

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH SOD

U ROSTLIN *ARABIDOPSIS THALIANA*

A MEDICAGO SATIVA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Sabina Hanáková
Studijní program:	B0512A130007
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.
Rok:	2022

Prohlášení

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

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Poděkování

Především děkuji svému vedoucímu Mgr. Petru Dvořákovi, Ph.D. z Katedry biotechnologií PřF UP za cenné rady, poskytnutí studijních materiálů a odborné vedení během vypracování této bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Sabina Hanáková
Název práce: Charakterizace vybraných SOD u rostlin *Arabidopsis thaliana* a *Medicago sativa*
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Katedra biotechnologií
Vedoucí práce: Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.
Rok obhajoby práce 2022

Abstrakt:

Rostliny, jakožto sesilní organismy, svádí celoživotní boj s měnícími se podmínkami prostředí a investují tak nemalé množství energie do vhodné adaptace. Mezi první signální molekuly patří reaktivní formy kyslíku, které vznikají v odpovědi na nově působící stres, a to v důsledku působení jak biotických, tak i abiotických stresových faktorů. Jejich hladiny musí být udržovány v určité fyziologické koncentraci, jinak se jejich signální funkce mění na destruktivní. Za tímto účelem rostliny vyvinuly komplexní aparát nazývaný jako antioxidační obrana. Jedním z hlavních zástupců antioxidační obrany jsou enzymy, známé jako superoxiddismutasy, které katalyzují přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku a kyslík. Tyto enzymy jsou zastoupeny v genomu *Arabidopsis thaliana* celkem v osmi isoformách a regulace jejich exprese je ovlivňována celou řadou podnětů. Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující expresi SOD patří dostupnost mědi, kdy je tato regulace zprostředkována pomocí transkripčního faktoru SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7.

Tato práce pomocí biochemické analýzy, zahrnující enzymatickou analýzu a imunoblotování se specifickými protilátkami anti-CSD a anti-FSD1, ověřila vliv různých koncentrací mědi v růstovém médiu na abundanci a aktivitu superoxiddismutasy, společně s fenotypovými projevy u divokého typu *A. thaliana* a rostliny *Medicago sativa*. Pomocí bioinformatické analýzy byly nově definovány superoxiddismutasy u rostliny *M. sativa* a následná fylogenetická analýza navrhla jejich možnou roli v buňce. Provedená mikroskopická analýza tranzientně transformovaných listů *Nicotiana benthamiana* potvrdila funkčnost dříve připraveného konstruktů kódujícího *pCSD1-gCSD1::eGFP:3'UTR-CSD1* a naznačila možnou subcelulární lokalizaci tohoto fúzního proteinu.

Klíčová slova: reaktivní formy kyslíku, antioxidační obrana, superoxiddismutasy, SQUAMOSA promoter-binding protein-like, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*
Počet stran: 72
Počet příloh: 7
Jazyk: Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Sabina Hanáková
Title: Characterization of selected SOD in *Arabidopsis thaliana* and *Medicago sativa*
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of Biotechnology
Supervisor: Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.
The year of presentation: 2022

Abstract:

Plants, as sessile organisms, are fighting daily with consistent changes in their environmental conditions and they invest a large amount of energy into appropriate adaptation. Reactive oxygen species belongs among the first signal molecules, which are being created as a reaction to a stress, due to biotic and abiotic stress factors. The concentration of reactive oxygen species has to be maintained in certain physiological concentrations, otherwise their signal functions change to destructive ones. For this purpose, plants had developed a complex apparatus called an antioxidant defence. One of the main representatives of antioxidant defences are enzymes known as superoxide dismutases, which catalyse conversion of superoxide radicals to hydrogen peroxide and oxygen. These enzymes are presented overall in eight isoforms in the genome of *Arabidopsis thaliana* and their gene expression regulation is affected by a whole range of factors. One of the most important factors influencing their expression is the availability of copper, which is mediated via transcriptional factor SQUAMOSA promoter-binding protein like 7.

This bachelor thesis verified the influence of various concentrations of copper in growth medium on abundance and activity of *A. thaliana* and *Medicago sativa* superoxide dismutases by using biochemical analysis, including enzymatic analysis and immunoblotting with specific anti-CSD and anti-FSD1 antibodies. Also, the phenotype analysis of *A. thaliana* and *M. sativa* seedlings was performed under exanimated conditions. The new superoxide dismutases were defined by bioinformatical analysis in *M. sativa* and phylogenetic analysis suggested their possible role in cell. The microscopic analysis of transiently transformed leaves of *Nicotiana benthamiana* confirmed the functionality of a prepared *pCSD1-gCSD1::eGFP:3'UTR-CSD1* construct which indicated a possible subcellular localization of fusion protein.

Keywords: reactive oxygen species, antioxidant defence, superoxide dismutases, SQUAMOSA promoter-binding protein-like, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*
Number of pages: 72
Number of appendices: 7
Language: Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Reaktivní formy kyslíku	2
2.1.1	Charakteristika hlavních zástupců ROS	3
2.1.2	Vznik ROS	5
2.1.3	Signální a vývojová role ROS	7
2.2	Základní charakteristika rostlinné antioxidační obrany	10
2.2.1	Charakterizace superoxiddismutas u rostlin	11
2.2.2	Cu/ZnSOD u <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.2.3	FeSOD u <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.2.4	MnSOD u <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
2.2.5	SOD u <i>Medicago sativa</i>	16
2.3	Základní charakterizace transkripčních faktorů SQUAMOSA promoter-binding protein-like	18
2.3.1	Úloha SPL7 u <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1	Biologický materiál	22
3.2	Chemikálie	22
3.3	Roztoky a média	24
3.4	Soupravy	27
3.5	Protilátky	27
3.6	Přístroje a zařízení	27
3.7	Programy a databáze	28
3.8	Metody	28
3.8.1	Bioinformatická predikce SOD genů u píceiny <i>M. sativa</i>	28
3.8.2	Povrchová sterilizace semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
3.8.3	Skarifikace semen <i>Medicago sativa</i>	29
3.8.4	Povrchová sterilizace semen <i>Medicago sativa</i>	30
3.8.5	Příprava médií	30
3.8.6	Výsev a kultivace sterilních semen	31
3.8.7	Fenotypová analýza <i>in vitro</i> kultivovaných rostlin	31
3.8.8	Extrakce proteinů pro biochemické analýzy	31
3.8.9	Měření koncentrace proteinů	32
3.8.10	Metoda stanovení enzymatické aktivity SOD	32
3.8.11	SDS-PAGE	33
3.8.12	Imunoblotování	33

3.8.13	Tranzientní transformace <i>Nicotiana benthamiana</i>	34
3.8.14	Konfokální mikroskopie	35
4	VÝSLEDKY	37
4.1	Fenotypová analýza semenáčků rostlin <i>A. thaliana</i> rostoucích při různé dostupnosti mědi a dusíku.....	37
4.2	Biochemická analýza SOD u rostliny <i>A. thaliana</i> rostoucích při různé dostupnosti mědi a dusíku.....	39
4.3	Fenotypová analýza semenáčků rostliny <i>M. sativa</i> rostoucích při různé dostupnosti mědi	44
4.4	Biochemická analýza SOD u rostliny <i>M. sativa</i> rostoucích při různé dostupnosti mědi	46
4.5	Mikroskopická analýza listů <i>Nicotiana benthamiana</i> transformovaných konstruktem <i>pCSD1-gCSD1::eGFP:3'UTR-CSD1</i>	50
4.6	Bioinformatická analýza superoxiddismutas u <i>M. sativa</i>	51
5	DISKUSE.....	55
6	ZÁVĚR	59
7	LITERATURA.....	60
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	70
9	PŘÍLOHY	72

CÍLE PRÁCE:

Vypracování rešerše na téma: Reaktivní formy kyslíku, jejich vznik, reaktivita, role při buněčné signalizaci a vývoji rostlin. Dále antioxidantní obrana rostlin se zaměřením na superoxiddismutasy (SOD) a jejich regulace pomocí SQUAMOSA promoter-binding protein-like7 transkripčního faktoru.

Experimentální cíle: Získání praktických zkušeností v práci s rostlinami a v základních molekulárně-biologických a biochemických metodách.

Ověření vlivu různých koncentrací mědi a dusíku v růstovém médiu na úrovni fenotypového projevu a vliv na abundanci a aktivitu SOD u divokého typu *A. thaliana* a *M. sativa*. Definování jednotlivých isoenzymů SOD pomocí inhibiční analýzy u *M. sativa* a jejich bioinformatická analýza. Ověření funkčnosti připraveného konstruktů kódujícího fúzní CSD1-GFP protein pomocí transientní transformace epidermálních buněk *N. benthamiana*.

1 ÚVOD

Rostliny jsou v průběhu života nuceny neustále se přizpůsobovat prostředí, ve kterém se nacházejí. Jsou pod neustálým vlivem různých stresových faktorů, které značnou mírou ovlivňují jejich fyziologické procesy. Důsledkem tohoto působení v organismu vznikají a hromadí se reaktivní formy kyslíku, které plní důležitou signální a vývojovou roli. Nicméně musí být udržovány v určitých fyziologických koncentracích, protože se v určitém, nadlimitním množství stávají pro rostliny toxickými. V reakci na jejich zvýšenou produkci dochází ke spuštění celé řady různých obranných mechanismů, a to včetně navýšení kapacity systému nazývaného jako antioxidační obrana. Mezi hlavní zástupce antioxidační obrany se řadí metaloenzymy známé jako superoxiddismutasy, které koordinují ve své struktuře aktivního místa atomy různých kovů, které jsou zcela nezbytné pro katalýzu superoxidového radikálu na peroxid vodíku a kyslík (Pilon *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018). Významné množství isoform superoxiddismutas je regulováno pomocí SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 transkripčního faktoru, který představuje jeden z hlavních regulátorů procesů závislých na dostupnosti mědi v rostlinách (Yamasaki *et al.*, 2009).

Tato bakalářská práce je zejména zaměřena na superoxiddismutasy u rostlin *Arabidopsis thaliana* a *Medicago sativa* a na jejich závislost abundance a aktivit při různé dostupnosti mědi v růstovém médiu. Manuálně připravená média s různým obsahem mědi byla využita pro fenotypovou analýzu semenáčků. Následná biochemická analýza aktivit superoxiddismutas a imunoblotování se specifickými protilátkami potvrdila záměnu aktivit/abundance u superoxiddismutas závislých na mědi, a to jak u rostliny *A. thaliana*, tak i *M. sativa*. Pomocí bioinformatické analýzy se podařilo nově definovat superoxiddismutasy u rostliny *M. sativa* a predikovat jejich možné lokalizace a funkce u této rostliny. Závěr experimentální práce je věnován validaci dříve připraveného konstruktů *pCSD1-gCSD1::eGFP:3'UTR-CSD1* pomocí transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana* s následným mikroskopickým pozorováním.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Reaktivní formy kyslíku

Za jeden ze zcela klíčových okamžiků evoluce lze považovat výrazné zvýšení molekulárního kyslíku (O_2) v zemské atmosféře, které bylo zapříčiněno především činností fotosyntetizujících cyanobacterií (Halliwell, 2006). Tato událost vedla k postupnému vývoji celé řady aerobních organismů, jejichž společným znakem je využívání O_2 v jejich bazálním metabolismu. V oxidativním metabolismu slouží O_2 především jako finální akceptor elektronů, a to v systémech známých jakožto elektron-transportní řetězce. Právě jejich funkce, charakteristická vysokou rychlostí přenosu elektronů nebo energie, vede nevyhnutelně k tvorbě volných kyslíkatých radikálů (Reactive oxygen species; ROS; Janků *et al.*, 2019).

Jak již bylo naznačeno, hlavním zdrojem pro tvorbu ROS je O_2 s vlastností diradikálu. I přesto, že je tato molekula sama o sobě považována za relativně stabilní, obsahuje ve své struktuře dva nepárové valenční elektrony. Díky tomu může po přidání či odebrání energie snadno měnit svoji konformaci a může tak přecházet v různé reaktivní formy. Příkladem takového stavu může pak být tripletový nebo singletový stav (Huang *et al.*, 2019).

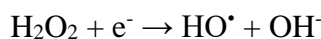
Jednotlivé zástupce ROS, odvozené od molekuly O_2 , poté dělíme na volné radikály, kterými jsou: superoxid ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}), peroxy (ROO^{\cdot}), alkoxy (RO^{\cdot}) a hydroperoxy (HO_2^{\cdot}). Druhou skupinu poté tvoří molekuly neradikálové povahy. Do této skupiny spadají molekuly, které se dále účastní na vzniku radikálů. Jsou jimi: peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná ($HOCl$), ozon (O_3) a singletový kyslík (1O_2). Tyto formy se dají odvodit od základní molekuly O_2 sérií postupných redukčních jednoelektronových kroků, které v organismu vznikají analogickými pochody při enzymatických a neenzymatických cestách (Karuppanapandian *et al.*, 2011).

Dříve byly ROS chápány především jako vedlejší produkty aerobního metabolismu a jejich přítomnost v organismus byla považována jako nežádoucí jev, který je třeba co nejdříve eliminovat. Za tímto účelem si nejenom rostliny vyvinuly velmi účinnou a propracovanou antioxidační obranu (Blokhina *et al.*, 2003). Její složení a role v rostlinách bude samostatně diskutována v kapitole 2.2. V následujících letech bylo prokázáno, že ROS jsou toxické až při vyšších koncentracích (především za stresových podmínek), kdy dokážou poškodit jak proteiny, tak i nukleové kyseliny, a dokonce působí i na lipidy membrán (Apel a Hirt, 2004).

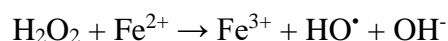
Postupem času bylo zjištěno, že ROS mají na organismus nejen negativní, ale i pozitivní vliv. ROS se účastní na aktivaci mnoha různých fyziologických procesů, kterými jsou zejména ochrana organismu před patogeny z okolního prostředí, zapojení do vývojových procesů či účast na buněčné signalizaci (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Hlavní vlastnosti, jejich vznik a role ROS u rostlin budou dále detailněji diskutovány v následujících kapitolách.

2.1.1 Charakteristika hlavních zástupců ROS

Mezi čtyři hlavní a nejvýznamnější zástupce pak řadíme $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 a OH^{\cdot} . Tito zástupci ROS se od sebe navzájem liší chemickými vlastnostmi, reaktivitou a také stabilitou. Nejreaktivnějším a nejnebezpečnějším je OH^{\cdot} , který má nejkratší poločas rozpadu, a to 1 ns. Jeho migrační vzdálenost mezi molekulami pak odpovídá přibližně 1 nm (Mittler, 2017). OH^{\cdot} vzniká nejčastěji z H_2O_2 v jednoelektronové reakci.



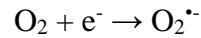
Tato látka může také vznikat v případě, že se nachází v přítomnosti konkrétních volných redukováných iontů kovu. Dochází tak k Fentonové reakci H_2O_2 s železem či mědí.



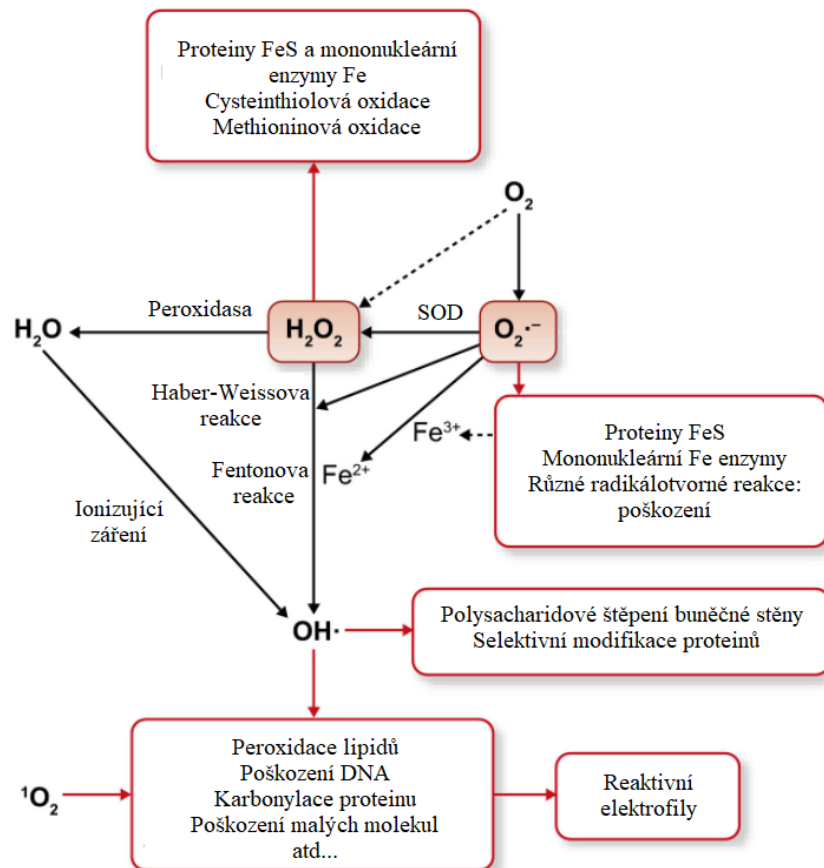
OH^{\cdot} produkují chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy i apoplast. Taktéž výborně reaguje v podstatě s každou další sousední biomolekulou včetně lipidů a proteinů. S biomolekulou se dokáže sloučit anebo z ní vytrhnout elektron a tím ji aktivovat. Také je schopen poškozovat purinové či pyrimidinové báze v nukleových kyselinách, a způsobit tak mutace (Mittler, 2017).

Dalším, avšak poměrně málo stabilním a reaktivním zástupcem, který má poměrně krátký poločas rozpadu (1-4 μs), je $^1\text{O}_2$. Jeho migrační vzdálenost činí 30 nm a kvůli tomu, bývá řazen mezi nestabilní ROS (Skovsen *et al.*, 2005). $^1\text{O}_2$ vzniká v chloroplastech, konkrétně v tylakoidní membráně (Triantaphylidès a Havaux, 2009). Dále během metabolických procesů, působením ozonu či γ -zářením nebo reakcí singletového kyslíku s elektronem (Smirnoff a Arnaud, 2019). Podobně nestabilní, se

stejným poločasem rozpadu, který nepřesahuje 1 μ s, je také $O_2^{\cdot-}$, který vzniká z tripletového kyslíku a liší se od sebe směrem elektronů.



Tato molekula se tvoří v peroxisomech, mitochondriích, chloroplastech a také v apoplastu. $O_2^{\cdot-}$ může difundovat pouze na vzdálenost několika nanometrů. Konkrétně 30 nm, stejně jako tomu je u 1O_2 . Právě proto jej také označujeme za velmi nestabilní. V důsledku tohoto znaku často napadá ostatní molekuly a podněcuje tak tvorbu dalších ROS (Halliwell, 2006). Hlavním typem poškozených molekul bývá například akonitasa (AKO, EC 4.2.1.3), která ve své struktuře obsahuje klastr (4Fe-4S) (Wallace *et al.*, 2004). $O_2^{\cdot-}$ způsobuje oxidaci tohoto klastru (Fridovich, 1995), což vede k uvolnění železnatého iontu, který následně může reagovat s H_2O_2 za vzniku OH^{\cdot} (Obrázek 1).



Obrázek 1: Tvorba a reaktivita superoxidu ($O_2^{\cdot-}$), peroxidu vodíku (H_2O_2) a dalších reaktivních forem kyslíku. $O_2^{\cdot-}$ je produkován oxidasami (např. NADPH oxidasa) a procesy transportu elektronů. Převzato a upraveno ze Smirnov a Arnaud (2019). H_2O_2 a $O_2^{\cdot-}$ mohou poškozovat proteiny obsahující Fe a FeS, za vzniku reaktivních radikálů (např. thiolových radikálů z thiolů). Zkratky: hydroxylový radikál (OH^{\cdot}); molekulární kyslík (O_2); singletový kyslík (1O_2); sulfid železnatý (FeS); superoxid $O_2^{\cdot-}$; superoxididismutasa (SOD); voda (H_2O).

Na druhé straně škály pak stojí již zmíněný H_2O_2 , jehož poločas rozpadu se pohybuje ve škále vyšší než 1 ms a jeho migrační vzdálenost je vyšší než 1 μm . Místem produkce H_2O_2 jsou především chloroplasty (Ivanov *et al.*, 2018) a další organely jako například mitochondrie (Ježek a Hlavatá, 2005). Dále také vzniká v peroxisomech dismutací $\text{O}_2^{\cdot-}$, případně působením některých enzymů jako jsou xanthinoxidasa (XO, EC 1.1.3.22) nebo monoaminoxidasa (MAO, EC 1.4.3.4). Neposledním místem vzniku je také apoplast a cytosol. Jedná se o poměrně málo reaktivního, ale naopak nejvíce stabilního člena ROS. Právě s těmito vlastnostmi a s tím, že je H_2O_2 bez náboje, souvisí schopnost prostupovat přes lipidové membrány. Tento přenos se uskutečňuje prostřednictvím speciálních kanálů známých jako aquaporiny (Bienert *et al.*, 2006). Molekula H_2O_2 je schopna reagovat s DNA, s hemovými proteiny či s proteiny prostřednictvím thiolových skupin cysteinů a methioninových zbytků. Taktéž hraje nezastupitelnou roli v řadě rostlinných vývojových procesech a buněčné signalizaci (Smirnov a Arnaud, 2019).

2.1.2 Vznik ROS

Vznik ROS v organismu je přirozenou záležitostí. Testy provedené v roce 1951 potvrdily zvýšenou produkci H_2O_2 po osvětlení v chloroplastech (Mehler, 1951). Další výzkumy poté potvrdily, že právě chloroplasty patří mezi hlavní producenty $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 a OH^{\cdot} u rostlin (Gill a Tuteja, 2010). ROS jsou poskytovány především prostřednictvím fotosystému I a fotosystému II, a také prostřednictvím elektron transportního řetězce v thylakoidní membráně během světelné fáze fotosyntézy. Ke tvorbě $\text{O}_2^{\cdot-}$ přispívá také feredoxin, ale tato cesta redukce O_2 je závislá na dostupnosti oxidovaného nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP^+). Pokud se NADP^+ vyskytuje v nízkých koncentracích, nastává tzv. Mehlerova reakce (fotoredukce kyslíku; Kozuleva a Ivanov, 2010). Na tvorbě ROS se rovněž podílí chlorofylové pigmenty v reakčním centru fotosystému II, kde dochází k reakci tripletního O_2 s chlorofylem. Tímto procesem dochází ke vzniku $^1\text{O}_2$ (Roach a Krieger-Liszkay, 2014).

Jedním z hlavních míst produkce jsou rovněž mitochondrie. Zde ROS vznikají především jako vedlejší produkty aerobního respiračního (dýchacího) řetězce na komplexu I a III (Schieber a Chandel, 2014). Jedná se hlavně o vznik $\text{O}_2^{\cdot-}$, který je následně pomocí superoxidodismutasy (SOD, EC 1.15.1.1) dismutován na H_2O_2 a O_2 .

Místa, která pravidelně a výrazně přispívají tvorbou ROS jsou také peroxisomy a glyoxyzomy. V matrix peroxisomech je XO, která katalyzuje reakci hypoxanthinu na xanthin, a nakonec i na samotnou kyselinu močovou. V průběhu této cesty oxidace vznikají produkty jako $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Halliwell a Gutteridge, 2015, Karuppanapandian *et al.*, 2011). V peroxisomech, na její membráně, může $O_2^{\cdot-}$ vznikat v elektron transportním řetězci (López-Huertas *et al.*, 1999). Taktéž β -oxidací mastných kyselin a působením enzymů, jako například glykolát oxydasa (EC 1.1.3.15) a urát oxidasa (EC 1.7.3.3), dochází v glyoxyzomech či peroxisomech ke vzniku ROS (del Río, 2016; Janků *et al.*, 2019). Produkce významného množství H_2O_2 v peroxisomech je taktéž spojena s procesem známým jako fotorespirace, kdy dochází k soustavné akumulaci H_2O_2 . Ten je však okamžitě degradován antioxidačním enzymem známým jako katalasa (CAT; EC 1.11.1.6), vyskytující se v těchto organelách (Lopez-Huertas *et al.*, 2000).

K nezanedbatelné produkci ROS dochází i v jiných místech rostliny, která však disponují dostatečně vysokým redoxním potenciálem (Mittler, 2017). Takovouto oblastí pak může být například endoplazmatické retikulum, cytoplazma a především apoplast. Do apoplastu se $O_2^{\cdot-}$ dostává skrze produkci enzymy známými jako NADPH oxidasy (EC 1.6.3.1), které jsou u rostlin nazývány jako „RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG“ (RBOH), přičemž tyto RBOH jsou přítomny v cytoplazmatické membráně (Kadota *et al.*, 2015). Role v buněčné signalizaci a regulace RBOH bude detailněji popsána v kapitole 2.1.3.

Jak již bylo naznačeno, zvýšené množství ROS vzniká především v důsledku působení stresových faktorů (stresor), které výrazně ovlivňují růst a vývoj rostlin. Tyto faktory se dále dělí na dva typy, a to dle původu jejich vzniku. Prvním jsou stresory biotického původu. V tomto případě je organismus vystaven působení patogenu (bakterie, fytoplazmy, houby, viry, viroidy či nematoda), cizí rostlině či býložravému živočichu, kterému slouží jako potrava (Castro *et al.*, 2021). Tito původci, kteří ohrožují rostlinu, jsou rozpoznány receptory, které jsou lokalizovány na plazmatické membráně vedoucí k cílené odpovědi na jejich přítomnost.

Druhým typem jsou pak stresory abiotické, které způsobují neživé faktory, ať už chemického či fyzikálního původu. Takovými faktory jsou například: nedostatek či nadbytek vody, nadměrné světelné či ionizující záření, vysoká či nízká teplota nebo mechanické poranění. Dále pak nedostatek živin, výskyt toxických prvků nebo snížená či zvýšená koncentrace iontů a solí v půdě (Nadarajah, 2020).

Oba druhy zmíněných stresů vedou ke spuštění cílených signálních drah vedoucí taktéž v prvních fázích k cílené produkci ROS. Produkce ROS v odpovědi na působící stres je označována jako ROS oxidační vzplanutí (ROS oxidative burst). Hlavní funkcí této ROS signální dráhy je: Zaprvé amplifikace přijatého úvodního signálního podnětu, který je následně dál přenášen za účelem upozornění okolních buněk či pletiv na působící stres. Zadruhé propojení biotických a abiotických signálů a zatřetí koordinace systémové stomatální reakce celé rostliny (Castro *et al.*, 2021). V případě biotického stresu je taktéž cílem produkovaných ROS usmrcení nebo alespoň částečně zabránit šíření daného původce, který napadl imunitní systém (Apostol *et al.*, 1989).

2.1.3 Signální a vývojová role ROS

Podle toho, co již bylo zmíněno výše víme, že role ROS není pro organismus pouze destruktivní, ale plní řadu důležitých funkcí. Příkladem může být to, že působí jako signální molekuly (Schieber a Chandel, 2014; Waszczak *et al.*, 2018). Tato úloha ROS závisí na poměru mezi jejich vznikem a detoxifikací (Foyer a Noctor, 2013). V závislosti na míře produkce ROS, druhu a intenzitě stresu, momentální antioxidační kapacitě a energetickém stavu buněk lze získat různé buněčné a fyziologické výstupy působení ROS.

Ve vyšších koncentracích ROS posouvají buněčnou redoxní rovnováhu směrem k oxidovanému stavu, což může být vnímáno rozdílným způsobem různými kompartmenty buňky (Noctor *et al.*, 2017). Jeden z hlavních výstupů akumulace ROS je modifikace redox-senzitivních proteinů (např. kinasy, transkripční faktory a proteiny zapojené do odpovědi na stres; Waszczak *et al.*, 2014 a 2015), které vedou ke změně struktury proteinů, lokalizace, aktivity a v neposlední řadě také ke změnám na úrovni protein-proteinových interakcí (Castro *et al.*, 2021). Hlavním mechanismem vnímání přítomnosti zvýšené koncentrace ROS (především H_2O_2) je oxidační modifikace cysteinů v proteinových strukturách redox-senzitivních proteinů (Waszczak *et al.*, 2015). Tato modifikace je přísně regulována redox-senzitivními pufráčními proteiny, jako jsou thioredoxiny, peroxiredoxiny a glutaredoxiny, které mohou podléhat reverzibilní oxidaci/redukci a jsou aktivovány/inaktivovány v reakci na buněčný redoxní stav (Waszczak *et al.*, 2015 a 2018).

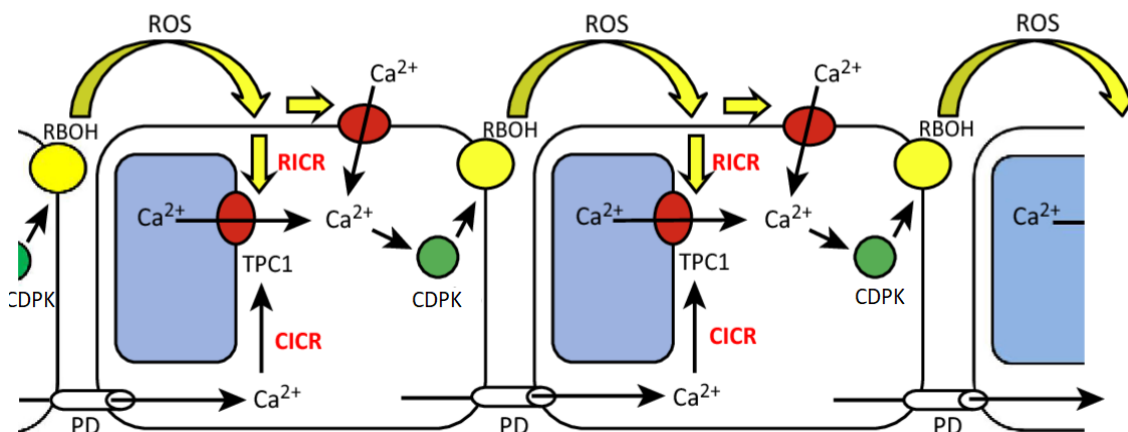
U rostlin se na přímé signalizaci podílí především apoplastický H_2O_2 , který může aktivovat receptory nacházející se na buněčném povrchu. Konkrétním příkladem je

nedávno objevený receptor známý jako „HYDROGEN-PEROXIDE-INDUCED Ca^{2+} INCREASES 1“ (HPCA1, EC 2.7.11.1). Tato receptorová kinasa, která je řazena do rodiny kinás bohatých na leucin (leucine-rich receptor kinase; LRR), obsahuje v její extracelulární doméně dva páry cysteinových zbytků. Tyto rezidua jsou aktivovány v případě, že se v okolí nachází zvýšená koncentrace H_2O_2 , což následně vede k autofosforylaci HPCA1 a spuštění následné signální dráhy vedoucí k řízenému uzavírání průduchů (Wu *et al.*, 2020).

Signalizace skrze ROS je pak povětšinou zapříčiněná jejich akumulací v daných buněčných organelách, a to především v chloroplastech a mitochondriích. Změna redoxního prostředí skrze řízenou produkci ROS vede v daných organelách ke změně metabolismu a cílené produkci signálních metabolitů přenášejících specifické signály do jádra, tak aby se aktivovaly rychlé adaptivní mechanismy v rámci retrográdní signalizace (Chan *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2019).

Zcela klíčovým enzymem je již dříve zmíněný RBOH, který hraje zásadní roli při „cell to cell“ signalizaci, tedy při signalizaci ROS na dlouhé vzdálenosti pomocí přenosu signálu z buňky na buňku (Qi *et al.*, 2017). Tento enzym produkující $\text{O}_2^{\cdot-}$, je vázán na plazmatickou membránu a tvořen šesti transmembránovými doménami, C-terminálními redukovanými nikotinamidadenindinukleotidfosfátovými (NADPH) a flavinadenindinukleotidovými (FAD) doménami, dvěma hemovými skupinami a N-terminálními Ca^{2+} -vazebnými doménami (Sagi a Fluhr, 2006).

Celý proces signalizace spouští vnější podnět (stres), který iniciuje tvorbu $\text{O}_2^{\cdot-}$ prostřednictvím komplexní aktivace RBOH (Kimura *et al.*, 2012). Vzniklý $\text{O}_2^{\cdot-}$ se uvolní, je dismutován na H_2O_2 a ten volně putuje apoplastem do okolních buněk skrze akvaporiny. Jeho působením následně dochází k aktivaci Ca^{2+} kanálů (na plazmatické membráně a vakuole) a dojde tak ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě (Kurusu *et al.*, 2015). Ca^{2+} se přímo váže a aktivuje na RBOH, ale především aktivuje proteinové kinasy závislé na vápníku (calcium-dependent protein kinase, CDPK, EC 2.7.1.37), které jsou zodpovědné za další důležitou aktivaci RBOH skrze cílenou fosforylaci (Kimura *et al.*, 2012). Tímto dochází k opětovné akumulaci H_2O_2 v apoplastu okolních buněk (Obrázek 2; Miller *et al.*, 2009).



Obrázek 2: Schematicky znázorněný model integrace vln reaktivních forem kyslíku (ROS), vápníku (Ca^{2+}) a proteinkinas závislých na Ca^{2+} (CDPK) v buňkách prostřednictvím komplexní aktivace „RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG“ (RBOH). Převzato a upraveno z Gilroy *et al.*, (2014). Vnější stimuly vyvolávají rychlou počáteční apoplastickou produkci ROS, které vstupují do cytosolu prostřednictvím akvaporinů. ROS poté aktivují Ca^{2+} kanály na plazmatické membráně a vakuole, čímž dochází ke zvýšené koncentraci Ca^{2+} v cytoplazmě. Ca^{2+} aktivuje na RBOH a CDPK. Následně pak dochází k akumulaci H_2O_2 v apoplastu okolních buněk a celý proces je tak opakován. Vápníkové kanály (TPC1), vakuola znázorněna modrou barvou. Zkratky: plasmodesmata (PD); vápníkem indukované uvolňování vápníku (CICR); ROS-indukované uvolňování vápníku (RICR).

Tato akce je repetitivně opakována a odborným výrazem je nazývána jako „vlna ROS“ (ROS wave), která se následně může rozšířit do buněk celé rostliny a podává tak prvotní varovný signál v odpovědi na získaný vnější podnět (Miller *et al.*, 2009; Fichman a Mittler, 2020). To vede k iniciaci aklimatizačních a obranných mechanismů s cílem zvýšit toleranci rostlin, a to jak na abiotický nebo biotický stres (Suzuki *et al.*, 2013; Mittler a Blumwald, 2015; Kollist *et al.*, 2019)

Proces signalizace pomocí ROS je také úzce propojen s hormony a jejich signálními dráhami, což organismu poskytuje schopnost reagovat na vnější podněty (Bartoli *et al.*, 2013). Příkladem mohou být fytohormony, jako je kyselina salicylová, kyselina jasmonová, ethylen nebo brassinosteroidy (Noctor *et al.*, 2018; Talaat, 2019). V neposlední řadě je akumulace ROS v organismu spojená s aktivací významných obranných, ale i vývojových signalizačních drah, jako je například aktivace mitogen-aktivovaných protein kinásových kaskád (Smékalová *et al.*, 2014).

Významná role ROS taktéž spočívá v jejich zapojení do řady vývojových procesů, zejména do jejich regulace (Singh *et al.*, 2016). Například: klíčení semen (Müller *et al.*, 2009), prodlužování pylové láčky (Cárdenas *et al.*, 2006; Chen a Yang, 2020), lignifikace (Denness *et al.*, 2011), kontrola stárnutí buněk a buněčné smrti (Chen *et al.*, 2012) nebo

růst kořenových vlásků (Kuběnová *et al.*, 2022). ROS jsou také součástí vysoce koordinovaného procesu tvorby laterálních kořenů, kde hrají důležitou signální roli při jejich zakládání společně s rostlinným hormonem auxinem. Zde mají ROS za úlohu degradovat nebo alespoň částečně modifikovat středovou lamelu v primordiu laterálního kořene (Orman-Ligeza *et al.*, 2016).

Právě proces růstu kořenových vlásků pak patří mezi nejlépe prozkoumané děje v souvislosti s vývojovou funkcí ROS, jejichž produkce je spojena s RBOH, konkrétně s RBOHC isoformou (Monshausen *et al.*, 2009; Kuběnová *et al.*, 2022). Tímto způsobem vzniklé ROS jsou nezbytné k aktivaci a přísunu Ca^{2+} do buňky. Tyto molekuly jsou nezbytné pro elongaci buněk v kořenových vláscích a jejich správný růst (Mangano *et al.*, 2017).

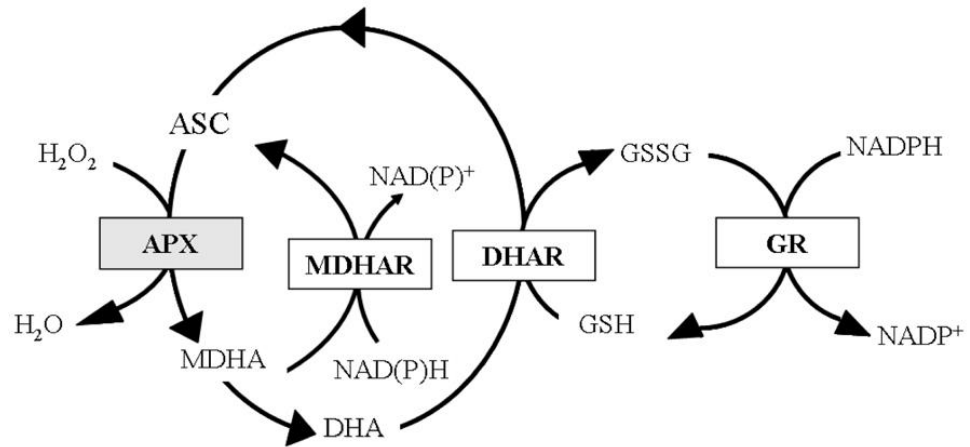
2.2 Základní charakteristika rostlinné antioxidační obrany

Vzhledem k tomu, že ROS musí být v organismu udržovány v určité fyziologické koncentraci, bylo zcela nezbytné, aby si rostliny vyvinuly specializované mechanismy, kterými by jejich tvorbu a následnou degradaci mohly regulovat. Tento evoluční požadavek dal za vznik řadě specifických enzymů a tvorbě celé řady nízkomolekulárních látek, které společně vytváří mechanismus známý jako antioxidační obrana. Ta může být z pohledu její vlastnosti dělena do dvou skupin (Bellegarde *et al.*, 2019).

První skupinou je neenzymatická obrana, kam řadíme především metabolity jako jsou tokoferoly, alkaloidy, kyselina askorbová, glutathion, karotenoidy, vitamin E, vitamin D a taktéž i různé fenolické sloučeniny, jako taniny a flavonoidy (Conklin *et al.*, 1996; Creissen *et al.*, 1999; Karuppanapandian *et al.*, 2011; Zechmann, 2018).

Druhou část poté vytváří enzymatická obrana, jejíž hlavními zástupci jsou enzymy zapojené do askorbát-glutationového cyklu: askorbát peroxidasa (APX, EC 1.11.1.1), monodehydroaskorbát reduktasa (MDHAR, EC 1.6.5.4), dehydroaskorbát reduktasa (DHAR EC 1.8.5.1) a glutathion reduktasa (GR, EC 1.6.4.2). V tomto cyklu je H_2O_2 redukován pomocí APX a kyseliny askorbové, a tím vzniká monodehydroaskorbát (MDHA) anebo až dehydroaskorbát (DHA). MDHA se může následně regenerovat na kyselinu askorbovou skrze enzymatickou katalýzu pomocí MDHAR, zatímco DHA je regenerována na kyselinu askorbovou skrze DHAR (Obrázek 3). Jako energetické platidlo reakce katalyzovanou DHAR je využíván redukovaný glutathion, který je opět regenerován pomocí GR, čímž je celý cyklus uzavřen (Obrázek 3). Celý tento proces, se

taktéž označuje jako Foyer-Asada-Halliwellový cyklus (Apel a Hirt, 2004; Asada 2006; Mhamdi *et al.*, 2010).



Obrázek 3: Schématické znázornění askorbát-glutationového cyklu. Zkratky: askorbová kyselina (ASC); askorbát peroxidasa (APX); dehydroaskorbát (DHA); dehydroaskorbát reduktasa (DHAR); glutation (GSH); glutation disulfid (GSSG); glutathion reduktasa (GR); monodehydroaskorbát (MDHA); monodehydroaskorbát reduktasa (MDHAR). Převzato a upraveno z Locato *et al.*, (2013).

Nezastupitelnou roli v antioxidační obraně hrají již dříve zmíněné enzymy známé jako katalasy, které katalyzují přímý rozklad H_2O_2 na H_2O a O_2 . U rostlin se katalasy dělí na tři různé třídy. První třída je lokalizována v listech, druhá v cévních svazcích a třetí, tedy i poslední třída, se nachází především v reprodukčních pletivech a následně semenech (Mhamdi *et al.*, 2010).

Mezi zcela esenciální součástí enzymatické antioxidační obrany se pak řadí SOD, kterým je v této práci věnována samostatná kapitola 2.2.1.

2.2.1 Charakterizace superoxididismutas u rostlin

Tuto skupinu metaloenzymů, označovaných jako SOD, řadíme mezi hlavní představitele antioxidační obrany. Byly objevené roku 1969 v hovězích erytrocytech (McCord a Fridovich, 1969). Při tomto experimentu bylo prokázáno, že právě tyto enzymy katalyzují dismutaci nebezpečného $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 a O_2 . Přítomnost těchto enzymů byla následně prokázána i u prokaryot, cyanobakterií a dalších eukaryot (Pilon *et al.*, 2011; Dreyer a Schippers, 2019).

SOD rozlišujeme na několik skupin podle toho, jaký mají ve své struktuře vázaný kovový iont. Tímto kovem může být měď, zinek, železo, mangan, nebo nikl (Pilon *et al.*, 2011). Na základě těchto vlastností byly SOD rozřazeny do čtyř skupin. Konkrétně jimi

jsou: Cu/ZnSOD, FeSOD, MnSOD, či NiSOD objevená u bakterií, nikoli však u vyšších rostlin (Kim *et al.*, 1996; Pilon *et al.*, 2011).

Modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* obsahuje ve svém genomu osm genů pro SOD (Kliebenstein *et al.*, 1998). Skupinu Cu/ZnSOD (CSD) tvoří právě tři geny: *CSD1*, *CSD2* a *CSD3*. *CSD1* se nacházejí v cytosolu (Pilon *et al.*, 2011), *CSD2* v chloroplastu, konkrétně na tylakoidní membráně (Kleffmann *et al.*, 2004; Myouga *et al.*, 2008) a *CSD3* jsou lokalizované v peroxisomech (Kliebenstein *et al.*, 1998). *FeSOD* (*FSD*) skupina je rovněž zastoupena třemi geny, označované jako *FSD1*, *FSD2* a *FSD3*. Pro *FSD* isoenzymy je typické, že se převážně pojí s přítomností v chloroplastech (Myouga *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2013). Výjimku však tvoří *FSD1*, která se nenachází pouze ve stromě chloroplastu, ale i v jádře a cytoplazmě (Myouga *et al.*, 2008; Dvořák *et al.*, 2021a). Poslední skupinu poté tvoří *MnSOD* (*MSD*), které v této rostlině, zastupují dvě isoformy. Lokalizace *MSD1* je spojena s přítomností v mitochondriích (Morgan *et al.*, 2008), zatímco nově objevená *MSD2* je exkluzivně lokalizovaná v apoplastu, jakožto jediný známý zástupce SOD u *A. thaliana* (Chen *et al.*, 2022). Tato rozdílná lokalizace jednotlivých SOD je spjata i s rozdílnou funkcí a vyzdvihuje jejich význam pro určitý buněčný kompartment (Pilon *et al.*, 2011; Gallie a Chen, 2019).

SOD mohou být cílem různých dalších posttranslačních modifikací. Příkladem mohou být: fosforylace, glutathionylace, nitrace nebo i glykace s dopadem na jejich stabilitu nebo lokalizaci. Tyto procesy mohou mít také vliv na proteinovou aktivitu SOD, kdy může dojít ke zvýšení či snížení aktivity, nebo dokonce i k úplné inaktivaci (Yamakura a Kawasaki, 2010; Banks a Andersen, 2019). Právě účinek S-nitrosylace a nitrace tyrosinu byl testován na rekombinantních *A. thaliana* SOD působením S-nitrosoglutathionu a peroxynitritu. Výsledky ukázaly, že S-nitrosylace nemá žádný významný vliv na aktivitu rekombinantních enzymů. Tyrosinová nitrace poté vedla u *MSD1* k drastickému snížení aktivity. Mírným snížením se rovněž projevovaly i *CSD3* a *FSD3* (Holzmeister *et al.*, 2015).

Samotná exprese *SOD* je rovněž ovlivňována stresovými faktory. Vzhledem k tomu, že jsou SOD úzce spjaty s ROS, jsou tedy i samotné SOD zapojeny do signalizačních drah (Foyer a Noctor, 2009; Huang *et al.*, 2016). Příkladem může být signalizace spojená s klíčením a dormancí semen (El-Maarouf-Bouteau a Bailly, 2008, Morgan *et al.*, 2008).

2.2.2 Cu/ZnSOD u *Arabidopsis thaliana*

Cu/ZnSOD byla objevená jako první u rostlin. Konkrétně byla nalezena v semenech hrachu (Sawada *et al.*, 1972). U těchto SOD zastupuje katalytickou úlohu kovový kofaktor Cu^{2+} . Atom Zn^{2+} má zase vliv na stabilitu struktury a na udržování aktivity enzymu (Forman a Fridovich, 1973).

Regulace CSD genů je řízena několika způsoby, a to jak na transkripční, tak i na translační úrovni. Především je regulována dostupností Cu^{2+} , kdy při jejím nedostatku je směřována do sloučenin, jako je plastocyanin a cytochrom-c oxidasa (COX, EC 1.9.3.1; Burkhead *et al.*, 2009; CoHu *et al.*, 2009; Pilon, 2017). Právě Cu^{2+} má vliv na elektronový transport během fotosyntézy, buněčné dýchání a rovněž se podílí na zvýšené toleranci proti oxidačnímu stresu (Zhou *et al.*, 2016). Z těchto důvodů musí být Cu^{2+} v rostlině udržována v určitých fyziologických koncentracích (0,01–10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro *A. thaliana*). Naopak vysoké hladiny Cu^{2+} (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a vyšší) mohou být pro buňku toxické (Lequeux *et al.*, 2010). Způsobují inhibici růstu kořenů a syntézy chlorofylu, dále sníženou funkci fotosystému II a v neposlední řadě také tvorbu nadměrného množství ROS v chloroplastu. Nízké koncentrace (nižší než 0,01 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) pak vyvolávají redukcí transportu elektronů během fotosyntézy nebo rozpad thylakoidní membrány (Abdel-Ghany a Pilon, 2008). V případě nízké koncentrační dostupnosti Cu^{2+} dochází k potlačení exprese *CSD1* a *CSD2* na úkor ochrany funkčnosti plastochinonu a dalších esenciálních enzymů. Zároveň při tomto procesu dochází ke zvyšování exprese *FSD1*. *CSD1* v cytosolu a *CSD2* v chloroplastech je nahrazena *FSD1*, a to vše je řízeno pomocí transkripčního faktoru SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 (Yamasaki *et al.*, 2009; Abdel-Ghany a Pilon, 2008; CoHu *et al.*, 2009), jehož úloha bude samostatně diskutována v kapitole 2.3.

Jako důležitý článek regulace CSD isoenzymů vystupují chaperonové proteiny, které se podílejí na jejich posttranslační aktivaci. Tyto proteiny, známé jako „copper chaperone for SOD1“ (CCS, Abdel-Ghany *et al.*, 2005), jsou důležité zejména při aktivaci CSD apoenzymu. CCS interaguje s CSD a tím pomáhá se začleňování Cu^{2+} do struktury aktivního místa těchto enzymů. CCS jsou také dále zodpovědné za katalýzu tvorby disulfidových vazeb (Huang *et al.*, 2012).

U rostliny *A. thaliana* byla vyšší aktivita CSD pozorovaná po napadnutí patogenem (Kliebenstein *et al.*, 1999), ale i ve spojení s působením těžkých kovů, konkrétně arseničnanu draselného (Abercrombie *et al.*, 2008), nebo v souvislosti se

stresem ze sucha (Jung, 2004). U inzerčních mutantů *csd2* T-DNA, známých jako KD-SOD, byl zaznamenán jak potlačený růst, tak i rychlost fotosyntézy, nižší hladiny chlorofylu a přecitlivělost na světlo (Rizhsky *et al.*, 2003).

2.2.3 FeSOD u *Arabidopsis thaliana*

Jako poslední byla objevena FeSOD v listech *Ginkgo biloba* (Duke a Salin, 1985) a to i přesto, že se jedná o vývojově nejstarší skupinu SOD, která má ve své struktuře vázaný kovový atom Fe^{2+} (Pilon *et al.*, 2011). Jak již bylo zmíněno, genom *A. thaliana* obsahuje tři geny pro FSD (*FSD1*, *FSD2* a *FSD3*), které se od sebe odlišují v mnoha směrech. Společným znakem je především lokalizace v chloroplastech. Výjimku však tvoří nejhojněji zastoupená SOD u *A. thaliana*, *FSD1*, která se zároveň vyskytuje i v jádře a cytoplazmě (Myouga *et al.*, 2008; Dvořák *et al.*, 2021a). *FSD1* se taktéž od ostatních FSD isoformů liší ve zvýšené míře exprese. Její exprese je až 10krát vyšší než u *FSD2* a *FSD3* (Pilon *et al.*, 2011).

FSD2 a *FSD3* mají kromě úlohy odbourávat $\text{O}_2^{\cdot-}$ i významnou funkci ve vývoji rostliny. Konkrétně mají nenahraditelnou úlohu při vývoji plastidů. Tyto dvě isoformy vytváří heterodimér, který zvyšuje efektivitu odbourávání $\text{O}_2^{\cdot-}$ v době světelné fáze fotosyntézy. Mutantní linie *fsd2* a *fsd3* vykazovaly výrazný fenotyp nazývaný jako „pale green phenotype“ a tedy disponovali výrazně sníženým množstvím chlorofylu za standardních podmínek. Následnou přípravou dvojitého mutantu *fsd2/fsd3* došlo k úplné ztrátě pigmentace a tento mutant nebyl schopen přežít a reprodukovat se (Myouga *et al.*, 2008). Individuální *fsd2* a *fsd3* mutantní rostliny byly také vysoce citlivé na oxidační stres a disponovaly tak zvýšenou hladinou ROS. Opačný efekt, vyšší tolerance k oxidačnímu stresu, byl pozorován u transgenních linií, které cíleně nadexprimovaly geny *FSD2* a *FSD3* (Myouga *et al.*, 2008).

Na druhé straně první provedená fenotypová analýza *fsd1* mutantů neprokázala žádné významnější fenotypové projevy v nadzemní části rostliny, a to ani po zvýšeném osvětlení nebo indukovaném oxidačním stresu (Myouga *et al.*, 2008). Nicméně při následných studiích těchto linií se zjistilo, že *fsd1* mutanti disponují sníženým počtem laterálních kořenů, což naznačuje zapojení *FSD1* do jejich vývoje (Dvořák *et al.*, 2021a). Nejnovější studie, provedená na *fsd1* mutantech, se zaměřila na charakterizaci role *FSD1* v chloroplastech. Bylo zjištěno, že *fsd1* mutanti byli výrazně citlivější na indukovaný oxidační stres pomocí methyl viologenu (MV, známý jako paraquat), jehož aplikace vede

k cílené produkci $O_2^{\cdot-}$ právě v chloroplastech. Nicméně tento fenotypový projev *fsd1* mutantů byl přítomný pouze za podmínek nízké koncentrace Cu^{2+} v médiu, kdy mutanti *fsd1* disponují nižší schopností rozkládat $O_2^{\cdot-}$ (Melicher *et al.*, 2022). Naopak při vyšších koncentracích Cu^{2+} v médiu *fsd1* mutanti nevykazovali dříve pozorované fenotypové projevy v porovnání s divokým typem. Tyto experimenty potvrdily, že abundance a s ní spojená funkce FSD1 v chloroplastech je tedy striktně závislá na koncentračním gradientu Cu^{2+} a při vyšších koncentracích je její abundance/funkce nahrazována za CSD2 (Melicher *et al.*, 2022).

Přesný mechanismus aktivace FSD není zatím zcela jasný (Burkhead *et al.*, 2009; Dreyer a Schippers, 2019). Známe však je, že aktivita FSD1 souvisí nejen s CHAPERONINEM 20 lokalizovaným v chloroplastech (Kuo *et al.*, 2013), ale také s dalšími faktory, ovlivňující expresi a aktivitu FSD1. Těmito hlavními faktory jsou dostupnost Fe^{2+} (Waters *et al.*, 2012), Cu^{2+} (Cohu *et al.*, 2009), dusíku (Mermod *et al.*, 2019) a sacharosy (Dugas a Bartel, 2008). Bylo dokázáno, že mezi Fe^{2+} a Cu^{2+} existuje vzájemné ovlivňování exprese SOD isoforem (Waters *et al.*, 2012).

Exprese *FSD* isoforem je úzce spojena nejen s reakcí na oxidační stres, ale i na další formy stresu, kterými jsou: teplo, chlad nebo zasolení. Zde je však exprese *FSD1* závislá na ekotypu rostliny *A. thaliana* (Filiz *et al.*, 2019).

2.2.4 MnSOD u *Arabidopsis thaliana*

MnSOD váže v aktivním místě atom Mn^{2+} (Alscher *et al.*, 2002). Jedná se o důležitý enzym, který se podílí na ochraně rostliny proti stresu ze sucha (Wang *et al.*, 2005), zasolení (Wang *et al.*, 2007) či chladu (Van Breusegem *et al.*, 1999). Poprvé byla MnSOD pozorována v listech hrachu (Sevilla *et al.*, 1980). U modelové rostliny *A. thaliana* je zastoupena ve dvou variantách (MSD1, MSD2, Chen *et al.*, 2022).

MSD1 je úzce spjata s mitochondriálními funkcemi, s cyklem trikarboxylových kyselin, a je rovněž zapojena do kořenového vývoje. Toto potvrdily studie s *MSD1-RNAi* liniemi. Tyto linie se prokazovaly zpomaleným růstem kořenů, defekty v mitochondriální redoxní rovnováze a v inhibici cyklu trikarboxylových kyselin (Morgan *et al.*, 2008). Další důležitá úloha MSD1 je udržování homeostázy ROS při gametogenezi. Je vysoce exprimována během gametogeneze a koreluje se vzorem mitochondriálního $O_2^{\cdot-}$ (Martin *et al.*, 2013).

Na rozdíl od dříve definovaných SOD, MSD2 obsahuje ve své struktuře signalizační peptid s lokalizačním signálem do apoplastu. Je tedy pravděpodobné, že se bude podílet na dismutaci $O_2^{\cdot-}$, produkovaného prostřednictvím RBOH. Bylo zjištěno, že hladina exprese *MSD2* je ovlivněna světelnými podmínkami (Chen *et al.*, 2022). Světlo ovlivňuje růst kořenů, tvorbu laterálních kořenů a tvorbu kořenových vlásků, stejně jako gravitropní odezvy kořenů (van Gelderen *et al.*, 2018). Prokázalo se, že hladiny exprese *MSD2* jsou nízké na světle, ale vysoce indukované v kořenech etiolovaných semenáčků. Specifická analýza kořenů mutantů *msd2* rovněž prokázala, že *MSD2* moduluje distribuci ROS a ovlivňuje stavbu kořenů v etiolovaných semenáčcích. Velikost meristemických a elongačních zón se významně nelišila mezi sazenicemi divokého typu a *msd2*, ale elongační zóna se zvýšila u mutantů ve srovnání s divokým typem u sazenic pěstovaných ve tmě. *MSD2* má tedy potenciál působit jako důležitý mediátor spojující světelné podmínky s morfogenezí kořenů (Chen *et al.*, 2022).

2.2.5 SOD u *Medicago sativa*

Tato dvouděložná rostlina, tolíce vojtěška (*Medicago sativa* L.), spadající do čeledi bobovité (Fabaceae), se řadí mezi hospodářsky významné pícniny, které hrají významnou roli v zemědělství především jako krmivo pro hospodářská zvířata. *M. sativa* disponuje vysokým obsahem bílkovin, antioxidantů, minerálů, enzymů a vitamínů A, C, K a E (Bora a Sharma, 2011). Kromě toho se také používá pro výrobu biopaliva, pro ochranu půdy jako přírodní fytofarmacie a pro výrobu farmaceutických sloučenin a průmyslových enzymů (Kumar *et al.*, 2018). V současné době patří *M. sativa* spolu s *Medicago truncatula* (jakožto modelová rostlina) mezi hojně zkoumané víceleté rostliny (Young *et al.*, 2005).

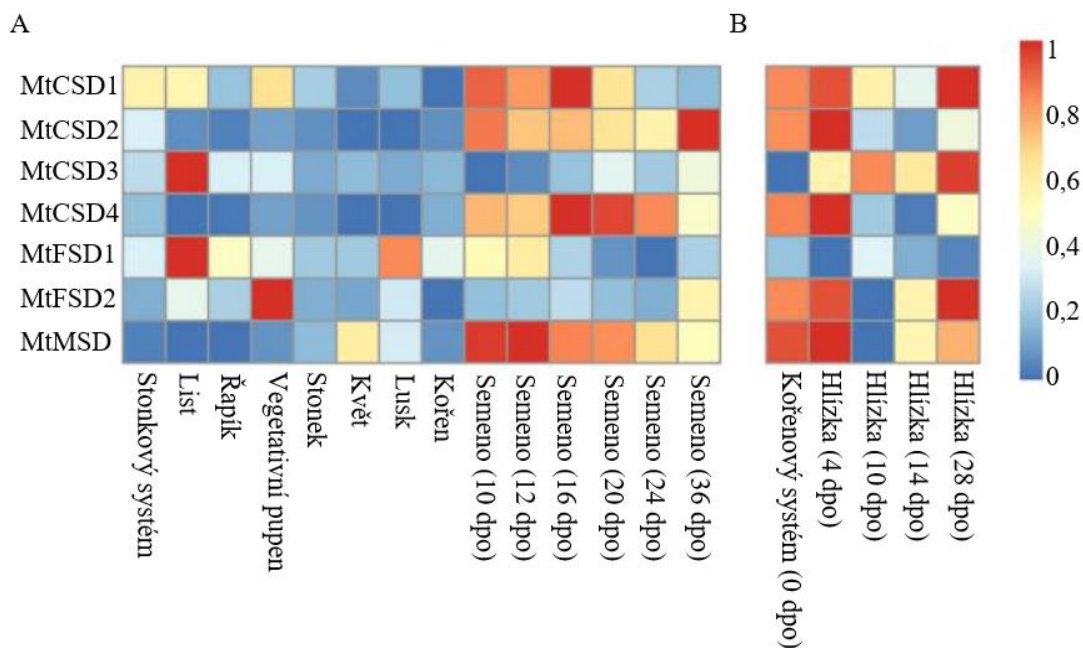
V posledních letech byly SOD zkoumány nejen u *A. thaliana*, ale i u mnoha dalších rostlinných druhů, kterými jsou například: topol chlupatoplodý (*Populus trichocarpa*; Molina-Rueda *et al.*, 2013), rýže setá (*Oryza sativa*; Nath *et al.*, 2014), rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*; Feng *et al.*, 2016), kukmák sklepní (*Volvariella volvacea*; Yan *et al.*, 2016) nebo okurka setá (*Cucumis sativus*; Zhou *et al.*, 2017).

Nové studie se i nadále zaměřují především na rostlinu *M. truncatula*, která je využívána jako modelový organismus (Tang *et al.*, 2014). Využívá se především z toho důvodu, že současné databáze zaměřující se na rostlinu *M. sativa*, nelze považovat za

zcela důvěryhodné. A to i přes to, že již disponují přečtenými sekvencemi genomu rostliny *M. sativa* (Hrbáčková *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2020).

Výsledky studií pro rostlinu *M. truncatula* prokázaly, že se skládá z osmi chromozomů a velikost genomu je 465 Mbp (Young *et al.*, 2011). Ze 47845 genů u ní bylo identifikováno a charakterizováno celkem 7 genů pro MtSOD, kódující 1 MnSOD (*MtMSD*), 2 FeSOD (*MtFSD1*, *MtFSD2*) a 4 Cu/ZnSOD (*MtCSD1*, *MtCSD2*, *MtCSD3* a *MtCSD4*), které jsou nerovnoměrně distribuovány v pěti z osmi chromozomů. Přičemž chromozom číslo 3 a 4 distribuoval vždy dva geny a chromozom 1, 6 a 7 pouze jeden gen (Song *et al.*, 2018).

Těchto 7 MtSOD genů v genomu *M. truncatula* jsou exprimovány především v listech rostliny, kde se prokázala zvýšená exprese *MtCSD3*, *MtFSD1* a *MtFSD2* genů, což dokazuje, že SOD jsou zásadním enzymem při vychytávání ROS vytvořených fotosyntézou (Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016). Další exprese byla prokázána v semenech, ale také v kořenových uzlinách, kde byla přítomna v rané fázi nodulace vysoká transkripce *MtCSD1* a následně i *MtCSD4* a *MtMSD* (Obrázek 4; Song *et al.*, 2018).



Obrázek 4: Profily exprese genů MtSOD v různých vývojových stádiích. Převzato a upraveno ze Song *et al.*, (2018). A – Stonkový systém. B – Kořenový systém. Barevná stupnice představuje hodnoty log signálu. Zkratky: dny po opylení (dpo).

I u rostliny *M. truncatula* mají tyto geny klíčovou roli při stresové reakci a jsou tak rozdílně exprimovány při ošetření solí, suchem či chladem (Song *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017). Při solném stresu se většina *MtSOD* genů prokazuje sníženou expresí. Výjimkou jsou geny *MtCSD1*, *MtCSD2* a *MtCSD4*, jejichž snížená exprese se projevuje se značnou prodlevou. Obdobně je tomu i při stresu ze sucha, zatímco stres chladem způsobuje významně sníženou expresi bez rozdílu u všech genů *MtSOD* (Song *et al.*, 2018).

Další studie prokázaly, že exprese jednotlivých transgenů *SOD* (cDNA mit-MnSOD a chl-MnSOD rostliny *Nicotiana plumbaginifolia*) zlepšuje nejen produkci biomasy, přičemž transgenní rostliny mají větší výhonky, korunky a kořenové systémy ve srovnání s netransgenními kontrolami, ale také zlepšuje jejich toleranci vůči různým typům stresu (Samis *et al.*, 2002).

Například rostliny transgenní vojtěšky (*M. sativa* L.) nadexprimující *MnSOD* (opět z rostliny *Nicotiana plumbaginifolia*) disponovaly větší biomasou a zároveň měly zvýšenou vitalitu po působení mrazového stresu a také lépe přežívaly v zimě v polních podmínkách (McKersie *et al.*, 1996, 1997, 1999). Další výzkumy se poté zaměřily na transgenní rostliny se nadexpresí *FeSOD*. Ty sice prokázaly zvýšenou aktivitu *FeSOD* a vyvolanou expresi dalších genů spojených s odolností transgenních rostlin při testování v chladových podmínkách, ale překvapivě se neprokázalo, že by účinek transgenu *FeSOD* zlepšil toleranci vůči oxidativnímu stresu (McKersie *et al.*, 1996, 2000).

2.3 Základní charakterizace transkripčních faktorů SQUAMOSA promoter-binding protein-like

Jedním ze základních znaků transkripční faktorů známých jako SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SPL) je přítomnost a konzervovaná úloha u rostlin, u nichž jsou zastoupeny v různém počtu (Guo *et al.*, 2008; Preston a Hileman, 2013). Například *Hordeum vulgare* L., známý jako ječmen setý, obsahuje 17 genů kódujících SPL (Tripathi *et al.*, 2018), zatímco u rýže (*Oryza sativa* L.) je jich přítomno 19 (Chen *et al.*, 2010). Nicméně mezi nejlépe prostudovanou rostlinou, co se funkce SPL týče, patří *A. thaliana*, která disponuje 17 geny kódující SPL. Relativně nedávné studie na této modelové rostlině ukázaly, že část těchto genů je duplicitní a sdílí stejnou jak nukleotidovou, tak následně aminokyselinovou sekvenci (Liu *et al.*, 2016). Jedná se o dvě

dvojice genů/proteinových produktů, kterými jsou SPL13A a SPL13B, SPL10 a SPL11 (Yang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2016).

I přesto, že všechny SPL obsahují vysoce konzervovanou SBP (SQUAMOSA binding protein) doménu, jsou SPL rozřazeny do několika skupin na základě jejich další struktury a aminokyselinové sekvence (Kropat *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). První skupinu u *A. thaliana* tvoří velké SPL, složené z: SPL1, SPL7, SPL12, SPL14 a SPL16, obsahující C-terminální transmembránovou doménu (Chao *et al.*, 2017). Druhou skupinou jsou poté malé SPL (SPL2-6, SPL8-11, SPL 13 a SPL15), které mají jednodušší strukturu a aminokyselinovou sekvenci menší než 500 aminokyselin (Letunic a Bork, 2018).

SBP doména, která je typickým prvkem těchto transkripčních faktorů, bývá tvořena 76 aminokyselinami a taktéž je zodpovědná za jaderný import. Zároveň je zodpovědná za vazbu na DNA, a to konkrétně do specifické oblasti promotoru cílových genů obsahujících GTAC motiv (Birkenbihl *et al.*, 2005). Tuto vazbu zprostředkovávají dvě struktury: Zn-1 a Zn-2. Tyto struktury, podobné zinkovým prstům, jsou esenciální pro vytvoření efektivní vazby DNA (Yamasaki *et al.*, 2004; Birkenbihl *et al.*, 2005).

Všechny SPL jsou zapojeny do celé řady buněčných pochodů (Yamasaki *et al.*, 2004). Jedna z jejich hlavních funkcí je změna vegetativní fáze, iniciace tvorby listů nebo regulace tvorby květu a kořene (Si *et al.*, 2016; Jorgensen a Preston, 2014; Garcia-Molina *et al.*, 2014). Rovněž pletivová specifická exprese *SPL* genů sehrává důležitou úlohu během růstu a vývoje rostlin (Preston a Hileman, 2013). Tento děj je spojován především s regulací transkripce MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS, SRF (MADS)-box genů (Cardon *et al.*, 1999; Birkenbihl *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2009). Další významná úloha SPL je zaznamenána také v souvislosti s odpovědí na stresové podmínky (Chao *et al.*, 2017).

2.3.1 Úloha SPL7 u *Arabidopsis thaliana*

Mezi nejlépe prostudované členy této početné rodiny transkripčních faktorů patří SPL7. Pro tento gen je charakteristické, že se hladina jeho transkriptu v rostlině postupně zvyšuje. Tento proces souvisí s vývojem rostliny, přičemž k největší expresi dochází v období kvetení (Garcia-Molina *et al.*, 2014; Jorgensen a Preston, 2014). Další oblastí produkce a vyšší akumulace mRNA *SPL7* je stonek a kořen. Právě v kořeni se projevíla

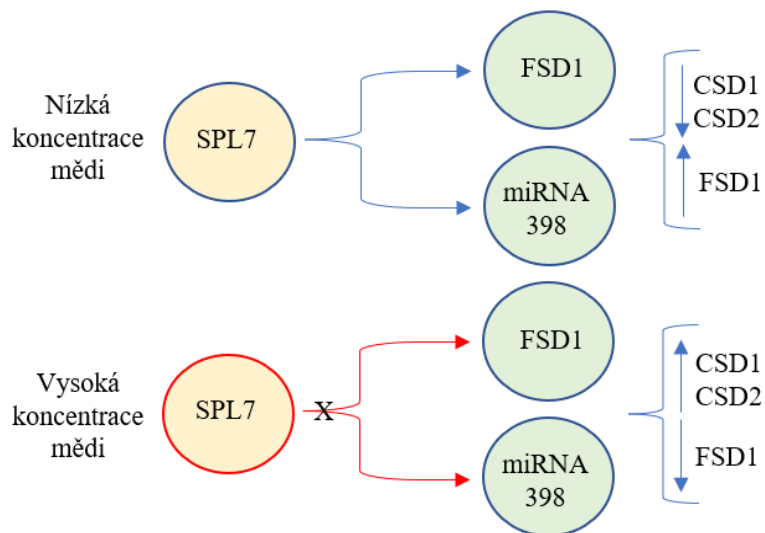
specifická exprese ve vyvíjejících se primordiích laterálních kořenů (Yamasaki *et al.*, 2009; Araki *et al.*, 2018).

Detailní mikroskopická analýza semenáčků, které exprimovaly fúzně značený SPL7 se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP), ukázala přítomnost GFP-SPL7 v jádře, v okolí plazmatické membrány a endoplazmatického retikula (Garcia-Molina *et al.*, 2014).

SPL7 je zapojen do regulace exprese MIR genů (miRNA). Jedná se jak o MIR398 a MIR408, které jsou exprimovány všudypřítomně, tak i o MIR397 a MIR857, jejichž exprese je zaznamenána především ve vaskulatuře (Yamasaki *et al.*, 2009). Jejich genové produkty brání expresi nejen zmíněné CSD, ale i dalších neesenciálních genů, kódujících proteiny bohaté na Cu²⁺ (Abdel-Ghany a Pilon, 2008; German *et al.*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2009).

SPL7 je úzce spojené se signalizací světla a mědi prostřednictvím interakce s ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5; Zhang *et al.*, 2014; Saini *et al.*, 2020) a se schopností reagovat na teplotní stres (Wu *et al.*, 2019). HY5 reguluje MIR408 přímou interakcí s jeho promotorem. Další exprese MIR genů je poté u rostliny *A. thaliana* indukována sacharózou (MIR398), tepelným šokem (MIR398) a ošetřením chladem (MIR397; Dugas a Bartel, 2008; Guan *et al.*, 2013)

SPL7 je především spojena s regulací antioxidační obrany některých genů *SOD*. Jak již bylo zmíněno, SPL7 reguluje tři geny (*CSD1*, *CSD2* a *FSD1*), a to jak na transkripční, tak i na posttranskripční úrovni tak, že při nízkých koncentracích Cu²⁺ spouští SPL7 transkripci *FSD1* a *MIR398* (Obrázek 5). Při nízkých koncentracích Cu²⁺ dochází k silné expresi SPL7, který se následně váže do promotorových sekvencí *FSD1* a *MIR398*, které obsahují ve své struktuře několikanásobně GTCA motiv. To má za následek spuštění silné exprese těchto genů vedoucí k vysoké abundanci FSD1 proteinu a *MIR398*. *MIR398* následně specificky blokuje produkci CSD isoenzymů, což vede k drastickému snížení jejich abundance. V opačném případě, tedy za podmínek nízké dostupnosti Cu²⁺, nedochází k expresi *SPL7*, a tedy nenastává aktivace exprese *FSD1* a *MIR398* genů, což vede ke zvýšení abundance CSD isoenzymů (Yamasaki *et al.*, 2009).



Obrázek 5: Schematicky znázorněná regulace SOD exprese prostřednictvím SPL7. Nízké koncentrace mědi: SPL7 aktivuje transkripci miRNA398, která dále snižuje abundanci CSD1 a CSD2 a zvyšuje expresi FSD1 tím, že se váže přímo do jejich promotorové sekvence. Vysoké koncentrace mědi: SPL7 není přítomná, čímž nedochází k blokování CSD1 a CSD2 a taktéž nedochází k expresy expresi FSD1. CSD1 – Cu/ZnSOD ležící v cytosolu; CSD2 – Cu/ZnSOD ležící v chloroplastech; FSD1 – FeSOD1; SPL7 – SQUAMOSA promoter-binding protein-like7.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Biologický materiál

- *Arabidopsis thaliana*: ekotyp Columbia (Col-0; semena divokého typu)
- *M. sativa* cv. Regen-SY (Bingham, 1991), semena divokého typu
- *Nicotiana bethamiana*, semena divokého typu
- *Agrobacterium tumefaciens* kmen GV3101 (Lifeasible; ACC-100) nesoucí konstrukt *pCSD1-gCSD1::eGFP:3'UTR-CSD1*

3.2 Chemikálie

- 2-merkapt ethanol (Sigma Aldrich, kat. č. M6250)
- 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina (HEPES; Sigma Aldrich, kat. č. H3375)
- Acetosyringon (Sigma Aldrich, D134406)
- Akrylamid/N,N'-methylenbisakrylamid, 40%, 37,5:1 (BioRad, kat. č. 1610148)
- cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete; Roche, kat. č. 11697498001)
- Dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na₂EDTA; Sigma Aldrich, kat. č. E5134)
- Dihydrát molybdenanu sodného (NaMoO₄·2H₂O; Sigma Aldrich, kat. č. M1651)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄; Sigma Aldrich, kat. č. P8416)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH₂PO₄; Sigma Aldrich, kat. č. S8282)
- Dithiothreitol (DTT; Sigma Aldrich, kat. č. D0632)
- Dodecylsírán sodný (SDS; Sigma Aldrich, kat. č. L3771)
- Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové (MES; Duchefa Biochemie, kat. č. M1503)
- Dusičnan amonný (NH₄NO₃; Sigma Aldrich, kat. č. A9642)
- Dusičnan draselný (KNO₃; Sigma Aldrich, kat. č.: P8394)
- Ethylen glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA; Sigma Aldrich, E3889)
- Ethanol (C₂H₅OH; Sigma Aldrich, kat. č. 493546)
- Fluorid sodný (NaF; Sigma Aldrich, kat. č. 201154)
- Gellan Gum (Alfa Aesar, kat. č. Y28C036)
- Glycerol (Sigma Aldrich, kat. č. G5516)
- Glycin (Sigma Aldrich, kat. č. G8898)

- Heptahydrát síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, kat. č. 230391)
- Heptahydrát síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, kat. č. Z0251)
- Heptahydrát síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, kat. č. F8633)
- Hexahydrát chloridu kobaltnatého ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, kat. č. 769495)
- Hovězí sérový albumin (BSA, Bovine serum albumin; Sigma Aldrich, kat. č. A2153)
- Hydroxid draselný (KOH; Sigma Aldrich, kat. č. 60130)
- Hydroxid sodný (NaOH; Sigma Aldrich, kat. č. S8045)
- Chlorid hořečnatý (MgCl_2 ; Sigma Aldrich, M8266)
- Chlorid nitrotetrazoliové modři (NBT; Sigma Aldrich, kat. č. N6876)
- Chlorid sodný (NaCl; Sigma Aldrich, kat. č. 31434)
- Chlorid vápenatý (CaCl_2 ; Sigma Aldrich, kat. č. C2661)
- Isopropanol (Sigma Aldrich, kat. č. 278475)
- Jodid draselný (KI; Sigma Aldrich, kat. č. 60399)
- Kyanid draselný (KCN; Sigma Aldrich, kat. č. 31252)
- Kyselina boritá (H_3BO_3 ; Sigma Aldrich, kat. č. B7901)
- Kyselina chlorovodíková (HCl; Sigma Aldrich, kat. č. 30721)
- Kyselina L-askorbová (Sigma Aldrich, kat. č. A92902)
- Kyselina nikotinová (Sigma Aldrich, kat. č. N4126)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich, kat. č. 45726)
- Laemliho pufr, 4X (BioRad, kat. č. 1610747)
- LB Broth (Miller; Sigma Aldrich, kat. č. L3522)
- Methanol (Sigma Aldrich, kat. č. 34860)
- Monohydrát síranu manganatého ($\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, kat. č. M8179)
- Myo-Inositol (Sigma Aldrich, kat. č. I5125)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED; Sigma Aldrich, kat. č. T9281)
- Odtučněné sušené mléko, Blotting Grade Blocker (BioRad, kat. č. 1706404)
- Pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Duchefa Biochemie, kat. č. C0508)
- Peroxid vodíku (H_2O_2 ; Sigma-Aldrich, kat. č. 216763)
- Peroxodisíran amonný (APS; Sigma Aldrich, kat. č. A3678)
- Ponceau S (Sigma Aldrich, kat. č. 78376)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, kat. č. 1610374)

- Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 5X (Bradfordovo činidlo; BioRad, kat. č. 5000006)
- Pyridoxin hydrochlorid (Sigma Aldrich, kat. č. P9755)
- Riboflavin (Applichem, kat. č. A0968,0010)
- Rifampicin (Duchefa; R0146.0005)
- Sacharosa (Sigma Aldrich, kat. č. S8501)
- Spektinomycin (Duchefa Biochemie; 007179.06)
- Tekutý dusík (Messer Technogas, Česká Republika)
- Tetrahydrát dusičnanu vápenatého ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, kat. č. C1396)
- Tetrahydrát chloridu manganatého ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, kat. č. M3634)
- Thiamin hydrochlorid (Sigma Aldrich, kat. č. T4625)
- Tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris) (Sigma-Aldrich, USA)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, kat. č. P1379)

3.3 Roztoky a média

APS, 10% (w/v):

- 0,2 g APS
- Doplnit do objemu 2 ml deionizovanou vodou

E pufr (200 ml):

- 8,396 mg NaF
- 2,38 g HEPES, pH 7,8 (NaOH)
- 0,86 g NaCl
- 76 mg EGTA
- 19,04 mg MgCl_2
- 20 ml glycerol
- Doplnit do objemu 200 ml deionizovanou vodou
- 20 tablet cOplete
- 200 μl DTT, $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Elektroforetický pufr, pro SDS-PAGE (2000 ml):

- 6 g Tris
- 28,8 g glycin
- 2 g SDS
- Doplnit do objemu 2000 ml deionizovanou vodou

Kokultivační médium (200 ml):

- 19048 mg MES, pH 5,6
- 190,42 mg MgCl₂
- Acetosyringon (výsledná koncentrace 150 μmol·l⁻¹)
- Doplnit do objemu 200 ml deionizovanou vodou

Na fosfátový pufr (400 ml):

- 2,4 g NaH₂PO₄, pH 7,8 (NaOH)
- 70,4 mg kyselina L-askorbová
- 40 ml glycerol
- Doplnit do objemu 400 ml deionizovanou vodou

Ponceau S, roztok (1000 ml):

- 1 g Ponceau S
- 50 ml kyselina octová
- Doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou

Rozdělovací gel, 12% (20 ml):

- 6 ml akrylamid/N,N'-methylenbisakrylamid
- 5 ml TrisCl, 1,5 mol·dm⁻³, pH 8,8
- 8,9 ml deionizovaná voda
- 10 μl TEMED
- 100 μl APS, 10% (w/v)
- Pro případ SDS-PAGE bylo přidáno 0,2 ml SDS, 10% (w/v)

SDS 10% (w/v):

- 20 g SDS
- Doplnit do objemu 200 ml deionizovanou vodou

Sterilizační roztok pro sterilizaci semen *M. sativa* (100 ml):

- 66 ml 10% hypochlorid sodný
- 34 ml 70% (v/v) ethanolu
- kapka Tween 20

Tekuté LB médium (2000 ml):

- 50 g LB Broth (Miller), pH 7,2 (KOH)
- Doplnit do objemu 2000 ml deionizovanou vodou.
- Sterilizace autoklávováním

Tris buffer saline s přídavkem Tween 20 (TBS-T; 4000 ml):

- 9,68 g Tris
- 35,12 g NaCl, pH 7,4 (HCl)
- Doplnit do objemu 3996 ml deionizovanou vodou
- 4 ml Tween 20

Tris-Cl, 0,5 mol·dm⁻³, pH 6,8 (200 ml):

- 12 g Tris, pH 6,8 (HCl)
- Doplnit do objemu 200 ml deionizovanou vodou

Tris-Cl, 1,5 mol·dm⁻³, pH 8,8 (600 ml):

- 108,9 g Tris, pH 8,8 (HCl)
- Doplnit do objemu 600 ml deionizovanou vodou

Tris-glycinový pufr, transferový pufr (2000 ml):

- 6 g Tris
- 28,8 g glycin
- Doplnit do objemu 2000 ml deionizovanou vodou

Zaostřovací gel, 4% (10 ml):

- 1 ml akrylamid/N,N'-methylenbisakrylamid
- 2,52 ml TrisCl, 0,5 mol·dm⁻³, pH 6,8
- 6,46 ml deionizovaná voda
- 10 µl TEMED
- 50 µl APS, 10% (w/v)
- Pro případ SDS-PAGE bylo přidáno 0,1 ml SDS, 10% (w/v)

Zásobní roztok mědi (200 ml):

- 1 g (pro koncentraci mědi $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), 0,05 mg (pro koncentraci mědi $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), 0,005 mg (pro koncentraci mědi $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Zásobní roztok vitamínů (400 ml):

- 4 g inositolu
- 0,02 g kyseliny nikotinové
- 0,02 g thiaminu·HCl
- 0,004 g pyridoxinu·HCl
- 0,08 g glycinu

Zásobní roztok železa, 100X (100 ml):

- 146,8 g Na_2EDTA
- 111,5 mg $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3.4 Soupravy

- Clarity Western ECL Substrate (BioRad, kat. č. 1705061)
- Polyvinyliden difluoridová (PVDF) membrána (GE Healthcare, kat. č. GE10600023)

3.5 Protilátky

- Anti Cu/ZnSOD, primární protilátka (rabbit; Agrisera, kat. č. AS06 170)
- Anti FeSOD, primární protilátka (rabbit; Agrisera, kat. č. AS06 125)
- Anti Rabbit, sekundární protilátka (Thermo-Fischer, kat. č. 31460)

3.6 Přístroje a zařízení

- Analytická váha XA110/2X (Radwag, Polsko)
- Elektroforetická vana Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad; USA)
- Elektroforetická vana Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad; USA)
- Elektroforetická vana Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad; USA)
- Elektromagnetická míchačka (Boeco, Německo)
- Fotoaparát (Nikon, Japonsko)
- Fytotronová komora (WEISS Gallenkamp; Německo)
- Hlubokomrazící box (Panasonic)

- ChemiDoc MP Imaging System (BioRad; USA)
- Chlazená centrifuga Allegra 64R (Beckman Coulter; USA)
- Image Scanner III (GE Healthcare)
- Infinite M Nano (TECAN; Švýcarsko)
- Laboratorní chladnička LIE LCV 4010 (Schoeller)
- Laminární box (MERCİ; Česká republika)
- LSM 710 (Axio Imager 2; Carl ZEISS; Německo)
- Mraznička LIE G 5216 513L (Comfort)
- pH metr (Eutech Instruments; Singapur)
- Simplicity Water Purification System (Merk; Německo)
- Spektrofotometr SmartSpec Plus (BioRad; USA)
- Stolní chlazená centrifuga ScanSpeed 1730R (LaboGene; Dánsko)
- Suchá lázeň ThermoCell MixingBlock (Bioer; Čína)
- Třepačka Rocker Shaker MR-12 (Biosan; Lotyšsko)
- Vortex Genie 2Pulse (Genie; Holandsko)
- Zdroj napětí PowerPac HV (BioRad; USA)

3.7 Programy a databáze

- Image Lab (verze 4.0.1 build 6; BioRad; USA)
- Image Processing and Analysis on Java (ImageJ; 1.51j8)
- Microsoft Excel, PowerPoint (Microsoft; USA)
- ZEN Black a ZEN Blue (Carl ZEISS, Německo)

3.8 Metody

3.8.1 Bioinformatická predikce SOD genů u píceiny *M. sativa*

Za účelem získání proteinových sekvencí předpokládaných SOD u *M. sativa* byly využity sekvence SOD z modelové rostliny *M. truncatula*, které byly definovány v odborné publikaci Song *et al.*, (2018), ze které byly získány sekvence aminokyselinového složení těchto SOD. Následně byly tyto sekvence vloženy do webového programu alfalfatoolbox (<https://www.alfalfatoolbox.org/>), kde byla zvolena funkce prohledávání („blastování“; <https://www.alfalfatoolbox.org/blast/>) vůči proteinovým sekvencím SOD z *M. truncatula*. Prohledávání proteinových sekvencí proběhlo vůči dostupné databázi proteinů z *M. sativa* pod názvem „medsa XinJiangDaYe gnm1.ann1.RKB9.protein“.

Následně byly vybrány sekvence, které obsahovaly nejvyšší míru podobnosti při nejvyšší míře pokrytí sekvence. Tyto proteiny byly opět porovnány pomocí webového programu protein blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) za účelem zjištění bližších informací o podobnosti proteinových struktur.

Fylogenetická analýza byla provedena v programu MEGA-X (10.0.5; <http://www.megasoftware.net/>). Jako vstupní informace sloužily aminokyselinové sekvence SOD *A. thaliana* (sekvence získané z webové databáze TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>), homologní sekvence pocházející z rostlin *M. truncatula* a získané sekvence SOD *M. sativa*. Pokud není uvedeno jinak, bylo použito původní programové nastavení. Byl proveden alignment (ClustalW) dříve získaných sekvencí. Získaný alignment byl využit pro konstrukci fylogenetického stromu (Maximum Likelihood; WAG+G, bootstrap hodnota: 1000). Získaná data byla upravena pomocí programu MEGA-X a Microsoft Powerpoint do finální podoby.

Predikce lokalizace jednotlivých proteinů byla provedena ve webovém programu WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) pro seřazení jednotlivých druhů proteinů dle jejich lokalizace byl využit program Microsoft Excel.

3.8.2 Povrchová sterilizace semen *Arabidopsis thaliana*

Práce se semeny rostliny *A. thaliana*, která probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu s filtrovaným vzduchem (flowbox), byla sterilizována kývavými pohyby v plastové mikrozkuhavce nejprve pomocí 1 ml 70% (v/v) ethanolu po dobu 5 minut. Po uplynuté době a sedimentaci semen byl 70% (v/v) ethanol odebrán a nahrazen 1 ml 96% (v/v) ethanolom a semena byla promíchávána další 3 minuty. Následně byl 96% (v/v) ethanol opět odstraněn a probíhalo promývání deionizovanou vodou. Promývání deionizovanou vodou bylo opakováno třikrát. Semena vysterilizovaná podle tohoto protokolu byla pomocí pipety přenesena a rozprostřena na sterilní filtrační papír v Petriho misce, dokud se neodpařila přebytečná voda.

3.8.3 Skarifikace semen *Medicago sativa*

Tento proces urychluje klíčení semen, které disponují silnou testou. Semena jsou umístěna na Petriho misky a ručně obroušena smirkovým papírem, dokud testa není narušena. Po tomto kroku jsou semena připravena ke sterilizaci.

3.8.4 Povrchová sterilizace semen *Medicago sativa*

Semena rostliny *M. sativa* byla za sterilních podmínek ve flowboxu sterilizována kývavými pohyby v plastové mikrozkuhavce po dobu 1 minuty nejprve pomocí 2 ml 70% (v/v) ethanolu. Po uplynuté době a sedimentaci semen byl 70% (v/v) ethanol odebrán a nahrazen 2 ml sterilizačního roztoku pro sterilizaci semen *M. sativa* a promícháván 3 minuty. Následně byl roztok odstraněn a probíhalo promývání deionizovanou vodou. Promývání deionizovanou vodou bylo opakováno dvakrát. Semena byla dále odstavena a ponechána přes noc v deionizované vodě nabobtnat. Následně byla přenesena a rozprostřena na sterilní filtrační papír v Petriho misce, dokud se neodpařila přebytečná voda.

3.8.5 Příprava médií

Vycházelo se z postupu přípravy MS média (Murashige a Skoog médium-DUCHEFA M0222). K 900 ml deionizované vody v litrové plastové kádince bylo přidáno 10 g sacharózy, 0,5 g MES, 6,5 g Gellan gumu a 100 ml roztoku makroelementu, specifického pro každé médium (Tabulka č.1). Objem byl rozmíchán pomocí magnetického míchadla, pH upraveno na 5,7 pomocí 10M a 1M KOH a doplněno do 1 l deionizovanou vodou. Takto připravená média byla sterilizována autoklávováním. Poté bylo ve flowboxu přidáno 100 μ l roztoku mikroelementů (Tabulka č.2), specifického pro každé médium a dále 100 μ l zásobního roztoku vitamínů a 200 ml zvlášť připraveného zásobního roztoku železa a 100 μ l zásobního roztoku mědi o koncentraci 0,01 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Takto připravená média byla rozlévána do Petriho misek.

Tabulka 1: Navážky makroelementů pro přípravu zásobních roztoků MS, ARA modifikovaného a ARA média. Navážky jsou napočítány pro přípravu 1 l (10x koncentrovaného) zásobního roztoku makroelementů.

Makroelementy	MS médium (g)	ARA médium (g)	ARA mod. médium (g)
CaCl ₂	3,32	3,32	3,32
KH ₂ PO ₄	1,70	1,70	1,70
KNO ₃	19,0	5,06	5,06
MgSO ₄	1,81	1,81	1,81
NH ₄ NO ₃	16,5	-	4,70
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	-	4,70	-

Tabulka 2: Navážky mikroelementů pro přípravu zásobních roztoků MS, ARA modifikovaného a ARA média. Navážky jsou napočítány pro přípravu 2 l (1000x koncentrovaného) zásobního roztoku mikroelementů.

Makroelementy	MS médium (g)	ARA médium (g)	ARA mod. médium (g)
H ₃ BO ₃	12,4	8,6	8,6
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,05	0,005	0,005
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,5	0,1	0,1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	17,2	0,58	0,58
KI	1,66	-	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	33,8	-	-
MnCl ₂ ·4H ₂ O	-	5,6	5,6
NaCl	-	1,16	1,16

3.8.6 Výsev a kultivace sterilních semen

Vysterilizovaná semena byla ve flowboxu přenesena z filtračního papíru pomocí párátko (*A. thaliana*) či pinzety (*M. sativa*) na předem připravená média na Petriho miskách určená pro výsev semen a udržování rostlin v *in vitro* podmínkách. Po přenosu byly Petriho misky uzavřeny za pomoci parafilmu a pásky. Pro přerušení procesu dormance a k synchronizovanému klíčení byly takto připravené Petriho misky stratifikovány přes noc v lednici (4 °C, tma). Následně byly vyloženy ve vertikální poloze ve fytotronové komoře (fytotron) s parametry: 22 °C, denní režim: 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70% vlhkost, intenzita osvětlení 150 μmol·m⁻²·s⁻¹.

3.8.7 Fenotypová analýza *in vitro* kultivovaných rostlin

Fenotypové projevy byly zaznamenávány pomocí ImageJ obrazového záznamu, který byl získán pomocí Image Scanner III (GE Healthcare). Rostliny divokého typu *A. thaliana*, rostoucích při různých kultivačních podmínkách, byly dokumentovány 4. a 12. den od vyklíčení. Dokumentace rostlin *M. sativa* poté probíhala 4. a 25. den od vyklíčení.

3.8.8 Extrakce proteinů pro biochemické analýzy

Do třecí misky byly přeneseny celé semenáčky dvanáctidenních rostlin *A. thaliana*. Proces homogenizace proběhl pomocí třecí misky s tloučkem, mořským pískem a tekutým dusíkem. Vzniklý homogenát byl rozdělen, převrstven 100 μl extrakčního pufru a přenesen do dvou popsaných 1,5ml mikrozkuhavek, které byly

napřed vychlazené v tekutém dusíku. Po každém vzorku bylo třeba očistit nástroje 96% etanolem. K jedné části nadrceného vzorku byl přidán Na fosfátový pufr, k druhé části E pufr a vortexován. Směs byla uchovávána 30 minut na ledu a centrifugována (15000 g, 15 min, 4 °C). Po provedení centrifugace byl supernatant odebrán, přenesen do čisté 1,5ml mikrozkušavky a skladován při -80°C.

3.8.9 Měření koncentrace proteinů

Zjištění koncentrace proteinů v extraktu proběhlo podle metody Bradforda (Bradford, 1976). Bradfordovo činidlo bylo ředěno v poměru 1:4 deionizovanou vodou. Do každé jamky 96jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 299 μ l Bradfordova činidla a 1 μ l proteinového extraktu. Vše bylo důkladně propipetováno tak, aby nevznikly přebytečné vzduchové bubliny. Mikrotitrační destička byla vystavena inkubaci (15 minut, laboratorní teplota) a následně analyzována pomocí spektrofotometru s monochromátorem Infinite M Nano (TECAN). Absorbance byla měřena při zvolené vlnové délce 595 nm. Každý vzorek byl měřen třikrát, aby se zamezilo chybovosti. Kvantifikace získaných hodnot probíhala sestavením kalibrační křivky, pro jejíž konstrukci byly použity roztoky hovězího sérového albuminu (BSA) o známé koncentraci (opět měřeny ve třech opakováních). Zpracování dat bylo zhotoveno pomocí Microsoft Excel.

3.8.10 Metoda stanovení enzymatické aktivity SOD

Pro stanovení enzymatické aktivity SOD bylo použito 20 μ g proteinů a 25 μ g proteinů (sloužících jako kontrola), extrahovaných pomocí Na fosfátového pufru. Elektroforetická separace probíhala za nedenaturujících podmínek v 1,5mm polyakrylamidovém gelu. Gely byly připraveny následovně: spodní a horní tenká skla byla vyčištěna 70% etanolem a vysušena plynným dusíkem. Po sestavení aparatury pro výrobu gelů byla skla za pomoci Pasteurovy pipety naplněna nejdříve 12% roztokem rozdělovacího gelem asi 1 cm pod horní hranu kratšího skla. Rozdělovací gel byl převrstven isopropanolem a ponechán polymerizovat 1 hodinu. Po uplynulé době byl pomocí filtračního papíru odsát zbytek isopropanolu a napipetován 4% zaostřovacím gelem s vloženým plastovým hřebenem na jamky. Polymerizace trvala 20 minut. K elektroforetické separaci byl využit elektroodový pufr (tris-glycinového pufr) a do jamek bylo pipetováno vypočítané množství vzorku pro 20 a 25 μ g proteinu. Samotná separace probíhala na ledu při konstantním proudu 40 mA

a napětí 250 V po dobu dvou hodin. Po dokončení byl gel přenesen do 50 ml Na fosfátového pufru a inkubován na kývačce 10 min při pokojové teplotě. Poté byl gel inkubován 20 minut ve tmě v 50 ml Na fosfátovém pufru s $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NBT a následně 15 minut v Na fosfátovém pufru s $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Na_2EDTA , 0,25% TEMED a $0,06 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ riboflavinem opět ve tmě. Poté byl roztok odlit a gel byl vystaven expozici přímého světla o intenzitě $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ při laboratorní teplotě 5 minut. Následně se gel promýval třikrát deionizovanou vodou. Pro výslednou dokumentaci byl využit Image Scanner III (GE Healthcare), pro zpracování ImageJ a pro finální verzi program Microsoft PowerPoint. Pro inhibiční analýzu bylo využito inhibitorů H_2O_2 a KCN.

3.8.11 SDS-PAGE

Elektroforetická separace za denaturujících podmínek (SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného) proběhla smícháním extraktu proteinů získaných prostřednictvím extračního E pufru s Laemliho pufrům v poměru 3:1, který byl předtím připraven smícháním s 2-merkptoethanolem v poměru 9:1. Tyto vzorky byly promíchány pomocí vortexu, inkubovány při $95 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut a následně ponechány zchladnout na pokojovou teplotu. K separaci byl použit elektrodový pufr (elektroforetický pufr) a 1mm polyakrylamidový gel připravený ze dvou částí: 4% zaostřovací a 12% rozdělovací gel s přísádkem SDS. Samotná separace probíhala na ledu při konstantním proudu nejprve 20 minut při napětí 100 V a dále 60 nebo 75 minut při 140 V. Detekce proteinů probíhala pomocí přístroje ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) a software Image 47 Lab (Bio-Rad) s využitím protokolu pro „Stain-Free“ gely. Pro zpracování se použil program Microsoft PowerPoint.

3.8.12 Imunoblotování

Po dokončení elektroforetické separace za denaturujících podmínek byly proteiny přeneseny na PVDF membránu o rozměrech: 8,5 cm délka a 7 cm výška. Tato membrána byla předem rehydratována v methanolu po dobu 30 sekund, a poté inkubována 10 minut s houbičkami, filtračním papírem a polyakrylamidovým gelem v transferovém pufru (tris-glycinový pufr s obsahem 10% (v/v) methanolu). Následně byla houbička s třemi filtračními papíry, vložena do kazety. Na tuto vrstvu byl přenesen gel, překryt aktivovanou PVDF membránou a dalšími třemi filtračními papíry, přičemž poslední

vrstvu tvořila druhá houbička. Mezi všemi vrstvami se dbalo na důsledné vytlačování vzduchových bublin za pomoci tlaku vytvořeného válečkem. Tímto způsobem složená kazeta byla vložena do vany obsahující transferový pufr a umístěna na ledu. Přenos probíhal přes noc při konstantním napětí 24 V.

Poté byla membrána z kazet vyjmuta a omyta deionizovanou vodou a pro vizualizaci proteinů obarvená roztokem Ponceau S. Přebytečná barva byla vymyta deionizovanou vodou a výsledek byl zdokumentován fotoaparátem. Následné odbarvení probíhalo za pomoci promytí v TBS-T.

Pro detekci SOD byly membrány přes noc blokovány na třepačce při 4 °C v 5% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS-T. Po odstranění blokovacího roztoku byla membrána opět přes noc inkubována při 4 °C v roztoku obsahujícím primární polyklonální protilátku (anti FeSOD, 1:3000; anti Cu/ZnSOD, 1:2000), která byla ředěna v 1% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS-T. Po uplynutí doby inkubace následovalo promytí roztokem TBS-T po dobu 10 minut, přičemž tento postup se opakoval 5x. Nakonec byla provedena inkubace (1,5 hodiny) v roztoku obsahujícím sekundární protilátku (anti rabbit protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou, 1:5000), která byla naředěna v 1% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS-T. Po ukončení inkubace byla membrána opět pětkrát promyta v roztoku TBS-T po dobu 10 minut. Pro vizualizaci značených proteinů byl použit komerční substrát Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). Membrána byla inkubována v substrátu 2 minuty a následně zdokumentována pomocí přístroje ChemiDoc MP Imaging Systém (Bio-Rad) s využitím protokolu Chemi. Pro zpracování získaného obrazového materiálu byl využit Image Lab a pro finální verzi program Microsoft PowerPoint.

3.8.13 Tranzientní transformace *Nicotiana benthamiana*

Ve flowboxu bylo do 20 ml tekutého LB média obsahující selekční antibiotika (spektinomycin a rifampicin v koncentracích 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) přeneseno 50 μl bakteriální suspenze *Agrobacterium tumefaciens*, kmene GV3101 nesoucí konstrukt *pCSDI-gCSDI::eGFP:3'UTR-CSDI*. Tato kultura byla kultivována přes noc na třepačce (tma, 180 RPM a 25 °C). Následující den (minimálně 2 hodiny před samotnou transformací) byly rostliny *Nicotiana benthamiana* určené k transformaci umístěny v laboratoři a důkladně zality vodou, aby došlo k otevření průduchů na spodní straně listů. Byly přeneseny z fytotronu s parametry: 22 °C, denní režim: 16 hodin světlo, 8 hodin tma,

70% vlhkost, intenzita osvětlení $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Bakteriální kultura byla centrifugována (3500 g, 10 minut, 23 °C), následně byl supernatant odlit a nahrazen 400 μl kokultivačního média. Po kultivaci byla v namnožené bakteriální kultuře změřena optická hustota při vlnové délce 600 nm (optical density, OD_{600}). 10 μl bakteriální suspenze bylo smícháno s 990 μl kokultivačního média a měřeno pomocí spektrofotometru při indikované vlnové délce. Jako blank bylo použito 500 μl infiltračního média. Výsledná hodnota byla použita pro získání infiltrační bakteriální suspenze, kde výsledná hodnota pro OD_{600} byla vypočítána podle níže uvedené rovnice. Ředilo se na $\text{OD}_{600} = 0,7$, přičemž na doplnění na požadovaný objem bylo použito kokultivační médium.

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

V je objem bakteriální suspenze s měřeným OD_{600} ; OD_{600} požadované je výsledné požadované OD_{600} ; V_1 je výsledný objem bakteriální suspenze (10 ml); OD_{600} naměřené je aktuálně naměřená hodnota OD_{600} ; 100 je koeficient ředění.

Bakteriální suspenze byla dále inkubována 2 hodiny ve tmě, při pokojové teplotě. Po provedení inkubace byly pomocí 2ml injekční stříkačky infiltrovány listy *N. benthamiana*. Bakteriální suspenze byla nasáta do injekční stříkačky a pomalu vtlačena do abaxiální strany listu. Jako negativní kontrola bylo použito čisté infiltrační médium. Celá infiltrovaná plocha byla řádně vyznačena, celá rostlina byla přikryta černou folií a uložena do druhého dne na temném místě v laboratoři a následně přemístěna do fytotronu (22 °C, denní režim: 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70% vlhkost, intenzita osvětlení $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

3.8.14 Konfokální mikroskopie

Subcelulární lokalizace CSD1 byla analyzována s využitím GFP fluorescence. Z tří denních listů tranzientně transformované rostliny *N. benthamiana* byly odštířeny sedimenty, přeneseny abaxiální stranou vzhůru na podložné sklíčko s kapkou deionizované vody a překryté krycím sklíčkem. Takto připravené preparáty byly pozorované s využitím mikroskopu LSM 710 (Axio Imager 2) při zvětšení okuláru 10x a objektivu 20x (Plan-Apochromat 20x/0.8 M27). Pro excitaci GFP byl využit laser

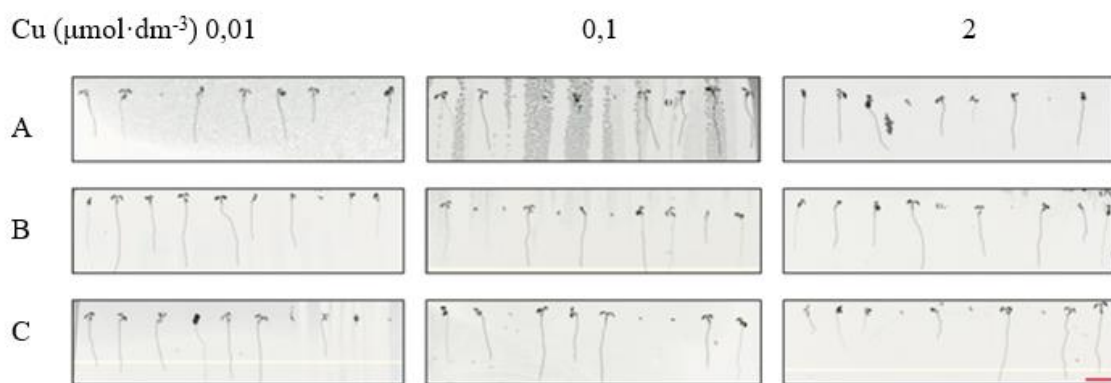
s vlnovou délkou 488 nm o intenzitě 2–4 %, přičemž emise byla detekována v rozmezí vlnových délek 493–555 nm. Pro chlorofyl byl pak použit laser s vlnovou délkou 633 nm o intenzitě 2 % a emisí v rozmezí 649–721 nm. Analýza obrazového materiálu byla zpracována pomocí programu ZEN Black (ZEISS) a ZEN Blue (ZEISS).

4 VÝSLEDKY

4.1 Fenotypová analýza semenáčků rostlin *A. thaliana* rostoucích při různé dostupnosti mědi a dusíku

Úvodní analýzou této práce bylo sledování fenotypového projevu rostlin *A. thaliana* rostoucích na různých koncentracích mědi ($0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), různých koncentracích a zdroji dusíku ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ a $0,019 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ pro MS médium; $0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ a $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ pro ARA médium; $0,006 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ a $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ pro ARA modifikované (ARA mod.) médium) v médiu a jejich dopad na raný vývoj rostlin. Dalším cílem tohoto experimentu byla především optimalizace a potvrzení správnosti připravených médií (všechny složky médií byly připraveny manuálně ze základních komponentů, viz sekce příprava kultivačních médií 3.2.5) za účelem jejich následovného využití pro kultivaci rostlin *M. sativa*.

Jako první byla využita semena divokého typu rostliny *A. thaliana*, která byla přímo vysazená na média označená jako MS, ARA mod. a ARA médium. V průběhu prvních dnů téměř všechna semena vyklíčila. Zkoumaná média podporovala růst a vývoj rostlin bez výrazných změn fenotypového projevu. Toto pozorování proběhlo 4. den od vyklíčení (Obrázek 6A, B, C).



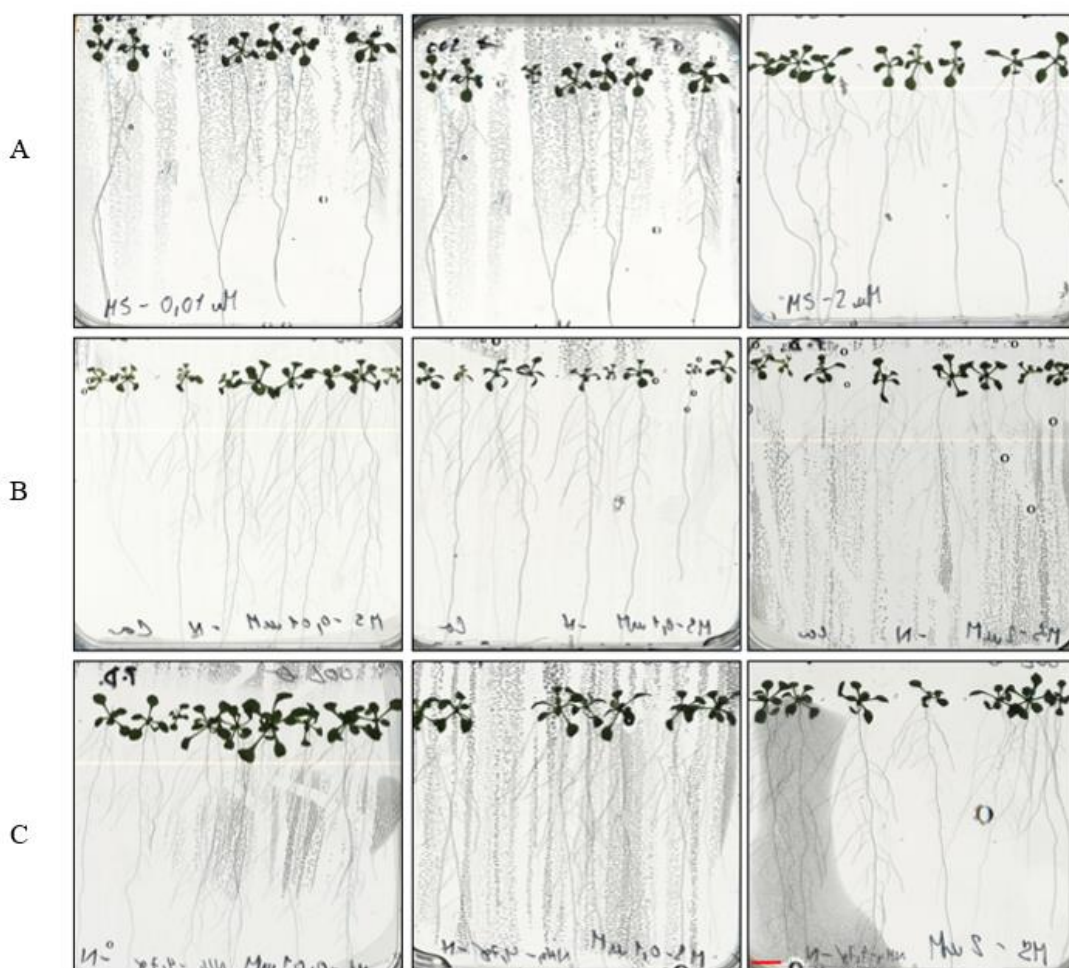
Obrázek 6: Fenotypová analýza divokého typu *A. thaliana* na různých kultivačních médiích čtvrtý den po vyklíčení. Manuálně připravená média se lišila v koncentraci mědi ($0,01$; $0,1$; $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a v koncentraci a zdroji dusíku: A – MS médium ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ a $0,019 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$); B – ARA médium ($0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ a $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$); C – ARA mod. médium ($0,006 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ a $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$); Měřítka – 1 cm.

Následující dny pozorování prokázaly první fenotypové rozdíly mezi jednotlivými rostlinami pěstovanými na různých médiích, ale za stejných kultivačních podmínek. Konkrétně dvanáctý den po vyklíčení byly zaznamenány fenotypové změny projevující se především v nadzemních částech rostlin, ale i na úrovni kořenového systému (Obrázek 7A, B, C). Menší listové růžice byly pozorovány u rostlin kultivovaných na ARA médiu (Obrázek 7B) v porovnání se zbylými médii (Obrázek 7A, C), a to při všech zkoumaných koncentracích mědi. Taktéž kořenový systém, pozorovaný na MS médiu (Obrázek 7A), vykazoval výrazně snížený počet laterálních kořenů a celková vývoj kořenové soustavy v porovnání se semenáčky rostoucích na ARA a ARA mod. médiích (Obrázek 7B, C), a to opět při všech zkoumaných koncentracích mědi.

Cu ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) 0,01

0,1

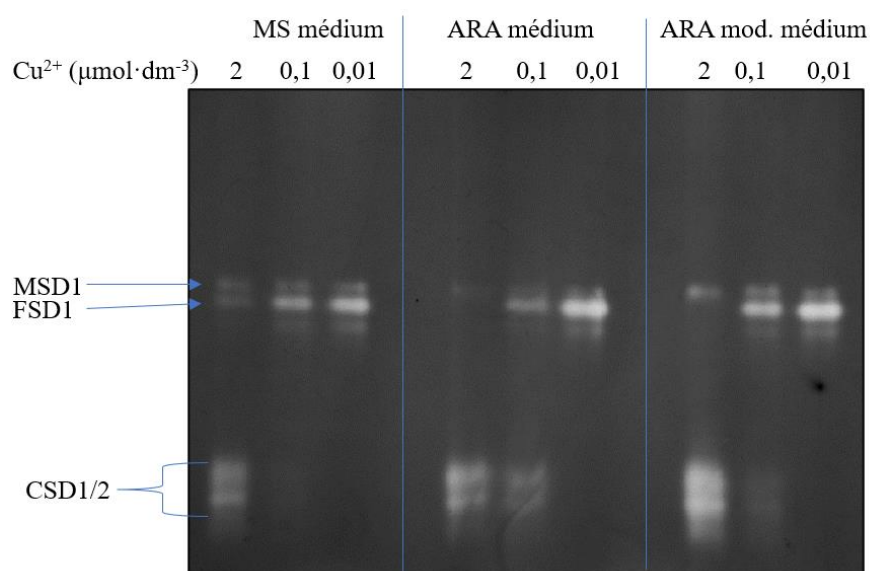
2



Obrázek 7: Fenotypová analýza divokého typu *A. thaliana* na různých kultivačních médiích dvanáctý den po vyklíčení. Manuálně připravená média se lišila v koncentraci mědi (0,01; 0,1; 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a v koncentraci a zdroji dusíku: A – MS médium (0,02 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NH_4NO_3 a 0,019 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KNO_3); B – ARA médium (0,002 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ a 0,005 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KNO_3); C – ARA mod. médium (0,006 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NH_4NO_3 a 0,005 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KNO_3); Měřítka – 1 cm.

4.2 Biochemická analýza SOD u rostliny *A. thaliana* rostoucích při různé dostupnosti mědi a dusíku

Jako první byla provedena enzymatická analýza získaných nativních extraktů za účelem detekce aktivity jednotlivých SOD isoenzymů pomocí nativní-PAGE s následným specifickým barvením. Tato metoda je schopna vizualizovat přítomnost a různou intenzitu aktivit MSD1, FSD1 a CSD1/2 isoenzymů u rostliny *A. thaliana*. Hlavním cílem tohoto experimentu byla charakterizace přítomnosti aktivit jednotlivých SOD isoenzymů v závislosti na různé přítomnosti mědi a dusíku v růstovém médiu (Obrázek 8). Tato separační metoda (nativní-PAGE) není schopná jednoznačně rozdělit chloroplastové (CSD2) a cytosolové (CSD1) CSD isoenzymy, které splývají do jednoho bandu, a proto jsou vyhodnocovány jako celek.



Obrázek 8: Vizualizace enzymatické analýzy aktivit SOD u rostlin divokého typu *A. thaliana* rostoucích na různých kultivačních médiích. Proteinové extrakty byly připraveny ze semenáčků rostoucích na manuálně připravených médiích, která se lišila v koncentraci mědi (0,01; 0,1; 2 μmol·dm⁻³) a v koncentraci a zdroji dusíku: MS médium (0,02 mol·dm⁻³ NH₄NO₃ a 0,019 mol·dm⁻³ KNO₃); ARA médium (0,002 mol·dm⁻³ Ca(NO₃)₂·4 H₂O a 0,005 mol·dm⁻³ KNO₃); ARA mod. médium (0,006 mol·dm⁻³ NH₄NO₃ a 0,005 mol·dm⁻³ KNO₃).

Proteinový extrakt získaný z rostlin rostoucích na MS médiu (ve všech variantách přítomen 0,02 mol·dm⁻³ NH₄NO₃ a 0,019 mol·dm⁻³ KNO₃), při desetkrát nižší koncentraci mědi v médiu, než je standartní (0,01 μmol·dm⁻³), nevykazovalo aktivitu pro CSD1/2 a naopak vykazovalo zvýšenou aktivitu pro FSD1. Pokud koncentrace mědi vzrostla na standartní (0,1 μmol·dm⁻³), pás pro CSD1/2 nebyl téměř vůbec patrný, a taktéž pás pro FSD1 byl slabší v porovnání s koncentrací 0,01 μmol·dm⁻³ mědi. Při vysoké koncentraci

mědi v médiu ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) byl poté pozorován opačný jev než při snížené koncentraci mědi. CSD1/2 se projevovaly vysokou aktivitou a FSD1 velice nízkou vše pozorováno na obrázku 8.

Dále extrakt získaný z rostlin rostoucích na ARA médiu (ve všech variantách přítomen $0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ a $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$) při nízké koncentraci mědi v médiu ($0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) rovněž nevykazovalo aktivitu CSD1/2 a naopak vysokou aktivitu pro FSD1. Při standartní koncentraci mědi ($0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) byl pás pro FSD1 méně patrný, než u koncentrace $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Při této koncentraci mědi ($0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) se rovněž začal projevovat pás pro CSD1/2. Vysoké koncentrace mědi v médiu ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) měly za následek vysoké projevy aktivit pro CSD1/2 a pás představující aktivitu FSD1 nebyl pozorován. Všechny tyto výsledky byly pozorovány na obrázku 8.

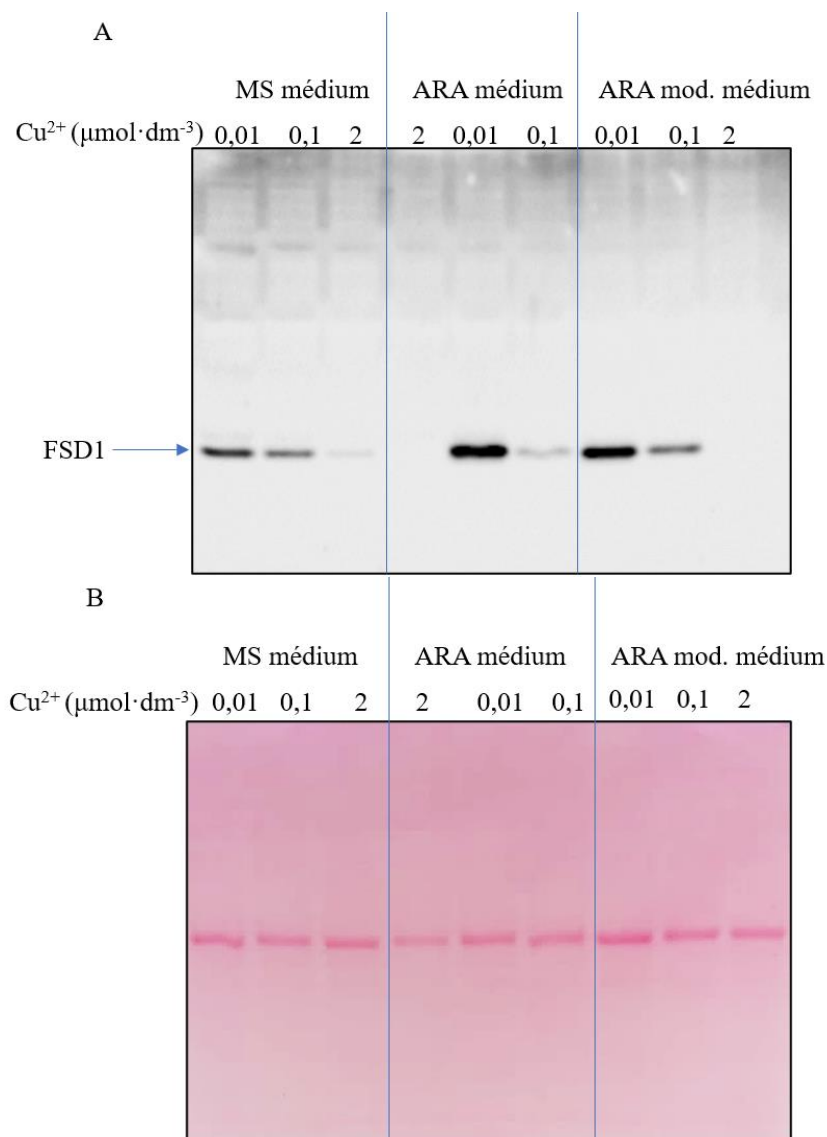
Poslední extrakt získaný z rostlin na ARA mod. médiu (ve všech variantách přítomen $0,006 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ a $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$) se poté projevovalo stejným způsobem jako ARA médium při různých koncentracích mědi. Jediným patrným rozdílem byla zvýšená aktivita CSD1/2 při koncentraci $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ mědi a mírnější snížení aktivity FSD1 při koncentraci $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ mědi (Obrázek 8).

MSD1 se ve všech případech médií (MS, ARA mod., ARA a médium) projevovaly stejně a to tak, že nevykazovaly téměř žádné změny enzymatické aktivity v odpovědi na zvyšování nebo snižování koncentrace mědi, či koncentrace nebo druhu zdroje dusíku v médiu (Obrázek 8).

Pro stanovení proteinové abundance SOD za výše zmíněných kultivačních podmínek byla využita metoda imunoblotování specifickými protilátkami. Jako první byla použita anti-FSD1 protilátka (Obrázek 9A, B), kde abundance FSD1 potvrdila výsledky předešlé analýzy aktivit SOD. Vysoké hodnoty abundance FSD1 byly prokázány při nízké koncentraci mědi ($0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) u všech třech typů médií. Nicméně při dané koncentraci mědi byl pozorován patrný rozdíl ve FSD1 abundanci na MS médiu, a to výrazné snížení, v porovnání s ARA mod. a ARA médii. Tento výsledek pozitivně koreluje s výsledky získanými z SOD aktivit (Obrázek 8).

Při standartní koncentraci mědi ($0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) byla abundance FSD1 výrazně snížena, a to především v případě ARA média. U MS a ARA mod. médií byl pokles abundance FSD1 nižší, což opět pozitivně koreluje s výsledky získanými u SOD aktivit (Obrázek 8).

Při vysoké koncentraci mědi v médiu ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) byla detekována velmi nízká nebo žádná abundance FSD1 (Obrázek 9). Zatímco u MS média byl i při vysoké koncentraci mědi ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) zaznamenán velmi slabý pás odpovídající abundanci FSD1, u ARA a ARA mod. médií již při této koncentraci nebyl pozorován žádný pás. Tento výsledek opět koreluje s výsledky získanými z SOD aktivit (Obrázek 8).

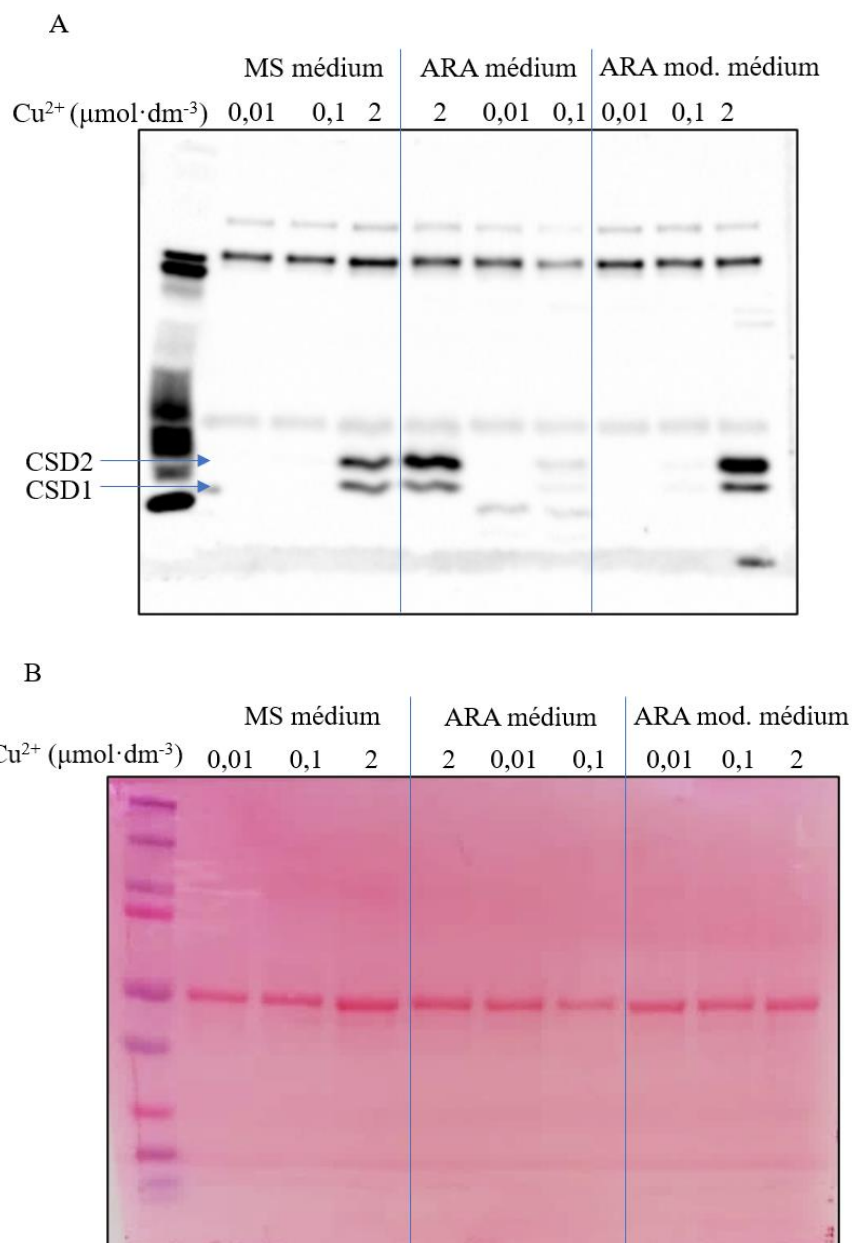


Obrázek 9: Detekce abundance FSD1 proteinu u rostlin divokého typu *A. thaliana* rostoucích na různých kultivačních médiích pomocí imunoblotování se specifickou anti-FSD1 protilátkou. A – Imunoblot se specifickou FSD1 protilátkou. B – Kontrola proteinové nanášky barvením membrány pomocí Ponceau S. Proteinová velikost pozorovaných pásů odpovídají FSD1 proteinu je 24 kDa. Proteinové extrakty byly připraveny ze semenáčků rostoucích na manuálně připravených médiích, která se lišila v koncentraci mědi ($0,01$; $0,1$; $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a v koncentraci a zdroji dusíku: MS médium ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ a $0,019 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$); ARA médium ($0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ a $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$); ARA mod. médium ($0,006 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ a $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$).

Dále bylo využito i imunoblotování s anti-CSD protilátkou, která dokáže rozpoznat CSD1 i CSD2 u rostliny *A. thaliana* (Obrázek 10). V tomto případě byla pozorována přítomnost proteinů pouze při vysoké koncentraci mědi ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), kdy opět nižší abundanci obou CSD1 a CSD2 vykazoval proteinový extrakt získaný z MS média v porovnání s ARA a ARA mod. médií. Jedinou výjimku detekce CSD1 a CSD2 proteinové abundance při standardní koncentraci mědi ($0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) vykazovalo ARA médium, kdy při zvolené expozici byly patrné velmi slabé pruhy odpovídající přítomnosti CSD1 a CSD2 proteinů. Tyto výsledky opět korelují s výsledky získanými z SOD aktivit (Obrázek 8).

Obecně pak lze říci, že u všech třech druhů připravených médií byl pozorován očekávaný dopad na aktivitu/abundanci SOD v odpovědi na přítomnost různého množství mědi, čímž se potvrdila správnost nastaveného protokolu a přípravy médií. Rozdíly mezi médií a důvod těchto změn na úrovni abundance a aktivity jednotlivých SOD v závislosti na zdroji dusíku v jednotlivých médiích budou následně diskutovány v sekci 5.

Pro následné experimentální analýzi na roslině *M. sativa* bylo vybráno MS médium. Důvody tohoto výběru jsou taktéž diskutovány v sekci 5.

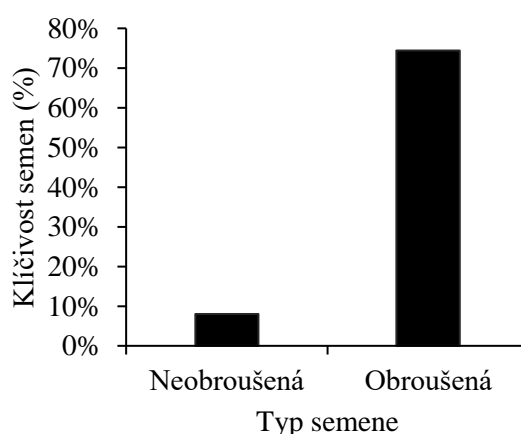


Obrázek 10: Detekce abundance CSD1 a CSD2 proteinu u rostlin divokého typu *A. thaliana* rostoucích na různých kultivačních médiích pomocí imunoblotování se specifickou anti-CSD protilátkou. Tato protilátka rozpoznává specificky CSD1 a CSD2 isoenzymy. A – Imunoblot se specifickou CSD protilátkou. B – Kontrola proteinové nanášky barvením membrány pomocí Ponceau S. Proteinová velikost pozorovaných pásů odpovídají CSD1 proteinu je 15 kDa a 22 kDa pro CSD2 proteiny. Proteinové extrakty byly připraveny ze semenáčků rostoucích na manuálně připravených médiích, která se lišila v koncentraci mědi (0,01; 0,1; 2 μmol·dm⁻³) a v koncentraci a zdroji dusíku: MS médium (0,02 mol·dm⁻³ NH₄NO₃ a 0,019 mol·dm⁻³ KNO₃); ARA médium (0,002 mol·dm⁻³ Ca(NO₃)₂·4 H₂O a 0,005 mol·dm⁻³ KNO₃); ARA mod. médium (0,006 mol·dm⁻³ NH₄NO₃ a 0,005 mol·dm⁻³ KNO₃).

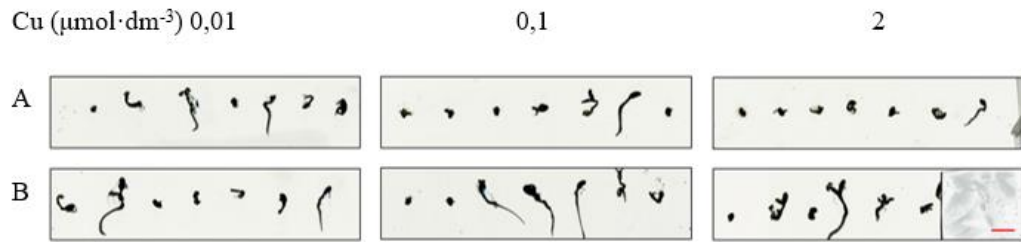
4.3 Fenotypová analýza semenáčků rostliny *M. sativa* rostoucích při různé dostupnosti mědi

Fenotypová analýza byla rovněž provedena i u semenáčků rostlin *M. sativa*, a to na dříve vybraném MS médiu s opět rozdílnými koncentracemi mědi ($0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Nicméně sterilizovaná semena prokazovala velice nízkou klíčivost za daných podmínek. Z padesáti vysazených semen vyklíčila a následně vyrostla pouze čtyři. Z důvodu velmi nízké klíčivosti semen, bylo rozhodnuto o využití metody mechanického narušení testy, které by mělo zvýšit procentuální úspěšnost klíčivosti semen. Pro provedení této metody mechanické skarifikace bylo použito 43 semen, z nichž následně vyklíčilo 32 semen. Statisticky se tak úspěšnost klíčivosti zvedla z pouhých 8 % na 74,4 % (Graf 1).

Graf 1: Procentuální porovnání klíčivosti semen v závislosti na procesu skarifikace.



Zvýšení klíčivosti bylo prokázáno jak u nových (21 semen, Obrázek 11A) tak u opětovně použitých semen, které bez procesu skarifikace nevyklíčila (22 použitých nevyklíčených semen z předešlého experimentu, Obrázek 11B). Klíčivost takto ošetřených semen byla pozorována čtvrtý den po vyložení do kultivační místnosti.



Obrázek 11: Fenotypová analýza divokého typu *M. sativa* na různých kultivačních médiích čtvrtý den po vyložení do kultivační místnosti. Manuálně připravené MS se lišilo v koncentraci mědi v médiu (0,01; 0,1; 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). A – Nová semena; B – Nevyklíčená semena z předešlého experimentu. Měřítka – 1 cm.

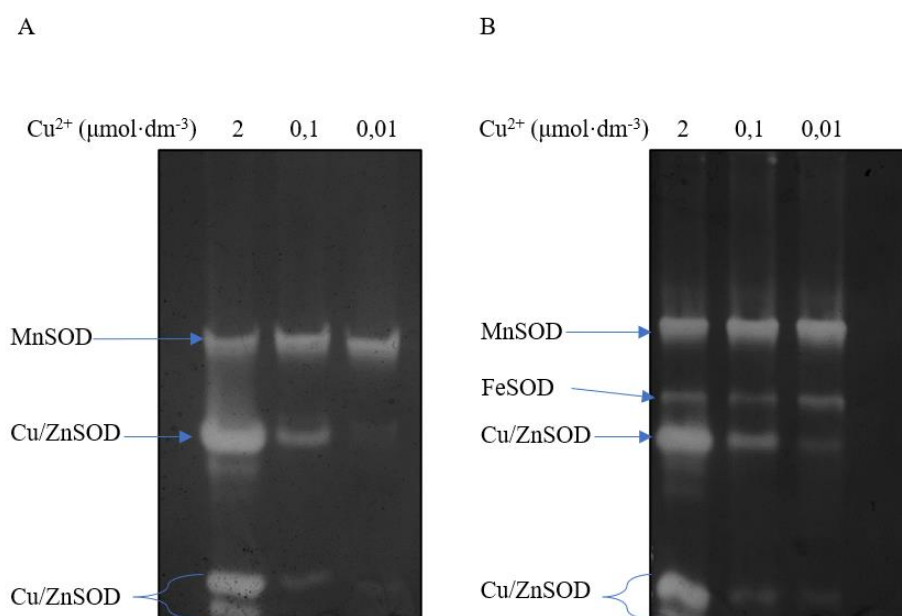
Další hodnocení fenotypu semenáčků bylo provedeno 25. den po vyložení do kultivační místnosti (Obrázek 12A, B). Fenotyp těchto rostlin však nelze zcela adekvátně porovnávat, a to z důvodu provedení manuální mechanické skarifikace. Tato metoda zbrušuje testu nerovnoměrným způsobem u jednotlivých semen, a proto bez optimalizace tohoto procesu nelze hodnotit adekvátně fenotypové projevy, jelikož samotný proces skarifikace může vyvolávat různé fenotypové projevy rostoucího semenáčku. Nicméně ze získaných výsledků může být uvažováno, že snížená koncentrace mědi (0,01 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) může vést k fenotypovému projevu nadzemní části, a to konkrétně snížení velikosti listové plochy (Obrázek 12A, B).



Obrázek 12: Fenotypová analýza divokého typu *M. sativa* na různých kultivačních médiích dvacátý pátý den po vyložení do kultivační místnosti. Manuálně připravené MS médium se lišilo v koncentraci mědi v médiu (0,01; 0,1; 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). A – Nová semena; B – Nevyklíčená semena z předešlého experimentu. Měřítka – 1 cm.

4.4 Biochemická analýza SOD u rostliny *M. sativa* rostoucích při různé dostupnosti mědi

Vliv koncentrace mědi na aktivitu/abundanci SOD je velmi dobře popsáným jevem u rostliny *A. thaliana* (Drazkiewicz *et al.*, 2004). Následující experimenty byly provedeny za účelem zjištění, zdali je tato regulace taktéž přítomná u rostliny *M. sativa*. Jako první byla provedena analýza hodnotící aktivitu SOD, které byly pěstované na MS médiu obsahující opět rozdílné koncentrace mědi (0,01; 0,1; 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Z pořízeného obrazového záznamu odpovídajícího aktivitám jednotlivých SOD isoenzymů bylo možno odvodit přítomnost aktivit reprezentujících FeSOD MnSOD a Cu/ZnSOD (Obrázek 13), dle dříve dostupné literatury (Samis *et al.*, 2002).



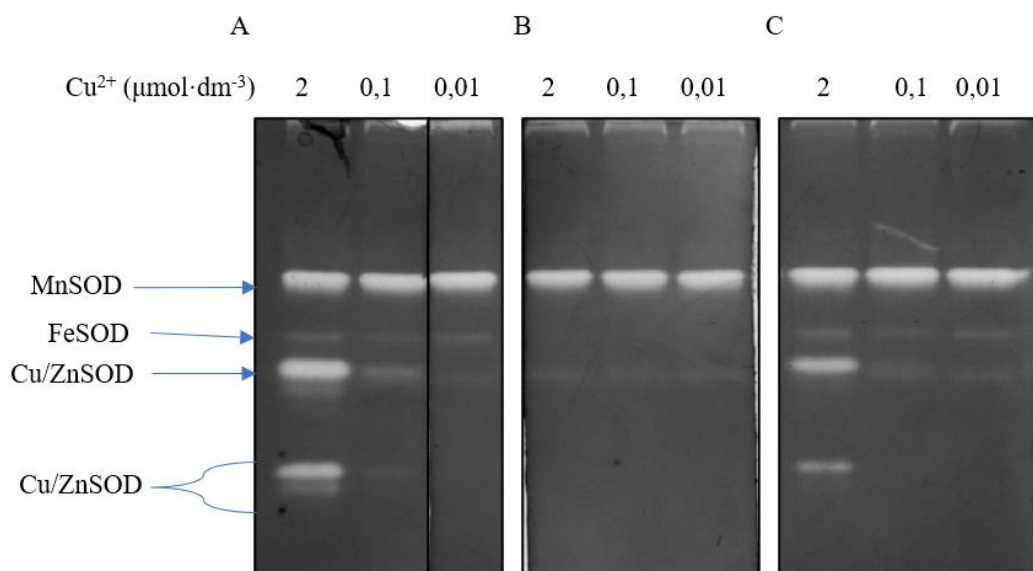
Obrázek 13: Vizualizace enzymatické analýzy aktivit SOD u rostlin divokého typu *M. sativa* rostoucích na MS médiu s různou koncentrací mědi. Proteinové extrakty byly připraveny ze semenáčků rostoucích na manuálně připraveném MS médiu, které se lišilo v koncentraci mědi (0,01; 0,1; 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). A – Doba elektroforézy 60 minut; B – Doba elektroforézy 75 minut.

Při prvním pokusu (doba separace 60 minut) se podařilo detekovat přítomnost různých isoenzymů SOD (Obrázek 13A) odpovídající MnSOD a Cu/ZnSOD. Při kratší době separace (60 minut) splýval pás reprezentující aktivitu FeSOD s pásem pro Cu/ZnSOD. Až prodloužená doba elektroforézy (75 minut) způsobila oddělení těchto pásů (Obrázek 13B).

Dále bylo zjištěno, že nízké koncentrace mědi v médiu (0,01 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) způsobují potlačení aktivit pro Cu/ZnSOD, zatímco standartní (0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a vysoké

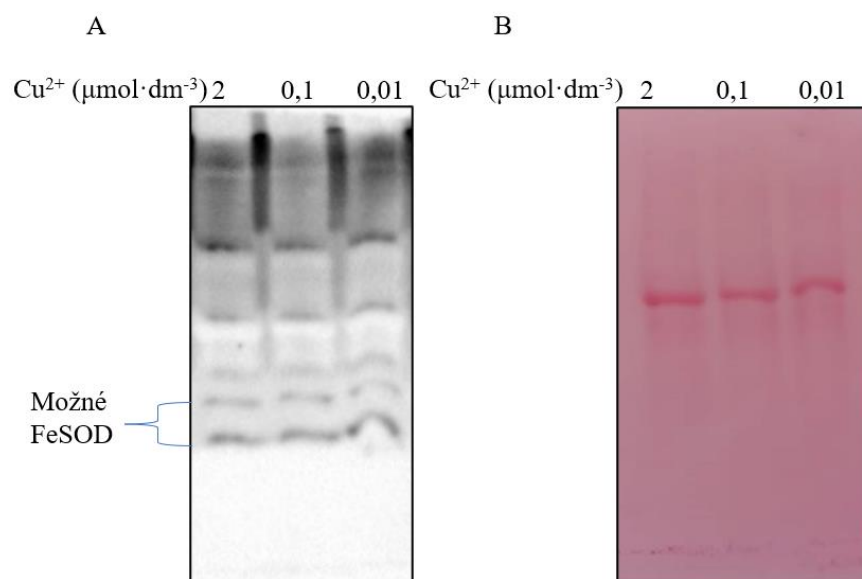
koncentrace mědi ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) vytváří zvyšující se gradient Cu/ZnSOD aktivity (Obrázek 13A, B). Pro MSD1 byl poté pozorován stejný jev jako u rostliny *A. thaliana*. Jejich aktivita zůstala neměnná (Obrázek 13A, B). U píceiny *M. sativa* se aktivita FeSOD projevovala nezávisle na koncentraci mědi. Jeho aktivita tak v průběhu zůstala neměnná (Obrázek 13A, B).

Definování vizualizovaných SOD isoenzymů bylo potvrzeno pomocí inhibiční analýzy za použití H_2O_2 a KCN inhibitorů (Obrázek 14A, B, C). H_2O_2 inhibuje všechny isoenzymy kromě MnSOD, která je vůči H_2O_2 rezistentní (Obrázek 14B). Díky tomuto testu byl jednoznačně určen pás odpovídající MnSOD. KCN poté inhibuje pouze Cu/ZnSOD isoenzymy, zatímco FeSOD a MnSOD isoenzymy jsou vůči KCN rezistentní (Obrázek 14C). Po srovnání získaných výsledků s inhibitorem H_2O_2 bylo možné definovat FeSOD. Zbylé pásy, které byly v obou případech inhibovány, poté odpovídaly Cu/ZnSOD isoenzymům.



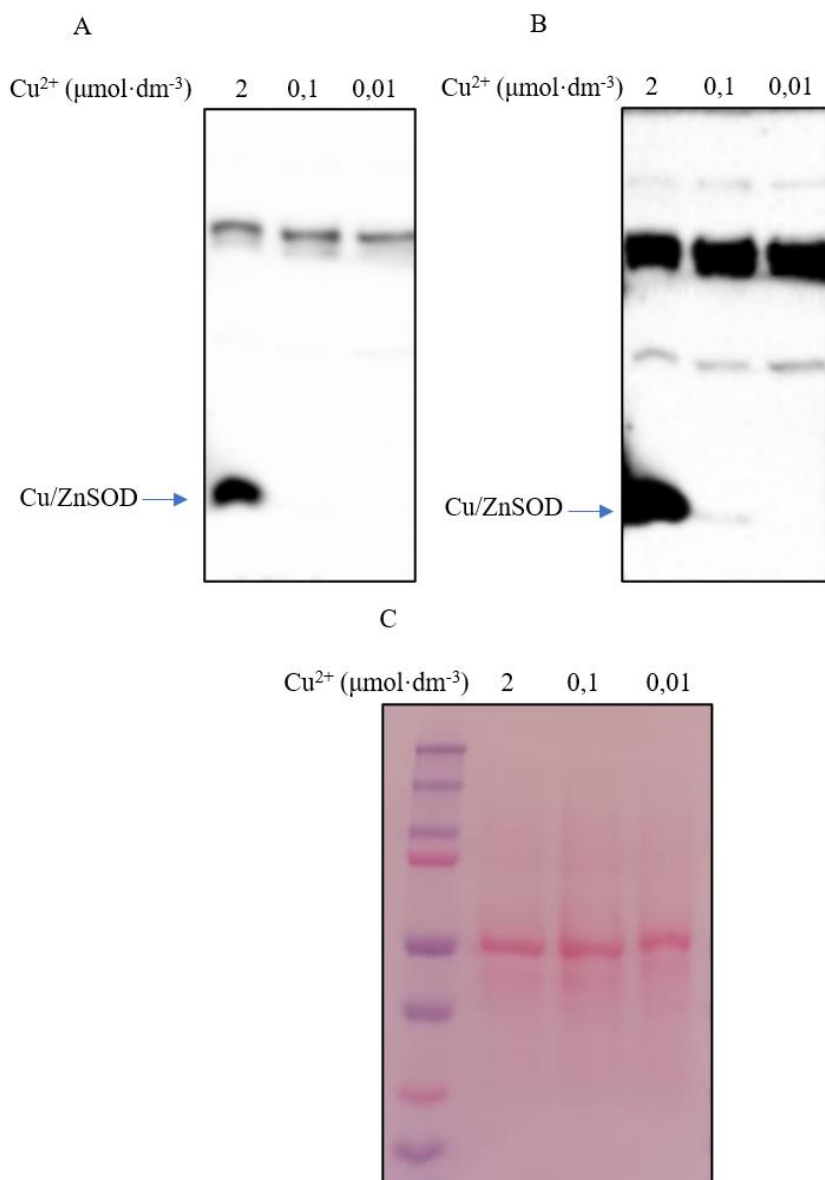
Obrázek 14: Inhibiční analýza MnSOD, FeSOD a Cu/ZnSOD u divokého typu *M. sativa*. Proteinové extrakty byly připraveny ze semenáčků rostoucích na manuálně připraveném MS médium, které se lišilo v koncentraci mědi (0,01; 0,1; $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). A – Bez inhibitoru; B – Inhibitor H_2O_2 , C – Inhibitor KCN. Doba separace: 75 minut.

Dále byla použita metoda imunoblotování pro rostlinu *M. sativa*. Jako první byla opět použita anti-FSD1 (Obrázek 15). Vzhledem k tomu, že abundance FeSOD se prokazovala nezávisle na koncentraci mědi v médiu (Obrázek 14A), nebylo možné určit, zda se s jistotou jedná o pás/pásy odpovídající FeSOD. Nicméně na základě přibližné molekulové velikosti naznačených pásů by se mohlo jednat o FeSOD.



Obrázek 15: Detekce abundance FeSOD u rostlin divokého typu *M. sativa* rostoucích na MS médium s různou koncentrací mědi pomocí imunoblotování se specifickou anti-FSD1 protilátkou. A – Imunoblot se specifickou FSD1 protilátkou. B –Kontrola proteinové nanášky barvením membrány pomocí Ponceau S. Proteinová velikost pozorovaných pásů odpovídají pravděpodobným pásům FeSOD je v přibližném rozmezí 20-30 kDa. Proteinové extrakty byly připraveny ze semenáčků rostoucích na manuálně připraveném MS médium, které se lišilo v koncentraci mědi (0,01; 0,1; 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).

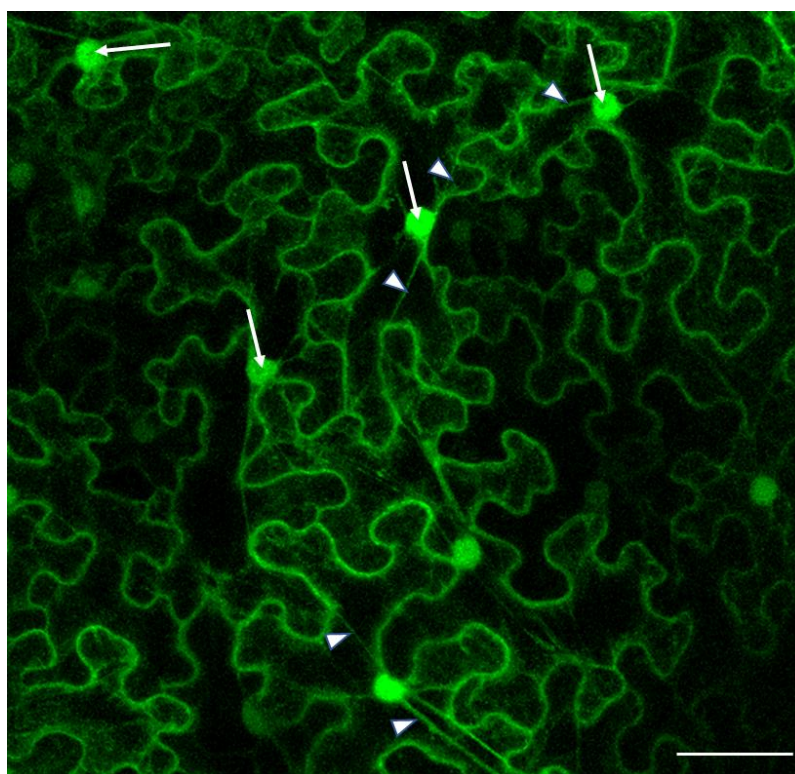
Dále bylo stejně jako pro rostlinu *A. thaliana*, využito imunoblotování s anti-CSD protilátkou. Jelikož byl u aktivit Cu/ZnSOD zaznamenán gradient, bylo možné po provedení metody zadefinovat Cu/ZnSOD i u rostliny *M. sativa*. Výsledky imunoblotování ukázaly, že tato protilátka specificky rozpoznává jeden Cu/ZnSOD isoenzym, jelikož byl detekován pás s vysokou abundancí při koncentraci mědi 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, velmi málo parný pás při koncentraci mědi 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, který byl patrný až při vyšších expozicích (Obrázek 16 A, B). Při koncentraci 0,01 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ nebyl detekován žádný pás, a to ani při vyšších expozicích (Obrázek 16 A, B). Vzhledem k tomu, že genom této rostliny pravděpodobně disponuje čtyřmi isoformami genu pro Cu/ZnSOD (Song *et al.*, 2018), nebylo možné jednoznačně posoudit, o kterou isoformu se jedná, jelikož tato protilátka rozpoznává jak cytosolickou CSD1, tak i chloroplastou CSD2 u *A. thaliana*.



Obrázek 16: Detekce abundance CSD proteinu u rostlin divokého typu *M. sativa* rostoucích na MS médium s různou koncentrací mědi pomocí imunoblotování se specifickou anti-CSD protilátkou. Proteinové extrakty byly připraveny ze semenáčků rostoucích na manuálně připraveném MS médium, které se lišilo v koncentraci mědi (0,01; 0,1; 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). A – Imunoblot se specifickou CSD protilátkou, doba expozice 5 s. B – Imunoblot se specifickou CSD protilátkou, doba expozice 43 s. C – Kontrola proteinové nanášky barvením membrány pomocí Ponceau S. Proteinová velikost pozorovaného pásu odpovídají Cu/ZnSOD je v přibližném rozmezí 25-15 kDa.

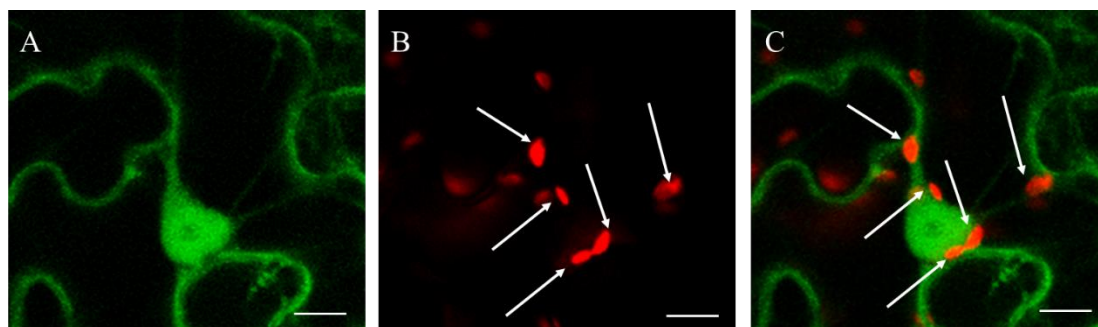
4.5 Mikroskopická analýza listů *Nicotiana benthamiana* transformovaných konstruktem *pCSD1-gCSD1::eGFP:3'UTR-CSD1*

Za účelem ověření funkčnosti dříve připraveného konstruktu *pCSD1-gCSD1::eGFP:3'UTR-CSD1* byla provedena mikroskopická analýza listů *N. benthamiana*, které byly tranzientně transformovány pomocí bakterie *A. tumefaciens* nesoucí daný konstrukt. Pro pozorování přítomnosti fluorescentního signálu, který odpovídá lokalizaci fúzního proteinu byla využita konfokální mikroskopie. Přítomnost signálu byla pozorována v jádře a cytoplazmě. Signál byl taktéž pozorován v blízkosti cytoplazmatické membrány (Obrázek 17). Detailní pozorování zachytilo signál rovněž v cytoplazmatických vláknech (Obrázek 17, označeno hrotem) a zároveň ukázalo pokles intenzity signálu v centrální části jádra (Obrázek 17, označeno šipkou), který odpovídá jadérku.



Obrázek 17: Mikroskopické pozorování tranzientně transformovaných listů *N. benthamiana* konstruktem *pCSD1-gCSD1::eGFP:3'UTR-CSD1*. Kanál pro eGFP byl pozorován 3 dny po transformaci a pro mikroskopické pozorování byla využita konfokální mikroskopie. Šipka označuje jádro, které je spjato se snížením intenzity signálu, které představuje jadérko. Hrot označuje přítomnost v cytoplazmatickém vláknu. Měřítko – 50 μm .

Kromě dříve pozorované subcelulární lokalizace signálu byla snaha potenciálně pozorovat signál eGFP v chloroplastech. Avšak výskyt v chloroplastech byl vyloučen absencí překryvu (Obrázek 18C) signálu eGFP (Obrázek 18A) a chlorofylu (Obrázek 18B), přičemž chloroplasty byly označeny šipkou (Obrázek 18B, C).



Obrázek 18: Mikroskopické pozorování překryvu signálů v jednotlivých kanálech u tranzientně transformovaných listů *N. benthamiana* konstruktem *pCSD1-gCSD1::eGFP:3'UTR-CSD1*. A – Transformovaná buňka listu *N. benthamiana*, kanál pro eGFP. B – Kanál pro chlorofyl. C – Překryv kanálu pro eGFP (A) a chlorofyl (B). Pro mikroskopické pozorování byla využita konfokální mikroskopie. Šipky označují chloroplasty. Měřítko – 5 μm .

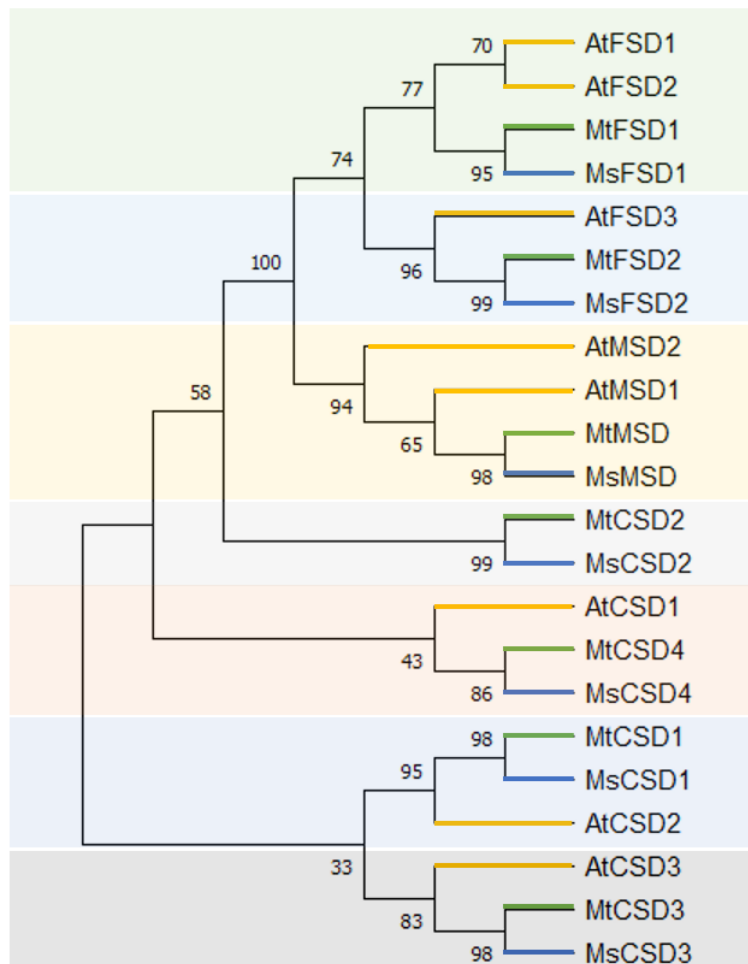
4.6 Bioinformatická analýza superoxidismutas u *M. sativa*

V současné době stále není v odborné literatuře definován jasný počet SOD, který je kódován genomem *M. sativa*, a to i přesto, že genom této rostliny byl již osekvenován (Shen *et al.*, 2020). Z tohoto důvodu byla provedena bioinformatická analýza za účelem definování SOD u *M. sativa*, na základě již známých sekvencí SOD u rodově příbuzné rostliny *M. truncatula*. Jako podklad pro tuto analýzu byly využity proteinové sekvence 7 SOD, které byly dříve definovány v odborné publikaci Song *et al.*, (2018). Zde byly identifikovány 4 CSD, 2 FSD a 1 MSD u modelové rostliny *M. truncatula*.

Webová databáze, známá jako alfafatoolbox, již v současné době obsahuje možnost prohledávání proteinových sekvencí *M. sativa* na základě sekvenční homologie. Díky této funkci byly identifikovány proteiny sdílející nejvyšší míru homologie na úrovni proteinové sekvence se sedmi SOD identifikovanými u *M. truncatula*. Následně byly tyto sekvence porovnány pomocí webového programu známého jako „Protein Blast“ (Příloha 1–7). Bylo zjištěno, že proteinové struktury odpovídající SOD z rostliny *M. sativa*, sdílí vysokou sekvenční homologii se SOD z *M. truncatula* a to konkrétně: CSD1 98,5% identitu při 100% pokrytí proteinové sekvence; CSD2 96,8% identitu při pokrytí 80% proteinové sekvence; CSD3 98,1% identitu při pokrytí 100% proteinové

sekvence; CSD4 98% identitu při 100% pokrytí proteinové sekvence; FSD1 94,5% identitu při 100% pokrytí proteinové sekvence; FSD2 96,9% identitu při pokrytí 100% proteinové sekvence; MSD 98,2% identitu při 99% pokrytí proteinové sekvence.

Následně byla provedena fylogenetická analýza proteinových sekvencí SOD u rostlin *A. thaliana*, *M. truncatula* a *M. sativa* s cílem identifikovat možné příbuzenské vztahy v rámci zjištěných společných větví (Obrázek 19). Na základě získaných výsledků můžeme uvažovat o přibližně stejných funkcích SOD u *M. sativa*, jako u rostliny *A. thaliana*, jelikož funkce těchto SOD je v literatuře nejlépe popsána. Všechny SOD z rostliny *M. sativa* byly přiřazeny do větve s pravděpodobně podobnou SOD z rostliny *A. thaliana*. Nicméně výjimku tvoří MtCSD2 společně s MsCSD2, které se zdají být vývojově unikátní (Obrázek 19).



Obrázek 19: Fylogenetická analýza proteinových sekvencí SOD rostlin *A. thaliana*, *M. truncatula* a *M. sativa*. Proteiny byly rozděleny do sedmi podskupin označených různými barvami, a to dle predikovaného příbuzenského vztahu k SOD z rostliny *A. thaliana*. Pro lepší orientaci byly finalní větvení označeny různými barvy pro dané čáry (*A. thaliana* – žlutá; *M. truncatula* – zelená; *M. sativa* – modrá).

V odborné literatuře je taktéž popsána specifická lokalizace každého isoenzymu SOD u rostliny *A. thaliana*. Za účelem potvrzení výsledků získaných fylogenetickou analýzou, kdy jsme rozřadily jednotlivé SOD do určitých podskupin s potencionální možností stejné funkce, byla provedena predikce lokalizace SOD u rostlin *M. truncatula* a *M. sativa*, ale i u rostliny *A. thaliana*, která sloužila jako pozitivní kontrola. Získané výsledky potvrzují predikci stejné lokalizace pro SOD, které se nachází v jednotlivé třídě rozdělené dle fylogenetické analýzy (Tabulka 3).

Tabulka 3: Predikce lokalizace SOD u rostlin *A. thaliana*, *M. truncatula* a *M. sativa*.

	Chloroplast	Mitochondrie	Peroxisom	Jádro	Cytosol	Extracelulární prostor
AtFSD1	-	-	-	1,5	-	-
AtFSD2	11	3	-	-	-	-
AtFSD3	12	-	-	-	1	-
AtCSD1	-	-	-	-	14	-
AtCSD2	13	-	-	-	-	-
AtCSD3	-	-	2	9	2	-
AtMSD1	3	10	-	-	-	-
AtMSD2	-	1	-	-	2	10
MtCSD1	12	-	-	1	-	-
MtCSD2	14	-	-	-	-	-
MtCSD3	-	-	-	1	12	-
MtCSD4	-	-	-	-	13	-
MtFSD1	10	1	-	2	-	-
MtFSD2	-	2	-	-	12	-
MtMSD	-	9,5	-	-	-	-
MsCSD1	13	-	-	-	-	-
MsCSD2	2	-	2	-	10	-
MsCSD3	-	-	-	-	13	-
MsCSD4	-	-	-	-	13	-
MsFSD1	12	-	-	1	-	-
MsFSD2	8	-	-	-	5	-
MsMSD	2	10	-	-	1	-

Výjimku tvoří CSD3 u *A. thaliana*, která dle fylogenetické analýzy odpovídá MtCS3 a MsCSD3, přičemž jejich lokalizace byla predikována do cytozolu, nikoli do peroxisomu. Zcela unikátní MtCSD2 a MsCSD2, které dle fylogenetické analýzy byly zařazeny do samostatné větve, disponují rozdílnou predikcí v rámci lokalizace. To může být taktéž spojeno s tím, že u těchto SOD byla zjištěna nejnižší míra pokrytí proteinové sekvence při porovnávání a to 80%. Tento rozdíl byl pozorován především na začátku

proteinové sekvence, kde se nachází signální peptid pro lokalizaci do chloroplastu (Příloha 2). To může mít pravděpodobně za následek rozdíl v predikování lokalizace.

5 DISKUSE

Rostliny, jakožto sesilní organismy, nemají možnost opustit stanovištně, ve kterém se právě nacházejí. V průběhu jejich vývoje dochází k nespočtu změn v jejich přímém okolí, které vytváří pro rostliny stresové podmínky, a na které musí vhodně reagovat a přizpůsobovat se. Z toho důvodu došlo u rostlin k vývoji signálních drah tak, aby na různé druhy stresu mohlo být odpovídáno jak co nejrychleji, tak co nejspecifičtěji (Sewelam *et al.*, 2016). Mezi úvodní stresové signalizační molekuly patří ROS, jejichž role v buněčné signalizaci není dodnes zcela objasněna a skrývá mnohé otázky (Waszczak *et al.*, 2018). Teprve relativně nedávno byl objeven první receptor, který je přímo aktivován při zvýšené produkci ROS, a to konkrétně H₂O₂ (Wu *et al.*, 2020). Z tohoto důvodu je i v současné době hojně zkoumána antioxidační obrana v popředí se SOD, jejichž výsledkem enzymatické aktivity je přeměna O₂[•] na zmíněný H₂O₂, který hraje zcela esenciální roli v buněčné signalizaci, jak již bylo nastíněno (Dvořák *et al.*, 2021b). Z tohoto důvodu se teoretická část této práce zabývala definováním základních charakteristik ROS, včetně signální a vývojové funkce, dále antioxidační obraně se zaměřením na SOD a jejich regulaci.

SOD jsou velmi dobře charakterizovány u modelové rostliny *A. thaliana*, u které jsou dostupné jak proteinové, tak genomové sekvence. Jedním ze základních parametrů, který významným způsobem ovlivňuje expresi *SOD* u této rostliny, je dostupnost mědi v růstovém médiu. Bylo prokázáno, že *SPL7* patří mezi hlavní regulátory homeostázy mědi u *A. thaliana* a zcela zásadním způsobem ovlivňuje výslednou abundanci/aktivitu *FSD1* a *CSD1/2* v odpovědi na dostupnost mědi (Yamasaki *et al.*, 2009). Tento druh regulace skrze *SPL7* byl popsán jen u rostlin *A. thaliana*, nicméně je velmi pravděpodobné, že tato regulace je zachována i u dalších rostlinných druhů, jelikož rodina *SPL* transkripčních faktorů je velmi konzervovaná mezi jednotlivými druhy rostlin (Chen *et al.*, 2010). Relativně nedávno se podařilo přečíst genom rostliny *M. sativa* L., který však stále není dostupný v porovnatelné kvalitě, jako je tomu například u modelových rostlin *A. thaliana* a *M. truncatula* (Hrbáčková *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2020). Doposud tedy nebylo v odborné literatuře definováno, jaké množství, a které druhy SOD se vyskytují u rostliny *M. sativa*. Na druhou stranu u modelové rostliny *M. truncatula*, která je blízkým příbuzným pro *M. sativa*, byla provedena poměrně detailní studie definující přítomný počet SOD a jejich přibližnou funkci (Song *et al.*, 2018).

Právě proto se tato práce zabývala definováním SOD u rostliny *M. sativa* pomocí bioinformatických přístupů a následnou biochemickou analýzou isoformů SOD u rostlin *A. thaliana* a *M. sativa* v souvislosti s jejich reakcí na různé kultivační podmínky, a to především v dostupnosti mědi. Pomocí bioinformatických porovnání proteinových sekvencí SOD z *M. truncatula* s dostupnou databází proteinových sekvencí *M. sativa* bylo definováno celkem 7 nezávislých SOD, které sdílely velmi vysokou sekvenční homologii s danými SOD z *M. truncatula*. Pomocí fylogenetického porovnání získaných sekvencí SOD z rostlin *A. thaliana*, *M. truncatula* a *M. sativa* se podařilo predikovat předpokládané vývojové větve jednotlivých SOD, a tím i predikovat jejich předpokládanou funkci v rámci známých informací o SOD z modelové rostliny *A. thaliana*. Jako pozitivní kontrola těchto výsledků může být brána publikace autorů Song *et al.*, (2018), kteří taktéž provedli fylogenetickou studii pro porovnání SOD z více druhů rostlin obsahující taktéž i porovnání *A. thaliana* a *M. truncatula*. Námi získané výsledky se shodují s těmito dříve publikovanými, což potvrzuje správnost provedené analýzy. V neposlední řadě byla provedena predikce lokalizace nově definovaných SOD u *M. sativa*, která podpořila předpokládané funkce těchto SOD nalezených ve stejných vývojových větvích skrze potvrzení stejných lokalizací se SOD u *A. thaliana*.

Experimentální část byla věnována především definování chování SOD na úrovni aktivity/abundance v odpovědi na dostupnost mědi, ale i fenotypovým projevům semenáčků rostlin *A. thaliana* a *M. sativa*. U rostliny *A. thaliana* byl taktéž studován dopad různých koncentrací a druhů zdroje dusíku na zmíněné parametry.

Pro první pozorovanou rostlinu, *A. thaliana*, obsahovala média různé koncentrace mědi a dále disponovala různými koncentracemi a zdroji dusíku (prostřednictvím NH_4NO_3 pro MS a ARA mod. média a $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ pro ARA médium). Rostliny divokého typu rostoucí na ARA médiu, vykazovaly fenotypové projevy v nadzemní části rostlin, a to při všech koncentracích mědi. Konkrétně byly zaznamenány podstatně menší listové růžice. Tento fenotypový projev se zdá být závislý na druhu použitého zdroje dusíku, jelikož rostliny rostoucí na ostatních typech médií tento fenotyp nevykazovaly. Dá se tedy říci, že zdroj dusíku $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ bez přidání amonných solí není zcela vhodný pro vývoj nadzemní části rostliny *A. thaliana* (Ueda *et al.*, 2017). Na druhou stranu standardní MS médium, které je hojně využíváno pro standardní růst rostlin, vykazovalo nižší počet laterálních kořenů a celkový vývoj kořenové soustavy v porovnání s ARA a ARA mod. médii, a to při všech variantách koncentrace mědi.

Nicméně tento fenotyp byl očekávaný, jelikož ARA médium a jeho upravená verze, se používá především k cílené mikroskopické analýze kořenového systému a za tímto účelem je taktéž upraveno jeho složení (Ovečka *et al.*, 2014). Ze získaných výsledků je ovšem možno konstatovat, že změna zdroje dusíku nemá vliv na vývoj kořenové soustavy, ale má zcela zásadní vliv na velikost růžice. Sledované koncentrace mědi (0,01; 0,1; 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) nevedly ke změnám fenotypového projevu u všech zkoumaných médií, jelikož tyto koncentrace jsou považovány za fyziologické pro rostlinu *A. thaliana* (Lequeux *et al.*, 2010).

Následovná biochemická analýza extraktů divokého typu *A. thaliana* potvrdila správnost připravených médií, a to jak na úrovni aktivit SOD, tak i na úrovni abundance. Z výsledku byl patrný gradientní vliv mědi v médiu na úrovni aktivit a abundance FSD1 a CSD1/CSD2 enzymů, jejichž exprese je regulována skrze dříve popsany transkripční faktor SPL7. Nicméně zajímavým zjištěním bylo, že taktéž druh a koncentrace dostupného dusíku ovlivňují tento vztah výměny FSD1 za CSD1/2 při zvyšující se nebo snižující se koncentraci mědi. Největší poklesy úrovně abundance/aktivity FSD1 při snižující se koncentraci mědi byly pozorovány u ARA média, které obsahuje jako zdroj dusíku $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ v koncentraci 0,002 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Mírnější pokles abundance/aktivity FSD1 byl pozorován pro ARA mod. médium obsahující 0,006 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NH_4NO_3 . Nutné podotknout, že obě tato média obsahují ve stejné koncentraci KNO_3 jako zdroj dusíku. Naopak MS médium obsahuje 3,8x vyšší koncentraci KNO_3 a 3,2x vyšší koncentrace NH_4NO_3 . Toto médium vykazovalo nejmenší pokles v abundanci/aktivitě FSD1 při stoupající koncentraci mědi a jeho přítomnost byla dokonce detekována i při nejvyšší koncentraci mědi v médiu (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), což u zbylých dvou médií nebylo zaznamenáno. Tyto výsledky jednoznačně podporují tvrzení, že nejen množství, ale i zdroj dusíku je dalším parametrem ovlivňujícím abundanci/aktivitu SOD. Toto tvrzení bylo již i experimentálně potvrzeno. Množství dostupného dusíku přímo ovlivňuje chování SPL7 transkripčního faktoru, což vede k ovlivňování poměru exprese *FSD1* a *CSD1/CSD2*, a to i nezávisle na úrovni koncentrace mědi v médiu (Mermoud *et al.*, 2019).

Získané výsledky z rostliny *A. thaliana* napomohly optimalizaci přípravy manuálně připravených médií. Především napomohly ověření správnosti přípravy za účelem studia vlivu mědi na abundanci/expresi SOD. Pro následné studium této regulace u rostliny *M. sativa* bylo vybráno MS médium, a to z několika důvodů. Na oddělení

katedry Biotechnologií je toto médium hojně využíváno při metodách somatické embryogeneze a následného růstu regenerantů, kdy již víme, že na tomto médiu rostliny *M. sativa* velmi dobře prospívají. Nadále získané biochemické výsledky potvrdily změnu aktivity SOD v závislosti na koncentraci mědi v růstovém MS médiu a jsou tedy vhodné pro další studium SOD v *M. sativa*. Pozorovaný fenotypový projev na rostlině *A. thaliana*, tedy snížený vývoj kořenové soustavy, nepředstavoval výrazný problém pro využití tohoto média pro další studie. Fenotypová analýza divokého typu *M. sativa* byla bohužel výrazně ovlivněna velmi nízkou klíčivostí, což bylo zapříčiněno velmi silnou testou u semen. Z tohoto důvodu byla využita metoda skarifikace, která výrazně zvedla účinnost klíčení, nicméně zabránila objektivnímu hodnocení fenotypových projevů. Avšak je pravděpodobné, že nízká koncentrace mědi ($0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) vede ke snížené velikosti listové plochy, což může být následek nedostatku tohoto esenciálního prvku.

Následná biochemická analýza odhalila, že i u rostliny *M. sativa* je zachována regulace aktivity SOD v odpovědi na dostupnost mědi v růstovém médiu. Nicméně tato regulace skrze SPL7 je pravděpodobně zachována jenom pro Cu/ZnSOD isoformy (a to pravděpodobně pro všechny čtyři identifikované isoformy), jelikož nebyl pozorován trend změny na úrovni aktivity a ani abundance pro FeSOD. U rostliny *M. sativa* tedy pravděpodobně mohlo dojít k evoluční změně regulace *FeSOD* isoform, konkrétně ke ztrátě schopnosti SPL7 se vázat do promotorové sekvence *FeSOD*. U rostliny *A. thaliana* obsahuje promotorová sekvence *FSD1* celkem šest motivů GTAC, které jsou zodpovědné za vazbu SPL7 a spuštění exprese *FSD1* genu (Andrés-Colás *et al.*, 2013). V budoucnu by měla být provedena bioinformatická analýza promotorových sekvencí FeSOD u *M. sativa* za účelem ověření této teorie.

Závěrečná část práce se věnovala ověření funkčnosti dříve připraveného *pCSD1-gCSD1::eGFP:3'UTR-CSD1* konstruktů, který kóduje CSD1 protein fúzovaný s GFP pod kontrolou nativního promotoru. Pomocí transientní transformace listů *N. benthamiana*, a následné mikroskopické analýzy, byla ověřena funkčnost a nastíněna první možná subcelulární lokalizace tohoto proteinu. Stejně jako v případě FSD1-GFP byl tento protein lokalizován v jádře a v cytoplasmě (Dvořák *et al.*, 2021a), což by mohlo nastiňovat případné podobné funkce těchto proteinů v daných částech buňky. Nicméně pro přesnou lokalizaci tohoto proteinu bude nezbytné stabilně transformovat *csdl* a následně opět provést detailní mikroskopickou analýzu, která by ověřila námi získané výsledky z transientní transformace.

6 ZÁVĚR

První, teoretická část bakalářské práce byla zaměřena na vypracování literární rešerše na téma ROS (hlavní zástupci, jejich vznik a signální a vývojová role ROS), antioxidační obrana (SOD a její isoformy) a SPL (konkrétně SPL7) se zaměřením se na rostliny *A. thaliana* a *M. sativa*.

Druhá, experimentální část, byla věnována bioinformatické analýze, která byla provedena za účelem definování SOD u rostliny *M. sativa* a predikce lokalizace a funkce jednotlivých isoform SOD. Pro ověření vlivu mědi (*A. thaliana*, *M. sativa*) a dusíku (*A. thaliana*) na raný vývoj rostlin byla zhotovena fenotypová analýza, která odhalila, že především různé zdroje a koncentrace dusíku mají zásadní vliv na listovou růžici a kořenový systém u rostliny *A. thaliana*. Pro ověření regulace isoform SOD byla rovněž provedena biochemická analýza zahrnující enzymatickou analýzu získaných nativních extraktů z rostlin rostoucích na různé koncentraci mědi pomocí nativní-PAGE a imunoblotování se specifickými protilátkami. Výsledky potvrdily přítomnost regulace SOD skrze SPL7 v odpovědi na různé koncentrace mědi v médiu u rostliny *A. thaliana* (Yamasaki *et al.*, 2009). U rostliny *M. sativa* byl taktéž potvrzen vliv dostupnosti mědi na přítomnost abundance/aktivity SOD, nicméně tato závislost byla pozorována pouze pro Cu/ZnSOD, nikoliv však pro FeSOD tak, jak je tomu u *A. thaliana*. Tyto výsledky naznačují, že došlo k evolučně změněné regulaci exprese *FeSOD* u rostliny *M. sativa* v odpovědi na nedostatek mědi v médiu řízené skrze SPL7 transkripční faktor.

Také byl použit konstrukt *pCSD1-gCSD1::eGFP:3'UTR-CSD1* pro tranzientní transformaci listů *N. benthamiana* za účelem ověření jeho funkčnosti a určení jeho primární domnělé subcelulární lokalizace. Výsledky ukázaly výskyt fúzního proteinu v jádře, v cytoplazmě, v blízkosti cytoplazmatické membrány a v cytoplazmatických vláknech.

7 LITERATURA

- Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T. (2005): Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant Cell*, 17: 1233–1251. doi: 10.1105/tpc.104.030452.
- Abdel-Ghany SE, Pilon M. (2008): MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 15932–15945. doi: 10.1074/jbc.M801406200.
- Abercrombie J.M, Halfhill M.D, Ranjan P, Rao M.R, Saxton A.M, Yuan J.S, Stewart C.N.Jr. (2008): Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress. *BMC Plant Biology*, 8: 87. doi: 10.1186/1471-2229-8-87.
- Alfalfatoolbox. <https://www.alfalfatoolbox.org/> (13. 5. 2022)
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1331–1341.
- Andrés-Colás N, Perea-García A, Mayo de Andrés S, Garcia-Molina A, Dorcey E, Rodríguez-Navarro S, Pérez-Amador M. A, Puig S, Peñarrubia L. (2013). Comparison of global responses to mild deficiency and excess copper levels in *Arabidopsis* seedlings. *Metallomics: integrated biometal science*, 5(9): 1234–1246. doi: 10.1039/c3mt00025g.
- Apel K, Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373–399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.
- Apostol I, Heinstejn P.F, Low P.S. (1989): Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells: Role in Defense and Signal Transduction. *Plant Physiology*, 90: 109-116. doi: 10.1104/pp.90.1.109.
- Araki R, Mermoud M, Yamasaki H, Kamiya T, Fujiwara T, Shikanai T. (2018): SPL7 locally regulates copper-homeostasis-related genes in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 224–225: 137–143. doi: 10.1016/j.jplph.2018.03.014.
- Asada K. (2006): Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141: 391–396. doi: 10.1104/pp.106.082040.
- Banks C. J, Andersen J. L. (2019). Mechanisms of SOD1 regulation by posttranslational modifications. *Redox biology*, 26: 101270. doi: 10.1016/j.redox.2019.101270.
- Bartoli CG, Casalongué CA, Simontacchi M, et al. (2013): Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany*, 94: 73–88.
- Bellegarde F, Maghiaoui A, Boucherez J, Krouk G, Lejay L, Bach L, Gojon A, Martin A. (2019): The Chromatin Factor HNI9 and ELONGATED HYPOCOTYL 5 Maintain ROS Homeostasis under High Nitrogen Provision. *Plant physiology*, 180(1): 582–592. doi: 10.1104/pp.18.01473.
- Bienert G.P, Schjoerring J.K, Jahn T.P. (2006): Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 994–1003. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.02.015.
- Birkenbihl RP, Jach G, Saedler H, Huijser P. (2005): Functional dissection of the plant-specific SBPdomain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *Journal of Molecular Biology*, 352: 585–596. doi: 10.1016/j.jmb.2005.07.013.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K.V. (2003): Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91: 179-194. doi: 10.1093/aob/mcf118.
- Bora K. S, Sharma A. (2011). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review. *Pharmaceutical biology*, 49: 211–220. doi: 10.3109/13880209.2010.504732.
- Burkhead J. L, Reynolds K. A, Abdel-Ghany S. E, Cohu C. M, Pilon M. (2009). Copper homeostasis. *The New Phytologist*, 182: 799–816. doi: doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02846.x.
- Cárdenas L, McKenna ST, Kunkel JG, Hepler PK. (2006): NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth. *Plant physiology*, 142: 1460–1468. doi: 10.1104/pp.106.087882.

- Cardon G, Höhmann S, Klein J, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P. (1999): Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. *Gene*, 237: 91–104. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00308-x.
- Castro B, Citterico M, Kimura S, Stevens DM, Wrzaczek M, Coaker G. (2021): Stress-induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling. *Nature Plants*, 7(4): 403–412. doi: 10.1038/s41477-021-00887-0.
- Cohu CM, Abdel-Ghany SE, Gogolin Reynolds KA, Onofrio AM, Bodecker JR, Kimbrel JA, Niyogi KK, Pilon M. (2009): Copper delivery by the copper chaperone for chloroplast and cytosolic copper/zinc-superoxide dismutases: regulation and unexpected phenotypes in an Arabidopsis mutant. *Molecular Plant*, 2: 1336–1350. doi: 10.1093/mp/ssp084.
- Conklin PL, Williams EH, Last RL. (1996): Environmental stress sensitivity of an ascorbic aciddeficient Arabidopsis mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 9970–9974. doi: 10.1073/pnas.93.18.9970.
- Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Wellburn F, Baker N, Wellburn A, Mullineaux P. (1999): Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *The Plant Cell*, 11: 1277–1292. doi: 10.1105/tpc.11.7.1277.
- Cui F, Brosché M, Shapiguzov A, He X-Q, Vainonena J.P, Leppälä J, Trotta A, Kangasjärvi S, Salojärvi J, Kangasjärvi J, Overmyer K. (2019): Interaction of methyl viologen-induced chloroplast and mitochondrial signalling in Arabidopsis. *Free Radical Biology and Medicine*, 134: 555-566. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.006.
- del Río, L. A., López-Huertas, E. (2016). ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling. *Cell Physiology*, 57, 1364–1376. doi: 10.1093/pcp/pcw076.
- Denness L, McKenna J.F, Segonzac C, Wormit A, Madhou P, Bennett M, Mansfield J, Zipfel C, Hamann T. (2011): Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species-and jasmonic acid-dependent process in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 156: 1364-1374. doi: 10.1104/pp.111.175737.
- Drazkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z. (2004). Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in Arabidopsis thaliana. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 17(4): 379–387. doi: 10.1023/b:biom.0000029417.18154.22.
- Dreyer BH, Schippers JHM. (2019): Copper-Zinc Superoxide Dismutases in Plants: Evolution, Enzymatic Properties, and Beyond. *Annual Plant Reviews Online*, 1–36.
- Dugas DV, Bartel B. (2008): Sucrose induction of Arabidopsis miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant molecular biology*, 67: 403–417. doi: 10.1007/s11103-008-9329-1.
- Duke M.V, Salin M.L. (1985): Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, Ginkgo biloba. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 243: 305-314. doi: 10.1016/0003-9861(85)90800-8.
- Dvořák P, Krasylenko Y, Ovečka M, Basheer J, Zapletalová V, Šamaj J, Takáč T. (2021a): In vivo light-sheet microscopy resolves localisation patterns of FSD1, a superoxide dismutase with function in root development and osmoprotection. *Plant Cell Environ*, 44: 68–87. doi: 10.1111/pce.13894.
- Dvořák P, Krasylenko Y, Zeiner A, Šamaj J, Takáč T. (2021b): Signaling Toward Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11: 618835. doi: 10.3389/fpls.2020.618835.
- El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C. (2008): Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant signaling and behavior*, 3: 175–182. doi: 10.4161/psb.3.3.5539.
- Feng K, Yu J, Cheng Y, Ruan M, Wang R, Ye Q, Zhou G, Li Z, Yao Z, Yang Y, et al. (2016). The SOD Gene Family in Tomato: Identification, Phylogenetic Relationships, and Expression Patterns. *Frontiers in plant science*, 7: 1279. doi: 10.3389/fpls.2016.01279.
- Fichman Y, Mittler R. (2020): Rapid systemic signaling during abiotic and biotic stresses: is the ROS wave master of all trades? *The Plant Journal*, 102: 887–896. doi: 10.1111/tj.14685.

- Filiz E, Ozyigit I.I, Saracoglu I.A, Uras M.E, Sen U, Yalcin B. (2019): Abiotic stress-induced regulation of antioxidant genes in different Arabidopsis ecotypes: microarray data evaluation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33: 128-143.
- Forman H.J, Fridovich I. (1973): On the stability of bovine superoxide dismutase. The effects of metals. *The Journal of Biological Chemistry*, 248: 2645–2649.
- Foyer CH, Noctor G. (2009): Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and redox signaling*, 11: 861–905. doi: 10.1089/ars.2008.2177.
- Foyer CH, Noctor G. (2013): Redox signaling in plants. *Antioxidants and redox signaling*, 18(16): 2087–90. doi: 10.1089/ars.2013.5278.
- Fridovich I. (1995): Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 97–112. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525.
- Gallie D.R, Chen Z. (2019): Chloroplast-localized iron superoxide dismutases FSD2 and FSD3 are functionally distinct in Arabidopsis. *PloS One*, 14: e0220078. doi: 10.1371/journal.pone.0220078.
- Garcia-Molina A, Xing S, Huijser P. (2014): Functional characterisation of Arabidopsis SPL7 conserved protein domains suggests novel regulatory mechanisms in the Cu deficiency response. *BMC Plant Biology*, 14: 231. doi: 10.1186/s12870-014-0231-5.
- German MA, Pillay M, Jeong DH, Hetawal A, Luo S, Janardhanan P, Kannan V, Rymarquis LA, Nobuta K, German R, et al. (2008): Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nature biotechnology*, 26: 941–946. doi: 10.1038/nbt1417.
- Gill S. S, Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 48(12): 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- Gilroy S, Suzuki N, Miller G, Choi W. G, Toyota M, Devireddy A. R, Mittler R. (2014). A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in plant science*, 19(10): 623–630. doi: 10.1016/j.tplants.2014.06.013.
- Guan Q, Wu J, Zhang Y, Jiang C, Liu R, Chai C, Zhu J. (2013). A DEAD box RNA helicase is critical for pre-mRNA splicing, cold-responsive gene regulation, and cold tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25: 342–356. doi: 10.1105/tpc.112.108340.
- Guo AY, Zhu QH, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J. (2008): Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene*, 418: 1–8. doi: 10.1016/j.gene.2008.03.016.
- Halliwell B, Gutteridge J.M.C. (2015): Free Radicals in Biology and Medicine. 5th ed., Oxford University Press, Oxford, New York, USA, 944 stran.
- Halliwell B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2): 312–322. doi: 10.1104/pp.106.077073.
- Holzmeister C, Gaupels F, Geerlof A, Sarioglu H, Sattler M, Durner J, Lindermayr C. (2015). Differential inhibition of Arabidopsis superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Journal of experimental botany*, 66: 989–999. doi: 10.1093/jxb/eru458.
- Hrbáčková M, Dvořák P, Takáč T, Tichá M, Luptovčíak I, Šamajová O, Ovečka M, Šamaj J. (2020). Biotechnological Perspectives of Omics and Genetic Engineering Methods in Alfalfa. *Frontiers in plant science*, 11: 592. doi: 10.3389/fpls.2020.00592.
- Huang C-H, Kuo W-Y, Weiss C, Jinn T-L. (2012): Copper Chaperone-Dependent and –Independent Activation of Three Copper-Zinc Superoxide Dismutase Homologs Localized in Different Cellular Compartments in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 158: 737–746. doi: 10.1104/pp.111.190223.
- Huang H, Ullah F, Zhou DX, Yi M, Zhao Y. (2019): Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Frontiers in Plant Science*, 10: 800. doi: 10.3389/fpls.2019.00800.
- Huang S, Van Aken O, Schwarzländer M, Belt K, Millar A. H. (2016). The Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cellular Signaling and Stress Response in Plants. *Plant physiology*, 171(3): 1551–1559. doi: 10.1104/pp.16.00166.

- Chan K. X, Phua S. Y, Crisp P, McQuinn R, Pogson B. J. (2016). Learning the languages of the chloroplast: retrograde signaling and beyond. *Annu. Rev. Plant Biology*, 67: 25–53. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111854.
- Chao LM, Liu YQ, Chen DY, Xue XY, Mao YB, Chen XY. (2017): Arabidopsis Transcription Factors SPL1 and SPL12 Confer Plant Thermotolerance at Reproductive Stage. *Molecular plant*, 10: 735–748. doi: 10.1016/j.molp.2017.03.010.
- Chen H, Lee J, Lee J. M, Han M, Emonet A, Lee J, Jia X, Lee Y. (2022). MSD2, an apoplastic Mn-SOD, contributes to root skotomorphogenic growth by modulating ROS distribution in Arabidopsis. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 317: 111192. doi: 10.1016/j.plantsci.2022.111192.
- Chen HJ, Wu SD, Huang GJ, Shen CY, Afiyanti M, Li WJ, Lin YH. (2012): Expression of a cloned sweet potato catalase SPCAT1 alleviates ethephon mediated leaf senescence and H₂O₂ elevation. *Journal of Plant Physiology*, 169: 86–97. doi: 10.1016/j.jplph.2011.08.002.
- Chen Q, Yang G. (2020): Signal Function Studies of ROS, Especially RBOH-Dependent ROS, in Plant Growth, Development and Environmental Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39: 157–171.
- Chen X, Zhang Z, Liu D, Zhang K, Li A, Mao L. (2010): SQUAMOSA promoter-binding proteinlike transcription factors: star players for plant growth and development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52: 946–951. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00987.x.
- Ivanov B.N, Borisova-Mubarakshina M.M, Kozuleva M. A. (2018): Formation mechanisms of superoxide radical and hydrogen peroxide in chloroplasts, and factors determining the signalling by hydrogen peroxide. *Functional Plant Biology*, 45: 102-110. doi: 10.1071/FP16322.
- Janků M, Luhová L, Petřivalský M. (2019): On the Origin and Fate of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Compartments. *Antioxidants*, 8: 105. doi: 10.3390/antiox8040105.
- Ježek P, Hlavatá L. (2005): Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37: 2478–2503. doi: 10.1016/j.biocel.2005.05.013.
- Jorgensen SA, Preston JC. (2014): Differential SPL gene expression patterns reveal candidate genes underlying flowering time and architectural differences in *Mimulus* and Arabidopsis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 73: 129–139. doi: 10.1016/j.ympev.2014.01.029.
- Jung S. (2004): Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of Arabidopsis thaliana subjected to drought. *Plant Science*, 166, 459-466.
- Kadota Y, Shirasu K, Zipfel C. (2015). Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant and cell physiology*, 56(8): 1472–1480. doi: 10.1093/pcp/pcv063.
- Karuppanapandian T, Moon J. Ch, Kim Ch, Manoharan K, Kim W. (2011): Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5: 709-725.
- Kim E.J, Kim H.P, Hah Y. C, Roe J.H. (1996): Differential Expression of Superoxide Dismutases Containing Ni and Fe/Zn in Streptomyces Coelicolor. *European Journal of Biochemistry*, 241: 178–185. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0178t.x.
- Kimura S, Kaya H, Kawarazaki T, Hiraoka G, Senzaki E, Michikawa M, Kuchitsu K. (2012): Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of Arabidopsis NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823: 398-405. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.09.011.
- Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, Christopher W, Sjölander K, Grussem W, Baginsky S. (2004): The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current Biology*, 14: 354-362. doi: 10.1016/j.cub.2004.02.039.
- Kliebenstein D.J, Dietrich R.A, Martin A.C, Last R.L, Dangl J.L. (1999): LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12: 1022-1026. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.11.1022.

- Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL. (1998): Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology*, 118: 637–650. doi: 10.1104/pp.118.2.637.
- Kollist H, Zandalinas S. I, Sengupta S, Nuhkat M, Kangasjärvi J, Mittler R. (2019). Rapid Responses to Abiotic Stress: Priming the Landscape for the Signal Transduction Network. *Trends Plant Science*, 24: 25–37. doi: 10.1016/j.tplants.2018.10.003.
- Kozuleva M.A, Ivanov B.N. (2010): Evaluation of the participation of ferredoxin in oxygen reduction in the photosynthetic electron transport chain of isolated pea thylakoids. *Photosynthesis Research*, 105: 51–61. doi: 10.1007/s11120-010-9565-5.
- Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depège N, Huijser P, Merchant S. (2005): A regulator of nutritional copper signaling in Chlamydomonas is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 18730–18735. doi: 10.1073/pnas.0507693102.
- Kuběnová L, Tichá M, Šamaj J, Ovečka M. (2022) ROOT HAIR DEFECTIVE 2 vesicular delivery to the apical plasma membrane domain during Arabidopsis root hair development. *Plant Physiology*, 188: 1563-1585. doi: 10.1093/plphys/kiab595.
- Kumar T, Bao A. K, Bao Z, Wang F, Gao L, Wang S. M. (2018). The progress of genetic improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Czech. J. Genet. Plant Breed*, 54: 41–51.
- Kuo WY, Huang CH, Liu AC, Cheng CP, Li SH, Chang WC, Weiss C, Azem A, Jinn TL. (2013): CHAPERONIN 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in Arabidopsis chloroplasts. *The New Phytologist*, 197: 99–110. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04369.x.
- Kurusu T, Kuchitsu K, Tada Y. (2015): Plant signaling networks involving Ca (2+) and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, 6: 427. doi: 10.3389/fpls.2015.00427.
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N. (2010): Response to copper excess in Arabidopsis thaliana: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(8): 673–82. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.05.005.
- Letunic I, Bork P. (2018): 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic acids research*, 46: D493–D496. doi: 10.1093/nar/gkx922.
- Liu Q, Harberd NP, Fu X. (2016): SQUAMOSA Promoter Binding Protein-like Transcription Factors: Targets for Improving Cereal Grain Yield. *Molecular Plant*, 9(6): 765–767. doi: 10.1016/j.molp.2016.04.008.
- Locato V, Cimini S, Gara L. D. (2013). Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspective to food biofortification. *Frontiers in plant science*, 4: 152. doi: 10.3389/fpls.2013.00152.
- López-Huertas E, Corpas F. J, Sandalio L. M, del Río L. A. (1999). Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *The Biochemical journal*, 337: 531–536.
- Lopez-Huertas E, Charlton W.L, Johnson B, Graham I.A, Baker A. (2000): Stress induces peroxisome biogenesis genes. *The EMBO Journal*, 19: 6770–6777. doi: 10.1093/emboj/19.24.6770.
- Mangano S, Denita-Juarez S.P, Choi H.S, Marzol E, Hwang Y, Ranocha P, Velasquez S.M, Borassi C, Barberini M.L, Aptekmann A.A, et al. (2017): Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114: 5289-5294. doi: 10.1073/pnas.1701536114.
- Martin MV, Fiol DF, Sundaresan V, Zabaleta EJ, Pagnussat GC. (2013): oiwa, a female gametophytic mutant impaired in a mitochondrial manganese-superoxide dismutase, reveals crucial roles for reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25: 1573–1591. doi: 10.1105/tpc.113.109306.

- McCord J.M, Fridovich I. (1969): Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049-6055.
- McKersie B. D, Bowley S. R, Harjanto E, Leprince O. (1996). Water-Deficit Tolerance and Field Performance of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase. *Plant physiology*, 111(4): 1177–1181. doi: 10.1104/pp.111.4.1177.
- McKersie B. D, Murnaghan J, Jones K. S, Bowley S. R. (2000). Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant physiology*, 122(4): 1427–1437. doi: 10.1104/pp.122.4.1427.
- McKersie BD, Bowley SR, Jones KS. (1999). Zimní přežití transgenní vojtěšky nadměrně exprimující superoxidodismutázu. *Plant Physiology*, 119(3): 839-848. doi: 10.1104/pp.119.3.839.
- McKersie BD, Murnaghan J, Bowley. (1997). SR Manipulační mrazuvzdornost u transgenních rostlin. *Acta Physiol Plant*, 19: 485-495.
- Mehler A.H. (1951): Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 33: 65-77. doi: 10.1016/0003-9861(51)90082-3.
- Melicher P, Dvořák P, Krasylenko Y, Shapiguzov A, Kangasjärvi J, Šamaj J, Takáč T. (2022). Arabidopsis Iron Superoxide Dismutase FSD1 Protects Against Methyl Viologen-Induced Oxidative Stress in a Copper-Dependent Manner. *Frontiers in plant science*, 13: 823561. doi: 10.3389/fpls.2022.823561.
- Mermoud M, Takusagawa M, Kurata T, Kamiya T, Fujiwara T, Shikanai T. (2019): SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 mediates copper deficiency response in the presence of high nitrogen in Arabidopsis thaliana. *Plant cell reports*, 38: 835–846. doi: 10.1007/s00299-019-02422-0.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G. (2010): Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61: 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282.
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R. (2009): The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, 2(84): ra45. doi: 10.1126/scisignal.2000448.
- Mittler R, Blumwald E. (2015). The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *Plant Cell*, 27: 64–70. doi: doi.org/10.1105/tpc.114.133090.
- Mittler R. (2017): ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22: 11–19. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002.
- Molina-Rueda J. J, Tsai C. J, Kirby E. G. (2013). The Populus superoxide dismutase gene family and its responses to drought stress in transgenic poplar overexpressing a pine cytosolic glutamine synthetase (GS1a). *PloS one*, 8(2): e56421. doi: 10.1371/journal.pone.0056421.
- Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S. (2009): Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in Arabidopsis roots. *The Plant Cell*, 21(8): 2341–56. doi: 10.1105/tpc.109.068395.
- Morgan MJ, Lehmann M, Schwarzländer M, Baxter CJ, Sienkiewicz-Porzucek A, Williams TC, Schauer N, Fernie AR, Fricker MD, Ratcliffe RG, et al. (2008): Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant physiology*, 147: 101–114. doi: 10.1104/pp.107.113613.
- Müller K, Carstens A.C, Linkies A, Torres M.A, Leubner-Metzger G. (2009): The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in Arabidopsis seed after-ripening. *New Phytologist*, 184: 885–897. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03005.x.
- Myouga F, Hosoda C, Umezawa T, Iizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, Shinozaki K. (2008): A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20: 3148–3162. doi: 10.1105/tpc.108.061341.

- Nadarajah K. K. (2020). ROS Homeostasis in Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International journal of molecular sciences*, 21(15): 5208. doi: 10.3390/ijms21155208.
- Nath K, Kumar S, Poudyal RS, Yang YN, Timilsina R, Park YS, Nath J, Chauhan PS, Pant B, Lee C-H. (2014) Developmental stage-dependent differential gene expression of superoxide dismutase isoenzymes and their localization and physical interaction network in rice (*Oryza sativa* L.). *Genes Genom*, 36: 45–55.
- Noctor G, Reichheld J. P, Foyer C. H. (2017). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in cell and developmental biology*, 80: 3–12.
- Noctor G, Reichheld JP, Foyer CH. (2018): ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80: 3–12. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013.
- Orman-Ligeza B, Parizot B, de Rycke R, Fernandez A, Himschoot E, Van Breusegem F, Bennett M.J, Périlleux C, Beeckman T, Draye X. (2016): RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in Arabidopsis. *Development*, 143: 3328–3339. doi: 10.1242/dev.136465.
- Ovečka M, Lichtscheidl I, Šamaj J. (2014). Live microscopy analysis of endosomes and vesicles in tip-growing root hairs. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1209: 31–44. doi: 10.1007/978-1-4939-1420-3_3.
- Pilon M, Ravet K, Tapken W. (2011): The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807: 989–998. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.11.002.
- Pilon M. (2017): The copper microRNAs. *New Phytologist*, 213: 1030–1035. doi: 10.1111/nph.14244.
- Preston JC, Hileman LC. (2013): Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. *Frontiers in Plant Science*, 4: 80. doi: 10.3389/fpls.2013.00080.
- Protein blast. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> (13. 5. 2022)
- Qi J, Wang J, Gong Z, Zhou JM. (2017): Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 38: 92–100. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.022.
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R. (2003): The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40): 38921–38925. doi: 10.1074/jbc.M304987200.
- Roach T, Krieger-Liszkay A. (2014): Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. *Current Protein and Peptide Science*, 15: 351–362. doi: 10.2174/1389203715666140327105143.
- Sagi M, Fluhr R. (2006): Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant physiology*, 141: 336–340. doi: 10.1104/pp.106.078089.
- Saini P, Bhatia S, Mahajan M, Kaushik A, Sahu SK, Kumar A, Satbhai SB, Patel MK, Saxena S, Chaurasia OP, Lingwan M, et al. (2020): ELONGATED HYPOCOTYL5 negatively regulates DECREASE WAX BIOSYNTHESIS to increase survival during UV-B stress. *Plant physiology*, 184: 2091–2106. doi: 10.1104/pp.20.01304.
- Samis K, Bowley S, McKersie B. (2002). Pyramiding Mn-superoxide dismutase transgenes to improve persistence and biomass production in alfalfa. *Journal of experimental botany*, 53: 1343–1350.
- Sawada Y, Oyama T, Yamazaki I. (1972): Preparation and physicochemical properties of green pea superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 268: 305–312. doi: 10.1016/0005-2744(72)90325-7.
- Sevilla F, López-Gorgé J, Gómez M, del Río L.A. (1980): Manganese superoxide dismutase from a higher plant: Purification of a new Mn-containing enzyme. *Planta*, 150: 153–157. doi: 10.1007/BF00582359.
- Sewelam N, Kazan K, Schenk P. M. (2016). Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. *Frontiers in plant science*, 7: 187. doi: 10.3389/fpls.2016.00187.

- Shen C, Du H, Chen Z, Lu H, Zhu F, Chen H, Meng X, Liu Q, Liu P, Zheng L, et al. (2020). The Chromosome-Level Genome Sequence of the Autotetraploid Alfalfa and Resequencing of Core Germplasms Provide Genomic Resources for Alfalfa Research. *Molecular plant*, 13(9): 1250–1261. doi: 10.1016/j.molp.2020.07.003.
- Schieber M, Chandel NS. (2014): ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24: R453–R462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
- Si L, Chen J, Huang X, Gong H, Luo J, Hou Q, Zhou T, Lu T, Zhu J, Shangguan Y, Chen E, et al. (2016): OsSPL13 controls grain size in cultivated rice. *Nature Genetics*, 48(4): 447–456. doi: 10.1038/ng.3518.
- Singh R, Singh S, Parihar P, Mishra RK, Tripathi DK, Singh VP, Chauhan DK, Prasad SM. (2016): Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants' Developmental Processes. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1299. doi: 10.3389/fpls.2016.01299.
- Skovsen E, Snyder JW, Lambert JD, Ogilby PR. (2005): Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109: 8570–8573. doi: 10.1021/jp051163i.
- Smékalová V, Doskočilová A, Komis G, Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances*, 32: 2–11. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.07.009.
- Smirnoff N, Arnaud D. (2019): Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221: 1197–1214.
- Song J, Mo X, Yang H, Yue L, Song J, Mo B. (2017). The U-box family genes in *Medicago truncatula*: Key elements in response to salt, cold, and drought stresses. *PloS one*, 12(8): e0182402. doi: 10.1371/journal.pone.0182402.
- Song J, Zeng L, Chen R, Wang Y, Zhou Y. (2018). In silico identification and expression analysis of superoxide dismutase (SOD) gene family in *Medicago truncatula*. *3 Biotech*, 8(8): 348.
- Suzuki N, Miller G, Salazar C, Mondal H. A, Shulaev E, Cortes D. F, et al. (2013). Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. *Plant Cell*, 25: 3553–3569. doi: 10.1105/tpc.113.114595.
- TAIR. <https://www.arabidopsis.org/> (13. 5. 2022)
- Talaat NB. (2019): Role of Reactive Oxygen Species Signaling in Plant Growth and Development. Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur. *Species in Plants*, 225–266.
- Tang H, Krishnakumar V, Bidwell S, Rosen B, Chan A, Zhou S, Gentzbittel L, Childs K. L, Yandell M, Gundlach H, et al. (2014). An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC genomics*, 15: 312. doi: 10.1186/1471-2164-15-312.
- The MEGA-X <http://www.megasoftware.net/> (13. 5. 2022)
- Triantaphylidès C, Havaux M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Science*, 14: 219–228. doi: 10.1016/j.tplants.2009.01.008.
- Tripathi R. K, Bregitzer P, Singh J. (2018). Genome-wide analysis of the SPL/miR156 module and its interaction with the AP2/miR172 unit in barley. *Scientific reports*, 8: 7085. doi: 10.1038/s41598-018-25349-0.
- Ueda Y, Kiba T, Yanagisawa S. (2020). Nitrate-inducible NIGT1 proteins modulate phosphate uptake and starvation signalling via transcriptional regulation of SPX genes. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 102(3): 448–466. doi: 10.1111/tbj.14637.
- van Breusegem F, Slooten L, Stassart J. M, Moens T, Botterman J, Van Montagu M, Inzé D. (1999). Overproduction of *Arabidopsis thaliana* FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize. *Plant Cell Physiology*, 40: 515–523. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029572.
- van Gelderen K, Kang C, Pierik R. (2018). Light Signaling, Root Development, and Plasticity. *Plant physiology*, 176(2): 1049–1060. doi: 10.1104/pp.17.01079.
- Wallace M.A, Liou L.L, Martins J, Clement M.H, Bailey S, Longo V.D, Valentine J.S, Gralla E.B. (2004): Superoxide inhibits 4Fe-4S cluster enzymes involved in amino acid biosynthesis. Cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 32055–32062. doi: 10.1074/jbc.M403590200.

- Wang B, Wang H. (2017): IPA1: A New "Green Revolution" Gene? *Molecular plant*, 10: 779–781. doi: 10.1016/j.molp.2017.04.011.
- Wang F.Z, Wang Q.B, Kwon S.Y, Kwak S.S, Su W.A. (2005): Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology*, 162: 465–472. doi: 10.1016/j.jplph.2004.09.009.
- Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. (2018): Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *The Journal of Cell Biology*, 217(6): 1915–1928. doi: 10.1083/jcb.201708007.
- Wang Y, Wisniewski M, Meilan R, Uratsu S.L, Cui M, Dandekar A, Fuchigami L (2007): Ectopic expression of Mn-SOD in *Lycopersicon esculentum* leads to enhanced tolerance to salt and oxidative stress. *Journal of applied horticulture*, 9: 3–8.
- Waszczak C, Akter S, Eeckhout D, Persiau G, Wahni K, Bodra N, et al. (2014). Sulfenome mining in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31), 11545–11550. doi: 10.1073/pnas.1411607111.
- Waszczak C, Akter S, Jacques S, Huang J, Messens J, Van Breusegem F. (2015): Oxidative posttranslational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, 66(10): 2923–2934. doi: 10.1093/jxb/erv084.
- Waszczak C, Carmody M, Kangasjärvi J. (2018): Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 69: 209–236. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040322.
- Waters B.M, McInturf S.A, Stein R.J. (2012): Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 63: 5903–5918. doi: 10.1093/jxb/ers239.
- WoLF PSORT <https://wolfsort.hgc.jp/> (13. 5. 2022)
- Wu F, Chi Y, Jiang Z, Xu Y, Xie L, Huang F, Wan D, Ni J, Yuan F, Wu X, Zhang Y, et al. (2020): Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in *Arabidopsis*. *Nature*, 578(7796): 577–581. doi: 10.1038/s41586-020-2032-3.
- Wu JR, Wang TY, Weng CP, Duong NKT, Wu SJ. (2019): AtJ3, a specific HSP40 protein, mediates protein farnesylation-dependent response to heat stress in *Arabidopsis*. *Planta*, 250: 1449–1460. doi: 10.1007/s00425-019-03239-7.
- Yamaguchi A, Wu MF, Yang L, Wu G, Poethig RS, Wagner D. (2009): The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Developmental cell*, 17: 268–278. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.007.
- Yamakura F, Kawasaki H. (2010): Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804: 318–325. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.10.010.
- Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T. (2009): SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21: 347–361. doi: 10.1105/tpc.108.060137.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, et al. (2004): A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors. *Journal of Molecular Biology*, 337: 49–63. doi: 10.1016/j.jmb.2004.01.015.
- Yan J. J, Zhang L, Wang R. Q, Xie B, Li X, Chen R. L, Guo L. X, Xie B. G. (2016). The Sequence Characteristics and Expression Models Reveal Superoxide Dismutase Involved in Cold Response and Fruiting Body Development in *Volvariella volvacea*. *International journal of molecular sciences*, 17(1): 34. doi: 10.3390/ijms17010034.
- Yang Z, Wang X, Gu S, Hu Z, Xu H, Xu C. (2008): Comparative study of SBP-box gene family in *Arabidopsis* and rice. *Gene*, 407: 1–11. doi: 10.1016/j.gene.2007.02.034.
- Young N. D, Cannon S. B, Sato S, Kim D, Cook D. R, Town C. D, Roe B. A, Tabata S. (2005). Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant physiology*, 137(4): 1174–1181. doi: 10.1104/pp.104.057034.
- Young N. D, Debellé F, Oldroyd G. E, Geurts R, Cannon S. B, Udvardi M. K, Benedito V. A, Mayer K. F, Gouzy J, Schoof H, Van de Peer Y, et al. (2011). The *Medicago* genome

- provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, 480(7378): 520–524. doi: 10.1038/nature10625.
- Zechmann B. (2018). Compartment-specific importance of ascorbate during environmental stress in plants. *Antioxidant Redox Signaling*, 29: 1488–1501. doi: 10.1089/ars.2017.7232.
- Zhang H, Zhao X, Li J, Cai H, Deng XW, Li L. (2014): MicroRNA408 is critical for the HY5-SPL7 gene network that mediates the coordinated response to light and copper. *The Plant cell*, 26: 4933–4953. doi: 10.1105/tpc.114.127340.
- Zhang J, Luo W, Zhao Y, Xu Y, Song S, Chong K. (2016): Comparative metabolomic analysis reveals a reactive oxygen species-dominated dynamic model underlying chilling environment adaptation and tolerance in rice. *The New Phytologist*, 211: 1295–1310. doi: 10.1111/nph.14011.
- Zhou S, Jia L, Chu H, Wu D, Peng X, Liu X, Zhang J, Zhao J, Chen K, Zhao L. (2016). Arabidopsis CaM1 and CaM4 Promote Nitric Oxide Production and Salt Resistance by Inhibiting S-Nitrosoglutathione Reductase via Direct Binding. *PLoS genetics*, 12(9): e1006255. doi: 10.1371/journal.pgen.1006255.
- Zhou Y, Hu L, Wu H, Jiang L, Liu S. (2017). Genome-Wide Identification and Transcriptional Expression Analysis of Cucumber Superoxide Dismutase (SOD) Family in Response to Various Abiotic Stresses. *International journal of genomics*, 2017. 7243973. doi: 10.1155/2017/7243973.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

$^1\text{O}_2$	Singletový kyslík
AKO	Akonitasa
APS	Peroxodisíran amonný
APX	Askorbát peroxidasa
ARA médium	Ara. modifikované médium
BSA	Hovězí sérový albumin
CAT	Katalasa
CCS	Copper chaperone for SOD1
CDPK	Calcium-dependent protein kinase
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> ekotyp Columbia
COX	Cytochrom-c oxidasa
CSD1, 2, 3	Superoxiddizmutasa 1, 2, 3 obsahující měď a zinek
Cu/ZnSOD	Superoxiddizmutasa obsahující měď a zinek
DHA	Dehydroaskorbát
DHAR	Dehydroaskorbát reduktasa
Dpo	Dny po opylení
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N' tetraoctová kyselina
FAD	Flavinadenindinukleotid
FeS	Sulfid železnatý
FeSOD	Superoxiddizmutasa obsahující železo
FSD1, 2, 3	Superoxiddizmutasa 1, 2, 3 obsahující železo
GFP	Zelený fluorescenční protein; Green fluorescent protein
GR	Glutathion reduktasa
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfid
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HO ₂ •	Hydroperoxyl
HOCl	Kyselina chlorná

HPCA1	HYDROGEN-PEROXIDE-INDUCED Ca^{2+} INCREASES 1
HY5	ELONGATED HYPOCOTYL 5
LRR	Leucine-rich receptor kinase
MAO	Monoaminoxidasa
MDHA	Monodehydroaskorbát
MDHAR	Monodehydroaskorbát reduktasa
MES	Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové
MnSOD	Superoxiddizmutasa obsahující mangan
MS	Murashige a Skoog médium
MSD1, 2	Superoxiddizmutasa 1, 2, 3 obsahující mangan
MV	Methyl viologen; Paraquat
NADP+	Oxidovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NBT	Chlorid nitrotetrazoliové modři
NiSOD	Superoxiddizmutasa obsahující nikl
O_2	Molekulární kyslík
$\text{O}_2^{\bullet -}$	Superoxid
O_3	Ozon
OH^{\bullet}	Hydroxylový radikál
PVDF	Polyvinyliden difluoridová membrána
RBOH	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG
RO^{\bullet}	Alkoxy
ROO^{\bullet}	Peroxy
ROS	Reaktivní formy kyslíku; Reactive oxygen species
SBP	SQUAMOSA binding protein
SDS	Dodecylsírán sodný
SOD	Superoxiddismutasa
SPL	SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE
SPL7	SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE 7
TBS-T	Tris buffer saline s přísadkou Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
XO	Xanthinoxidasa

9 PŘÍLOHY

Seznam příloh:

- Příloha 1: Porovnání proteinových sekvencí CSD1 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*.
- Příloha 2: Porovnání proteinových sekvencí CSD2 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*.
- Příloha 3: Porovnání proteinových sekvencí CSD3 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*.
- Příloha 4: Porovnání proteinových sekvencí CSD4 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*.
- Příloha 5: Porovnání proteinových sekvencí MSD pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*.
- Příloha 6: Porovnání proteinových sekvencí FSD1 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*.
- Příloha 7: Porovnání proteinových sekvencí FSD2 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*.

Příloha 1: Porovnání proteinových sekvencí CSD1 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*. A – Porovnání proteinových sekvencí CSD1 u *M. sativa* a *M. truncatula*. B – Výstup základních parametrů porovnávaných sekvencí. C – Grafické shrnutí pokrytí porovnávaných proteinových sekvencí. Zkratky: *M. truncatula* (query); *M. sativa* (sbjct).

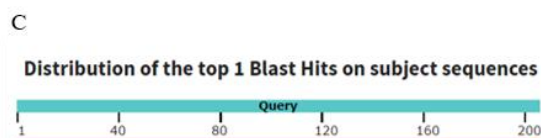
A Ms_CSD1
Sequence ID: **Query_3229** Length: **206** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 206 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
407 bits(1047)	3e-152	Compositional matrix adjust.	203/206(99%)	205/206(99%)	0/206(0%)
Query 1	MHLTMASHSLMSPSPLTSHSLLRSSFSGVSVKLSPOFSTLSRSTFKPLSVVAAAKKAVAV				60
Sbjct 1	MHLTMASHSLMSPSPLTSHSLLRSSFSGVSVKLSPOFSTLSRS F+PLSVVAAAKKAVAV				60
Query 61	LKGNSTVEGVVTLTQENEGPTTVNVRITGLTPGLHGFHLHEYGDTTNGCISTGPHFNPNQ				120
Sbjct 61	LKGNSTVEGVVTLTQENEGPTTVNVRITGLTPGLHGFHLHEYGDTTNGCISTGPHFNPNQ				120
Query 121	LTHGAPEDEIRHAGDLGNIADANGVAEATIVDNQIPLTGPNSVVGALVWHELEDDLK				180
Sbjct 121	LTHGAPEDEIRHAGDLGNIADANGVAEATIVDNQIPLTGPNSV+GRALVWHELEDDLK				180
Query 181	GGHELSTSTGNAGGRACGVVGLTPV		206		
Sbjct 181	GGHELSTSTGNAGGRACGVVGLTPV		206		

B

Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
407	407	100%	3e-152	98.54%	206	Query_18673



Příloha 2: Porovnání proteinových sekvencí CSD2 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*. A – Porovnání proteinových sekvencí CSD2 u *M. sativa* a *M. truncatula*. B – Výstup základních parametrů porovnávaných sekvencí. C – Grafické shrnutí pokrytí porovnávaných proteinových sekvencí. Zkratky: *M. truncatula* (query); *M. sativa* (sbjct).

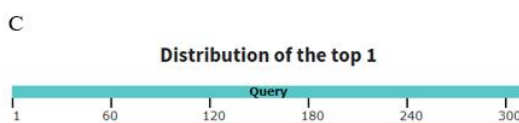
A Ms_CSD2
Sequence ID: **Query_50151** Length: **251** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 251 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

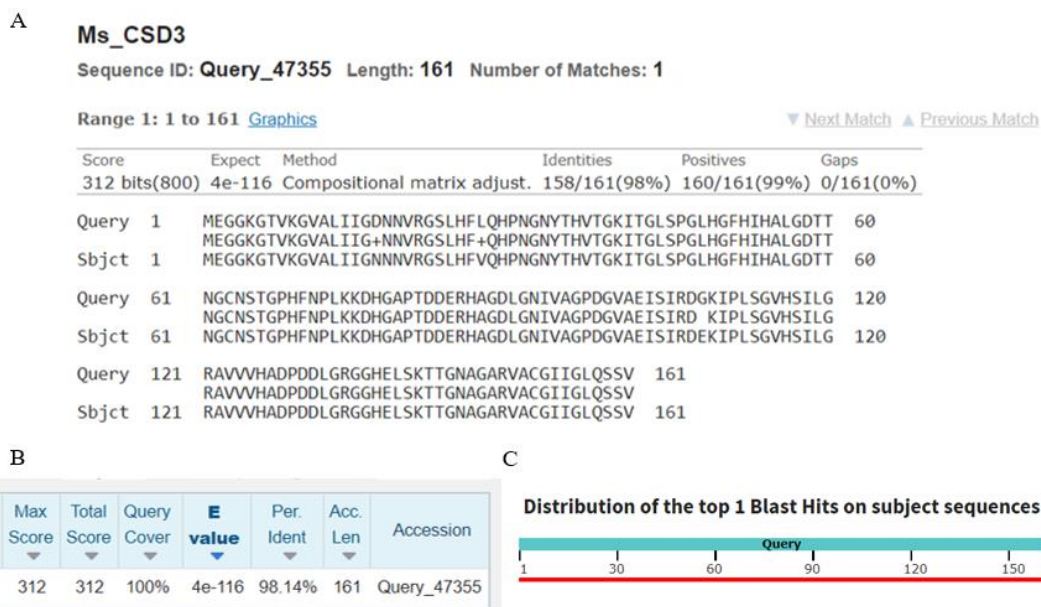
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
508 bits(1308)	0.0	Compositional matrix adjust.	243/251(97%)	248/251(98%)	0/251(0%)
Query 62	MDQNLSSQTQTDHDLPELLTEYMVDMKCEGCNVAKNKLTQIHGIKNVEVDLSNQVVRI				121
Sbjct 1	MD NLSQTQTDHDLPELLTEYMVDMKCEGCNVAKNKLTQIHGIKNVEVDLSNQVVRI				60
Query 122	LGSTPVKTMTEALEQTGKKARLIGQGVPEDFLISAASVSEFKGPEIFGWRLAQVNMELAR				181
Sbjct 61	LGSTPVKTM+EALEQTGKKARLIGQGVPEDFLISAASVSEFKGPEIFGWRLAQV+MELAR				120
Query 182	IEANFSGLSPGKHSWSINEFGDLTRGAASTGKVFNP NEENTKEPLGDLGTLVDNKEGEA				241
Sbjct 121	IEANFSGLSPGKHSWSINEFGDLTRGAASTGKVFNP NEENTKEPLGDLGTLVDNKEGEA				180
Query 242	FFTGVKEKLRVSDLIGRAVVYATEDKSEHGIAAAVARSAAVGENYKLLCTCDGTTIWE				301
Sbjct 181	F+TGVKEKLRVADLIGRAVVYATEDKSEHGIAAAVARSAAVGENYKLLCTCDGTTIWE				240
Query 302	ASDADFVPSKF		312		
Sbjct 241	ASD DVFPSKF		251		

B

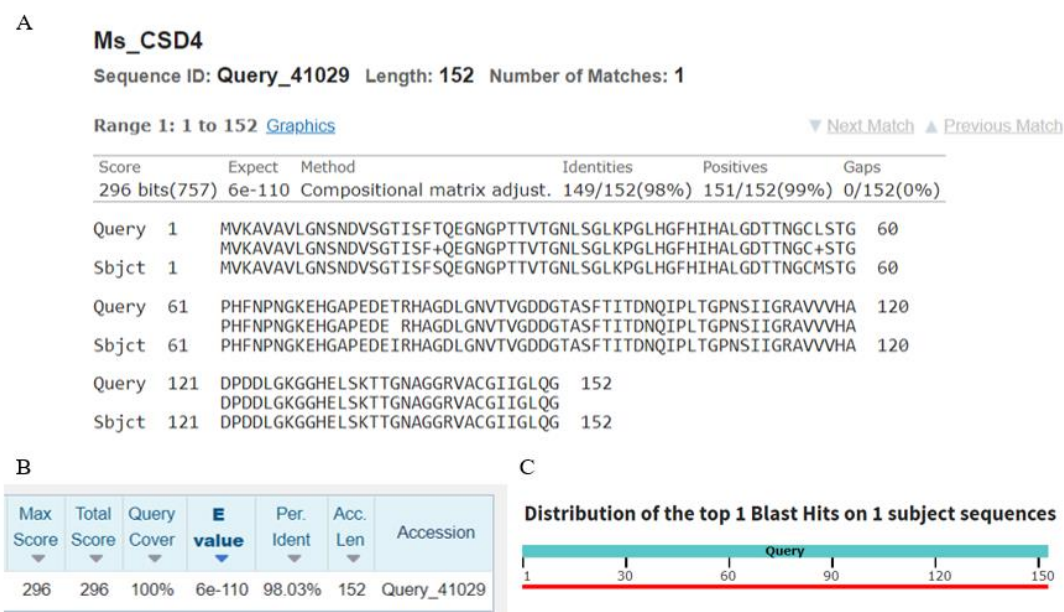
Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
508	508	80%	0.0	96.81%	251	Query_50151



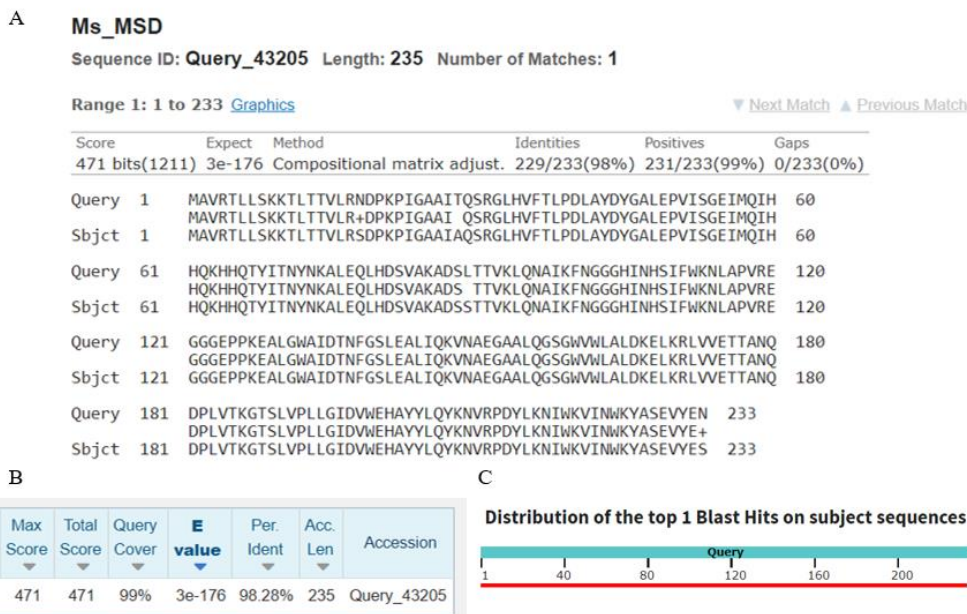
Příloha 3: Porovnání proteinových sekvencí CSD3 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*. A – Porovnání proteinových sekvencí CSD3 u *M. sativa* a *M. truncatula*. B – Výstup základních parametrů porovnávaných sekvencí. C – Grafické shrnutí pokrytí porovnávaných proteinových sekvencí. Zkratky: *M. truncatula* (query); *M. sativa* (sbjct).



Příloha 4: Porovnání proteinových sekvencí CSD4 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*. A – Porovnání proteinových sekvencí CSD4 u *M. sativa* a *M. truncatula*. B – Výstup základních parametrů porovnávaných sekvencí. C – Grafické shrnutí pokrytí porovnávaných proteinových sekvencí. Zkratky: *M. truncatula* (query); *M. sativa* (sbjct).



Příloha 5: Porovnání proteinových sekvencí MSD pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*. A – Porovnání proteinových sekvencí MSD u *M. sativa* a *M. truncatula*. B – Výstup základních parametrů porovnávaných sekvencí. C – Grafické shrnutí pokrytí porovnávaných proteinových sekvencí. Zkratky: *M. truncatula* (query); *M. sativa* (sbjct).



Příloha 6: Porovnání proteinových sekvencí FSD1 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*. A – Porovnání proteinových sekvencí FSD1 u *M. sativa* a *M. truncatula*. B – Výstup základních parametrů porovnávaných sekvencí. C – Grafické shrnutí pokrytí porovnávaných proteinových sekvencí. Zkratky: *M. truncatula* (query); *M. sativa* (sbjct).



Příloha 7: Porovnání proteinových sekvencí FSD2 pomocí webového programu „Protein Blast“ u rostlin *M. sativa* a *M. truncatula*. A – Porovnání proteinových sekvencí FSD2 u *M. sativa* a *M. truncatula*. B – Výstup základních parametrů porovnávaných sekvencí. C – Grafické shrnutí pokrytí porovnávaných proteinových sekvencí. Zkratky: *M. truncatula* (query); *M. sativa* (sbjct).

A

Ms_FSD2

Sequence ID: **Query_64875** Length: 262 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 262 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
533 bits(1374)	0.0	Compositional matrix adjust.	254/262(97%)	260/262(99%)	0/262(0%)
Query 1	MASCYLNPIPTSSRLFSPDLSTKFKIPKLLHRKKRFGVLP	RSSKVTAFYGLKTPPYEHDA	60		
Sbjct 1	MASCYLNPIPTSSRL SPDLSTKFKIPKLLHRKKRFGVLP	RSSKVTAFYGLKTPPYEHDA	60		
Query 61	LEPYMSKQIDVHWGEHHRNFIEGLNKQLGKDDILYGYTL	DELVKVTYNNGNPSPEFNNA	120		
Sbjct 61	LEPYL SKQIDVHWGEHHRNFVEGLNEQLGKDDILYGYTL	DELVKVTYNNGNPSPEFNNA	120		
Query 121	AEVWNHDFFWESMQPGGGDIPILGLLQQIEKDFGSFTNF	KEKFTAAALTFGSGWVWLVL	180		
Sbjct 121	AEVWNHDFFWESMQPGGGDMPILGLLQQIEKDFGSFTNF	KEKFTAAALALFGSGWVWLVL	180		
Query 181	KREEKQLAIVKTSNSICPIVWGDIPINLWLWEHAYYLDY	KNDRAKYVNVFLNHLVSWNA	240		
Sbjct 181	KREEKQLAIVKTSNAICPIVWGDIPINLWLWEHAYYLDY	KNDRAKYVNVFLNHLVSWNA	240		
Query 241	ATERLTWGEAFVNLGEPKIPVA	262			
Sbjct 241	ATERLTWGEAFVNLGEPKIPVA	262			

B

Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
533	533	100%	0.0	96.95%	262	Query_64875

C

Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences

