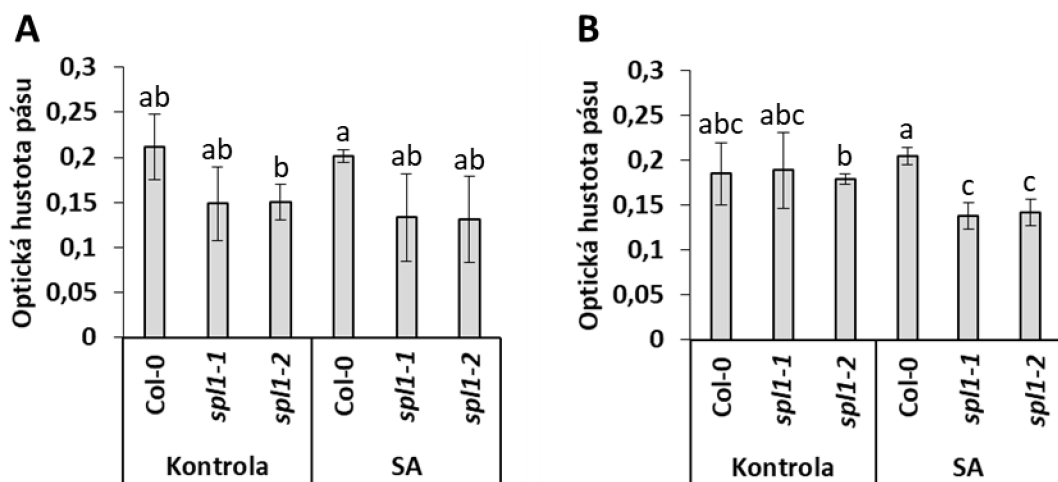
Po farbení špecifickej aktivity superoxididizmutáz sme na polyakrylamidovom géli rozpoznali 3 rôzne izoenzýmy superoxididizmutáz, a to Mn-superoxididizmutázu (MnSOD), Fe-superoxididizmutázu (FeSOD1), a jeden pás ktorý predstavuje aktivitu Cu/Zn-superoxididizmutáz (Cu/ZnSOD). Tieto izoformy sú jasne viditeľné ako biele pásy na fialovom pozadí gélu na Obrázku 9, ktorých optická denzita je kvantifikovaná na Obrázku 10, 11 a 12.



Obrázok 9 Farbenie aktivity superoxididizmutáz na natívnych polyakrylamidových géloch v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po ošetrení kyselinou salicylovou (SA) **A**: ošetrenie kontrolným roztokom a roztokom s 0,5 mM kyselinou salicylovou po dobu štyroch hodín; **B**: ošetrenie kontrolným roztokom a roztokom s 0,5 mM kyselinou salicylovou po dobu 24 hodín.

#### 4.3.2.1 MnSOD

Po štyroch hodinách v kontrolných podmienkach je možné u oboch mutantov pozorovať mierne nižšiu aktivitu MnSOD v porovnaní s divým typom. Tento rozdiel však nie je štatisticky signifikantný. Štyri hodiny trvajúce ovplyvnenie SA nemalo vplyv na aktivitu MnSOD ani u jednej z analyzovaných línií. U mutantov *sp11-1* a *sp11-2* sme po štyroch hodinách pôsobenia SA pozorovali mierne nižšiu aktivitu MnSOD oproti divému typu, avšak bez štatistickej preukazateľnosti (Tabuľka 2). Po 24 hodinách v kontrolných podmienkach sme pozorovali veľmi podobné hladiny MnSOD u divého typu a mutantov. Po 24 hodinách pôsobenia SA sme u divého typu v porovnaní s kontrolou nepozorovali žiadny rozdiel v aktivite MnSOD, avšak mutanty vykazujú nižšiu aktivitu MnSOD v porovnaní s kontrolou, toto zníženie však nie je signifikantné. Mutanty vykazujú signifikantne nižšiu aktivitu MnSOD v porovnaní s divým typom po 24 hodinovom ovplyvnení SA (Tabuľka 3).



Obrázok 10 Graf kvantifikácie optickej hustoty pásu MnSOD z Obrázku 9. **A**: optická hustota pásu po štyroch hodinách pôsobenia kontrolných podmienok a kyseliny salicylovej. **B**: optická hustota pásu po 24 hodinách pôsobenia kontrolných podmienok a kyseliny salicylovej. Chybové úsečky znázorňujú štandardnú odchylku. Rovnaké písmená nad jednotlivými stĺpcami predstavujú štatisticky nepreukazný rozdiel.

Tabuľka 2 Hodnoty P vypočítané pomocou jednocestného ANOVA testu pre vyhodnotenie štatistickej preukaznosti rozdielov v aktivite MnSOD v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po štyroch hodinách ošetrenia kyselinou salicylovou (SA; Obrázok 10). Rozdiel sa považuje za štatisticky významný (signifikantný), ak je hodnota  $P \leq 0,05$ .

MnSOD 4h	Col-0 Kontrola	<i>spl1-1</i> Kontrola	<i>spl1-2</i> Kontrola	Col-0 SA	<i>spl1-1</i> SA	<i>spl1-2</i> SA
Col-0 Kontrola		0,1185	0,0643	0,6532	0,0898	0,0828
<i>spl1-1</i> Kontrola	0,1185			0,0945	0,6985	0,6618
<i>spl1-2</i> Kontrola	0,0643			<b>0,0147</b>	0,6030	0,5609
Col-0 SA	0,6532	0,0945	<b>0,0147</b>		0,0750	0,0674
<i>spl1-1</i> SA	0,0898	0,6985	0,6030	0,0750		
<i>spl1-2</i> SA	0,0828	0,6618	0,5609	0,0674		

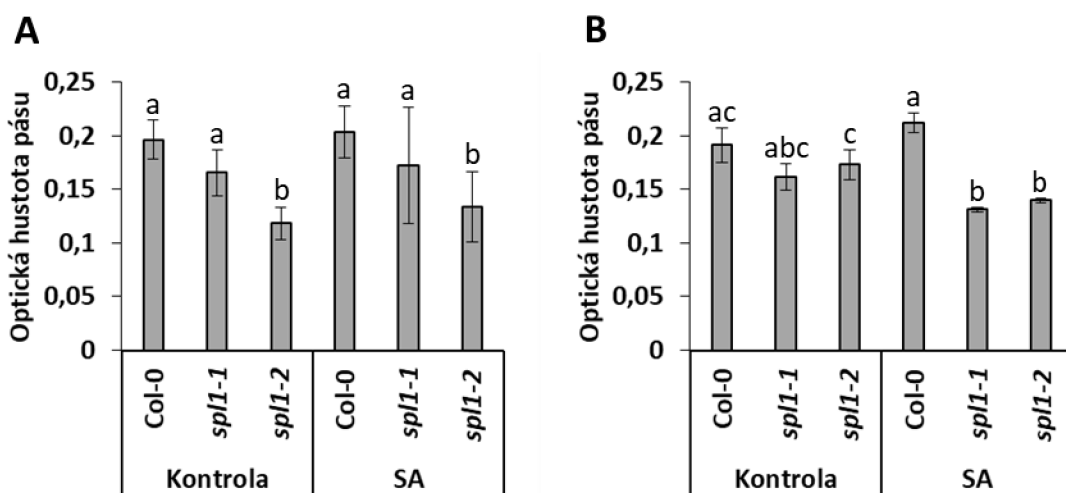
Tabuľka 3 Hodnoty P vypočítané pomocou jednocestného ANOVA testu pre vyhodnotenie štatistickej preukaznosti rozdielov v aktivite MnSOD v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po 24 h ošetrenia kyselinou salicylovou (SA; Obrázok 10). Rozdiel sa považuje za štatisticky významný (signifikantný), ak je hodnota  $P \leq 0,05$ .

MnSOD 24h	Col-0 Kontrola	<i>spl1-1</i> Kontrola	<i>spl1-2</i> Kontrola	Col-0 SA	<i>spl1-1</i> SA	<i>spl1-2</i> SA
Col-0 Kontrola		0,9140	0,7830	0,5091	0,0924	0,1182
<i>spl1-1</i> Kontrola	0,9140			0,6528	0,1190	0,1467
<i>spl1-2</i> Kontrola	0,7830			<b>0,0313</b>	<b>0,0103</b>	<b>0,0161</b>
Col-0 SA	0,5091	0,6528	<b>0,0313</b>		<b>0,0115</b>	<b>0,0146</b>
<i>spl1-1</i> SA	0,0924	0,1190	<b>0,0103</b>	<b>0,0115</b>		
<i>spl1-2</i> SA	0,1182	0,1467	<b>0,0161</b>	<b>0,0146</b>		

#### 4.3.2.2 FeSOD1

Aktivita FeSOD1 bola po štyroch hodinách mierne nižšia v mutantoch v porovnaní s Col-0 v rastlinách ovplyvnených tak SA, alebo kontrolným roztokom. Signifikantné rozdiely sme zistili medzi divým typom a *spl1-2* po kontrolnom ovplyvnení a tiež po ovplyvnení SA (Tabuľka 4). U všetkých línií nedošlo k výrazným rozdielom v aktivite FeSOD1 medzi ovplyvnením SA a kontrolou. Po 24 hodinách v kontrolných podmienkach nepozorujeme žiadny rozdiel v aktivite FeSOD1 medzi divým typom a mutantami. Po 24 hodinovom pôsobení SA vidieť u divého typu zvýšenie aktivity FeSOD1 v porovnaní s kontrolou, avšak toto zvýšenie nieje signifikantné. Mutanty, majú signifikantne zníženú aktivitu FeSOD1 v porovnaní s kontrolou (Tabuľka 5). A taktiež tieto mutanty majú signifikantne nižšiu aktivitu FeSOD1 v porovnaní s divým typom.





Obrázok 11 Graf kvantifikácie optickej hustoty pásu FeSOD z Obrázku 9. **A:** optická hustota pásu po štyroch hodinách pôsobenia kontrolných podmienok a kyseliny salicylovej. **B:** optická hustota pásu po 24 hodinách pôsobenia kontrolných podmienok a kyseliny salicylovej. Chybové úsečky znázorňujú štandardnú odchylku. Rovnaké písmená nad jednotlivými stĺpcami predstavujú štatisticky nepreukazný rozdiel.

Tabuľka 4 Hodnoty P vypočítané pomocou jednocestného ANOVA testu pre vyhodnotenie štatistickej preukaznosti rozdielov v aktivite FeSOD v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po štyroch hodinách ošetrenia kyselinou salicylovou (SA; Obrázok 10). Rozdiel sa považuje za štatisticky významný (signifikantný), ak je hodnota  $P \leq 0,05$ .

FeSOD 4h	Col-0 Kontrola	<i>spl1-1</i> Kontrola	<i>spl1-2</i> Kontrola	Col-0 SA	<i>spl1-1</i> SA	<i>spl1-2</i> SA
Col-0 Kontrola		0,1292	<b>0,0044</b>	0,6927	0,5113	<b>0,0440</b>
<i>spl1-1</i> Kontrola	0,1292			0,1093	0,8480	0,2318
<i>spl1-2</i> Kontrola	<b>0,0044</b>			<b>0,0064</b>	0,1724	0,5022
Col-0 SA	0,6927	0,1093	<b>0,0064</b>		0,4156	<b>0,0406</b>
<i>spl1-1</i> SA	0,5113	0,8480	0,1724	0,4156		
<i>spl1-2</i> SA	<b>0,0440</b>	0,2318	0,5022	<b>0,0406</b>		

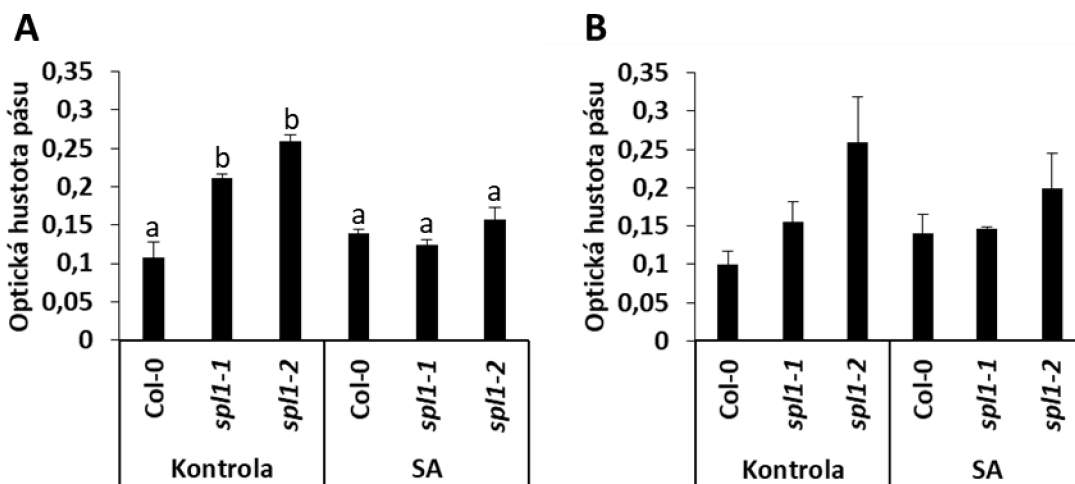
Tabuľka 5 Hodnoty P vypočítané pomocou jednocestného ANOVA testu pre vyhodnotenie štatistickej preukaznosti rozdielov v aktivite FeSOD v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po 24h ošetrenia kyselinou salicylovou (SA; Obrázok 10). Rozdiel sa považuje za štatisticky významný (signifikantný), ak je hodnota  $P \leq 0,05$ .

FeSOD 24h	Col-0 Kontrola	<i>spl1-1</i> Kontrola	<i>spl1-2</i> Kontrola	Col-0 SA	<i>spl1-1</i> SA	<i>spl1-2</i> SA
Col-0 Kontrola		0,5724	0,2157	0,2034	<b>0,0088</b>	<b>0,0053</b>
<i>spl1-1</i> Kontrola	0,5724			0,3055	<b>0,0479</b>	0,1699
<i>spl1-2</i> Kontrola	0,2157			<b>0,0420</b>	<b>0,0254</b>	<b>0,0146</b>
Col-0 SA	0,2034	0,3055	<b>0,0420</b>		<b>0,0043</b>	<b>0,0007</b>
<i>spl1-1</i> SA	<b>0,0088</b>	<b>0,0479</b>	<b>0,0254</b>	<b>0,0043</b>		
<i>spl1-2</i> SA	<b>0,0053</b>	0,1699	<b>0,0146</b>	<b>0,0007</b>		

#### 4.3.2.3 Cu/ZnSOD

Aktivita Cu/ZnSOD bola po štyroch hodinách v kontrolných podmienkach u mutantov signifikantne vyššia v porovnaní s divým typom. U divého typu po štyroch hodinách vplyvu SA bola aktivita Cu/ZnSOD mierne vyššia v porovnaní s kontrolou, avšak nie signifikantne. U obidvoch mutantov sme pozorovali nižšiu aktivitu Cu/ZnSOD po štvorhodinovom pôsobení SA v porovnaní s kontrolou, toto zníženie bolo u obidvoch mutantov štatisticky preukazné (Tabuľka 6). Aktivity Cu/ZnSOD boli po štyroch hodinách pôsobenia SA medzi líniami podobné. Po 24 hodinovom ošetrení v kontrolných podmienkach bola u mutantov pozorovaná vyššia aktivita Cu/ZnSOD. *spl1-1* a *spl1-2* v porovnaní s divým typom, pričom boli rozdiely signifikantné tak, ako tomu bolo pri štyroch hodinách. Po 24 hodinovom pôsobení SA došlo u divého typu k miernemu zvýšeniu aktivity Cu/ZnSOD v porovnaní s kontrolnými podmienkami, avšak toto zvýšenie nebolo signifikantné. U mutantu *spl1-1* po 24 hodinovo pôsobení SA nedošlo k výrazným zmenám v porovnaní s kontrolou, ale u mutantu *spl1-2* došlo ku miernemu zníženiu aktivity, ale toto zníženie nebolo signifikantné.

Naš výsledky teda ukázali, že ovplyvnenie rastlín SA má pozitívny účinok na aktivitu CuZn/SOD, pričom sa aktivita FeSOD1 a MnSOD nemení. Absencia expresie *SPL1* znižuje aktivitu všetkých izozýmov v odpovedi na SA.



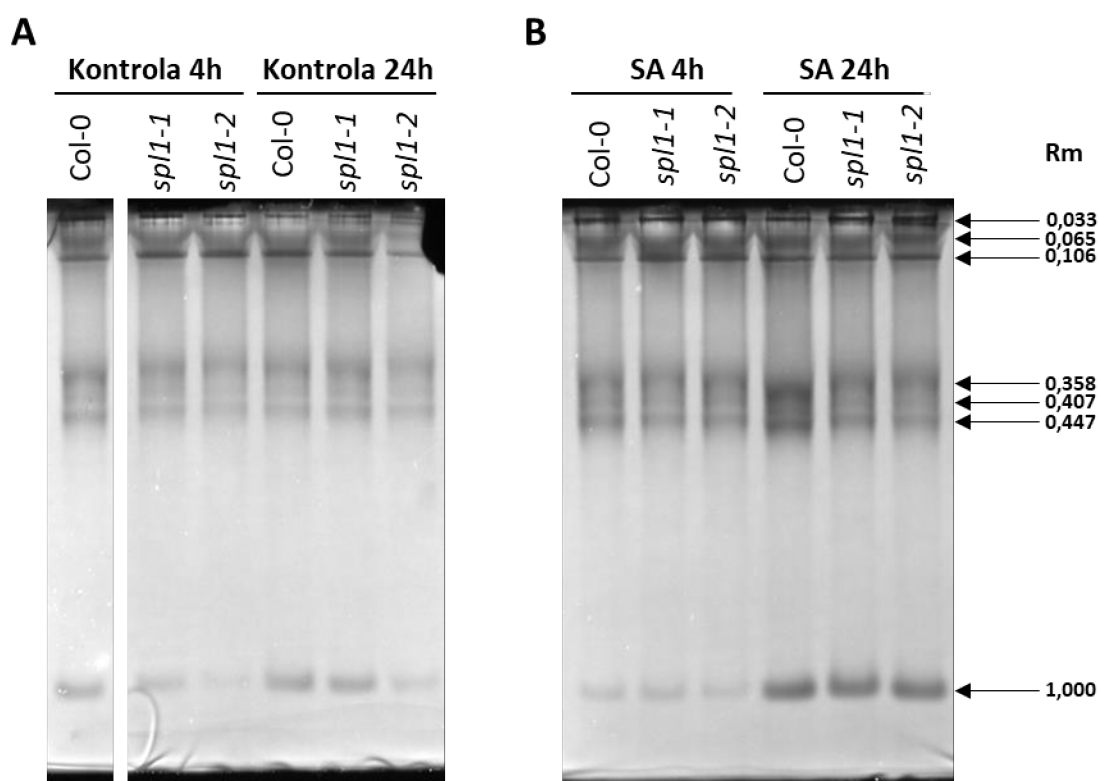
Obrázok 12 Graf kvantifikácie optickej hustoty pásu Cu/ZnSOD z Obrázku 9. **A**: optická hustota pásu po štyroch hodinách pôsobenia kontrolných podmienok a kyseliny salicylovej. **B**: optická hustota pásu po 24 hodinách pôsobenia kontrolných podmienok a kyseliny salicylovej. Chybové úsečky znázorňujú štandardnú odchylku. Rovnaké písmená nad jednotlivými stĺpcami predstavujú štatisticky nepreukazný rozdiel.

Tabuľka 6 Hodnoty P vypočítané pomocou jednocestného ANOVA testu pre vyhodnotenie štatistickej preukaznosti rozdielov v aktivite Cu/ZnSOD v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po štyroch hodinách ošetrenia kyselinou salicylovou (SA; Obrázok 10). Rozdiel sa považuje za štatisticky významný (signifikantný), ak je hodnota  $P \leq 0,05$ .

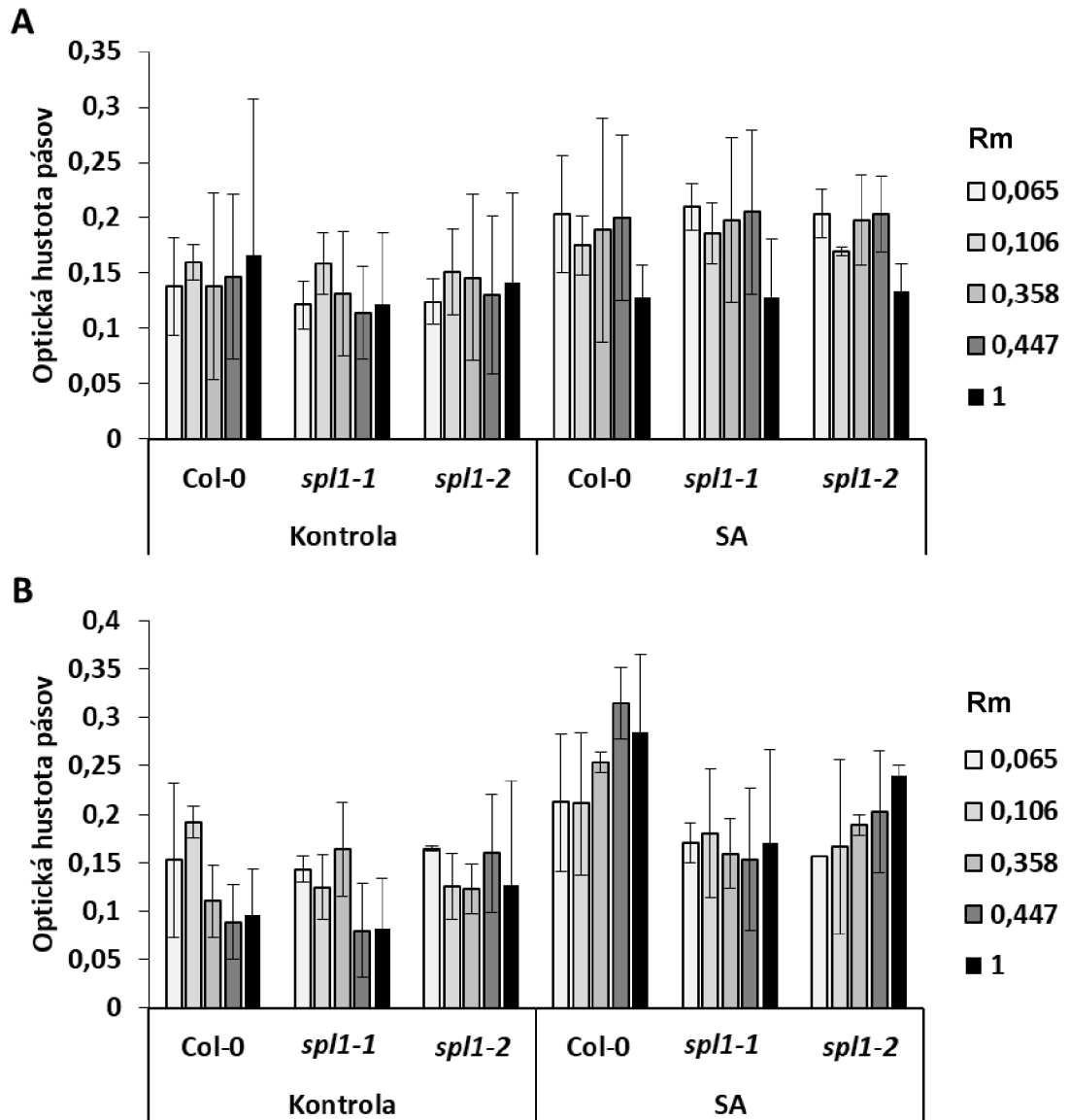
Cu/ZnSOD 4h	Col-0 Kontrola	<i>spl1-1</i> Kontrola	<i>spl1-2</i> Kontrola	Col-0 SA	<i>spl1-1</i> SA	<i>spl1-2</i> SA
Col-0 Kontrola		<b>0,0205</b>	<b>0,0107</b>	0,1673	0,3903	0,1140
<i>spl1-1</i> Kontrola	<b>0,0205</b>			<b>0,0040</b>	<b>0,0044</b>	<b>0,0400</b>
<i>spl1-2</i> Kontrola	<b>0,0107</b>			<b>0,0029</b>	<b>0,0030</b>	<b>0,0139</b>
Col-0 SA	0,1673	<b>0,0040</b>	<b>0,0029</b>			
<i>spl1-1</i> SA	0,3903	<b>0,0044</b>	<b>0,0030</b>			
<i>spl1-2</i> SA	0,1140	<b>0,0400</b>	<b>0,0139</b>			

### 4.3.3 Zmeny v aktivite izozýmov chitináz po ovplyvnení SA

Celkovo bolo na géli separovaných sedem rozoznatel'nych pásov v každej dráhe (Obrázok 13), avšak optická denzita pásov s  $R_m$  (relatívna mobilita,  $R_m$ ) 0,033 a  $R_m$  0,407 nebola z technických dôvodov merateľná. Kvantifikácia bola zaznamenaná do grafu na Obrázku 14.



Obrázok 13 Farbenie aktivity chitináz na natívnych polyakrylamidových géloch v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po ošetroení kyselinou salicylovou (SA) **A**: ošetroenie kontrolným roztokom po dobu štyroch hodín; **B**: ošetroenie a roztokom s 0,5 mM kyselinou salicylovou po dobu 24 hodín. Jednotlivým pásom bola vypočítaná hodnota relatívnej mobility ( $R_m$ ) na základe vydelenia prejdenej vzdialenosti daného izoenzýmu a vzdialenosti izoenzýmu, ktorý po separácii prešiel najväčšiu vzdialenosť.



Obrázok 14 Graf kvantifikácie optickej hustoty pásov s hodnotou relatívnej mobility 0,065; 0,106; 0,358; 0,447 a 1 z Obrázku 9. **A:** optická hustota pásov po štyroch hodinách pôsobenia kontrolných podmienok a kyseliny salicylovej. **B:** optická hustota pásov po 24 hodinách pôsobenia kontrolných podmienok a kyseliny salicylovej (SA). Chybové úsečky znázorňujú štandardnú odchylku. Relatívna mobilita (Rm) bola vypočítaná na základe vydelenia prejdenej vzdialenosti daného izoenzýmu a vzdialenosti izoenzýmu, ktorý po separácii prešiel najväčšiu vzdialenosť.

Optická denzita pásu s Rm 0,033 nebola merateľná z dôvodu vysokého pozadia, a tento pás bolo možno zhodnotiť len vizuálne. Intenzita pásu s Rm 0,33 sa po štvor hodinovom pôsobení SA zvýšila oproti kontrolnému ovplyvneniu vo všetkých 3 líniách, pričom aktivita bola v mutantoch nižšia v porovnaní s divým typom pri oboch ovplyvneniach. Aktivita tohoto izozýmu po 24 hodinovom kontrolnom ovplyvnení klesla u všetkých línií, pričom nepozorujeme rozdiely medzi divým typom a mutantami. Po 24 hodinovom ovplyvnení SA dochádza ku zvýšeniu aktivity, pričom zvýšenie sa javí viac intenzívne u mutantov v porovnaní s divým typom (Obrázok 13).

Aktivita izozýmu s Rm 0,065 je po štyroch hodinách v kontrolných podmienkach podobná u všetkých línií. Divý typ po štvorhodinovom ovplyvnení SA vykazuje mierne zvýšenú aktivitu tohto izoenzýmu v porovnaní s kontrolnými podmienkami, však toto zvýšenie nie je signifikantné. Mutanty prejavujú podobnú mieru zvýšenia aktivity po ošetrení SA v porovnaní s kontrolnými podmienkami ako divý typ, a toto zvýšenie je štatisticky preukazné (Tabuľka 7). Po 24 hodinách v kontrolných podmienkach bola hladina aktivity izoenzýmu s hodnotou Rm 0,065 pri divom type a mutantoch podobná. Po 24 hodinách pôsobenia SA sa u divého typu v porovnaní s kontrolou aktivita zvýšila, avšak tento rozdiel nebol signifikantný. U mutantov sa aktivita po 24 hodinovom ošetrení SA v porovnaní s kontrolou nemenila, a rozdiely medzi mutantami a divým typom neboli štatisticky preukazné.

Tabuľka 7 Hodnoty P vypočítané pomocou jednocestného ANOVA testu pre vyhodnotenie štatistickej preukaznosti rozdielov v aktivite izozýmu Rm 0,065 v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po štyroch hodinách ošetrenia kyselinou salicylovou (SA; Obrázok 10). Rozdiel sa považuje za štatisticky významný (signifikantný), ak je hodnota  $P \leq 0,05$ . Relatívna mobilita (Rm).

Rm 0,065 4h	Col-0 Kontrola	<i>spl1-1</i> Kontrola	<i>spl1-2</i> Kontrola	Col-0 SA	<i>spl1-1</i> SA	<i>spl1-2</i> SA
Col-0 Kontrola				0,1728	0,0624	0,0795
<i>spl1-1</i> Kontrola				0,0676	<b>0,0073</b>	<b>0,0096</b>
<i>spl1-2</i> Kontrola				0,0728	<b>0,0073</b>	<b>0,0097</b>
Col-0 SA	0,1728	0,0676	0,0728			
<i>spl1-1</i> SA	0,0624	<b>0,0073</b>	<b>0,0073</b>			
<i>spl1-2</i> SA	0,0795	<b>0,0096</b>	<b>0,0097</b>			

Podobne ako u izozýmu Rm 0,065, tak aj aktivita izozýmu s Rm 0,106 prejavovala po štyroch hodinách v kontrolných podmienkach u divého typu a mutantov podobné hladiny. Rovnaká situácia nastala medzi divým typom a mutantami po štvorhodinovom ošetroaní SA, pričom je možné pozorovať mierny nárast aktivity tohto izoenzýmu po ovplyvnení SA v porovnaní s kontrolou, avšak tento nárast nie je štatisticky preukazný. Po 24 hodinách sa aktivita izozýmu zvýšila u všetkých línií po obidvoch ovplyvneniach rovnakou mierou. Aktivita však bola u mutantov nižšia. Žiaden z rozdielov nie je štatisticky významný.

Aktivita izozýmu s Rm 0,358 sa nelíšila medzi líniami ani po štvorhodinovom kontrolnom ovplyvnení a ani po ovplyvnení SA. Izozým vykazoval mierne zvýšenú aktivitu po ošetroaní SA v porovnaní s kontrolou, toto mierne zvýšenie však nebolo signifikantné. Po 24 hodinách došlo k markantnému a signifikantnému zvýšeniu aktivity tohoto izozýmu po ovplyvnení SA v divom type (Tabuľka 8), pričom v mutantoch sme zaznamenali nezmenenú aktivitu (*spl1-1*), alebo zvýšenú aktivitu (*spl1-2*), pričom toto zvýšenie nedosiahlo intenzity divého typu. Mutanty po 24 hodinovom ošetroaní SA vykazujú zníženú aktivitu tohto izoenzýmu v porovnaní s divým typom. Toto zníženie je u obidvoch mutantoch štatisticky preukazné.

Tabuľka 8 Hodnoty P vypočítané pomocou jednocestného ANOVA testu pre vyhodnotenie štatistickej preukaznosti rozdielov v aktivite izozýmu Rm 0,358 v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po 24 hodinách ošetrovania kyselinou salicylovou (SA; Obrázok 10). Rozdiel sa považuje za štatisticky významný (signifikantný), ak je hodnota  $P \leq 0,05$ . Relatívna mobilita (Rm).

Rm 0,358 24h	Col-0 Kontrola	<i>spl1-1</i> Kontrola	<i>spl1-2</i> Kontrola	Col-0 SA	<i>spl1-1</i> SA	<i>spl1-2</i> SA
Col-0 Kontrola		0,3455	0,7208	<b>0,0351</b>	0,3127	0,1032
<i>spl1-1</i> Kontrola	0,3455			0,1252	0,9360	0,5412
<i>spl1-2</i> Kontrola	0,7208			<b>0,0216</b>	0,3662	0,0767
Col-0 SA	<b>0,0351</b>	0,1252	<b>0,0216</b>		0,0722	<b>0,0263</b>
<i>spl1-1</i> SA	0,3127	0,9360	0,3662	0,0722		
<i>spl1-2</i> SA	0,1032	0,5412	0,0767	<b>0,0263</b>		

Pás s Rm 0,407 v dôsledku vysokej hodnoty pozadia nebolo možné kvantifikovať. Po štyroch hodinách v kontrolných podmienkach je možné pozorovať u divého mierne vyššie aktivity v porovnaní z mutantami. SA spôsobila mierne zvýšenie aktivity tohoto izozýmu v divom type v porovnaní s kontrolou. Mutanty po štvorhodinovom vystavení SA vykazujú slabo zvýšenú aktivitu v porovnaní s kontrolou. Po 24 hodinovom pôsobení SA pozorujeme u divého typu výrazné zvýšenie aktivity tohto izoenzýmu v porovnaní s kontrolnými podmienkami. U mutantov je taktiež možné pozorovať mierne zvýšenú aktivitu v porovnaní s kontrolou i keď zvýšenie nebolo tak intenzívne ako u divého typu (Obrázok 13).

Aktivita izozýmu s Rm 0,447 sa mierne zvýšila po 4 hodinách ovplyvnenia SA, pričom neboli zaznamenané štatisticky významné rozdiely medzi líniami. Zvýšenie je preukázateľné len v prípade porovnania mutantu *spl1-1* v kontrolných podmienkach a mutantu *spl1-2* po štvor hodinovom ovplyvnení SA (Tabuľka 9). SA spôsobila markantné, štatisticky preukazné zvýšenie aktivity tohoto izoenzýmu po 24 hodinách u divého typu (Tabuľka 10). Aktivita bola zvýšená aj u mutantu *spl1-1*, avšak menej výrazne a nepreukazne. Mutant *spl1-2* neprejavoval žiadne zmeny v aktivite tohoto izozýmu po 24 hodinovom ovplyvnení SA. V kontrolných podmienkach mutant *spl1-2* má mierne zvýšenú aktivitu izoenzýmu s hodnotou Rm 0,447 v porovnaní s divým typom a mutantom *spl1-1*. Toto zvýšenie však nie je štatistický významné.

Tabuľka 9 Hodnoty P vypočítané pomocou jednocestného ANOVA testu pre vyhodnotenie štatistickej preukaznosti rozdielov v aktivite izozýmu Rm 0,447 v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po štyroch hodinách ošetrenia kyselinou salicylovou (SA; Obrázok 10). Rozdiel sa považuje za štatisticky významný (signifikantný), ak je hodnota  $P \leq 0,05$ . Relatívna mobilita (Rm).

Rm 0,447 4h	Col-0 Kontrola	<i>spl1-1</i> Kontrola	<i>spl1-2</i> Kontrola	Col-0 SA	<i>spl1-1</i> SA	<i>spl1-2</i> SA
Col-0 Kontrola				0,4315	0,3898	0,2954
<i>spl1-1</i> Kontrola				0,1579	0,1372	<b>0,0456</b>
<i>spl1-2</i> Kontrola				0,3090	0,2769	0,1851
Col-0 SA	0,4315	0,1579	0,3090			
<i>spl1-1</i> SA	0,3898	0,1372	0,2769			
<i>spl1-2</i> SA	0,2954	<b>0,0456</b>	0,1851			



Tabuľka 10 Hodnoty P vypočítané pomocou jednocestného ANOVA testu pre vyhodnotenie štatistickej preukaznosti rozdielov v aktivite izozýmu Rm 0,447 v rastlinách *Arabidopsis thaliana* divého typu Col-0 a mutantov *spl1-1* a *spl1-2* v kontrolných podmienkach a po 24 hodinách ošetrenia kyselinou salicylovou (SA; Obrázok 10). Rozdiel sa považuje za štatisticky významný (signifikantný), ak je hodnota  $P \leq 0,05$ . Relatívna mobilita (Rm).

<b>Rm 0,447 24h</b>	Col-0 Kontrola	<i>spl1-1</i> Kontrola	<i>spl1-2</i> Kontrola	Col-0 SA	<i>spl1-1</i> SA	<i>spl1-2</i> SA
Col-0 Kontrola		0,8620	0,2995	<b>0,0267</b>	0,3846	0,1603
<i>spl1-1</i> Kontrola	0,8620			<b>0,0325</b>	0,3607	0,1616
<i>spl1-2</i> Kontrola	0,2995			0,0916	0,9343	0,5598
Col-0 SA	<b>0,0267</b>	<b>0,0325</b>	0,0916		0,1085	0,1613
<i>spl1-1</i> SA	0,3846	0,3607	0,9343	0,1085		
<i>spl1-2</i> SA	0,1603	0,1616	0,5598	0,1613		

Izoenzým s Rm 1 nevykazuje takmer žiadne zmeny v aktivite u divého typu a ani u mutantov a to aj v kontrolných podmienkach aj v podmienkach po štvorhodinovom ošetrení SA. Jeho aktivita sa však zvýšila u všetkých línií po 24 hodinách pôsobenia SA, avšak zvýšenie bolo intenzívnejšie u divého typu v porovnaní s mutantami. Všetky zmeny aktivít pri tomto izoenzyme neboli štatisticky významné.

Naše výsledky teda ukazujú, že ošetrenie SA zvyšuje aktivitu všetkých nami prezentovaných izozýmoch chitináz, pričom absencia expresie *SPLI* ich aktivitu zvyšuje len miernejšie pri pôsobení SA.

## 5. Diskusia

Je známe, že SPL sú dôležité transkripčné faktory, ktoré regulujú rôzne procesy ako napríklad kvitnutie (Wang et al., 2009), biosyntézu antokyánov (Gou et al., 2011), odpoveď na abiotické stresy (Cui et al., 2014) alebo rast trichómov (Yu et al., 2010). Jedna z nedávnych štúdií zistila že expresia *SPL5*, *SPL7*, *SPL8*, *SPL13* a *SPL14* sa zvyšuje po ošetrovaní SA (Shah et al., 2022). Zvýšená úroveň expresie *SPL9* v juvenilných rastlinách, ktorá je spôsobená potlačením miR156, vedie k zvýšenej tvorbe ROS a vyvoláva signalizáciu SA. Toto vedie k zvýšenej odolnosti rastlín *Arabidopsis* proti bakteriálnemu patogénu *Pseudomonas syringae* (Yin et al., 2019). Tieto štúdie naznačujú že transkripčné faktory SPL môžu byť indukované SA a to pravdepodobne prostredníctvom miR156.

Bolo zistené, že OsSPL7/14/17 sa priamo viažu na promótor NPR1, a aktivujú jeho transkripciu a tým sa spúšťa signalizácia SA (Hui et al., 2023). Keďže všetky SPL transkripčné faktory obsahujú špecifickú SBP doménu, ktorou sa viažu na GTAC motív (Chen et al., 2010) je možno predpokladať že aj SPL1 môže regulovať transkripciu NPR1, keďže tento motív obsahuje.

Naše výsledky naznačujú že po ovplyvnení SA sa po 4 a ani po 24 hodinách aktivita peroxidáz nezmenila. Literárne zdroje uvádzajú nejednoznačné výsledky o vplyve SA na aktivitu peroxidáz. Inkubácia semien fazule v roztoku SA aktivitu peroxidáz v koreňoch znížila, jej prídanie do hydroponického roztoku aktivitu peroxidáz nezmenila (Gondor et al., 2016; Hiraga et al., 2000). Ukázalo sa, že rezpozivita peroxidáz na SA je závislá na ich identite. Kým cytoplazmatické peroxidázy analyzované s využitím guaiakolu len málo menili svoju aktivitu v odpovedi na SA, aktivita sekretorických peroxidáz bola silno indukovaná (Mika et al., 2010). Naše výsledky ukazujú podobné výsledky.

Proteín *lesion simulating disease 1* (LSD1) je nevyhnutný pre akumuláciu proteínov Cu/ZnSOD1 a Cu/ZnSOD2 v odpovedi na 2,6-dichloroisonicotínovú kyselinu, analóg SA (Kliebenstein et al., 1999). Podľa štúdie Nazari et al. (2022) aplikácia SA v koncentrácii 0,1 mM a 1 mM v rastline *Vitis vinifera* L. (vinič) zvýšila celkovú aktivitu SOD v listoch, epiderme aj v dužine, čo môže byť spôsobené zvýšenou indukciou ROS po aplikácii SA (Khokon et al., 2010). V našom experimente sme pozorovali u divého typu mierne, nepreukazné zvýšenie aktivity CuZn SOD, pričom aktivity MnSOD a FeSOD1 neboli zmenené. Preukazný pokles aktivity FeSOD1 pri aplikácii SA sme

pozorovali u mutantov *spl1*, pričom mutanty okrem tohoto izozýmu vykazovali tiež preukazne nižšie hladiny aktivít MnSOD. Toto naznačuje, že transkripčný faktor SPL1 môže byť dôležitý pre reguláciu FeSOD1 a MnSOD v signalizácii SA. SPL1 bol pomocou bioinformatickej analýzy predikovaný ako možný transkripčný faktor, ktorý priamo reguluje FeSOD1 cez možnú fosforyláciu pomocou MAPK (Dvořák et al., 2021b). Analýza aktivít v mutantoch *spl1* bez ovplyvnenia neukázala rozdiely v porovnaní s divým typom (Zeiner et al., 2021). Naše výsledky naznačujú, že táto regulácia môže byť kondicionálna, závislá na SA. Avšak nemôžeme vylúčiť tiež nepriamu reguláciu cez horeuvedené prepojenie na NPR1 alebo LSD1, nakoľko je zároveň zmenená aj aktivita MnSOD. Expresia SPL1, v kontraste so známym regulátorom SOD SPL7, nie je regulovaná hladinami medi v médiu (Schulten et al., 2019), čo by predstavovalo nový mechanizmus regulácie FeSOD1. Priamu reguláciu FeSOD1 pomocou SPL1 je nutné dokázať nezávislými metódami ako napríklad Chip sekvenovanie. Pri tejto metóde sa transkripčné faktory viažu na fragmentovanú DNA. Pre izoláciu transkripčného faktora a fragmentov DNA, ktoré viaže, sa používa špecifická protilátka pre požadovaný transkripčný faktor. Potom sa vykonáva analýza signálov, ktoré sú spojené s prítomnosťou transkripčného faktora na daných miestach v DNA, aby sa určilo, ktoré miesta sú potenciálne priamo regulované transkripčnými faktormi (Zhang et al., 2008).

SA indukuje prostredníctvom NPR1 expresiu PR proteínov (Seo et al., 2020), vrátane chitináz (Mahesh et al., 2017; Zhang et al., 2016). Podobne aj naše výsledky ukazujú preukazné zvýšenie aktivity niektorých izoformiem u divého typu predovšetkým po 24 hodinách ovplyvnenia. Chýbajúca expresia SPL1 zabránila zvýšeniu aktivity niektorých izoformiem, čo môže naznačovať zapojenie SPL1 do regulácie chitináz v odpovedi na SA. Chitinázy majú okrem úlohy v obrane proti patogénom dôležité funkcie v abiotickom strese, ako napríklad odpoveď rastlín na soľný stres a stres z ťažkých kovov (Dana et al., 2006) alebo chlad (Nakamura et al., 2008). Preto nie je možné jednoznačne povedať, či sa SPL1 zúčastňuje na odpovediach rastlín na abiotické alebo biotické stresy. Predchádzajúce výsledky indikujú, že inokulácia *Agrobacterium tumefaciens* nesúceho konštruktu *pro35S::SPL1:GFP* do listov tabaku spôsobila markantné nekrózy v okolí miesta inokulácie (Zeiner et al., 2021). Táto odpoveď môže súvisieť s obrannými funkciami SPL1 voči patogénom.

SPL1 bola lokalizovaná v plasmodezmách na základe tranzientnej transformácie listov *N. benthamiana* (Zeiner et al., 2021). Proteíny, ktoré sú lokalizované

v plazmodezmách sa ukázali ako dôležité pre SAR (Lim et al., 2016a), ktorá je úzko spojená s akumuláciou SA (Shine et al., 2019). Avšak k SAR prispievajú aj iné látky ako je SA a to napríklad kyselina azelaová alebo glycerol-3-fosfát (Lim et al., 2016a). Štúdie ukázali, že infekcia patogénom vedie k zvýšeniu hladín SA v apoplastickom priestore a to aj v prípade rastlín, ktoré vykazujú defekt so symplastickým transportom (Lim et al., 2016b). SA je transportovaná s oblasti rastliny infikovanej patogénom do neinfikovanej oblasti prostredníctvom apoplastického transportu (Kachroo et al., 2020) ale aj prostredníctvom symplastického transportu (Lim et al., 2016b). Tým, že SPL1 je lokalizovaná v plasmodezmách, je možné že by mohla ovplyvňovať ich priepustnosť a tým sa zapojiť do obranných procesov. Tým pádom by SPL1 mohla byť schopná regulovať symplastický transport SA a tým byť zapojená do jej signalizácie. Každopádne úlohy SPL1 v obranných procesoch proti biotickému a abiotickému stresu bude treba detailnejšie preštudovať.

## 6. Záver

Zistili sme, že SPL1 môže byť transkripčný faktor dôležitý pre klíčenie semien. Výsledky fenotypovej analýzy dĺžky koreňa ukázali, že transkripčný faktor SPL1 nie je dôležitý pre reguláciu rastu a gravitropizmu primárneho koreňa *Arabidopsis* počas odpovedi na SA. Výsledky biochemickej analýzy ukázali, že SPL1 pravdepodobne ovplyvňuje aktivitu superoxiddizmutáz po aplikácii SA. SPL1 by preto mohol regulovať schopnosť rastlín odbúravať superoxidové radikály v odpovedi na SA. Z výsledkov tiež vyplýva, SPL1 by mohol regulovať chitinázy indukované prostredníctvom SA. SPL1 je pravdepodobne dôležitý pre obranu rastlín voči patogénom.

Funkcie SPL1 neboli doteraz v literatúre podrobne študované. Naša bakalárska práca prináša nové funkcie tohoto transkripčného faktoru v odpovedi rastlín na stres. Úplne pochopenie funkcií SPL1 si vyžaduje ďalší výskum.

## 7. Literatura

- Adamowski, M. & Friml, J. (2015). PIN-Dependent auxin transport: action, regulation, and evolution, *The Plant Cell* 27 (1), 20–32. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134874>
- Alavi, S. M. N., Arvin, M. J., Kalantari, K. M. (2014). Salicylic acid and nitric oxide alleviate osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Journal of Plant Interactions* 9 (1), 683–688. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.900120>
- Alonso-Ramírez, A., Rodríguez, D., Reyes, D., Jiménez, J. A., Nicolás, G., López-Climent, M., Gómez-Cadenas, A., Nicolás, C. (2009). Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in arabidopsis seeds. *Plant Physiology* 150 (3), 1335–1344. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139352>
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53 (372), 1331–1341. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331>
- Averesch, N. J. H. & Krömer, J.O. (2018). Metabolic engineering of the shikimate pathway for production of aromatics and derived compounds—Present and future strain construction strategies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6, 32. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00032>
- Azooz, M. M. (2009). Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. *International Journal of Agriculture & Biology* 11 (4), 343–350.
- Bernal, M., Casero, D., Singh, V., Wilson G. T., Grande A., Yang, H., Dodani, S. C., Pellegrini, M., Huijser, P., Connolly E. L., et al. (2012). Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes *FRO4/FRO5* and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24 (2), 738–761. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.090431>
- Birkenbihl, R. P., 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 (3), 585–596. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.013>
- Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M. A. (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 126 (3), 1024–1030. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1024>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., Lin, J. F., Wu, S. H., Swidzinski, J., Ishizaki, K. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 42 (4), 567–585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02399.x>
- Cao, Y., Zhang, Z. W., Xue, L. W., Du, J. B., Shang, J., Xu, F., Yuan, S., Lin, H. H. (2009). Lack of salicylic acid in *Arabidopsis* protects plants against moderate salt stress. *Zeitschrift für Naturforschung C* 64, 231–238. <https://doi.org/10.1515/znc-2009-3-414>
- Cardon, G. H., Höhmann, S., Klein, J., Nettlesheim, K., Saedler, H., Huijser, P. (1999). Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* 237 (1), 91–104. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00308-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00308-X)

- Cardon, G. H., Höhmann, S., Nettlesheim, K., Saedler, H., Huijser, P. (1997). Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition. *The Plant Journal* 12 (2), 367–377. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.12020367.x>
- Chao, L. M., Liu, Y. Q., Chen, D. Y., Xue, X. Y., Mao, Y. B., Chen, X. Y. (2017). Arabidopsis transcriptional factors SPL1 and SPL2 confer plant thermotolerance at reproductive stage. *Molecular Plant* 10 (5), 735–748. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.03.010>
- Chen, J., Zhu, C., Li, L. P., Sun, Z. Y., Pan, X. B. (2007). Effects of exogenous salicylic acid on growth and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. *Journal of Environmental Sciences* 19 (1), 44–49. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60007-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60007-2)
- Chen, L., Wang, W. S., Wang, T., Meng, X. F., Chen, T. T., Huang, X. X., Li, Y. J., Hou, B. K. (2019). Methyl salicylate glucosylation regulates plant defense signaling and systemic acquired resistance. *Plant Physiology* 180 (4), 2167–2181. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00091>
- Chen, X., Zhang, Z., Liu, D., Zhang, K., Li, A., Mao, L. (2010). *SQUAMOSA* Promoter-binding protein-like transcription factors: Star player for plant growth and development. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (11), 946–951. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00987.x>
- Cletus, J., Balasubramaniam, V., Vashisht, D., Saktivel, N. (2013). Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance. *Biotechnology Letters* 35, 1719–1732. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1269-4>
- Cohu, C. M., Abdel-Ghany, S. E., Gogolin Reynolds, K. A., Onofrio, A. M., Bodecker, J. R., Kimbrel, J. A., Niyogi, K. K., Pilon, M. (2009). Copper delivery by the copper chaperone for chloroplast and cytosolic copper/zinc-superoxide dismutases: Regulation and Unexpected Phenotypes in an *Arabidopsis* Mutant. *Molecular Plant* 2 (6), 1336–1350. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp084>
- Cui, L. G., Shan, J. X., Shi, M., Gao, J. P., Lin, H. X. (2014). The *miR156-SPL9-DFR* pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *The Plant Journal* 80 (6), 1108–1117. <https://doi.org/10.1111/tpj.12712>
- Dana, M. M., Pintor-Toro, J. A., Cubero, B., (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology* 142 (2), 722–730. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086140>
- Dean, J. V., Shah, R. P., Mohammed, L. A. (2003). Formation and vacuolar localization of salicylic acid glucose conjugates in soybean cell suspension cultures. *Physiologia Plantarum* 118, 328–336. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00117.x>
- Dempsey, M. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., Klessig, D. F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book* 9. <https://doi.org/10.1199/tab.0156>
- Ding, C. K., Wang, C., Gross, K. C., Smith, D. L. (2002). Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* 214, 895–901. <https://doi.org/10.1007/s00425-001-0698-9>
- 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 & Environment* 44, 68–87. <https://doi.org/10.1111/pce.13894>
- Dvořák, P., Krasylenko, Y., Zeiner, A., Šamaj, J., Takáč, T. (2021b). Signaling toward reactive oxygen species-scavenging enzymes in plants. *Frontiers in Plant Science* 11 (618835). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.618835>

- Eriksson, M., Moseley, J. L., Tottey, S., del Campo, J. A., Quinn, J., Kim, Y., Merchant, S. (2004). Genetic dissection of nutritional copper signaling in chlamydomonas distinguishes regulatory and target genes. *Genetics* 168 (2), 795–807. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.030460t>
- Fayez, K. A. & Bazaid, S. A. (2014). Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 13 (1), 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2013.01.001>
- Feng, K., Yu, J., Cheng, Y., Ruan, M., Wang, R., Ye, Q., Zhou, G., Li, Z., Yao, Z., Y., Yang, Y., et al. (2016). The *SOD* gene family in tomato: identification, phylogenetic realtionships, and expression patterns. *Frontiers in Plant Science* 7 (1279). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01279>
- Filyushin, M. A., Anisimova, O. K., Kochieva, E. Z., Shchennikova, A. V. (2021). Genome-wide identification and expression of chitinase class I genes in garlic (*Allium sativum* L.) Cultivars Resistant and Susceptible to *Fusarium proliferatum*. *Plant* 10 (4), 720. <https://doi.org/10.3390/plants10040720>
- Gandikota, M., Birkenbihl, R. P., Höhmann, S., Cardon, G. H., Saedler, H., Huijser, P. (2007). The miRNA156/157 recognition element in the 3'UTR of the Arabidopsis SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal* 49 (4), 683–693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02983.x>
- Gondor, O. K., Janda, T., Soós, V., Pál, M., Majláth, I., Adak, M. K., Blaázs, E., Szalai, G. (2016). Salicylic acid induction of flavonoid biosynthesis pathways in wheat varies by treatment. *Frontiers in Plant Science* 7 (1447). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01447>
- Gou, J. Y., Felippes, F. F., Liu, C. J., Weigel, D., Wang, J. W. (2011). Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor. *Plant Cell* 23 (4), 1512– 1522. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084525>
- Guo, J., Song, J., Wang, F., Zhang, X. S. (2007). Genome-wide identification and expression analysis of rice cell cycle genes. *Plant Molecular Biology* 64, 349–360. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9154-y>
- Habibi, G. (2012). Exogenous salicylic acid alleviates oxidative damage of barley plants under drought stress. *Acta Biologica Szegediensis* 56 (1), 57–63.
- Hao, F., Zhao, S., Dong, H., Zhang, H., Sun, L., Miao, C. (2010). Nia1 and Nia2 are involved in exogenous salicylic acid-induced nitric oxide generation and stomatal closure in *Arabidopsis*. *Journal Integrative Plant Biology* 52 (3), 298–307. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00920.x>
- Hiraga, S., Ito, H., Yamakawa, H., Ohtsubo, N., Seo, S., Mitsuhara, I., Matsui, H., Honma, M., Ohashi, Y. (2000). An HR-induced tobacco gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. *The American Phytopathological Society* 13 (2), 210–216. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.210>
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science* 10 (800). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Huang, P., Dong, Z., Guo, P., Zhang, X., Qiu, Y., Li, B., Wang, Y., Guo, H. (2020). Salicylic acid suppresses apical hook formation via NPR1-mediated repression of EIN3 and EIL1 in *Arabidopsis*, *The Plant Cell* 32 (3), 612–629. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00658>
- Hui, S., Ke, Y., Chen, D., Wang, L., Li, Q., Yuan M. (2023). Rice microRNA156/529-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE7/14/17 modules regulate defenses against bacteria. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad201>



- Jain, D. & Khurana, J. P. (2018). Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*, 265–281. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12)
- Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jumali, S. S., Said, I. M., Ismail, I., Zainal, Z. (2011). Genes induced by high concentration of salicylic acid in *Mitragyna speciosa*. *Australian Journal of Crop Science* 5 (3), 296–303.
- Kachroo, P., Liu, H., Kachroo, A. (2020). Salicylic acid: transport and long-distance immune signaling. *Current Opinion in Virology* 42, 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.05.008>
- Kang, G., Li, G., Xu, W., Peng, X., Han, Q., Zhu, Y., Guo, T. (2012). Proteomics reveals the effects of salicylic acid on growth and tolerance to subsequent drought stress in wheat. *Journal of Proteome Research* 11, 6066–6079. <https://doi.org/10.1021/pr300728y>
- Kaya, C., Ugurlar, F., Ashraf, M., Ahmad, P. (2023). Salicylic acid interacts with other plant growth regulators and signal molecules in response to stressful environments in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 196, 431–443. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.02.006>
- Ke, M., Ma, Z., Wang, D., Sun, Y., Wen, C., Huang, D., Chen, Z., Yang, L., Tan, S., Li, R., et al. (2020). Salicylic acid regulates *PIN2* auxin transporter hyperclustering and root gravitropic growth via *Remorin*-dependent lipid nanodomain organisation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist Foundation* 229 (2), 963–978. <https://doi.org/10.1111/nph.16915>
- Kerchev, P., Smet, B. D., Waszczak, C., Messens, J., van Breusegem, F. (2015). Redox strategies for crop improvement. *Antioxidants & Redox Signaling* 23 (14). <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6033>
- Khan, M. I. R., Asgher, M., Khan, N. A. (2014). Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 80, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.026>
- Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., Khan, N. A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science* 6, <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00462>
- Khan, M. I. R., Iqbal, N., Masood, A., Per, T. S., Khan, N. A. (2013). Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. *Plant Signaling & Behavior* 8 (11). <https://doi.org/10.4161/psb.26374>
- Khan, N. A., Nazar, R., Iqbal, N., Anjum, N. A. (2012). *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Berlin, Germany: Springer.
- Khan, N. A., Syeed, S., Masood, A., Nazar, R., Iqbal, N. (2010). Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. *International Journal of Plant Biology* 1 (1). <https://doi.org/10.4081/pb.2010.e1>
- Khokon, A. R., Okuma, E., Hossain, M. A., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y., Mori, I. C., Murata, Y. (2010). Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 34 (3), 434–443. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02253.x>
- Klein, J., Saedler, H., Huijser, P. (1996). A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. *Molecular and General Genetics MGG* 250, 7–16. <https://doi.org/10.1007/BF02191820>

- Kliebenstein, D. J., Dietrich, R. A., Martin, A. C., Last, R. L., Dangl, J. L. (1999). LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *The American Phytopathological Society* 12 (11), 1022–1026. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.11.1022>
- Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G., Popova, L. (2008). Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of Plant Physiology* 165 (9), 920–931. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.11.014>
- Kuai, X. & Després, C. (2016). Defining *Arabidopsis* NPR1 orthologues in crops for translational plant immunity. *Canadian Journal of Plant Pathology* 38 (1), 25–30. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1149106>
- Kumudini, B. S., Jayamohan, N. S., Patil, S. V., Govardhana, M. (2018). Chapter 11 – Primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its role in defense. *Plant Metabolites Regulation Under Environmental Stress*, 215–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00011-X>
- Lee, S., Kim, S. G., Park, C. M. (2010). Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 188 (2), 626–637. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03378.x>
- Lefevre, H., Bauters, L., Gheysen, G. (2020). Salicylic acid biosynthesis in plant. *Frontiers in Plant Science* 11, 338. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- Li, P., Cai, Q., Wang, H., Li, S., Cheng, J., Li, H., Yu, Q., Wu, S. (2020). Hydrogen peroxide homeostasis provides beneficial micro-environment for SHR-mediated periclinal division in *Arabidopsis* root. *New Phytologist Foundation* 228 (6), 1926–1938. <https://doi.org/10.1111/nph.16824>
- Li, T., Hu, Y., Du, X., Tang, H., Shen, C., Wu, J. (2014). Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress in *Torreya grandis* cv. merrillii seedlings by activating photosynthesis and enhancing antioxidant systems. *PLoS One* 9 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109492>
- Liang, X., Nazareus, T. J., Stone, J. M. (2008). Identification of a consensus DNA-binding site for the *Arabidopsis thaliana* SBP domain transcription factor, AtSPL, and binding kinetics by surface plasmon resonance. *Biochemistry* 47 (12), 3645–3653. <https://doi.org/10.1021/bi701431y>
- Lim, G. H., Kachroo, A., Kachroo, P. (2016a). Role of plasmodesmata and plasmodesmata localizing proteins in systemic immunity. *Plant Signaling & Behavior* 11 (9). <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1219829>
- Lim, G. H., Shine, M. B., de Lorenzo, L., Yu, K., Cui, W., Navarre, D., Hunt, A. G., Lee, J. Y., Kachroo, A., Kachroo, P. (2016b). Plasmodesmata localizing proteins regulate transport and signaling during systemic acquired immunity in plants. *Cell Host & Microbe* 19 (4), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.006>
- Liu, M., Shi, Z., Zhang, X., Wang, M., Zhang, L., Zheng, K., Liu, J., Hu, X., Di, C., Qian, Q., et al. (2019). Inducible overexpression of *Ideal Plant Architecture1* improves both yield and disease resistance in rice. *Nature Plants* 5 (4), 389–400. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0383-2>
- Liu, Y. & He, C. (2016). Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: Learning from AtRBOHD. *Plant Cell Reports* 35, 995–1007. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1950-x>

- Lowe-Power, T. M., Jacobs, J. M., Ailloud, F., Fochs, B., Prior, P., Allen, C. (2016). Degradation of the plant defense signal salicylic acid protects *Ralstonia solanacearum* from toxicity and enhances virulence on tobacco. *mBio* 7 (3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00656-16>
- Mackelprang, R., Okrent, R. A., Wildermuth, M. C. (2017). Preference of *Arabidopsis thaliana* GH3.5 acyl amido synthase for growth versus defense hormone acyl substrates is dictated by concentration of amino acid substrate aspartate. *Phytochemistry* 143, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.07.001>
- Mahesh, H. M., Murali, M., Pal, M. A. C., Melvin, P., Sharada, M. S. (2017). Salicylic acid seed priming instigates defense mechanism by inducing PR-Proteins in *Solanum melongena* L. Upon infection with *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Physiology and Biochemistry* 117, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.05.012>
- Manning, K., Tör, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A. J., King, G. J., Giovannoni, J. J., Seymour, G. B. (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* 38, 948–952. <https://doi.org/10.1038/ng1841>
- Melicher, P., Dvořák, P., Šamaj, J., Takáč, T. (2022). Protein-protein interactions in plant antioxidant defense. *Frontiers in Plant Science* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1035573>
- Mika, A., Boenisch, M. J., Hopff, D., Lüthje, S. (2010). Membrane-bound guaiacol peroxidases from maize (*Zea mays* L.) roots are regulated by methyl jasmonate, salicylic acid, and pathogen elicitors. *Journal of Experimental Botany* 61 (3), 831–841. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp353>
- Mustafa, N. R., Kim, H. K., Choi, Y. H., Erkelens, C., Lefeber, A. W., Spijksma, G., van der Heijden, R., Verpoorte, R. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in fungus elicited *Catharanthus roseus* cells. *Phytochemistry* 70 (4), 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.01.009>
- Mutlu, S., Karadağoğlu, Ö., Atici, Ö., Nalbantoğlu, B. (2013). Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. *Biologia Plantarum* 57 (3), 507–513. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0322-4>
- Nakamura, T., Ishikawa, M., Nakatani, H., Oda, A. (2008). Characterization of cold-responsive extracellular chitinase in bromegrass cell cultures and its relationship to antifreeze activity. *Plant Physiology* 147 (1), 391–401. <https://doi.org/10.1104/pp.106.081497>
- Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S., Khan, N. A. (2011). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *Journal of Plant Physiology* 168 (8), 807–815. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.11.001>
- Nazari, F., Maleki, M., Rasouli, M. (2022). Effect of salicylic acid on change in superoxide dismutase enzyme activity, protein, proline, and some photosynthetic pigments in grape (*Vitis vinifera* L.) bidane ghermez and bidane sefid cultivars at two stages. *Erwerbs- Obstbau* 64, 37–45. <https://doi.org/10.1007/s10341-022-00683-w>
- O'Brien, K. M., Dirmeier, R., Engle, M., Robert O. P. (2004). Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): EVIDENCE THAT MnSOD AND CuZnSOD HAVE BOTH UNIQUE AND OVERLAPPING FUNCTIONS IN PROTECTING MITOCHONDRIAL PROTEINS FROM OXIDATIVE DAMAGE. *Journal of Biological Chemistry* 279 (50), 51817–51827. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405958200>

- Palma, F., López-Gómez, M., Tejera, N. A., Lluch, C. (2013). Salicylic acid improves the salinity tolerance of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* by preventing nitrogen fixation inhibition. *Plant Science* 208, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.015>
- Pasternak, T., Groot, E. P., Kazantsev, F. V., Teale, W., Omelyanchuk, N., Kovrizhnykh, V., Palme, K., Mironova, V. V. (2019). Salicylic Acid Affects Root Meristem Patterning via Auxin Distribution in a Concentration-Dependent Manner, *Plant Physiology* 180 (3), 1725–1739. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00130>
- Peng, Y., Yang, J., Li, X., Zhang, Y. (2021). Salicylic acid: Biosynthesis and signaling. *Annual Review of Plant Biology* 72, 761–791. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-081320-092855>
- Perry, J. J. P. Shin, D. S., Getzoff, E. D., Tainer J.A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics* 1804 (2), 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.004>
- Poethig, R. S. (2013). Chapter Five – Vegetative phase change and shoot maturation in plants. *Current Topics in Developmental Biology* 105, 125–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396968-2.00005-1>
- Pogány, M., von Rad, U., Grün, S., Dongó, A., Pintye, A., Simoneau, P., et al. (2009). dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an Arabidopsis-*Alternaria* pathosystem. *Plant Physiology* 151 (3), 1459–1475. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141994>
- Procházková, D., Sairam, R. K., Srivastava, G. C., Singh, D. V. (2001). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science* 161 (4), 765–771. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00462-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00462-9)
- Qi, G., Chen, J., Chang, M., Chen, H., Hall, K., Korin, J., Liu, F., Wang, D., Fu, Z. Q. (2018). Pandemonium breaks out: Disruption of salicylic acid-mediated defense by plant pathogens. *Molecular Plant* 11 (13), 1427–1439. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.10.002>
- Qin, X. J., Qi, J. J., Dou, W. F., Chen, S. C., He, Y. R., Li, Q. (2020). Identification of Rboh family and the response to hormone and citrus bacterial canker in citrus. *Scientia agricultura sinica* 53 (20), 4189–4203. [10.3864/j.issn.0578-1752.2020.20.008](https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2020.20.008)
- Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., Job, D. (2006). Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology* 141 (3), 910–923. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082057>
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., Bartel, D. P. (2002). Prediction of Plant MicroRNA targets. *Cell* 110 (4), 513–520. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00863-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00863-2)
- Rivas-San Vicente & M., Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 62 (10), 3321–3338. <https://doi.org/10.1093/jxb/err031>
- Saidi, I., Ayouni, M., Dhieb, A., Chtourou, Y., Chaïbi, W., Djebali, W. (2013). Oxidative damages induced by short-term exposure to cadmium in bean plants: Protective role of salicylic acid. *South African Journal of Botany* 85, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.12.002>
- Saleem, M., Fariduddin, Q., Castroverde, C. D. M. (2021). Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. *Plant Physiology and Biochemistry* 168, 381–397. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.10.011>

- 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 (7). <https://doi.org/10.1002/pld3.150>
- Seo, S. Y., Wi, S. J., Park, K. Y. (2020). Functional switching of NPR1 between chloroplast and nucleus for adaptive response to salt stress. *Scientific Reports* 10, 4339. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61379-3>
- Shah, K., Wang, M., Li, X., Shang, W., Wang, S., Han, M., Ren, X., Tian, J., An, N., Xing, L. (2022). Transcriptome analysis reveals dual action of salicylic acid application in the induction of flowering in *Malus domestica*. *Plant Science* 324. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111433>
- Shine, M. B., Xiao, X., Kachroo, P., Kachroo, A., (2019). Signaling mechanism underlying systematic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science* 279, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.01.001>
- Singh, R., Upadhyay, S. K., Singh, M., Sharma, I., Sharma, P., Kamboj, P., Saini, A., Voraha, R., Sharma, A. K. (2021). Chitin, chitinases and chitin derivatives in biopharmaceutical, agricultural and environmental perspective. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 11 (3), 9985–10005. <https://doi.org/10.33263/BRIAC113.998510005>
- Skelly, M. J., Furniss, J. J., Grey, H., Wong, K. W., Spoel, S. H. (2019). Dynamic ubiquitination determines transcriptional activity of the plant immune coactivator NPR1. *eLife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.47005.001>
- Snoeren, T. A. L., Mumm, R., Poelman, E. H., Yang, Y., Pichersky, E., Dicke, M. (2010). The herbivore-induced plant volatile methyl salicylate negatively affects attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum*. *Journal of Chemical Ecology* 36, 479–489. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9787-1>
- Stone, J. M., Liang, X., Nekl, E. R., Stiers, J. J. (2005). Arabidopsis *AtSPL14*, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *The Plant Journal* 41 (5), 744–754. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02334.x>
- Sun, T., Zhou, Q., Zhou, Z., Song, Y., Li, Y., Wang, H. B., Liu, B. (2022). SQUINT positively regulates resistance to the pathogen *Botrytis cinerea* via miR156-SPL9 Module in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 63 (10), 1414–1432. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac042>
- Szepesi, Á., Csiszár, J., Gémes, K., Horváth, E., Horváth, F., Simon, M. L., Tari, I. (2009). Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na<sup>+</sup> content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *Journal of Plant Physiology* 166 (9), 914–925. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.11.012>
- Takáč, T., Křenek, P., Komis, G., Vadovič, P., Ovečka, M., Ohnoutková, L., Pechan, T., Kašpárek, P., Tichá, T., Basheer, J., et al. (2021). TALEN-based *HvMPK3* knock-out attenuates proteom and root hair phenotypic response to flg22 in barley. *Frontiers in Plant Science* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.666229>
- 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 (12), 5347–5361. <https://doi.org/10.1021/pr500588c>

- Unte, U. S., Sorensen, A. M., 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 (4), 1009–1019. <https://doi.org/10.1105/tpc.010678>
- 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 (6), 955–964. <https://doi.org/10.1242/dev.028613>
- van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review in Phytopathology* 44, 135–162. [10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425)
- van Wersch, R., Li, X., Zhang, Y. (2016). Mighty dwarfs: *Arabidopsis* autoimmune mutants and their usages in genetic dissection of plant immunity. *Frontiers in Plant Science* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01717>
- Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P. B., Friml, J. (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Science* 12 (4), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.03.006>
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A. H., Dong, X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology* 17 (20) 1784–1790. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.09.025>
- Wang, H., Li, Y., Chern, M., Zhu, Y., Zhang, L. L., Lu, J. H., Li, X. P., Dang, Q., Ma, X. C., Yang, Z. R., et al. (2021). Suppression of rice miR168 improves yield, flowering time and immunity. *Nature Plants* 7, 129–136. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00852-x>
- Wang, H., Nussbaum-Wagler, T., Li, B., Zhao, Q., Vigouroux, Y., Faller, M., Bomblies, K., Lukens, L., Doebley, J. F. (2005). The origin of the naked grains of maize. *Nature* 436, 714–719. <https://doi.org/10.1038/nature03863>
- Wang, J. W., Czech, B., Weigel, D. (2009b). miR156-Regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138 (4), 738–749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.014>
- Wang, W., Xia, M. X., Chen, J., Yuan, R., Deng, F. N., Shen, F. F. (2016). Gene expression characteristics and regulation mechanism of superoxide dismutase and its physiological roles in plants under stress. *Biochemistry (Moscow)* 81, 465–480. <https://doi.org/10.1134/S0006297916050047>
- Wang, Y., Hu, Z., Yang, Y., Chen, X., Chen, G. (2009a). Function annotation of an SBP-box gene in *Arabidopsis* based on analysis of co-expression networks and promoters. *International Journal of Molecular Sciences* 10 (1), 116–132. <https://doi.org/10.3390/ijms10010116>
- Wang, Y., Mopper, S., Hasenstein, K. H. (2001). Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in iris hexagona. *Journal of Chemical Ecology* 27 (2), 327–342. <https://doi.org/10.1023/A:1005632506230>
- War, A. R., Paulraj, M. G., War, M. Y., Ignacimuthu, S. (2011). Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signaling & Behavior* 6 (11), 1787–1792. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17685>
- Wassie, M., Zhang, W., Zhang, Q., Ji, K., Cao, L., Chen, L. (2020). Exogenous salicylic acid ameliorates heat stress-induced damages and improves growth and photosynthetic efficiency in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 191. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110206>

Withers, J. & Dong, X. (2016). Posttranslational modifications of NPR1: A single protein playing multiple roles in plant immunity and physiology. *PLoS Pathogens* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005707>

b

Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D., Poethig, R. S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138 (4), 750–759. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.031>

Wu, G. & Poethig, R. S. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by *miR156* and its target *SPL3*. *Development* 133 (18), 3539–3547. <https://doi.org/10.1242/dev.02521>

Xing, S., Salinas, M., Hohmann, 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 (12), 3935–3950. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079343>

Xu, L., Zhao, H., Ruan, W., Deng, M., Wang, F., Peng, J., Luo, J., Chen, Z., Yi, K. (2017). ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM1 functions in salicylic acid biosynthesis to maintain proper reactive oxygen species levels for root meristem activity in rice. *The Plant Cell* 29 (3), 560–574. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00665>

Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., Pilon, M. (2007). Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 282 (22), 16369–16378. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700138200>

Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y., Shikanai, T. (2009). *SQUAMOSA* Promoter binding protein-like 7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21 (1), 347–361. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060137>

Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Terada, T. (2006). An *Arabidopsis* SBP domain fragment with a disrupted C-terminal zinc-binding site retains its tertiary structure. *FEBS Letters* 580 (8), 2109–2116. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.014>

Yang, H., Thai, X., Zhao, Z., Fan, G. (2023). Comprehensive analyses of the SPL transcription factor family in *Paulowia fortunei* and their response to biotic and abiotic stresses. *International Journal of Biological Macromolecules* 226, 1261–1272. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.239>

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 (1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.02.034>

Yin, H., Hong, G., Li, L., Zhang, X., Kong, Y., Sun, Z., Li, J., Chen, J., He, Y. (2019). MiR156/SPL9 regulates reactive oxygen species accumulation and immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 109 (4), 632–642. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0306-R>

Yu, N., Cai, W. J., Wang, S., Shan, C. M., Wang, L. J., Chen, X. Y. (2010). Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted *SPL* genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22 (7), 2322–2335. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072579>

Yu, X., Xu, Y., Yan, S. (2021). Salicylic acid and ethylene coordinately promote leaf senescence. *Journal of Integrative Plant Biology* 63 (5), 823–827. <https://doi.org/10.1111/jipb.13074>

Zeiner, A. (2021). *Genetická, biochemická a mikroskopická analýza regulace FSD1 pomocí SPL1 u Arabidopsis*. [Diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.

- Zengin, F. (2014). Exogenous treatment with salicylic acid alleviating copper toxicity in bean seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 84 (3), 749–755. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0285-4>
- Zhang, L. L., Huang, Y. Y., Zheng, Y. P., Liu, X. X., Zhou, S. X., Yang, X. M., Liu, S. L., Li, Y., Li, J. L., Zhao, S. L. (2022). Osa-miR535 targets *SQUAMOSA promoter binding protein-like 4* to regulate blast disease resistance in rice. *The Plant Journal* 110 (1), 166–178. <https://doi.org/10.1111/tpj.15663>
- Zhang, Y., Shi, X., Li, B., Zhang, Q., Liang, W., Wang, C. (2016). Salicylic acid confers enhanced resistance to *Glomerella* leaf spot in apple. *Plant Physiology and Biochemistry* 106, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.047>
- Zhang, Y., Xu, S., Yang, S., Chen, Y. (2015). Salicylic acid alleviates cadmium-induced inhibition of growth and photosynthesis through upregulating antioxidant defense system in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.). *Protoplasma* 252, 911–924. [10.1007/s00709-014-0732-y](https://doi.org/10.1007/s00709-014-0732-y)
- Zhang, Y., Zhao, L., Zhao, J., Li, Y., Wang, J., Guo, R., Gan, S., Liu, C. J., Zhang, K. (2017). *S5H/DMR6* encodes a salicylic acid 5-hydroxylase that fine-tunes salicylic acid homeostasis. *Plant Physiology* 175 (3), 1082–1093. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00695>
- Zhang, Z. D., Rozowsky, J., Snyder, M., Chang, J., Gerstein, M. (2008). Modeling ChIP sequencing in silico with applications. *PloS Computational* 4 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000158>
- Zhou, P., Zavaliev, R., Xiang, Y., Dong, X. (2023). Seeing is believing: Understanding functions NPR1 and its paralogs in plant immunity through cellular and structural analyses. *Current Opinion in Plant Biology* 73 (102352). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102352>
- Zhu, C., Ding, Y., Liu, H. (2011). MiR398 and plant stress responses. *Physiologia Plantarum* 143 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01477.x>
- Zottini, M., Costa, A., De Michele, R., Ruzzene, M., Carimi, F., Lo Schiavo, F. (2007). Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 58 (6), 1397–1405. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm001>



## 8. Zoznam použitých symbolov a skratiek

ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> Adenozín trifosfát
CAT2	<i>CATALASE2</i> Kataláza 2
CSD	<i>Cu/Zn superoxiddismutase</i> Cu/Zn superoxiddizmutáza
DMSO	Dimetyl sulfoxid
EDTA	Ethyléndiamín tetraoctová kyselina
EIN3	<i>Ethylene insensitive 3</i>
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i> Efektorom spustená imunita
Flg22	Flagelín 22
FSD	<i>Fe superoxiddismutase</i> Fe superoxiddizmutáza
HR	<i>Hypersensitive response</i> Hypersenzitívna odpoveď
HSP	<i>Heat shock proteins</i> Proteíny tepelného šoku
ICS1	<i>Isochorismatesyntaaze 1</i> Izochorizmat syntáza 1
IPA1	<i>Ideal Plant Architecture 1</i>
LSD1	<i>Lesion simulating disease 1</i>
MAPK/MPK	<i>Mitogen activated protein kinases</i> Mítogenom aktivované protein kinázy
MDA	<i>Malondialdehyde</i> Malondialdehyd
MeSA	Kyselina metylsalicylová
MiliQ	Deionizovaná voda
MRE	<i>MicroRNA respons elements</i>

	MicroRNA responzívne elementy
MS	Murashige a Skoog
NBT	<i>Nitrotetrazolium blue</i> Nitrotetrazóliová modrá
NPR1	<i>NONEXPRESSER OF PR GENES1</i>
PIN	<i>PIN-FORMED</i>
PR	<i>Patogen-related</i>
PRR	<i>Patern-recognition receptors</i> Vzor rozpoznávajúce receptory
PSII	<i>Photosystem II</i> Fotosystém II
PTI	<i>Patern-triggered imunity</i> Vzorovo spustená imunita
PVP	Polyvinylpyrolidón
RAM	<i>Root apical meristeme</i> Koreňový apikálny meristém
RBOH	<i>RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGs</i>
ROS	<i>Reactive oxigen species</i> Reaktívne formy kyslíka
RuBisCO	<i>ribulose-1,5bisphospate carboxylase/oxygenase</i> ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza
SA	<i>Salicylic acid</i> Kyselina salicylová
SAR	<i>Systemic acquired resistance</i> Systémovo získaná rezistencia
SBP	<i>SQUAMOSA promoter binding protein</i>
SOD	<i>Superoxiddismutase</i> Superoxiddizmutáza
SPL	<i>SQUAMOSA promoter-binding protein-like</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin

TGA

*TGACC MOTIF-BINDING PROTEIN*

Trx

*Thioreoxin*

Tioredoxin