

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016

HELENA ŠTUŘÍKOVÁ



**Role cytokininů v regulaci odpovědi na nedostatek síry
u *Arabidopsis thaliana***
Diplomová práce

Vedoucí práce:
Mgr. Jaroslav Pavlů

Vypracovala:
Helena Štuříková

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Role cytokininů v regulaci odpovědi na nedostatek síry u *Arabidopsis thaliana* vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Jaroslavu Pavlů za odborné vedení, hodnotné rady a v neposlední řadě za jeho trpělivost a čas strávený na konzultacích.

Ráda bych poděkovala také Mgr. Janu Novákovi, Ph.D., a Mgr. Janu Skalákovi za pomoc při vyhodnocování fluorescenčních snímků. Poděkování bych chtěla vyjádřit i svému otci za umožnění studia.

ABSTRAKT

Role cytokininů v regulaci odpovědi na nedostatek síry u *Arabidopsis thaliana*

Za deficitu síry dochází u rostlin k mnoha adaptivním stresovým reakcím, které musí být vzájemně zkoordinovány. Bylo již dokázáno, že fytohormony cytokininy se účastní příjmu a asimilace síry, poznatky jsou však rozporuplné. V této diplomové práci bylo zjištěno, že cytokininy vyvolávají změny v expresi genů odpovědi na nedostatek síry, které jsou doprovázeny snížením glutathionu, klíčové sloučeniny síry. Dále bylo zjištěno, že odpověď na nedostatek síry zahrnuje i změnu hladiny cytokininů, díky které je dosaženo koordinace adaptací ve vývoji a/nebo metabolismu. Rostliny *A. thaliana* deficientní v signální dráze cytokininů vykázaly narušení elongace kořene za nedostatku síry. Elongace kořene v odpovědi na nedostatek síry byla navíc dále stimulována nízkými koncentracemi cytokininů. Roli cytokininů v odpovědi na nedostatek síry dále prokázaly opět rostliny deficientní v signální dráze cytokininů, které akumulovaly více glutathionu za běžné výživy oproti standardním rostlinám, snížení glutathionu navíc posílil nedostatek síry. Výsledky této práce ukazují na účast cytokininů v kontrole výživy sírou.

Klíčová slova: síra, stres, výživa, elongace kořene, glutathion

ABSTRACT

Cytokinin Action In Sulfur Nutrition-related Responses In *Arabidopsis thaliana*

Sulfur deficiency stress induces a number of adaptive responses which must be coordinated. Phytohormone cytokinin has been previously shown to regulate sulfur acquisition and utilization, however, the cytokinin-regulation of sulfur nutrition remains elusive. In this diploma thesis, it was reported that cytokinin induces a sulfur-deficiency-like gene expression which is accompanied by a decrease in pool of the key sulfur-containing compound glutathione. Further, it was found that the sulfur deficiency responses involve altered cytokinin status to coordinate developmental and/or metabolic adaptations. *Arabidopsis* plants deficient in cytokinin signaling showed disrupted root elongation in response to sulfur starvation and, unexpectedly, the root elongation in response to sulfur starvation was further stimulated by a low cytokinin concentration. Further, the role of cytokinin in sulfur nutrition was indicated in cytokinin signaling-deficient plants which accumulated more glutathione under normal nutritive conditions in comparison to wild-type, and vice versa, the decrease of glutathione pool was exaggerated during sulfur starvation. Altogether, results of this diploma thesis suggest that cytokinins participate in nutritional sulfur homeostasis control.

Key words: sulfur, stress, nutrition, root elongation, glutathione

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV POZNATKŮ.....	9
2.1	Síra v rostlinách.....	9
2.1.1	Příjem a metabolismus síry	9
2.1.2	Glutathion.....	11
2.1.3	Vliv fytohormonů na metabolismus a odpověď na nedostatek síry	14
2.2	Cytokininý.....	15
2.2.1	Metabolismus cytokininů	17
2.2.2	Transport cytokininů	20
2.2.3	Signální dráha cytokininů.....	21
2.2.4	Fyziologické účinky cytokininů	22
2.2.5	Cytokininý v regulaci příjmu, metabolismu a odpovědi na nedostatek síry	23
3	CÍL PRÁCE.....	24
4	MATERIÁL A METODIKA	25
4.1	Rostlinný materiál	25
4.2	Kultivace	25
4.3	Analýza genové exprese.....	27
4.4	Stanovení glutathionu.....	29
4.5	Stanovení antokyanů	30
4.6	Analýza elongace kořenů	31
4.7	Fluorescenční mikroskopie	31
4.8	Statistické zpracování a prezentace dat.....	31
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	33
5.1	Účinek cytokininů na expresi genů spojených s metabolismem síry a odpovědi na její nedostatek	33
5.1.1	Role dusíku v odpovědi na nedostatek síry vyvolané cytokininý	36
5.2	Obsah glutathionu při odpovědi na působení cytokininů.....	38
5.3	Expese genů spojených s metabolismem cytokininů v odpovědi na nedostatek síry	39
5.4	Stanovení hladiny cytokininů u <i>A. thaliana</i> vystavených nedostatku síry.....	41
5.5	Sledování aktivity signální dráhy cytokininů při nedostatku síry s využitím transgenních linií <i>TCSnew::GFP</i>	43
5.6	Fyziologická a fenotypová analýza linií <i>A. thaliana</i> insensitivních k cytokininům.....	47
6	ZÁVĚR.....	54
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	55
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	74
9	SEZNAM TABULEK.....	74
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	75
11	PŘÍLOHA.....	78

1 ÚVOD

Síru řadíme z hlediska výživy rostlin mezi esenciální minerální prvky, tedy mezi takové, které jsou nezbytné pro správnou ontogenezi rostliny. Patří společně s dusíkem, draslíkem, vápníkem, fosforem a hořčíkem do skupiny tzv. makronutrientů, které se vyskytují v rostlině obvykle v milimolárních koncentracích.

V rostlině se síra stává součástí mnoha strukturně i funkčně odlišných látek, obsahují ji aminokyseliny cystein a methionin, je součástí ochranných systémů (glutathion, fytochelatiny), některých lipidů, koenzymů a sekundárních metabolitů. Její nedostatek se projeví sníženou syntézou proteinů a inhibicí metabolických procesů, kterých se účastní; příznačným znakem bývá u dospělých rostlin žloutnutí listů růstového vrcholu.

Cytokininy patří mezi fytohormony, které se významně podílí na vývoji rostliny. Stimulují buněčné dělení, potlačují růst kořene, podporují růst a větvení prýtu, podílí se na formování květů, oddalují senescenci aj. Syntetizují se hlavně v apikálním kořenovém meristému, ale mohou se tvořit i v jiných částech rostliny. Ovlivňují příjem a metabolismus mnoha živin, mezi které patří i síra (Kopriva a Koprivova, 2015)

V této diplomové práci byl pozorován vliv cytokininů na regulaci příjmu a asimilace tohoto významného prvku, a současně i působení cytokininů při jeho deficienci u *Arabidopsis thaliana*.

Významným nástrojem se stala metoda RT-qPCR, sloužící ke stanovení míry exprese jednotlivých genů. Pomocí optické fluorescenční mikroskopie byly sledovány transgenní linie *Arabidopsis* exprimující fluorescenční protein GFP, jehož signál odráží aktivitu ARR typu B (transkripčních faktorů *Arabidopsis response regulators*) (Zürcher et al., 2013). Byly zkoumány i změny obsahu glutathionu (důležité zásobní formy síry), a to jak ve standardním ekotypu *Arabidopsis*, tak i v mutantních liniích se sníženou citlivostí na cytokininy (Riefler et al., 2006). V neposlední řadě byla sledována i elongace kořenů mutantních rostlin deficientních v percepci cytokininů.

2 SOUČASNÝ STAV POZNATKŮ

2.1 Síra v rostlinách

Síra je jedním z makronutrientů nutným pro růst a fyziologické funkce rostlin. Je obsažena ve dvou proteinogenních aminokyselinách, konkrétně v cysteinu a methioninu, které jsou rostliny (na rozdíl od živočichů) schopny syntetizovat z anorganického síranového aniontu. Obě aminokyseliny mají strukturální funkci a slouží také jako prekurzory dalších sloučenin (Saito, 2002). Za zmínku stojí například sulfolipidy, ze sekundárních metabolitů pak silice aliiny u rostlinných druhů z čeledi *Alliaceae* a glukosinoláty u druhů z čeledi *Brassicaceae*. Poslední dva jmenované typy sloučenin fungují jako protektanty vůči stresu. Díky (mj.) glukosinolátům má čeleď *Brassicaceae* zvýšené nároky na obsah síry v půdě (Blake-Kalff et al., 1998; Lewandowska a Sirko, 2008). *Arabidopsis thaliana* je proto vhodný model pro výzkum metabolismu síry a odpovědi na její nedostatek. Největšího pokroku ve výzkumu asimilace síry bylo dosaženo právě u *A. thaliana*.

Ze šesti makronutrientů potřebných pro rostliny je síra v jejich těle zastoupena nejméně, což je pravděpodobně důvod, proč se na tuto živinu zaměřuje (v rámci makronutrientů) relativně nejmenší počet studií.

2.1.1 Příjem a metabolismus síry

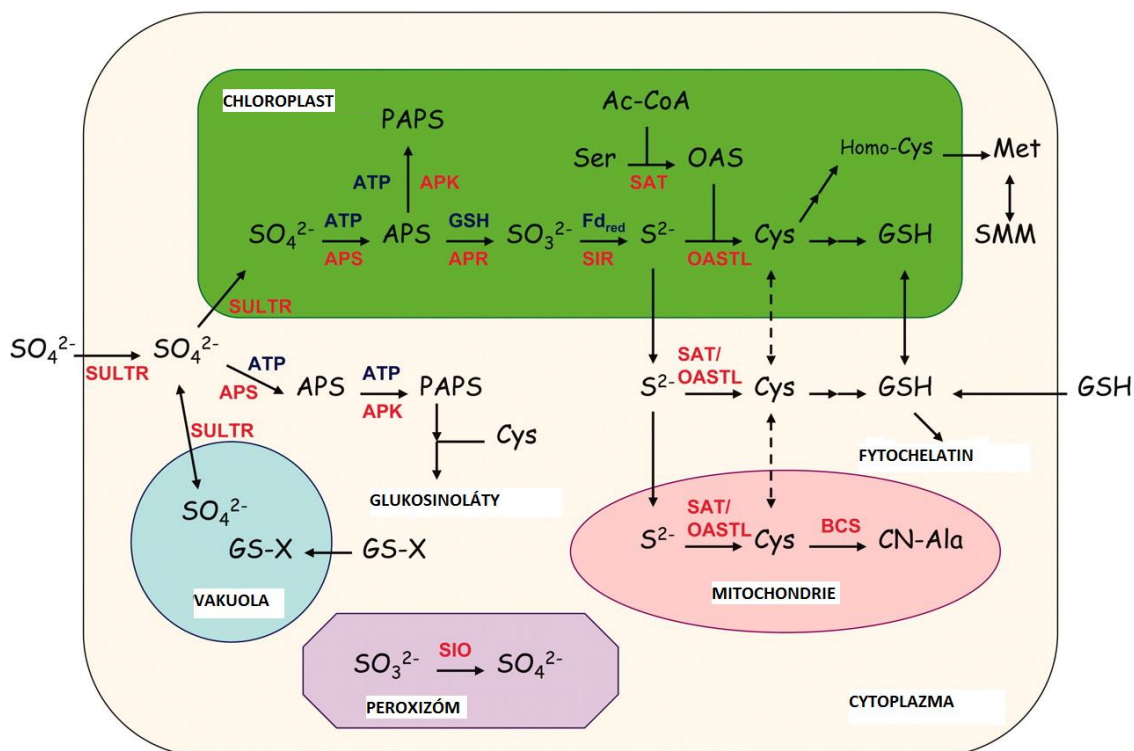
Jako hlavní zdroj síry slouží rostlinám anorganický síran (SO_4^{2-}). V menším měřítku jsou rostliny schopné přijmout i atmosférické sloučeniny síry, konkrétně oxid siřičitý a sirovodík (Kimmerer a Kozlowski, 1981; Leustek et al., 2000). Půdní síran je přijat kořenem a skrz buňky distribuován pomocí specializovaných proteinů v plazmatických membránách – transportérů síranu (SULTR – SULfate TRansporter). Podle své funkce jsou rozděleny do skupin. 1. skupina s vysokou afinitou je odpovědná za příjem síranu z půdy do kořenových buněk (Shibagaki, 2002). Transportéry skupiny 2 s nízkou afinitou zprostředkovávají transport síranu skrz buňky v rostlině, jsou lokalizovány v xylému a floémových buňkách kořene a listů (Takahashi et al., 2000). Zástupci

4. skupiny se nacházejí v tonoplastu vakuol a zodpovídají za výstup síranů z vakuoly (Kataoka et al., 2004a). Transportéry skupin 3 a 5 zatím nejsou prozkoumány na takové úrovni, jako transportéry ostatních skupin. Předpokládá se, že některé transportéry třetí skupiny translokují síran mezi kompartmenty semene a zajišťují tak embryu přísun síry (Zuber et al., 2010). SULTR 3;1 je lokalizován v chloroplastech a zajišťuje tak přísun síranu této organelle (Cao et al., 2013). Za zmínku stojí i SULTR3;5, u kterého byla prokázána schopnost navýšení intenzity translokace síranu z kořene do prýtu u *A. thaliana* (Kataoka et al., 2004b).

Síran je v buňce skladován ve vakuole, nebo dále přeměňován na mnohé primární a sekundární metabolity. Před zabudováním do cysteinu je síran transportován do plastidů a následně adenylován (aktivován) na adenosin-5-fosfosulfát (APS) za katalýzy ATP-sulfurylázou. APS je redukován na siřičitan (SO_3^{2-}), reakce je katalyzována APS-reduktázou (APR). Siřičitan je dále redukován sulfitreduktázou (která je v komplexu s ferredoxinem) na sulfid (S^{2-}), který je inkorporován za pomoci O-acetylserin(thiol)lyázy do O-acetylserinu (OAS) (OAS je syntetizován acetylací serinu acetylkoenzymem A za katalýzy serinacetyltransferázou [SAT] [Leustek et al., 2000]) za vzniku cysteinu. Enzymy APR a SAT jsou klíčové pro rychlost asimilace síry a biosyntézy cysteinu. Cystein může být inkorporován přímo do proteinů nebo peptidů, jako je například glutathion. Také může být dále metabolizován a sloužit jako donor síry k syntéze methioninu, biotinu a sekundárních metabolitů (Hawkesford a De Kok, 2006; Kopriva, 2006; Kopriva, 2009) (Obr. 1). Nutno dodat, že siřičitan, meziproduct asimilace síranu, je přeměňován a zabudováván do sulfolipidů, důležitých komponent chloroplastových membrán (Sanda et al., 2001).

Zatímco k redukci síranu dochází pouze v plastidech, cystein je syntetizován kromě plastidů i v mitochondriích a cytosolu (Leustek et al., 2000).

Závěrem je nutné zmínit, že metabolismus síry je silně ovlivňován faktory jako dostupnost jiných živin (dusíku a fosforu), metabolismem sacharidů, v neposlední řadě i světelným zářením.



Obr. 1 Hlavní kroky metabolismu a asimilace síry v rostlinných buňkách. Černým písmem jsou označeny metabolity: Ac-CoA (acetylkoenzym A), APS (adenosin-5-fosfosulfát), CN-Ala (β -kyano-alanin), GSH (redukovaný glutathion), GS-X (konjugát glutathionu), OAS (O-acetylserin), PAPS (3-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát), SMM (S-methyl-methionin). **Tmavě modře** jsou znázorněny názvy kofaktorů: GSH (redukovaný glutathion), Fd_{red} (redukovaný ferredoxin). Červenou barvou jsou značeny názvy enzymů a proteinů: APK (adenosin-5'-fosfosulfátkináza), APR (adenosin-5'-fosfosulfát reduktáza), APS (ATP-sulfuryláza, BCS (β -kyano-alaninsyntáza), OASTL (O-acetylserin[thiol]lyáza), SAT (serinacetyltransferáza), SIO (sulfitoxidáza), SiR (sulfitireduktáza), SULTR (transportér síranu). Převzato od Saito, (2004) a upraveno.

2.1.2 Glutathion

Glutathion (γ -glutamyl-cystein-glycin) řadíme mezi nízkomolekulární thioly, jedná se o tripeptid složený z aminokyselin glutaminu, glycinu a cysteinu. Neobvyklá vazba mezi γ -karboxylovou skupinou glutaminu a aminoskupinou cysteinu zajišťuje stabilitu molekuly. Díky thiolové skupině je schopen tvořit disulfidické můstky (a udržuje tak redoxní prostředí buňky), je hlavní zásobní formou redukované síry, uplatňuje se v obranných reakcích. Za příklad lze uvést fytoalexin kamalexin, v jehož biosyntéze se glutathion uplatňuje jako donor síry (Su et al., 2011). Má antioxidační vlastnosti, deto-

xifikuje kyslíkové radikály, xenobiotika a těžké kovy (Noctor et al., 2011). V tomhle směru nelze nezmínit skupinu enzymů zvanou glutathion-S-transferázy (GST), které katalyzují konjugaci redukovaného glutathionu s řadou elektrofilních sloučenin, které často mají cytotoxické vlastnosti (Basantani a Srivastava, 2007). Tyto konjugáty jsou následně izolovány ve vakuolách, nebo transportovány do apoplastu buněk. V rostlinách glutathion také participuje společně s jinými antioxidačními enzymy jako nezbytná součást askorbát-glutathionového cyklu (Foyer a Noctor, 2011). Glutathion se uplatňuje i v řadě signálních kaskád – má funkci signálního metabolitu při regulaci metabolismu síry, ovlivňuje transport a/nebo signální dráhy řady fytohormonů a, v neposlední řadě, díky redoxním interakcím s thiolovými skupinami proteinů interaguje s komplexní sítí buněčné signalizace (Meyer, 2008; Noctor et al., 2012). Jeho hladina v rostlinách je ovlivněna dostupností síry, dalšími vnějšími podmínkami (světlo, stres), případně i působením fytohormonů (Noctor et al., 2011).

V buňkách se vyskytuje jak v redukované (GSH), tak v oxidované formě (GSSG). Oxidovaná forma vzniká spojením dvou molekul glutathionu disulfidickým můstkem a tvoří se např. při detoxifikaci reaktivních forem kyslíku (ROS). Přeměnu GSSG zpět na GSH katalyzuje NADPH-dependentní glutathionreduktáza. Množství akumulovaného GSSG odráží oxidační stres (Noctor et al., 2012), obsah GSSG ale nelze považovat za univerzální marker stresu (Kranner et al., 2006).

Glutathion je syntetizován z kyseliny glutamové, glycinu a cysteinu ve dvou reakcích závislých na ATP (Noctor et al., 2002). Reakce katalyzují dva enzymy, prvním je γ -glutamyl-cysteinsyntetáza (γ -ECS) kódována genem *GSH1* u *A. thaliana* a druhým je glutathionsyntetáza (GSH-S) kódována genem *GSH2*. Pro biosyntézu glutathionu jsou limitujícími faktory aktivita γ -ECS a dostupnost cysteinu (Noctor et al., 2002).

Degradace glutathionu není dosud objasněna v takové míře, jako biosyntéza. Dochází buď ke štěpení γ -glutamylové vazby γ -glutamyltranspeptidázou (GGT) nebo ke tvorbě 5-oxoprolinu z peptidů obsahujících γ -glutamylovou vazbu za katalýzy γ -glutamylcyklotransferázy (GGCT) (Ohkama-Ohtsu et al., 2007a; Ohkama-Ohtsu et al., 2007b; Ohkama-Ohtsu et al., 2008; Ohkama-Ohtsu et al., 2009; Noctor et al., 2012; Paulose et al., 2013). U *A. thaliana* byly identifikovány 4 geny pro GGT, konkrétně *GGT1-4*. Enzymy GGT1 a GGT2 jsou integrovány v plazmatické membráně a buněčné stěně (Ohkama-Ohtsu et al., 2007a). GGT4 je lokalizována do vakuol, kde degraduje konjugáty glutathionu (Ohkama-Ohtsu et al., 2007b; Grzam et al., 2007). *GGT3* je

pseudogen. Enzym GGCT společně s 5'-oxoprolinázou je odpovědný za degradaci glutathionu v cytosolu a jedná se patrně i o hlavní způsob degradace glutathionu u rostlin (Ohkama-Ohtsu, et al., 2008). První GGCT, kterou se povedlo charakterizovat, byla GGCT2;1. Na rozdíl od způsobu degradace glutathionu u živočichů, kde GGCT teprve přeměňuje peptidy vytvářené aktivitou GGT, rostlinné GGCT rostlin degradují glutathion přímo (Ohkama-Ohtsu et al., 2008; Paulose et al., 2013). Degradace glutathionu se rovněž účastní fytochelatinsyntáza, jejíž funkce spočívá v usnadnění degradace v případech, že je rostlina vystavená účinkům těžkých kovů a konjugát glutathionu se akumuluje v cytosolu (Grzam et al., 2007).

Obsah síry v zemědělských půdách je v současnosti ve světě deficitní. Následkem intenzivního zemědělství a zvyšování výnosu se zvedly i požadavky plodin na výživu sírou. V našich podmínkách můžeme vzít za příklad brukev řepku olejku (*Brassica napus subsp. napus*), která má z našich plodin nároky na síru největší, a stává se indikátorem deficitu síry.

Zkoumání mechanismů a regulace odpovědi rostlin na nedostatek síry může posloužit k získání nových poznatků, aplikovatelných pro navýšení účinnosti využití síry kulturními plodinami v budoucnu.

Asimilace síry je kontrolována aktivitou enzymů a regulací genové exprese (Hawkesford, 2000; Saito, 2000). Za podmínek deficitu síry se mění exprese genů a hladiny mnohých metabolitů (Hirai et al. 2003; Nikiforova et al., 2003; Hoefgen a Nikiforova, 2008), dochází například ke zvýšení exprese transportérů síranu, genů účastnících se mobilizace zásobních forem a zvýšení aktivity enzymů asimilace (Hirai et al., 2003; Hirai et al., 2004; Kawashima et al., 2005; Hawkesford a De Kok, 2006; Kopriva a Koprivova, 2014). Jako typické příklady metabolitů, které navíc slouží jako metabolické signály dostupnosti síry, můžeme vyzdvihnout OAS, jehož hladina se za nedostatku síry zvyšuje (Hirai et al., 2003) a glutathion, jehož hladina je přímo úměrná dostupnosti síry (Maryuama-Nakashita et al., 2005; Davidian a Kopriva, 2010). Adaptace rostliny na nedostatek síry zahrnuje koordinovanou aktivaci řady metabolických drah (Hirai et al., 2005; Nikiforova et al., 2005; Hoefgen a Nikiforova, 2008).

Mezi geny, jejichž exprese je ovlivněna nedostatkem síry, patří ty pro transportéry síranu SULTR1;1 a SULTR1;2, které jsou za tohoto stavu výrazně nadregulovány (Maryuama-Nakashita et al., 2003; Maruyama-Nakashita et al., 2004a; Maryuama-

Nakashita et al., 2004b). Sledování exprese chimérických reportérů kontrolovaných regulačními sekvencemi těchto genů umožnilo identifikaci některých molekulárních mechanismů regulace odpovědi na nedostatek síry. Regulaci transportéru SULTR1;1 ovlivňuje zatím neznámá fosfatáza (Maryuama-Nakashita et al., 2004a). V promotoru genu pro SULTR1;1 (i dalších genů odpovědi na nedostatek S) byl identifikován cis-regulační element SURE (Sulfur Responsive Element) (Maryuama-Nakashita et al., 2005). Hledání mutací, které naruší regulaci exprese SULTR1;2, pak vedlo k identifikaci transkripčního faktoru SULFUR LIMITATION1 (SLIM1), jenž má klíčové postavení v regulaci odpovědi na nedostatek síry (Maryuama-Nakashita et al., 2006); jeho molekulární mechanismus působení však zatím není zcela znám (Wawrzynska a Sirko, 2014). Mezi další transkripční faktory podílející se na regulaci exprese genů kódujících enzymy asimilace síry patří například několik MYB proteinů (Yatusevich et al., 2010) a LONG HYPOCOTYL 5 (HY5) (Lee et al., 2011), které ovlivňují expresi genů APR – konkrétně *APR1* a *APR2*. Na posttranskripční úrovni regulace asimilace síry se uplatňuje mikroRNA miR395 (Kawashima et al., 2011).

Nedostatek síry u rostlin má vliv i na celou řadu komplexních fyziologických projevů. Za příklad lze uvést akumulaci antokyanů při nedostatku síry u *A. thaliana* (Nikiforova et al., 2003). Následkem deficiencie síry se omezí biosyntéza sulfolipidů a v souvislosti s tím i fotosyntetické energetické procesy. Běžná intenzita světla je za těchto podmínek vnímána rostlinou jako stres způsobený nadměrným ozářením a ta začne na svou obranu akumulovat antokyany.

Nedostatek síranu v půdě stimuluje vývoj kořene. Dochází k intenzivnějšímu dlouhivému růstu kořene na úkor prýtu (Nikiforova et al., 2003; Zhao et al., 2014). U semenáčků *A. thaliana* při deficienci síranu dále dochází k intenzivnějšímu větvení kořene, laterální kořeny se tvoří blíže špičce hlavního kořene (López-Bucio et al., 2003).

2.1.3 Vliv fytohormonů na metabolismus a odpověď na nedostatek síry

Na regulaci odpovědi na nedostatek síry se mj. významně podílí také fytohormony. Jako první bych uvedla auxiny. Při deficienci síry dochází u *A. thaliana* ke zvýšení exprese genu pro nitrilázu NIT3 (Kutz et al., 2002; Nikiforova et al., 2003). Nitrilázy katalyzují přeměnu indol-3-acetonitrilu na indol-3-oxalovou kyselinu (IAA). Na stimulaci metabolismu auxinu při deficienci síry dále poukazuje zvýšení metabolismu tryptofanu (prekurzor auxinu), a dále indukce thioglukosidáz, které se podílejí na degradaci gluko-

sinolátů za vzniku výše zmíněného prekurozoru auxinu indol-3-acetonitrilu (Nikiforova et al., 2003; Dan et al., 2007). Odpověď na nedostek síry rovněž zahrnuje změny v signalizaci auxinů (Nikiforova et al., 2003; Kasajima et al., 2007; Falkenberg et al., 2008). Bylo také dokázáno spojení mezi auxiny a sírou v kontrole stavby kořenového systému, kdy vystavení rostlin deficienci síry vedlo ke snížení hladiny auxinu a redukci akumulace PIN1 proteinů (Zhao et al., 2014; Wang et al., 2015).

Podíl v regulaci metabolismu síry mají také etylén a kyselina abscisová. Deficience síry je spojena se zvýšením tvorby etylénu a význam signální dráhy etylénu v regulaci odpovědi na nedostatek síry může být nezanedbatelný (Wawrzynska et al., 2015). Moniuszko (2015) navrhl, že receptory etylénu stojí na počátku signální kaskády odpovědi na nedostatek síry. Kyselina abscisová se také podílí na regulaci metabolismu síry. Dostupnost síranu je přímo úměrná obsahu kyseliny abscisové (Kopriva, 2006; Cao et al., 2014).

Mezi další fytohormon podílející se na regulaci metabolismu síry patří kyselina jasmonová (JA), jejíž syntéza je indukována deficitem síry (Nikiforova et al., 2003, Kopriva, 2006; Hoefgen a Nikiforova, 2008). Po ošetření JA byly indukovány geny redukce síranu, syntézy glutathionu a metabolismu glukosinolátů (Harada et al., 2000; Jost et al., 2005).

V neposlední řadě ovlivňují příjem a metabolismus síry také cytokininy a právě role cytokininů v odpovědi na nedostatek síry bude zkoumána v této diplomové práci.

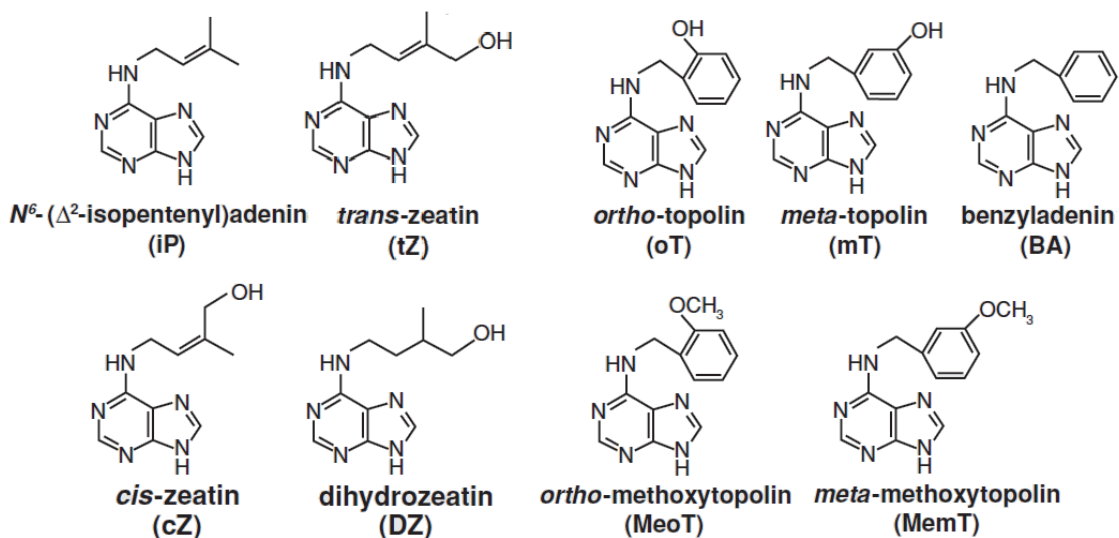
2.2 Cytokininy

V letech čtyřicátých a padesátých minulého století, v návaznosti na rozvoj používání rostlinných explantátových kultur, byla objevena schopnost biologických látek (jako je například rajčatová šťáva, kokosové mléko nebo kvasniční extrakt) spouštět proliferaci buněk rostlinných pletiv. V roce 1955 na univerzitě ve Wisconsinu objevili Folke Skoog a Carlos Miller v autoklávovaném spermatu sledů substanci, která byla schopná v kultuře tabáku *in vitro* iniciovat (za přítomnosti auxinů) proliferaci buněk. Látka (derivát adeninu 6-furfurylaminopurin) byla nazvána kinetin (Miller et al., 1956). Nejednalo se však o látku nativní v rostlinách, a až o něco později byl izolován a identifikován v endospermu obilky kukuřice první přirozený cytokinin – zeatin (Miller, 1961; Letham, 1963). Mezi další významné počiny ve výzkumu cytokininů patřil objev iso-

pentenyltransferázy - enzymu biosyntézy cytokininů kódovaným lokusem *tmr* u *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi et al., 1984), objev receptorů cytokininů (Inoue et al., 2001; Ueguchi et al., 2001) a izolace cytokinioxidázy/dehydrogenázy, enzymu odpovědného za degradaci některých cytokininů (Houba-Hérin et al., 1999; Morris et al., 1999).

Z hlediska své chemické struktury řadíme přirozeně se vyskytující cytokininy mezi deriváty adeninu, které nesou substituent v poloze N⁶. Řetězec navázaný v této poloze určuje, zda jde o cytokininy izoprenoidní nebo aromatické. Nejznámějším aromatickým cytokininem je benzylaminopurin (benzyladenin), který byl dlouho považován pouze za syntetický růstový regulátor, než se ho povedlo vyizolovat z topolu (Horgan et al., 1975). Podle topolu byly pojmenována i celá skupina aromatických cytokininů jako topoliny, zahrnující izomery *para*-, *meta*-, *ortho*- a jejich methoxyderiváty (Strnad et al., 1997) (Obr 2).

Izoprenoidní skupina cytokininů je mnohem rozsáhlejší, spadá do ní mnoho přirozených cytokininů, jejichž metabolismus je (oproti aromatickým cytokininům) lépe prozkoumán. Patří sem *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), dihydrozeatin a isopentenyladenin (*iP*) (Obr. 2). *tZ* bývá v rostlinách zastoupen často, jeho izomer *cZ* má větší nížší aktivitu (Yonekura-Sakakibara et al, 2004). Za zmínku stojí rovněž i syntetické sloučeniny s cytokininovou aktivitou, konkrétně deriváty fenylmočoviny – významným zástupcem je thidiazuron.



Obr. 2 Příklady izoprenoidních (vlevo) a aromatických (vpravo) cytokininů. Převzato od Sakakibara (2006) a upraveno.

Cytokininy se vyskytují v rostlinách ve formě volných bází, ale také i jako nukleotidy, nukleosidy nebo konjugáty monosacharidů glukózy, případně xylózy (Turner et al., 1987; Sakakibara, 2006).

2.2.1 Metabolismus cytokininů

Biosyntéza cytokininů

V 70. letech minulého století byly objeveny ribosidy s cytokininovou aktivitou v izolované tRNA hrachu (*Pisum sativum*) (Vreman et al., 1972), čímž se potvrdila myšlenka o tvorbě cytokininů štěpením tRNA na *cis*-zeatin a modifikovanou bázi. Rychlost této metabolické přeměny ale není taková, aby stačila pokrýt velké množství cytokininů obsažených v rostlinách. Detailnější znalosti o biosyntéze cytokininů přinesl až výzkum fytopatogenní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. V Ti-plazmidu (kódujícím mj. enzymy pro katalýzu cytokininů a auxinů) odpovědném za indukci nádorů u dvouděložných rostlin byl charakterizován gen klíčového enzymu biosyntézy cytokininů – isopentenyltransferáza (*ipt*; *IPT*) (Akiyoshi et al., 1984). Ta katalyzuje připojení dimethylalylldifosfátu (DMAPP) k AMP (adenosinmonofosfátu), ADP (adenosindifosfátu) nebo ATP (adenosintrifosfátu) za vzniku isopentelyladeninribosylmonofosfátu, isopentelyladeninribosyldifosfátu nebo isopentelyladeninribosyltrifosfátu, tedy cytokininů typu iP. Ty jsou dále hydroxylovány (jedná se převážně o cytokininy v nukleotidové formě) cytochrom-P450-monooxygenázou, a vznikají cytokininy typu tZ. Po defosforylaci nebo deribosylaci dávají vznik volným bázím cytokininů s největší aktivitou (Sakakibara, 2006; Frébort et al., 2011). Nebyly dosud identifikovány nukleotidázy a nukleosidázy cytokininových ribotidů/ribosidů (Frébort et al., 2011), byla však objevena a popsána fosforibohydroláza, pojmenována LONELY GUY (Kurakawa et al., 2007).

Biosyntéza cytokininů zprostředkovaná isopentenyltransferázou (*ipt*) v bakteriích se liší od biosyntézy cytokininů v rostlinách. Biosyntéza u *A. tumefaciens* vychází pouze z AMP, který *ipt* prenuluje hydroxy-2-metyl-2-(E)-butenyl-4-difosfátem (HMBDP) nebo DMAPP (Krall et al., 2002). HMBDP je dostupný substrát, díky kterému můžou bakteriální buňky rychle zvýšit hladinu aktivních cytokininů

v infikovaných rostlinách, naproti tomu je DMAPP využíván pro syntézu řady izoprenoidních sloučenin (Astot et al., 2000; Frébort et al., 2011).

IPT u rostlin nebyly dlouho známy, až Kakimoto (2001) identifikoval 9 genů kódujících IPT u *A. thaliana*. Byly označeny jako *AtIPT1-9*. Sedm z těchto genů je blízce příbuzných bakteriálnímu *ipt* a katalyzují vznik cytokininů typu iP z ADP nebo ATP (Kakimoto, 2001), nikoli AMP, jak je tomu obvyklé u bakterií. *AtIPT2* a *AtIPT9* kódují tRNA-IPT prenylující adenin v sousedství antikodonu tRNA (Miyawaki et al., 2006).

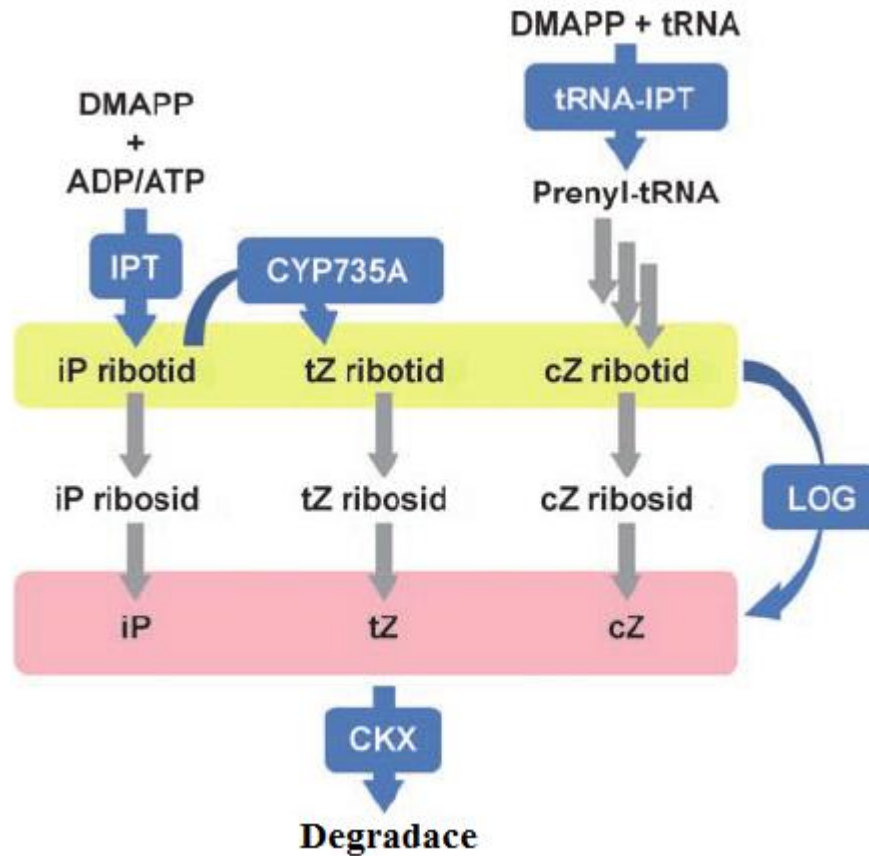
Geny *AtIPT* jsou u dospělých rostlin *A. thaliana* transkribovány v kořenových, prýtových, listových i květních pletivech (Takei et al., 2004a). Exprese *AtIPT1* a *AtIPT7* byla prokázána v cévních svazcích kořene, *AtIPT3* v průvodních buňkách floému celé rostliny, *AtIPT7* v průvodních buňkách floému kořene a *AtIPT5* v primordiálních buňkách laterálních kořenů (Takei et al., 2004a). Z hlediska buněčné lokalizace jsou geny *AtIPT1*, 3, 5 a 8 exprimovány v plastidech, *AtIPT4* je exprimována v plastidech, cytosolu i mitochondriích, zatímco *AtIPT7* představuje mitochondriální izoformu (Kasahara et al., 2004).

Degradace cytokininů

Cytokinininy jsou degradovány štěpením nenasyceného postranního řetězce za vzniku adeninu a příslušného aldehydu. Odpovědným enzymem je cytokininoxidáza/dehydrogenáza (CKX), která rozeznává dvojnou vazbu isopentenylového řetězce zeatinu, iP a odpovídajících ribosidů. Dihydrozeatin a aromatické cytokinininy jsou tak ke štěpení CKX odolné. Pokud je postranní řetězec O-glukosylován, nebo substituován dalšími funkčními skupinami purinového jádra, je zcela chráněn před degradací CKX (Armstrong, 1994; Frébort et al., 2011). Vysoké koncentrace cytokininů zvyšují aktivitu CKX (Motyka et al., 2003; Brenner et al., 2012).

CKX byla dlouho klasifikována jako aminoroxidáza (EC. 1.4.3.6), než se podařilo naklonovat a izolovat gen pro CKX v kukuřičných obilkách – *ZmCKX1* (Houba-Hérin et al., 1999). Enzym byl strukturálně specifikován jako flavoprotein obsahující kovalentně vázaný flavinadeninnukleotid a překlasifikován na FAD vazebnou oxidázu, neboli cytokininovou dehydrogenázu (EC 1.5.99.12).

Degradace (i biosyntéza) u aromatických cytokininů zatím stále není objasněna.



Obr. 3 Zjednodušený model biosyntézy a degradace cytokininů. CKX – cytokininoxidáza/dehydrogenáza; cZ – cis-zeatin; DMAPP – dimethylalylldifosfát; iP – isopentenyladenin; IPT – isopentenyltransferáza; LOG – LONELY GUY; tRNA-IPT – tRNA-isopentenyltransferáza; tZ – trans-zeatin. Převzato a upraveno podle Kudo et al. (2010).

Metabolické přeměny cytokininů

Jak bylo zmíněno výše, cytokininy se v rostlinách vyskytují ve formě volných bází, případně k nim příslušných nukleotidům a nukleosidům. Mezi těmito formami dochází k vzájemným přeměnám (Mok a Mok, 2001). Konkrétně dochází k modifikaci adeninového heterocyklu nebo k modifikaci/štěpení postranního řetězce. Jedná se např. o reverzibilní tvorbu ribosidů a ribotidů, přeměny postranních řetězců, ireverzibilní inaktivaci cytokininů nebo degradaci cytokininů (viz předchozí odstavec).

Příkladem enzymů katalyzujících tyto procesy jsou adeninfosforibosyltransferázy (APT), které přeměňují volné cytokininové báze na nukleotidy a snižují tak hladinu aktivních forem cytokininů (Allen et al., 2002). Biologická aktivita cytokininů může

být také snížena konjugací se sacharidem za vzniku glykosidů. Rozlišujeme N-glukosylaci, která probíhá na adeninovém heterocyklu a O-glukosylaci probíhající na postranním řetězci. Při N-glukosylaci je cukerný zbytek připojen na N³, N⁷ nebo N⁹ purinu. Reakci katalyzují N-glykosyltransferázy. Atomy N³ a N⁷ konjugují s D-glukózou, N⁹ je schopen navázat D-glukózu, D-ribózu a D-glukózu-5'-fosfát (Sakakibara, 2006). Glukosylace na N⁷ je ireverzibilní.

Glukosylací postranního řetězce se formují O-glukosidy/O-xylosidy. Hydroxylový kyslík na tomto řetězci je glukosylován D-glukózou nebo D-xylozou za katalýzy zeatin-O-glukosyltransferázy (ZOG) nebo O-xylosyltransferázy. O-glukosyl-konjugáty slouží jako neaktivní, zásobní formy cytokininů, mohou být ale snadno přeměněny zpět na aktivní cytokininy hydrolýzou β-glukosidázami (Brzobohatý et al., 1993). Tvorba a přeměny neaktivních zásobních forem cytokininů jsou důležité pro udržování homeostáze cytokininů.

2.2.2 Transport cytokininů

Dlouhou dobu byla za hlavní místo biosyntézy cytokininů považována špička kořene, cytokininy se ale tvoří i v mnoha nadzemních orgánech rostliny (Miyawaki et al., 2004). Z těchto míst se transportují floémem nebo xylémem do jiných částí rostliny, pokud nepůsobí přímo na místě svého vzniku (Kudo et al., 2010). Nejčastěji jsou tímto způsobem distribuovány CK typu iP a tZ, iP jsou distribuovány hlavně floémem a tZ hlavně xylémem (Hirose et al., 2008). Kromě úlohy lokální signalizace se předpokládá i působení na dlouhou vzdálenost. Cytokininy typu iP mohou sloužit jako signály z prýtu pro kořen a cytokininy typu tZ z kořene mohou regulovat metabolismus a vývoj prýtu (Hirose et al., 2008; Kudo et al., 2010).

Příkladem transportéru cytokininů na dlouhou vzdálenost je AtABCG14 z rodiny transportérů ABC (z angl. ATP-Binding Cassette). Jeho gen je exprimován v kořenech a v případě ztráty jeho aktivity u mutantní rostliny *A. thaliana* (*atabcg14*) dojde ke snížení obsahu cytokininů v prýtu. Tento poznatek dokazuje význam úlohy AtABCG14 v translokaci cytokininů do prýtu (Ko et al., 2014).

Biosyntéza, metabolismus a percepce cytokininů jsou lokalizovány v rámci buněčné kompartmentace do různých organel. K biosyntéze dochází hlavně v plastidech (Kasahara et al., 2004), ve stejném místě se nachází také β-glukosidázy, které uvolňují

biologicky aktivní formy z glukosidů cytokininového původu (ty se pro změnu akumuluji do vakuoly). Různé izoformy CKX se nachází v endoplazmatickém retikulu (ER), vakuolách i mimobuněčném prostoru. K percepci cytokininů dochází hlavně na ER (Wulfentage et al., 2011).

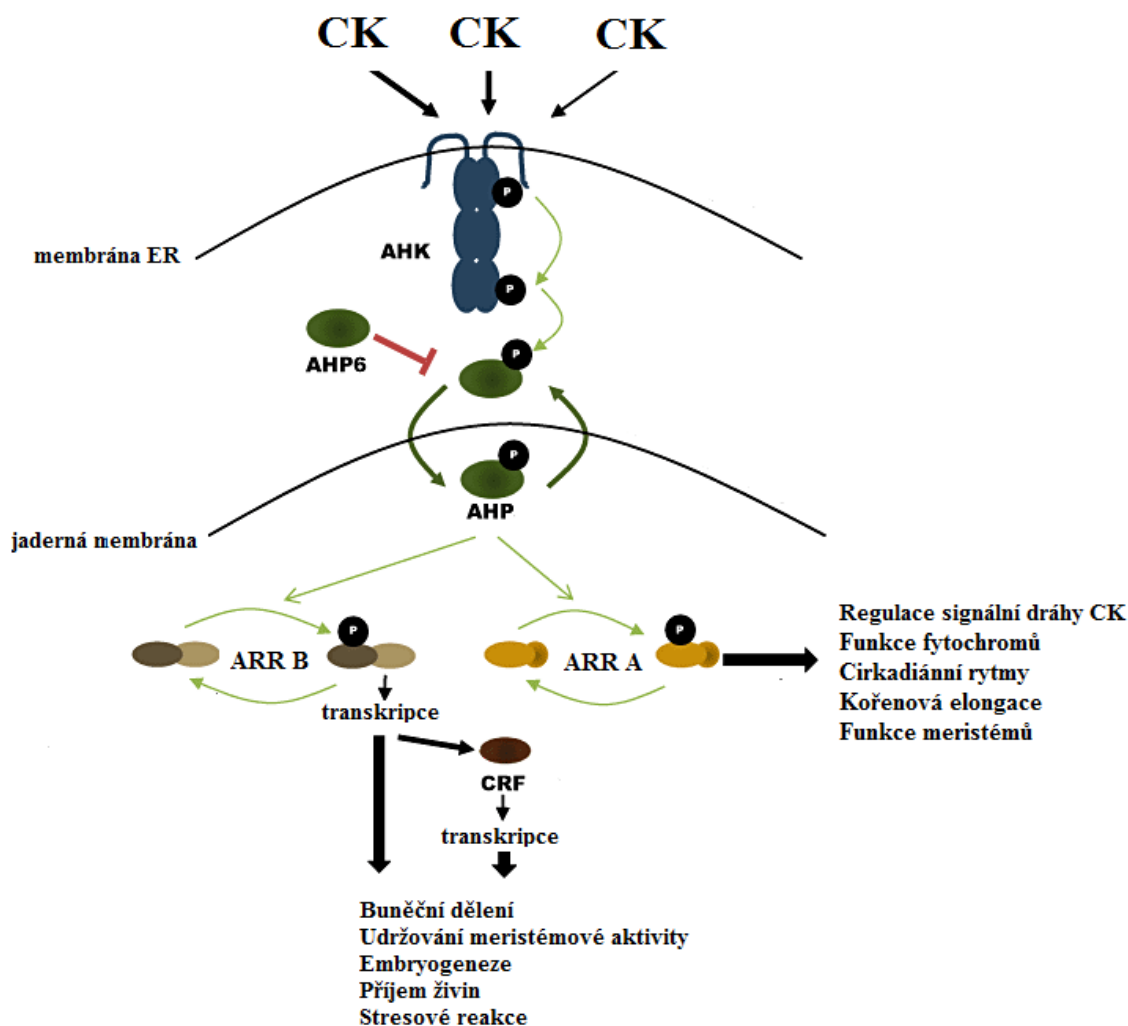
Translokace cytokininů přes buněčné membrány se pravděpodobně podobá mechanismu translokace purinů, nukleosidů a cukerných konjugátů.

Předchozí studie dokázaly, že vnitrobuněčný a mezibuněčný transport cytokininů zprostředkovávají některé z purinpermeáz (PUP), konkrétně AtPUP1 a AtPUP2 (Cedzich et al., 2008). Mezi další transportéry cytokininů patří také ENT (z angl. Equilibrium Nucleoside Transporters), nalezené v *A. thaliana* (Hirose et al., 2008).

2.2.3 Signální dráha cytokininů

Přenos signálu zprostředkovaného cytokininu u rostlin se podobá mechanismu bakteriální dvoukomponentní signální dráhy, která zahrnuje sensorické histidinkinázy, histidin-fosfotransferové proteiny a regulátory odpovědi. Rostliny mají tuto signální dráhu rozšířenou, přenos signálu spočívá ve čtyřech fosforylacích mezi histidinem a aspartátem (Schaller et al., 2011). Typická signální dráha cytokininů u *A. thaliana* zahrnuje receptory typu membránových histidinových kináz (AHK – z angl. ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE), zahrnující vazebnou doménu cytokininů CHASE (z angl. Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular) (Mougel a Zhulin, 2001), transmembránovou doménu, histidinkinázovou doménu a přijímací doménu. Součástí signální dráhy cytokininů u rostlin jsou také přenašeče fosfátu (AHP – z angl. ARABIDOPSIS HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER) a nakonec regulátory odpovědi (ARR – z angl. ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR).

AHK, z nichž převážná část je lokalizována na membráně endoplazmatického retikula (Caesar et al., 2011, Wulfentage et al., 2011), vytváří v aktivní formě dimer. Jakmile se naváže cytokinin, dochází k fosforylaci zbytků histidinu v kinázové doméně. Fosfát je pak přenesen na aspartát přijímací domény a nakonec odsud přenesen na histidin AHP, který se translokuje do jádra a zde předá fosfát na aspartát ARR. ARR typu A slouží jako negativní regulátory signální dráhy cytokininů a ARR typu B zase jako aktivátory exprese cílových genů (Kieber a Schaller, 2014).



Obr. 4 Zjednodušený model signální dráhy cytokininů. AHK – hybridní histidinkináza, AHP – přenašeč fosfátu, ARR – regulátor odpovědi, CFR – faktor odpovědi na CK (Cytokinin *Response Factor*), CK – cytokininy. Převzato a upraveno z Argueso et al. (2009).

2.2.4 Fyziologické účinky cytokininů

Cytokinininy se účastní (mnohdy i ve spolupráci s jinými fytohormony) mnoha aspektů růstu a vývoje rostlin. Mezi typické role cytokininů patří regulace buněčného dělení, regulace vývoje prýtu, kořene a cévních svazků. Zprostředkovávají i řadu fyziologických procesů závislých na světle, jako je deetiolizace a diferenciace chloroplastů (Mok, 1994). Cytokinininy dále ovlivňují senescenci, apikální dominanci, příjem živin, fylotaxi,

embryonální vývoj a mnohé další fyziologické procesy. Roli hrají i v interakcích s faktory vnějšího prostředí.

Typickou vlastností cytokininů je schopnost regulace buněčného dělení. V prýtových meristémech cytokininy indukují expresi genu *WUSCHEL* a udržují tak činnost meristému (Gordon et al., 2009). Naopak v kořenovém apikálním meristému u *A. thaliana* po ošetření cytokininy dochází k redukci počtu meristemických buněk a tím i k inhibici elongace kořene (Dello Ioio et al., 2007). Pokud dojde ke snížení hladiny endogenních cytokininů, podpoří se vývoj kořenového meristému. Cytokininy také ovlivňují správný vývoj cévních svazků (Dettmer et al., 2009), kdy regulují specifikaci pluripotentních buněk vaskulárního meristému.

Cytokininy mají podíl i v regulaci příjmu a metabolismu některých živin, jako je dusík (Takei et al., 2004a; Sakakibara, 2006; Sýkorová et al., 2008), fosfor (Martin et al., 2000), síra (Ohkama et al., 2002; Maryuama-Nakashita et al., 2004b), draslík (Nam et al., 2012) a železo (Séguéla et al., 2008). Konkrétně dochází k omezení příjmu nutrientů skrz snížení exprese jejich specifických transportérů (Argueso et al., 2009; Krouk et al., 2011; Kieber a Schaller, 2014).

2.2.5 Cytokininy v regulaci příjmu, metabolismu a odpovědi na nedostatek síry

Jak bylo řečeno v předchozím odstavci, cytokininy hrají roli v regulaci příjmu a metabolismu specifických živin. Jejich vliv na výživu sírou v rostlinách bude v této práci podrobněji studován.

Cytokininy (konkrétně zeatin) zvyšují u transgenních rostlin *A. thaliana* expresi reportérového genu, kterou řídí promotor genu původem ze sóji aktivovaný za nedostatku síry (β SR), stejně tak zvyšují i expresi *APR1* (Ohkama et al., 2002). Regulují také aktivitu tohoto enzymu na postranskripční úrovni (Kopriva et al., 2008).

Za nedostatku síry cytokininy snižují expresi transportérů síranu lokalizovaných na kořenovém povrchu (*SULTR1;1* a *SULTR1;2*) (Maruyama-Nakashita et al., 2004b). Při deficienci cytokininů se jejich exprese zvyšuje (Werner et al., 2010).

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je zjistit, jaká je role cytokininů při odpovědi na nedostatek síry u *Arabidopsis thaliana*.

Vliv cytokininů na stav výživy sírou bude sledován za pomoci analýzy exprese specifických genů účastnících se metabolismu síry a odpovědi na její nedostatek a dále stanovením obsahu glutathionu, který představuje hlavní zásobní formu redukované síry. Bude pozorováno, zdali snížená dostupnost síry/deficience síry zahrnuje změnu obsahu a signalizace cytokininů. Význam cytokininů v koordinaci odpovědi na nedostatek síry bude dále sledován u rostlin deficientních v signalizaci cytokininů – zde bude pozorována elongace kořene a také hladina glutathionu.

Experimentální práci pak předchází zpracování literární rešerše shrnující význam síry, odpověď rostlin na její nedostatek, metabolismus cytokininů a jejich význam v regulaci minerální výživy.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Rostlinný materiál

V experimentální části této práce byl použitý standardní rostlina huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), ekotyp Columbia (Col-0), ze kterého byly rovněž odvozeny použité mutantní a transgenní linie. Mutantní linie *ahk2ahk3*, *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4* insensitivní vůči cytokininům (Riefler, 2006) byly laskavě poskytnuty prof. Schmöllingem a linie *TCSnew::GFP* (Two Component signaling Sensor::green fluorescent protein) (Zürcher et al., 2013) poskytnul Dr. Müller.

4.2 Kultivace

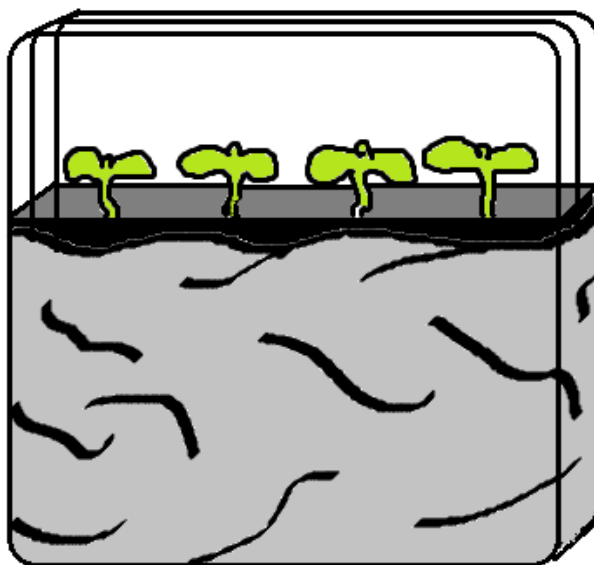
V průběhu typického experimentu byly použity dvě varianty kultivačního média, obě bez vitamínů a antibiotik, konkrétně běžné poloviční MS (Murashige-Skoogovo) médium s optimálním obsahem živin a médium prosté síry či dusíku (dle povahy experimentu). Médium bez zdroje síry/dusíku bylo připraveno nahrazením solí MS patřičnými chloridy v ekvimolárním množství. Místo složky MS (½) byly do média přidány veškeré soli jednotlivě. Síranové a nitrátové soli byly nahrazeny odpovídajícími chloridovými solemi ($MgCl_2$ v médiu prostém síry, KCl v médiu prostém dusíku namísto KNO_3). V kontrolním médiu pak byl $MgSO_4$ (0,75 mM) jediným zdrojem síry. Hodnota pH byla upravena na 5,7.

Tab. 1 Složení ½ MS kultivačního média (pH 5,7)

složky média (<i>Duchefa Biochem</i>)	množství na 1000 ml média
MS – Murashige-Skoog	2,15 g
MES	0,3 g
plant agar	10 g
destilovaná voda	1000 ml

Namíchané médium jsem vysterilizovala v autoklávu, po vychlazení na cca 60 °C jsem médium rozlila ve flowboxu do čtvercových (12×12cm) Petriho misek. Semena jsem

povrchově sterilizovala 75% roztokem ethanolu po dobu 5 minut a vysela přímo na agarem ztužené $\frac{1}{2}$ MS médium, nebo na polyamidové síťky (Uhelon 120 T, Silk&Progress, Česká republika) položené na médium. Pro kultivace určené k následné analýze genové exprese nebo stanovení metabolitů jsem cca 100 semen rozmístila po ploše do horní poloviny misky. V případě fenotypových analýz byla semena vyseta do řady v počtu cca 15-20 na misku. Po výsevu jsem misky zalepila paropropustnou páskou z netkané textilie. Po stratifikaci semen při 4 °C po dobu 3 dnů byly rostliny vertikálně kultivovány v růstové komoře (AR36LX, Percival Scientific) za podmínek dlouhého dne (16 h světlo/8 h tma), denní/noční teploty 21 °C/19 °C, světelné intenzitě 120 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (případně 20 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při kultivaci pro analýzu elongace kořene) a relativní vlhkosti 60 %. V případě kultivace pro sledování elongace kořenů byla část misky obalena vrstvou černé fólie a nad ní vrstvou alobalu (viz Obr. 5) (Novák et al., 2015). Při ošetření benzylaminopurinem (BA) byl zásobní roztok BA v DMSO přidán do autoklávovaného média po ochlazení na 60 °C a do kontrolního média bylo přidáno DMSO (0,02 %; koncentrace odpovídající množství DMSO v médiu s BA). Vzorky rostlin byly sbírány mezi devátou a jedenáctou hodinou denního cyklu, rychle zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány za teploty -80 °C.



Obr. 5 Schématické znázornění způsobu kultivace se zastíněnými kořeny.

4.3 Analýza genové exprese

Pro sledování hladin transkriptů vybraných genů byla použita kvantitativní polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (RT-qPCR). Metodě předcházela izolace celkové RNA pomocí Trizol reagentu.

Izolace RNA

Vzorky rostlin byly před samotnou izolací mechanicky zhomogenizovány v tekutém dusíku. K 100 mg homogenizátu byl přidán (ještě před roztáním) 1 ml Trizol reagentu (Invitrogen) a vzorky byly inkubovány 5 minut. Následně bylo do každého přidáno 200 μ l chloroformu a každá zkumavka se vzorkem byla intenzivně třepána 15 sekund kvůli odstranění fenolu z vodné fáze. Pak se vzorky nechaly 3 minuty odstát.

Centrifugace probíhala při 14 000g/15 min/4 °C. Do čistých zkumavek byly odebrány vodné fáze tak, aby se nenarušila DNA-lipidová vrstva mezi vodnou a fenolovou fází. K odebraným vodným fázím bylo přidáno 500 μ l izopropanolu a RNA se nechala srážet 10-15 minut za laboratorní teploty. Po uplynutí této doby byla zopakována centrifugace, vodná fáze byla opět odstraněna a pelet promyt 75% ethanolem. Nakonec byly pelety v otevřených zkumavkách sušeny v bezprašném prostředí Petriho misky při 30 °C. Po vysušení se pelety nechaly rozpustit v 25-50 μ l (podle velikosti peletu) vody ošetřené DEPC (diethylpyrokarbonátem), zautoklávované (v této fázi bylo možné skladovat vzorky při -80 °C). RNA bylo při manipulaci nutné udržovat na ledu.

Vyizolovaná RNA byla inkubována s DNázou (TurboDNase, Life Technologies), aby se odstranila kontaminace DNA. Po přidání 1 μ l 25mM EDTA k 10 μ l extraktu RNA byla DNáza byla inaktivována teplotou 65 °C po dobu 5 minut.

Integrita RNA byla sledována pomocí gelové elektroforézy, absence kontaminující DNA pomocí qPCR. Koncentrace RNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific, USA).

Reverzní transkripce

K 1 μ l 100 mM oligo(d)T primerů byl přidáno 1 až 4 μ g celkové RNA a voda ošetřená DEPC. Jeden vzorek určený k reverzní transkripci tak měl celkový objem 12,5 μ l.

Vzorky byly inkubovány v cykleru PTC 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) při 65 °C po dobu 10 minut a poté prudce zchlazeny v ledové tříšti. K nim se přidalo 1 μ l 100 mM dNTP, reverzní transkriptázy (SuperScriptII, Invitrogen) a pufr. Celkový objem reakce tak byl 20 μ l. Následně proběhla inkubace (přepisování RNA do cDNA) v cykleru při programu 42 °C po 55 minut a nakonec inaktivace reverzní transkriptázy při 70 °C po dobu 15 minut.

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

qPCR byla provedena s komerčním mastermixem (Light Cycler 480 Sybr Green I Master, Roche) na cykleru Roche Light Cycler 480 Instrument II (Roche, Německo) podle doporučeného protokolu. Program teplotního režimu qPCR byl: 95 °C/5 min, 42 cyklů 95 °C/15 s, 58 °C/15 s, 72 °C/20 s, detekce fluorescence

Specifita amplifikace byla ověřena analýzou tání produktu PCR. Reakce byly provedeny vždy ve třech opakováních. Pro každý vzorek a gen byla identifikována hodnota C_p (metoda „Second Derivative Maximum“). Relativní množství cDNA bylo spočítáno pomocí standardní křivky, která byla připravena řadou ředění koncentrované cDNA. Hladina exprese byla normalizována vůči třem referenčním genům (*UBQ10*, *At4g26410* a *ACT2*) pomocí appletu GeNorm (Vandensompele et al., 2002).

Primery, se kterými se na Ústavu pracuje již delší čas, navrhl Mgr. Pavlů nebo Dr. Souček pomocí programu OLIGO 7 Primer Analysis Software. V tabulce 2 jsou uvedeny sekvence použitých primerů.

Tab. 2 Primery použité pro qPCR

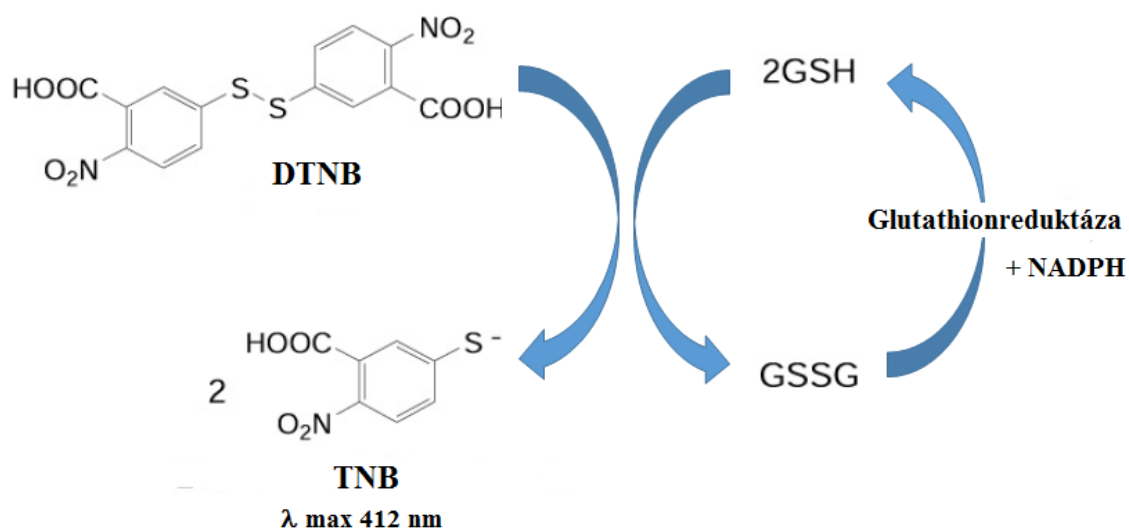
Lokus	Gen	přímý primer 5' - 3'	zpětný primer 5' - 3'
<i>A. thaliana</i>			
At4g05320	UBQ10	AACGGGAAAGACGATTAC	ACAAGATGAAGGGTGGAC
At3g18780	ACT2	GCTTCTCCATTTGTTTGT	GCATCAATTCGATCACTCA
At4g26410	At4g26410	CAATGCGTTCTGCTCGTT	GCGACACCAATCCCAATA
At3g48100	ARR5	GCTGATAGAACCAAGACTGA	CTTCCAAAATAACACACCAC
At1g19050	ARR7	AGGAATGAAGCTGAGGAAT	CTAAGGTCTTGGCCTCTAT
At4g08620	SULTR1;1	CTAGCAAATCCAGGACCA	GCTCAGCCACTTCCGTA
At1g78000	SULTR1;2	GGTAAAAGCAGCAAGCCTA	GGCATCAGCCACCGTT
At4g21990	APR3	GGGAGGAAGTGGTGTGAAG	GCGGATTTTATTGCGGATT
At4g35640	SERAT3;2	CCATCTATGACAATGGAGCA	TTGATGATGAAAACCGCTT
At3g12520	SULTR4;2	ATCCTGGAAATGTCTCCTGT	TTGGTTTGCTGCTTTCTTCT
At5g26220	GGCT2;1	TTGTGGGAACAACCGAGAG	GACCCGTTGACGAGTGGA
At2g44460	BGLU28	CGATCTCACTCGTATTCCCA	CGCATTGATCTCTTTCTTCC
At1g36370	SHM7	GACACCCGCAATGACAA	CGAATAAGAGAAGCAGGCA
At5g48850	SDI1	GCCAGATGCTAACAAATCGT	CATCCGTGGCAGCGAA
At3g49580	LSU1	GGCGGAAGAGATGGATGA	CGAGGAAGAGACGACAGAAG
At5g24660	LSU2	GCCGAGCTTGAAGCAGA	GATATGAGCCGATAAGAGGA
At3g63110	IPT3	TTTTTCAGGAACGAGCAGT	TTGGACCTTCGCTTTGTA
At5g19040	IPT5	CGGTGGACTAGTCAGGTT	ACTTCACAGCCGTTTGATT
At3g23630	IPT7	ACGTACAGGTGTGACATT	ATATCGTGGCACAAGGAA
At1g67110	CYP735A2	CATGATGGAGGCGAAGATA	AATCCCTCATGTCACTCAA
Oligo(d)T primer pro reverzní transkripci			
		CGTTTCGACGGTACCTACGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	

4.4 Stanovení glutathionu

Celkový glutathion byl stanoven spektrofotometricky za použití modifikované enzymové metody podle Luwe et al. (1993). 200 mg rostlinného materiálu bylo zhomogenizováno v kapalném dusíku a glutathion byl extrahován 900 µl 2% kyseliny metafosforečné (Sigma). Zkumavky s extrakty byly centrifugovány při 10 000 g 15 minut za teploty 4 °C. 50 µl extraktu bylo po centrifugaci před měřením neutralizováno v 500 µl 25 mM Na₂HPO₄. Koncentrace glutathionu (sumy GSH a GSSG) byla stanovena v kinetické extrakci sledováním změny absorbance při 412 nm po dobu 1 minuty (Obr. 6).

900 µl reakční směsi obsahovalo tyto složky – 111mM draselný/didraselný fosfátový pufr (pH 7,5); 6,3mM EDTA; 0,23 mM NADPHNa₄ (Sigma); 1,2 U kvasinkové

glutathionreduktáza (Sigma) a 0,67mM 5,5'-dithiobis-(2-nitro)-benzoová kyselina (Sigma). Produktem reakce byla žlutá kyselina thionitrobenzoová, jejíž koncentrace je přímo úměrná koncentraci glutathionu ve vzorku (Obr. 6). Byla také provedena kontrolní reakce za absence extraktu. Koncentrace celkového glutathionu byla spočítána za pomoci koncentrační řady. Nutno podotknout, že obsah glutathionu byl sledován díky své funkci hlavní zásobní formy síry, proto jsem nestanovovala jednotlivě obsah redukovaného a oxidovaného glutathionu, pouze glutathion celkový.



Obr. 6 Schéma reakce potřebné pro spektrofotometrické stanovení glutathionu. DTNB - kyselina dithionitrobenzoová, TNB - kyselina thionitrobenzoová, GSH - redukovaná forma glutathionu, GSSG - oxidovaná forma glutathionu. Schéma převzato z <http://www.biovision.com/manuals/K261.pdf> a upraveno.

4.5 Stanovení antokyanů

40 až 120 mg rostlinného materiálu bylo zhomogenizováno v kapalném dusíku. Ke vzorkům bylo přidáno 0,75 ml 1% HCl v methanolu (1:99), protřepaly se, přidalo se k nim 0,5 ml destilované vody a znovu se roztřepaly. Okamžitě se uvolnily barviva.

Následně byly vzorky centrifugovány při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut za pokojové teploty. Po centrifugaci byla odebrána vodno-methanolvá fáze do nové čisté zkumavky. K fázi bylo přidáno 200 μl chloroformu, vzorek se opět intenzivně protřepal a nechal odstát do doby, než se ustálila chloroformová a vodno-methanolvá fáze (tímto krokem byly separovány chlorofyly). Byla zopakována centri-

fugace za stejných podmínek po dobu 10 minut. Fialová vodno-methanolová fáze s anthokyaniny byla oddělena do nové Eppendorfovy zkumavky.

Koncentrace antokyaninů byla stanovována spektrofotometricky za vlnových délek 530 a 657 nm. Pro kontrolu byl použit k měření i slepý vzorek namíchaný z methanolu a vody (0,75 ml ku 0,5 ml). Výsledné absorbance byly přepočítány na navážku podle vzorce $A_{530} - 0,25 \times A_{657}/FW$ (FW – čerstvá hmotnost). Metodika izolace antokyaninů byla převzata od Rodriguez-Saona a Wrolstad (2001).

4.6 Analýza elongace kořenů

Rostliny *A. thaliana* (staré 21 dní) byly fotografovány fotoaparátem Canon EOS 600D. Délka kořenů byla měřena pomocí softwarového programu ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.7 Fluorescenční mikroskopie

Na fluorescenčním mikroskopu (Olympus IX70) byly pozorovány kořenové špičky mutantních rostlin *A. thaliana TCS::GFP new*, staré 12 až 21 dní podle variace experimentu. Pozorování bylo prováděno pod objektivovým zvětšením 4× za osvětlení UV zářením. Špičky kořenů se odsekly zhruba 1,5 cm od konce a byly ihned vkládány na podložní sklíčko do kapky destilované vody a přiklopeny krycím sklíčkem. Intenzita fluorescenčního signálu GFP byla vyhodnocena pomocí softwarového programu ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.8 Statistické zpracování a prezentace dat

Data v tabulkách a grafech jsou většinou prezentována jako průměry z absolutních hodnot získaných ze vzorků. K hodnotám byly spočítány směrodatné odchylky (SD) podle vzorce:

$$SD = \sqrt{\left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i^2 \right) - \bar{x}^2}$$

Data genové exprese jsou prezentována jako relativní hodnoty, tj. podíly průměrných hodnot získaných ze vzorků ošetřených sledovanou látkou (či vystaveným specifickým

podmínkám) a průměrných hodnot získaných z kontrolních vzorků. Pro tyto podíly byly spočteny standardní odchylky dle vzorce použitého v práci Novák et al. (2013):

$$SD = \frac{\bar{X}_1}{\bar{X}_2} \sqrt{\left(\frac{SD_1}{\bar{X}_1}\right)^2 + \left(\frac{SD_2}{\bar{X}_2}\right)^2}$$

Z nich byly následně spočítány standardní chyby (SE), které jsou prezentovány v tabulkách, dle vzorce:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Pro zhodnocení statistické významnosti rozdílů mezi soubory dat byl použit Studentův *t*-test (příp. ANOVA) na hladině významnosti $P < 0,05$.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předchozí studie prokázaly, že cytokininy regulují příjem a metabolismus síry, jejich účinek je však rozporuplný. Cytokininy totiž nadregulují i podregulují geny účastníci se příjmu a asimilace síry.

5.1 Účinek cytokininů na expresi genů spojených s metabolismem síry a odpovědí na její nedostatek

Účinek cytokininů je spojen s redukcí příjmu síranu díky podregulaci SULTR skupiny 1 (Maruyama-Nakashita et al., 2004b) a potlačením aktivace genu pro APR2 při deficienci síry (Dan et al., 2007). Okhama et al. 2002 však pozorovali, že působení cytokininů je spojeno s indukcí genů, které jsou nadregulovány při deficienci síranu (β -konglycinin, *APR1*, *SULTR2;1*). Cytokininy tedy mají pozitivní i negativní vliv na expresi genů, které jsou indukované nedostatkem síry. Abychom objasnili tento rozpor, tedy zda mají cytokininy spíše pozitivní nebo negativní účinek při obecné odpovědi na nedostatek síranu, sledovali jsme expresi typických expresních markerů nedostatku síry. Mezi tyto typické geny nadregulované při nedostatku síry patří *ADENOSINE-5'-PHOSPHOSULFATE REDUCTASE 3 (APR3)*, *SULFATE TRANSPORTER 4;2 (SULTR4;2)*, *SERINE ACETYLTRANSFERASE 3;2 (SERAT3;2)*, *GAMMA-GLUTAMYL CYCLOTRANSFERASE 2;1 (GGCT2;1)*, *SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE 7 (SHM7)*, *BETA GLUCOSIDASE 28 (BGLU28)*, *SULFUR DEFICIENCY-INDUCED 1 (SDI1)*, *RESPONSE TO LOW SULFUR 1 (LSU1)* a *RESPONSE TO LOW SULFUR 2 (LSU2)* (Hirai et al., 2003; Nikiforova et al., 2003; Maruyama-Nakashita et al., 2003; Maruyama-Nakashita et al., 2005; Maruyama-Nakashita et al., 2006; Howarth et al., 2009; Lee et al., 2012; Zhang et al., 2014; Bielecka et al., 2014).

Expresí genů odpovědi na nedostatek síry v *A. thaliana* byla sledována po 24hodinovém působení benzylaminopurinu (BA) a pro kontrolu také po 24hodinovém vystavení nedostatku síry. V průběhu byly všechny sledované geny odpovědi na nedostatek síry po působení BA nadregulovány, podle očekávání s výjimkou *SULTR1;1* a *SULTR1;2*, které se po působení BA podregulovaly také v kořeni (Maruyama-Nakashita et al., 2004) (Tab. 3). Ke zvýšení exprese genů odpovědi

na nedostatek síry došlo také ve vzorcích kořene. Zatímco odpověď na nedostatek síry se v kořeni projevila u všech sledovaných genů, po 24hodinovém působení BA se nadregulovaly pouze geny *GGCT2;1*, *BGLU28* a *LSU2* (Tab. 3).

Tab. 3 Regulace genů spojených s odpovědí na nedostatek síry při změně hladiny cytokininů. Byly použity standardní rostliny staré 12 dnů, ošetřené 5μM BA po dobu 24 hodin. Pro kontrolu a indukci odpovědi na nedostatek síry byly rostliny také přeneseny na médium bez obsahu zdroje síry na dobu 24 h. Hodnoty vyjadřují relativní expresi oproti kontrole (hodnota 1) (tj. rostliny ošetřené 0,02% DMSO). Výsledky jsou prezentovány jako průměry (± standardní chyba), získány nejméně ze čtyř vzorků. Hvězdičky značí statisticky signifikantní rozdíly na hladině $P < 0,05$ (*t*-test), nadregulace je zvýrazněna červenou barvou, podregulace zelenou.

Col-0	prýt		kořen	
<i>GEN</i>	BA	-S	BA	-S
<i>APR3</i>	3,2 ± 2,0	1,9 ± 0,7 *	1,0 ± 0,3	2,3 ± 0,5 *
<i>SERAT3;2</i>	2,3 ± 0,7 *	3,4 ± 1,0 *	1,2 ± 0,4	7,1 ± 2,1 *
<i>SHM7</i>	1,7 ± 0,4 *	3,9 ± 0,6 *	1,0 ± 0,2	3,5 ± 0,7 *
<i>SULTR4;2</i>	2,1 ± 0,4 *	3,0 ± 0,6 *	1,0 ± 0,2	2,8 ± 0,6 *
<i>GGCT2;1</i>	3,7 ± 1,1 *	4,8 ± 1,5 *	21,0 ± 5,2 *	22,9 ± 6,5 *
<i>BGLU28</i>	3,8 ± 1,3 *	17,8 ± 6,2 *	51,9 ± 41,3	692,5 ± 530,4
<i>SDII</i>	9,6 ± 3,9 *	18,3 ± 6,1 *	1,0 ± 0,4	14,3 ± 5,7 *
<i>LSU1</i>	6,4 ± 2,1 *	7,7 ± 2,5 *	0,6 ± 0,2	4,0 ± 1,1 *
<i>LSU2</i>	2,0 ± 0,5 *	2,4 ± 0,7 *	2,8 ± 0,6 *	4,5 ± 0,1 *
<i>SULTRI;1</i>	0,2 ± 0,7	2,5 ± 1,4	0,2 ± 0,1 *	8,0 ± 1,0 *
<i>SULTRI;2</i>	0,5 ± 0,4	0,9 ± 0,5	0,2 ± 0,1 *	1,5 ± 0,2 *

Z výsledných hodnot exprese vyplývá, že účinek cytokininů vyvolává odpověď podobnou odpovědi vyvolané nedostatkem síry. Tato odpověď je patrně spojena s indukcí asimilace síry a remobilizací zásobních forem síry.

Zvýšení asimilace síry indikuje nadregulace genů *APR3*, *SERAT3;2* a *SHM7*. *APR* a *SERAT* jsou klíčové enzymy asimilace síry (Kopriva, 2006). *SHM7* kóduje domnělou serinhydroxymethyltransferázu, uplatňující se v interkonverzi glycinu a serinu (prekurzor O-acetylserinu), která je součástí fotorespirace. Serinhydroxymethyltransferáza také hraje roli v metabolismu methioninu, purinů, pyrimidinů a lipidů. Zvýšení exprese genu *SHM7* patří mezi typické odpovědi na nedostatek síry (Nikiforova et al., 2005; Hoefgen a Nikiforova, 2008).

Produkty genů *SULTR4;2*, *GGCT2;1* a *BGLU28* (které jsou indukovány cytokininy) se pro změnu podílejí na redistribuci a remobilizaci zásobních forem síry. Transportér síranu *SULTR4;2* (lokalizován na tonoplastu) pak zprostředkovává výstup zásobního síranu z vakuoly (Kataoka et al., 2004a; Dan et al., 2007).

Hlavní zásobní formou redukované síry je glutathion, v jehož degradaci hraje podstatnou úlohu enzym *GGCT2;1* (Ohkama-Otsu et al., 2008; Paulose et al., 2013). *GGCT2;1* představuje jediný z (v této práci sledovaných) markerů nedostatku síry, jehož nadregulace po působení cytokininů byla identifikována v globálních expresních studiích (Rashotte et al., 2006; Lee et al., 2007).

Další zásobní formou síry jsou sekundární metabolity čeledi *Brassicaceae* - glukosinoláty (Maruyama-Nakashita et al., 2003; Hirai et al., 2004; Dan et al., 2007). *BGLU28* kóduje thioglukosidázu (myrosinázu), která štěpí glukosinoláty za uvolnění aglykonu. Z něj se může generovat síran (Grubb a Abel, 2006).

Nebyly dosud zcela objasněny biologické funkce genů *SDII*, *LSU1* a *LSU2*. U *SDII* je uvažováno o jeho funkci v regulaci hladin zásobních forem síry. Rostliny *A. thaliana* s mutací *sdi1* měly po 3 dnech růstu na nedostatku síry naměřeny vyšší koncentrace síranu v listech a kořenech oproti rostlinám divokého typu (Howarth et al., 2009).

Geny z rodiny *LSU* (*LOW SULFUR INDUCED*), regulované nedostatkem síry i působením cytokininů také nemají dosud plně objasněnou funkci. Potlačení exprese („knock-down“) genů *LSU* u tabáku vedlo k pozměněným odpovědím na nedostatek síry, např. ke snížení hladiny glutathionu v kořenech (Moniuszko et al., 2013; Sirko et al., 2014). U tabáku byl také prokázán stimulační vliv proteinů *LSU* na tvorbu etylénu při deficienci síry. Jako možný důvod tohoto jevu je uvažována interakce s ACC-oxidázou (důležitý enzym v dráze biosyntézy etylénu) (Moniuszko et al., 2013). Zajímavé je, že účinek cytokininů je spojen se zvýšenou tvorbou etylénu. Ke zvýšení syntézy etylénu při působení cytokininů dochází díky stabilizaci ACC-syntázy (Vogel et al. 1998; Chae et al. 2003). V proteomické studii Žďárské et al. (2013) bylo navíc pozorováno zvýšení hladiny u ACC-oxidázy po působení cytokininů. Indukce *LSU* po působení cytokininů tedy může představovat chybějící článek vedoucí ke zvýšení ACC-oxidázy po ošetření cytokininy, a tím stimulaci tvorby etylénu.

Nutno dodat, že většina sledovaných genů odpovídi na nedostatek síry je regulována transkripčním faktorem *SLIM1* (Maruyama-Nakashita et al., 2006). V případné

budoucí studii by bylo zajímavé objasnit roli SLIM1 v indukci genů odpovědi nedostatku síry po působení cytokininů.

Indukce exprese genů, které se účastní asimilace síry a remobilizace jejích zásobních forem, po působení cytokininů ukazuje na další, doposud nepopsanou, roli cytokininů při růstu a vývoji rostlin. Cytokininy se uplatňují jako atraktanty živin, jakými jsou nitrát a cukry (Sýkorová et al., 2008; Balibrea Lara et al., 2008). Nutno dále dodat, že metabolismy dusíku, uhlíku a síry jsou koordinovány a udržovány ve vzájemné rovnováze (Rennenberg a Kopriva, 2004). Zvýšení asimilace a remobilace síry účinkem cytokininů může sloužit k udržení rovnováhy těchto klíčových nutrientů a zajištění dostupnosti živin v místech růstu.

5.1.1 Role dusíku v odpovědi na nedostatek síry vyvolané cytokininy

Metabolismus dusíku a síry u rostlin jsou spolu vzájemně koordinovány, a to tak, že při deficienci jednoho nutrientu dojde k utlumení metabolismu druhého nutrientu (Prosser et al., 2001; Kopriva a Rennenberg et al., 2004). Metabolismus, příjem i signální dráha dusíku je regulována mj. cytokininy (Sakakibara, 2006; Kudo et al., 2010), což vytváří další možné spojení cytokininů s metabolismem síry. Spojení stavu výživy dusíkem s odpovědí na nedostatek síry vyvolanou cytokininy jsem sledovala u rostlin vystavených deficienci dusíku a/nebo ošetřených BA. Míra indukce genů odpovědi na nedostatek síry byla při působení BA a deficienci dusíku (oproti působení BA samotného) nezměněna, snížena (*SULTR4;2*, *GGCT2;1*, *BLU28*) i zvýšena (*LSUI*) (Tab. 4). Přestože nejsou všechny výsledky zdaleka statisticky signifikantní, je možné z nich vyvodit některé poznatky. Pozorované snížení exprese genů asimilace síranu (*APR* a *SERAT3;2*) za deficiencie dusíku (Tab. 4), i některých dalších genů účastnících se metabolismu síry, je v souladu s poznatkem o koordinaci metabolismu síry a dusíku (viz výše).

Tab. 4 Regulace genů spojených s metabolismem a odpovědí na nedostatek síry při změně hladiny cytokininů a zároveň změně dostupnosti dusíku (N). Expres byla stanovena u prýtlů standardních rostlin (Col-0), stáří 12 dnů, dle varianty ošetřené 5 μM BA a/nebo kultivované na médiu s nedostatkem dusíku po dobu 24 hodin. Hodnoty vyjadřují relativní expresi oproti kontrole, tj. rostlinám pěstovaným na médiu s optimálním množstvím živin (hodnota 1). Výsledky jsou prezentovány jako průměry (± standardní chyba) z nejméně čtyř vzorků. Nadregulace je zvýrazněna červeně, podregulace zeleně. Statisticky signifikantní rozdíly jsou vyznačeny hvězdičkami (hladina $P < 0,05$; t -test).

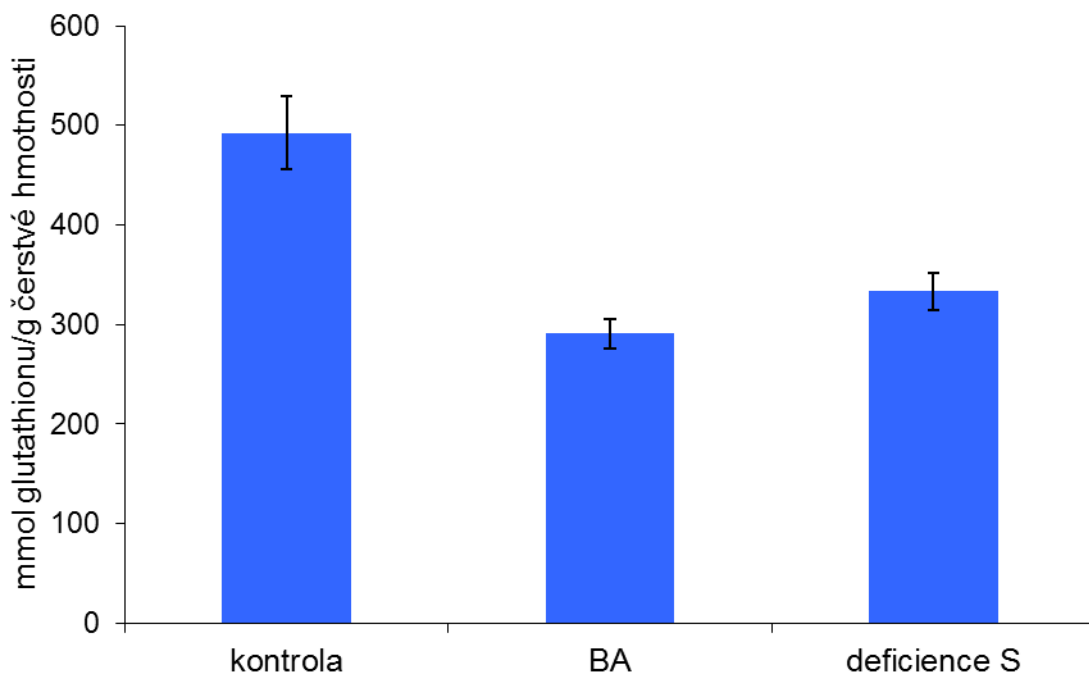
Col-0 <i>GEN</i>	BA		kontrola	
	$\frac{1}{2}$ MS	-N	-N/ $\frac{1}{2}$ MS	
<i>APR3</i>	1,69 ± 0,5	4,56 ± 0,2	0,20 ± 0,04	*
<i>SERAT3;2</i>	4,12 ± 2,4	2,08 ± 0,5	0,53 ± 0,3	
<i>SHM7</i>	2,49 ± 0,8	1,99 ± 0,4	0,63 ± 0,2	
<i>SULTR4;2</i>	2,91 ± 1,3	1,13 ± 0,4	0,92 ± 0,3	
<i>GGCT2;1</i>	13,63 ± 5,1	4,18 ± 1,4	1,22 ± 0,3	
<i>BGLU28</i>	16,96 ± 7,9	0,88 ± 1,5	0,88 ± 1,5	
<i>SDII</i>	32,71 ± 12,2	38,84 ± 2,0	0,20 ± 0,04	*
<i>LSU1</i>	18,87 ± 7,1	89,58 ± 4,0	0,08 ± 0,04	*
<i>LSU2</i>	5,75 ± 2,7	3,8 ± 0,9	0,71 ± 0,3	

Jeden ze sledovaných genů, který nebyl při deficitu dusíku podregulován, byl *GGCT2;1*. Degradace glutathionu aktivitou GGCT za účelem poskytnutí cysteinu má význam nejen při nedostatku síry. Glutathion může být rovněž využíván jako zdroj glutamátu; role *GGCT2;1* v homeostázi dusíku byla popsána v práci Paulose et al. (2013). Udržení stálé exprese *GGCT2;1* při deficienci dusíku však naznačuje, že glutathion není rapidně využíván jako zdroj dusíku při jeho nedostatku.

Vliv deficiencie dusíku na indukci genů odpovědi na nedostatek síry cytokininu byl spíše komplexní – míra nadregulace sledovaných genů se jak zvýšila, tak výrazně nezměnila i snížila. Ztráta nadregulace *SULTR4;2* a *BGLU28* (spolu s oslabením míry nadregulace *GCCT2;1*) po působení cytokininů za podmínek deficitu dusíku ukazuje, že proces remobilizace síry ze zásobních forem při působení cytokininů za podmínek deficiencie dusíku pozbývá významu, což však patrně neplatí v případě asimilace síranu (geny *APR3*, *SERAT3;2*, *SHM7*).

5.2 Obsah glutathionu při odpovědi na působení cytokininů

Hladina glutathionu je v rostlinách ovlivněna dostupností síranu (Nikiforova et al., 2003; Maruyama-Nakashita et al., 2003). Podobnost účinku cytokininů s odpovědí na nedostatek síry byla proto dále ověřena i na metabolické úrovni, zde jsem sledovala obsah glutathionu. Rostliny byly přeneseny na médium prosté síry a na médium s optimálním zastoupením živin s přidavkem BA a následně kultivovány dalších 24 hodin. U rostlin kultivovaných na nedostatku síranu došlo ke snížení obsahu glutathionu na cca 67 % hladiny glutathionu v kontrolních rostlinách. Po ošetření BA hladina glutathionu poklesla na cca 59 % kontrolní hladiny (Obr. 7).



Obr. 7 Obsah celkového glutathionu při nedostatku síry nebo působení cytokininů. Standardní rostliny byly přeneseny na médium prosté síry nebo na médium s $5\mu\text{M}$ BA po dobu 24 hodin. Graf znázorňuje průměrné hodnoty se standardními odchylkami, získané nejméně z pěti vzorků. Snížení hladiny glutathionu bylo statisticky významné na hladině $P < 0,05$ (t-test).

Z výsledného grafu vyplývá, že snížení příjmu síranu u rostlin ošetřených cytokininou nemůže být jediným důvodem snížení obsahu glutathionu. Při deficitu síranu (nulový příjem síranu) je pokles glutathionu ve srovnání s působením cytokininů pomalejší - při sledování (časového) průběhu snížení glutathionu u rostlin ošetřených BA došlo

k výraznému snížení obsahu glutathionu již po 8 h působení BA (Pavlů et al., 2015). Při nedostatku síry bylo pozorováno relativně pomalé snížení glutathionu i v pracech Howarth et al. (2009) a Kawashima et al. (2011).

Příčinou snížené hladiny glutathionu po působení cytokininů může být jeho zvýšená degradace, kterou naznačuje indukce klíčového enzymu degradace glutathionu GGCT2;1 (Ohkama et al., 2008; Paulose et al., 2013) (Tab. 4).

Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda dostupnost síry má vliv na obsah, či signální dráhu cytokininů. V následujících třech podkapitolách je popsáno hledání role cytokininů v regulaci odpovědi na nedostatek síry.

5.3 Exprese genů spojených s metabolismem cytokininů v odpovědi na nedostatek síry

Pro hlubší porozumění reciprokého účinku nedostatku síry na regulaci cytokininů u *A. thaliana* byla sledována exprese vybraných genů spojených s biosyntézou, metabolismem a signální dráhou cytokininů. Pilotní experimenty Mgr. Jaroslava Pavlů (Tab. přílohy 1) prokázaly, že u *A. thaliana* v kořeni dochází ke snížení exprese některých genů spojených s cytokininy. Mezi geny podregulované u kořene na nedostatku síry patřily *IPT3*, *5* a *7* (*ISOPENTENYLTRANSFERASE*), *CYP735A2* (*CYTOKININ HYDROXYLASE*) a *ARR7* (*TWO COMPONENT RESPONSE REGULATOR ARR7*), a stanovení jejich exprese v odpovědi na nedostatek síry jsem zopakovala. Sledovala jsem také expresi genu odpovědi na nedostatek síry *SDII* pro ověření dostupnosti resp. deficiencie síry v kultivačním médiu. Gen se nadreguloval, čímž se prokázalo, že rostliny byly kultivovány za správných podmínek.

U všech sledovaných genů spojených s cytokininy došlo u kořene po 24 hodinách na nedostatku síry k podregulaci, čímž byly potvrzeny výsledky výše zmíněného pilotního experimentu.

Tab. 5 Regulace genů spojených s metabolismem a signální dráhou cytokininů při deficienci síry. Genová exprese byla stanovena u rostlin starých 12 dní vystavených nedostatku síry po dobu 24 hodin. Hodnoty vyjadřují relativní expresi oproti kontrole (hodnota 1) (tj. rostliny ošetřené médiem s optimálním zastoupením živin). Výsledky jsou prezentovány jako průměry (\pm standardní chyba), které byly získány nejméně ze čtyř vzorků. Hvězdičky značí statisticky signifikantní rozdíly na hladině $P < 0,05$ (t -test), nadregulace je zvýrazněna červenou barvou, podregulace zelenou.

Col-0	kořen	
<i>GEN</i>	-S	
<i>IPT3</i>	0,6 \pm 0,1	*
<i>IPT5</i>	0,8 \pm 0,1	*
<i>IPT7</i>	0,7 \pm 0,1	*
<i>CYP735A2</i>	0,3 \pm 0,1	*
<i>ARR7</i>	0,7 \pm 0,1	*
<i>SDII</i>	12,6 \pm 1,0	*

Za deficiencie síry by mělo hypoteticky docházet v kořenech rostlin ke snížení signalizace cytokininů, aby se snížil negativní dopad cytokininů na vývoj architektury kořene a příjem síranu. Podregulace genů *IPT3*, *IPT5* a *IPT7*, jakožto klíčových genů kódujících enzymy biosyntézy cytokininů isopentenyltransferázy ukazuje na pravděpodobné snížení biosyntézy cytokininů v kořeni. Modulační transkriptů *IPT3*, *IPT5* a *IPT7* (v kořeni i prýtu *A. thaliana*) je prokazatelně ovlivňována nejen koncentrací síranu v médiu, ale také koncentrací fosfátu (PO_4^{3-}) a nitrátu (NO_3^-) (Hirose et al., 2008). Ve zmíněné studii bylo naznačeno, že díky rozdílům v intenzitě regulace mezi jednotlivými typy *IPT* v odpovědi na různé koncentrace makronutrientů v živném médiu jsou *IPT* funkčně specializované, čímž dosahují kontrolované produkce cytokininů v rostlinách za nepříznivých podmínek.

CYP735A2 patří do rodiny genů kódující cytochrom P450 monooxygenázy, odpovědné za konverzi nukleotidů typu *iP* na nukleotidy typu *tZ* (Takei et al., 2004b). Podobně, jako geny pro *IPT*, je i *CYP735A2* spojená s biosyntézou cytokininů. Podregulace jejího genu ukazuje na možné snížení biosyntézy cytokininů v kořeni za deficiencie síry.

Pozorovala jsem také sníženou expresi genu *ARR7*, která poukazuje na snížení aktivity signální dráhy CK při odpovědi na nedostatek síry. Jediný komponent signální dráhy cytokininů, u kterého byla zatím prokázána účast na metabolismu síry, byl receptor CRE/WOL/AHK4 (Maruyama-Nakashita et al., 2004b). Zmíněný receptor negativně reguluje příjem kořenových transportérů síranu. Podregulace výše zmíněných genů tak přímo navazuje na tuto skutečnost – za deficiencie síry rostlina potřebuje zvýšit produkci transportérů síranu, čemuž napomůže potlačením aktivity signální dráhy cytokininů. Podregulace *ARR7*, který lze tak považovat za marker aktivity signalizace cytokininů (Brenner et al., 2012), indikuje očekávané snížení aktivity signální dráhy cytokininů.

5.4 Stanovení hladiny cytokininů u *A. thaliana* vystavených nedostatku síry

Pro shrnutí a lepší pochopení předchozích výsledků odpozorovaných z genové exprese nás zajímalo, zda se nedostatek síry projeví přímo na hladině cytokininů v rostlinách. Vzorky prýtů a kořenů standardních rostlin *A. thaliana* vystavených po 24 hodin nedostatku síry byly zaslány do Laboratoře růstových regulátorů na Přírodovědeckou univerzitu Palackého v Olomouci Mgr. Ondřeji Novákovi, Ph.D. Jeho tým vzorky laskavě zanalyzoval.

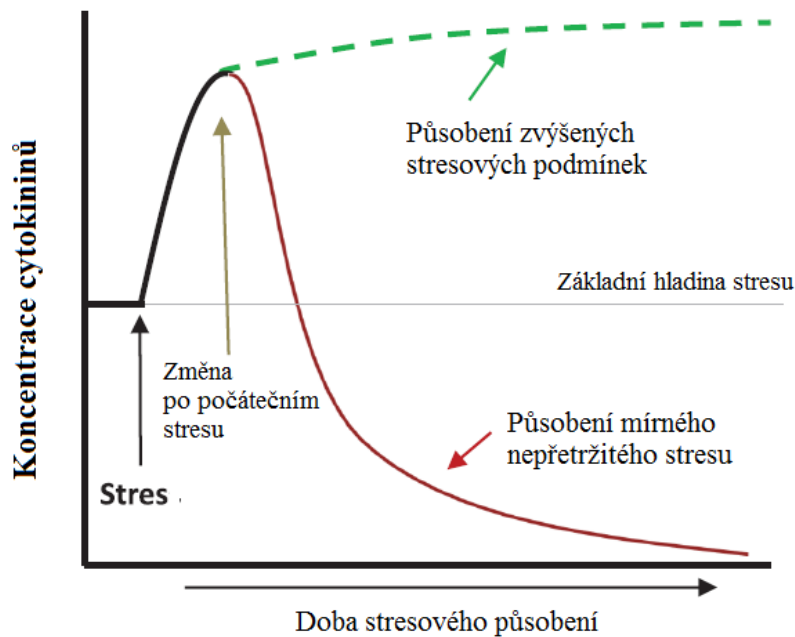
Výsledky jsou rozporuplné. Hladina cytokininů se výrazně změnila jen u prýtů. Při deficienci síry došlo k prokazatelnému snížení celkového obsahu cytokininů, v rámci jednotlivých typů cytokininů se signifikantně snížily pouze aktivní cytokininy (báze a ribosidy). V kořenech nedošlo k žádné výrazné změně obsahu cytokininů za deficiencie síry (Tab. 6).

Tab. 6 Obsah cytokininů (CK) v pmol/g čerstvé hmotnosti. Standardní rostliny *A. thaliana* byly ve stáří 11 dnů přeneseny na médium prosté síry po 24 hodin. Výsledky jsou prezentovány jako průměry (\pm směrodatná odchylka) hodnot získaných ze čtyř vzorků. Statisticky signifikantní rozdíly na hladině $P < 0,05$ (Anova) mezi rostlinami kultivovanými na běžném médiu (K) a na médiu prostém síry (-S) jsou znázorněny hvězdičkami.

Col-0	PRÝT		KOŘEN	
	K	-S	K	-S
CK báze	2,4 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2 *	5,0 \pm 0,4	5,0 \pm 0,4
CK ribosidy	5,9 \pm 0,8	3,1 \pm 0,6 *	9,6 \pm 1,1	9,4 \pm 0,5
CK nukleotidy	14,9 \pm 1,2	13,6 \pm 1,5	4,9 \pm 0,3	5,3 \pm 0,4
CK O-glukosidy	2,4 \pm 0,2	2,6 \pm 0,2	1,8 \pm 0,4	1,9 \pm 0,2
CK N-glukosidy	50,4 \pm 2,5	45,7 \pm 5,8	27,0 \pm 1,0	28,0 \pm 1,6
Celkové CK	75,8 \pm 2,8	66,3 \pm 7,1 *	48,4 \pm 3,1	49,6 \pm 2,4
Celkové aktivní CK (b+r)	8,2 \pm 0,9	4,4 \pm 0,8 *	14,6 \pm 1,5	14,4 \pm 0,6

Neměnná hladina cytokininů v kořenech za nedostatku síry není v souladu s experimentem týkající se stanovení exprese genů spojených s cytokininy v kořeni, kde došlo k jejich podregulaci (Tab. 5). Podobně diskutabilní je i snížení obsahu cytoninů za nedostatku síry v prýtech. Pilotní experimenty Mgr. Jaroslava Pavlů zde neprokázaly změnu regulace genů spojených s cytokininy, přesto zde došlo ke snížení celkových cytokininů.

Možné objasnění tohoto problému je naznačeno v práci Zwack a Rashotte (2015). Po shrnutí dosavadních poznatků ze studií o změnách hladiny cytokininů při stresových podmínkách dospěli autoři k závěru, že koncentrace cytokininů se po začátku působení stresu nejprve přechodně zvýší (během cca 3 hodin). Následně hladina cytokininů kolísá dle míry dalšího působení stresu (Obr. 8). Stres způsobený nedostatkem síranu může mít na hladinu cytokininů podobné účinky, čímž by bylo možno vysvětlit rozporuplné výsledky pozorované v rámci mé diplomové práce.



Obr. 8 Model obecného účinku stresu na obsah cytokininů (znázorněný křivkou). Převzato a upraveno podle Zwack a Rashotte (2015).

5.5 Sledování aktivity signální dráhy cytokininů při nedostatku síry s využitím transgenních linií *TCSnew::GFP*

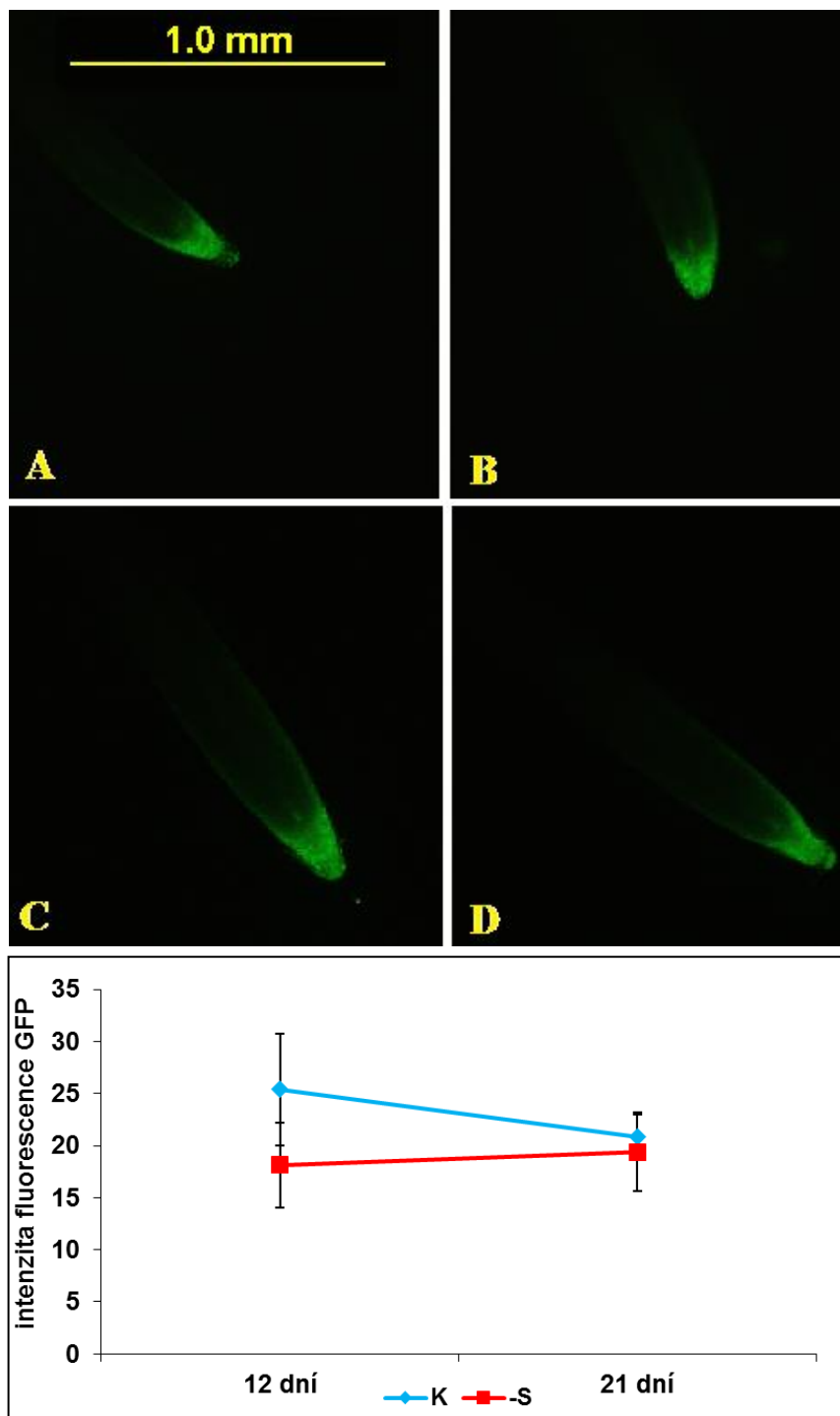
Pro zhodnocení aktivity signální dráhy cytokininů jsem sledovala intenzitu fluorescence GFP (Green Fluorescent Protein) v transgenních liniích *A. thaliana TCSnew::GFP* (Zürcher et al., 2013), která odráží míru transkripční aktivity komponent signální dráhy cytokininů ARR typu B. Byly sledovány zvláště dvě skupiny rostlin podle druhu kultivace. První skupina byla kultivována na médiu prostém síry od semene, při nízké intenzitě osvětlení a se zakrytými kořeny. Snímky byly pořizovány ve stáří rostlin 12 a 21 dní (Obr. 9). Druhá skupina byla po 12 dnech kultivace přenesena médium prostém síry a snímky byly pořizovány po 6 hodinách, 24 hodinách a 72 hodinách (Obr. 10).

Rostliny kultivované na nedostatku síry od semene nevykázaly žádný signifikantní rozdíl v aktivitě signální dráhy cytokininů ve vrcholu kořene oproti rostlinám kultivovaným na kontrolním médiu. Po 21 dnech kultivace však byla zřejmá tendence zvýšení aktivity signalizace cytokininů za nedostatku síry (Obr. 9).

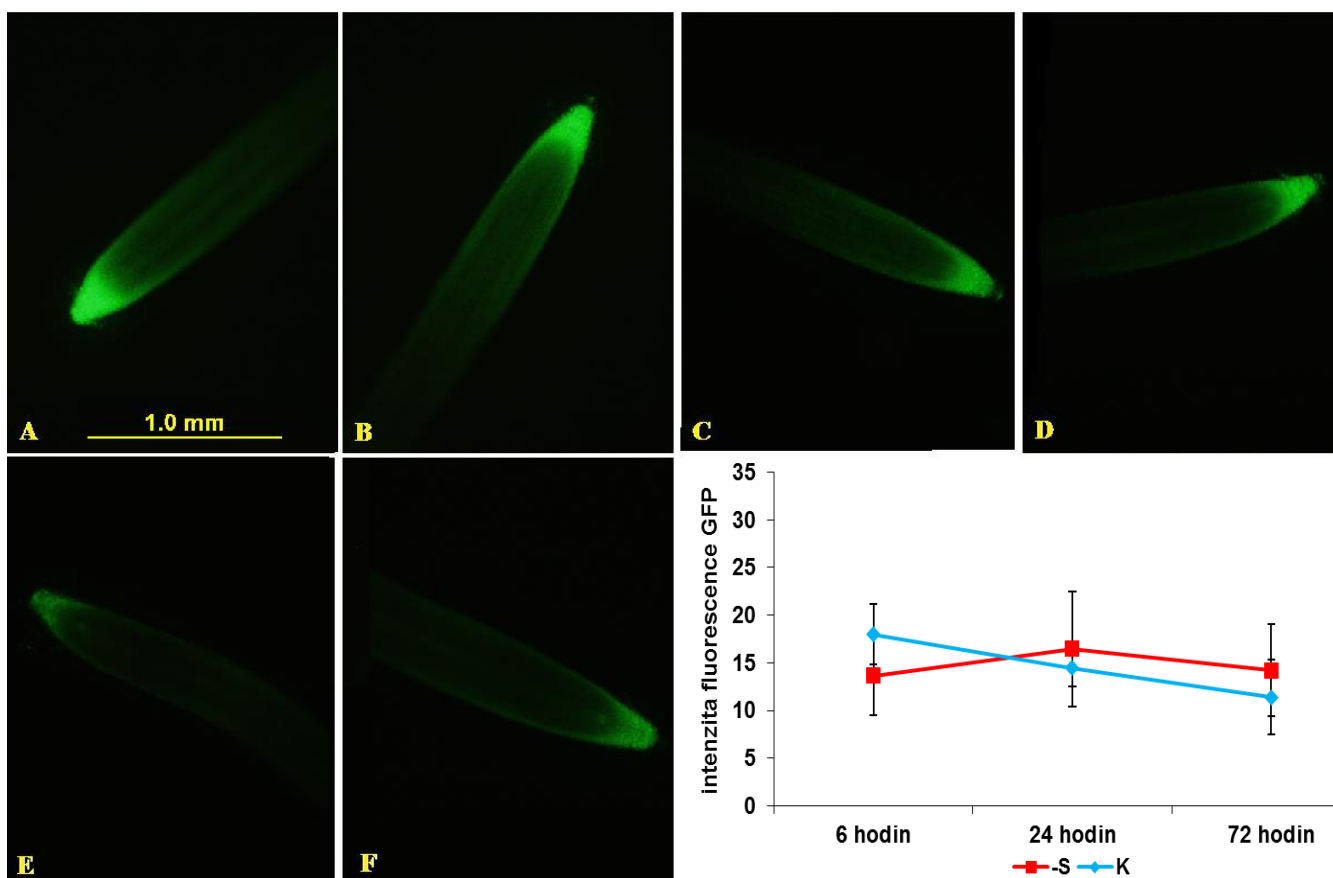
Druhá skupina rostlin vystavená deficienci síry po kratší dobu také nevykázala žádný statisticky významný rozdíl oproti rostlinám kultivovaným na kontrolním médiu. Zatímco aktivita signalizace cytokininů u rostlin kultivovaných na kontrolním médiu postupně v průběhu tří dnů měla tendenci ke snížení, u rostlin kultivovaných na nedostatku síry se aktivita signalizace cytokininů po 24 hodinách mírně zvýšila oproti kontrolním rostlinám, než znovu nabrala klesavou tendenci (Obr. 10).

Kolísavost aktivity signální dráhy cytokininů pozorovaná u rostlin kultivovaných na deficienci síry po 6, 24, a 72 hodinách by opět mohla korelovat s poznatkem o kolísavosti hladiny cytokininů pojmenovaným v práci Zwack a Rashotte (2015) (Obr. 8).

Pokud by byla v průběhu času míra fluorescence dál hodnocena, mohl by se objevit nárůst signalizace cytokininů, který by odpovídal zvýšení hladiny cytokininů pozorované při dlouhodobém silném stresu (Zwack a Rashotte, 2015). U rostlin kultivovaných na nedostatku síry od semene se tendence zvyšování aktivity signalizace cytokininů v rámci delšího časového úseku projevila.



Obr. 9 Snímky kořenových špiček rostlin *TCSnew::GFP*, kultivovaných na nedostatku síry od semene, stáří 12 dní (A - kontrolní médium, B - médium prosté síry) a 21 dní (C - kontrolní médium, D - médium prosté síry). Graf znázorňuje průměry hodnot intenzity fluorescence GFP (Mean Gray Value), získané nejméně z 8 snímků. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku.



Obr. 10 Snímky kořenových špiček rostlin *TCSnew::GFP*, stáří 12 dní, přenesených na médium prosté síry po dobu 6 hodin (A - kontrolní médium, B - médium prosté síry), 24 hodin (C - kontrolní médium, D - médium prosté síry) a 72 hodin (E - kontrolní médium, F - médium prosté síry). Graf znázorňuje průměry hodnot intenzity fluorescence GFP (Mean Gray Value), získané nejméně z 6 snímků. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku.

5.6 Fyziologická a fenotypová analýza linií *A. thaliana* insensitivních k cytokininům

Pozorování elongace kořenů za nedostatku síry

Byl sledován vliv nedostatku síranu na prodlužování kořenů u čtyř linií *A. thaliana*, a to u Columbie (standardních rostlin), *ahk2ahk3*, *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4* (mutantních linií se zablockovanou expresí receptorů signální dráhy cytokininů). Rostliny měly po celou dobu kultivace zakryté (zastíněné) kořeny, navíc byly kultivovány za snížené světelné intenzity. Rozměr standardní Petriho misky pro kultivaci *A. thaliana* nedostačuje pro dlouhodobé sledování elongace kořenů. Kořeny jsou také nepřírodně osvětleny – tento faktor ovlivňuje prodlužování kořene (způsobuje negativní fototropismus) a může interferovat s jeho analýzou. Z tohoto důvodu byl použit pozměněný způsob kultivace rostlin *in vitro* popsáný v práci Novák et al. (2015). Nízká intenzita osvětlení a zastínění vedly ke zpomalení růstu kořenů ve srovnání s klasickou kultivací.

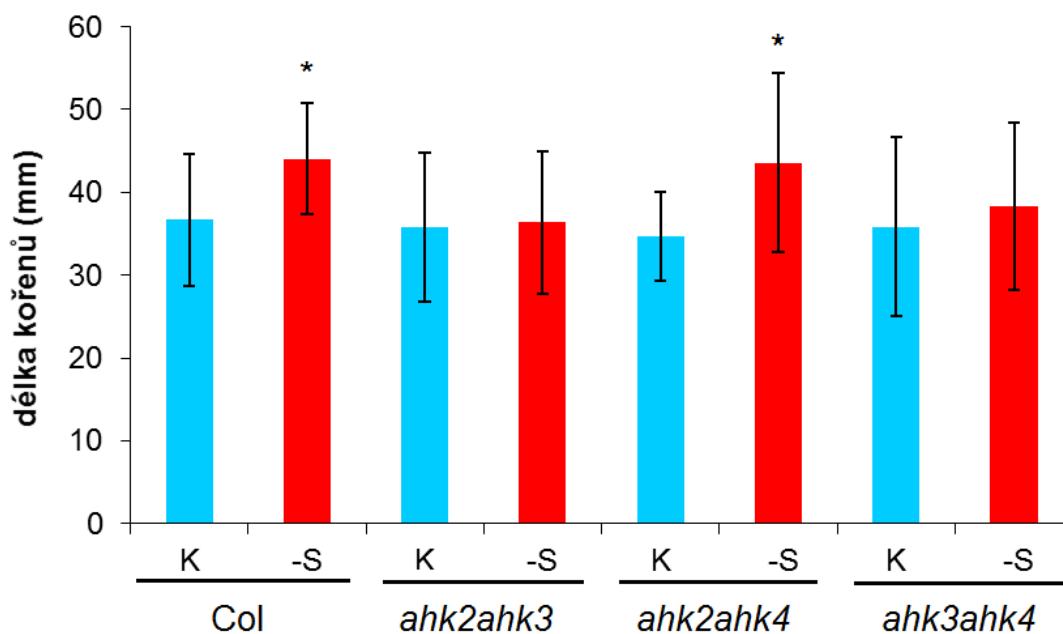
Signální dráha cytokininů navíc hraje roli v růstu kořene, pokud je vystaven světelnému záření (Novák et al., 2015). Tento faktor může představovat další omezení v rozlišení nebo stanovení role signální dráhy v elongaci kořene za podmínky nedostatku síry.

Délky kořenů byly změřeny u rostlin starých 21 dnů. V rámci každého genotypu došlo k většímu prodloužení kořenů u rostlin pěstovaných na nedostatku síranu vůči rostlinám pěstovaným na kontrolním médiu, signifikantně ale pouze u Columbie a linie *ahk2ahk4*, kde byl rozdíl nejvýraznější (cca 8 mm). U linií *ahk2ahk3* a *ahk3ahk4* došlo pouze k nepatrnému navýšení délky kořenů za nedostatku síry oproti kontrole, cca o 1 až 2 mm (Obr. 11).

Linie *ahk2ahk3*, *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4* jsou dvojní mutanti receptorů AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4. Jde o receptory cytokininů skupiny histidinových kináz, jejichž funkce jsou vzájemně redundantní. Percepce cytokininů je tak u těchto rostlinných jedinců narušena, což se následně projevuje řadou fyziologických a fenotypových změn. V práci Riefler et al. (2006) bylo popsáno zvětšení kořenového systému u rostlin s mutací v genech *AHK*. Pozorované zvětšení kořene bylo v této studii stanoveno u semenáčků starých 7 dní kultivovaných za standardních podmínek. Během kultivace mého experimentu zůstala délka kořenů mutantních linií ve srovnání se standardními rost-

linami prakticky beze změny. Ačkoli cytokinininy působí na prodlužovací růst kořene negativně, v nízkých koncentracích působí opačně, a v případě, že je jejich percepce narušena, může dojít k interferenci s prodloužením kořene v odpovědi na deficienci síry. Pozitivní účinek cytokininů na elongaci kořene v odpovědi na nedostatek síry lze vysvětlit tím, že určité množství cytokininů a nenarušená aktivita jejich signální dráhy jsou pro správný vývoj kořene nezbytné.

Důvodem mohlo být také to, že délka kořene byla sledována v odlišném vývojovém stádiu, a navíc byly rostliny kultivovány se sníženou světelnou intenzitou a se zastíněnými kořeny (Novák et al., 2015).



Obr. 11 Délky kořenů standardních rostlin (*Columbia*) a linií insensitivních k cytokininům pěstovaných na nedostatku síry. Délky kořenů byly změřeny u rostlin starých 21 dní, pěstovaných od semena na běžném médiu (K) nebo médiu s deficiencí síranu (-S) za nízké světelné intenzity $20 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Během kultivace měly rostliny zastíněné kořeny. Graf znázorňuje průměrné hodnoty se standardními odchylkami, každá z nich získána nejméně z 23 kořenů. Statisticky signifikantní rozdíly (K vs. -S u daného genotypu) na hladině $P < 0,05$ (t-test) jsou znázorněny hvězdičkami.

Je prokázáno, že deficiencie síry i některých dalších nutrientů v živné půdě ovlivňuje vývoj kořenové soustavy rostlin. Známý je vliv auxinu v regulaci vývoje kořene

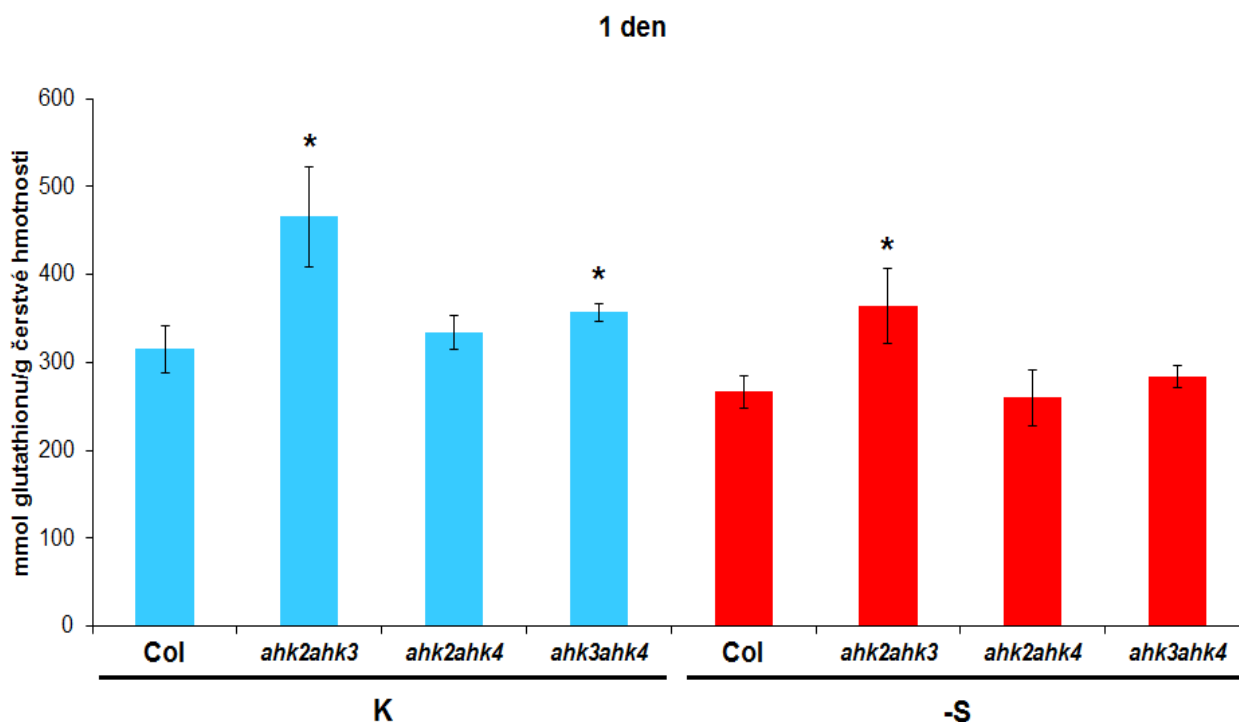
při nedostatku síry (Kutz et al., 2002). Přestože cytokinininy se rovněž významně podílejí na regulaci vývoji kořene, poznatky o roli cytokininů nebo vzájemné koordinaci auxinů s cytokininů při kontrole vývoje kořene v odpovědi na nedostatek síry prozatím chybí. V mém pokusu nedostatek síranu stimuloval elongaci kořenů standardních rostlin. Zablokovaná percepce cytokininů mutantních linií *ahk2ahk3* a *ahk3ahk4* narušila odpověď kořenů na nedostatek síry a jejich prodloužení následně nebylo tak výrazné, jako u standardních rostlin. Oproti tomu délky kořenů linie *ahk2ahk4* při deficienci síranu byly téměř srovnatelné se standardními rostlinami. Tento poznatek ukazuje na roli receptoru AHK3 ve správné odpovědi na nedostatek síry, jelikož pouze u linie *ahk2ahk4* je tento receptor funkční. Zdá se tedy, že signalizace cytokininů hraje podstatnou úlohu v prodloužení kořene na nedostatku síry. Aby bylo možné v budoucnu tuto hypotézu potvrdit a případně i rozšířit, bylo by dobré se zaměřit na identifikaci dalších komponent signální dráhy cytokininů, jako jsou AHP, ARR a CRF pomocí násobných mutantních rostlin *A. thaliana*. Ke stanovení role ARR v elongaci kořene při nedostatku síry by mohla být dále využita transgenní linie *35S:ARR1-SRDX*, která má umlčenou expresi ARR typu B (Heyl et al., 2008).

Cílenou mutací rostlin vedoucí k necitlivosti k cytokininům by bylo hypoteticky možné využít k vývoji specializovaných plodin schopných snášet nedostatek síry v půdě. V práci Shi et al. (2012) byly studovány mutantní rostliny *Brassica napus* insensitivní vůči exogenním cytokininům, které se vyznačují zvětšeným kořenovým systémem. Byla prokázána jejich schopnost lépe akumulovat a využívat fosfor. Plodiny mutantní v signální dráze cytokininů by tak mohly být schopné lépe hospodařit se sírou i fosforem.

Význam signální dráhy cytokininů pro kontrolu obsahu glutathionu při deficienci síranu

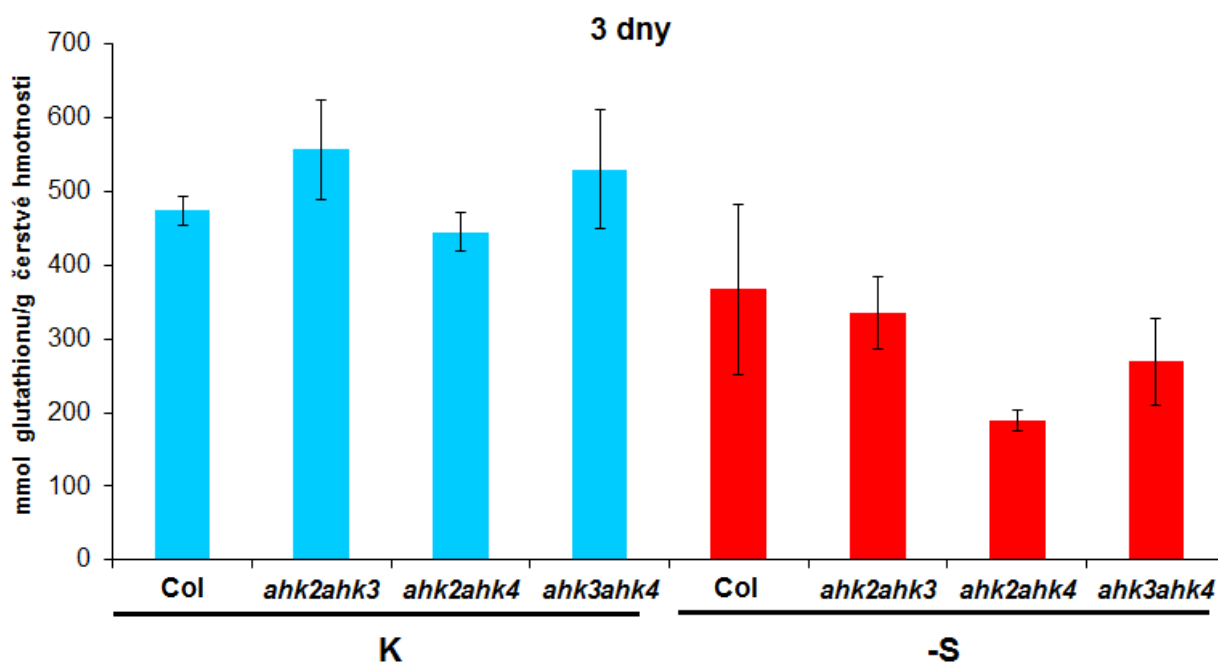
Tripeptid glutathion je jednou z hlavních zásobních forem síry v rostlinách a patří mezi metabolity, jejichž hladinu významně reguluje stres. Jeho hladina byla sledována a stanovena spektrofotometricky u standardních rostlin a mutantních linií insensitivních k cytokininům vystavených deficienci síranu po dobu 1 a 3 dnů. Po 1 dni kultivace bez přítomnosti zdroje síry v živné půdě měly rostliny všech sledovaných genotypů hladinu glutathionu sníženou oproti rostlinám kultivovaným na kontrolním médiu (Obr. 12). K drastičtější změně hladiny glutathionu došlo až po 3 dnech na deficienci síry

(Obr. 13). Jeho obsah rapidně poklesl u všech genotypů kultivovaných na nedostatku síry. Ke zdaleka největšímu sestupu došlo u linie *ahk2ahk4*, skoro o 58 % vůči svému protějšku pěstovanému na kontrolním médiu. Během kultivace byla patrná akumulace glutathionu u rostlin na kontrolním médiu (1,5x zvýšení po 3 dnech oproti 1 dni).



Obr. 12 Hladiny glutathionu u prýtů standardních rostlin (*Columbia*) a linií insensitivních k cytokininům vystavených nedostatku síry. Rostliny staré 14 dní byly přeneseny na běžné médium (K) nebo médium s deficiencí síranu (-S) po dobu 24 hodin. Graf znázorňuje průměrné hodnoty se standardními odchylkami, každá z nich získána nejméně ze 4 naměřených hodnot. Statisticky signifikantní rozdíly na hladině $P < 0,05$ (t-test) mezi standardními rostlinami a dvojnými mutanty v rámci jedné varianty živného média jsou znázorněny hvězdičkami.

Z výsledných grafů lze vyvodit možnou roli receptorů cytokininů v regulaci hladiny glutathionu při nedostatku síry. Hladina glutathionu po 3 dnech na nedostatku síry poklesla nejvýrazněji u linie *ahk2ahk4*. AHK2 a AHK4 proto pravděpodobně udržují a hospodaří s hladinou glutathionu tak, aby nedošlo k jejímu kritickému poklesu pro rostliny za podmínek deficience síry (živiny nezbytné pro tvorbu glutathionu).



Obr. 13 Změna hladiny glutathionu u prýtů standardních rostlin (*Columbia*) a linií insensitivních k cytokininům vystavených nedostatku síry po 3 dny. Graf znázorňuje průměrné hodnoty se standardními odchylkami, každá z nich získána nejméně ze 4 naměřených hodnot. Mezi oběma variantami živného média jsou statisticky významné rozdíly na hladině $P < 0,05$ (*t*-test), mezi jednotlivými genotypy v rámci jedné varianty živného média není významný rozdíl.

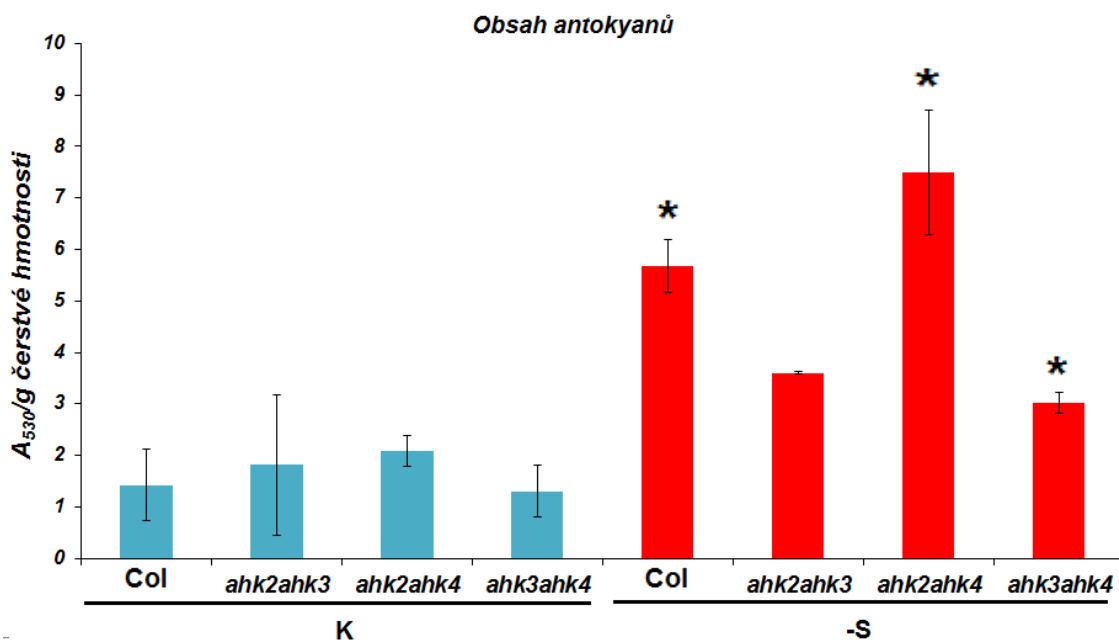
Oproti standardním rostlinám došlo u mutantních linií *ahk2ahk3* a *ahk3ahk4* ke zvýšení hladiny glutathionu při kultivaci běžném médiu. AHK3 má tedy za podmínky dostatečné dostupnosti síry negativní vliv na hladinu GSH. Zvýšený obsah glutathionu je spojen s odolností vůči některým stresovým faktorům, jako je např. sucho (Chen et al., 2012; Cheng et al., 2015). Tato skutečnost navazuje na známou vlastnost zvýšené tolerance vůči suchu u rostlin *A. thaliana* s mutací v receptorech AHK2 a AHK3 pozorované v práci Tran et al. (2007). Zvýšení obsahu glutathionu u rostlin deficientních v signální dráze cytokininů (linie *ahk2ahk3* a *ahk3ahk4*) (Obr. 12 a 13) tak může představovat klíčový faktor, který zprostředkuje známou odolnost těchto rostlin k suchu (Tran et al., 2007; Kang et al., 2013).

Hladina antokyanů při odpovědi na nedostatek síry

Antokyanany jsou sekundární metabolity ze skupiny flavonoidů, které zajišťují rostlinám mj. ochranu proti nadměrnému ozáření při narušení správného průběhu fotosyntézy. Stanovila jsem spektrofotometricky hladinu antokyanů ve standardních rostlinách a rostlinách mutantních v signální dráze cytokininů kultivovaných od semene na médiu prostém síry nebo na běžném kontrolním médiu.

U rostlin vystavených deficienci síry se obsah antokyanů rapidně zvýšil. Nejvíce se antokyanany akumulovaly ve standardních rostlinách a u linie *ahk2ahk4*, na nedostatku síry se jejich hladina zvýšila cca 4× ve srovnání s rostlinami kultivovanými na běžném médiu, zatímco u dvojných mutantů *ahk2ahk3* a *ahk3ahk4* se při nedostatku síry hladina antokyanů zvýšila pouze dvojnásobně ve srovnání s kontrolní hladinou (Obr. 14).

Akumulace antokyanů je jednou z typických odpovědí na nedostatek síry (Nikiforova et al., 2003); narušení akumulace antokyanů při nedostatku síry u rostlin deficičních v signální dráze cytokininů tedy lze označit za další důkaz významu signální dráhy cytokininů v koordinaci odpovědi na nedostatek síry. Protože akumulace antokyanů při odpovědi na nedostatek síry je narušena u dvojných mutantů *ahk2ahk3* a *ahk3ahk4*, nikoli však u *ahk2ahk4*, poukazuje tento výsledek na klíčovou roli receptoru AHK3 ve zprostředkování akumulace antokyanů při nedostatku síry. Fyziologický význam akumulace antokyanů při nedostatku síry patrně spočívá ve funkci antokyanů při ochraně fotosyntetického aparátu před nadměrným ozářením, protože nedostatek síry má nepříznivý vliv na fotosyntetický aparát - snižuje tvorbu sulfolipidů, komponent thylakoidních membrán v chloroplastech (Nikiforova et al., 2003).



-S/K	
Columbia	4,0
ahk2ahk3	2,0
ahk2ahk4	3,6
ahk3ahk4	2,3

Obr. 14 Stanovení obsahu antokyanů u standardních rostlin (Columbia) a linií insensitivních k cytokininům. Naměřené hodnoty pocházejí ze vzorků rostlin starých 14 dní, kultivovaných na běžném médiu (K) nebo na nedostatku síranu (-S). Graf znázorňuje průměrné hodnoty se standardními odchylkami. Tabulka pod grafem ukazuje, kolikrát byla hladina antokyanů jednotlivých genotypů vyšší při kultivaci na médiu prostém síry oproti kontrolnímu médiu. Statisticky významné rozdíly mezi K a -S na hladině $P < 0,05$ (t-test) jsou znázorněny hvězdičkami.

Narušení schopnosti akumulace antokyanů u rostlin deficientních v percepci cytokininů může být rovněž i jednou z příčin zvýšené citlivosti *ahk2ahk3* vůči fotooxidativnímu stresu, který byl popsán v práci Cortleven et al. (2014).

6 ZÁVĚR

Význam cytokininů v odpovědi na nedostatek síry byl sledován u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Doposud nepopsaná role cytokininů v kontrole metabolismu síry byla neprve doložena nadregulací genů spojených s asimilací síry a remobilizací jejích zásobních forem v odpovědi na působení exogenních cytokininů. Tato odpověď podobná odpovědi na nedostatek síry může sloužit k zajištění dostupných zdrojů síry v místech růstu, ve kterých mají cytokininy klíčovou regulační úlohu. Jedním z genů odpovědi nedostatku síry, který byl indukován účinkem cytokininů, byl *GAMMA-GLUTAMYL CYCLOTRANSFERASE 2;1 (GGCT2;1)*, který kóduje dominantní enzym degradace glutathionu u *A. thaliana*. Glutathion představuje hlavní zásobní formu redukované síry a snížení jeho obsahu po působení cytokininů je v souladu s předpokládanou mobilizací zásobních forem síry.

Význam cytokininů v regulaci odpovědi na nedostatek síry naznačila podregulace genů kódujících klíčové enzymy biosyntézy cytokininů (IPT357, CYP) a podregulace markerového genu signální dráhy cytokininů (*ARR7*) v kořeni rostlin při deficienci síranu. Vzhledem ke známému negativnímu účinku cytokininů na příjem síranu z půdy a na vývoj kořenového systému může snížení obsahu cytokininů a aktivity jejich signální dráhy představovat jeden z klíčových mechanismů při adaptaci na nedostatek síry. Význam cytokininů při regulaci odpovědi na nedostatek síry byl dále studován u mutantních rostlin s narušenou percepcí cytokininů. Mutace receptoru cytokininů *AHK3* byla spojena s narušením některých odpovědí na nedostatek síry (elongace kořene, akumulace antokyanů). Receptory cytokininů se dále uplatňují při regulaci obsahu glutathionu při podmínkách snížené i dostatečné dostupnosti síry.

Nově blíže popsané spojení mezi cytokininy a metabolismem síry může představovat první krok ke studiu dalších regulačních rolí cytokininů a získané poznatky lze využít v budoucnu při vývoji plodin s výhodnými hospodářskými vlastnostmi, kterých bude dosaženo modifikací signální dráhy cytokininů.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

Akiyoshi, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W., & Gordon, M. P. (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(19), 5994-5998.

Allen, M., Qin, W., Moreau, F., & Moffatt, B. (2002). Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of Arabidopsis and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiologia plantarum*, 115(1), 56-68.

Anderson, J. W. (2012). Sulfur metabolism in plants. *The biochemistry of plants*, 16, 327-381.

Argueso, C. T., Ferreira, F. J., & Kieber, J. J. (2009). Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, cell & environment*, 32(9), 1147-1160.

Armstrong, D. J. (1994). Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. CRC Press, Boca Raton, FL, 139-154.

Åstot, C., Dolezal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., ... & Sandberg, G. (2000). An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14778-14783.

Balibrea Lara, M. E., Gonzales Garcia, M. C., Fatima, T., Ehneß, R., Lee, T. K., Proels, R., ... & Roitsch, T. (2004). Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell*, 16(5), 1276-1287.

Basantani, M., & Srivastava, A. (2007). Plant glutathione transferases-a decade falls short. *Botany*, 85(5), 443-456.

Bielecka, M., Watanabe, M., Morcuende, R., Scheible, W. R., Hawkesford, M. J., Hesse, H., & Hoefgen, R. (2014). Transcriptome and metabolome analysis of plant sulfate starvation and resupply provides novel information on transcriptional regulation of metabolism associated with sulfur, nitrogen and phosphorus nutritional responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 5, 805.

Blake-Kalff, M. M., Harrison, K. R., Hawkesford, M. J., Zhao, F. J., & McGrath, S. P. (1998). Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant physiology*, 118(4), 1337-1344.

Brenner, W. G., Romanov, G. A., Köllmer, I., Bürkle, L., & Schmölling, T. (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*, 44(2), 314-333.

Brenner, W. G., Ramireddy, E., Heyl, A., & Schmölling, T. (2012). Gene regulation by cytokinin in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 3, 8.

Brzobohaty, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., & Palme, K. (1993). Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, 262(5136), 1051-1054.

Caesar, K., Thamm, A. M., Witthöft, J., Elgass, K., Huppenberger, P., Grefen, C., ... & Harter, K. (2011). Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5571-5580.

Cao, M. J., Wang, Z., Wirtz, M., Hell, R., Oliver, D. J., & Xiang, C. B. (2013). SULTR3; 1 is a chloroplast-localized sulfate transporter in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 73(4), 607-616.

- Cao, M. J., Wang, Z., Zhao, Q., Mao, J. L., Speiser, A., Wirtz, M., ... & Xiang, C. B. (2014). Sulfate availability affects ABA levels and germination response to ABA and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *77*(4), 604-615.
- Cedzich, A., Stransky, H., Schulz, B., & Frommer, W. B. (2008). Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiology*, *148*(4), 1857-1867.
- Chae, H. S., Faure, F., & Kieber, J. J. (2003). The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. *The Plant Cell*, *15*(2), 545-559.
- Chen, J. H., Jiang, H. W., Hsieh, E. J., Chen, H. Y., Chien, C. T., Hsieh, H. L., & Lin, T. P. (2012). Drought and salt stress tolerance of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. *Plant Physiology*, *158*(1), 340-351.
- Cheng, M. C., Ko, K., Chang, W. L., Kuo, W. C., Chen, G. H., & Lin, T. P. (2015). Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *83*(5), 926-939.
- Cortleven, A., Nitschke, S., Klaumünzer, M., Abdelgawad, H., Asard, H., Grimm, B., ... & Schmölling, T. (2014). A novel protective function for cytokinin in the light stress response is mediated by the *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2* and *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE3* receptors. *Plant physiology*, *164*(3), 1470-1483.
- Dan, H., Yang, G., & Zheng, Z. L. (2007). A negative regulatory role for auxin in sulphate deficiency response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, *63*(2), 221-235.
- Davidian, J. C., & Kopriva, S. (2010). Regulation of sulfate uptake and assimilation - the same or not the same?. *Molecular Plant*, *3*(2), 314-325.

- Falkenberg, B., Witt, I., Zanon, M. I., Steinhauser, D., Mueller-Roeber, B., Hesse, H., & Hoefgen, R. (2008). Transcription factors relevant to auxin signalling coordinate broad-spectrum metabolic shifts including sulphur metabolism. *Journal of experimental botany*, *59*(10), 2831-2846.
- Dettmer, J., Elo, A., & Helariutta, Y. (2009). Hormone interactions during vascular development. *Plant molecular biology*, *69*(4), 347-360.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, *155*(1), 2-18.
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, *62*(8), 2431-2452.
- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., ... & Kiba, T. (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *The Plant Journal*, *55*(3), 526-542.
- Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C., & Meyerowitz, E. M. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(38), 16529-16534.
- Grubb, C. D., & Abel, S. (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in plant science*, *11*(2), 89-100.
- Grzam, A., Martin, M. N., Hell, R., & Meyer, A. J. (2007). γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *FEBS letters*, *581*(17), 3131-3138.

Harada, E., Kusano, T., & Sano, H. (2000). Differential expression of genes encoding enzymes involved in sulfur assimilation pathways in response to wounding and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, *156*(2), 272-276.

Hawkesford, M. J. (2000). Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *Journal of Experimental Botany*, *51*(342), 131-138.

Hawkesford, M. J., & De Kok, L. J. (2006). Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell & Environment*, *29*(3), 382-395.

Heyl, A., Ramireddy, E., Brenner, W. G., Riefler, M., Allemeersch, J., & Schmülling, T. (2008). The transcriptional repressor ARR1-SRDX suppresses pleiotropic cytokinin activities in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *147*(3), 1380-1395.

Hirai, M. Y., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M., & Saito, K. (2003). Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-l-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *The Plant Journal*, *33*(4), 651-663.

Hirai, M. Y., Yano, M., Goodenowe, D. B., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., ... & Saito, K. (2004). Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, *101*(27), 10205-10210.

Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., & Sakakibara, H. (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, *59*(1), 75-83.

Hoefgen, R., & Nikiforova, V. J. (2008). Metabolomics integrated with transcriptomics: assessing systems response to sulfur-deficiency stress. *Physiologia Plantarum*, *132*(2), 190-198.

- Horgan, R., Hewett, E. W., Horgan, J. M., Purse, J., & Wareing, P. F. (1975). A new cytokinin from *Populus x robusta*. *Phytochemistry*, *14*(4), 1005-1008.
- Hoth, S., Ikeda, Y., Morgante, M., Wang, X., Zuo, J., Hanafey, M. K., ... & Chua, N. H. (2003). Monitoring genome-wide changes in gene expression in response to endogenous cytokinin reveals targets in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, *554*(3), 373-380.
- Houba-Hérin, N., Pethe, C., d'Alayer, J., & Laloue, M. (1999). Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *The Plant Journal*, *17*(6), 615-626.
- Howarth, J. R., Parmar, S., Barraclough, P. B., & Hawkesford, M. J. (2009). A sulphur deficiency-induced gene, *sdi1*, involved in the utilization of stored sulphate pools under sulphur-limiting conditions has potential as a diagnostic indicator of sulphur nutritional status. *Plant biotechnology journal*, *7*(2), 200-209.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., ... & Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, *409*(6823), 1060-1063.
- Ioio, R. D., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*, *17*(8), 678-682.
- Jost, R., Altschmied, L., Bloem, E., Bogs, J., Gershenzon, J., Hähnel, U., ... & Mendel, R. R. (2005). Expression profiling of metabolic genes in response to methyl jasmonate reveals regulation of genes of primary and secondary sulfur-related pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*, *86*(3), 491-508.
- Kakimoto, T. (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, *42*(7), 677-685.

Kang, G. Z., Li, G. Z., Liu, G. Q., Xu, W., Peng, X. Q., Wang, C. Y., ... & Guo, T. C. (2013). Exogenous salicylic acid enhances wheat drought tolerance by influence on the expression of genes related to ascorbate-glutathione cycle. *Biologia plantarum*, 57(4), 718-724.

Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., ... & Sakakibara, H. (2004). Distinct isoprenoid origins of cis-and trans-zeatin biosyntheses in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14049-14054.

Kasajima, I., Ohkama-Ohtsu, N., Ide, Y., Hayashi, H., Yoneyama, T., Suzuki, Y., ... & Fujiwara, T. (2007). The BIG gene is involved in regulation of sulfur deficiency-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 129(2), 351-363.

Kataoka, T., Watanabe-Takahashi, A., Hayashi, N., Ohnishi, M., Mimura, T., Buchner, P., ... & Takahashi, H. (2004a). Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(10), 2693-2704.

Kataoka, T., Hayashi, N., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2004b). Root-to-shoot transport of sulfate in Arabidopsis. Evidence for the role of SULTR3;5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant physiology*, 136(4), 4198-4204.

Kawashima, C. G., Berkowitz, O., Hell, R., Noji, M., & Saito, K. (2005). Characterization and expression analysis of a serine acetyltransferase gene family involved in a key step of the sulfur assimilation pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 137(1), 220-230.

Kawashima, C. G., Matthewman, C. A., Huang, S., Lee, B. R., Yoshimoto, N., Koprivova, A., ... & Takahashi, H. (2011). Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 66(5), 863-876.

Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, e0168.

Kimmerer, T. W., & Kozlowski, T. T. (1981). Stomatal conductance and sulfur uptake of five clones of *Populus tremuloides* exposed to sulfur dioxide. *Plant physiology*, 67(5), 990-995.

Ko, D., Kang, J., Kiba, T., Park, J., Kojima, M., Do, J., ... & Martinoia, E. (2014). Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(19), 7150-7155.

Kopriva, S., & Rennenberg, H. (2004). Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55(404), 1831-1842.

Kopriva, S. (2006). Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. *Annals of Botany*, 97(4), 479-495.

Kopriva, S., Mugford, S. G., Matthewman, C., & Koprivova, A. (2009). Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. *Plant cell reports*, 28(12), 1769-1780.

Koprivova, A., & Kopriva, S. (2014). Molecular mechanisms of regulation of sulfate assimilation: first steps on a long road. *Frontiers in plant science*, 5, 589.

Koprivova, A., & Kopriva, S. (2015). Hormonal control of sulfate uptake and assimilation. *Plant molecular biology*, 1-11.

Krall, L., Raschke, M., Zenk, M. H., & Baron, C. (2002). The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS letters*, 527(1), 315-318.

Kranner, I., Birtić, S., Anderson, K. M., & Pritchard, H. W. (2006). Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death?. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(12), 2155-2165.

- Krouk, G., Ruffel, S., Gutiérrez, R. A., Gojon, A., Crawford, N. M., Coruzzi, G. M., & Lacombe, B. (2011). A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends in plant science*, *16*(4), 178-182.
- Kudo, T., Kiba, T., & Sakakibara, H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, *52*(1), 53-60.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., ... & Kyojuka, J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, *445*(7128), 652-655.
- Kutz, A., Müller, A., Hennig, P., Kaiser, W. M., Piotrowski, M., & Weiler, E. W. (2002). A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *30*(1), 95-106.
- Lee, D. J., Park, J. Y., Ku, S. J., Ha, Y. M., Kim, S., Kim, M. D., ... & Kim, J. (2007). Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7) overexpression in cytokinin response. *Molecular Genetics and Genomics*, *277*(2), 115-137.
- Lee, B. R., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2011). The key enzyme of sulfate assimilation, adenosine 5'-phosphosulfate reductase, is regulated by HY5 in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *67*(6), 1042-1054.
- Lee, B. R., Huseby, S., Koprivova, A., Chételat, A., Wirtz, M., Mugford, S. T., ... & Hell, R. (2012). Effects of fou8/fry1 mutation on sulfur metabolism: is decreased internal sulfate the trigger of sulfate starvation response?. *PLoS One*, *7*(6), e39425.
- Letham, D. S. (1963). Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life sciences*, *2*(8), 569-573.
- Leustek, T., Martin, M. N., Bick, J. A., & Davies, J. P. (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual review of plant biology*, *51*(1), 141-165.

Lewandowska, M., & Sirko, A. (2008). Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochimica Polonica*, 55(3), 457-471.

Li, X. G., Su, Y. H., Zhao, X. Y., Li, W., Gao, X. Q., & Zhang, X. S. (2010). Cytokinin overproduction-caused alteration of flower development is partially mediated by CUC2 and CUC3 in Arabidopsis. *Gene*, 450(1), 109-120.

López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., & Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 280-287.

Luwe, M. W., Takahama, U., & Heber, U. (1993). Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant physiology*, 101(3), 969-976.

Martín, A. C., Del Pozo, J. C., Iglesias, J., Rubio, V., Solano, R., De La Peña, A., ... & Paz-Ares, J. (2000). Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 24(5), 559-567.

Maruyama-Nakashita, A., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2003). Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in Arabidopsis reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiology*, 132(2), 597-605.

Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Watanabe-Takahashi, A., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2004a). Induction of SULTR1; 1 sulfate transporter in Arabidopsis roots involves protein phosphorylation/dephosphorylation circuit for transcriptional regulation. *Plant and cell physiology*, 45(3), 340-345.

Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2004b). A novel regulatory pathway of sulfate uptake in Arabidopsis roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *The Plant Journal*, 38(5), 779-789.

Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2005). Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, *42*(3), 305-314.

Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Tohge, T., Saito, K., & Takahashi, H. (2006). *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *The Plant Cell*, *18*(11), 3235-3251.

May, M. J., & Leaver, C. J. (1994). *Arabidopsis thaliana* gamma-glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast, and *Escherichia coli* homologs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(21), 10059-10063.

Mehterov, N., Balazadeh, S., Hille, J., Toneva, V., Mueller-Roeber, B., & Gechev, T. (2012). Oxidative stress provokes distinct transcriptional responses in the stress-tolerant *atr7* and stress-sensitive *loh2* *Arabidopsis thaliana* mutants as revealed by multiparallel quantitative real-time PCR analysis of ROS marker and antioxidant genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, *59*, 20-29.

Meyer, A. J. (2008). The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of plant physiology*, *165*(13), 1390-1403.

Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1956). Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division¹, *2*. *Journal of the American Chemical Society*, *78*(7), 1375-1380.

Miller, C. O. (1961). A kinetin-like compound in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *47*(2), 170.

Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., & Kakimoto, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal*, *37*(1), 128-138.

- Mok, M. C. (1994). Cytokinins and plant development. *Cytokinins: chemistry, activity, and function*. CRC Press, Boca Raton, 155-166.
- Mok, D. W., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant biology*, 52(1), 89-118.
- Moniuszko, G., Skoneczny, M., Zientara-Rytter, K., Wawrzyńska, A., Głów, D., Cristescu, S. M., ... & Sirko, A. (2013). Tobacco LSU-like protein couples sulphur-deficiency response with ethylene signalling pathway. *Journal of experimental botany*, ert309.
- Moniuszko, G. (2015). Ethylene signaling pathway is not linear, however its lateral part is responsible for sensing and signaling of sulfur status in plants. *Plant signaling & behavior*, 10(11), e1067742.
- Morris, R. O., Bilyeu, K. D., Laskey, J. G., & Cheikh, N. N. (1999). Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and biophysical research communications*, 255(2), 328-333.
- Motyka, V., Vaňková, R., Čapková, V., Petrášek, J., Kamínek, M., & Schmölling, T. (2003). Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiologia Plantarum*, 117(1), 11-21.
- Mougel, C., & Zhulin, I. B. (2001). CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends in biochemical sciences*, 26(10), 582-584.
- Müller, B., & Sheen, J. (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*, 453(7198), 1094-1097.
- Nam, Y. J., Tran, L. S. P., Kojima, M., Sakakibara, H., Nishiyama, R., & Shin, R. (2012). Regulatory roles of cytokinins and cytokinin signaling in response to potassium deficiency in Arabidopsis. *PLoS One*, 7(10), e47797.

Nemhauser, J. L., Hong, F., & Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell*, *126*(3), 467-475.

Nikiforova, V., Freitag, J., Kempa, S., Adamik, M., Hesse, H., & Hoefgen, R. (2003). Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *The Plant Journal*, *33*(4), 633-650.

Nikiforova, V. J., Kopka, J., Tolstikov, V., Fiehn, O., Hopkins, L., Hawkesford, M. J., ... & Hoefgen, R. (2005). Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. *Plant physiology*, *138*(1), 304-318.

Nishiyama, R., Le, D. T., Watanabe, Y., Matsui, A., Tanaka, M., Seki, M., ... & Tran, L. S. P. (2012). Transcriptome analyses of a salt-tolerant cytokinin-deficient mutant reveal differential regulation of salt stress response by cytokinin deficiency. *PLoS One*, *7*(2), e32124.

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., & Foyer, C. H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of experimental botany*, *53*(372), 1283-1304.

Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., & Foyer, C. H. (2011). Glutathione. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, *9*.

Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., ... & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell & environment*, *35*(2), 454-484.

Novák, J., Černý, M., Pavlů, J., Zemánková, J., Skalák, J., Plačková, L., & Brzobohatý, B. (2015). Roles of proteome dynamics and cytokinin signaling in root to hypocotyl ratio changes induced by shading roots of *Arabidopsis* seedlings. *Plant and Cell Physiology*, pcv026.

Ohkama, N., Takei, K., Sakakibara, H., Hayashi, H., Yoneyama, T., & Fujiwara, T. (2002). Regulation of sulfur-responsive gene expression by exogenously applied cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, *43*(12), 1493-1501.

Ohkama-Ohtsu, N., Radwan, S., Peterson, A., Zhao, P., Badr, A. F., Xiang, C., & Oliver, D. J. (2007a). Characterization of the extracellular γ -glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *49*(5), 865-877.

Ohkama-Ohtsu, N., Zhao, P., Xiang, C., & Oliver, D. J. (2007b). Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by γ -glutamyl transpeptidase GGT3 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *49*(5), 878-888.

Ohkama-Ohtsu, N., Oikawa, A., Zhao, P., Xiang, C., Saito, K., & Oliver, D. J. (2008). A γ -glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *148*(3), 1603-1613.

Ohkama-Ohtsu, N., Fukuyama, K., & Oliver, D. J. (2009). Roles of γ -glutamyl transpeptidase and γ -glutamyl cyclotransferase in glutathione and glutathione-conjugate metabolism in plants. *Advances in Botanical Research*, *52*, 87-113.

Paulose, B., Chhikara, S., Coomey, J., Jung, H. I., Vatamaniuk, O., & Dhankher, O. P. (2013). A γ -glutamyl cyclotransferase protects *Arabidopsis* plants from heavy metal toxicity by recycling glutamate to maintain glutathione homeostasis. *The Plant Cell*, *25*(11), 4580-4595.

Pavlů, J., Černý, M., Štuříková, H., Brzobohatý, B. (2015). Cytokinin impacts sulfur nutrition status including glutathione content and heavy metal stress tolerance in *Arabidopsis*. In M. Černý, J. Novák, J. Balla, J. Skalák, P. Klimeš, S. Procházka, B. Brzobohatý, *European Society for New Methods in Agriculture: 44. Omics for Sustainable Agriculture* (s. 49). Brno: Mendelova univerzita.

Prosser, I. M., Purves, J. V., Saker, L. R., & Clarkson, D. T. (2001). Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany*, 52(354), 113-121.

Rashotte, A. M., Mason, M. G., Hutchison, C. E., Ferreira, F. J., Schaller, G. E., & Kieber, J. J. (2006). A subset of Arabidopsis AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29), 11081-11085.

Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., & Schmülling, T. (2006). Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell*, 18(1), 40-54.

Rodriguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current protocols in food analytical chemistry*.

Saito, K. (2000). Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Current opinion in plant biology*, 3(3), 188-195.

Saito, K. (2004). Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology*, 136(1), 2443-2450.

Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 431-449.

Sanda, S., Leustek, T., Theisen, M. J., Garavito, R. M., & Benning, C. (2001). Recombinant Arabidopsis SQD1 converts UDP-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 3941-3946.

Schaller, G. E., Shiu, S. H., & Armitage, J. P. (2011). Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Current Biology*, 21(9), R320-R330.

Séguéla, M., Briat, J. F., Vert, G., & Curie, C. (2008). Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *The Plant Journal*, *55*(2), 289-300.

Sirko, A., Wawrzyńska, A., Rodríguez, M. C., & Sęktas, P. (2014). The family of LSU-like proteins. *Frontiers in plant science*, *5*, 774.

Shi, T., Zhao, D., Li, D., Wang, N., Meng, J., Xu, F., & Shi, L. (2012). *Brassica napus* root mutants insensitive to exogenous cytokinin show phosphorus efficiency. *Plant and soil*, *358*(1-2), 61-74.

Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J. P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T., & Davies, J. P. (2002). Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1; 2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *The Plant Journal*, *29*(4), 475-486.

Strnad, M., Hanuš, J., Vaněk, T., Kamínek, M., Ballantine, J. A., Fussell, B., & Hanke, D. E. (1997). Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus × canadensis* Moench., cv. *Robusta*). *Phytochemistry*, *45*(2), 213-218.

Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., ... & Ren, D. (2011). Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, *23*(1), 364-380.

Sýkorová, B., Kurešová, G., Daskalova, S., Trčková, M., Hoyerová, K., Raimanová, I., ... & Kamínek, M. (2008). Senescence-induced ectopic expression of the *A. tumefaciens ipt* gene in wheat delays leaf senescence, increases cytokinin content, nitrate influx, and nitrate reductase activity, but does not affect grain yield. *Journal of Experimental Botany*, *59*(2), 377-387.

Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Smith, F. W., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M. J., & Saito, K. (2000). The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *23*(2), 171-182.

Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., ... & Sakakibara, H. (2004a). AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, *45*(8), 1053-1062.

Takei, K., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2004b). Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(40), 41866-41872.

Tran, L. S. P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(51), 20623-20628.

Turner, J. E., Mok, D. W., Mok, M. C., & Shaw, G. (1987). Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of O-xylosylzeatin in *Phaseolus vulgaris* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(11), 3714-3717.

Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T., & Tabata, S. (2001). The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, *42*(7), 751-755.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, *3*(7), 1-12.

Vogel, J. P., Schuerman, P., Woeste, K., Brandstatter, I., & Kieber, J. J. (1998). Isolation and characterization of Arabidopsis mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics*, *149*(1), 417-427.

Vreman, H. J., Skoog, F., Frihart, C. R., & Leonard, N. J. (1972). Cytokinins in Pisum transfer ribonucleic acid. *Plant physiology*, *49*(5), 848-851.

Wang, R., Tischner, R., Gutiérrez, R. A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., ... & Crawford, N. M. (2004). Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *136*(1), 2512-2522.

Wang, Z., Mao, J. L., Zhao, Y. J., Li, C. Y., & Xiang, C. B. (2015). L-cysteine inhibits root elongation through auxin/PLETHORA and SCR/SHR pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of integrative plant biology*, *57*(2), 186-197.

Wawrzyńska, A., & Sirko, A. (2014). To control and to be controlled: understanding the *Arabidopsis* SLIM1 function in sulfur deficiency through comprehensive investigation of the EIL protein family. *Frontiers in plant science*, *5*, 575.

Wawrzyńska, A., Moniuszko, G., & Sirko, A. (2015). Links Between Ethylene and Sulfur Nutrition - A Regulatory Interplay or Just Metabolite Association?. *Frontiers in plant science*, *6*, 1053.

Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Krämer, U., & Schmülling, T. (2010). Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *The Plant Cell*, *22*(12), 3905-3920.

Wulfetange, K., Lomin, S. N., Romanov, G. A., Stolz, A., Heyl, A., & Schmülling, T. (2011). The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*, *156*(4), 1808-1818.

Yatusevich, R., Mugford, S. G., Matthewman, C., Gigolashvili, T., Frerigmann, H., Delaney, S., ... & Kopriva, S. (2010). Genes of primary sulfate assimilation are part of the glucosinolate biosynthetic network in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *62*(1), 1-11.

Yonekura-Sakakibara, K., Kojima, M., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2004). Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant physiology*, *134*(4), 1654-1661.

Zhang, B., Pasini, R., Dan, H., Joshi, N., Zhao, Y., Leustek, T., & Zheng, Z. L. (2014). Aberrant gene expression in the Arabidopsis SULTR1; 2 mutants suggests a possible regulatory role for this sulfate transporter in response to sulfur nutrient status. *The Plant Journal*, 77(2), 185-197.

Zhao, Q., Wu, Y., Gao, L., Ma, J., Li, C. Y., & Xiang, C. B. (2014). Sulfur nutrient availability regulates root elongation by affecting root indole-3-acetic acid levels and the stem cell niche. *Journal of integrative plant biology*, 56(12), 1151-1163.

Zuber, H., Davidian, J. C., Aubert, G., Aimé, D., Belghazi, M., Lugan, R., ... & Gallardo, K. (2010). The seed composition of Arabidopsis mutants for the group 3 sulfate transporters indicates a role in sulfate translocation within developing seeds. *Plant physiology*, 154(2), 913-926.

Zürcher, E., Tavor-Deslex, D., Lituiev, D., Enkerli, K., Tarr, P. T., & Müller, B. (2013). A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network in planta. *Plant physiology*, 161(3), 1066-1075.

Zwack, P. J., & Rashotte, A. M. (2015). Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *Journal of experimental botany*, 66(16), 4863-4871.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1	Metabolismus a asimilace síry v rostlinné buňce	str. 11
Obr. 2	Izoprenoidní a aromatické cytokininy	str. 16
Obr. 3	Schéma biosyntézy a degradace cytokininů	str. 19
Obr. 4	Schéma signální dráhy cytokininů	str. 22
Obr. 5	Schéma způsobu kultivace se zastíněnými kořeny	str. 26
Obr. 6	Schéma kinetické reakce ke stanovení glutathionu	str. 30
Obr. 7	Obsah glutathionu u standardních rostlin <i>A. thaliana</i> za nedostatku síry/působení cytokininů	str. 38
Obr. 8	Vliv stresu na obsah cytokininů u <i>A. thaliana</i>	str. 43
Obr. 9	Rostliny <i>TCSnew::GFP</i> kultivované od semene na nedostatku síry	str. 45
Obr. 10	Rostliny <i>TCSnew::GFP</i> přenesené na médium s nedostatkem síry	str. 46
Obr. 11	Elongace kořenů za nedostatku síry	str. 48
Obr. 12	Obsah glutathionu u standardních rostlin a mutantních rostlin insenzitivních k cytokininům (1 den)	str. 50
Obr. 13	Obsah glutathionu u standardních rostlin a mutantních rostlin insenzitivních k cytokininům (3 dny)	str. 51
Obr. 14	Obsah antokyanů u standardních rostlin a mutantních rostlin insenzitivních k cytokininům	str. 53

9 SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Složení ½ MS kultivačního média	str. 25
Tab. 2	Primery použité pro qPCR	str. 29
Tab. 3	Regulace genů odpovědi na nedostatek síry při změně hladiny cytokininů	str. 34
Tab. 4	Regulace genů odpovědi na nedostatek síry při změně hladiny cytokininů a dostupnosti dusíku	str. 37
Tab. 5	Regulace genů metabolismu cytokininů při nedostatku síry	str. 40
Tab. 6	Obsah cytokininů v pmol/g čerstvé hmotnosti	str. 42

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC	ATP-Binding-Casette (rodina transportérů)
ACC	aminocyklopropankarboxylová kyselina
ACT2	aktin 2
ADP	adenosindifosfát
AHK	histidinové kinázy (<i>A. thaliana</i>)
AHP	histidinfosfotransferové proteiny (<i>A. thaliana</i>)
AMP	adenosinmonofosfát
APR	adenosin-5'-fosfosulfátreduktáza
APS	adenosin-5'-fosfosulfát
ARR	regulátory odpovědi (<i>A. thaliana</i>)
ATP	adenosintrifosfát
BA	benzylaminopurin
BGLU28	betaglukosidáza 28
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CKX	cytokininoxidáza/dehydrogenáza
CRE1	CYTOKININ RESPONSE 1 (receptor cytokininů)
CRF	CYTOKININ RESPONSE FACTOR (transkripční faktor)
CYP735A2	cytokininhydroxyláza
cZ	<i>cis</i> -zeatin
DEPC	diethylpyrokarbonát
DMAPP	dimethylalylidifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	nukleosidtrifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ENT	EQUALIBRATIC NUCLEOSIDE TRANSPORTER (transportér cytokininů)
ER	endoplazmatické retikulum
FAD	flavinadenindinukleotid
FW	fresh weight (čerstvá hmotnost)
GFP	green fluorescent protein

GGCT	γ -glutamylcyklotransferáza
GGT	γ -glutamyltransferáza
GSH	glutathion (redukovaná forma)
GSSG	glutathion (oxidovaná forma)
GST	glutathion-S-transferáza
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
HY5	ELONGATED HYPOCOTYL 5
CHASE	cytokinin vazebná doména histidinových kináz
IAA	indolyl-3-octová kyselina
iP	isopentyladenin
IPT	isopentyladenintransferáza
JA	kyselina jasmonová
K	kontrolní médium
LSU1 a 2	RESPONSE TO LOW SULFUR (proteiny)
MES	2-[N-morfolino]ethansulfonová kyselina
miR395	mikroRNA regulující asimilaci síry
MS	kultivační médium (Murashige a Skoog)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaná forma)
NIT3	nitriláza
OAS	O-acetylserin
PIN1	PIN-FORMED PROTEIN (transportér auxinu)
PUP	purinpermeáza
ROS	Reactive Oxygene Species (reaktivní formy kyslíku)
RNA	ribonukleová kyselina
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
-S	médium prosté síry
SAT	serinacetyltransferáza
SDI	SULFUR DEFICIENCY INDUCED
SERAT	serinacetyltransferáza
SHM7	serinhydroxymethyltransferáza 7
SLIM1	SULFUR LIMITATION 1 (regulátor transkripce)
SULTR	SULFATE TRANSPORTER (transportní protein síranu)
SURE	SULFUR RESPONSIVE ELEMENT

TCS	two component sensor
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
U	jednotka enzymového množství
UBQ10	POLYUBIQUITIN10
UV	ultrafialové záření
<i>WUSCHEL</i>	homeoboxový gen vrcholového meristému
<i>ZmCKX1</i>	gen <i>Zea mays</i> pro cytokininoxidázu/dehydrogenázu
ZOG	zeatin-O-glukosid
γ -ECS	γ -glutamyl-cysteinsyntetáza

11 PŘÍLOHA

Tabulka přílohy 1: Expresse genů spojených s cytokininy u kořene standardních rostlin *A. thaliana* po kultivaci na médiu prostém síry po 24 hodin. Expresse sledovaných genů byla stanovena pomocí RT-qPCR využívající systém Universal Probe Library (Roche Life Science); geny, jejichž exprese byla stanovena konvenční RT-qPCR s využitím SYBR Greenu II, jsou označeny hvězdičkou. Hodnoty vyjadřují relativní expresi oproti kontrole (hodnota 1). Výsledky prezentovány jako průměry (\pm standardní odchylka). Podregulace genů znázorněna zeleně, nadregulace červeně.

relativní exprese				relativní exprese			
gen	(-S/ctrl \pm SD)			gen	(-S/ctrl \pm SD)		
<i>LSUI*</i>	18,5	\pm	5,7	<i>IPT3*</i>	0,6	\pm	0,2
<i>SDII*</i>	25,6	\pm	7,8	<i>IPT3</i>	0,6	\pm	0,2
<i>AHK1</i>	0,8	\pm	0,1	<i>IPT5*</i>	0,8	\pm	0,4
<i>AHK3</i>	1,2	\pm	0,0	<i>IPT5</i>	0,9	\pm	0,3
<i>AHP1</i>	0,8	\pm	0,2	<i>IPT7</i>	0,7	\pm	0,2
<i>AHP2</i>	1,0	\pm	0,1	<i>IPT9</i>	0,9	\pm	0,1
<i>AHP3</i>	1,1	\pm	0,0	<i>CYP735A1</i>	1,0	\pm	0,0
<i>AHP5</i>	1,0	\pm	0,1	<i>CYP735A2*</i>	0,6	\pm	0,2
<i>ARR1</i>	1,0	\pm	0,1	<i>CYP735A2</i>	0,7	\pm	0,1
<i>ARR4</i>	0,9	\pm	0,1	<i>LOG1</i>	1,0	\pm	0,0
<i>ARR5</i>	0,8	\pm	0,1	<i>LOG3</i>	0,9	\pm	0,1
<i>ARR6</i>	0,9	\pm	0,1	<i>LOG4</i>	1,3	\pm	0,1
<i>ARR7</i>	0,7	\pm	0,1	<i>LOG5</i>	2,0	\pm	0,3
<i>ARR8</i>	0,7	\pm	0,2	<i>LOG7</i>	1,4	\pm	0,1
<i>ARR9</i>	0,8	\pm	0,1	<i>LOG8</i>	1,2	\pm	0,1
<i>ARR10</i>	1,0	\pm	0,2	<i>APT1</i>	1,1	\pm	0,0
<i>ARR11</i>	1,0	\pm	0,1	<i>APT2</i>	0,9	\pm	0,1
<i>ARR12</i>	1,0	\pm	0,0	<i>APT3</i>	1,0	\pm	0,1
<i>ARR14</i>	0,8	\pm	0,2	<i>APT4</i>	1,5	\pm	0,2
<i>ARR15</i>	1,1	\pm	0,8	<i>APT5</i>	0,9	\pm	0,0
<i>ARR16</i>	1,8	\pm	0,9	<i>UGT73C5</i>	1,5	\pm	0,1
<i>ARR17</i>	1,3	\pm	0,7	<i>UGT76C1</i>	1,0	\pm	0,1
<i>APRR1</i>	0,9	\pm	0,1	<i>UGT76C2</i>	1,1	\pm	0,1
<i>APRR2</i>	1,0	\pm	0,1	<i>UGT85A1</i>	0,9	\pm	0,2
<i>APRR3</i>	1,0	\pm	0,1	<i>CKX1</i>	1,3	\pm	0,3
<i>APRR5</i>	1,1	\pm	0,2	<i>CKX2*</i>	3,4	\pm	1,4
<i>APRR7</i>	0,8	\pm	0,1	<i>CKX2</i>	3,6	\pm	1,5
<i>APRR8</i>	0,8	\pm	0,1	<i>CKX3</i>	0,8	\pm	0,5
<i>APRR9</i>	1,1	\pm	0,3	<i>CKX4</i>	1,0	\pm	0,1
<i>CRF2</i>	0,8	\pm	0,2	<i>CKX5</i>	0,9	\pm	0,4
<i>CRF3</i>	0,9	\pm	0,1	<i>CKX6</i>	1,0	\pm	0,5
<i>CRF4</i>	0,8	\pm	0,2	<i>CKX7</i>	0,7	\pm	0,2
<i>CRF5</i>	0,8	\pm	0,1	<i>ABCG14</i>	1,0	\pm	0,0