

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Vliv kyseliny salicylové na vývoj průduchů, množství  
anthokyanů a asimilaci CO<sub>2</sub> u rostliny *Arabidopsis  
thaliana*.**

Bakalářská práce

**Pavla Beáta Trhlínová**

Školitel: Ing. Martin Janda, Ph.D.

České Budějovice 2022

Trhlínová, P. B., 2022: Vliv kyseliny salicylové na vývoj průduchů, množství anthokyanů a asimilaci CO<sub>2</sub> u rostliny *Arabidopsis thaliana*. [The role of salicylic acid on stomata development, amount of anthocyanins and CO<sub>2</sub> assimilation in plant *Arabidopsis thaliana*. Bc. Thesis, in Czech.] – 64 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

Salicylic acid (SA) is a plant phytohormone with the main role in the plant immunity response against pathogens. A higher concentration of SA induces stomata closure in plants and negatively impacts plant growth (plants with higher SA are smaller than the wild type). Under biotic stress, stomata are closed, which affect the diurnal carbon balance in plants. We are investigating the connection between the role of higher SA and small growth with the role of SA on the stomata closure and development, analysing their closure and density in *Arabidopsis thaliana* mutants with altered SA concentration. Additionally, the CO<sub>2</sub> assimilation and photosynthesis rate are studied. Furthermore, SA also helps plants to deal with abiotic stress. It is known that more anthocyanins are produced under drought or light stress. In this study, we uncover on the possible inhibitory effect of SA on the production of anthocyanins under stress conditions. Our results indicate that SA is much more than a simply biotic stress-related phytohormone.

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 13. 4. 2022

.....

Jméno a příjmení



## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Ing. Martinu Jandovi, Ph.D., za vedení během mé práce, za ochotu kdykoliv zodpovědět mé dotazy, inspirativní debaty, podporu a pomoc při problémech či nejasnostech. Dále bych chtěla poděkovat prof. Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, CSc., za cenné rady a zkušenosti, Ing. Marii Hronkové, Ph.D. za ochotu kdykoliv pomoci, poskytnutí prostor pro pěstování rostlin a naučení zhotovení IR snímků. Také bych ráda poděkovala RNDr. Tomáši Hájkovi, Ph.D. a RNDr. Jiřímu Kubáskovi, Ph.D. za rady, které pomohly a často i urychlily práci. Mé poděkování patří i dalším lidem z Katedry experimentální biologie rostlin, Katedry biologie ekosystémů, z Ústavu molekulární biologie rostlin a mým kolegům z Laboratoře molekulární interakce rostlin s mikroorganismy. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině a svým přátelům za trpělivost, občasné rozptýlení a podporu během mých studií.

## Obsah

Seznam použitých zkratk .....	1
1 Úvod .....	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	2
2.1 Fotosyntéza .....	2
2.1.1 Faktory ovlivňující fotosyntézu .....	3
2.2 Průduchy .....	5
2.2.1 Mechanismus otevírání a zavírání průduchů .....	5
2.2.2 Vývoj průduchů .....	7
2.2.3 Role průduchů .....	8
2.3 Kyselina salicylová (SA) .....	9
2.3.1 Biosyntéza SA .....	10
2.3.2 SA jako součást odpovědi na biotický stres .....	10
2.3.3 Vliv SA na pohyb průduchů .....	11
2.3.4 Vliv SA na fotosyntézu .....	13
2.3.5 „SA-kolekce“ mutantů .....	15
3 Cíle práce .....	19
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	19
4.1 Materiály a metody .....	19
4.1.1 Použité genotypy <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	19
4.1.2 Způsoby pěstování <i>A. thaliana</i> .....	21
4.1.3 Média použitá pro pěstování rostlin .....	22
4.1.4 Chemické ošetření rostlin .....	23
4.1.5 Analýza růstu rostlin .....	23
4.1.6 Analýza anthokyanů .....	23
4.1.7 Analýza hustoty průduchů .....	24
4.1.8 Měření teploty rostlin pomocí termokamery .....	24
4.1.9 Gazometrické měření .....	25

4.1.10	Analýza obsahu izotopu $^{13}\text{C}$ uvnitř listu – IRMS.....	25
4.1.11	Analýza chlorofylu .....	26
4.1.12	Zpracování dat, tvorba grafů a statistické vyhodnocení dat .....	26
4.2	Výsledky .....	27
4.2.1	Zavedli jsme pěstování „SA-kolekce“ na KEBR, PřF JU .....	27
4.2.2	Zvýšená koncentrace SA inhibuje tvorbu anthokyanů .....	32
4.2.3	Zvýšená koncentrace SA vede ke změně funkce průduchů .....	34
4.2.4	Změna koncentrace SA nemá přímý vliv na fluorescenci chlorofylu .....	40
4.2.5	Koncentrace SA přímo neovlivňuje hustotu průduchů.....	41
5	Diskuse .....	44
5.1	Zavedení pěstování „SA-kolekce“ v naší laboratoři.....	44
5.2	Vysoká koncentrace SA inhibuje tvorbu anthokyanů .....	45
5.3	Zvýšená koncentrace SA ovlivňuje funkci průduchů, a tím i výměnu plynů a fotosyntézu .....	46
5.4	Zvýšená koncentrace SA nemá vliv na vývoj průduchů .....	49
6	Závěr .....	51
7	LITERATURA .....	52

## Seznam použitých zkratek

Zkratka	Význam
A	rychlost fotosyntézy [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]
ABA	kyselina abscisová
$C_i$	obsah $\text{CO}_2$ uvnitř listu rostliny [ $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ]
ETI	imunita vyvolaná efektozem
GMC	mateřská buňka průduchu
$g_{\text{sw}}$	vodivost průduchů [ $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]
ICS	isochorismát syntáza
IRMS	izotopová hmotnostní spektrometrie
izotop $^{13}\text{C}$	stabilní izotop uhlíku
KEBR	Katedra experimentální biologie rostlin
MeSA	methylester kyseliny salicylové
MS médium	Murashige Skoog médium obsahující živiny pro kultivaci rostlin
NPQ	nefotochemické zhášení
PAL	fenylalanin amoniak lyáza
PR gen	geny spojené s patogenezi
PAMP	molekulární vzory spojené s patogeny
PTI	imunita vyvolaná PAMP
ROS	reaktivní formy kyslíku
SA	kyselina salicylová
SA – kolekce	kolekce mutantů se změněnou akumulací SA
SA[↓]	mutanti s nízkou akumulací SA
SA[↑]	mutanti s vyšší akumulací SA
SAR	systemově získaná rezistence
SAVO	roztok chlornanu sodného (chlorové bělidlo)
SA[WT]	mutanti s akumulací SA podobnou divokému typu
ÚMBR	Ústav molekulární biologie rostlin
WT	divoký typ

## 1 Úvod

Rostliny jsou na naší planetě již přibližně 3,5 miliardy let. Za tu dobu si dokázaly vynalézt spoustu mechanismů a látek určených pro boj proti nepříznivým podmínkám. Jedním takovým mechanismem je zvýšená tvorba fytohormonu kyseliny salicylové (SA) v boji proti patogenům. Napadení patogeny způsobuje ročně velké ztráty v zemědělství. Vzhledem k neustále rostoucí populaci je dosažení zvýšené odolnosti plodin jednou z hlavních výzev pro zvýšení výnosů. Pokud je rostlina schopná indukovat syntézu SA, je často více odolná proti napadení širokým spektrem patogenů. Vysoké koncentrace SA ovšem zapříčiňují menší vzrůst rostlin. Tato skutečnost je hlavním důvodem, proč se zatím v zemědělství nedaří uplatnit modifikace s cílem zvýšení koncentrace SA za účelem lepší odolnosti plodin. Jednou z klasických hypotéz, proč jsou rostliny s vyšším obsahem SA malé je, že těmto rostlinám chybí energie a materiál pro růst, z důvodu jejich spotřebování k aktivaci a udržení zvýšené imunity. Ovšem mechanismus, jímž by k tomu docházelo, není znám.

My v této práci vycházíme z faktu, že ošetření rostlin SA vede k uzavření průduchů. Tím je možné, že vyšší hladina SA nejen že způsobuje vyšší spotřebu energie na aktivovanou imunitu, ale současně i snižuje dostupnost CO<sub>2</sub> a rychlost fotosyntézy. Nižší syntéza sacharidů, úměrná nízké fotosyntetické produkci, by tak byla příčinou menšího využití energie, a tedy i menšího vzrůstu u rostlin se zvýšenou koncentrací SA.

V naší studii používáme takzvanou „SA-kolekci“ mutantů *Arabidopsis thaliana* (huseníčku rolního). Jsou to jedinci se změněnou regulací biosyntézy či metabolismu kyseliny salicylové. S využitím této kolekce se snažíme prokázat dopady odlišných koncentrací SA uvnitř *A. thaliana* na růst rostliny a vývoj průduchů, společně s vlivem na množství asimilovaného CO<sub>2</sub> a rychlost fotosyntézy.

Během zavedení pěstování „SA-kolekce“ na Katedře Experimentální biologie rostlin JU jsme si všimli nezvyklého fenotypu u rostlin vystavených stresu suchem a nadměrnou ozářeností. Všechny rostliny, kromě těch s vyšší koncentrací SA, „zřívavěly“. Rozhodli jsme se tedy začít studovat také vliv SA na biosyntézu anthokyanů.

Různé vlivy SA na fyziologii rostlin jsou známy již z mnoha studií. Ovšem často se využívá takzvaný exogenní způsob ošetření, který je rychlý a jednoduchý, ale současně nepřirozený. V naší studii, díky kolekci mutantů, jsme schopni zkoumat účinky SA produkované v různé míře přímo rostlinami. Jednotlivé mutanty porovnáváme s divokým typem, a navíc také s mutanty mající mutaci navracející fenotyp mutantu zpět k fenotypu

divokého typu. Tím pádem máme v rukou dobrý nástroj s důvěryhodnými kontrolami, díky kterému jsme schopni pozorovat vliv různých koncentrací SA na fyziologii, ale také morfologii rostlin.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Fotosyntéza

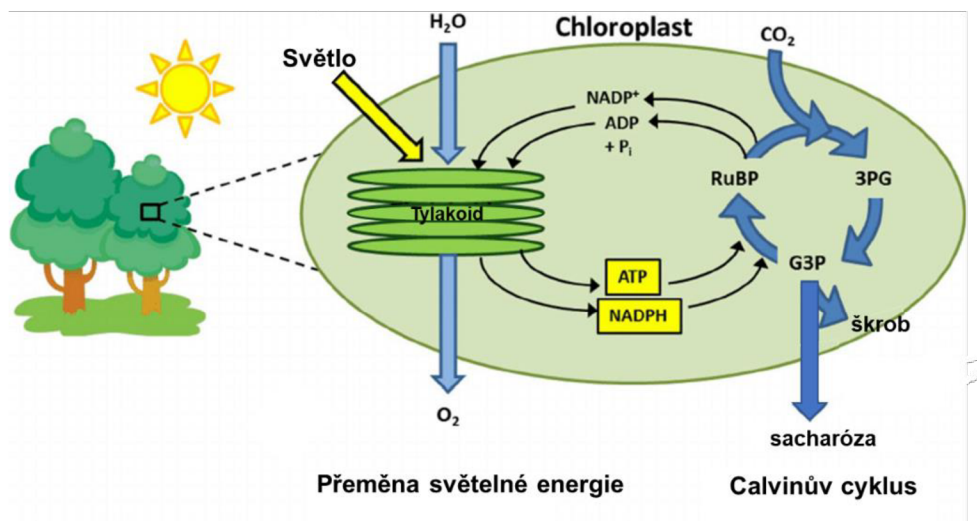
Pro vyšší rostliny je fotosyntéza zdrojem obživy, díky které dokáží přeměnit anorganické látky na látky organické pomocí světelné energie slunečního záření (Evans, 2013). Organismy využívající světelný zdroj energie pro získávání uhlíku z anorganických látek, mezi které rostliny patří, se nazývají fotoautotrofové (Kincl, 2006).

Fotosyntéza se odehrává v organelách zvaných chloroplasty, které obsahují fotosyntetizující barvivo chlorofyl. Nejvíce se jich nachází v mezofylu listu, zde bývá fotosyntéza nejvíce aktivní (Rasmussen, 2014; Taiz, 2018).

Světelná energie, ve formě fotonů, převede chlorofyl do excitovaného stavu, čímž mu předá energii (**Obr. 1**). Tato energie je následně transportována elektrony, které jsou kaskádou reakcí přepraveny k molekule vody, aby se její oxidací uvolnil kyslík, a tím se redukovala jedna molekula NADPH<sup>+</sup> (Trebst, 1974). Část energie ze světelného záření je také využita k syntéze ATP pomocí ATP syntázy v procesu nazývaném oxidační fosforylace (Senior, 1988). Obě molekuly ATP i NADPH<sup>+</sup> jsou přenašeče energie potřebné k následující fázi fotosyntézy, Calvinovu cyklu. Přeměna světelné energie na energii chemickou probíhá v tylakoidních membránách chloroplastu. Calvinův cyklus ovšem probíhá ve stroma chloroplastu (Raines, 2003). V tomto cyklu se syntetizuje molekula CO<sub>2</sub> a molekula vody s molekulou ribulosa-1,5-bisfosfát za pomoci enzymu ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza (RuBisCO) (Johnson, 2016). Výsledný produkt se dále redukuje na karbohydráty, jako například na sacharózu nebo škrob, což je základem obživy rostlin (Taiz, 2018).

Rovnice fotosyntézy:





**Obrázek 1: Schéma přeměny světelné energie a produkce sacharózy a škrobu v chloroplastu v procesu fotosyntézy.** Světelná energie převede chlorofyl v tylakoidní membráně chloroplastu do excitovaného stavu, čímž mu předá energii. Tato energie je elektrony transportována a použita k oxidaci vody. Redukuje se jedna molekula  $\text{NADPH}^+$  a dojde k syntéze ATP. Tyto dvě molekuly putují do Calvinova cyklu, kde se syntetizuje molekula  $\text{CO}_2$  s molekulou ribulosa-1,5-bisfosfát, a tím vzniká škrob nebo sacharóza. Upraveno podle Rasmussen (2014).

### 2.1.1 Faktory ovlivňující fotosyntézu

Fotosyntézu ovlivňuje vnější i vnitřní stav rostliny, a tím se může snižovat, nebo zvyšovat její rychlost či účinnost (Seemann, 1987). Vnějšími faktory mohou být například světlo, koncentrace  $\text{CO}_2$ , množství vody, teplota nebo napadení patogenem (Baker, 1996). S tím souvisí odpověď rostliny na dané faktory, například regulací množství chlorofylu nebo pohybem chloroplastů (Haupt, 1990). Pokud nepříznivé podmínky ovlivňují rostlinu již od samého počátku vývoje, může ovlivnit také její anatomii a vývoj buněčných či membránových organel (Taiz, 2018).

#### 2.1.1.1 Abiotické stresy

Aby rostlina dokázala růst a všechny její procesy správně fungovaly, potřebuje zejména světlo, vodu, uhlík a minerální živiny. Abiotický stres je stav, kdy se rostlina nachází v prostředí, které jí není schopné poskytnout optimální množství látek, nutných pro její růst a vývoj (Cramer, 2011). Reakce rostliny na takový stres mohou být různé (Cramer, 2010) a závislé na typu zasaženého pletiva (Dinneny, 2008) nebo délce působení daného stresoru (Tattersall, 2007). Jednotlivé stresy se mohou také navzájem kombinovat a jejich účinky se kumulovat.

Pro fotosyntézu je důležitá koncentrace  $\text{CO}_2$  v prostředí, ve kterém rostlina roste. Koncentrace  $\text{CO}_2$  má takzvaný saturační bod. Jedná se o množství  $\text{CO}_2$ , které je natolik

vysoké, že již nedochází ke zvyšování samotné fotosyntézy (Sage, 1989). Vliv koncentrace CO<sub>2</sub> je spojeno také s množstvím živin v rostlině. Pokud je jich nedostatek, rostlina není schopna vázat a zpracovávat CO<sub>2</sub> (Taiz, 2018).

Mezi další faktory ovlivňující fotosyntézu patří teplota, jejíž optimum se pohybuje okolo 15–27 °C. Pokud se hodnoty okolní teploty pohybují mimo zmíněné optimum, ovlivňují správné chody biochemických reakcí v rostlinném těle (Mathur, 2014).

Důležitou roli hraje i množství vody (Baker, 1996). Voda je do rostliny dopravována kořenovým systémem a vydávána transpirací přes průduchy (Slatyer, 1960; Taiz, 2018). Aby se zabránilo nadměrnému úniku vody z povrchu listů, průduchy se zavírají, ale pro získávání potřebného CO<sub>2</sub> z ovzduší se průduchy zase otevírají (Chaves, 2004; Buckley, 2005). Proto je regulace transpirace pro rostlinu důležitým mechanismem k dovážení dostatečného množství CO<sub>2</sub> bez nadměrných ztrát vody.

Intenzita osvětlení je zásadním faktorem pro správný průběh fotosyntézy. Čím je ozářenost rostliny vyšší, tím rychlost fotosyntézy roste (Peeters, 1978). V bodě, zvaném saturační ozářenost, se růst fotosyntézy zastaví a rychlost/účinnost fotosyntézy se ustaluje. Pokud ovšem ozářenost stále roste nebo trvá dlouhou dobu, dostane se fotosyntéza do bodu fotoinhibice (Adir, 2003). Zde fotosyntéza klesá, a dokonce může docházet k poškození fotosyntetického aparátu. Před fotoinhibicí mohou chránit antioxidantní látky, mezi které patří například karotenoidy nebo flavonoidy (Agati, 2013). Tyto látky dokáží chránit fotosyntetický aparát před jeho poškozením.

Typickým představitelem flavonoidů jsou anthokyany. Tyto pigmenty, odpovědné za fialové až tmavě modré zbarvení rostlin, poskytují rostlině ochranu proti poškození způsobené UV zářením (Lee, 2002), takzvaná fotoprotekce (Andersen, 2010). Mohou ovšem chránit také před nadměrnými či nízkými teplotami (Qiu, 2016) nebo při stresu způsobeným suchem (Sperdoui, 2012).

### **2.1.1.2 Biotické stresy**

Rostliny jsou ve svém prostředí vystaveny velkému množství mikroorganismů. Řada těchto mikroorganismů patří mezi rostlinné patogeny (Ghosh, 2019). Kromě abiotických stresů čelí rostlina také stresům biotickým. Neboli změnám optimálních podmínek pro růst a vývoj, které jsou způsobeny jinými živými organismy.

Biotický stres způsobují patogeny (např. bakterie, houby, viry) (Atkinson, 2012) anebo býložravci (Bale, 2002). Často úzce souvisí se stresem abiotickým. Například vyšší teplota



podnebí podporuje rychlejší šíření a množení bakteriální infekce. Nežádka tedy abiotický stres přímo předchází stresu biotickému. Neoptimální podmínky oslabí rostlinu, a tím se stává snadnějším terčem k napadení patogenem (Amtmann, 2008; Goel, 2008; Atkinson, 2012).

Aby se rostliny bránily proti napadení patogeny vyvinuly si specializované senzorické receptory, které rozpoznávají patogeny. Tyto receptory mohou rozpoznávat tzv. molekulární vzory spojené s patogenem (PAMP), ale také např. molekulární vzory spojené s poškozením (DAMP). Díky jejich rozpoznání rostlina ví, že je napadena patogenem a spustí se signální kaskáda, která vede k aktivaci obranných reakcí. Například k uzavření průduchů, posílení buněčné stěny, ale i jiných složitějších (Ghosh, 2019).

## 2.2 Průduchy

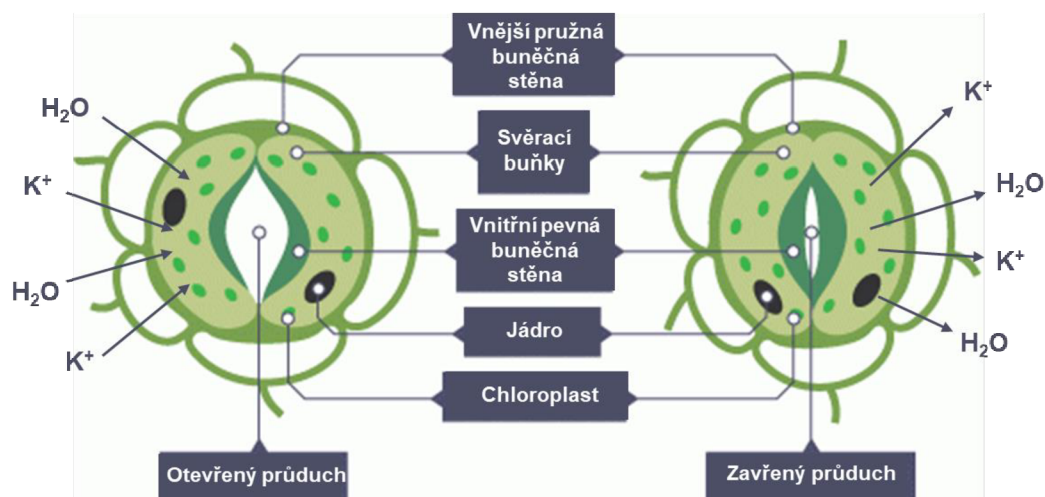
List rostliny je pokryt vrstvou kutikuly. Ta je ale téměř nepropustná pro přenos potřebných látek z okolí či naopak, jako jsou například vodní pára nebo CO<sub>2</sub> (Taiz, 2018). Proto se na epidermis nacházejí průduchy, mikropóry zajišťující výměnu plynů mezi rostlinou a jejím prostředím. Nejdůležitějšími plyny, které jsou vyměňovány, jsou kyslík, oxid uhličitý a vodní pára. Přes průduch se z povrchu rostliny vypařuje většina množství vody. Tím se průduchy stávají hlavním činitelem v rostlinné transpiraci probíhající na povrchu listu (Berry, 2010).

Průduchy se ve většině případů vyskytují ve vyšším počtu na spodní straně listu, takové rostliny nazýváme hypostomatické. Pokud je tomu naopak, tedy že počet průduchů je vyšší na horní straně listu než na straně dolní, nazýváme takové rostliny epistomatické. Rostliny bez většího rozdílu v počtu průduchů mezi horní a dolní stranou listu nazýváme amfistomatické. Počet průduchů na ploše listu 1 mm<sup>2</sup> se pohybuje v rozmezí několika desítek až stovek. Hodnoty se ovšem liší mezi jednotlivými druhy rostlin (Mott, 1982; Cotthem, 1970).

### 2.2.1 Mechanismus otevírání a zavírání průduchů

Průduch je tvořen dvěma svěřacími buňkami (**Obr. 2**). Díky těmto buňkám je umožněn pohyb zavírání a otevírání průduchové štěrbin, která je jimi obklopena. Mechanismus zavírání a otevírání průduchů je založen na změně turgoru (vnitřního tlaku) svěřacích buněk, který se ustavuje na základě výměny látek. Zejména toku draselných iontů a vody, mezi svěřacími buňkami a buňkami okolními. Zvyšováním či snižováním turgoru dochází k otevírání nebo zavírání průduchů. A to zejména díky odlišné anatomii svěřacích buněk od buněk ostatních. Svěřací buňky mají odlišné buněčné stěny na vnější a vnitřní straně. Díky tenké a pružné vnější buněčné stěně buňka při zvýšení turgoru zvětšuje svůj objem na

jednu stranu, směrem ven od průduchové štěrbině. Vnitřní strana buněčné stěny, zpevněná radiálně uloženými mikrofibrilami, tvoří pevnou lištu směrem k průduchové štěrbině. Celá buňka se tak prohýbá pouze na jednu stranu. Tím se uprostřed dvou svěracích buněk vytvoří štěrbin a průduch se otevře. Pokud se turgor sníží, svěrací buňky průduchu se zmenšují a ochabují, a štěrbin se uzavírá (Aylor, 1973; Taiz, 2018; Pillitteri, 2013).



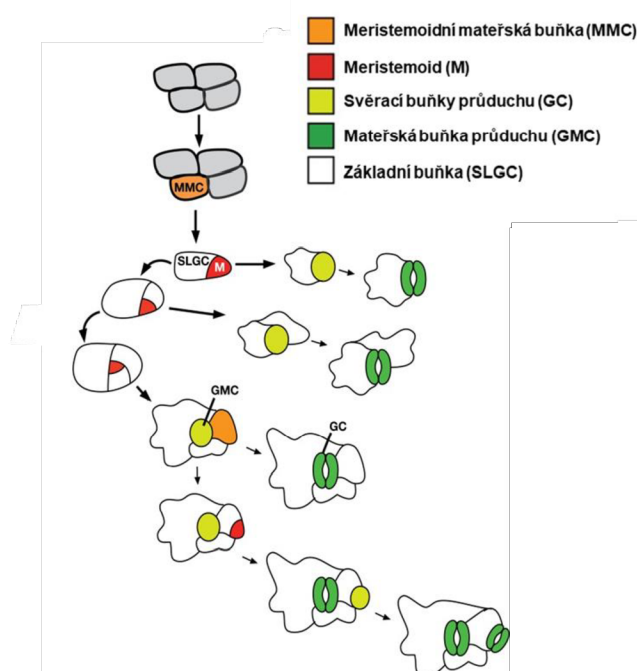
**Obrázek 2: Anatomie průduchů a jejich mechanismus otevírání a zavírání.** Při vstupu vody a draselných iontů do svěracích buněk průduchů, se zvyšuje turgor buněk a průduch se otevírá. Pokud ovšem dochází k úniku těchto látek, průduch se zavře. Upraveno podle Obpl (2018).

Pokud je v prostředí (v půdě) dostatek vody, nebo je dostatečná relativní vzdušná vlhkost, jsou průduchy otevřené. Nehrozí totiž riziko velkých ztrát vody. Pokud má ovšem rostlina málo vody, průduchy se zavírají (Agurla, 2018; Scarth, 1932). Tím se zásadně ovlivňuje výměna plynů mezi prostředím a rostlinou a průduchy tak hrají hlavní roli v transpiraci rostliny a ve fotosyntéze (Berry, 2010). Více v kapitole o roli průduchů.

Otevírání a zavírání průduchů je ovlivňováno nejen množstvím vody. Velkou roli hraje také intenzita ozáření, teplota prostředí a vnitrobuněčná koncentrace  $CO_2$  (Farquhar, 1982). Tento mechanismus může být ovšem regulován také hormonálně. Nejznámějším fytohormonem ovlivňujícím činnost průduchů je kyselina abscisová (ABA). Zvýšení její koncentrace vede k uzavření průduchů při nedostatku vody, a tedy k redukci transpirace a snížení ztrát vodní páry (Bharath, 2021). Je také známo, že zavření průduchů může být indukováno i napadením patogenem (Bharath, 2021; Melotto, 2006) o tom více v kapitole o roli průduchů.

## 2.2.2 Vývoj průduchů

Vývoj začíná meristemoidní mateřskou buňkou (MMC) (Zhao, 1999), která je protodermálního původu (Qi, 2018) a dělí se asymetricky na menší meristemoid a takzvanou základní buňku, která se většinou promění na dlaždicovou buňku (**Obr. 3**). Meristemoid má na průřezu trojúhelníkový tvar a dále se opět asymetricky rozdělí na menší meristemoid a mateřskou buňku průduchu (GMC). Menší meristemoid se může ještě jednou asymetricky členit na menší meristemoid a menší GMC. Mateřská buňka průduchů se rozděluje symetrickým dělením na dvě stejné svěrací buňky tvořící průduch (Zhao, 1999; Qi, 2018; Pillitteri, 2013). GMC lze identifikovat podle typicky oválného tvaru, zvýšené akumulaci škrobu a zesílení buněčných stěn na opačných stranách buňky, které obsahují velké množství plasmodesmat. Celkový, již zralý průduch, má vzhled připomínající fazoli nebo ledvinu (u dvouděložných rostlin) (Zhao, 1999).



**Obrázek 3: Schéma vývoje průduchů**, který začíná meristemoidní mateřskou buňkou (MMC), dělící se na menší meristemoid (M) a základní buňku (SLGC). Meristemoid se opět rozdělí na menší meristemoid a mateřskou buňku průduchu (GMC). Menší meristemoid se může ještě jednou dělit na menší meristemoid a menší GMC. Mateřská buňka průduchů se rozděluje symetrickým dělením na dvě stejné svěrací buňky (GC), tvořící průduch. Upraveno podle Pillitteri (2013).

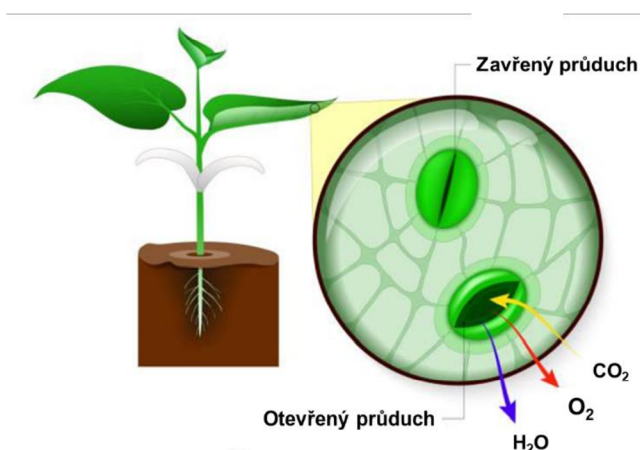
Všechny tyto buněčné přechody jsou regulovány transkripčními faktory helix-loop-helix ( $\beta$ HLH), Speechless (SPCH), MUTE a FAMA. Můžou být ovlivněny i chemickými hormony, jako jsou například brassinosteroidy, gibbereliny, auxinem nebo kyselinou abscisovou. Vznik průduchů také koreluje s vývojem mezofilních buněk, aby byl zajištěn

odpovídající fotosyntetický potenciál listu s dostatečnou kapacitou pro výměnu plynů (Qi, 2018).

### 2.2.3 Role průduchů

Jak již bylo zmíněno v dřívější kapitole, průduchy jsou póry zprostředkávající průchod přes epidermis listu mezi okolím a vnitřním prostředím rostliny. Touto cestou se do rostliny dostává  $\text{CO}_2$  (důležitý plyn pro fotosyntézu), ale také je odpařována voda (transpirace) (Hetherington, 2003) (**Obr. 4**).

Přes den, kdy je vysoká intenzita slunečního záření se průduchy otevírají a rostlina tak může přijímat  $\text{CO}_2$ . Ovšem v tu samou chvíli se přes průduch vypařuje velké množství vodní páry. V noci jsou průduchy většinou zavřené (kromě CAM rostlin) (Taiz, 2018). Regulace transpirace je proto důležitá pro správné hospodaření s vodou ale tak, aby bylo docíleno výkonné fotosyntézy (Farquhar, 1982). Díky regulaci transpirace v nepříznivých podmínkách je následně ovlivněn samotný vývoj a růst rostlinného těla (Qi, 2018).

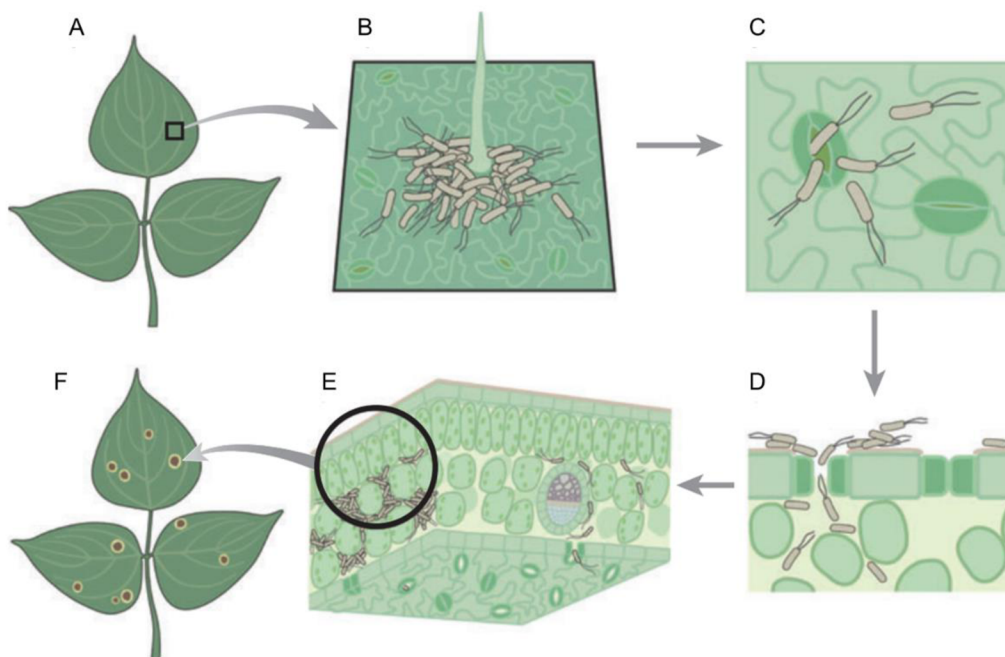


**Obrázek 4: Role průduchů v transpiraci a příjmu  $\text{CO}_2$ .** Pokud je průduch zavřený, je velmi omezen únik vody a kyslíku, ale i asimilace  $\text{CO}_2$ . Při otevření průduchu může rostlina čerpat  $\text{CO}_2$  ze svého okolí, ale také dochází k výparu vodní páry a uvolňování kyslíku. Upraveno podle Bisen (1994).

Průduchy byly dříve považovány za brány pro pasivní vstup infekce patogenu do rostlinného pletiva (Melotto, 2006; Gupta, 2020) (**Obr. 5**). Ale tím, že dokážou krátkodobě regulovat otevření průduchové štěrbin, sehraávají aktivní roli v obranné imunní odpovědi rostlin (David, 2019), na které se podílí i fytohormon kyselina salicylová (SA) nebo kyselina abscisová (Bharat, 2021; Melotto, 2006). Více v kapitole o roli SA na průduchy.

Průduchy rostliny využívají také jako obranu proti napadení patogeny. V principu rostlina rozpoznává PAMP, spouští obranou odpověď vyvolanou molekulárními vzory

spojenými s patogeny a aktivuje kanály  $\text{Ca}^{2+}$  ve svěracích buňkách, čímž se zvýší koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , která aktivuje na vápník závislé proteinové kinázy (CPK). Díky tomu se na plazmatické membráně aktivují NADPH oxidázy, které řídí transport draslíku ze svěracích buněk do buněk okolních. To zapříčiní pokles jejich turgoru, průduch se zavře (Prodhan, 2018; Khokon, 2011) a tím se zamezí přístupu patogenu do rostlinného pletiva (Melotto, 2006).



**Obrázek 5: Cyklus infekce způsobené bakterií** A) zdravé neinfikované listy rostliny, B) bakterie na povrchu listu, C)-D) bakterie vstupující do apoplastu rostliny skrz otevřené průduchy, E) množení bakterie v apoplastu listu zasažené rostliny, F) viditelná infekce (nekrózy a chlorózy) na povrchu listu. Převzato z Melotto (2008).

Rolí průduchů, jakožto brán do epidermis rostliny, je mnohem více. V této kapitole jsme ovšem představili pouze ty, které se týkají naší práce. Tj. těch, kterých se, i dle našich výsledků, účastní kyselina salicylová (fytohormon podílející se na obraně rostlin proti patogenům), kde jednou z jejích rolí je i indukce uzavření průduchů. Tento hormon detailněji nezkoumáme v imunní roli, ale zejména pro objasnění spojitosti mezi uzavíráním průduchů a malým vzrůstem nadzemních částí u rostlin s endogenně změněnou koncentrací právě této látky. Více v kapitole o kyselině salicylové a „SA-kolekci“ mutantů.

### 2.3 Kyselina salicylová (SA)

Kyselina salicylová (SA), chemicky kyselina 2-hydroxybenzoová, je fytohormon, který ovlivňuje mnoho fyziologických dějů v rostlinném těle (Ding, 2020), včetně fotosyntézy (Poór, 2019) a zavírání průduchů (Poór, 2012). Koncentrace SA v rostlinách se přirozeně zvyšuje v období, kdy rostlina kvete (Martin-Mex, 2015). Umí totiž zpomalit stárnutí

okvětních lístků (Buchanan, 2015). SA také může zvyšovat teplotu rostlin (Raskin, 1989). I přesto, že SA má vliv na vícero fyziologických dějů, nejvíce prostudována je její role v boji proti patogenům (Janda, 2015), tedy zapojení SA v rámci rostlinné imunity.

### **2.3.1 Biosyntéza SA**

Biosyntéza SA se v rostlinách odehrává dvěma drahami. První z nich je pomocí enzymu fenylalanin amoniak lyázy (PAL EC 4.3.1.24), který přeměňuje fenylalanin na trans-kyselinu skořicovou a tu na kyselinu benzoovou, která se pak přes dvě hydroxylace přemění na SA (Dempsey, 2011). Druhým enzymem zprostředkovávajícím biosyntézu SA je isochorismát syntáza (ICS EC 5.4.4.2) (Janda, 2015), který katalyzuje přeměnu chorismátu na isochorismát přeměňující se dále na SA. Touto cestou se syntetizuje až 90 % celkového objemu SA v rostlinném těle při napadení bakteriálními patogeny (Wildermuth, 2001). I PAL se účastní z části na biosyntéze SA při napadení, ovšem větší zásluhu má na bohatém zdroji metabolitů, jako jsou například flavonoidy, kumariny nebo lignany (Janda, 2014).

Po biosyntéze je většina SA převedena na jiné formy, které čekají na signál z vnitřního nebo vnějšího prostředí a ihned neindukují imunitní reakce. Hlavní zásobní formou SA je její glukosid (SAG). SA se také může methylovat na metylester-SA (MeSA). MeSA totiž může snáze prostupovat membránami buněk a přenášet signál obrany proti patogenům na delší vzdálenosti (Vlot, 2009). SA se také může přeměnit hydroxylací na kyselinu 2,3-dihydrogenbenzeovou pomocí SH3. Tato SH3 dependentní hydroxylace by mohla sloužit k prevenci nadměrné akumulace SA, protože její transkripce je indukována zvýšenou koncentrací SA v rostlinném těle (Janda, 2015).

### **2.3.2 SA jako součást odpovědi na biotický stres**

Rostliny, na rozdíl od savců nemají somatický adaptivní imunitní systém (Ausubel, 2005; An, 2011), spoléhají pouze na buněčnou vrozenou imunitu a na systémové signály vycházející z míst infekce (Dangl, 2001). SA slouží jako klíčový fytohormon v přirozené imunitě rostlin, tj. i v odolnosti vůči mnoha patogenům. Pokud je rostlina napadena, koncentrace SA se zvyšuje v infikovaných i distálních listech rostliny a stimuluje imunitní odpověď (Dempsey, 2010). I přesto, že existují dvě metabolické dráhy, ukázalo se, že při napadení patogenem je SA syntetizována především přes dráhu ICS (Ding, 2020; Wildermuth, 2001). Předchozí práce naznačovaly, že rostliny syntetizují SA při biotickém stresu z fenylalaninu (Mauch-Mani, 1996), ale v pozdějších studiích se ukázalo, že SA mohla



být stále produkována i ve chvíli, kdy její biosyntéza přes PAL byla inhibována (Coquoz, 1998).

Studie Jones (2006) navrhla tzv. „zig-zag“ model, popisující revolučním způsobem rostlinou imunitu. V první fázi jsou PAMPs rozpoznávány a spouští se tak imunita indukovaná PAMP (PTI). Ta může zastavit šíření patogenu. S cílem obejít tuto imunitní odpověď, nasazuje patogen do boje své efekторы, jejichž hlavním cílem je potlačit PTI (Lu, 2021). Takové efekторы dokáže ovšem rostlina často rozpoznat, což vede k imunitě spuštěné efekторы (ETI) (Mishina, 2007; Tsuda, 2013). ETI je zrychlená a zesílená reakce podobná té, která se odehrává při PTI. Vede k rezistenci vůči onemocněním a ve většině případů vede i k buněčné smrti v místě napadení, tzv. hypersenzitivní reakce (Jones, 2006).

Jak PTI, tak ETI vedou ke zvýšené produkci SA (Wildermuth, 2001; Tsuda, 2009). Ukázalo se, že důležitou roli pro biosyntézu SA, při spuštění imunitní reakce rostliny, mají proteiny EDS1 a PAD4 (Zheng, 2015). SA v rámci PTI a ETI hraje, ve většině případů, roli ve spuštění hypersenzitivní reakce (speciálnímu typu buněčné smrti), čímž přispívá k zabránění šíření patogenu (Janda, 2015). Tím hraje SA, mimo jiné, významnou roli v imunitě rostlin.

SA je také zásadní pro aktivaci systémově získané rezistenci (SAR). Je to situace, při níž rostlina dopraví signál o napadení z primárního místa infekce do distální části rostliny (Durrant, 2004; Kumar, 2014). Univerzální signál na dlouhou vzdálenost v rámci SAR není znám. Zdá se, že takových signálů je více a jedním z nich je pravděpodobně MeSA, který je těkavý (Dempsey, 2012; Vlot, 2009). MeSA se pomocí esterázy SABP2, v distálních částech rostliny přeměňuje na aktivní formy SA a naopak (Kumar, 2014; David, 2019).

Jednou z dalších možností, jak se SA účastní rostlinné imunity je, že přispívá k uzavření průduchů, což se může dít také v reakci na jiné stresy (Proadhan, 2018).

### **2.3.3 Vliv SA na pohyb průduchů**

Průduchy svou schopností zamezit přístupu patogenu do rostlinného pletiva hrají aktivní roli v imunitní odpovědi rostlin (David, 2019) a SA k tomu pravděpodobně přispívá (Bharat, 2021; Melotto, 2006; Lee, 1998; Khokon, 2011).

O roli SA v rámci uzavření průduchů, se neví tolik jako o vlivu ABA. Ještě, než uvedeme dostupné znalosti týkající se SA a jejího vlivu na uzavření průduchů, chtěli bychom upozornit na fakt, že veškeré experimenty se týkaly měření otevřenosti štěrbin svěřacích buněk. Touto hodnotou studie ukazovaly na uzavřenost průduchů. V žádné ze studií se

nezabývali vlastními funkcemi průduchů, jakými je především přenos plynů z prostředí do rostliny a naopak.

Uzavření průduchů pomocí SA je zprostředkováno zejména zvýšenou koncentrací reaktivních forem kyslíku (ROS) (Bharat, 2021; Hao, 2010), které jsou produkovány SHAM peroxidázami (Khokon, 2011). Vysoké množství ROS představují například vysoké akumulace  $H_2O_2$ , (Gémes, 2011) nebo  $O_2^-$  (Prodhan, 2018). Ve studii Zhang (2001) ale ukázali, že ROS reagují jako “druhý posel“ v SA signalizaci zavírání průduchů. Toto tvrzení potvrdila i studie Prodhan (2018).

Lee (1998) zjistili, exogenním ošetřením listů u druhu *Commelina communis*, že SA stimuluje transport  $K^+$  ze svěracích buněk, což později u *Arabidopsis thaliana* potvrdila (SA exogenním ošetřením) i studie Khokon (2011). Zde bylo ovšem zmíněno, že SA indukuje v cytosolu buněk oscilaci  $Ca^{2+}$ . Jiná studie ovšem říká, že po ošetření SA se v cytosolu množství  $Ca^{2+}$  nezvyšuje (Prodhan, 2018). Další možnou hypotézou je příčina zvýšení  $Ca^{2+}$  v cytosolu za účelem ochrany buněk před poškozením vysokými koncentracemi SA (Mori, 2001). Opět ale je toto tvrzení pouhou úvahou z výsledků exogenního ošetření a je zapotřebí dalšího hlubšího zkoumání, jak sama studie navrhuje (Mori, 2001). Ovšem o něco později Khokon (2017) tvrdí, že SA nemá vliv na zvýšení  $Ca^{2+}$  pouze na indukci transportu  $K^+$  ze svěracích buněk. Podobnou teorii zmínili také v Lee (1998). Podle nich je SA indukce zavření průduchů opřena o schopnost SA inhibovat katalázu, což zapříčiní zvyšování koncentrace  $H_2O_2$  (tato teorie je spekulována také v Jones (1994)). Tím se oxiduje plazmatická membrána a zvýší se permeabilita k  $K^+$ . Následný masivní transport  $K^+$  ze svěracích buněk zapříčiňuje poklesu turgoru. Což může být důvodem, proč vysoká koncentrace SA vede k uzavření průduchů.

CPKinázy, jako například CPK3 a CPK6 (Mori, 2006) a  $Ca^{2+}$  nezávislé protein kinázy Open stomata 1 (OST1) hrají zásadní roli v uzavření průduchů indukovaném ABA (Mustilli, 2002). Tento hormon je totiž vyžaduje k aktivaci pomalého anion kanálu (SLAC1), což je membránový transportér esenciální pro „slow-type“ kanál (S-typ) průduchů (Negi, 2008). Pokud se S-typ kanál aktivuje, dojde k depolarizaci plazmatické membrány a transportu  $K^+$  ze svěracích buněk (Schroeder, 1987). Bylo zjištěno (Khokon, 2017; Prodhan, 2018), že SA aktivuje S-typ kanál a že SLAC1 je nezbytným pro indukci zavření průduchů pomocí SA. Na rozdíl od ABA, SA nepotřebuje k zavření průduchu OST1 (Prodhan, 2018). I přesto, že ABA a SA sdílejí část signální dráhy (Khokon, 2017), zvýšená endogenní koncentrace ABA není nutná pro zavření průduchů indukovaného SA (Hao, 2011; Miura, 2013).



Aby došlo k indukci zavření průduchů pomocí SA, hraje důležitou roli dosažení určitých podmínek, jako například vysoké množství ROS, přítomnost CPK3 a CPK6 nebo také aktivace kanálů SLAC1 a S-type. SA signalizace vyvolávající ROS signál a následná přeměna tohoto signálu do aktivace CPK ináz svěřacích buněk je ale zatím nejasná. Další důležitou rolí v indukci zavření průduchů pomocí SA je samotná koncentrace SA nebo doba její aplikace. Čím větší koncentrací SA byla rostlina ošetřena nebo čím delší byla doba aplikace, tím bylo uzavření průduchů více indukováno (Poór, 2012; Mori, 2001). To se ukázalo také ve studiích (Okuma, 2014; Miura, 2013), kde testovali mutanty s konstitutivní změnou (po celou dobu života rostliny) koncentrace SA. V obou případech bylo indukováno, vyššími koncentracemi SA, zavření průduchů. Ve studii Manthe (1992) se také ukázalo, že důležitou podmínkou je pH prostředí, ve kterém SA působí. Nejvíce totiž SA indukovala uzavření průduchů při nízkých hodnotách pH.

Pokud se tedy zvýší koncentrace SA, průduchy dostanou signál k uzavření (Proadhan, 2018). Uzavřený průduch ovšem zamezuje přísun  $\text{CO}_2$  ke správné aktivitě fotosyntézy (Hetherington, 2003). Je tedy možné, že vysoké koncentrace SA ovlivňují i fotosyntézu.

#### **2.3.4 Vliv SA na fotosyntézu**

Ukázalo se, že SA skutečně ovlivňuje fotosyntézu (Janda, 2014), a to nejen fotosyntetické procesy (Pancheva, 1996; Janda, 2014; Poór, 2019; Fariduddin, 2003), ale také samotnou strukturu chloroplastu (Pancheva, 1996; Uzunova, 2000).

Po ošetření SA se sníží kvantový výtěžek fotochemie fotosystému I a fotosystému II (QY) (Maslenkova, 2014). Stejně tak se sníží i maximální výtěžek (Fv/Fm) fotosyntézy (Poór, 2019), celková aktivita RuBisCO (Pancheva, 1996) a také celkové nasycení zářením, které je důležité pro transport elektronů (Poór, 2019; Fariduddin, 2003). Jediné nefotochemické zhášení (NPQ) se zdá být nezávislé na ošetření vyššími koncentracemi SA (Poór, 2012). Ze studie Pluhařová (2019) je také známo, že hodnoty NPQ a QY nebyly ovlivněny ani u mutantů s vyššími koncentracemi SA (s konstitutivní změnou koncentrace SA).

Ovlivnění aktivity RuBisCO je zapříčiněno hlavně snížením celkového obsahu RuBisCO (Pancheva, 1998). Nicméně krátkodobé povrchové ošetření SA snížilo množství chlorofylu,  $\text{CO}_2$  asimilaci a také rychlost transpirace bez změny na aktivity RuBisCO (Ananieva, 2002). V přehledném článku (Janda, 2014) si to vysvětlují tím, že by ke snížení

aktivity RuBisCo mohlo dojít až sekundárně, v důsledku snížení fotosyntetické aktivity způsobené vysokou koncentrací SA.

Žádný vliv vysoké koncentrace SA na NPQ, je možné si vysvětlit tím, že se rostlina brání takzvanou fotoprotekcí (Müller, 2001). NPQ může totiž rozptýlit přebytečnou energii absorbovanou ze slunečního záření, a tím dokáže zmírnit škodlivé účinky ROS na fotosyntetický aparát (Müller, 2001). I přesto, že NPQ dokáže zmírnit škodlivé účinky ROS, při vysokých koncentrací SA se přesto struktura chloroplastů poškodí (Poór, 2019).

Jak uvádí Uzunova (2000), vysoká koncentrace SA v rostlinném těle (*Hordeum vulgare*) vytváří změny ve struktuře chloroplastů, ale i v rámci celé rostliny. Docházelo k poklesu tloušťky a zmenšení celkové plochy listů nebo zmenšení mezofylového pletiva. Z hlediska povrchu listu, bylo pletivo ošetřené vyšší koncentrací SA, složeno z menších buněk a průduchy na pokožce byly méně uspořádané, menší a velmi často uzavřené. S čímž by mohla souviset snížená rychlost asimilace CO<sub>2</sub>, pokles transpirace a maximální karboxylační účinnost (Pancheva, 1996). Po aplikaci vysoké koncentrace SA se výrazně snižoval obsah chlorofylu (Pancheva, 1996), tylakoidní membrány byly netypicky uspořádané, grana v širších a nižších stozích a celkový vzhled chloroplastů byl “vypouklější“ a kulatější struktury oproti jiným, které se nedostaly do kontaktu s vyšší hladinou SA (Uzunova, 2000).

Stejně jako u vlivu SA na uzavření průduchů i v ovlivnění fotosyntézy je velmi důležité množství aplikované SA. Čím vyšší koncentrace, pro exogenní ošetření, se ve studii použila, tím nižší účinnost a výkonnost měly procesy spojené s fotosyntézou (Fariduddin, 2003; Pancheva, 1996; Poór, 2012; Poór, 2019). Závisí také na době působení vyšší koncentrace SA (Poór, 2019) po exogenní aplikaci. Při krátkodobém (2 h) působení, neměla SA vliv na rychlost fotosyntézy, růst listů ani strukturu chloroplastu. Pokud se ovšem stejná koncentrace SA použila dlouhodobě (24 h), veškeré aktivity a stavby začaly být značně ovlivňovány (Poór, 2019; Poór, 2012; Pancheva, 1996). To může výrazně souviset s rolí SA v rámci programované buněčné smrti, resp. hypersenzitivní reakci.

Negativní vliv vyšších koncentrací SA na fotosyntetické procesy byl potvrzen také u studiích využívající mutanty, kteří mají změněnou koncentraci SA po celou dobu jejich života. Například Mateo (2006) tvrdí, že mutanti s vyšší koncentrací SA měli nižší hodnoty Fm/Fv, které byly doprovázené vyššími hodnotami NPQ. U mutantů s nižší koncentrací SA byla Fm/Fv naměřena nejvyšší oproti divokému typu i mutantů s vyššími koncentracemi SA

(Wang, 2019). V již zmíněné studii Pluhařová (2019), ale nebyly pozorovány rozdíly hodnot NPQ mezi jednotlivými mutanty s vyšší či nižší koncentrací SA.

Je nutno dodat, že ve výše zmíněných studiích se nestudovalo pouze na *Arabidopsis thaliana*, jako například u Pluhařová (2019), Mateo (2006) nebo Wang (2019), kde se tento druh rostliny používal. U ostatních se zkoumal vliv SA na druhu *Hordeum vulgare* L. (Pancheva, 1996; Uzunova, 2000; Maslenkova, 2014; Poór, 2012; Pancheva, 1998; Ananieva, 2002), na *Solanum lycopersicum* (Poór, 2019) nebo na *Brassica juncea* (Fariduddin, 2003).

Bylo ukázáno, že rostliny, které mají či přišly do kontaktu s vyššími koncentracemi SA měly také ovlivněný samotný růst rostliny. Naše studie používající mutanty SA, se snaží přispět právě k objasnění dlouhodobého vlivu vyšších koncentrací SA na vývoj rostliny, vývoj a funkci průduchů a aktivitu fotosyntézy v porovnání s jedinci s nižší koncentrací SA nebo jedinci s koncentrací podobnou divokému typu (WT).

### 2.3.5 „SA-kolekce“ mutantů

Ve většině studií, ve kterých se zkoumá vliv SA na fotosyntézu a průduchy, byl použit takzvaný farmakologický postup, tedy povrchové ošetření rostlin různými koncentracemi roztoku SA. Druhým způsobem je genetický přístup, který se opírá o genetické ovlivnění rostlin, a tedy o studium rostlinných mutantů. V tomto případě jde o mutanty s pozměněnou vnitřní koncentrací SA. Zatím jsou dostupní mutanti *A. thaliana*, kteří mají pozměněnou regulaci množství SA konstitutivně (po celou dobu života rostliny).

V této práci jsme se rozhodli využít druhého zmíněného přístupu. K tomu jsme použili tzv. „SA-kolekci“ mutantů, která byla popsána ve studii Pluhařová (2019), a kterou máme v laboratoři k dispozici. Tato „SA-kolekce“ se skládá z jedinců s vysokou akumulací kyseliny salicylové (SA[↑]), s nízkou akumulací kyseliny salicylové (SA[↓]) a s jedinci, podobající se akumulací kyseliny salicylové divokému typu (WT) (SA[WT]).

Mezi SA[↑] mutanty z „SA kolekce“ patří (dle jejich analýzy obsahu SA v Pluhařová, 2019) *pi4kβ1β2* (Preuss, 2006), *cpr1* (Jirage, 1999), *cpr5* (Boch, 1998), *snc1-1* (Zhang, 2003), *fah1/fah2* (König, 2012), *acd6* (Rate, 1999) a *bon1-1* (Li, 2007). Mutanty s nižší koncentrací SA oproti WT, představují *pad4* (Jirage, 1999), *NahG* (Nawrath, 1999) a *sid2* (Wildermuth, 2001). A mutanti SA[WT] s podobnou koncentrací SA, jako WT: *NahG/pi4kβ1β2* (Šašek, 2014), *sid2/pi4kβ1β2* (Šašek, 2014), *bon1-1/snc1-11* (Li, 2007), *edr2-6/NahG* (Vorwerk, 2007), *pmr4-1* (Nishimura, 2003), *edr2-6* (Vorwerk, 2007) a *exo70B1-1* (Kulich, 2013). Každý z mutantů má jiným způsobem pozměněnou syntézu SA.

### 2.3.5.1 SA[↑] mutanti z „SA-kolekce“

SA[↑] se společně vyznačují menším vzrůstem nadzemních částí rostlin (**Obr. 6A**) a vyšší koncentrací SA, díky čemuž má rostlina i vyšší odolnost při napadení různými typy patogenů (Bowling, 1994; Boch, 1998; Zhang, 2003; Rate, 1999; Li, 2007). Zde jsou uvedeny některé konkrétní příklady pro jednotlivé mutanty z „SA-kolekce“ se zvýšenou koncentrací SA.

Mutant *pi4kβ1β2* je takzvaný dvojitý mutant, který má mutace v genech fosfatidylinositol-4-kinázy β1 a β2 (PI4Kβ1 a PI4Kβ2), které způsobí, že jsou PI4K proteiny nefunkční (Preuss, 2006). V kolekci je ještě jeden dvojnásobný mutant s vysokou koncentrací SA, *fah1/fah2*. Tento mutant má ovlivněnou biosyntézu sfingolipidů, což se projevuje, mimo jiné, zvýšeným obsahem SA (König, 2012).

Mezi mutanty s mutací zajišťující konstitutivní expresi PR genů spojených s patogenezi (a tím zajišťující vyšší koncentraci SA a vyšší odolnost proti nákaze) se řadí mutanti s inaktivovanými geny *cpr1* (Bowling, 1994), *cpr5* (Boch, 1998) a také mutant *snc1-1*, který ale má aktivitu SNC1 proteinu zvýšenou (Li, 2001). Zvýšené obranné reakce má i mutant *bon1-1*, u kterého je tento děj způsoben inaktivací BON1 proteinu, který reguluje (inhibuje) aktivitu SNC1, jehož zvýšená aktivita, jak bylo zmíněno výše, vede k akumulaci SA (Li, 2007). Posledním mutantem SA[↑] v naší „SA-kolekci“ je *acd6*, který má takzvanou zrychlenou buněčnou smrt (accelerated cell death 6), čímž je jeho obrana proti patogenům zvýšená, což je pravděpodobně způsobeno vysokou koncentrací SA (Rate, 1999).

### 2.3.5.3 SA[↓] mutanti

Mutanti SA[↓] mají mezi společnými znaky nízkou rezistenci proti napadení patogenem, a to především díky nízké akumulaci SA v porovnání s divokým typem (WT). Velikosti listů a ostatních nadzemních částí rostlin jsou velmi podobné WT (Jirage, 1999; Nawrath, 1999; Wildermuth, 2001) (**Obr. 6B**). Zde jsou uvedeny konkrétní příklady pro jednotlivé mutanty z „SA-kolekce“ se sníženou koncentrací SA.

Mutant *pad4* má zablokovanou funkci genu *PAD4*, který hraje významnou roli v aktivaci biosyntézy SA při spuštěné imunitě a účastní se pozitivní regulační smyčky, díky které se zvyšuje množství SA. Tento mutant je náchylnější na napadení patogenem, a to zejména kvůli malé koncentraci SA (Jirage, 1999). Mutaci v genu *ICS1*, důležitého při syntéze SA v ICS dráze, má mutant *sid2*. Kvůli této mutaci se rostlina stává méně rezistentní (Wildermuth, 2001). A poslední mutant SA[↓] z naší kolekce „SA-mutantů“ je *NahG*.

V tomto případě se jedná o mutanta s vneseným cizorodým genem. Tyto rostliny exprimují gen kódující SA hydroxylázu z bakterie *Pseudomonas putida*. Tato hydroxyláza degraduje SA na katechol. Mutant *NahG* je také velmi náchylný na infekci způsobenou patogeny (Nawrath, 1999).

### 2.3.5.3 SA[WT] mutanti

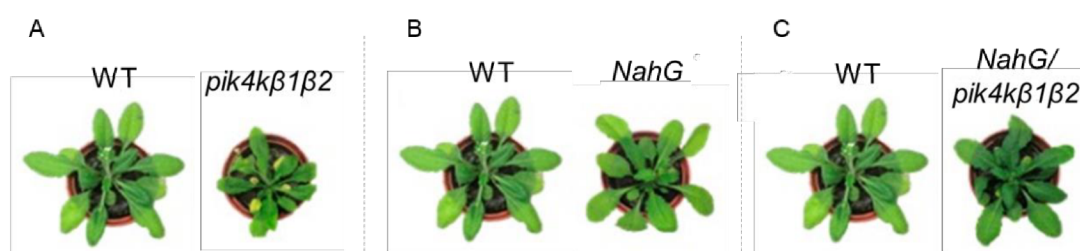
Mutanti SA[WT] mají mezi společnými znaky podobnou koncentraci SA, jako u divokého typu. Mají tím pádem i podobné vlastnosti, jako WT (**Obr. 6C**). Velikost růžice se velmi podobá WT a také rezistence vůči napadení patogeny není významně odlišná (Janda, 2015). Zde jsou uvedeny příklady pro jednotlivé mutanty z „SA-kolekce“ s podobnou koncentrací SA jako má WT.

Dvojnásobný mutant *pi4kβ1β2* byl ve studii Šášek (2014) zkřížen s *NahG a sid2* pro vznik trojitých mutantů. U obou trojitých mutantů *NahG/pi4kβ1β2* a *sid2/pi4kβ1β2* byly potlačeny charakteristiky SA[↑] projevující se v *pi4kβ1β2*. Byl tedy potlačen trpasličí fenotyp i vysoká akumulace SA (Šášek, 2014). Také u mutanta *bon1-1/snc1-11* je zakrslý růst navrácen zpět na úroveň WT (Li, 2007). V tomto případě se byla zablokována funkce genu *SNC1*, což vedlo k zamezení efektu mutace v *bon1-1*. Mutant *edr2-6/ NahG* je „dvojitý mutant“. Zde byla rezistence vůči patogenům ztracena díky expresi genu *NahG*. Vykazuje tedy stejné charakteristiky jako ostatní mutanti SA[WT] (Vorwerk, 2007).

Tito výše zmínění mutanti jsou velmi dobrou kontrolou pro pokusy, v nichž chceme prokázat roli SA. Pokud totiž nalezneme efekt SA u mutanta SA[↑], ale u jeho „zpětného mutanta“ je efekt opačný nebo se neprojeví vůbec, znamená to, že na daný děj má vliv právě koncentrace SA. Pokud by tomu tak nebylo, hrála by zde větší roli vliv mutace na jiné procesy, které s SA nesouvisí.

V „SA-kolekci“ jsou i mutanti SA[WT], kteří nejsou trojitým či dvojitým mutantem, ale přesto jejich koncentrace SA i vzhled rostliny odpovídá WT. To se ovšem ukázalo až ve studii Pluhařová (2019), do které byli tito mutanti zařazeni z důvodu očekávání (dle dostupné literatury) pozměněné koncentrace SA. Například *pmr4-1* má mutaci v genu *PMR4*. Tento gen kóduje kalóza syntázu 12, která zprostředkovává akumulaci kalózy v rámci spuštěných imunitních reakcí. V dřívější literatuře je ukázáno, že tento jedinec má zvýšenou SA dráhu při napadení patogeny (Nishimura, 2003). Další mutant *edr2-6* má mutaci v *EDR2* genu. Tento mutant vykazuje zvýšenou chlorózu a nekrózu při napadení patogenem, která koreluje se stimulací signalizace SA, ta je ale u tohoto mutanta z části potlačena. Výsledkem je fenotyp

velmi citlivý na stárnutí indukované ethylenem (Vorwerk, 2007). Posledním mutantem z „SA-kolekce“ a ze skupiny mutantů SA[WT] je *exo70B1-1*. Zde je mutace v *EXO70B1* genu, který hraje zásadní roli v autofagickém membránovém transportu, který pomáhá rostlině během stresových situací. A právě s tímto transportem souvisí i zvýšená syntéza SA, která se ovšem projeví až ve vyšším stáří rostliny (Kulich, 2013). Ve čtyřech týdnech, jak bylo měřeno v Pluhařová (2019), mají rostliny ještě stejnou koncentraci SA jako WT.



**Obrázek 6: Reprezentativní mutanti z „SA-kolekce“ v porovnání s WT. A) SA[WT] mutant *NahG* / *pi4kβ1β2* s podobnou koncentrací SA jako WT, má i podobný vzrůst. B) SA[↓] mutant *NahG* s nižší koncentrací SA, má podobný vzrůst jako WT. C) SA[↑] mutant *pi4kβ1β2* s vyšší koncentrací SA, má menší vzrůstu oproti WT. Převzato z Pluhařová (2019).**

Vysoká koncentrace SA způsobuje vyšší rezistenci proti patogenům, ale menší vzrůst nadzemních částí rostlin (Pluhařová, 2019). SA má tedy negativní účinek na růst (Janda, 2015; Pancheva, 1996). Naopak u mutantů s nižší koncentrací SA, byla imunita menší, ale vzrůst rostliny podobný či vyšší než u WT (Janda, 2015). To, jakým způsobem SA ovlivňuje malý vzrůst rostliny, není dosud známo. Obecně přijatou hypotézou je, že energii potřebnou pro vývoj SA spotřebovává na aktivovanou imunitu rostliny. Naše hypotéza se opírá o vliv vysoké koncentrace SA na uzavření průduchů a následné snížení rychlosti fotosyntézy. Představujeme si, že omezení přístupu CO<sub>2</sub> by mohl bránit správnému vývoji a fyziologickým procesům rostlin.

### 3 Cíle práce

- 1) Zavedení pěstování kolekce mutantů *Arabidopsis thaliana* se změněnou koncentrací kyseliny salicylové (dále jen „SA-kolekce“) na Katedře experimentální biologie rostlin.
- 2) Analýza koncentrace CO<sub>2</sub> uvnitř listů, hustoty průduchů a chlorofylu s využitím „SA-kolekce“
- 3) Analýza množství anthokyanů u rostlin s ovlivněnou koncentrací SA.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiály a metody

#### 4.1.1 Použité genotypy *Arabidopsis thaliana*

K práci byly použity genotypy, které jsou součástí naší tzv. „SA-kolekce“ (Pluhařová, 2019), tj. kolekce mutantů rostlin *A. thaliana*, které mají pozměněnou regulaci koncentrace SA. Pro zavedení pěstování „SA-kolekce“ byli využiti všichni mutanti. Pro analýzu hustoty průduchů, měření teploty listů a množství anthokyanů jsme vybrali pouze reprezentativní jedince z „SA-kolekce“ mutantů, a to z důvodu jejich jasného fenotypu charakterizující danou skupinu mutantů z „SA-kolekce“, ale také z důvodu stabilního chování již při analýze růstu. S vybranými jedinci, z hlediska velikosti růžice, se také lépe manipulovalo a pozorovaly se na nich lépe rozdíly. U dalších pokusů (Gazometrie, IRMS a fluorescence chlorofylu) bylo vybráno sedm reprezentativních jedinců aproximující celou „SA-kolekci“ (**Tab.1**). Jeden SA[↓] mutant (*NahG*), tři mutanti SA[↑] (*pi4kβ1β2*, *bon1-1*, *fah1/fah2*), dva mutanti SA[WT] (*NahG/pi4kβ1β2*, *bon1-1/snc1-11*) a WT. SA[WT] mutanti mají mutaci navracející fenotyp mutantů *pi4kβ1β2* a *bon1-1* zpět k fenotypu divokého typu. Tím sehrávají roli kontroly, vedle WT, ve sledování vlivu různých koncentrací SA.

**Tabulka 1:** Tabulka mutantů, které jsou součástí tzv. „SA-kolekce“ s pozměněnou regulací hladiny koncentrace kyseliny salicylové a provedené experimenty u jednotlivých genotypů.

Název genotypu	c[SA] <sup>1</sup>	Původ semen	Experiment						
			Růst	Hustota průduchů	Termokamera	Li-COR	IRMS	Anthokyany	Chlorofyl
WT	WT	1	X	X	X	X	X	X	X
<i>pad4</i>	↓	2	X	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>NahG</i>	↓	3	X	X	X	X	X	X	X
<i>NahG/pi4kβ1β2</i>	↓/WT	4	X	N.A.	X	X	X	X	X
<i>sid2</i>	↓	5	X	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>sid2/pi4kβ1β2</i>	↓/WT	4	X	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>pi4kβ1β2</i>	↑	6	X	X	X	X	X	X	X
<i>pmr4-1</i>	WT	7	X	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>cpr1</i>	↑	2	X	X	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>cpr5</i>	↑	8	X	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>bon1-1</i>	↑	9	X	X	X	X	X	N.A.	X
<i>bon1-1/snc1-11</i>	WT	9	X	N.A.	X	X	X	N.A.	X
<i>snc1-1</i>	↑	10	X	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>edr2-6</i>	WT	11	X	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>edr2-6/NahG</i>	WT	11	X	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>fah1/fah2</i>	↑	12	X	X	X	X	X	X	X
<i>exo70B1-1</i>	WT	13	X	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>acd6</i>	↑	14	X	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	X	N.A.

X – mutant byl testován, N.A. – daný mutant nebyl testován

Literatura: <sup>1</sup> Pluhařová (2019), <sup>2</sup> Jirage (1999) <sup>3</sup> Nawrath (1999), <sup>4</sup> Šašek (2014), <sup>5</sup> Wildermuth (2001), <sup>6</sup> Preuss (2006), <sup>7</sup> Nishimura (2003), <sup>8</sup> Boch (1998), <sup>9</sup> Li (2007), <sup>10</sup> Zhang (2003), <sup>11</sup> Vorwerk (2008), <sup>12</sup> König (2012), <sup>13</sup> Kulich (2013), <sup>14</sup> Rate (1999)



## 4.1.2 Způsoby pěstování *A. thaliana*

### 4.1.2.1 V zemině

Do květináčů (průměr 6 cm), které byly umístěny v plastové misce (sloužila jako podmiska na zalévání rostlin), byla vložena odblaněná rašelinová tableta (průměr 41 mm; Jiffy-7, Bohemmiaseed) (**Příloha č. 1A**). Tableta se následně zalila kohoutkovou vodou a nechala se nabobtnat. Semena (cca 30 kusů) byla nasázena na dostatečně vlhkou zeminu. Pokud se semena nesázela ihned skladovala se v lednici (4 °C). Květináče s vysázenými semeny byly umístěny do skleníků na Katedře experimentální biologie rostlin (KEBR) a semena se nechala vyklíčit. Podmínky růstu byly dvojí. V prvním případě kolekce rostla ve sklenicích na KEBR, PřF, JU, (a to v suterénu, a ve druhém patře), kde nelze zcela regulovat vlhkost či intenzitu záření. Délka záření je regulována v horním skleníku a dá se sjednotit pouze na dlouhý den. Teplota je částečně hlídána klimatizací, ale i zde se jedná o relativně široký interval teplot. V druhém případě kolekce rostla za kontrolovaných podmínek (bílé teplé světlo PPF  $\sim 130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , teplota 22 °C, délka světelné periody den/noc 10/14 h) v růstových komorách na Ústavu molekulární biologie rostlin (ÚMBR). Mezi 10. a 14. dnem stáří byly rostliny pikýrovány tak, aby v nových květináčích rostla vždy jen jedna rostlina.

### 4.1.2.2 Hydroponicky

Nejdříve byla semena vysterilizována 30% roztokem Sava (aktivní látka chlornan sodný; **Tab.2**) s přidaným (kapka) detergentem (Tween 20, Sigma Aldrich P1379) po dobu 5-7 minut. Následně byla semena 4krát až 6krát propláchnuta destilovanou vodou. Takto připravená semena byla skladována po dobu 1 až 2 dnů v lednici (4 °C) pro lepší klíčení semen. Následně byly připraveny hydroponické květináče, do kterých bylo vloženo pěstební médium grodan (Grodan delta, 4x4 cm). Ten se lehce navlhčil destilovanou vodou a napipetovala se na něj semena (**Příloha č. 1B**). Nádoba, do které se květináče ponořily, byla vyplněna destilovanou vodou. Takto připravená „SA-kolekce“ byla přenesena do fytotronů na ÚMBR. Kolekce rostla v kontrolovaných podmínkách: intenzita světla (PPFD)  $\sim 130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperioda 10/14h den/noc a teplota 22 °C. Po uplynutí 7 dnů byly semenáčky vyjednoceny, grodan přikryt alobalem tak, aby rostlina nebyla zakrytá (ochrana proti růstu řas) a destilovaná voda vyměněna za pěstební 1/4 Hoaglandův roztok (**Tab. 3**).

### 4.1.2.3 Za sterilních podmínek v Petriho misce na gelritem ztuženém ½ MS mediu

V tomto případě probíhala sterilizace semen pomocí roztoku Sava popsaná u hydroponií, jen veškeré úkony byly prováděny za sterilních podmínek ve flowboxu.

Takto připravená semena byla také skladována po dobu 1 až 2 dnů v lednici (4 °C) pro lepší klíčení semen. Následně se semena sázala na Petriho misky s ½ MS médiem obsahujícím 1% sacharózu a ztužené 1,5% Gelritem (Duchefa Biochemie, G1101.0500) (**Tab. 4**) (**Příloha č. 1C**). Hotové plotny byly zakryty parafilmem a přeneseny do místnosti určené pro kultivaci rostlin na KEBR. Zde byla nastavena délka světelné periody (10/14h den/noc), intenzita osvětlení (PPFD ~130  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) a teplota (18-20 °C). Když kolekce dorostla do vhodné velikosti (stáří 4-5 dní), jednotlivé semenáčky byly přesazeny na misky s jiným obsahem média (více v kap. 4.1.4). Hotové misky byly uzavřeny parafilmem a odneseny zpět do kultivační místnosti na KEBR. Každý týden se pořizovaly snímky skenu Petriho misek s vysázenými rostlinami pro analýzu růstu.

#### 4.1.3 Média použitá pro pěstování rostlin

**Tabulka 2:** Složení roztoku chlornanu sodného používaný na sterilizaci semen.

Látka	Množství
SAVO® (chlornan sodný 5%)	15 ml
Destilovaná voda	35 ml
Detergent: Tween 20	1 kapka

**Tabulka 3:** Složení zásobního roztoku (Hoaglandův roztok) pro hydroponie.

Látka	Objem (ml) / l l
1M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1
1M $\text{KNO}_3$	6
1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4
1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
Roztok mikroelementů a vitaminů	10
Citrát železitý	1
<i>Veškeré komponenty byly smíchány a následně čtyřikrát zředěny destilovanou vodou</i>	

**Tabulka 4:** Složení ½ MS média

Látka	Množství [g] / [l]
Murashige a Skoog včetně vitaminů	2,2 g
1 % Sacharóza	10 g
1,5 % Gelrit	15 g

**Tabulka 5:** Složení zásobního roztoku 1M kinetinu

Látka	Množství
Kinetin [40 $\mu\text{M}$ ]	68 mg
KOH	300 $\mu\text{l}$

#### 4.1.4 Chemické ošetření rostlin

Rostliny se ošetřovaly pouze u analýzy anthokyanů. Pro indukci syntézy anthokyanů byl přidán kinetin nebo 7% sacharóza (Zou, 2017). Množství anthokyanů bylo měřeno u vybraných jedinců pěstovaných hydroponicky a za sterilních podmínek v Petriho misce (kap.4.1.2).

U pěstování za sterilních podmínek v Petriho misce, byla předpěstovaná kolekce na kontrolních Petriho miskách (s 1% sacharózou) přesazena na označené Petriho misky s MS médiem, které obsahovalo 1% sacharózu (kontrola), 7% sacharózu, anebo 1% sacharózu s 40  $\mu$ M kinetinem. Na těchto médiích mutanti dál rostli. V období, kdy byly rostliny 3-4 týdny staré, se jednotlivé genotypy sesbíraly do označených Eppendorfových zkumavek a byly rychle zmrazeny v nádobě s kapalným dusíkem. Zmražené vzorky byly dlouhodobě skladovány v mrazícím boxu při -80 °C.

V hydroponickém pokusu byl do živného roztoku přidán zásobní roztok kinetinu tak, aby jeho finální koncentrace byla 40  $\mu$ M (**Tab. 5**). Zásobní roztok kinetinu byl přidán k rostlinám přes nádobu s vodou (v 3-4 týdnu stáří), tedy přes kořenový systém. Po týdnu až dvou po ošetření se vzorky sesbíraly do označených Eppendorfových zkumavek a byly vhozeny do nádoby s kapalným dusíkem pro rychlé zmrazení. Zmražené vzorky se skladovaly v chladícím boxu při -80 °C.

#### 4.1.5 Analýza růstu rostlin

Růst rostlin byl zaznamenávám fotografiemi, nebo pomocí skenu. Velikost rostlin byla určena pomocí programu pro analýzu obrazu FIJI (Schindelin, 2012) měřením průměru růžic.

#### 4.1.6 Analýza anthokyanů

Pro analýzu anthokyanů byly zmražené vzorky (kap.4.1.4) nejdříve rozdrceny v Eppendorfových zkumavkách pomocí drticích tyčinek (**Příloha č. 2**). Do rozdrceného rostlinného materiálu byl přidán 1 ml roztoku 1% kyseliny chlorovodíkové (**Tab. 6**). Připravený vzorek byl vložen do centrifugy Sigma 3K30 na 20 minut. Z odstředěného vzorku byl 1 ml supernatantu přenesen do kyvet a 4x zředěn destilovanou vodou. Hotové kyvety se vložily do spektrofotometru Specord 210 plus, kde byla změřena hodnota absorbance pro vlnové délky 528 nm a 657 nm.

**Tabulka 6:** Složení roztoku 1% kyseliny chlorovodíkové

Látka	Množství
HCl	0,1 ml
CH <sub>3</sub> OH	10 ml

#### 4.1.7 Analýza hustoty průduchů

Analýza hustoty průduchů byla prováděna z otisků listů vybraných mutantů rostlin, které rostly v zemině v horním skleníku (viz. Pěstování rostlin *Arabidopsis thaliana*) na KEBR. Tato analýza byla provedena později i na rostlinách pěstovaných na ÚMBR (kap. 4.1.2). Analyzované rostliny byly staré přibližně 8 týdnů od vysetí semen.

##### 4.1.7.1 Otisky

Na kreslicí karton byla nalepena oboustranná lepicí páska jejíž nepřilnavá část se odstranila. Nůžkami byl oddělen plně vyvinutý list z vybrané rostliny (přibližně 8 týdnů staré), nalepen požadovanou stranou na lepicí pásku a nanest se na něj rychleschnoucí průhledný lak na nehty (Rimmel London 60 Seconds Super Shine, 740 Clear). Po zaschnutí laku se na natřený list nalepil kus jednostranné lepicí pásky (izolepa). Lehce se přitlačilo na celý povrch listu a odrhla se jednostranná lepicí páska, čímž se oddělil od listu požadovaný obtisk. Takto zhotovený vzorek se nalepil na čisté popsané podložní sklíčko (**Příloha č. 3**).

##### 4.1.7.2 Mikroskopie

Zhotovené otisky se fotily buď s využitím digitálního mikroskopu Keyence VHX 5000 nalézajícím se v Laboratoři archeobotaniky a paleoekologie nebo na digitálním mikroskopu Olympus BX61 nacházejícím se na KEBR.

Průduchy na fotografiích byly označeny v programu GIMP (The GIMP Development Team, 2019). Dále se v programu FIJI (Schindelin, 2012) spočítalo množství průduchů a do Microsoft Excel se zaznamenaly výsledky a později se zde zhotovily i grafy. Počet průduchů byl vždy přepočten na plochu 1 mm<sup>2</sup>.

#### 4.1.8 Měření teploty rostlin pomocí termokamery

Určení míry uzavření průduchů bylo aproximováno pomocí měření teploty rostlin. Teplota byla analyzována pomocí termokamery (Specifikace IR kamery: FLIR P6606, 40x480 pixelů rozlišení, rozsah 8-14 mikrom, teplotní rozsah -40 až 120 °C, přesnost 2 °C, citlivost 0.06 °C při 30 °C) ve spolupráci s Ing. Marií Hronkovou, Ph.D. Vybraní mutanti byli pěstováni hydroponicky na ÚMBR (5-6 týdnů). Nejdříve se mutanti vystavili po dobu 30 minut světelnému ozáření. Podmínky, kterým byli mutanti v místnosti vystaveni představovaly:

intenzita osvětlení 300 W/m<sup>2</sup>, teplota 21,5 °C a vlhkost 38.7 kg. m<sup>-3</sup>. Později se zhotovovaly snímky termokamerou vždy s porovnáním daného mutanta s WT kontrolou. Následně se fotografie vyhodnocovaly v programu ThermoCAMReporter 9 Professional software (FLIR Systems, 2008).

#### **4.1.9 Gazometrické měření**

Rostliny, které byly pěstované hydroponicky na ÚMBR, se v období přibližně 6 týdnů stáří použily na analýzu čisté rychlosti fotosyntézy (A), průduchové vodivosti (gsw) a vnitřní koncentrace CO<sub>2</sub> v listu pomocí gazometrie. Nejdříve se zapojil přístroj LI-COR 6800 a nastavily se požadované parametry. V komoře byly nastaveny následující podmínky: průtok vzduchu 250 μmol/s, tlak 0,1 kPa, vlhkost/ množství vodní páry 1,2 kPa v listu, koncentrace CO<sub>2</sub> 410 μmol/mol, rychlost průtoku vzduchu 10000 rpm, teplota 22 °C (také u listu), osvětlení Fluorometr (r90b10). Tyto podmínky byly u všech jedinců stejné. Před měřením byla celá rostlina na 15 minut zakryta alobalem, aby došlo k temnostní adaptaci. Poté se jeden určený list uzavřel v komoře přístroje Li-COR (6800) a zahájilo se měření (**Příloha č. 4A**). Po dokončení se na listu označila část testované plochy, list se uvolnil z komory a vyměnil se za list jiné rostliny, u které byl postup stejný. Jediné, co se mohlo lišit mezi jednotlivými rostlinami, bylo nastavení plochy listu, protože někteří jedinci měli i dvakrát menší list od ostatních. Plocha listu byla aproximována tak, že pro malý list byla stanovena hodnota 1,5 cm a pro velký list hodnota 3 cm.

#### **4.1.10 Analýza obsahu izotopu <sup>13</sup>C uvnitř listu – IRMS**

Pro stanovení koncentrace CO<sub>2</sub> na základě analýzy obsahu izotopu <sup>13</sup>C v sušině listu byli vybráni jedinci z „SA-kolekce“ pěstované v zemině na ÚMBR (přibližně v 5 týdnu stáří). Nejdříve se z vybraných jedinců odstříhly listy, které se pokládaly na popsané hliníkové misky. Ty se umístily se sebraným materiálem do sušárny s nastavenými 90 °C a nechaly se sušit po dobu minimálně 24 hodin. Vysušený materiál se přemístil do označených Eppendorfových zkumavek (Eppendorf, Safe-Lock Tubec 1,5ml, 0030 120.086). Do každé zkumavky byly vloženy dvě drticí železné kuličky (**Příloha č. 4B**). Hotové vzorky se následně vložily do kulového mlýnku (Retsch, MM 400) po dobu 3 minut. Rozdrcený materiál se nechal ve zkumavkách, pouze se pinzetou vyjmully drticí kuličky.

Ze zkumavek se rozdrcený materiál navážil na vahách (Mettler toledo, MT5) s přesností na 0,00001g v rozmezí 74–106 μg do cínových kapslí. Navážené vzorky se složily do malé kuličky a vložily se do 96 jamkové destičky, odkud se následně přemístily k měření ve hmotovém spektrometru Delta XL, Thermo; s prvkovým analyzátozem EA. Tuto analýzu

zpracování hodnot prováděl Mgr. Ladislav Marek. My jsme data následně zpracovali statisticky a znázornili graficky.

#### **4.1.11 Analýza chlorofylu**

Analýza chlorofylu byla zhotovena pomocí FluorCam FC 800-C (Photon Systems Instruments) měřící fluorescenci chlorofylu. Rostliny pěstované v zemině byly v období 5–6 týdnů stáří vloženy do komory FluorCamu. U saturačního světla se nastavila hodnota 50 a u aktinického světla hodnota 9. Citlivost byla nastavena na 26 %. Vybraní jedinci se vložily na vyvýšenou plošinu v komoře FluorCamu tak, aby byly rostliny dobře vidět na kameře pro analýzu. Zahájilo se měření. Výsledky se upravily v programu FluorCam 7.0 (FluorCam, 2019) a poté se vyhodnotily v programu MS Excel.

#### **4.1.12 Zpracování dat, tvorba grafů a statistické vyhodnocení dat**

Všechna data byla zpracována v MS Excel. Tvorba grafů byla provedena v programu MS Excel a PowerPoint. T-test byl proveden u analýzy růstu, hustoty průduchů a měření teploty rostlin v programu MS Excel. ANOVA s následným Tukey post hoc test byla provedena u měření IRMS a fluorescence chlorofylu v programu Prism 9.3.1 GraphPad.

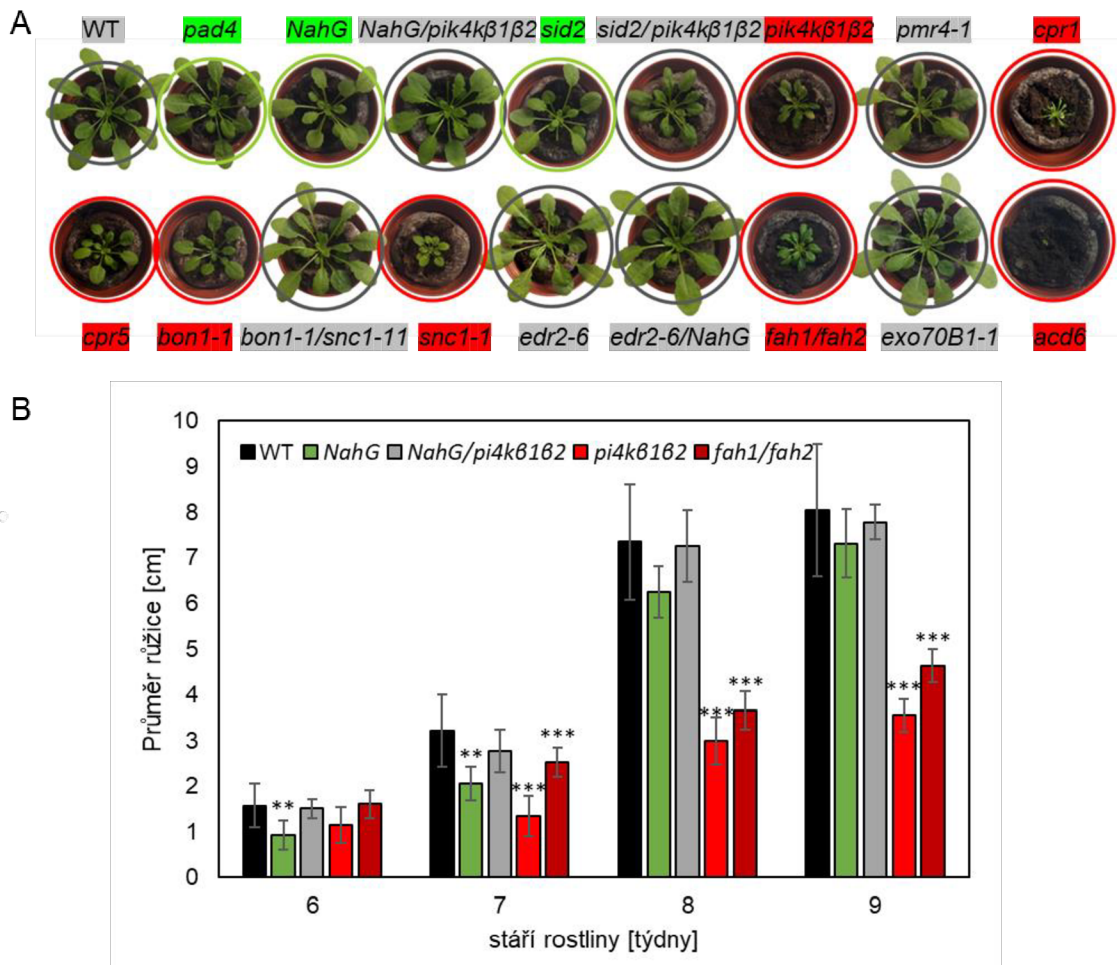
## 4.2 Výsledky

### 4.2.1 Zavedli jsme pěstování „SA-kolekce“ na KEBR, PŘF JU

Vzhledem k situaci, že v době, kdy jsem začala řešit svou bakalářskou práci, můj školitel zakládal naši laboratoř, bylo nutné zavést pěstování *A. thaliana* v podmínkách KEBR JU. Základním vzorkem genotypů *A. thaliana*, o kterém jsme věděli, jak by se měly při pěstování chovat, byla „SA-kolekce“. Současně se „SA-kolekce“ měla stát základním nástrojem našeho budoucího výzkumu. Proto jsme otestovali růst „SA-kolekce“ za tří rozdílných podmínek pěstování (viz kapitola 4.1.2). U všech třech podmínek pěstování kolekce se nám potvrdila fenotypová rozdílnost mezi genotypy podobně, jak je zmíněno ve studii Pluhařová (2019).

#### 4.2.1.1 Pěstování v zemině ve sklenících

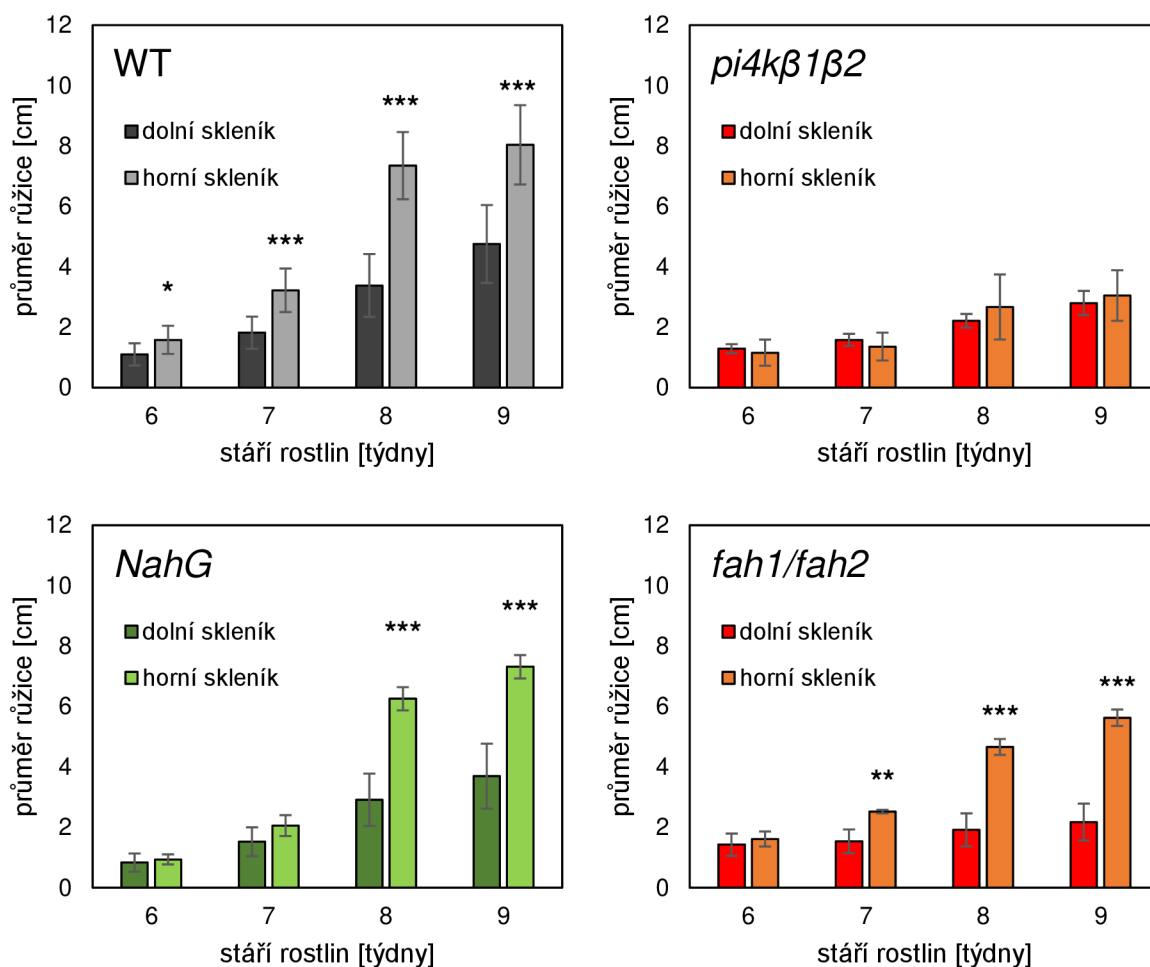
Z našeho pěstování v zemině (v horním skleníku) vyšlo najevo, že všech sedm mutantů SA[↑], je oproti WT výrazně menšího vzrůstu (**Obr. 7A**). Ostatní mutanti SA[↓] a SA[WT] měli fenotyp podobný WT. Rozdíl ve velikosti růžic se mezi WT a SA[↑] v průběhu času zvětšoval. Největší rozdíl byl 8. a 9. týdnů (**Obr. 7B**). Tato tvrzení se nám potvrdila i u dalších opakování růstu v zemině (různé podmínky: skleníky, růstová komora) a také u hydroponií. Avšak u růstové komory a hydroponií jsme již nikdy netestovali všech osmnáct genotypů najednou.



**Obrázek 7: A) Reprezentativní fotografie růstu „SA-kolekce“ *Arabidopsis thaliana* pěstovaných v zemině ve skleníku KEBR. Prezentované rostliny byly 8 týdnů staré. B) Porovnání vybraných jedinců z „SA-kolekce“, kteří byli pěstováni v zemině. U všech týdnů pro WT n=9, pro ostatní jedince n=3. Hodnoty sloupců reprezentují průměr a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hvězdičky znázorňují statisticky významný rozdíl v průměru růžice mutantů v porovnání s WT v daném týdnu (\*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; oboustranný t-test). Šedivá barva a její odstíny znázorňuje divoký typ (WT) nebo jedince podobné WT z hlediska koncentrace SA. Zelená barva znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA než WT. Červená barva a její odstíny znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA než WT.**

Dále jsme zjistili, že při pěstování kolekce SA ve sklenících na KEBR (v zemině) byl rozdíl ve velikosti růžic mezi skleníkem horním a dolním. Přesněji, jak je ukázáno v grafu (Obr. 8), v horním skleníku rostly rostliny obecně rychleji než ve skleníku dolním, s výjimkou mutantu *pi4kβ1β2* (SA[↑]). Rychlejší růst v horním skleníku lze přičíst faktu, že zde byly rostliny dosvěčovány umělým světlem.



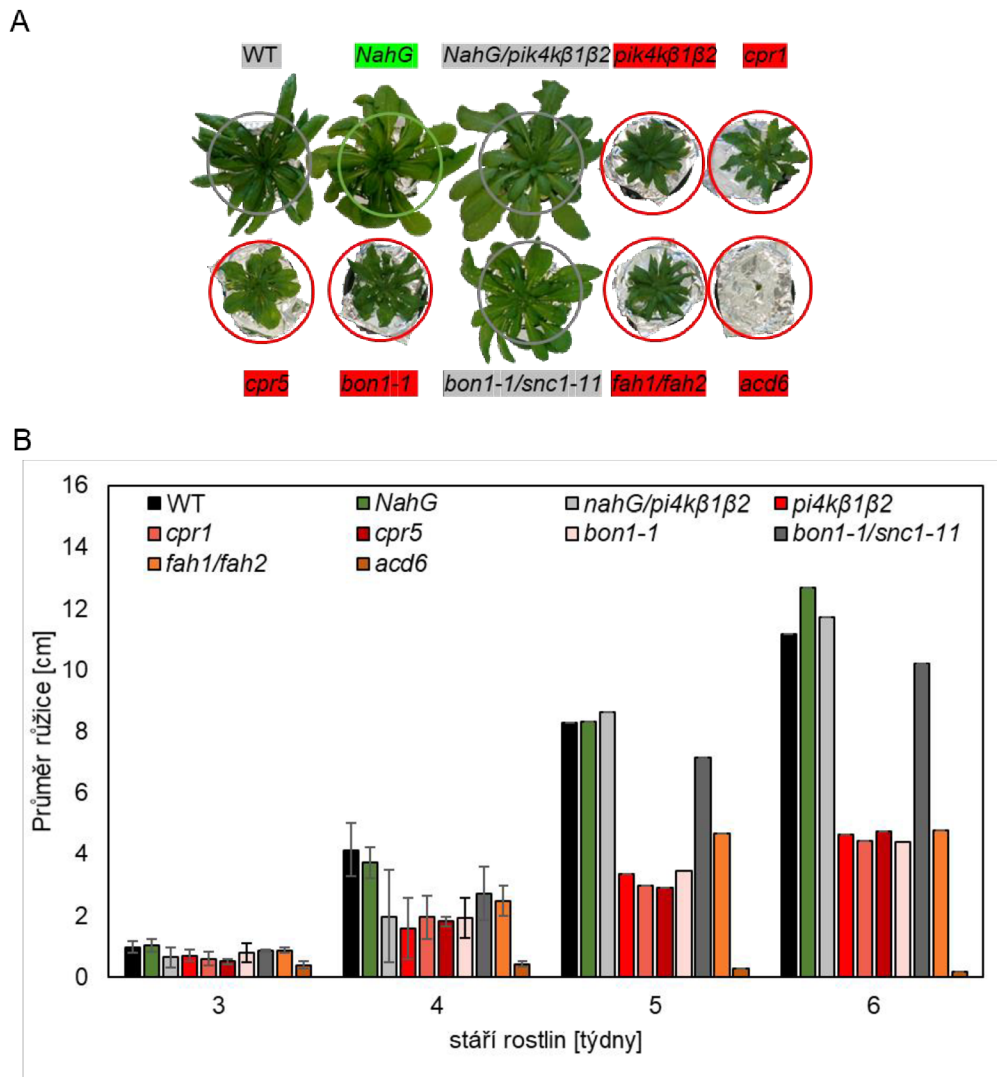


**Obrázek 8: Rozdíly v růstu *A. thaliana* mezi horním a dolním skleníkem na KEBR.** Ukázka růstu vybraných genotypů „SA-kolekce“ *Arabidopsis thaliana* pěstovaných v zemině. Pro dolní skleník n=6 (u WT n=14); horní skleník n=3 (WT=8). Hodnoty sloupců reprezentují průměr a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hvězdičky znázorňují statisticky významný rozdíl v průměru růžice mezi rostlinami v dolním a horním skleníku (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; oboustranný t-test). Zelená barva znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA oproti WT. Červená barva znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA oproti WT. Tmavší odstín barvy představuje dolní skleník, zatímco světlejší odstín horní skleník.

Fotografie, ze kterých jsme měřili velikost růžic, jsme pořídili v různých intervalech stáří rostlin: 6 týdnů, 7 týdnů, 8 týdnů a 9 týdnů staré rostliny. Největší rozdíl ve velikosti růžic mezi jednotlivými skleníky začal v 8. týdnu stáří (**Obr. 8**). Pouze mutant *pi4kβ1β2* (SA[↑]) neměl velikostně rozdílné růžice ani v 9. týdnu. Obecně SA[↑] mutanti vykazují dříve znaky senescence, což je v souladu i s literaturou (Janda, 2015). Z pozdějších opakování pěstování „SA-kolekce“ v již kontrolovatelných podmínkách se nám také potvrdily informace, které byly publikovány ve studii Pluhařová (2019).

#### 4.2.1.2 Pěstování SA kolekce hydroponicky

Z našeho pěstování kolekce hydroponicky vyšlo najevo, že všichni mutanti SA[↑] jsou oproti WT výrazně menšího vzrůstu (**Obr. 9A**). Ostatní mutanti SA[↓] a SA[WT] měli fenotyp podobný WT. Podobně jako u zeminy se rozdíl ve velikosti růžic mezi WT a SA[↑] v průběhu času zvětšoval (**Obr. 9B**). Zde jsme fotografie pořizovali v intervalech stáří rostlin: 3 týdnů, 4 týdnů, 5 týdnů a 6 týdnů staré rostliny. Také zde se nám potvrdily informace, které byly publikovány ve studii Pluhařová (2019).



**Obrázek 9: Vybraní mutanti „SA-kolekce“, kteří byli pěstováni v hydroponii.**

**A)** Reprezentativní fotografie růstu „SA-kolekce“ *Arabidopsis thaliana* pěstovaných na ÚMBR. Prezentované rostliny byly 6 týdnů staré. **B)** Porovnání vybraných jedinců z „SA-kolekce“, kteří byli pěstováni v hydroponii. Pro 3. a 4. týden  $n=3$ , pro 5. a 6. týden  $n=1$ . Hodnoty sloupců reprezentují průměr a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Z důvodu nízkého počtu rostlin u 5. a 6. týdne jsme neprováděli statistické vyhodnocení. Šedivá barva a její odstíny znázorňuje jedince WT nebo WT podobné z hlediska koncentrace SA. Zelená barva a její odstíny znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA oproti WT. Červená barva a její odstíny znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA oproti WT.

#### 4.2.1.3 Pěstování „SA-kolekce“ za sterilních podmínek

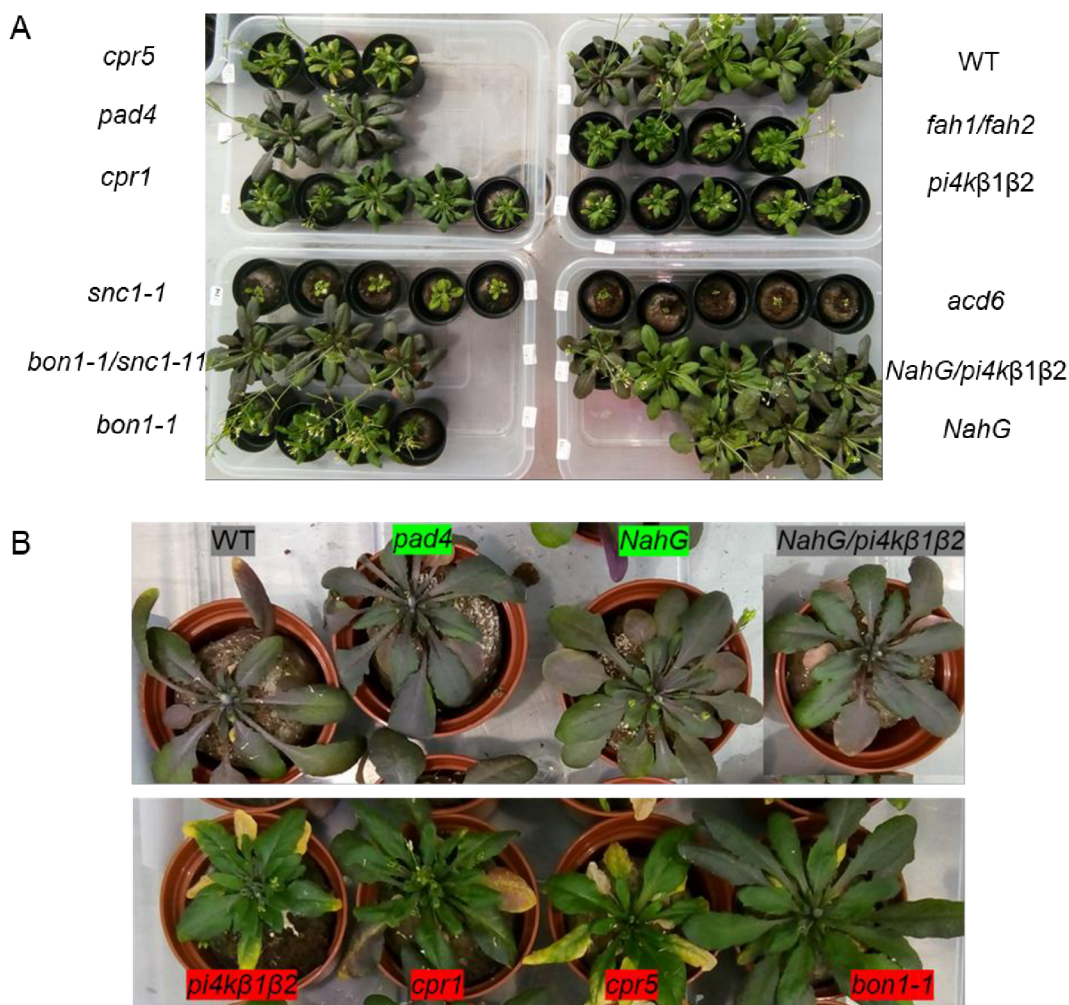
Během pěstování „SA-kolekce“ hydroponicky se během prvních týdnů růstu rostliny od sebe, z hlediska velikosti nadzemních částí rostlin, zásadně neodlišovaly. Jakmile byly rostliny starší, začala se mezi nimi viditelněji rozlišovat velikost růžice. Podobné chování růstu rostlin jsme zpozorovali také při pěstování vybraných jedinců „SA-kolekce“ ve sterilních podmínkách na ztuženém médiu (plotny), kde jsme pořizovali snímky růstu rostlin častěji než u jiných metod (**Obr. 10**).



**Obrázek 10: Porovnání třech ploten s vysázenými vybranými jedinci z „SA-kolekce“ v průběhu třítýdenního pěstování.**

#### 4.2.1.4 Dlouhodobé pěstování „SA kolekce“

I přesto, že se mutanti lišili velikostí listové růžice, kvést začali v podobnou, ne-li ve stejnou dobu (**Obr. 11A**). Pouze mutant *acd6* ( $SA[\uparrow]$ ) nezačal kvést vůbec. Při pěstování kolekce jsme si také povšimli fialového zbarvení listů u WT,  $SA[\downarrow]$  a  $SA[WT]$  mutantů (**Obr. 11B**).



**Obrázek 11: A) Kvetení u „SA-kolekce.** Rostliny *A. thaliana* 10 týdnů staré, pěstované ve skleníku. **B) Začátek fialovění WT, SA[↓] a SA[WT] mutantů.** Rostliny byly 7 týdnů staré a pěstované v dolním skleníku. Šedivá barva znázorňuje jedince WT nebo WT podobné z hlediska koncentrace SA. Zelená barva znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA oproti WT. Červená barva znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA oproti WT.

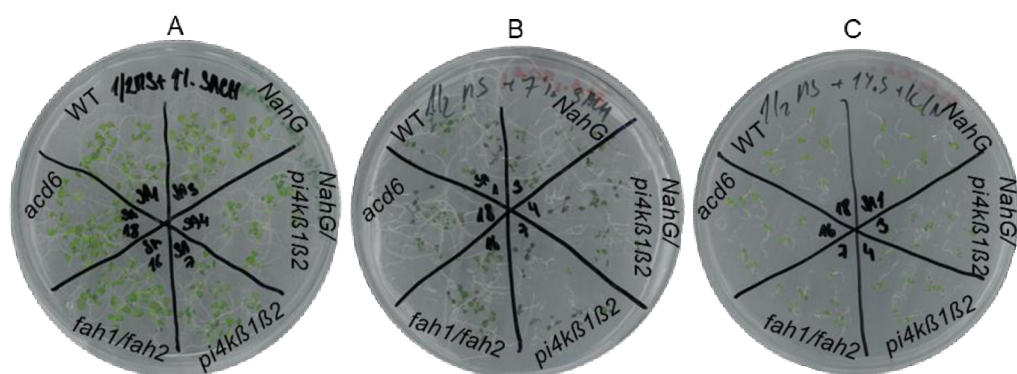
#### 4.2.2 Zvýšená koncentrace SA inhibuje tvorbu anthokyanů

V průběhu testování růstu rostlin *A. thaliana* jsme si povšimli, že SA[↓] a SA[WT] v pozdějších stádiích růstu vykazují fialovění, zatímco SA[↑] nikoliv (**Obr. 11B**). Z toho důvodu jsme se u vybraných genotypů rozhodli na toto fialovění zaměřit a sledovat možnost inhibice tvorby anthokyanů skrze zvýšenou koncentraci SA. V literatuře jsme našli (Zou, 2017) dvě chemicky indukovatelné podmínky tvorby anthokyanů (7% sacharóza; 40  $\mu$ M kinetin).

Pro jednoduchost jsme začali s rostlinami pěstovanými za sterilních podmínek na Petriho misce. Tvorbu anthokyanů jsme indukovali pomocí MS média s obsahem 7% sacharózy (kontrola obsahuje 1% sacharózu) nebo s živným roztokem obsahující

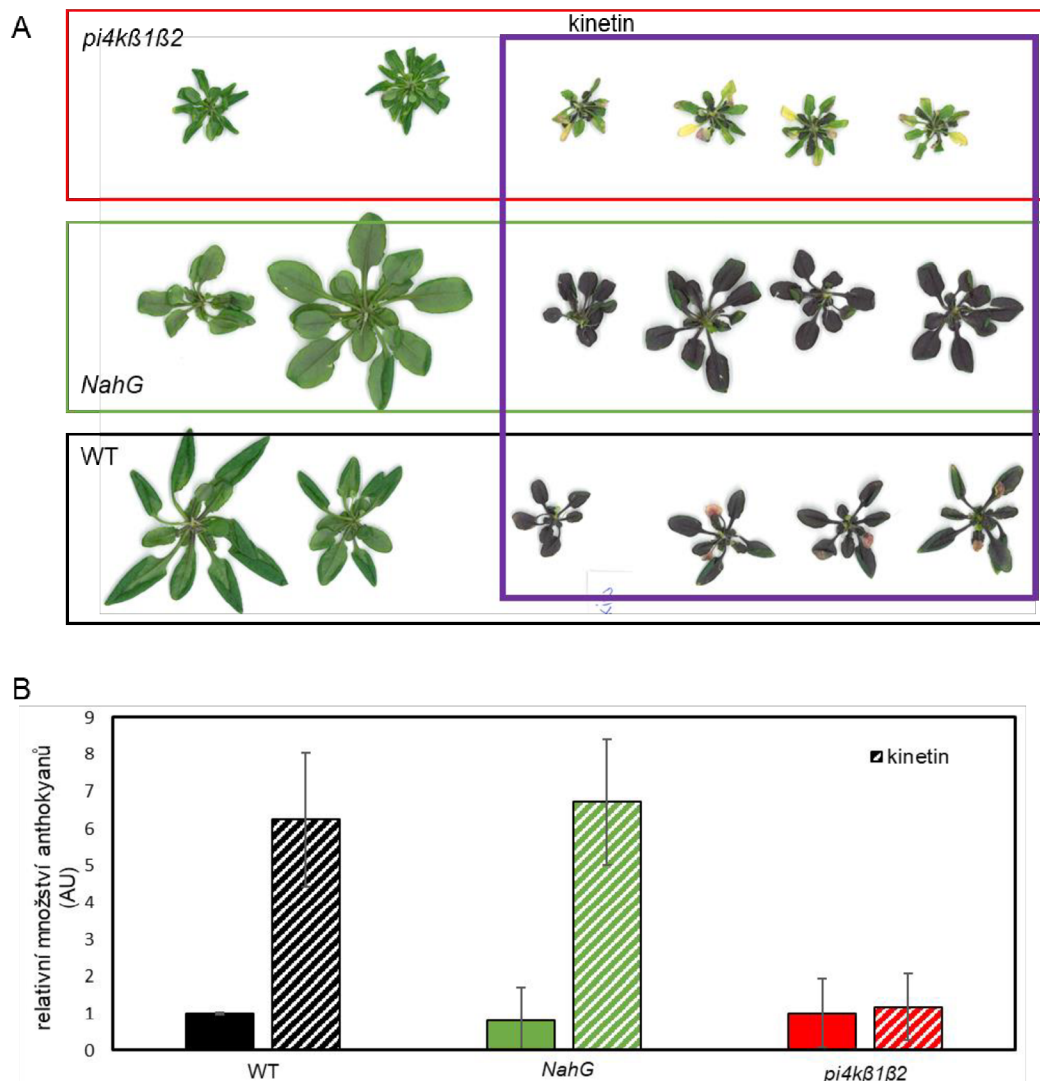


40  $\mu\text{M}$  kinetin. Analyzovali jsme, jak fialovění, tak růst semenáčků. Díky pravidelnému pořizování snímků a pozorování Petriho misek s nasázenou „SA-kolekcí“ je patrné, že na MS médiu s 1% sacharózou rostliny nezačaly fialovět (**Obr. 12A**). V případě MS média se 7% sacharózou (**Obr. 12B**) byla syntéza anthokyanů indukována u všech jedinců za každého opakování. V tomto typu pěstování neměl kinetin velký význam na indukci anthokyanů v rostlinách (**Obr. 12C**). Tato data byla vyhodnocena pouze vizuálně z pravidelných snímků skenování. V budoucnu bude zapotřebí zhodnotit obsah anthokyanů za těchto podmínek také pomocí spektrofotometrické metody.



**Obrázek 12: Vybraní mutanti „SA-kolekce“ pěstování za sterilních podmínek na Petriho miskách. A) pěstování na MS médiu s 1% sacharózou, B) pěstování na MS médiu s 7% sacharózou, C) pěstování na MS médiu s 1% sacharózou a 40  $\mu\text{M}$  kinetinem**

U rostlin pěstovaných v zemině není jednoduché ošetření 7% sacharózou či 40  $\mu\text{M}$  kinetinem. Pravděpodobně by se musely rostliny ošetřovat infiltrací přímo do listu, nebo s využitím vakuové infiltrace. Proto jsme se rozhodli testovat efekt 40  $\mu\text{M}$  kinetinu u rostlin pěstovaných hydroponicky. Ošetřovali jsme tak, že kinetin byl přidán do růstového média, tedy ošetření probíhalo ke kořenům a nebyla jím přímo ovlivněna růžice. Po ošetření 40  $\mu\text{M}$  kinetinem, bylo fialovění vizuálně zřetelné již po týdnu od aplikace (**Obr. 13A**) s porovnáním s jedinci bez kontaktu s kinetinem. Pouze mutant *pi4k $\beta$ 1 $\beta$ 2* (SA[ $\uparrow$ ]) nezfialověl, jak dokazují i výsledky ze spektrofotometru (**Obr. 13B**). U jedinců, ke kterým byl přidán kinetin, měli množství anthokyanů vyšší v porovnání s jedinci (stejného genotypu), ke kterým přidán nebyl. Jediný mutant *pi4k $\beta$ 1 $\beta$ 2* (SA[ $\uparrow$ ]) nebyl fialový ani poté, co se dostal do kontaktu s kinetinem. To značí SA negativní regulaci množství anthokyanů.



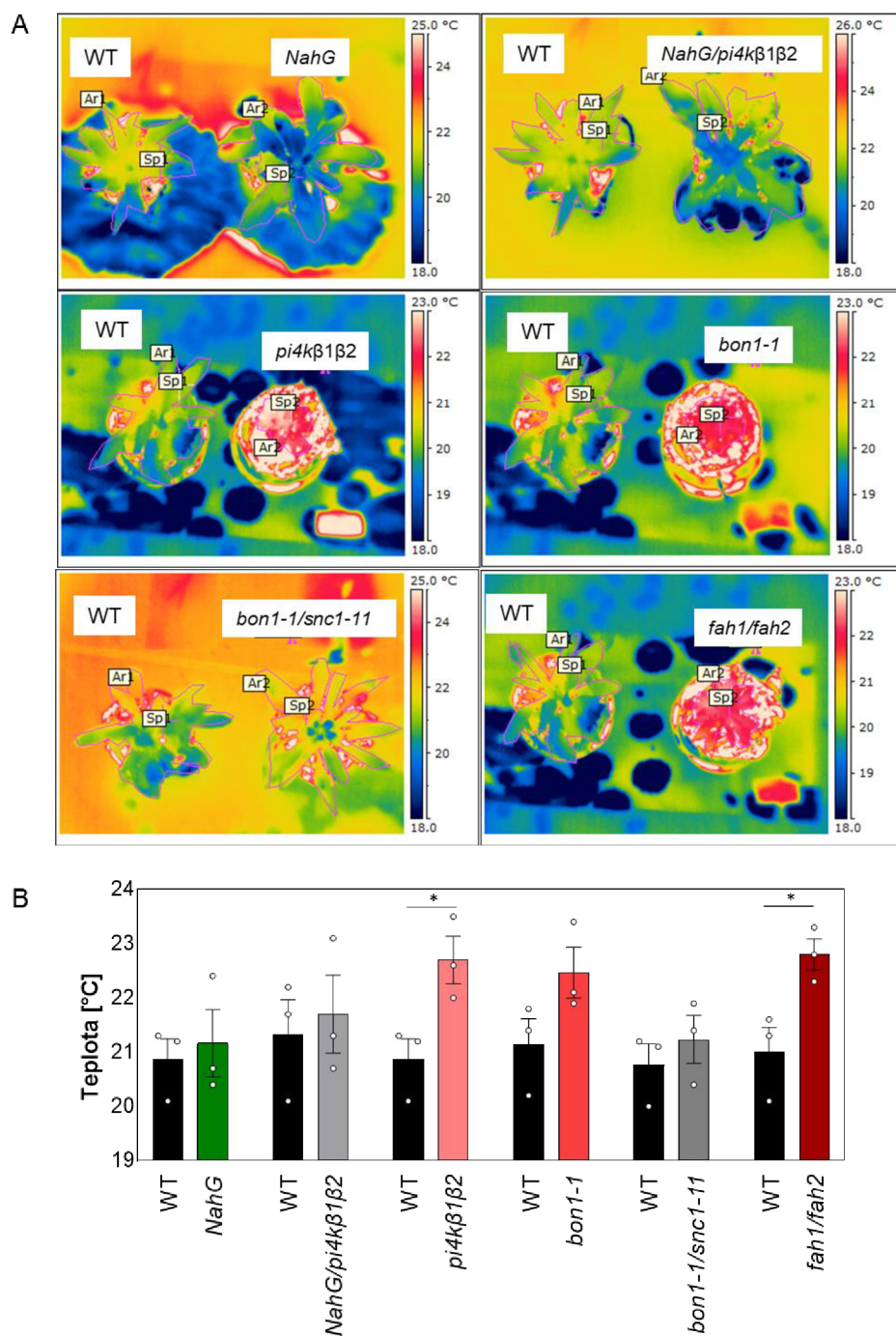
**Obrázek 13: Porovnání rostlin pěstovaných v hydroponii s indukcí syntézy anthokyanů kinetinem a bez indukce. A)** Repräsentativní rostliny byly 5 týdnů staré, 1 týden po aplikaci kinetinu. Ve fialovém obdélníku jsou jedinci ošetřeni kinetinem. **B)** Graf porovnávající množství anthokyanů indukované kinetinem a bez indukce. Hodnoty reprezentují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku. Rostliny s indukcí kinetinem  $n=4$  (sloupečky se vzorem), rostliny bez indukce syntézy anthokyanů  $n=2$  (sloupečky bez vzoru). Černá barva znázorňuje jedince WT. Zelená barva znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA oproti WT. Červená barva znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA oproti WT.

#### 4.2.3 Zvýšená koncentrace SA vede ke změně funkce průduchů

Dřívější experimenty ukázaly, že ošetření SA vede k uzavření průduchů (Bharat, 2021; Melotto, 2006; Lee, 1998; Khokon, 2011). Vždy toto zjištění bylo odvozeno na základě měření velikosti šterbiny mezi svěracími buňkami. Rozhodli jsme se zaměřit na efekt endogenně produkované SA (s využitím „SA kolekce“) na uzavřenost (funkci) průduchů, a to jinými technikami, než je uzavřenost šterbiny.

#### 4.2.3.1 Mutanti se zvýšenou koncentrací SA vykazují vyšší teplotu listů

Transpirace skrze průduchy mimo jiné reguluje teplotu listů. Obecně platí, že čím více jsou průduchy uzavřené, tím je teplota listu vyšší. Otevřené průduchy umožňují odpařování vodní páry, skupenské teplo potřebné k přeměně vody ve vodní páru se odnímá z povrchu listu a vede tak k jeho ochlazení. Uzavřením průduchů dojde k omezení výparu (transpirace) a list se tak na světle zahřívá. Pro analýzu míry uzavřenosti průduchů jsme tedy vybrané jedince pěstované hydroponicky vyfotografovali pomocí termokamery. Analyzovali jsme 3 rostliny od každého genotypu, určili průměrnou teplotu z celých listových růžic a vypočetli průměrnou teplotu pro každého mutanta. Z fotografií (**Obr. 14A**) je patrné, že mutanti s vyšším obsahem SA (*fah1/fah2*, *bon1-1*, *pik4kβ1β2*) mají vyšší teplotu oproti WT. Statisticky ovšem vyšel průkazný rozdíl teploty oproti WT pouze u mutantů *fah1/fah2* a *pik4kβ1β2* (**Obr. 14B**). Zde byl zjištěn rozdíl v teplotě listů více než 1°C. U ostatních jedinců s nižší nebo podobnou koncentrací SA jako WT se statisticky neprokázal teplotní rozdíl v porovnání s WT.



**Obrázek 14: Rozdíly v teplotě listů vybraných genotypů „SA-kolekce“ pěstovaných hydroponicky. 5týdenní rostliny *A. thaliana*. A) Reprezentativní infračervené snímky. B) Vyhodnocení teplot ze tří rostlin, kdy byl vždy mutantní genotyp porovnáván (vyfocen) spolu s kontrolní rostlinou (WT). Hodnoty znázorňují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ze tří nezávislých rostlin. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl mezi WT a mutantem (\* $p < 0,05$ ; oboustranný studentův t-test). Šedivá barva a její odstíny znázorňuje jedince WT nebo WT podobné z hlediska koncentrace SA. Zelená barva a její odstíny znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA oproti WT. Červená barva a její odstíny znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA oproti WT.**



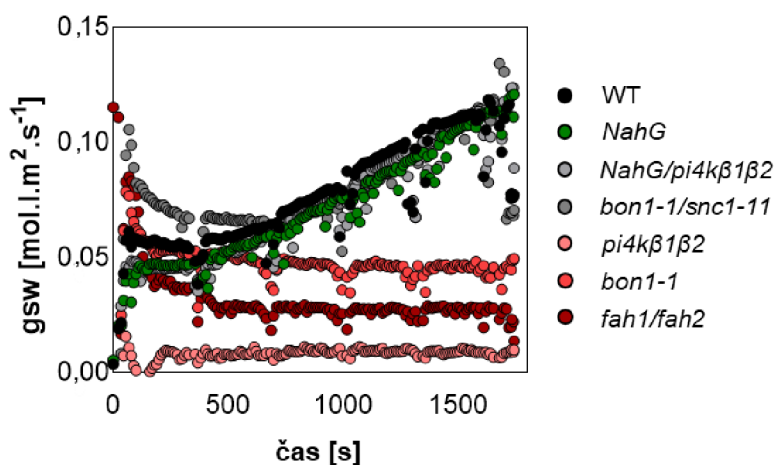
#### 4.2.3.2 Činnost průduchů je inhibována zvýšenou koncentrací SA

Společně s výsledky dokazující vliv SA na teplotu listu, jsme se rozhodli zjistit, zda zvýšené koncentrace SA ovlivňují také činnost průduchů. Proto jsme využili přístroj LICOR 6800 pro gazometrickou analýzu. Z těchto dat jsme schopni určit rychlost fotosyntézy ( $A$ ), vodivost průduchů ( $g_{sw}$ ) a vypočítat přibližnou vnitřní koncentraci  $CO_2$  v mezibuněčném prostoru listu ( $C_i$ ).  $A$ ,  $g_{sw}$  i  $C_i$  bylo změřeno vždy u čtyřech rostlin od genotypu, z čehož se následně vypočítal průměr.

Pro další metodu, která by nám pomohla zjistit stav obsahu  $CO_2$  uvnitř listu, jsme se rozhodli využít analýzu obsahu izotopu  $^{13}C$  pomocí metody IRMS. Množství izotopu  $^{13}C$  nám pomůže poukázat na relativní množství  $CO_2$  v rostlině. Pokud je naměřeno více izotopu  $^{13}C$ , znamená to, že v rostlinném pletivu je k dispozici méně  $CO_2$  oproti kontrole.

##### Vodivost průduchů

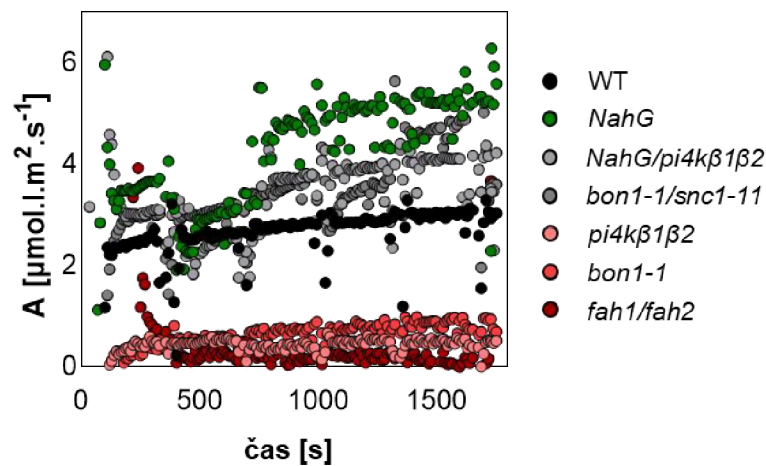
Nejdříve jsme změřili vodivost průduchů ( $g_{sw}$ ). Všichni mutanti s vyšší koncentrací SA (*pik4kβ1β2*, *bon1-1*, *fah1/fah2*) měli nižší vodivost průduchů, a to zejména v polovině čase měření. Mutanti *NahG/pik4kβ1β2* (SA[WT]) a *NahG* (SA[↓]), ale také WT vykazovali rychlejší nárůst vodivosti průduchů oproti jedincům s vyšší koncentrací SA (*pik4kβ1β2*, *bon1-1*, *fah1/fah2*), kde byl nárůst pomalejší (Obr. 15).



**Obrázek 15: Gazometrická analýza vybraných genotypů „SA-kolekce“ - vodivost průduchů v čase [ $g_{sw}$ ].** Rostliny *A. thaliana* byly pěstovány hydroponicky. Stáří rostlin 6 týdnů. Jedná se o průměry ze čtyř měřených rostlin. Šedivá barva a její odstíny znázorňuje jedince WT nebo WT podobné z hlediska koncentrace SA. Zelená barva a její odstíny znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA oproti WT. Červená barva a její odstíny znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA oproti WT.

### Rychlost fotosyntézy

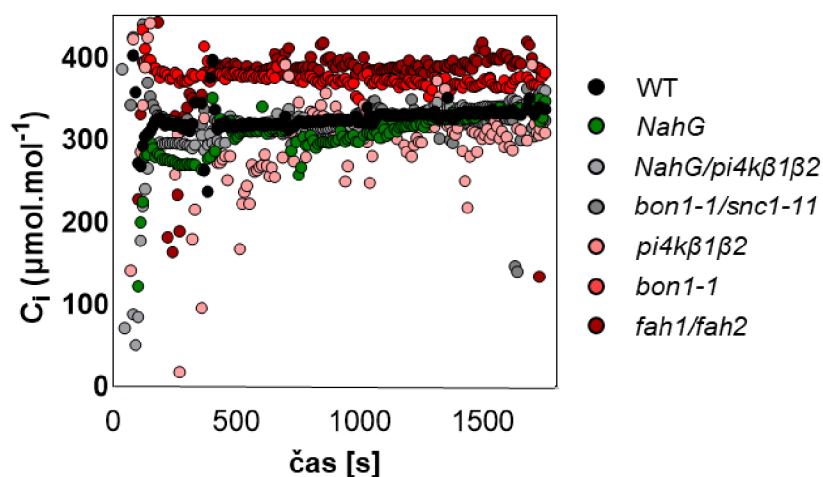
Jako další jsme změřili rychlost fotosyntézy (A) (**Obr. 16**). Z těchto výsledků je zřejmé, že mutanti *pik4kβ1β2*, *bon1-1*, *fah1/fah2* (SA[↑]) měli o několik řádů nižší rychlost fotosyntézy než WT. Mutant *NahG* (SA[↓]) vykazoval nejvyšší hodnoty rychlosti fotosyntézy ze všech mutantů. Všichni mutanti, kteří mají podobnou nebo stejnou koncentraci SA jako WT (*NahG/pik4kβ1β2*, *bon1-1/snc1-11*) a WT, měli vyšší rychlost fotosyntézy než mutanti s vyšší koncentrací SA (*pik4kβ1β2*, *bon1-1*, *fah1/fah2*), ale nižší než mutant SA[↓]



**Obrázek 16: Gazometrická analýza vybraných genotypů „SA-kolekce“ - rychlost fotosyntézy v čase [A].** Rostliny *A. thaliana* byly pěstovány hydroponicky. Stáří rostlin 6 týdnů. Jedná se o průměry ze čtyř měřených rostlin. Šedivá barva a její odstíny znázorňuje jedince WT nebo WT podobné z hlediska koncentrace SA. Zelená barva a její odstíny znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA oproti WT. Červená barva a její odstíny znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA oproti WT.

### Vnitřní koncentrace CO<sub>2</sub>

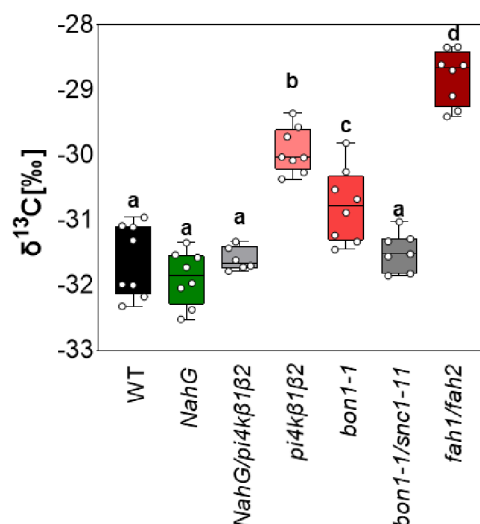
Dále jsme měřili koncentraci CO<sub>2</sub> ve vybraném listu (C<sub>i</sub>). Mutanti SA[↑] se pohybovali ve vyšších hodnotách C<sub>i</sub>. Pouze mutant *pik4kβ1β2* (SA[↑]) měl hodnoty vnitřní koncentrace CO<sub>2</sub> nižší oproti ostatním mutantům s vyšší koncentrací SA, ale podobnou s SA[WT], SA[↓] a WT. Mutanti SA[WT] a SA[↓] měli podobné hodnoty jako WT (**Obr. 17**).



**Obrázek 17: Gazometrická analýza vybraných genotypů „SA-kolekce“ – vnitřní koncentrace CO<sub>2</sub> v čase (C<sub>i</sub>).** Rostliny *A. thaliana* byly pěstovány hydroponicky. Stáří rostlin 6 týdnů. Jedná se o průměry ze čtyř měřených rostlin. Šedivá barva a její odstíny znázorňuje jedince WT nebo WT podobné z hlediska koncentrace SA. Zelená barva a její odstíny znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA oproti WT. Červená barva a její odstíny znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA oproti WT.

#### Obsah izotopu <sup>13</sup>C

Obsah izotopu <sup>13</sup>C jsme měřili v rostlinné sušině. Jedinci s vyšší koncentrací SA (*pik4kβ1β2*, *bon1-1*, *fah1/fah2*,) měli vyšší hodnoty izotopu <sup>13</sup>C než WT a další mutanti s jinak pozměněnou koncentrací SA. Jedinci SA[WT] (*NahG*, *NahG /pik4kβ1β2*, *bon1-1/snc1-11*) se s obsahem izotopu <sup>13</sup>C oproti WT nelišili. Naše výsledky ukazují, že vyšší koncentrace SA obecně koreluje s vyššími hodnotami poměru izotopu <sup>13</sup>C vůči izotopu <sup>12</sup>C (**Obr. 18**).



**Obrázek 18: Hodnoty poměru izotopu <sup>13</sup>C a izotopu <sup>12</sup>C z IRMS měření sušiny listu.** 5týdenní rostliny *A. thaliana* pěstované v zemině. Hodnoty představují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku z n=4. Různá písmena znázorňují statisticky významnou odchylku (p<0,05; One-way ANOVA následovaná Tukey post hoc testem). Šedivá barva a její odstíny znázorňuje jedince WT nebo WT podobné z hlediska koncentrace SA. Zelená barva a její odstíny znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA oproti WT. Červená barva a její odstíny znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA oproti WT.

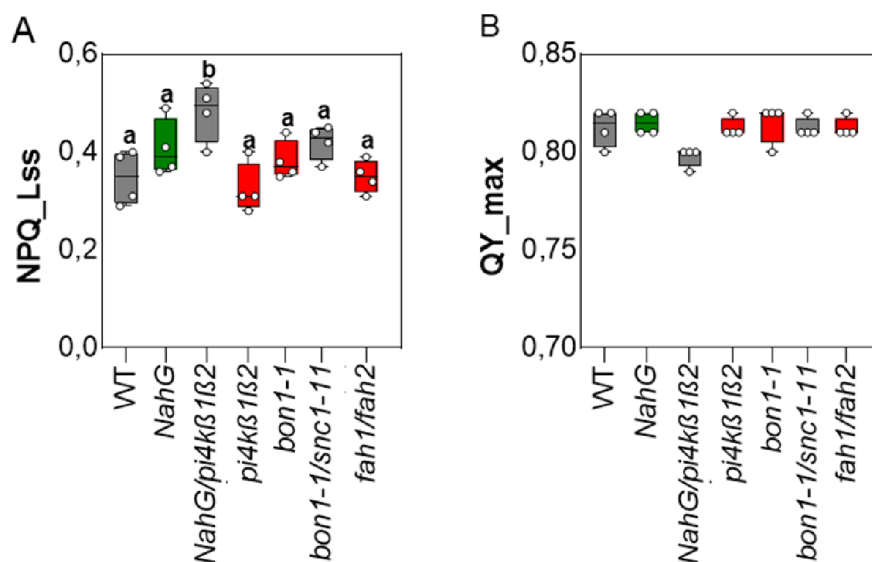
Z výsledků, které jsme z měření získali, lze usoudit, že rostliny se zvýšenou koncentrací SA mají ovlivněnou činnost a pravděpodobně i vyšší uzavřenost průduchů, což se doplňuje s měřením pomocí termokamery (**Obr. 14**).

#### 4.2.4 Změna koncentrace SA nemá přímý vliv na fluorescenci chlorofylu

Jak bylo zmíněno (kap. 2.1), světlo dopadá na chloroplasty uložené v rostlinné epidermis listu. Následně zde dochází k absorpci energie, excitací fotosyntetického barviva chlorofylu, která je využívána k syntéze potřebných látek pro rostlinu (Trebst, 1974). Současně jsme zmínili, že ošetření rostlin vyššími koncentracemi SA ovlivňuje aktivitu fotosyntézy (Pancheva, 1996; Janda, 2014; Poór, 2019; Fariduddin, 2003), ale i mění strukturu chloroplastů či snižuje obsah chlorofylu (Pancheva, 1996; Uzunova, 2000). Rozhodli jsme se analyzovat na naší „SA-kolekci“ také fluorescenci chlorofylu. Jako parametry, vypovídající o fotosyntetickém stavu rostliny, z fluorescence chlorofylu, jsme zvolili kvantový výtěžek PSII fotochemie (QY) a nefotochemické zhášení (NPQ) (Maxwell, 2000).

Z výsledků měření NPQ v ustáleném stavu (NPQ\_Lss) je zřejmé (**Obr. 19A**), že hodnoty u mutantů SA[↓] a SA[WT] byly podobné hodnotám WT. Pouze mutant *NahG/pik4kβ1β2* (SA[WT]) měl vyšší hodnoty NPQ v porovnání s WT. Tyto hodnoty byly i vyšší v porovnání se všemi ostatními mutanty. Všichni mutanti SA[↑] měli podobné hodnoty s WT.

Z analýzy maximálního kvantového výtěžku PSII fotochemie (QY\_max) nám nevyšly signifikantní rozdíly. Všichni mutanti s nižší, vyšší nebo podobnou koncentrací SA jako WT měli podobné hodnoty v porovnání s WT (**Obr. 19B**).



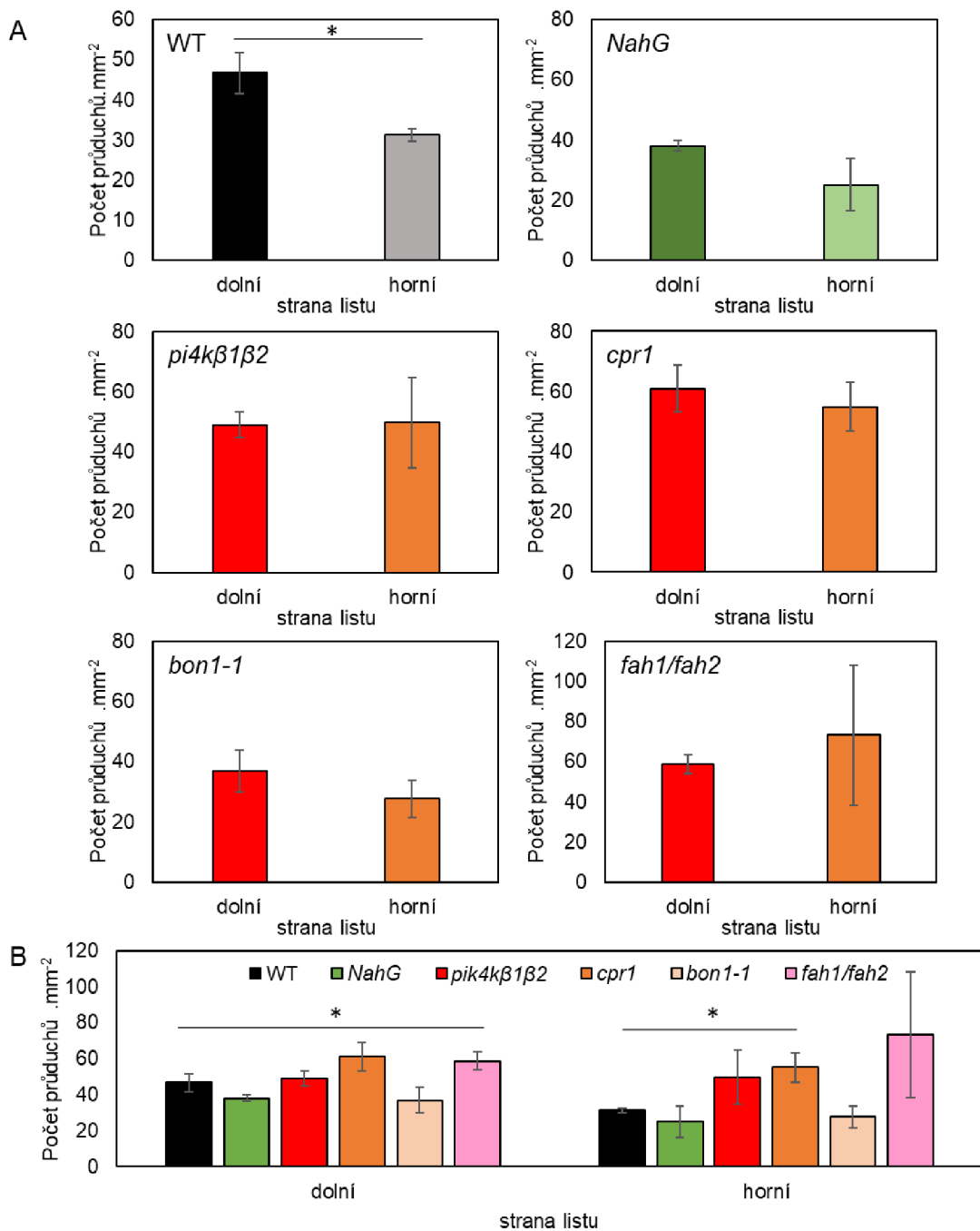
**Obrázek 19: Analýza fluorescence chlorofylu.** Rostliny *A. thaliana* byly pěstovány v kontrolovaných podmínkách v ÚMBR v zemině, analyzovány v 7. týdnu stáří. **A)** Analýza nefotochemického zhášení v ustáleném stavu (NPQ\_Lss). **B)** Analýza maximálního kvantového výtěžku PSII fotochemie (QY\_max). Hodnoty reprezentuje průměr a chybové úsečky směrodatná odchylka (n=4). Obě analýzy byly změřeny na totožných rostlinách. Různá písmena znázorňují statisticky významnou odchylku ( $p < 0,05$ ; One-way ANOVA následovaná Tukey post hoc testem). Šedivá barva a její odstíny znázorňuje jedince WT nebo WT podobné z hlediska koncentrace SA. Zelená barva a její odstíny znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA oproti WT. Červená barva a její odstíny znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA oproti WT.

#### 4.2.5 Koncentrace SA přímo neovlivňuje hustotu průduchů

Na základě našich výsledků dokazujících vliv SA na funkci průduchů, jsme se rozhodli zjistit, zda SA nemá vliv na vlastní vývoj průduchů. Tedy zda mezi jedinci z „SA-kolekce“ je rozdíl v hustotě průduchů. Z výsledků (**Obr. 20**) je patrné, že se počet průduchů na plochu listu lišil mezi dolní (adaxiální) a horní (abaxiální) stranou listu. Na adaxiální straně listu je většinou méně průduchů než na abaxiální.

Mezi testovanými mutanty jsme pozorovali rozdíly v hustotě průduchů. Mutant *NahG* (SA[↓]) měl méně průduchů než WT. Mutanti *fah1/fah2* a *pik4kβ1β2* (SA[↑]) měli více průduchů než WT. Mutant *cpr1* (SA[↑]) měl vyšší počet průduchů oproti WT na horní straně listu. Na dolní straně listu byl u *cpr1* počet průduchů stejný s WT. U jedince *fah1/fah2* (SA[↑]) vyšly výsledky velmi rozdílně oproti ostatním mutantům s vysokou koncentrací SA.

Měl více průduchů než všichni ostatní jedinci. Mutant *bon1-1* (SA[↑]) měli podobné množství průduchů jako WT. Naše výsledky dohromady ukazují na to, že změny v hustotě průduchů pozorované u *pik4kβ1β2* a *fah1/fah2* nebyly pravděpodobně způsobeny přímo zvýšenou koncentrací SA. Bylo neobvyklé, že se u mutantu *fah1/fah2* ukázalo více průduchů na adaxiální straně listu v porovnání s abaxiální stranou listu (**Obr. 20A**). Podobně tomu tak bylo u mutantu *pik4kβ1β2* (SA[↑]), který měl na obou stranách listu stejné množství průduchů. Statisticky ovšem vyšly průkazné pouze rozdíly v počtu průduchů mezi horní částí listu a dolní částí listu u WT. Rozdíl v počtu průduchů oproti WT se statisticky potvrdil pouze u mutantu *fah1/fah2* na abaxiální straně listu a u mutantu *cpr1* pouze na adaxiální části listu (**Obr. 20B**). Jsme si vědomi, že pro lepší závěry bude nutno toto měření zopakovat, a to s vícero rostlinami (listy).



**Obrázek 20: Porovnání počtu průduchů u vybraných genotypů z „SA kolekce“.** Rostliny staré 7 týdnů, pěstované v zemině v horním skleníku. **A)** Porovnání hustoty průduchů mezi horní a dolní stranou listu u vybraných genotypů. **B)** Celkové porovnání hustoty průduchů mezi horní a dolní stranou listu. A a B vychází ze stejného setu dat (n=3). Hodnoty znázorňují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl (\* $p < 0,05$ ; oboustranný studentův t-test). Šedivá barva a její odstíny znázorňuje jedince WT nebo WT podobné z hlediska koncentrace SA. Zelená barva a její odstíny znázorňuje jedince s nižší koncentrací SA oproti WT. Červená barva a její odstíny znázorňuje jedince s vyšší koncentrací SA oproti WT.



## 5 Diskuse

### 5.1 Zavedení pěstování „SA-kolekce“ v naší laboratoři

Protože naše laboratoř byla nová na Katedře experimentální biologie rostlin JU a věděli jsme, že jedním z výzkumných témat v laboratoři bude „kyselina salicylová v rostlinách“, bylo nutné zavést pěstování „SA-kolekce“. Tu jsme měli k dispozici díky zapojení mého školitele do její tvorby na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Praze (Pluhařová, 2019). Danou kolekci jsme pěstovali třemi možnými způsoby a u všech se potvrdily fenotypové rozdíly mezi jedinci podobně, jak bylo publikováno ve studii Pluhařová (2019).

Potvrdili jsme, že i v našich (různých) pěstebních podmínkách SA negativně ovlivňuje růst rostlin (**Obr. 7, 9, 10**). U všech jedinců SA[↑] jsme zaznamenali malý vzrůst nadzemních částí rostlin v porovnání s WT. U mutantů SA[↓] a SA[WT] nebyly rozměry růžic odlišné od WT.

Pozorovali jsme ovšem také rozdíly ve velikosti nadzemních částí rostlin mezi pěstováním v dolním a horním skleníku (**Obr. 8**). Obecně v horním skleníku rostly rostliny rychleji. Také podmínky v horním skleníku více prohlubovaly rozdíl ve vzrůstu mezi SA[↑] a WT. Zejména tak u mutantu *pi4kβ1β2*. Rozdíly v růstu za odlišných podmínek byly zmíněny i v jiných studiích (Pluhařová, 2019; Šašek, 2014; Mateo, 2006).

Díky našemu pravidelnému zaznamenávání růstu „SA-kolekce“ jsme si také povšimli, že nadzemní části rostlin mutantů jsou do určitého období stáří velikostně podobné, a to za všech podmínek pěstování (**Obr. 10**). Vysvětlujeme si to syntézou SA indukovanou až od určitého stáří rostliny a postupnému prohlubování jejího vlivu v čase, což je zmíněno také ve studii Šašek (2014). Je tedy možné, že v mladých semenáčkách syntéza SA brání jiná látka/mechanismus, nebo naopak není dostatek určité látky/energie pro indukci syntézy SA, nebo se stimuly k tvorbě SA objevují až v průběhu vývoje. Je známo, že mutanti SA[↑] podléhají dřívějšímu stárnutí (Zhang, 2013). SA totiž hraje roli ve stárnutí rostlin, senescenci. Je tedy možné, že v období, kdy se začne syntetizovat SA, se rostlina více soustředí na obranu a později dochází zejména k jejímu stárnutí, takže nestihne dodávat více energie do samotného růstu. Studie Šašek (2014) porovnávala kinetiku růstu a exprese *PRI* genů u WT a mutantu *pi4kβ1β2* (konstitutivně exprimuje SA a *PRI* geny). Na základě aproximace s markerovými geny byli v této studii schopni analyzovat, že v průběhu času se obsah SA zvyšoval více v porovnání s WT. Společně s tím se začal zvětšovat rozdíl ve velikosti růžice nadzemních částí rostliny mezi mutantem a WT.



Do budoucna je nutné u rostlin z „SA-kolekce“ stanovit koncentraci SA i za našich pěstebních podmínek a ideálně analyzovat detailně kinetiku obsahu SA během růstu rostlin. Výsledky z této analýzy by nás poté mohly pomoci přiblížit k příčině negativního vlivu SA na růst rostlin.

## 5.2 Vysoká koncentrace SA inhibuje tvorbu anthokyanů

Při pěstování „SA-kolekce“ jsme si povšimli, že za stresových podmínek (vysoká intenzita světla či sucho – nechtěně zapříčiněné) začaly rostliny fialovět s výjimkou mutantů SA[↑] (**Obr. 11B**). Toto zjištění bylo pro nás velmi překvapivé. Rozhodli jsme se tedy analyzovat vliv vyšší koncentrace SA na syntézu anthokyanů v rostlině.

Množství anthokyanů se zvyšuje za vybraných stresových podmínek, například při vysoké intenzitě světla (Andersen, 2010; Lee, 2002; Qiu, 2016; Sperdoui, 2012). Pro zjištění, zda vyšší koncentrace SA ovlivňuje syntézu anthokyanů, jsme zahájili nejdříve pěstování za sterilních podmínek na Petriho miskách. Tuto formu pěstování jsme zvolili, protože za těchto podmínek je pěstování a ošetření rostlin velmi jednoduché a v dané době pro nás představovala nejvíce kontrolované podmínky růstu (neměli jsme ještě přístup ke kultivačním boxům na ÚMBR).

Tvorbu anthokyanů jsme v tomto případě indukovali pomocí MS média s obsahem 7% sacharózy (kontrola obsahuje 1% sacharózy) nebo s přidavkem 40  $\mu\text{M}$  kinetinu ke kontrolnímu médiu, na kterém rostliny rostly. Tímto ošetřením jsme se inspirovali ve studii Zou (2017), kde ukázali, že se jedná o podmínky indukující tvorbu anthokyanů. U tohoto pěstování rostlin za sterilních podmínek v Petriho miskách naše hypotéza nebyla zcela potvrzena. Indukci tvorby anthokyanů zde spíše zapříčila vyšší koncentrace sacharózy než samotný kinetin (**Obr. 12**). To přisuzujeme možné degradaci kinetinu z MS média během času růstu, a tím zamezení indukce syntézy anthokyanů pomocí (již) chybějícího kinetinu. Přesnou příčinu ovšem nejsme zatím schopni zcela určit. Tato data byla zhodnocena pouze z pravidelných snímků skenu. V budoucnu bude zapotřebí zhodnotit množství anthokyanů u pěstování za těchto podmínek také pomocí spektrofotometrické metody.

V průběhu pěstování rostlin za sterilních podmínek jsme získali i přístup do kultivačních boxů s kontrolovanými podmínkami na ÚMBR. Rozhodli jsme se tedy otestovat vliv SA na syntézu anthokyanů také za nesterilních podmínek. Protože by nebylo jednoduché ošetření 40 $\mu\text{M}$  kinetinem u rostlin pěstovaných v zemině, rozhodli jsme se, tento vliv sledovat u rostlin pěstovaných hydroponicky. Zde byl kinetin přidán tak, aby růstové médium

obsahovalo 40  $\mu\text{M}$  kinetin. V tomto případě se naše hypotéza potvrdila. Fialovění rostlin (SA[ $\downarrow$ ] a SA[WT]) po ošetření 40  $\mu\text{M}$  kinetinem, bylo zřetelné již po týdnu od aplikace (**Obr. 13A**). Naopak všichni mutanti s vyšší koncentrací SA měli inhibovanou syntézu anthokyanů. Zde nám naše výsledky potvrdila i spektrofotometrická analýza množství anthokyanů (**Obr. 13B**).

Naši hypotézou, jak by mohla SA inhibovat syntézu anthokyanů, je možný překryv biosyntetických drah SA a anthokyanů (Andersen, 2010; Buchanan, 2015). Další možností je, že SA, jako molekula, nebo signální kaskáda vyvolaná její vysokou produkcí, inhibují tvorbu anthokyanů. Do budoucna by bylo vhodné otestovat tento trend také u ostatních jedinců z „SA-kolekce“. Např. mutant *NahG/pi4k $\beta$ 1 $\beta$ 2* by byla vhodným nástrojem k zjištění, zda za inhibici tvorby anthokyanů může překryv biosyntetických drah či nikoliv. Dále by bylo zajímavé se zaměřit na podmínky růstu či indukci anthokyanů jinými růstovými podmínkami (změna délky dne, intenzita ozáření) či jinými látkami (sacharóza). Je nám jasné, že počet použitých vzorků byl malý (n=2). Rozdíl mezi SA[ $\uparrow$ ] a WT byl ale natolik velký, že těmito výsledkům věříme. Do budoucna je ovšem zapotřebí tento pokus zopakovat s větším počtem vzorků.

### **5.3 Zvýšená koncentrace SA ovlivňuje funkci průduchů, a tím i výměnu plynů a fotosyntézu**

Díky našim výsledkům z analýzy růstu, které potvrzují negativní vliv SA na růst rostlin, jsme narazili na otázku, čím by SA mohla růst inhibovat. Obecně přijatá hypotéza říká, že určité množství energie potřebné pro růst je u SA[ $\uparrow$ ] mutantů více využíváno k obranně rostlin. Mechanismus, jakým by SA mohla růst inhibovat, ale stále není zcela znám. Naši teorii je, že by v této inhibici mohly hrát roli průduchy. Víme, že exogenním ošetřením SA (Bharat, 2021; Melotto, 2006), ale také u mutantů s vyšší koncentrací SA (Okuma, 2014; Miura, 2013), se indukuje uzavření průduchů. Nabízí se hypotéza, zda indukcí uzavření průduchů nedochází k zamezení dostatečného přísunu  $\text{CO}_2$ , a tím je snížena aktivita fotosyntézy. Sníženou aktivitou fotosyntézy by byla omezená produkce důležitých látek pro rostlinný růst. Tím by rostlina neměla z čeho čerpat energii pro správný růst a její nadzemní části by oproti rostlinám bez tohoto omezení byly menší. Zaměřily jsme se proto na vliv SA na funkci průduchů a dále také na množství plynů v rostlinném pletivu a aktivitě fotosyntézy u naší „SA-kolekce“ mutantů s endogenně změněnou koncentrací SA.

Nejdříve jsme se rozhodli zjistit, zda mutanti mají ovlivněnou funkci průduchů. Obecně platí, že čím více jsou průduchy uzavřenější, tím je teplota listu vyšší (Taiz, 2018). Proto jsme se rozhodli vyfotografovat mutanty IR kamerou pro zjištění teploty nadzemních

částí rostlin. Ještě před zhotovení snímků jsme rostliny vystavili vysoké intenzitě světla pro dosažení znatelnější výsledků. Naše výsledky ukázaly, že mutanti SA[↑] mají vyšší teploty v porovnání s WT (**Obr. 14**). I přesto, že statisticky vyšel průkazný rozdíl teploty oproti WT pouze u mutantů *fah1/fah2* a *pik4kβ1β2*, ve třech následujících biologických opakováních, se nám rozdíl teplot oproti WT potvrdil také u *bon1-1* (SA[↑]) (data nejsou poskytnuta). To ukazuje na to, že endogenní nadprodukce SA ovlivňuje funkci a regulaci otevírání/zavírání průduchů. Pravděpodobně jsou více zavřené. Ve studii Raskin (1989) ukázali, že čím vyšší hladina SA u termogenní rostliny (*Sauromatum guttatum* Schott) byla (v tomto případě si rostlina SA syntetizovala sama), tím se zvyšovala i teplota rostliny. Zde tento jev s průduchy ovšem nespojovali. Uzavření průduchů vyššími koncentracemi SA u mutantů, je uvedeno také ve studiích Miura (2013) a Okuma (2014). Zde testovali mutanty *cpr5* a *acd6* SA[↑], u kterých zjistili indukci uzavření průduchů. V obou publikacích také zjistili, že po vnesení *NahG* (SA[↓]) do *cpr5* nebo *acd6* (SA[↑]), byla inhibována indukce uzavření průduchů. Tedy potvrdili vliv SA na uzavření průduchů. Je také důležité zmínit, že v těchto studiích analyzovali uzavření průduchů měřením průduchové štěrbin. Zmíněné mutanty jsme v naší studii netestovali, jsou ovšem k dispozici v naší kolekci. V budoucnu bychom tedy chtěli otestovat vliv SA na uzavření průduchů pomocí SA na zbylých jedincích „SA-kolekce“ pro potvrzení dat z těchto studií. Současnou slabinou provedených experimentů byl nízký počet rostlin v jednotlivých opakováních (n=3). S cílem jednoznačného prokázání zmíněného efektu by se mělo analyzovat alespoň 9 rostlin od daného genotypu v rámci jednoho biologického opakování.

Z literatury víme, že exogenním ošetřením SA (Poór, 2019; Fariduddin, 2003), ale také endogenními změnami koncentrací SA v rostlině (Mateo, 2006; Wang, 2019; Pluhařová, 2019), byly ovlivněny fotosyntetické procesy. Bylo také naznačeno, že by ošetřením SA mohla být snížena celková asimilace CO<sub>2</sub> (Pancheva, 1996). Na základě těchto informací jsme se rozhodli otestovat na naší „SA-kolekci“ mutantů vliv endogenně zvýšené koncentrace SA na výměnu plynů a fotosyntézu. Pomocí gazometrie jsme byli schopni určit rychlost fotosyntézy (A), vodivost průduchů (g<sub>sw</sub>) a vnitřní koncentraci CO<sub>2</sub> v mezibuněčném prostoru listu (C<sub>i</sub>).

Měření rychlosti fotosyntézy ukázalo, že mutanti SA[↑] mají pomalejší fotosyntézu (nižší A) (**Obr. 16**). Zatímco mutanti SA[↓] a SA[WT] se pohybovali podobně v rozmezí WT. Vliv SA potvrzují i data z jiných studií, uvádějící vliv zvýšené exogenní koncentrace SA na snížení rychlosti fotosyntézy (Maslenkova, 2014; Poór, 2019; Fariduddin, 2003; Pancheva 1996). Naše data, o nižší rychlosti fotosyntézy u SA[↑], se shodují se studií

Wang (2019). Zde ovšem vliv SA testovali na mutantovi *snc1-1* (SA[↑]). Do budoucna bychom chtěli tuto analýzu zopakovat i na dalších jedincích z „SA-kolekce“ mutantů.

Vodivost průduchů ( $g_{sw}$ ) byla nejnižší u SA[↑]. Obecně mutanti SA[↑], v porovnání s jinými mutanty, měli pomalejší nárůst vodivosti průduchů v závislosti na světle poté, co byli aklimatizováni na tmu (**Obr. 15**). Přisuzujeme to menší schopnosti adaptace na změnu světelných podmínek u SA[↑]. Pokud vyšší koncentrace SA indukuje zavírání průduchů (Bharat, 2021; Melotto, 2006; Miura, 2013; Okuma, 2014), nebo se může jednat o inhibici jejich otevírání, zabraňuje rostlině a zejména průduchům přizpůsobit se podmínkám, kterým je rostlina vystavena.

Vypočtené hodnoty vnitřní koncentrace  $CO_2$  v mezibuněčném prostoru ( $C_i$ ) ukázaly, že mutanti SA[↑], ve většině případů, mají vyšší množství  $C_i$  v porovnání s WT (**Obr. 17**). V tomto případě byly výsledky ovšem velmi variabilní. Přisuzujeme to možnému stresu při manipulaci během měření nebo nepatrného natrhnutí listu (z důvodu malého vzrůstu). Zatím si, ale v souvislosti s dalšími výsledky, nejsme schopni úplně vysvětlit příčinu. Výsledky  $C_i$  a rychlost fotosyntézy (**Obr. 16, 17**) by ukazovaly na výrazně inhibovanou fotosyntézu u SA[↑] mutantů, kdy průduchy by v tomto ohledu nemusely hrát významnou roli.

Data z analýzy IRMS nám ukázala (**Obr. 18**), že mutanti SA[↑] mají větší obsah izotopu  $^{13}C$  v porovnání s WT. A mutanti SA[↓] a SA[WT] se naopak od WT významně neliší. To naznačuje vyšší množství izotopu  $^{13}C$  v rostlinné sušině u mutantů s vyšší koncentrací SA, což odpovídá menšímu množství dostupného  $CO_2$  v plastidech u těchto jedinců. Výsledky z  $g_{sw}$  (**Obr. 15**), teploty listů (**Obr. 14**) a IRMS (**Obr. 18**) hovoří vcelku jednoznačně, že SA[↑] mutanti mají inhibovanou funkci průduchů, resp. vliv SA na jejich vyšší míru uzavřenosti. Naše výsledky je nutné zopakovat a ověřit, které z vysvětlení je správné, nebo zda neexistuje jiné vysvětlení, které nás zatím nenapadlo.

Jako další parametry k zjištění fotosyntetického stavu rostliny jsme zvolili kvantový výtěžek PSII fotochemie (QY) a nefotochemické zhášení (NPQ) (Maxwell, 2000) pomocí analýzy fluorescence chlorofylu. Z našich výsledků QY a NPQ nebyl patrný jasný trend mezi jednotlivými mutanty SA[↑], SA[↓], SA[WT] a WT (**Obr. 19**). Statistické rozdíly se objevily pouze u mutantu *NahG /pik4kβ1β2* (SA[WT]), který měl vyšší hodnoty (NPQ) v porovnání s WT i ostatními testovanými jedinci. Ve studii Mateo (2006) hodnoty NPQ vyšly u SA[↑] mutantů (*cpr5-1*, *cpr6-1* a *dnd1-1*) vyšší v porovnání s WT. Na rozdíl od této studie ve Wang (2019) u mutantu *snc1* SA[↑] naměřili nižší hodnoty NPQ oproti WT. Naše naměřené

hodnoty se shodují s výsledky NPQ ve studii Pluhařová (2019), kde také testovali „SA-kolekci“ mutantů. Zde hodnoty NPQ neprokazovaly signifikantní rozdíly mezi mutanty s nižší či vyšší koncentrací SA.

Rozdílné chování mutantu *NahG /pik4kβ1β2* (SA[WT]) si vysvětlujeme možným poškozením rostliny při manipulaci nebo možnému vystavení stresu (sucho, špatné osvětlení). Ke zvýšení NPQ totiž může dojít v důsledku procesů chránící list před poškozením nebo jako důsledek samotného poškození (Hendrickson, 2004).

Také hodnoty QY ve studii Pluhařová (2019) vyšly podobné u všech mutantů. Z těchto výsledků, kdy NPQ ani QY po změření fluorescence chlorofylu nebyly odlišné, usuzujeme, že vyšší koncentrace SA nemají zásadní vliv na funkci chlorofylu, oproti studii (Pancheva, 1996; Uzunova, 2000), kde ošetřovali povrch rostliny SA pouze exogenně a ukázali její vliv na fotosyntézu. Do budoucna by bylo dobré tyto výsledky zopakovat a vyvarovat se možnému poškození rostlin či podrobení abiotickému stresu. Také by bylo dobré změřit množství chlorofylu či zanalyzovat morfolologii chloroplastů, které bylo již zmíněno (Pancheva, 1996; Uzunova, 2000).

#### **5.4 Zvýšená koncentrace SA nemá vliv na vývoj průduchů**

Zjištěním, že SA ovlivňuje mechanismus průduchů, a tím také výměnu plynů a rychlost fotosyntézy nás napadlo zanalyzovat, zda nemá SA vliv také na samotný vývoj průduchů. Buněčné přechody ve vývoji průduchů jsou regulovány transkripčními faktory ( $\beta$ HLH, SPCH, MUTE a FAMA), které mohou být ovlivňovány i hormonálně (Qi, 2018). V tom případě nás zajímalo, zda mezi tyto hormony patří i SA. Dalo by se předpokládat, že vyšší koncentrace SA indukuje tvorbu průduchů v rostlinné epidermis. SA totiž uzavírá průduchy hlavně díky produkce ROS a oscilací vápníkových iontů v cytosolu (Khokon, 2010). Zmíněné ROS a vápníkové ionty, jsou hlavními regulátory vývoje a pohybu průduchů (He, 2020). Mohli bychom tedy předpokládat, že ovlivněním produkce těchto sloučenin pomocí snížení či zvýšení koncentrace SA, bude mít vliv i na samotný vývoj průduchů.

Po analýze růstu „SA-kolekce“ jsme se rozhodli, že hustotu průduchů budeme zkoumat pouze u rostlin rostoucích v horním skleníku. Zde nám výsledky růstu vycházely více stabilně a také zde byly více kontrolované podmínky (viz. kapitola 4.1.2 Způsoby pěstování *A. thaliana*). Naše výsledky z analýzy hustoty průduchů byly nejednoznačné (**Obr. 20**). Někteří mutanti SA[↑] (*fah1/fah2*, *cpr1*) měli více průduchů oproti WT, ale jiní (*bon1-1*, *pik4kβ1β2*) se od WT nelišili. To naznačuje, že změny v hustotě průduchů nejsou způsobeny

přímo zvýšenou koncentrací SA, ale jsou způsobené spíše změnami způsobené mutacemi u jednotlivých mutantů. U většiny jedinců testovaných na hustotu průduchů byl vyšší počet průduchů na spodní straně listu v porovnání s horní stranou listů. To je také v souladu s literaturou (Mott, 1982; Cotthem, 1970). Jen u mutantů *pik4kβ1β2* a *fah1/fah2* tomu bylo naopak. Tuto anomálii by stálo za to dále prostudovat, protože u obou mutantů je ovlivněn fosfolipidový signální systém. U *fah1/fah2* produkce sfingolipidů (König, 2012), u *pik4kβ1β2* produkce fosfatidylinositol-4-fosfátu (Preuss, 2006). Produkce fosfolipidů by tak mohla mít vliv na regulaci produkce průduchů.

Z našich výsledků tedy není patrné, že SA přímo ovlivňuje vývoj průduchů. Zamýšleli jsme se nad teorií opírající se o zvýšenou imunitu SA[↑] mutantů. Mysleli jsme si, že rostliny s vyšším obsahem SA budou mít více průduchů, kvůli indukci zavírání průduchů pomocí SA, tak aby vyrovnaly ztráty přísunu CO<sub>2</sub>. Naopak vzhledem k úloze SA v boji proti napadení patogeny, kde průduchy sehrávají aktivní roli (David, 2019), rostliny naprogramované na zvýšení své obranyschopnosti proti patogenům, budou spíše redukovat počet průduchů, jako vstupních bran pro patogen. Je ovšem možné, že na vývoj průduchů měly z větší části vliv podmínky prostředí a mechanismy pozměněné danou mutací u jedinců než vyšší koncentrace SA. V budoucnu bude zapotřebí tato data zopakovat, nejlépe s mutanty se „zpětnou mutací“ (např. *NahG/pik4kβ1β2*), ale také v lépe kontrolovaných růstových podmínkách, které nyní máme k dispozici na ÚMBR.

Naše výsledky potvrdily negativní vliv SA na růst rostlin a také na funkci průduchů, s čímž souvisejí výsledky o nižší vodivosti průduchů, vyššího obsahu izotopu <sup>13</sup>C a také nižší rychlosti fotosyntézy u SA[↑] mutantů. Pokud bychom potvrdili tato data i v dalších biologických opakováních, byli bychom schopni přispět s výsledky, které by dokazovaly negativní vliv SA na růst rostlin způsobený indukcí uzavření průduchů. Popostoupili bychom tím také k odpovědi, jakým způsobem SA inhibuje růst, díky které by se mohlo začít zvažovat použití SA v zemědělství.

## 6 Závěr

- Zavedli jsme pěstování „SA-kolekce“ na KEBR, PřF JU.
- Zvýšená koncentrace SA inhibuje tvorbu anthokyanů.
- Zvýšená koncentrace SA vede ke zvýšené teplotě rostlin.
- Zvýšená koncentrace SA inhibuje průduchovou vodivost a rychlost fotosyntézy.
- Zvýšená koncentrace SA omezuje dostupnost CO<sub>2</sub> v plastidech.
- Množství průduchů a fluorescence fotosyntézy nejsou pravděpodobně ovlivněny vysokou koncentrací SA.

## 7 LITERATURA

ADIR, Noam, Hagit ZER, Susana SHOCHAT a Itzhak OHAD, 2003. Photoinhibition – a historical perspective. *Photosynthesis Research* [online]. 2003, **76**(1/3), 343-370 [cit. 2022-03-17]. ISSN 01668595. Dostupné z: doi:10.1023/A:1024969518145

AGARWAL, Sangeeta a Anil GROVER, 2006. Molecular Biology, Biotechnology and Genomics of Flooding-Associated Low O<sub>2</sub> Stress Response in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* [online]. **25**(1), 1-21 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0735-2689. Dostupné z: doi:10.1080/07352680500365232

AGATI, Giovanni, Cecilia BRUNETTI, Martina DI FERDINANDO, Francesco FERRINI, Susanna POLLASTRI a Massimiliano TATTINI, 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. **72**, 35-45 [cit. 2022-03-17]. ISSN 09819428. Dostupné z: doi:10.1016/j.plaphy.2013.03.014

AGURLA, Srinivas a Agepati S. RAGHAVENDRA, 2016. Convergence and Divergence of Signaling Events in Guard Cells during Stomatal Closure by Plant Hormones or Microbial Elicitors. *Frontiers in Plant Science* [online]. **7**(24) [cit. 2022-03-28]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2016.01332

AMTMANN, Anna, Stephanie TROUFFLARD a Patrick ARMENGAUD, 2008. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum* [online]. **133**(4), 682-691 [cit. 2022-03-18]. ISSN 00319317. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01075.x

AN, Chuanfu a Zhonglin MOU, 2011. Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. *Journal of Integrative Plant Biology* [online]. **53**(6), 412-428 [cit. 2022-03-20]. ISSN 16729072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x

ANANIEVA, Elitsa Antonova, Vera Stefanova ALEXIEVA a Losanka Petrova POPOVA, 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* [online]. **159**(7), 685-693 [cit. 2022-03-21]. ISSN 01761617. Dostupné z: doi:10.1078/0176-1617-0706

ANDERSEN, Øyvind M, Monica JORDHEIM, 2010. Anthocyanins. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. [cit. 2022-01-30]. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001909.pub

ATKINSON, N. J. a P. E. URWIN, 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* [online]. **63**(10), 3523-3543 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0022-0957. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/ers100

AUSUBEL, Frederick M, 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nature Immunology* [online]. **6**(10), 973-979 [cit. 2022-03-20]. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni1253

AYLOR, Donald E., Jean-Yves PARLANGE a A. D. KRIKORIAN, 1973. STOMATAL MECHANICS. *American Journal of Botany* [online]. **60**(2), 163-171 [cit. 2022-03-28]. ISSN 00029122. Dostupné z: doi:10.1002/j.1537-2197.1973.tb10213.x

BAKER, Neil R., ed., 1996. *Advances in Photosynthesis and Respiration: Photosynthesis and the Environment*. 5. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. [cit. 2022-01-30]. ISBN 0792343166.



BALE, Jeffery S., Gregory J. MASTERS, Ian D. HODKINSON, et al., 2002. *Global Change Biology* [online]. **8**(1) [cit. 2022-03-18]. ISSN 13541013. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2486.2002.00451.x

BERRY, Joseph A, David J BEERLING a Peter J FRANKS, 2010. Stomata: key players in the earth system, past and present. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. **13**(3), 232-239 [cit. 2022-03-18]. ISSN 13695266. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbi.2010.04.013

BHARATH, Pulimamidi, Shashibhushan GAHIR a Agepati S. RAGHAVENDRA, 2021. Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure: An Important Component of Plant Defense Against Abiotic and Biotic Stress. *Frontiers in Plant Science* [online]. **12** [cit. 2022-01-30]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2021.615114

BISEN, Meeta a P.G. DUTTA, 1994. *Frank Way To Successful ICSE, Biology: Paper Class 10*. 27. Franksons (A Division of Macmillan Publisher India Private Limited). ISBN 9789388826808.

BOCH, Jens, Michelle L. VERBSKY, Tara L. ROBERTSON, John C. LARKIN a Barbara N. KUNKEL, 1998. Analysis of Resistance Gene-Mediated Defense Responses in *Arabidopsis thaliana* Plants Carrying a Mutation in *CPR5*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® [online]. **11**(12), 1196-1206 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0894-0282. Dostupné z: doi:10.1094/MPMI.1998.11.12.1196

BOWLING, S A, A GUO, H CAO, A S GORDON, D F KLESSIG a X DONG, 1994. A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *The Plant Cell* [online]. **6**(12), 1845-1857 [cit. 2022-02-02]. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.6.12.1845

BUCKLEY, Thomas N., 2005. The control of stomata by water balance. *New Phytologist* [online]. **168**(2), 275-292 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01543.x

BUCHANAN, Bob B., Wilhelm GRUISSEM a Russell L. JONES, ed., 2015. *Biochemistry and Molecular Biology of Plant*. 2. John Wiley. ISBN 9780470714218.

COQUOZ, Jean-Luc, Antony BUCHALA a Jean-Pierre MÉTRAUX, 1998. The Biosynthesis of Salicylic Acid in Potato Plants1. *Plant Physiology* [online]. **117**(3), 1095-1101 [cit. 2022-03-20]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.117.3.1095

COTTHEM, Willem Van, 1970. Comparative Morphological Study of the Stomata in the Filicopsida. *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique / Bulletin van de National Plantentuin van België* [online]. **40**(2) [cit. 2022-03-18]. ISSN 03039153. Dostupné z: doi:10.2307/3667713

CRAMER, G.R., 2010. Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* [online]. **16**, 86-93 [cit. 2022-03-17]. ISSN 13227130. Dostupné z: doi:10.1111/j.1755-0238.2009.00058.x

CRAMER, Grant R, Kaoru URANO, Serge DELROT, Mario PEZZOTTI a Kazuo SHINOZAKI, 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* [online]. **11**(1) [cit. 2022-03-16]. ISSN 1471-2229. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2229-11-163

DANGL, Jeffery L. a Jonathan D. G. JONES, 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* [online]. **411**(6839), 826-833 [cit. 2022-03-20]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35081161

- DAVID, Lisa, Alice C. HARMON a Sixue CHEN, 2019. *Plant immune responses - from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens* [online]. **14**(5) [cit. 2022-01-30]. ISSN 1559-2324. Dostupné z: doi:10.1080/15592324.2019.1588667
- DEMMIG-ADAMS, B a W W ADAMS, 1992. Photoprotection and Other Responses of Plants to High Light Stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* [online]. **43**(1), 599-626 [cit. 2022-03-17]. ISSN 1040-2519. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pp.43.060192.003123
- DEMPSEY, D'Maris Amick a Daniel F. KLESSIG, 2012. SOS – too many signals for systemic acquired resistance?. *Trends in Plant Science* [online]. **17**(9), 538-545 [cit. 2022-02-01]. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2012.05.011
- DEMPSEY, D'Maris Amick, A. Corina VLOT, Mary C. WILDERMUTH a Daniel F. KLESSIG, 2011. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *The Arabidopsis Book* [online]. **9** [cit. 2022-03-20]. ISSN 1543-8120. Dostupné z: doi:10.1199/tab.0156
- DEMPSEY, D'Maris Amick, Jyoti SHAH a Daniel F. KLESSIG, 2010. Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* [online]. **18**(4), 547-575 [cit. 2022-03-20]. ISSN 0735-2689. Dostupné z: doi:10.1080/07352689991309397
- DING, Pingtao a Yuli DING, 2020. Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends in Plant Science* [online]. **25**(6), 549-565 [cit. 2022-01-31]. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2020.01.004
- DINNENY, José R., Terri A. LONG, Jean Y. WANG, et al., 2008. Cell Identity Mediates the Response of Arabidopsis Roots to Abiotic Stress. *Science* [online]. **320**(5878) [cit. 2022-03-17]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1153795
- DURRANT, W.E. a X. DONG, 2004. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology* [online]. **42**(1), 185-209 [cit. 2022-03-20]. ISSN 0066-4286. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421
- EVANS, John R., 2013. Improving Photosynthesis. *Plant Physiology* [online]. **162**(4), 1780-1793 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.113.219006
- FARIDUDDIN, Q., S. HAYAT a A. AHMAD, 2003. Salicylic Acid Influences Net Photosynthetic Rate, Carboxylation Efficiency, Nitrate Reductase Activity, and Seed Yield in Brassica juncea. *Photosynthetica* [online]. **41**(2), 281-284 [cit. 2022-03-21]. ISSN 03003604. Dostupné z: doi:10.1023/B:PHOT.0000011962.05991.6c
- FARQUHAR, G. D. a T. D. SHARKEY, 1982. Stomatal Conductance and Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* [online]. 1982, **33**, 317-345 [cit. 2022-01-30]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1146/annurev.pp.33.060182.001533
- FLIR SYSTEMS, 2008. FLIR Reporter Professional: User's manual. *FLIR systems* [online]. 2008, **2008**(1558567) [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: <file:///C:/Users/pavla/Desktop/%C4%8D1%C3%A1nky/FLIR%20Reporter%20manual.pdf>
- FluorCam: Instruction Manual and User's Guide, 2019. *Photon Systems Instruments* [online]. **2.1** [cit.2022- 02- 06].Dostupné z: [https://fluorcams.psi.cz/documents/FluorCam\\_Operation\\_Manual\\_2.1.pdf](https://fluorcams.psi.cz/documents/FluorCam_Operation_Manual_2.1.pdf)
- GÉMES, Katalin, Péter POÓR, Edit HORVÁTH, KOLBERT, Dóra SZOPKÓ, Ágnes SZEPESI a Irma TARI, 2011. Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive

oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiologia Plantarum* [online]. **142**(2), 179-192 [cit. 2022-03-21]. ISSN 00319317. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01461.x

GHOSH, Srayan, Kamal Kumar MALUKANI, Ravindra Kumar CHANDAN, Ramesh V. SONTI a Gopaljee JHA, 2019. How Plants Respond to Pathogen Attack: Interaction and Communication. *Sensory Biology of Plants* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2019-11-10, 537-568 [cit. 2022-03-18]. ISBN 978-981-13-8921-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-8922-1\_20

GOEL, Ajay K., Derek LUNDBERG, Miguel A. TORRES, Ryan MATTHEWS, Chiharu AKIMOTO-TOMIYAMA, Lisa FARMER, Jeffery L. DANGL a Sarah R. GRANT, 2008. The Pseudomonas syringae Type III Effector HopAM1 Enhances Virulence on Water-Stressed Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*<sup>®</sup> [online]. **21**(3), 361-370 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0894-0282. Dostupné z: doi:10.1094/MPMI-21-3-0361

GUPTA, Priya a Ashis Kumar NANDI, 2020. Long-chain base kinase1 promotes salicylic acid-mediated stomatal immunity in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* [online]. **29**(4), 796-803 [cit. 2022-01-30]. ISSN 0971-7811. Dostupné z: doi:10.1007/s13562-020-00608-2

HAO, Fushun, Shiling ZHAO, Huan DONG, Huan ZHANG, Lirong SUN a Chen MIAO, 2010. Nial and Nia2 are Involved in Exogenous Salicylic Acid-induced Nitric Oxide Generation and Stomatal Closure in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology* [online]. **52**(3), 298-307 [cit. 2022-03-21]. ISSN 1672-9072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00920.x

HAO, J. H., X. L. WANG, C. J. DONG, Z. G. ZHANG a Q. M. SHANG, 2011. Salicylic acid induces stomatal closure by modulating endogenous hormone levels in cucumber cotyledons. *Russian Journal of Plant Physiology* [online]. **58**(5), 906-913 [cit. 2022-03-21]. ISSN 1021-4437. Dostupné z: doi:10.1134/S1021443711050098

HAUPT, W. a R. SCHEUERLEIN, 1990. Chloroplast movement. *Plant, Cell and Environment* [online]. **13**(7), 595-614 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0140-7791. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-3040.1990.tb01078.x

HE, Jingjing, Ruo-Xi ZHANG, Dae Sung KIM, Peng SUN, Honggang LIU, Zhongming LIU, Alistair M. HETHERINGTON a Yun-Kuan LIANG, 2020. ROS of Distinct Sources and Salicylic Acid Separate Elevated CO<sub>2</sub>-Mediated Stomatal Movements in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* [online]. **11** [cit. 2022-02-11]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2020.00542

HENDRICKSON, Luke, Robert T. FURBANK a Wah Soon CHOW, 2004. A Simple Alternative Approach to Assessing the Fate of Absorbed Light Energy Using Chlorophyll Fluorescence. *Photosynthesis Research* [online]. **82**(1), 73-81 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0166-8595. Dostupné z: doi:10.1023/B:PRES.0000040446.87305.f4

HETHERINGTON, Alistair M. a F. Ian WOODWARD, 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* [online]. **424**(6951), 901-908 [cit. 2022-03-19]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature01843

CHAVES, M. M., 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* [online]. **55**(407), 2365-2384 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/erh269

JANDA, Martin a Eric RUELLAND, 2015. Magical mystery tour: Salicylic acid signalling. *Environmental and Experimental Botany* [online]. 2015, **114**, 117-128 [cit. 2021-02-25]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.07.003>

JANDA, Tibor, Orsolya Kinga GONDOR, Rusina YORDANOVA, Gabriella SZALAI a Magda PÁL, 2014. Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum* [online]. **36**(10), 2537-2546 [cit. 2022-01-31]. ISSN 0137-5881. Dostupné z: doi:[10.1007/s11738-014-1620-y](https://doi.org/10.1007/s11738-014-1620-y)

JIRAGE, D., T. L. TOOTLE, T. L. REUBER, L. N. FROST, B. J. FEYS, J. E. PARKER, F. M. AUSUBEL a J. GLAZEBROOK, 1999. Arabidopsis thaliana PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **96**(23), 13583-13588 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.96.23.13583](https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13583)

JOHNSON, Matthew P., 2016. Photosynthesis. *Essays in Biochemistry* [online]. **60**(3), 255-273 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:[10.1042/EBC20160016](https://doi.org/10.1042/EBC20160016)

JONES, Jonathan D. G. a Jeffery L. DANGL, 2006. The plant immune system. *Nature* [online]. 2006, **444**, 323-329 [cit. 2022-02-01]. Dostupné z: doi:[10.1038/nature05286](https://doi.org/10.1038/nature05286)

KARAGEORGOU, P. a Y. MANETAS, 2006. The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. *Tree Physiology* [online]. **26**(5), 613-621 [cit. 2022-01-30]. ISSN 0829-318X. Dostupné z: doi:[10.1093/treephys/26.5.613](https://doi.org/10.1093/treephys/26.5.613)

KHOKON, Md Atiqur Rahman, Mohammad Abdus SALAM, Fabien JAMMES, et al., 2017. MPK9 and MPK12 function in SA-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. **81**(7), 1394-1400 [cit. 2022-02-01]. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:[10.1080/09168451.2017.1308244](https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1308244)

KHOKON, MD. ATIQR RAHMAN, EIJI OKUMA, MOHAMMAD ANOWAR HOSSAIN, SHINTARO MUNEMASA, MISUGI URAJI, YOSHIMASA NAKAMURA, IZUMI C. MORI a YOSHIYUKI MURATA, 2011. *Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis* [online]. **34**(3), 434-443 [cit. 2022-01-30]. ISSN 01407791. Dostupné z: doi:[10.1111/j.1365-3040.2010.02253.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02253.x)

KIM, Yungil, Kenichi TSUDA, Daisuke IGARASHI, Rachel A. HILLMER, Hitoshi SAKAKIBARA, Chad L. MYERS a Fumiaki KATAGIRI, 2014. *Mechanisms Underlying Robustness and Tunability in a Plant Immune Signaling Network* [online]. **15**(1), 84-94 [cit. 2022-03-20]. ISSN 19313128. Dostupné z: doi:[10.1016/j.chom.2013.12.002](https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.002)

KINCL, Jan, 2006. *Biologie rostlin pro gymnázia*. 3. Praha: Fortuna. [cit. 2022-01-30]. ISBN 9788071689478.

KÖNIG, Stefanie, Kirstin FEUSSNER, Marnie SCHWARZ, et al., 2012. Arabidopsis mutants of sphingolipid fatty acid  $\alpha$ -hydroxylases accumulate ceramides and salicylates. *New Phytologist* [online]. **196**(4), 1086-1097 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:[10.1111/j.1469-8137.2012.04351.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04351.x)

KULICH, Ivan, Tamara PEČENKOVÁ, Juraj SEKEREŠ, Ondřej SMETANA, Matyáš FENDRYCH, Ilse FOISSNER, Margit HÖFTBERGER a Viktor ŽÁRSKÝ, 2013. Arabidopsis exocyst subcomplex containing subunit EXO70B1 is involved in the autophagy-

related transport to the vacuole. *Traffic* [online]. n/a-n/a [cit. 2022-02-02]. ISSN 13989219. Dostupné z: doi:10.1111/tra.12101

KUMAR, Dharendra a Daniel F. KLESSIG, 2014. *The search for the salicylic acid receptor led to discovery of the SAR signal receptor* [online]. **3**(9), 691-692 [cit. 2022-02-01]. ISSN 1559-2324. Dostupné z: doi:10.4161/psb.3.9.5844

KWAK, J. M., 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *The EMBO Journal* [online]. **22**(11), 2623-2633 [cit. 2022-03-21]. ISSN 14602075. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdg277

LEE, David W., 2002. Anthocyanins in leaves: Distribution, phylogeny and development. *Advances in Botanical Research* [online]. 2002, **37**, 37-53 [cit. 2022-01-30]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/S0065-2296(02)37042-3

LEE, Joon-Sang, 1998. The mechanism of stomatal closing by salicylic acid in *Commelina communis* L. *Journal of Plant Biology* [online]. **41**(2), 97-102 [cit. 2022-01-30]. ISSN 1226-9239. Dostupné z: doi:10.1007/BF03030395

LI, Xin, Joseph D. CLARKE, Yuelin ZHANG a Xinnian DONG, 2001. Activation of an EDS1-Mediated R -Gene Pathway in the *snc1* Mutant Leads to Constitutive, NPR1-Independent Pathogen Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® [online]. **14**(10), 1131-1139 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0894-0282. Dostupné z: doi:10.1094/MPMI.2001.14.10.1131

LI, Yongqing, Shuhua YANG, Huijun YANG a Jian HUA, 2007. The TIR-NB-LRR Gene *SNC1* Is Regulated at the Transcript Level by Multiple Factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® [online]. **20**(11), 1449-1456 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0894-0282. Dostupné z: doi:10.1094/MPMI-20-11-1449

LU, You a Kenichi TSUDA, 2021. Intimate Association of PRR- and NLR-Mediated Signaling in Plant Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® [online]. **34**(1), 3-14 [cit. 2022-04-12]. ISSN 0894-0282. Dostupné z: doi:10.1094/MPMI-08-20-0239-IA

MANTHE, Barbara, Margot SCHULZ a Heide SCHNABL, 1992. Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L: Evidence for salicylic acid metabolization. *Journal of Chemical Ecology* [online]. **18**(9), 1525-1539 [cit. 2022-03-21]. ISSN 0098-0331. Dostupné z: doi:10.1007/BF00993226

MARTIN-MEX, Rodolfo, Angel NEXTICAPAN-GARCEZ, Eduardo VILLANUEVA-COUOH, Veronica UICAB-QUIJANO, Silvia VERGARA-YOISURA a Alfonso LARQUE-SAAVEDRA, 2015. Salicylic acid stimulates flowering in micropopagated gloxinia plants. *Revista Fitotecnia Mexicana* [online]. 2015, **38**(2), 115-118 [cit. 2022-01-31]. Dostupné z: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802015000200001&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802015000200001&script=sci_arttext)

MASLENKOVA, L., V. PEEVA, Zh. STOJNOVA a L. POPOVA, 2014. *Salicylic Acid-Induced Changes in Photosystem II Reactions in Barley Plants* [online]. **23**(sup1), 297-300 [cit. 2022-02-01]. ISSN 1310-2818. Dostupné z: doi:10.1080/13102818.2009.10818423

MATEO, A., 2006. Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany* [online]. **57**(8), 1795-1807 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0022-0957. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/erj196

MATHUR, Sonal, Divya AGRAWAL a Anjana JAJOO, 2014. Photosynthesis: Response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B:*

*Biology* [online]. **137**, 116-126 [cit. 2022-03-17]. ISSN 10111344. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.01.010

MAUCH-MANI, B. a A. J. SLUSARENKO, 1996. Production of Salicylic Acid Precursors Is a Major Function of Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell* [online]. **8**(2), 203-212 [cit. 2022-03-20]. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.8.2.203

MAXWELL, Kate a Giles N. JOHNSON, 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* [online]. **51**(345), 659-668 [cit. 2022-03-28]. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jexbot/51.345.659

MELOTTO, Maeli, William UNDERWOOD a Sheng Yang HE, 2008. Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual Review of Phytopathology* [online]. **46**(1), 101-122 [cit. 2022-03-19]. ISSN 0066-4286. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.phyto.121107.104959

MELOTTO, Maeli, William UNDERWOOD, Jessica KOCZAN, Kinya NOMURA a Sheng Yang HE, 2006. Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* [online]. **126**(5), 969-980 [cit. 2022-01-30]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2006.06.054

MISHINA, Tatiana E. a Jürgen ZEIER, 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal* [online]. **50**(3), 500-513 [cit. 2022-02-01]. ISSN 09607412. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03067.x

MIURA, Kenji, Hiroyuki OKAMOTO, Eiji OKUMA, Hayato SHIBA, Hiroshi KAMADA, Paul M. HASEGAWA a Yoshiyuki MURATA, 2013. SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in Arabidopsis. *The Plant Journal* [online]. **73**(1), 91-104 [cit. 2022-03-28]. ISSN 09607412. Dostupné z: doi:10.1111/tpj.12014

MORI, Izumi C, Yoshiyuki MURATA, Yingzhen YANG, et al., 2006. CDPKs CPK6 and CPK3 Function in ABA Regulation of Guard Cell S-Type Anion- and Ca<sup>2+</sup> - Permeable Channels and Stomatal Closure. *PLoS Biology* [online]. **4**(10) [cit. 2022-03-21]. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.0040327

MORI, Izumi C., Reinhard PINONTOAN, Tomonori KAWANO a Shoshi MUTO, 2001. Involvement of Superoxide Generation in Salicylic Acid-Induced Stomatal Closure in *Vicia faba*. *Plant and Cell Physiology* [online]. **42**(12), 1383-1388 [cit. 2022-03-21]. ISSN 1471-9053. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pce176

MOTT, KEITH A., ARTHUR C. GIBSON a JAMES W. O'LEARY, 1982. *The adaptive significance of amphistomatic leaves* [online]. **5**(6), 455-460 [cit. 2022-03-18]. ISSN 01407791. Dostupné z: doi:10.1111/1365-3040.ep11611750

MÜLLER, Patricia, Xiao-Ping LI a Krishna K. NIYOGI, 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology* [online]. **125**(4), 1558-1566 [cit. 2022-03-21]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.125.4.1558

MÜLLER, Patricia, Xiao-Ping LI a Krishna K. NIYOGI, 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology* [online]. **125**(4), 1558-1566 [cit. 2022-03-28]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.125.4.1558

MUSTILLI, Anna-Chiara, Sylvain MERLOT, Alain VAVASSEUR, Francesca FENZI a Jérôme GIRAUDAT, 2002. Arabidopsis OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production. *The Plant Cell* [online]. **14**(12), 3089-3099 [cit. 2022-03-21]. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.007906

NAWRATH, Christiane a Jean-Pierre MÉTRAUX, 1999. Salicylic Acid Induction–Deficient Mutants of Arabidopsis Express PR-2 and PR-5 and Accumulate High Levels of Camalexin after Pathogen Inoculation. *The Plant Cell* [online]. **11**(8), 1393-1404 [cit. 2022-02-02]. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.11.8.1393

NEGI, Juntaro, Osamu MATSUDA, Takashi NAGASAWA, et al., 2008. CO2 regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* [online]. **452**(7186), 483-486 [cit. 2022-03-21]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature06720

NISHIMURA, Marc T., Mónica STEIN, Bi-Huei HOU, John P. VOGEL, Herb EDWARDS a Shauna C. SOMERVILLE, 2003. Loss of a Callose Synthase Results in Salicylic Acid-Dependent Disease Resistance. *Science* [online]. **301**(5635), 969-972 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1086716

OBPL, obpl, 2018. Stomatal movements. *Orbit Biotech* [online]. 2018 [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: <https://orbitbiotech.com/stomatal-movements-stomatal-movements-starch-stewards-hypothesis/>

OKUMA, Eiji, Rieko NOZAWA, Yoshiyuki MURATA a Kenji MIURA, 2014. Accumulation of endogenous salicylic acid confers drought tolerance to Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* [online]. **9**(3), 1559-2324 [cit. 2022-04-10]. ISSN 1559-2324. Dostupné z: doi:10.4161/psb.28085

PANCHEVA, T.V., L.P. POPOVA a A.N. UZUNOVA, 1996. Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *Journal of Plant Physiology* [online]. **149**(1-2), 57-63 [cit.2022-02-01]. ISSN 01761617. Dostupné z: doi:10.1016/S0176-1617(96)80173-8

PANCHEVA, Tania V. a Losanka P. POPOVA, 1998. Effect of salicylic acid on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in barley leaves. *Journal of Plant Physiology* [online]. **152**(4-5), 381-386 [cit. 2022-03-21]. ISSN 01761617. Dostupné z: doi:10.1016/S0176-1617(98)80251-4

PEETERS, J. C. H. a P. EILERS, 1978. The relationship between light intensity and photosynthesis—A simple mathematical model. *Hydrobiological Bulletin* [online]. **12**(2), 134-136 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0165-1404. Dostupné z: doi:10.1007/BF02260714

PILLITTERI, Lynn Jo a Juan DONG, 2013. Stomatal Development in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* [online]. **11** [cit. 2022-03-18]. ISSN 1543-8120. Dostupné z: doi:10.1199/tab.0162

PLUHAŘOVÁ, Kamila, Hana LEONTOVYČOVÁ, Věra STOUĐKOVÁ, et al., 2019. “Salicylic Acid Mutant Collection” as a Tool to Explore the Role of Salicylic Acid in Regulation of Plant Growth under a Changing Environment. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(24) [cit. 2022-02-01]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20246365

POÓR, P., P. BORBÉLY, N. BÓDI, M. BAGYÁNSZKI a I. TARI, 2019. Effects of salicylic acid on photosynthetic activity and chloroplast morphology under light and prolonged

darkness. *Photosynthetica* [online]. **57**(2), 367-376 [cit. 2022-01-31]. ISSN 03003604. Dostupné z: doi:10.32615/ps.2019.040

POÓR, Péter a Irma TARI, 2012. Regulation of stomatal movement and photosynthetic activity in guard cells of tomato abaxial epidermal peels by salicylic acid. *Functional Plant Biology* [online]. **39**(12) [cit. 2022-01-31]. ISSN 1445-4408. Dostupné z: doi:10.1071/FP12187

PREUSS, Mary L., Aaron J. SCHMITZ, Julie M. THOLE, Heather K.S. BONNER, Marisa S. OTEGUI a Erik NIELSEN, 2006. A role for the RabA4b effector protein PI-4K $\beta$ 1 in polarized expansion of root hair cells in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Biology* [online]. **172**(7), 991-998 [cit. 2022-02-02]. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200508116

PRODHAN, Md. Yeasin, Shintaro MUNEMASA, Mst. Nur-E-Nazmun NAHAR, Yoshimasa NAKAMURA a Yoshiyuki MURATA, 2018. Guard Cell Salicylic Acid Signaling Is Integrated into Abscisic Acid Signaling via the Ca<sup>2+</sup>/CPK-Dependent Pathway. *Plant Physiology* [online]. **178**(1), 441-450 [cit. 2022-01-30]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.18.00321

QI, Xingyun a Keiko U. TORII, 2018. Hormonal and environmental signals guiding stomatal development. *BMC Biology* [online]. February 2018, **16**(1) [cit. 2021-02-25]. ISSN 1741-7007. Dostupné z: doi:10.1186/s12915-018-0488-5

QIU, Zhengkun, Xiaoxuan WANG, Jianchang GAO, Yanmei GUO, Zejun HUANG, Yongchen DU a Keqiang WU, 2016. The Tomato Hoffman's Anthocyaninless Gene Encodes a bHLH Transcription Factor Involved in Anthocyanin Biosynthesis That Is Developmentally Regulated and Induced by Low Temperatures. *PLOS ONE* [online]. **11**(3) [cit. 2022-01-30]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0151067

RAINES, Christine A., 2003. The Calvin cycle revisited. *Photosynthesis Research* [online]. 2003, **75**(1), 1-10 [cit. 2022-03-17]. ISSN 01668595. Dostupné z: doi:10.1023/A:1022421515027

RASKIN, I., I. M. TURNER a W. R. MELANDER, 1989. Regulation of heat production in the inflorescences of an Arum lily by endogenous salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **86**(7), 2214-2218 [cit. 2022-01-31]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.86.7.2214

RASMUSSEN, Michelle a Shelley D. MINTEER, 2014. Photobioelectrochemistry: Solar Energy Conversion and Biofuel Production with Photosynthetic Catalysts. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. **161**(10), H647-H655 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0013-4651. Dostupné z: doi:10.1149/2.0651410jes

RATE, Debra N., James V. CUENCA, Grant R. BOWMAN, David S. GUTTMAN a Jean T. GREENBERG, 1999. The Gain-of-Function *Arabidopsis* *acd6* Mutant Reveals Novel Regulation and Function of the Salicylic Acid Signaling Pathway in Controlling Cell Death, Defenses, and Cell Growth. *The Plant Cell* [online]. **11**(9), 1695-1708 [cit. 2022-02-02]. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.11.9.1695

SAGE, Rowan F., Thomas D. SHARKEY a Jeffrey R. SEEMANN, 1989. Acclimation of Photosynthesis to Elevated CO<sub>2</sub> in Five C<sub>3</sub> Species. *Plant Physiology* [online]. **89**(2), 590-596 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.89.2.590



- SCARTH, George W., 1932. MECHANISM OF THE ACTION OF LIGHT AND OTHER FACTORS ON STOMATAL MOVEMENT. *Plant Physiology* [online]. **7**(3), 481-504 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.7.3.481
- SEEMANN, Jeffrey R., Thomas D. SHARKEY, Jinlang WANG a C. Barry OSMOND, 1987. Environmental Effects on Photosynthesis, Nitrogen-Use Efficiency, and Metabolite Pools in Leaves of Sun and Shade Plants. *Plant Physiology* [online]. **84**(3), 796-802 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.84.3.796
- SENIOR, A. E., 1988. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiological Reviews* [online]. **68**(1), 177-231 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.1988.68.1.177
- SHAH, Jyoti a Jürgen ZEIER, 2013. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* [online]. **4**(30) [cit. 2022-03-23]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2013.00030
- SCHINDELIN, Johannes, Ignacio ARGANDA-CARRERAS, Erwin FRISE, et al., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* [online]. **9**(7), 676-682 [cit. 2022-02-03]. ISSN 1548-7091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.2019
- SCHROEDER, Julian I., Klaus RASCHKE a Erwin NEHER, 1987. Voltage dependence of K channels in guard-cell protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **84**(12), 4108-4112 [cit. 2022-03-21]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.84.12.4108
- SKIRY CZ, Aleksandra a Dirk INZÉ, 2010. More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **21**(2), 197-203 [cit. 2022-03-17]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2010.03.002
- SLATYER, R. O., 1960. Absorption of water by plants. *The Botanical Review* [online]. **26**(3), 331-392 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0006-8101. Dostupné z: doi:10.1007/BF02860807
- SPERDOULI, Ilektra a Michael MOUSTAKAS, 2012. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *Journal of Plant Physiology* [online]. **169**(6), 577-585 [cit. 2022-01-30]. ISSN 01761617. Dostupné z: doi:10.1016/j.jplph.2011.12.015
- ŠAŠEK, Vladimír, Martin JANDA, Elise DELAGE, et al., 2014. Constitutive salicylic acid accumulation in pi4k III  $\beta$ 1 $\beta$ 2 *Arabidopsis* plants stunts rosette but not root growth. *New Phytologist* [online]. **203**(3), 805-816 [cit. 2022-03-21]. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/nph.12822
- TAIZ, Lincoln, Eduardo ZEIGER, Ian Max MØLLER a Angus S. MURPHY, 2018. *Plant physiology and development*. 6. New York: Sinauer Associates, Oxford University Press. [cit. 2022-01-30]. ISBN 978-160-5357-454.
- TANAKA, Yoshikazu, Nobuhiro SASAKI a Akemi OHMIYA, 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* [online]. **54**(4), 733-749 [cit. 2022-01-30]. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x
- TATTERSALL, Elizabeth A. R., Jérôme GRIMPLET, Laurent DELUC, et al., 2007. Transcript abundance profiles reveal larger and more complex responses of grapevine to chilling compared to osmotic and salinity stress. *American Journal of Plant Sciences* [online]. **7**(4), 317-333 [cit. 2022-03-17]. ISSN 1438-793X. Dostupné z: doi:10.1007/s10142-007-0051-x

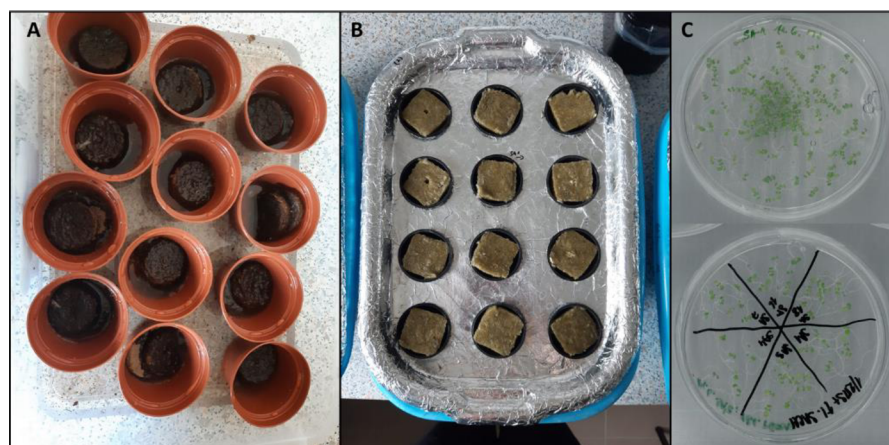
- TREBST, A, 1974. Energy Conservation in Photosynthetic Electron Transport of Chloroplasts. *Annual Review of Plant Physiology* [online]. **25**(1), 423-458 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0066-4294. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pp.25.060174.002231
- TSUDA, Kenichi, Akira MINE, Gerit BETHKE, et al., 2013. Dual Regulation of Gene Expression Mediated by Extended MAPK Activation and Salicylic Acid Contributes to Robust Innate Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* [online]. **9**(12) [cit. 2022-03-20]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1004015
- TSUDA, Kenichi, Masanao SATO, Thomas STODDARD, Jane GLAZEBROOK, Fumiaki KATAGIRI a Gregory P. COPENHAVER, 2009. Network Properties of Robust Immunity in Plants. *PLoS Genetics* [online]. **5**(12) [cit. 2022-03-20]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1000772
- UZUNOVA, A.N. a L.P. POPOVA, 2000. Effect of Salicylic Acid on Leaf Anatomy and Chloroplast Ultrastructure of Barley Plants. *Photosynthetica* [online]. **38**(2), 243-250 [cit. 2022-02-01]. ISSN 03003604. Dostupné z: doi:10.1023/A:1007226116925
- VLOT, A. Corina, D'Maris Amick DEMPSEY a Daniel F. KLESSIG, 2009. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* [online]. **47**(1), 177-206 [cit. 2022-03-20]. ISSN 0066-4286. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.phyto.050908.135202
- VORWERK, Sonja, Celine SCHIFF, Marjorie SANTAMARIA, Serry KOH, Marc NISHIMURA, John VOGEL, Chris SOMERVILLE a Shauna SOMERVILLE, 2007. EDR2 negatively regulates salicylic acid-based defenses and cell death during powdery mildew infections of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* [online]. **7**(1) [cit. 2022-02-02]. ISSN 1471-2229. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2229-7-35
- WANG, Yuan-Yuan, Yu WANG, Guang-Zhe LI a Lin HAO, 2019. Salicylic acid-altering *Arabidopsis* plant response to cadmium exposure: Underlying mechanisms affecting antioxidation and photosynthesis-related processes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. **169**, 645-653 [cit. 2022-04-11]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2018.11.062
- WILDERMUTH, Mary C., Julia DEWDNEY, Gang WU a Frederick M. AUSUBEL, 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* [online]. 2001, **414**, 562-565 [cit. 2022-02-02]. Dostupné z: doi:10.1038/35107108
- YLOR, Donald E., Jean-Yves PARLANGE a A. D. KRİKORIAN, 1973. STOMATAL MECHANICS. *American Journal of Botany* [online]. **60**(2), 163-171 [cit. 2022-03-18]. ISSN 00029122. Dostupné z: doi:10.1002/j.1537-2197.1973.tb10213.x
- ZHANG, Haoshan a Chunjiang ZHOU, 2013. Signal transduction in leaf senescence. *Plant Molecular Biology* [online]. **82**(6), 539-545 [cit. 2022-03-27]. ISSN 0167-4412. Dostupné z: doi:10.1007/s11103-012-9980-4
- ZHANG, Yuelin, Sandra GORITSCHNIG, Xinnian DONG a Xin LI, 2003. A Gain-of-Function Mutation in a Plant Disease Resistance Gene Leads to Constitutive Activation of Downstream Signal Transduction Pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. *The Plant Cell* [online]. **15**(11), 2636-2646 [cit. 2022-02-02]. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.015842

ZHAO, L a F D SACK, 1999. Ultrastructure of stomatal development in *Arabidopsis* (Brassicaceae) leaves. *American Journal of Botany* [online]. 1999, **86**(7), 929–939 [cit. 2021-02-25]. ISSN 1537-2197. Dostupné z: doi:10.2307/2656609

ZHENG, Xiao-yu, Mian ZHOU, Heejin YOO, Jose L. PRUNEDA-PAZ, Natalie Weaver SPIVEY, Steve A. KAY a Xinnian DONG, 2015. Spatial and temporal regulation of biosynthesis of the plant immune signal salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **112**(30), 9166-9173 [cit. 2022-01-31]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1511182112

ZOU, Bo, Dongli WAN, Ruili LI, Xiaomin HAN, Guojing LI, Ruigang WANG a Ing-Feng CHANG, 2017. Calmodulin-binding protein CBP60g functions as a negative regulator in *Arabidopsis* anthocyanin accumulation. *PLOS ONE* [online]. **12**(3) [cit. 2022-02-06]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0173129

## Seznam příloh



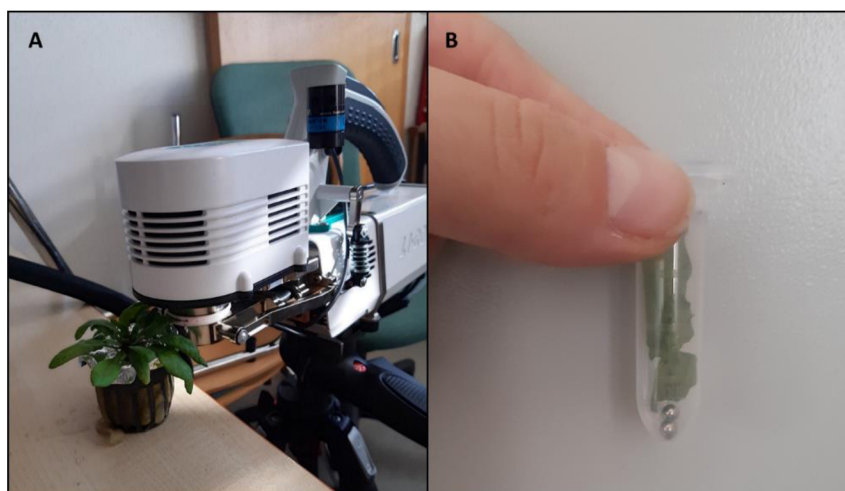
**Příloha číslo 1: Pěstování rostlin.** A) v zemině, B) hydroponicky, C) sterilně v Petriho miskách na MS médiu (nahore před vyjednocením, dole po vyjednocení)



**Příloha číslo 2: Drcení rostlinného materiálu na analýzu anthokyanů**



**Příloha číslo 3: Zhotovený otisk listu nalepený na podložním skle**



**Příloha č. 4: Stanovení koncentrace CO<sub>2</sub> uvnitř listu.** A) List uzavřený v komoře LI-COR při gazometrickém měření. B) Usušený rostlinný materiál se dvěma drticími kuličkami, pro stanovení izotopu <sup>13</sup>C.