

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Vliv cytokininového antagonisty na *Arabidopsis thaliana* v průběhu stresu kadmíem

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracovala:

Bc. Lucie Mikulíková

Vedoucí práce:

Mgr. Markéta Gemrotová, Ph.D

Studijní program:

N1501 Experimentální biologie

Studijní obor:

Experimentální biologie

Forma studia:

Prezenční

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své vedoucí Mgr. Markétě Gemrotové, Ph.D za její odborné vedení, cenné připomínky, rady a trpělivost. Dále mé díky patří všem členům kolektivu Laboratoře růstových regulátorů, kteří mi vždy byli ochotni poradit. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině, přátelům a partnerovi za porozumění a podporu.

OBSAH

OBSAH	4
Bibliografická identifikace	6
Bibliografical identification	7
Cíle práce	8
Teoretická část	9
1. Cytokininy	10
1.1. Funkce cytokininů	10
1.2. Struktura cytokininů	11
1.3. Biosyntéza a metabolismus cytokininů	12
1.3.1. Isopentenyltransferáza	12
1.3.2. Princip biosyntézy cytokininů	13
1.3.3. Degradace cytokininů	14
1.4. Signalizace cytokininů	15
1.4.1. Signální dráhy cytokininů v <i>A. thaliana</i>	16
1.4.2. Antagonisté cytokininových receptorů	18
1.5. Ovlivňování hladin cytokininů v rostlinách	19
1.5.1. Genetické modulace hladin cytokininů	20
1.5.2. Chemické modulace hladin cytokininů	20
2. Biotický a abiotický stres u rostlin	21
3. Těžké kovy	22
3.1. Zdroje těžkých kovů	23
3.2. Příjem a transport těžkých kovů v rostlinách	23
3.2.1. Transportéry kovů v rostlinách	24
3.3. Vliv těžkých kovů na rostliny	26
3.3.1. Vliv kadmia na rostliny	27
3.3.2. Oxidativní stres	28
3.4. Detoxifikace těžkých kovů v rostlinách	28
3.5. Fytoremediace	30
3.5.1. Fytoakumulace	31
Praktická část	33
4. Materiál a přístroje	34
4.1. Chemikálie	34
4.2. Přístrojové vybavení	35
4.3. Biologický materiál	35
4.4. Roztoky	35

4.4.1. Média pro pěstování <i>A. thaliana</i>	35
4.4.2. Roztoky pro izolaci a stanovení proteinů	36
4.4.3. Elektroforetické roztoky	36
4.4.4. Roztoky pro Western blot	37
5. Metody	37
5.1. Pěstování <i>A. thaliana</i> s využitím hydroponických tanků	37
5.2. Pěstování <i>A. thaliana</i> s využitím nádobek z polypropylenu	38
5.3. Pěstování <i>A. thaliana</i> ve 24-jamkových deskách	38
5.4. Extrakce RNA a její reverzní transkripce	39
5.5. Kvantitativní PCR v reálném čase	39
5.6. Western blot	40
5.6.1. Izolace proteinů z rostlinného materiálu	40
5.6.2. Stanovení proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové	40
5.6.3. Elektroforéza a Western blot	40
5.6.4. Detekce proteinů	41
5.7. Stanovení flavonoidů	41
5.8. Stanovení etylenu	42
6. Výsledky	42
6.1. Kvantitativní PCR v reálném čase	42
6.1.1. Hladina exprese vybraných genů v rostlinách <i>A. thaliana</i> vystavených kadmii	42
6.1.2. Hladina exprese vybraných genů v <i>A. thaliana</i> během třídnenního stresu kadmii	45
6.1.3. Hladina exprese genů transportérů kovů v rostlinách <i>A. thaliana</i> ošetřených cytokininem nebo antagonistou cytokininů	49
6.1.4. Hladina exprese genů transportérů kovů v kořenech <i>A. thaliana</i> ošetřených kadmii, cytokininem nebo antagonistou cytokininů	50
6.1.5. Hladina exprese genu <i>AtACS8</i>	52
6.2. Western blot	52
6.3. Stanovení flavonoidů	53
6.4. Měření ploch listů <i>A. thaliana</i>	54
6.5. Stanovení etylenu	55
7. Diskuze	56
8. Závěr	61
9. Seznam použitých zkratk	63
10. Seznam použité literatury	66

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Lucie Mikulíková
Název práce	Vliv cytokininového antagonisty na <i>Arabidopsis thaliana</i> v průběhu stresu kadmiem
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení chemické biologie a genetiky
Vedoucí práce	Mgr. Markéta Gemrotová, Ph.D
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>Kadmium je neesenciální těžký kov, který v rostlinách negativně ovlivňuje fyziologické a biochemické procesy. Způsobuje například zpomalení růstu rostlin, redukcí kořenových vlásků, žloutnutí listů a hnědnutí kořenových špiček. Cytokininy jsou rostlinné hormony účastníci se mnoha vývojových a fyziologických dějů včetně reakcí na biotický a abiotický stres. Sledování metabolismu cytokininů a transportu kovů v rostlinách je cenné pro pochopení principů, kterými rostliny reagují na stres těžkými kovy. Cytokininový antagonist PI-55 má pozitivní vliv na rostliny během stresu kadmiem. Pochopení mechanismu účinku tohoto antagonisty by mohlo posloužit v procesu fytoremediace, který je využíván k odstraňování škodlivých látek z životního prostředí rostlinami. V rámci této práce byl sledován vliv kadmia, cytokininu a antagonisty cytokininů na expresi genů, jejichž produkty se účastní metabolismu a signalizace cytokininů, transportů kovů a odpovědi rostlin na stres. Dále bylo pozorováno působení těchto látek a kadmia na množství klíčového transportéru kovů AtIRT1, na velikost plochy listů, množství flavonoidů a produkci etylenu rostlinami <i>A. thaliana</i>.</p>
Klíčová slova	Cytokininy, antagonisté cytokininů, abiotický stres kadmiem
Počet stran	89
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's name	Bc. Lucie Mikulíková
Title	The influence of cytokinin antagonist on <i>Arabidopsis thaliana</i> during the cadmium stress
Type of thesis	Master
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Chemical Biology and Genetics
Supervisor	Mgr. Markéta Gemrotová, Ph.D
Year of presentation	2015
Abstract	<p>Cadmium is nonessential heavy metal which influences physiological and biochemical processes in plants. It causes for example growth inhibition, root reduction, chlorosis and browning of root tips. Cytokinins are plant hormones that participate in many developmental and physiological mechanisms including reactions to biotic and abiotic stress. The observation of cytokinin metabolism and metal transportation in plants is valuable for understanding the principles how plants react to heavy metal stress. The cytokinin antagonist PI-55 has a positive effect on plants during the cadmium stress. The comprehension of mechanisms of its impact can be useful for phytoremediation which is exploited to remove harmful substances from the environment by plants. In this thesis the effect of cadmium, cytokinin and cytokinin antagonist on the expression of genes which products take part in cytokinin metabolism and signalling, metal transportation and response to stress was studied. Next the influence of these substances and cadmium on the level of metal transporter AtIRT1, on the size of the leaf area, on the amount of flavonoids and on the production of ethylene in <i>A. thaliana</i> was observed.</p>
Keywords	Cytokinins, cytokinin antagonists, abiotic stress by cadmium
Number of pages	89
Number of appendices	0
Language	Czech

Cíle práce:

- Provést rešerši na téma cytokininy a stres těžkými kovy.
- Experimentálně sledovat roli cytokininu nebo antagonisty cytokininu na *Arabidopsis thaliana* v průběhu stresu kadmíem:
 - metodou qRT-PCR sledovat vliv na expresi genů metabolismu a signalizace cytokininů, vybraných transportérů kovů a genů důležitých při odpovědi na stres,
 - pozorovat průběh růstu *A. thaliana* během stresu kadmíem a optimalizovat metodu pro měření etylenu na těchto rostlinách,
 - změřit obsah flavonoidů v rostlinách vystavených účinku kadmia v přítomnosti cytokininového antagonisty.
- Diskutovat získané výsledky.

Teoretická část

1. Cytokininy

Cytokininy jsou N⁶-substituované deriváty adeninu a patří mezi rostlinné hormony, které působí v nízkých koncentracích. Řadí se také mezi růstové regulátory, což jsou látky ovlivňující růst rostlin. Vyskytují se jako aromatické nebo isoprenoidní, v závislosti na struktuře jejich postranního řetězce na N⁶ atomu (Mok & Mok, 2001).

První cytokinin, který byl izolován, pocházel ze spermatu sledě. Jednalo se o 6-furfuryladenin a byl identifikován v roce 1955 F. Skoogem a jeho kolegy (Miller et al., 1955). Svůj triviální název kinetin získal podle schopnosti podporovat buněčné dělení (cytokinezi), z čehož byl následně odvozen i název cytokininů.

1.1. Funkce cytokininů

Cytokininy se transportují v rámci rostliny a vážou se na specifické proteinové receptory, čímž se účastní mnoha důležitých vývojových a fyziologických procesů. Jsou významné při reakcích rostlin na biotický i abiotický stres (Werner & Schmölling, 2009). Účastní se regulace buněčného cyklu, ovlivňují vývoj květů a plodů, podílí se na regulaci klíčení semen a růstu postranních pupenů (Mok & Mok, 1994). Jelikož brání odbourávání proteinů a zároveň podporují aktivaci jejich syntézy, podílí se na zpomalení stárnutí rostlinných orgánů (Campbell, 2008).

V kořenech rostlin je důležitý vzájemný poměr cytokininů a auxinů. Zvýšené množství cytokininů v kořenech ovlivňuje prodlužování kořenů, negativně reguluje růst postranních kořenů a působí na meristematickou diferenciaci cévních svazků (Sondheimer & Tzou, 1971; Werner & Schmölling, 2009). Oba tyto hormony zásadním způsobem zasahují do morfogeneze rostlin (Werner et al., 2001).

Cytokininy se také uplatňují v symbióze s plísněmi či bakteriemi. Velice známé je soužití rostliny s bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, která je sama schopna produkovat cytokininy a auxiny. Jejím působením potom vzniká kalus, čili nediferenciované pletivo, které se využívá například ve šlechtění nebo množení rostlin.

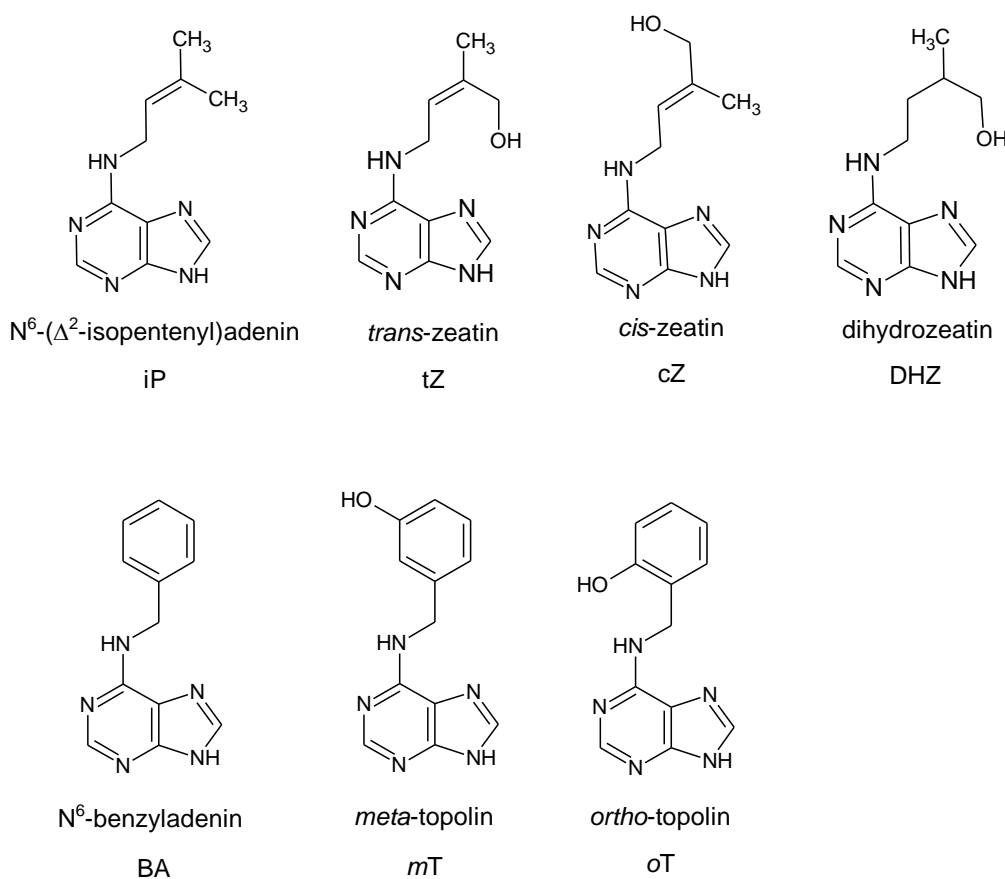
Dále významně reagují na koncentraci živin v půdě. Bylo prokázáno, že jsou schopny ovlivnit směr růstu kořenů tak, aby rostlina dosáhla místa, kde se živiny vyskytují ve větším množství (Werner & Schmölling, 2009). Účastní se i reakce rostlin na světlo. Ve tmě inhibují prodlužování hypokotylu rostliny, naopak za světla tento efekt nebyl pozorován (Su & Howell, 1995).

1.2. Struktura cytokininů

Mezi isoprenoidní cytokiny řadíme isopentenyladenin (iP), z něhož hydroxylací postranního řetězce v *cis*- nebo *trans*- koncové poloze vzniká zeatin (cZ nebo tZ). Jeho název vznikl podle rostliny, v níž byl poprvé objeven, a to kukuřice (*Zea mays* L., Letham, 1963). Redukcí dvojnásobné vazby zeatinu vzniká dihydrozeatin (DHZ).

Kromě přirozeně se vyskytujících isoprenoidních cytokininů existují i cytokiny aromatické, které se v přírodě vyskytují daleko méně (Strnad, 1997). Mezi aromatické cytokiny patří benzyladenin (BA). Přítomnost jeho hydroxylovaných derivátů byla potvrzena v topolech, podle kterých získaly svá pojmenování topoliny (*meta*-topolin a *ortho*-topolin). Následně byly objeveny i v jiných rostlinných druzích, jako např. v huseníčku (Tarkovská et al., 2003) či hrášku (Gaudinová et al., 2005).

Deriváty fenylmočoviny jako N,N-difenylničovina (DPU) nebo thidiazuron (TDZ) jsou výhradně syntetickými cytokiny. TDZ se pro svoji vysokou stabilitu hojně využívá v rostlinných tkáňových kulturách (Mok et al., 1982). Dále se vedle volných cytokininů objevují cytokiny ve formě ribosidů nebo nukleotidů, které se v rostlinách vyskytují dokonce ve větší míře (Chen, 1997).



Obr. 1: Struktury cytokininů.

1.3. Biosyntéza a metabolismus cytokininů

První reakce biosyntézy cytokininů je katalyzována enzymem isopentenyltransferázou (IPT). Jedná se o N-prenylaci adenosin 5'-fosfátu (AMP, ADP, ATP) na atomu N⁶, kdy prenylové skupiny pochází z dimetylalyl pyrofosfátu (DMAPP) nebo hydroxymetylbutenyl difosfátu (HMBDP; Krall et al., 2002). HMBDP se může přeměnit na DMAPP nebo dává vznik zeatinovému typu cytokininů. Obě tyto biosyntetické cesty jsou velmi důležité pro syntézu aktivních cytokininů v *Arabidopsis thaliana* (Åstot et al., 2000; Kakimoto, 2003; Sakakibara, 2006). V tomto případě hovoříme o adenylát IPT (EC 2.5.1.27), existuje však ještě tRNA IPT (EC 2.5.1.8), která umožňuje přenos isopentenylu na adenin tRNA.

1.3.1. Isopentenyltransferáza

Poprvé byla aktivita IPT pozorována u hlenek *Dyctiostelium discoideum* a je důležitá pro tvorbu discadeninu, který brání klíčení spor (Taya et al., 1978). Gen pro biosyntézu cytokininů, tumour morphology root (*Tmr*), byl poprvé identifikován v patogenních bakteriích *Agrobacterium tumefaciens* a v roce 1984 byla potvrzena aktivita jeho produktů (Akyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984).

V *A. thaliana* se vyskytuje 9 izoenzymů IPT, které se účastní biosyntézy cytokininů (Kakimoto, 2001; Takei, 2001). Pouze dva z těchto enzymů (AtIPT2 a AtIPT9) patří mezi tRNA IPT a zbylých sedm (AtIPT1 a AtIPT3-8) se řadí mezi adenylát IPT.

AtIPT1 se vyskytuje ve vegetativních orgánech, ale také ve zralých květech. AtIPT3 se exprimuje zejména v kořenové a listové žilnatině, čili ve floému. AtIPT5 a AtIPT7 je možné detekovat ve vegetativních orgánech, zatímco IPT4 a IPT8 se vyskytují především v orgánech reprodukčních (Hirose et al., 2008). Distribuce některých IPT v rámci rostliny je znázorněna na Obr. 5. Rozložení jednotlivých IPT je různé i v rámci buněk. AtIPT1, 3, 5 a 8 jsou prokazatelné v plastidech a AtIPT4 se vyskytuje v cytosolu. V mitochondriích byla potvrzena přítomnost AtIPT7 (Kasahara et al., 2004). Dále bylo prokázáno, že cytokininy negativně regulují expresi enzymů AtIPT1, 3, 5 a 7, ale na AtIPT4, 6 a 8 vliv nemají (Miyawaki et al., 2006).

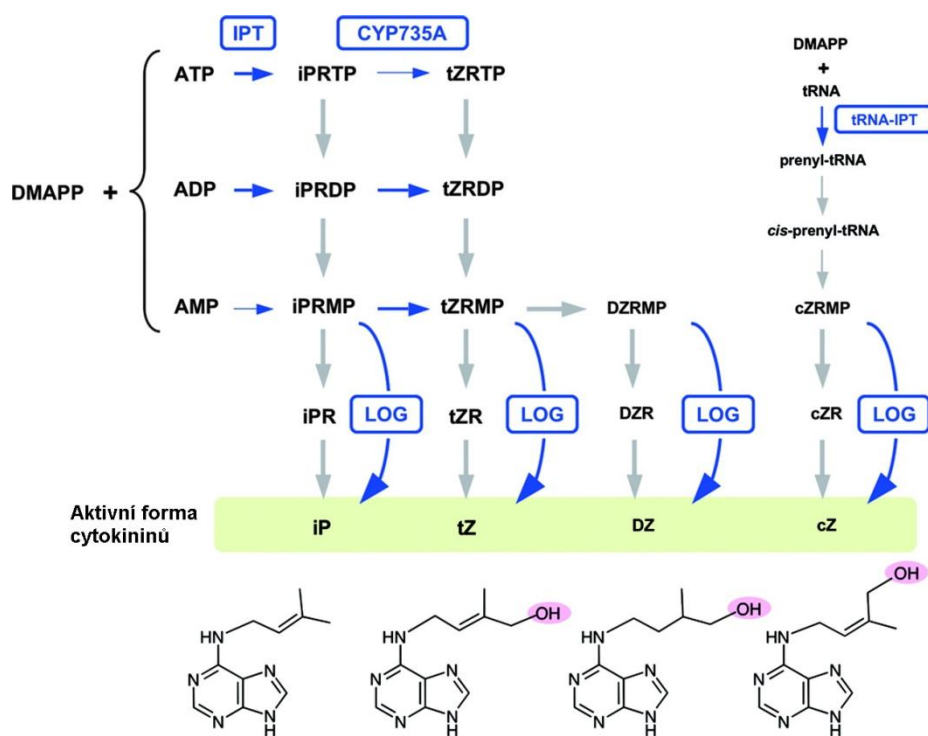
Enzymy AtIPT2 a AtIPT9 mají afinitu k tRNA. Rozpoznávají zejména tRNA, která obsahuje kodon začínající uridinem a katalyzují přenos isopentenyllové skupiny na adeninový kruh této tRNA (Persson et al., 1994). Geny pro AtIPT2 a AtIPT9 jsou exprimovány zejména v rostoucích pletivech rostlin, včetně apikálních meristémů

a prvotních listů (Miyawaki et al., 2004). Bylo prokázáno, že AtIPT2 se nachází v cytosolu (Kasahara et al., 2004).

Hladiny IPT v rostlinách mohou být ovlivňovány stresem a přísunem živin. Bylo zjištěno, že vlivem stresu těžkými kovy dochází ke snížení hladiny genů pro AtIPT7 v kořenech a naopak k jejímu zvýšení v listech *A. thaliana*. Rostliny vystavené zvýšenému množství mědi reagovaly opačně (Sofa et al., 2013). Dále byl pozorován nárůst hladiny genu pro GmIPT1 v sóji po stresu chladem a vyšší koncentraci soli (Ye et al., 2006).

1.3.2. Princip biosyntézy cytokininů

Rostlinné isopentenyltransferázy využívají jako akceptory isoprenoidního řetězce ATP nebo ADP, přičemž vzniká isopentenylribosid trifosfát (iPRTP) nebo isopentenylribosid difosfát (iPRDP). Defosforylací pomocí fosfatázy se vytváří příslušný monofosfát (iPRMP). Z iPRMP může být pomocí cytochrom P450 monooxygenázového systému (CYP735A) syntetizován *trans*-zeatinribosid monofosfát (tZRMP). *Cis*-zeatinribosid monofosfát (cZRMP) vzniká degradací *cis*-prenyl tRNA. Jednotlivé iPRMP, tZRMP a cZRMP jsou následně převedeny na volné báze pomocí fosforibohydrolázy tzv. Lonely guy (LOG). Další možností vzniku volných cytokininových bází je dvoukroková reakce, při které dochází k odštěpení fosfátu za vzniku příslušných ribosidů, což je katalyzováno 5'-ribonukleotid fosfohydrolázou. Následně jsou ribosidy přeměněny na aktivní volné báze pomocí adenosin nukleosidázy. cZ a tZ mohou poté být enzymaticky přeměňovány mezi sebou pomocí zeatin *cis-trans* isomerázy. Působením glukosyltransferáz (UGT) může docházet ke konjugaci cytokininů s cukernými skupinami, což vede k inaktivaci cytokininů. K degradaci cytokininů dále dochází vlivem cytokinin dehydrogenáz (CKX, EC 1.5.99.12; Kakimoto, 2003; Sakakibara, 2006). Schéma biosyntézy cytokininů je uvedeno na Obr. 2.



Obr. 2: Schéma biosyntézy cytokininů v *A. thaliana* (upraveno a převzato z Hirose et al., 2008).

1.3.3. Degradace cytokininů

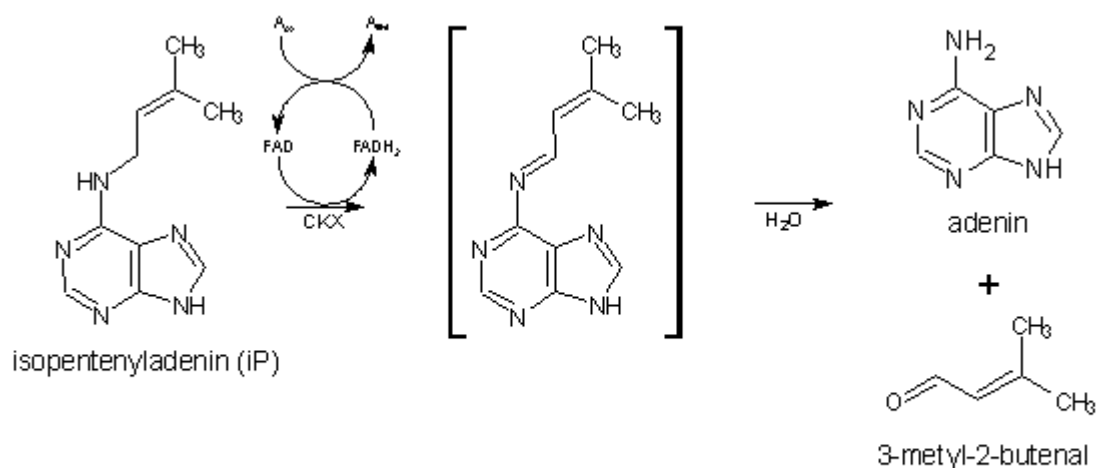
Hladina cytokininů je v rostlinách regulována pomocí jejich degradace, která může být reverzibilní nebo ireverzibilní. V prvním případě se jedná o spojení molekuly cytokininu s molekulou sacharidu nebo s aminokyselinou. Při reverzibilní degradaci se uplatňují například enzymy *O*-xylosyltransferáza (EC 2.4.1.204) a *O*-glukosyltransferáza (EC 2.4.1.203), která katalyzuje vznik *O*-glukosylzeatinu. Ten je v této formě odolný vůči působení CKX (Laloule & Pethe, 1982) a může být přeměněn zpět na aktivní cytokinin pomocí β -glukosidázy (EC 3.2.1.21; Brzobohatý et al., 1993).

Nevratná degradace je zajištěna enzymem cytokinin dehydrogenázou. Během této jedнокrokové reakce dochází ke štěpení cytokininu na adenin a příslušný aldehyd (Obr. 3; Brownlee et al., 1975). Na enzym CKX je kovalentně vázán kofaktor flavin adenin dinukleotid (FAD) vykazující dvojí katalytickou funkci (Galuszka et al., 2008). CKX jako dehydrogenáza má vysokou substrátovou specifitu k isoprenoidním cytokininům a jako oxidáza katalyzuje degradaci aromatických cytokininů (Werner et al., 2006).

V *A. thaliana* je známo sedm genů pro CKX (AtCKX1-AtCKX7; Schmölling et al. 2003). K expresi těchto genů dochází především v proliferujících pletivech rostlin. AtCKX1

a AtCKX2 se nachází ve vzrostném vrcholu stonku. AtCKX5 se vyskytuje spolu s AtCKX4 v mladých listech (Werner et al., 2006) a byla také prokázána s AtCKX6 v meristému kořenů a zralých květech. AtCKX6 se dále nachází v kořenové a listové žilnatině (Hirose et al., 2008) stejně jako AtCKX7, která byla navíc detekována ve zralých semenech (Köllmer et al., 2014). Distribuce AtCKX v rostlině je vyobrazena na Obr. 5. Rozmístění enzymů AtCKX se neliší pouze v rámci rostliny, ale i uvnitř buněk *A. thaliana*. Ve vakuolách byla zjištěna přítomnost AtCKX1 a AtCKX3, zatímco v cytosolu se vyskytuje AtCKX7. AtCKX2, 4, 5 a 6 byly pozorovány v apoplastu (Werner et al., 2001).

Dále geny pro CKX existují například v rýži (Ashikari et al., 2005), kukuřici (Houba-Herlin et al., 1999; Morris et al., 1999), pšenici nebo v ječmeni (Galuzska et al., 2004). Prokázány byly i v jiných organismech, a to například ve *Funaria hygrometrica* (Gerhäuser & Bopp, 1990) a *D. discoideum* (Armstrong & Firtel 1989).



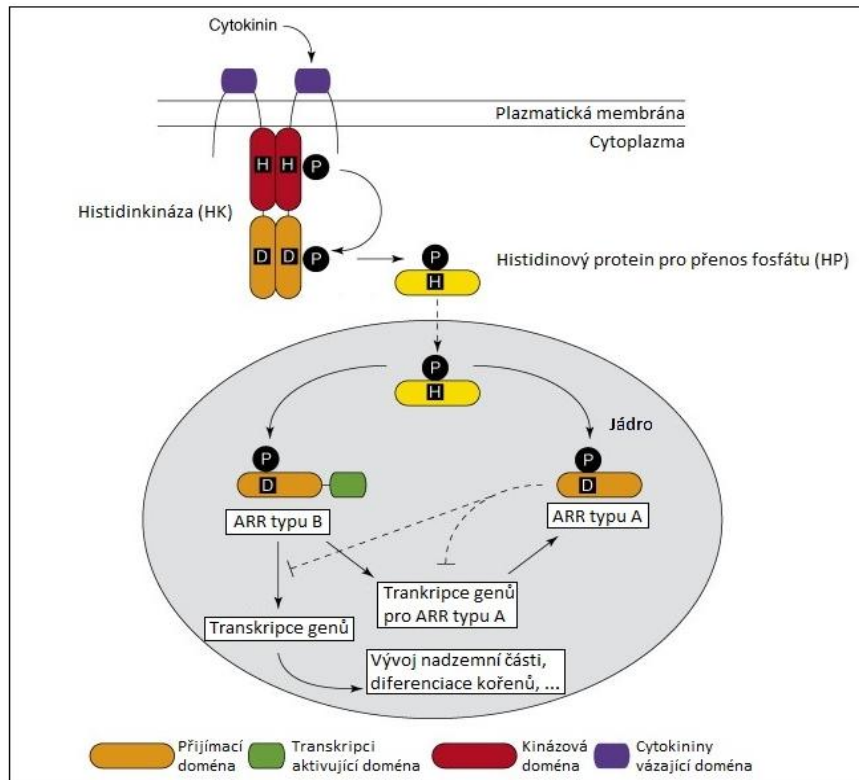
Obr. 3: Degradace isopentenyladeninu pomocí CKX.

1. 4. Signalizace cytokininů

Signální dráhy cytokininů jsou tvořeny dvěma základními komponentami. První komponentou je histidinkináza (HK), která je tvořena dvěma doménami. Jedna z těchto domén se nachází extracelulárně a slouží k perцепci signálu, druhá je umístěna v cytoplasmě a podílí se na přenosu signálu. Po přijetí signálu dochází k autofosforylaci histidinových zbytků a fosfátová skupina je přenesena na kyselinu asparagovou (Asp), která je součástí přijímací domény druhé komponenty signální dráhy cytokininů, a to regulátoru odpovědi (RR). Většina RR obsahuje ještě jednu doménu výstupní, která

působí jako transkripční faktor. Její aktivita je regulována podle stupně fosforylace přijímací domény (Hutchison & Kieber, 2002; Kieber, 2002; Kakimoto, 2003).

U eukaryotických organismů byl však popsán více krokový mechanismus signalizace, který zahrnuje ještě komponentu histidinový protein pro přenos fosfátu (HP). HP je fosforylován pomocí Asp, která je v tomto případě součástí histidinkinázy, následně dochází k přenosu fosfátu z HP na RR v jádře, což vede k expresi příslušných proteinů (To & Kieber, 2008).

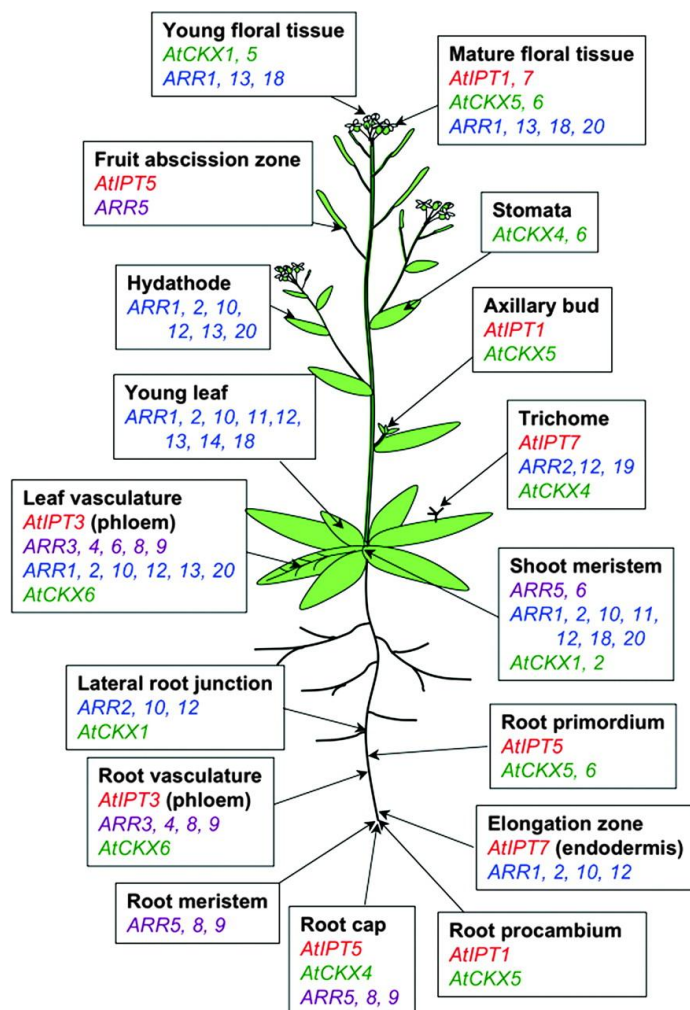


Obr. 4: Základní schéma přenosu signálu v buňce *A. thaliana* po navázání cytokininu na histidinkinázový receptor (upraveno a převzato z Tucker & Laux, 2007).

1.4.1. Signální dráhy cytokininů v *A. thaliana*

U *A. thaliana* se vykytují tři typy histidinkinázových receptorů, a to AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4. Tyto receptory obsahují obě výše zmíněné domény, ale navíc je jejich součástí doména, na kterou se váží cytokininy, tzv. CHASE (cyclase/histidine kinase associated sensing extracellular) doména (Ferreira & Kieber, 2005; To & Kieber, 2008). Expresce genů pro AHK2 a AHK3 byla pozorována v nadzemních částech rostlin, zatímco přítomnost CRE1/AHK4 byla potvrzena v kořenech (Nishimura et al., 2004).

Poté, co AHK přijme ligand, dochází k její autofosforylaci, přenosu fosfátu na AHP a následně až na ARR, který se nachází v jádře. Je známo, že se v *A. thaliana* nachází pět typů proteinů pro transfer fosfátů (AHP1-AHP5; Dortay et al., 2006; Hutchison et al., 2006). Existuje však ještě jeden AHP, který působí jako inhibitor signalizace cytokininů, a to AHP6 (Mähönen et al., 2006). Genů pro ARR se v *A. thaliana* vyskytuje 23, ty se dělí na ARR typu A, které mají kratší C-terminální doménu (výstupní) a typu B s delší C-terminální doménou. ARR typu A působí jako negativní regulátory cytokininové signalizace (zpětnovazebně zabraňují svojí transkripci) a jsou aktivovány působením cytokininů (Heyl & Schmölling, 2003; To et al., 2007). ARR typu B jsou transkripčními faktory a aktivují transkripci genů regulovaných cytokininu včetně ARR typu A (Mason et al., 2005; To et al., 2007; To & Kieber, 2008). Mají tedy pozitivní vliv na signální dráhy cytokininů. Jednotlivé podtypy ARR a jejich distribuce v rostlině jsou uvedeny na Obr. 5.



Obr. 5: Expresse genů spojených s biosyntézou, degradací a signalizací cytokininů v *A. thaliana*. Expresse genů pro AtIPT je znázorněna červeně, pro AtCKX zeleně, pro ARR typu A fialově a ARR typu B modře (převzato z Hirose et al., 2008).

1.4.2. Antagonisté cytokininových receptorů

S objevem cytokininů vzrostl zájem o látky, které naopak působí proti nim, tedy antagonisticky. Předpokládalo se, že by tyto sloučeniny mohly přispět k pochopení percepce a přenosu signálu v rámci signálních drah cytokininů a že by mohly mít význam v zemědělství, jelikož se očekával jejich opačný vliv na růst a vývoj rostlin.

V 70. letech byly synteticky připraveny látky strukturně podobné cytokininům, aby mohly soutěžit o stejné receptory (Iwamura, 1994). Jednalo se například o 7-substituované 3-methyl-pyrazolo(4,3-*d*)pirimidiny (Hecht et al., 1971; Skoog et al., 1973) nebo 7-deaza analoga 2-methylthioadeninu (Skoog et al., 1975), které byly sledovány v kalusovém růstovém testu. Ukázalo se, že některé z těchto látek mají negativní vliv na růst rostlin a po přidání cytokininů následně dochází k nápravě růstu, což vedlo k závěru, že použité sloučeniny působily na stejné receptory jako cytokininy (Iwamura, 1994).

Následně byl proveden výzkum na některých sloučeninách strukturně odlišných od cytokininů. Z těchto studií vyplynulo, že *s*-triaziny, *N*-arylkarbamáty a deriváty fenylnmočoviny působí antagonisticky na cytokininové receptory v chloroplastech (Iwamura, 1994).

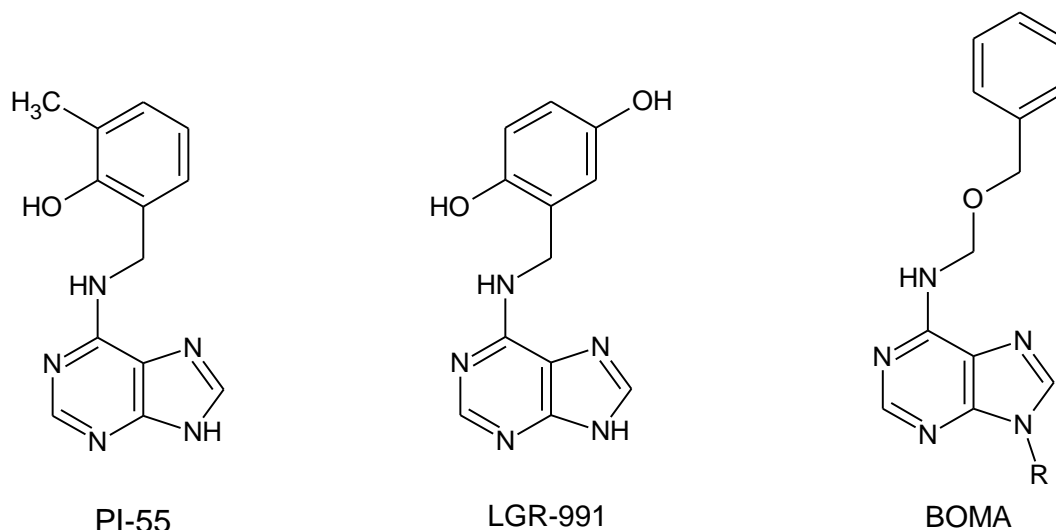
V tu dobu nebylo ovšem tolik znalostí o cytokininových receptorech a signálních drahách. Postupem času bylo zjištěno, že výše uvedené anticytokininy nejsou kompetitivními inhibitory cytokininových receptorů, ale potlačují buněčný cyklus prostřednictvím inhibice cyklin dependentních kináz (CDK; Spíchal et al., 2007). Následně byly syntetizovány nové látky tak, aby potlačovaly cytokininovou aktivitu *in vivo*, ale zároveň aby neaktivovaly cytokininovou signální dráhu a neinhibovaly CDK, což bylo vyhodnocováno v receptorových testech. Na základě tohoto výzkumu byla identifikována látka 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin (PI-55; viz Obr. 6), která je derivátem BA (Spíchal et al., 2009).

PI-55 soutěží o vazebné místo na receptorech (především na CRE1/AHK4, méně na AHK2 a 3) pro cytokininy a potlačuje aktivaci *ARR5:GUS* (Spíchal et al., 2009), což je reportérový gen, který je za normálních okolností exprimován v přítomnosti cytokininů (D'Agostino et al., 2000; Romanov et al., 2002). Antagonistický účinek PI-55 byl dále pozorován na růstu postranních kořenů, který byl podporován, a na klíčení semen, které bylo zrychleno (Spíchal et al., 2009). PI-55 může být dále využíváno ke studiu signálních drah či funkcí cytokininů v rostlinách za normálních podmínek i při stresu nebo se může pozitivně využívat v zemědělství.

V roce 2010 byla objevena další sloučenina odvozená od BA vykazující inhibiční aktivitu na cytokininových receptorech AHK3 a CRE1/AHK4. Jedná se

o 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin (LGR-991; viz Obr. 6), který má, podle cytokininových biotestů, ještě menší agonistické účinky než PI-55 a způsobuje rychlejší klíčení semen *A. thaliana* (Nisler et al. 2010).

Dalším identifikovaným antagonistou cytokininového receptoru CRE1/AHK4 se stal v roce 2012 N6-(benzyloxymetyl) adenosin (BOMA). Tento anticytokinin má, oproti PI-55 a LGR-991, jinou strukturu (viz Obr. 6; Krivosheev et al., 2012).



Obr. 6: Struktury antagonistů cytokininových receptorů. R = β -D-ribofuranosyl.

1.5. Ovlivňování hladin cytokininů v rostlinách

Díky současným znalostem o biosyntéze (Kakimoto, 2003; Sakakibara, 2006), degradaci (Laskey et al., 2003; Galuszka et al., 2005) a signálních drahách cytokininů (To et al., 2007; To & Kieber, 2008), je možné manipulovat s hladinami cytokininů v rostlinách, což je významné pro hlubší pochopení metabolismu cytokininů a jejich funkcí. Vzhledem k rozsáhlému vlivu cytokininů na růst, vývoj a fyziologické procesy v rostlinách může být těchto poznatků dále využíváno ve prospěch zemědělství.

Hladiny cytokininů mohou být ovlivňovány geneticky, kdy vznikají transgenní rostliny, které mohou mít v budoucnu veliké využití. Manipulace s geny v rostlinách a jejich pěstování je však legislativně ošetřeno a není jednoduché uvést geneticky pozměněné potraviny či krmiva na trh. Dále se mohou hladiny cytokininů regulovat pomocí chemických látek, jako jsou například různé deriváty cytokininů (včetně jejich antagonistů) nebo inhibitory CKX.

1.5.1. Genetické modulace hladin cytokininů

Nejprve byla pozorována exprese genů pro IPT pod kontrolou konstitutivních či indukovatelných promotorů, což vedlo k nadměrné produkci cytokininů v celé rostlině. Jako příklad konstitutivního promotoru můžeme uvést mozaikový virus kvěťáku (CaMV) 35S (Klee et al., 1987; Smigocki & Owens, 1988; Wang et al., 1997) a jako indukovatelný byl používán tzv. heat-shock promotor. Následně se vědci snažili ovlivnit hladinu cytokininů v jednotlivých rostlinných orgánech. Za tímto účelem bylo naklonováno mnoho eukaryotických promotorů, které byly dále studovány.

Jako výhodné se ukázaly být genetické manipulace se semeny tabáku, kdy byl urychlen jejich růst a zvýšena jejich hmotnost po expresi genu *ipt*, který byl regulován specifickým promotorem pro semena (*vicilin*; Higgins et al., 1988). Podobné výsledky byly zaznamenány u rostlin tabáku po expresi *ipt* pod promotorem *lectin*, který je normálně obsažen v sóji (Ma et al., 2008).

V jiném výzkumu bylo pozorováno zvětšení rajčete po expresi genu *ipt* (přímo v plodech rajčat), který byl regulován promotorem *2A11* (Martineau et al., 1995). Dále se díky genetickým modifikacím ukázalo, že cytokininy mají vliv na plodnost pestíku. V této studii byly pozorovány změny v hladinách cytokininů v květech kukuřice způsobené expresí genů pro IPT pod promotorem SAG (senescence associated genes; Young et al., 2004).

Kromě vlivu cytokininů na jednotlivé orgány se využívá i jejich vlastností při biotickém a abiotickém stresu. V případě zaplavených rostlin dochází k odumírání buněk v kořenech a poklesu metabolismu, tudíž i ke snížení tvorby cytokininů. Po zvýšení tvorby cytokininů u transgenních rostlin, jejichž gen pro IPT byl regulován specifickým senescenčním promotorem, se ukázalo, že byla senescence způsobená zaplavením rostlin oddálena (Huynh et al., 2005). Naopak zvýšená rezistence k suchu se současným oddálením senescence byla pozorována po expresi genu *SAG12-ipt* v listech manioku (Zhang et al., 2010). Rostlinám vystaveným zavodnění nebo suchu tedy může pomoci zvýšená hladina cytokininů (Rivero et al., 2007).

Geneticky modifikované rostliny se budou studovat i nadále, jelikož by mohly zvyšovat výnos a kvalitu zemědělských plodin.

1.5.2. Chemické modulace hladin cytokininů

K ovlivnění hladiny cytokininů v rostlinách se mohou využívat i různé chemické sloučeniny. Mezi tyto látky patří například inhibitory enzymu CKX zabraňující

degradaci cytokininů. Řadíme sem deriváty 6-anilinopurinů, například látka 2-chlor-6-(3-metoxyfenyl)aminopurin (INCYDE) je specifickým inhibitorem AtCKX2 (Zatloukal et al., 2008), dále analoga cytokininů s nenasyceným postranním řetězcem, například N⁶-(buta-2,3-dienyl)adenin (HA-8; Kopečný et al., 2008) a také deriváty močoviny jako N-(2-chlor-pyridin-4-yl)-N'-fenylurea (CPPU; Kopečný et al., 2010).

V rostlinách tabáku a kukuřice bylo prokázáno, že v důsledku zavodnění dochází k poklesu cytokininů vlivem zvýšené aktivity CKX (Alvarez et al. 2008; Havlová et al. 2008). Proto se předpokládá, že zvýšená koncentrace cytokininů bude mít při stresu naopak ochranný účinek. Bylo ukázáno, že na počáteční růst rostlin *Rumex crispus* a *Bubline natalensis*, které byly vystaveny stresu těžkým kovem kadmiiem a zároveň byly ošetřeny látkou INCYDE, nemá kadmium negativní účinek (Gemrotová et al., 2013). Navíc INCYDE zlepšuje antioxidační vlastnosti rostlin (Grúz & Spíchal, 2011).

K další významné skupině látek, které ovlivňují koncentraci cytokininů, patří jejich antagonisté. Prvním objeveným antagonistou, působícím na receptorové úrovni, byl PI-55. Je známo, že po ošetření rostliny antagonistou cytokininů dochází k poklesu percepce cytokininů, což pomáhá rostlinám odolávat zvýšené koncentraci solí, suchu nebo osmotickému stresu (Tran et al., 2007). Dále má PI-55 pozitivní účinek při stresu kadmiiem, jelikož zajišťuje prodlužování kořenů, a tím zvyšuje přísun živin do rostliny (Gemrotová et al., 2013). PI-55 si však zachovává slabou cytokininovou aktivitu, což může mít také pozitivní účinek při reakci rostliny na stres. Bylo totiž prokázáno, že exogenně podávané cytokininy mají kladný vliv na rostliny vystavené stresu kadmiiem (Wozny et al., 1995; Ul'yanenko et al., 2004).

Oba typy těchto chemických modulátorů mohou hrát důležitou roli v ochraně rostliny proti stresu nebo by se mohly využívat pro odstraňování škodlivých látek z prostředí pomocí rostlin (fytoremediaci).

2. Biotický a abiotický stres u rostlin

Stresem je označován stav vyvolaný nepříznivými podmínkami prostředí (stresovými faktory, stresory). Rostliny na stresové faktory reagují spuštěním tzv. stresové reakce, což je obranný mechanismus skládající se z několika fází. V první fázi dochází k narušení buněčných struktur a rostlina rozpoznává působení stresového faktoru. V této poplachové fázi se informace o narušení vnitřního prostředí šíří celou rostlinou. Následně je ve fázi restituční zaktivován obranný kompenzační mechanismus rostliny, který zvyšuje její odolnost vůči danému stresoru. Postupně rostlina získává tzv. maximální odolnost

a nepříznivé podmínky přežívá, mluvíme o fázi rezistence. Jestliže však nepříznivé podmínky přetrvávají dlouho, může dojít ke smrti rostliny v důsledku jejího energetického vyčerpání. Výsledek i průběh stresové reakce může být dále ovlivněn typem stresoru, vývojovým stádiem, fyziologickým stavem nebo genetickou výbavou rostliny (Procházka et al., 1998).

Stresové faktory, které mohou působit na rostliny, dělíme na biotické a abiotické. Biotický stres je většinou způsoben patogeny, jako jsou například mikroorganismy, viry a houby nebo konkurenčními druhy rostlin (parazitismus). Abiotické stresory dále dělíme na fyzikální a chemické. Mezi fyzikální se řadí nadměrné nebo nízké záření, mechanické působení větru nebo extrémní teploty. K chemickým faktorům patří nedostatek nebo nadbytek vody, který může vést k nedostatku kyslíku. Dále nedostatek minerálních látek v půdě, nadbytek iontů solí, přítomnost toxických látek (těžké kovy) nebo nevhodné pH půdy. V přírodě na rostlinu většinou působí několik stresorů současně a dochází tak k prohloubení jejich účinku (Procházka et al., 1998). Stres u rostlin způsobuje v zemědělství velké škody, proto se vědci snaží přijít na způsoby, kterými by pomohli rostlinám se bránit.

3. Těžké kovy

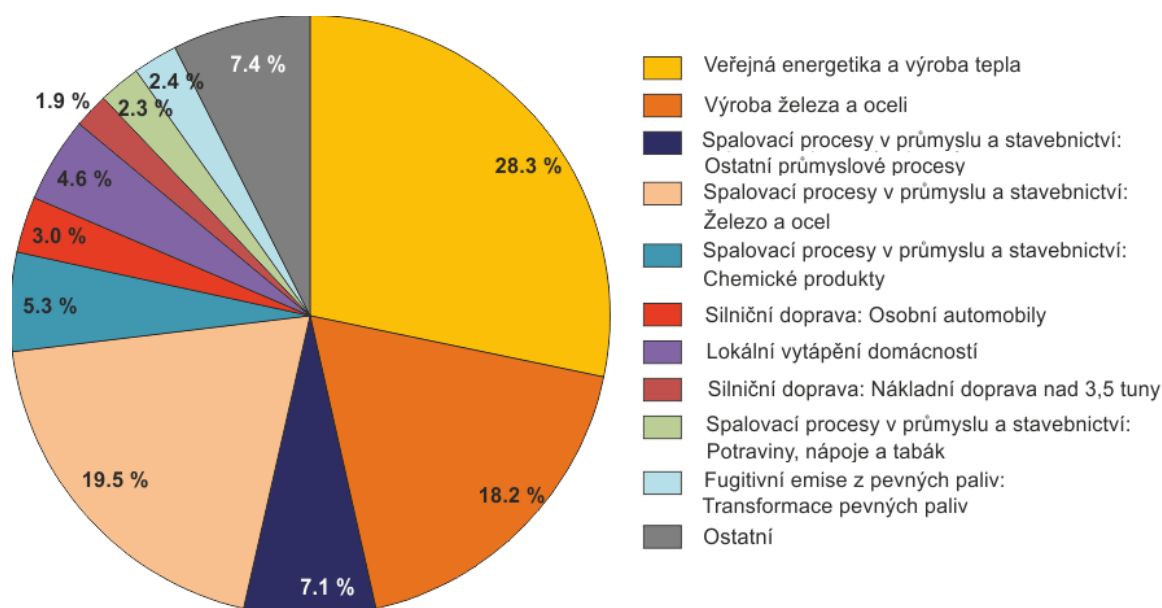
Za těžké kovy jsou považovány prvky s atomovou hmotností nad 20 a hustotou větší než 5 g/cm^3 . Mezi těžké kovy patří La, Ce, Pr, Zr, Hf, Th, V, Nb, Ta, Cr, Mo, W, U, Mn, Re, Fe, Co, Ni, Rh, Ru, Pd, Os, Ir, Pt, Cu, Ag, Au, Zn, Cd, Hg, Ga, In, Tl, Ge, Sn, Pb, As, Sb, Bi, Te, Tb (Adriano, 2001). Většina z nich jsou v podstatě kovy toxické, které i v nízkých koncentracích mohou mít neblahý vliv na rostliny a zvířata (Rascio & Navari-Izzo, 2011). Toxické kovy se v dnešní době vyskytují všude kolem nás, například vznikají při spalování uhlí, zemního plynu, ropy a jiných odpadních materiálů. Některé z těchto těžkých kovů jsou však v nízkých koncentracích důležité ve vývoji a růstu rostlin. K těmto esenciálním prvkům patří železo, zinek, měď, molybden a nikl. Jiné těžké kovy nejsou pro rostliny potřebné a mají škodlivý účinek. Tyto nepříznivě působící prvky, jako kadmium, olovo nebo rtuť, snadno proniknou do rostlin a skrze potravní řetězec se mohou dostat do jiných organismů včetně člověka (Anjum et al., 2013).

Kadmium je stříbřitě bílý, měkký, kujný kov s modravým nádechem. Jeho atomová hmotnost je 112,4 a hustota $8,65 \text{ g/cm}^3$, což odpovídá definici pro těžké kovy. Ve sloučeninách se vyskytuje nejčastěji v mocenství Cd^{2+} . Může vytvářet komplexní ionty (např. CdHCO_3^+), cheláty nebo stálé minerály (např. CdO), které se hromadí v biogenních

usazeninách. Patří mezi sedmý z nejnebezpečnějších toxinů, jelikož se vlivem průmyslových procesů snadno dostává do orné půdy (Yang et al., 2004).

3.1. Zdroje těžkých kovů

Obecně lze zdroje těžkých kovů rozdělit na přirozené a antropogenní (vznikající činností člověka). Těžké kovy se přirozeně uvolňují do prostředí zvětráváním zemské kůry, vulkanickou aktivitou i lesními požáry (Callender, 2003, Nriagu, 1990). Mezi antropogenní zdroje řadíme především hornictví, těžbu a zpracování rud (Callender, 2003). Dále zde patří spalování fosilních paliv, výroba cementu a skla, spalování odpadů, používání automobilů a komerčních hnojiv či pesticidů (Nriagu & Pacyna, 1988).



Obr. 7: Zastoupení jednotlivých zdrojů kadmia v roce 2012 (upraveno a převzato z Českého hydrometeorologického ústavu, 2014).

3.2. Příjem a transport těžkých kovů v rostlinách

Vyšší rostliny mohou těžké kovy přijímat svými kořeny z půdy, ale také listy a nadzemními částmi ze vzduchu (Lyubenova & Schröder, 2010). Množství přijatého těžkého kovu rostlinou závisí například na koncentraci iontů tohoto kovu v půdě, biologické dostupnosti, redoxním potenciálu, teplotě, pH půdy a přítomnosti dalších prvků (Benavides et al., 2005; Setia et al., 2008).

Kovy vstupují do rostlin apoplastickou (extracelulární) nebo symplastickou (intracelulární) cestou, kterou se dostávají až k endodermis. Aby mohly dále pokračovat do xylému, musí proniknout přes lipofilní Caspariho proužky. Příjem většiny těžkých kovů je umožněn mladými částmi kořenů, ve kterých ještě nejsou Caspariho proužky plně vyvinuty (Prasad, 2004). Z kořenů jsou tedy těžké kovy transportovány do xylému pomocí membránových přenašečů a dále do nadzemních částí rostlin (Salt et al., 1995). Do listů se dostávají pomocí transportérů, které jsou nejčastěji umístěny v epidermis a trichomech (Setia et al., 2008). Na úrovni buňky se nejvíce vyskytují v buněčné stěně nebo ve vakuolách (Cobbet & Goldsbrough, 2000; Burken, 2003).

3.2.1. Transportéry kovů v rostlinách

Rostlinné transportéry hrají zásadní roli v příjmu a transportu těžkých kovů kvůli jejich nedostatečné selektivitě (Procházka et al., 1998). Prvními takovými transportéry jsou P typy ATPáz, které k přenosu esenciálních i těžkých kovů využívají energii ve formě adenosin trifosfátu. Tato skupina transportérů je rozdělena na pět skupin a každá z nich podle substrátové specifity do dalších dvou a více podskupin (Colangelo & Gueriot, 2006). Podskupina transportérů, která se podílí na přenosu těžkých kovů, se označuje jako P_{1B}-ATPázy nebo také HMA (heavy metal ATPases; Baxter et al., 2003). U *A. thaliana* se HMA dělí podle toho, jestli přenáší monovalentní (Ag^+ , Cu^+) nebo bivalentní (Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}) ionty těžkých kovů. Do první zmíněné skupiny patří AtHMA5, 6, 7 a 8, do druhé se řadí AtHMA1, 2, 3 a 4. AtHMA2 je přirozeným transportérem zinku, ale může být využíván kadmíem, olovem, kobaltem, mědí nebo niklem (Eren & Argüello, 2004). Pro zinek, kadmium a olovo je také důležitý AtHMA4 (Verret et al., 2004). Předpokládá se, že HMA2/HMA4 umožňují přenos těžkých kovů z buněk a mohly by se účastnit i na jejich transportu v rámci xylému (Hussain et al., 2004; Verret et al., 2004). Na přenosu mědi do chloroplastů se uplatňuje AtHMA1, 6 a 8, přičemž AtHMA1 a 6 jsou umístěny v plastidech a AtHMA8 v tylakoidní membráně (Shikanai et al., 2003; Abdel-Ghany et al., 2005; Seigneurin-Berny et al., 2005). AtHMA7 umožňuje mědi vstoupit do Golgiho aparátu (Hirayama et al., 1999; Woeste & Kieber, 2000).

Dalším typem transportérů jsou NRAMP (natural resistance associated macrophage proteins), které jsou zodpovědné za transport bivalentních iontů včetně železa (Bereczky et al., 2003). V *A. thaliana* existuje 6 typů těchto proteinů (AtNRAMP1-6; Maser et al., 2001). AtNRAMP1 se uplatňuje při transportu manganu a železa a nachází se v plazmatické membráně (Cailliatte et al., 2010). AtNRAMP3 a AtNRAMP4 se ve vakuolární membráně účastní uvolňování zásobního železa z vakuol (Lanquar et al.,

2005). AtNRAMP3 navíc ovlivňuje expresi genu pro AtIRT1 (iron regulated transporter 1) a AtFRO2 (ferric reductase oxidase 2; Thomine et al., 2003). Transgenní rostliny s narušeným genem pro AtNRAMP6 vykazovaly zvýšenou toleranci ke kadmii, naopak jeho nadměrná exprese vedla k přecitlivělosti vůči tomuto kovu (Cailliatte et al., 2009). Podobný výsledek byl sledován i v případě AtNRAMP3 (Thomine et al., 2000), což znamená, že tyto transportéry hrají významnou roli při distribuci kadmia v rámci buňky.

Výše zmíněný transportér AtIRT1 se podílí na přenosu železa přes plazmatickou membránu do buněk v kořenech a v případě nedostatku železa v rostlinách dochází k jeho zvýšené expresi (Eide et al., 1996). Železo vstupuje do buněk ve formě Fe^{2+} , proto musí být redukováno z Fe^{3+} pomocí reduktázy železitých iontů (AtFRO2; Robinson et al., 1999). Jestliže je rostlina vystavena stresu těžkými kovy, jako jsou Cd, Zn, Ni, Co a Mn, může docházet k jejich neúmyslnému transportu prostřednictvím AtIRT1 (Baxter et al. 2008). V případě nadměrné exprese genu *irt1* nebo při nedostatku železa u rostlin vystavených kadmii tak dochází k jeho zvýšené akumulaci v kořenech. AtIRT1 patří mezi ZIP (zinc-regulated transporter/iron-regulated transporter-related protein) proteiny, což jsou membránové transportéry pro přenos kationtů Cd, Zn, Fe a Mn do cytoplasmy. V *A. thaliana* je známo 16 typů těchto proteinů (Maser et al., 2001). Dále byly identifikovány například v rýži (Buglio et al., 2002) nebo hrášku (Lopez-Millan et al., 2004), ale i v bakteriích, houbách či zvířatech (Grotz et al., 1998; Guerinot, 2000).

Existuje skupina přenašečů, tzv. ABC transportéry (ATP-binding cassette), které se podílejí na detoxifikaci rostlin. Tyto transportéry se nachází v tonoplastech a přenosem těžkých kovů do vakuol pomáhají zvyšovat toleranci rostlin vůči těmto kovům. Transportéry AtABCC1 a AtABCC2 se uplatňují při odstraňování kadmia, arsenu a rtuti, které jsou navázány na fytochelatinu (Song et al., 2010; Park et al., 2012). Fytochelatinu hrají důležitou roli při distribuci, akumulaci a detoxifikaci kadmia, ale i jiných toxických kovů, jako je rtuť, stříbro nebo arsen (Rauser, 1999; Cobbett, 2000). Bylo prokázáno, že AtABCC1 a 2 snižují množství těžkých kovů v cytosolu v kořenech, a díky tomu je sníženo množství těžkých kovů putujících do nadzemních částí rostlin (Park et al., 2012). Dále se na odstraňování kadmia podílejí AtABCC3, 6, 11 a 12 (Tommasini et al., 1998; Gaillard et al., 2008).

Do vakuol se může kadmium dostat i pomocí jiných transportérů umístěných v tonoplastech, a to CAX (cation/proton exchanger transporters). Poprvé byla aktivita těchto přenašečů pozorována v kořenech ovsa, kdy docházelo k akumulaci Cd^{2+} ve vakuolách výměnou za H^+ (Salt & Wagner, 1993). V dnešní době je známo šest genů pro AtCAX, které jsou selektivní pro různé bivalentní kationty, z nichž AtCAX2 a AtCAX4 slouží výhradně k transportu kadmia nebo zinku (Korenkov et al., 2007).

Další významnou skupinou transportérů jsou CDF (cation diffusion facilitators), které umožňují přenos těžkých kovů z cytoplazmy do vakuol proti koncentračnímu gradientu výměnou za kationty vodíku a draslíku (Gaither & Eide, 2001). Často také bývají označovány jako MTP (metal tolerance proteins). V *A. thaliana* se nachází 12 genů pro MTP a jako první z nich byl identifikován vakuolární AtMTP1 (Delhaize et al., 2003). MTP proteiny jsou vysoce specifické pro zinek (Krämer, 2005). Nadměrná exprese genu pro AtMTP1 vedla k toleranci rostlin na vysoké koncentrace zinku, přičemž byla pozorována akumulace zinku v kořenech (van der Zaal et al., 1999; Kobae et al., 2004). Příklady některých rostlinných transportérů jsou uvedeny na Obr. 9.

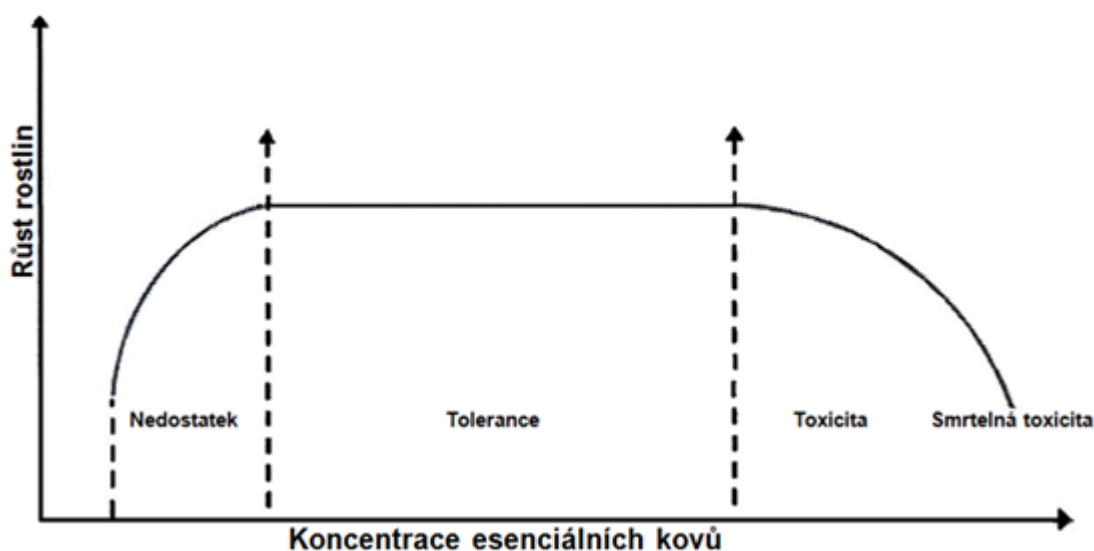
3.3. Vliv těžkých kovů na rostliny

Esenciální těžké kovy jsou pro rostliny nezbytné a jejich nedostatek se projevuje sníženým vzrůstem. Jejich zvyšující se koncentrace má pozitivní vliv na růst rostlin pouze do určitého bodu. Po překročení této hranice přestanou mít esenciální prvky kladný účinek, a pokud jejich koncentrace stále narůstá, mohou mít nežádoucí vliv na rostliny stejně jako neesenciální těžké kovy. Nakonec může dojít až k úhynu rostlin (viz Obr. 8; Wright & Welbourn, 2002).

Účinek těžkých kovů na rostliny se liší v závislosti na mnoha faktorech, například na koncentraci a typu těžkého kovu, stáří rostlin nebo době, po kterou jsou rostliny danému prvku vystaveny. Nejvýraznější reakcí rostlin je vždy snížená rychlost jejich růstu (Sharma & Dubey, 2007).

Toxický efekt těžkých kovů se na rostlinách projevuje postupně (Fodor, 2002). Nejprve kovové ionty interagují s jinými iontovými složkami v místě vstupu do rostliny (kořenový systém). Mohou se například vázat přes sulfhydrylové či fosfátové skupiny na proteiny nebo enzymy, což vede k narušení jejich funkce a ke změnám metabolismu v rostlinách (Sharma & Dubey, 2007; Sharma & Dietz, 2008). V cytoplasmě potom mohou interagovat s dalšími proteiny, metabolity, makromolekulami a tvořit volné kyslíkové radikály (ROS). Následně je ovlivněn příjem a transport vody i živin v rostlině a postupně se u rostlin začnou vyskytovat zřetelné symptomy (Fodor, 2002). Objevuje se chloróza, inhibice růstu kořenů, nekróza, potlačení fotosyntézy a respirace (Heckathorn et al., 2004; Lösch, 2004; Sharma & Dubey, 2007). Těžké kovy ovlivňují nejen růst kořenů, ale postupně i růst celé rostliny a jejích částí (Shanker et al., 2005). To může být vyvoláno negativním působením těžkých kovů na buněčné dělení a elongaci (Patra & Sharma, 2000; Zhou et al., 2009). Je známo, že kadmium interferuje s příjmem a transportem

jiných prvků. Těžké kovy tak obecně mohou ovlivňovat příjem a obsah živin, které jsou pro růst rostlin nezbytné (Das et al., 1997).



Obr. 8: Vztah mezi koncentrací esenciálních kovů a růstem rostlin (upraveno a převzato z Baker & Brooks, 1989).

3.3.1. Vliv kadmia na rostliny

Kadmium patří mezi nejvíce studované kontaminanty (Kah et al., 2012). Je schopno vytěšňovat kovy, které jsou přirozenou součástí metaloenzymů, a nahrazovat je. Vzhledem k chemické podobnosti kadmia se zinkem dochází nejčastěji k vytěsnění tohoto prvku z enzymu, což vede k jeho deaktivaci (Prasad, 2004). Kadmium inhibuje například amylázu nebo adenosin trifosfatázu obsahující zinek. Dále vytěšňuje měď v nitritreduktáze a molybden v nitrátreduktáze, což jsou významné enzymy v procesu asimilace dusíku (Gouia et al., 2000).

Toxicita kadmia pro rostliny se pohybuje v jeho obsahu nad 5-10 μg na g suché hmoty (White & Brown, 2010). Výjimku tvoří rostliny, které jsou schopny Cd hromadit až do 100 μg Cd na g sušiny (Verbruggen et al., 2009). Vysoké koncentrace kadmia v rostlinách způsobují pokles příjmu vody a minerálů kořeny, redukci fotosyntézy, fotosyntetických pigmentů (chlorofylu, karotenoidů) a počtu listů, na rostlinách je patrná chloróza, hnědnutí kořenových špiček, zvýšené množství trichomů a červenohnědé zbarvení listů. Dále potlačuje klíčení semen, otevírání průduchů, růst kořenů i nadzemních částí rostlin a je stimulována produkce etylenu (Fuhrer, 1982; Barceló et al., 1988; Larsson et al., 1998; Chen et al., 2011; Wójcik & Tukiendorf, 2004; Mohanpuria et al.,

2007). Bylo prokázáno, že kadmium způsobuje peroxidaci membránových lipidů (Hendry et al., 1992; Somashekaraiah et al., 1992). Nepůsobí však přímo na produkci reaktivních kyslíkových radikálů, ale inibuje aktivitu některých antioxidačních enzymů (Salin, 1988). Například v listech *Helianthus annuus* byla naměřena snížená aktivita superoxid dismutázy, katalázy, askorbát peroxidázy a glutation reduktázy, zatímco aktivita lipoxygenázy byla zvýšena (Gallego et al., 1996).

Nebezpečí kadmia nejen pro rostliny spočívá v jeho snadném příjmu kořeny a následném transportu do nadzemních částí, čímž se stává součástí potravního řetězce.

3.3.2. Oxidativní stres

Těžké kovy významně přispívají ke vzniku ROS, jako jsou singletový kyslík (O_2^{\cdot}), anion superoxidu (O_2^{2-}), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylové radikály (OH^{\cdot}). Při oxidativním stresu dochází k peroxidaci lipidů v membráně, oxidaci proteinů, inhibici enzymů a k poškození nukleových kyselin (Gill & Tuteja, 2010; Gill et al., 2011; Hasanuzzaman et al., 2012). Peroxidací membránových lipidů následně dochází k narušení integrity a funkce membrán (Vanhoudt et al., 2008).

Buňky se však mohou proti poškození reaktivními formami kyslíku bránit pomocí enzymů nebo neenzymatických antioxidantů. Velice významným enzymem je superoxid dismutáza (SOD), která katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. Takto vzniklý peroxid vodíku je následně rozložen na vodu a kyslík pomocí katalázy (CAT) nacházející se v peroxizomech nebo pomocí enzymu, který se vyskytuje v chloroplastech, askorbát peroxidázou (APX). Mezi další enzymy s antioxidačním účinkem patří guajakol peroxidáza (GPX) a glutation reduktáza (GR). Existují i antioxidanty neenzymatické, jako jsou například α -tokoferol, glutation, kyselina askorbová a flavonoidy (Gratao et al., 2005; Singh et al., 2007). Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin a kromě svých antioxidačních schopností přispívají ke zbarvení listů, květů a plodů, regulují proliferaci buněk a mají insekticidní a antimykotickou aktivitu (Tahara, 2007).

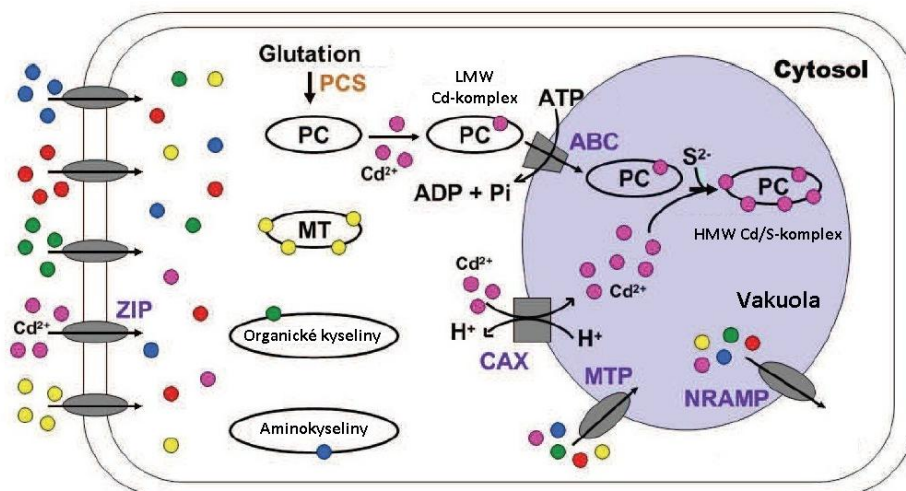
3.4. Detoxifikace těžkých kovů v rostlinách

Rostliny k adaptaci na stres těžkými kovy využívají několik mechanismů. Mezi tyto mechanismy patří například mykorhiza, při které dochází k příjmu těžkých kovů povrchem hyf. Dále zde řadíme vazbu kovů na pektiny nebo karboxylové skupiny v buněčných

stěnách, chelataci kovů v cytosolu pomocí peptidů, tvorbu etylenu, ukládání kovů ve vakuolách pomocí transporterů umístěných v tonoplastech (viz kapitola 3.2.1.), odstraňování ROS (viz kapitola 3.3.2.) a expresi stresových proteinů, jako jsou proteiny indukované horkem, chladem, patogeny, sníženou koncentrací kyslíku nebo dehydratací (Procházka et al., 1998; Hall, 2002).

Známými chelátory kovů v rostlinách jsou fytochelatiny (PC), metallothioneiny, organické kyseliny a aminokyseliny (Clemens, 2001). Fytochelatiny obsahují velké množství cysteinů, nachází se v cytoplazmě a umožňují přenos těžkých kovů do vakuol. Jsou syntetizovány přeměnou glutationu pomocí fytochelatin syntázy (PCS), jejíž aktivita závisí na přítomnosti iontů těžkých kovů Ag^+ , Bi^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} a Zn^{2+} (Grill et al., 1989). Interakcí fytochelatinu s kadmíem vzniká komplex Cd-PC, který je označován jako LMW (Low Molecular Weight) a umožňuje transport kadmia z cytosolu do vakuol s využitím ABC transporterů. Do tohoto komplexu je poté inkorporováno další kadmium, které se dostává do vakuol například pomocí CAX transporterů. Tímto vzniká HMW (High Molecular Weight) komplex, který slouží jako hlavní komponenta pro skladování kadmia ve vakuolách (viz Obr. 9; Rauser, 1999). Metallothioneiny jsou také bohaté na cystein a právě díky $-\text{SH}$ skupinám jsou schopny na sebe vázat ionty kovů. Podílí se tak na regulaci množství těžkých kovů v rostlinách (Rauser, 1999).

Působení kadmia zvyšuje aktivitu enzymu 1-aminocyklopropan-1-karboxylát syntázy (ACS), což vede ke zvýšené tvorbě etylenu (Fuhrer, 1982). Předpokládá se, že tvorbou etylenu se rostliny brání oxidativnímu stresu, jelikož pod jeho vlivem dochází ke zvyšování aktivity askorbát peroxidázy, která se významně podílí na odbourávání peroxidu vodíku (Mehlhorn, 1990). Dále bylo prokázáno, že etylen reguluje expresi genů pro metallothioneiny (Whitelaw et al., 1997) a ovlivňuje metabolismus glutationu ke zvýšené syntéze fytochelatinů (Sanita di Toppi et al., 1998).



Obr. 9: Sekvestrace kadmia v rostlinné buňce (upraveno a převzato z Yang & Chu, 2011).

3.5. Fytoremediace

Fytoremediace se obecně používá k odstraňování nebezpečných látek, jako jsou těžké kovy, pesticidy, barviva, radionuklidy, léčiva a další, z prostředí pomocí rostlin. Oproti klasickým způsobům odstraňování kontaminantů pomocí těžké techniky je fytoremediace šetrná a levná metoda. Účinnost této metody je však ovlivněna mnoha faktory, mezi které patří pH a struktura půdy, koncentrace solí a kontaminantů, rychlost růstu rostlin a jejich velikost (Kučerová et al., 1999).

Existuje několik typů fytoremediace, a to fytodegradace, rhizofiltrace, fytostimulace, fytovolatilizace, fytostabilizace a fytoakumulace (fytoextrakce; viz Obr. 10). V procesu fytodegradace jsou přijímané toxické organické látky odbourávány na méně škodlivé molekuly pomocí enzymů (nejčastěji dehalogenáz, oxygenáz a reduktáz) přítomných v rostlinách (Saxena & Mishra, 2010).

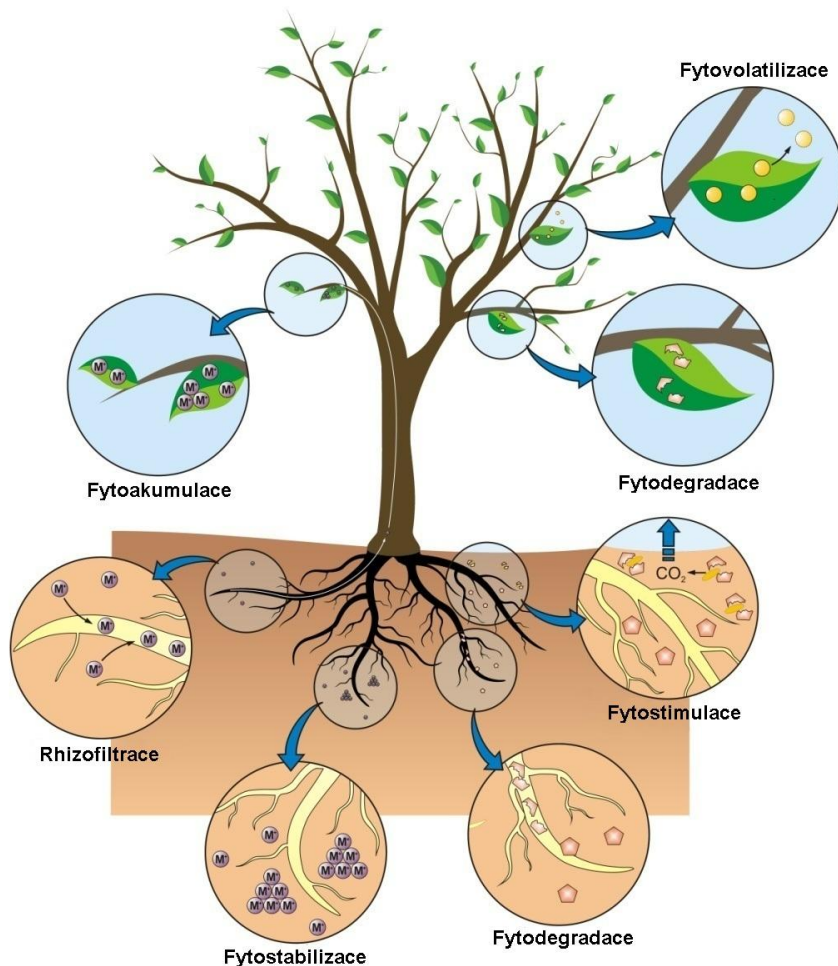
Rhizofiltrace slouží k odstraňování nebezpečných látek z vlhké půdy nebo podzemní vody pomocí kořenů rostlin. Ideálně se používají rostliny tvořící rozsáhlý kořenový systém se schopností zadržovat toxické látky v kořenech, jako jsou například *Brassica juncea* nebo *Helianthus annuus* (Dushenkov et al., 1995). Tato metoda se využívá zejména pro odstraňování radionuklidů (U, Pu, Sr, Cs, I; Dushenkov et al., 1997; Tome et al. 2008) a těžkých kovů (Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn; Dushenkov et al. 1995).

Fytostimulací rozumíme odstraňování organických látek (paliva, rozpouštědla) z půdy pomocí mikroorganismů (bakterií, hub nebo kvasinek), které žijí v symbióze s rostlinami (Ghosh & Singh, 2005).

Při fytovolatilizaci dochází k příjmu toxických látek (As, Hg a Se) rostlinami z půdy a následně k jejich přeměně na těkavou formu, která je vyloučena prúduchy rostlin do atmosféry (Suszcynsky & Shann, 1995). Tato metoda tedy neslouží k odstranění nebezpečných látek z životního prostředí, ale pouze z půdy a podzemních vod (Kvesitadze et al., 2006).

Účelem fytostabilizace je imobilizace těžkých kovů, která zabraňuje jejich migraci v podzemních vodách a vzduchu (Prasad & Freitas, 2003). Stabilizace probíhá pomocí sorpce, precipitace nebo redukce kovů na rostlinných kořenech.

Významnou metodou pro zbavování životního prostředí kontaminantů je fytoakumulace, kdy rostliny ve svých nadzemních částech tyto škodlivé látky zadržují (viz kapitola 3.5.1.).



Obr. 10: Metody fytořediacie (upraveno a převzato z Favas et al., 2014).

3.5.1. Fytoakumulace

Některé rostliny jsou schopny růst v půdách obsahujících vysoká a toxická množství těžkých kovů. Mezi takovéto rostliny patří například *Arabidopsis halleri* a *Nicotiana tabacum*, které tolerují přítomnost vysokých koncentrací kadmia, a jsou dokonce schopny je v sobě hromadit (Talke et al. 2006; Gorinova et al., 2007). Nazývají se hyperakumulátory a sekvestrují těžké kovy do vakuol v nadzemních částech rostlin, kde je koncentrace těchto kovů vyšší než v půdě. Vývoj a růst rostlin však není negativně ovlivněn (Krämer, 2010). Existují i rostliny, které v sobě hromadí kovy ve stejné koncentraci, jako je jejich množství v půdě, a označují se jako indikátory. Patří sem například pšenice, kukuřice nebo oves (Tlustoš et al., 2006).

V dnešní době je známo přes 450 druhů hyperakumulátorů, přičemž nejvíce z nich patří do čeledi *Brassicaceae*. Významným hyperakumulátorem je *Thlaspi caerulescens*, který dokáže hromadit více prvků, a to kadmium, zinek a nikl (Prasad et al., 2003). Díky

své příbuznosti s *Arabidopsis thaliana* je považován za modelovou rostlinu pro studium hyperakumulace (Assunção et al., 2003).

Rostliny používané k fytoakumulaci by měly být schopny přijímat, hromadit a tolerovat vysoké koncentrace těžkých kovů a měly by rychle růst do velkých rozměrů kvůli zadržení co největšího množství kovů (Blaylock et al., 1997; Blaylock & Huang, 2000). Tyto vlastnosti mohou být vylepšovány mnoha způsoby. Například se využívají rhizobakterie, které produkují chelátory tzv. siderofory. Siderofory mohou interagovat s těžkými kovy, čímž snižují jejich toxicitu a zvyšují jejich biologickou dostupnost (van der Lelie, 1998).

Akumulace v rostlinách může být také zvýšena pomocí genetických manipulací. Jelikož je do příjmu, transportu a akumulace zapojena spousta genů, jejich identifikace, izolace, transfer nebo nadměrná exprese může vést k vylepšení fytoextrakce (Eapen & D'Souza, 2005). Zadržování, především kadmia a mědi, může být zvýšeno na dvojnásobek až trojnásobek navozením nadměrné produkce molekul chelatujících kovy, jako jsou fytochelatiny a metallothioneiny (Clemens et al., 2002; Nedkovska & Atanassov, 1998; Pilon-Smits & Pilon, 2002; Gorinova et al., 2007). Dále je možné modifikovat transportéry kovů, a tím zvyšovat toleranci a akumulaci daného kovu v rostlinách (Arazi et al., 1999; Hirschi et al., 2000). Pro účinnější zadržování toxických kovů v rostlinách mohou být také prospěšné genetické zásahy do mechanismů oxidativního stresu nebo metabolismu rostlin (Eapen & D'Souza, 2005).

Dále může být fytoextrakce podporována pomocí chemických sloučenin a rostlinných hormonů. Bylo prokázáno, že je příjem kovů u rostlin ošetřených kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA) zvýšen, protože zlepšuje rozpustnost a pohyblivost kovů (Jabeen et al., 2009). Ve spojení s přirozeně se vyskytujícími cytokininy může být dosaženo ještě lepší úspěšnosti fytoakumulace. Cytokininy totiž podporují růst nadzemních částí, čímž se zvětšuje kapacita rostlin (Tassi et al., 2008). V tomto smyslu by bylo vhodné také používat inhibitory CKX, které by zvýšily množství aktivních cytokininů v rostlinách. Dále by mohla posloužit fytoemediaci látka PI-55, která svým antagonistickým působením vůči cytokininům vyvolává růst postranních kořenů (Spíchal et al., 2009). Rozsáhlejší kořenový systém umožňuje příjem většího množství těžkých kovů, ale i živin, které rostliny potřebují k vyrovnání se se stresem.

Praktická část

4. Materiál a přístroje

4.1. Chemikálie

Agar (Duchefa), akrylamid (Sigma), β -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich), bromfenolová modř (Fluka), dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner), dimetylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich), DNA/RNA free H₂O (Sigma), dodecylsulfát sodný (SDS; Lach-Ner), dusičnan amonný (LaChema), dusičnan draselný (Lach-Ner), ECL reagent (Thermo Scientific), etanol (Lach-Ner), fytigel (Sigma), glycerol (Sigma-Aldrich), glycin (Lach-Ner), heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner), heptahydrát síranu zinečnatého (LaChema), hydrogenuhličitan sodný (Sigma-Aldrich), hydroxid draselný (Sigma-Aldrich), hydroxid sodný (Sigma-Aldrich), chlorid draselný (Lach-Ner), chlorid hlinitý (Lach-Ner), chlorid kademnatý (Sigma), chlorid sodný (Lach-Ner), chlorid vápenatý (Lach-Ner), inhibitor rostlinných proteáz (Sigma-Aldrich), kyselina 2-(N-morfolino)etan sulfonová (MES; Sigma), kyselina bicinchoninová (BCA; Sigma), kyselina boritá (LaChema), kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA; Sigma), kyselina chlorovodíková (Lach-Ner), kyselina octová (Lach-Ner), markr SpectraTM multicolor broad range protein ladder (Thermo Scientific), metanol (Lach-Ner), molybdenan sodný (LaChema), monohydrát uhličitanu sodného (LaChema), Murashige & Skoog (MS) médium (Duchefa), N⁶-benzyladenin (Sigma), pentahydrát síranu měďnatého (LaChema), peroxidisíran amonný (APS; Sigma), Ponceau S (Sigma-Aldrich), primery (AtABCC1, AtACS8, AHK2, AHK3, CRE1/AHK4, ARR5, ARR15, AtCAT1, AtCAT2, AtCKX1, AtCKX2, AtCKX3, AtCKX4, AtCKX7, AtClath, AtFRO2, AtIPT1, AtIPT2, AtIPT7, AtIPT9, AtIRT1, AtNRAMP1, AtNRAMP3, AtZIP4; Sigma), protilátky (králíčí polyklonální protilátka anti-IRT1, kozí polyklonální protilátka anti-rabbit IgG konjugovaná s HRP; Agrisera), ProtoScript II. First Strand cDNA Synthesis Kit (BioLabs), quercetin dihydrát (Sigma), referenční standardy pro kalibraci pH metru (Sigma), sacharóza (Sigma-Aldrich), SpectrumTM Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich), sušené mléko, SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), tartrát sodný (Sigma-Aldrich), tetrahydrát dusičnanu vápenatého (LaChema), tetrahydrát chloridu manganatého (LaChema), tetrametylendiamin (TEMED; Bio-Rad), TRI reagent (Sigma-Aldrich), tris(hydroxymetyl)aminometan (AppliChem), Triton (Sigma), Tween 20 (Sigma-Aldrich).

Látka 6-(2-hydroxy-3-metylbenzylamino)purin (PI-55) byla připravena v Laboratoři růstových regulátorů PŘF UP, Olomouc, ČR.

4.2. Přístrojové vybavení

96-ti jamková deska Micro Amp (Applied Biosystems), analytické váhy XA 110 (RADWAG), automatická pipeta (Biohit), CCD kamera LAS-4000 (Fujifilm), centrifuga 1730 MR (ScanSpeed), centrifuga PCR plate spinner (VWR), digestoř MERCI M 1200 (MERC I), elektroforéza (Bio-Rad), fytotron H125A (WEISS Gallenkamp), hydroponický tank (Araponics), inkubátor (Major Science), kapilární kolona (HP-AL/S, 15 μm , 50 m, id = 0,535; Agilent Technologies), laboratorní váhy BPS 41 (BOECO), laminární flowbox biohazard (FASTER), masterclear real-time PCR film (Eppendorf), nádoby z polypropylenu, nitrocelulósová membrána (Bio-Rad), pH meter HANNA 211 (HANNA instruments), plynový chromatograf 6890N Network GC Systém (Agilent Technologies), sítěky z polyetyleny, skleněné kuličky, spektrofotometr Synergy H4 Hybrid Reader (Bio Tek), StepOnePlus™ RT-PCR Systém (Applied Biosystems), termocyklér TC-512 (TECHNE), termomixér comfort (Eppendorf), třepačka OS-10 (BIOSAN), vortex (Heidolph), Western blot (Major Science), XYZ PlantScreen System (Photon System Instruments).

4.3. Biologický materiál

Semena *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Col-0).

4.4. Roztoky

4.4.1. Média pro pěstování *A. thaliana*

Germinační médium

0,75mM CaCl_2 , 1mM KCl, 0,25mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2mM KH_2PO_4 , 50 μM NaFe(III)EDTA, 50 μM H_3BO_3 , 5 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM Na_2MoO_4 .

Bazální živné médium

2mM NH_4NO_3 , 3mM KNO_3 , 0,1mM CaCl_2 , 2mM KCl, 2mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6mM KH_2PO_4 , 1,5mM NaCl, 50 μM NaFe(III)EDTA, 50 μM H_3BO_3 , 5 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM Na_2MoO_4 .

½ MS médium

Na 1 l média bylo potřeba 2,15 g Murashige & Skoog média, 0,5 g MES, 1 g sacharózy, pH bylo upraveno na 5,6-5,8 pomocí 4M KOH. Fytigel (6 gramů na litr) se za stálého míchání postupně přidával do média těsně před sterilizací.

4.4.2. Roztoky pro izolaci a stanovení proteinů

Extrakční pufr

0,5mM β-merkaptoetanol, 8mM EDTA, 5% glycerol, 3% SDS, 60mM Tris/HCl (pH 8,6). Před extrakcí bylo přidáno do 4 ml extrakčního pufru 100 μl inhibitoru proteáz.

Stanovení proteinů pomocí BCA

Reagent A: 1% BCA-Na₂, 2% Na₂CO₃ . H₂O, 0,16% Na₂ tartrát, 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO₃

Reagent B: 4% CuSO₄ . 5H₂O

Těsně před použitím byly tyto reagenty smíchány v poměru 100:2.

4.4.3. Elektroforetické roztoky

Dělicí gel (15%):

Na 15 ml gelu bylo potřeba 6,25 ml akrylamidu, 5,6 ml 1M Tris (pH 8,8), 150 μl 10% SDS, 3,03 ml dH₂O, 50 μl 10% APS, 10 μl TEMEDu.

Zaostřovací gel (5%):

Na 10 ml gelu bylo potřeba 1,67 ml akrylamidu, 2,5 ml 0,5M Tris (pH 6,8), 100 μl 10% SDS, 5,73 ml dH₂O, 50 μl 10% APS, 10 μl TEMEDu.

10x koncentrovaný pracovní pufr:

Na 1 l pufru bylo potřeba 30 g Tris, 145 g glycinu a 10 g SDS.

Vzorkovací pufr:

62,5mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-merkaptoetanol, 0,01% bromfenolová modř.

4.4.4. Roztoky pro Western blot

10x koncentrovaný blotovací pufr:

Na 1 l pufru bylo potřeba 30 g Tris a 145 g glycinu.

0,1% Ponceau v 5% kyselině octové:

Na 1 l barvicího roztoku bylo potřeba 1 g Ponceau S a 50 ml kyseliny octové.

10x koncentrovaný TBS pufr:

Na 1 l pufru bylo potřeba 87,66 g NaCl, 60,55 g Tris a pH roztoku bylo upraveno na 8 pomocí HCl.

TBS s Tweenem:

Tween 20 byl naředěn do TBS tak, aby jeho koncentrace byla 0,1%.

Blokační pufr:

Do roztoku TBS s Tweenem bylo přidáno sušené mléko tak, aby jeho koncentrace byla 5% nebo 2,5%.

5. Metody

5.1. Pěstování *A. thaliana* s využitím hydroponických tanků

Semena *A. thaliana* byla 10 minut sterilizována 70% etanolem s 0,01% tritonem za intenzivního třepání na vortexu. Následně byla semena ve flowboxu promyta sterilní dH₂O a po dvou až třech rozeseta do stripů naplněných 0,8% agarem, které byly umístěny ve sterilních krabičkách. Tyto krabičky byly uchovány 48 hodin při 4°C ve tmě. Poté byla každá krabička naplněna germinačním médiem s příslušnými látkami (DMSO, DMSO + Cd, PI-55, PI-55 + Cd, BA nebo BA + Cd; výsledná koncentrace kadmia byla vždy 10 μM a látek 10 nM). Krabičky s *A. thaliana* byly umístěny do fytotronu, kde byl nastavený světelný cyklus (16 h světla/8 h tmy), teplota 22°C, 65% vlhkost vzduchu a intenzita záření 150 μmol.m⁻².s⁻¹ (ve všech níže popsaných experimentech byly podmínky ve fytotronu stejné). Po třech dnech bylo germinační médium nahrazeno ½ germinačním médiem + ½ bazálním živným médiem a po dalších dvou dnech bylo toto médium vystřídáno bazálním živným médiem. Čtrnáctý den byly rostliny přeneseny do

hydroponických tanků po 18-ti, ve kterých bylo médium kontinuálně provzdušňováno a vyměňováno každý týden (Conn et al., 2013). *A. thaliana* byly po 4-5 týdnech sesbírány a jednotlivé kořeny, listy a nadzemní části byly zamraženy tekutým dusíkem a uchovány při -80°C v mrazicím boxu.

Pro sledování vlivu 10μM Cd během prvních tří dnů po jeho aplikaci byly rostliny pěstovány obdobným způsobem. Kadmium však bylo přidáno až do bazálního živného roztoku, a to 21. den po jejich nasazení. Následně byly po 24 hodinách sesbírány rostliny z prvního tanku, zamraženy a uchovány při -80°C. Stejný postup byl aplikován po 48 hodinách s rostlinami v druhém tanku a po 72 hodinách byly sklizeny rostliny z posledních dvou tanků, přičemž jeden neobsahoval roztok s kadmíem (kontrola).

5.2. Pěstování *A. thaliana* s využitím nádobek z polypropylenu

Nádobky z polypropylenu (PE) obsahující síťky z polyetyleny byly připraveny a vysterilizovány podle Alatorre-Cobos et al., 2014. Nádobky byly ve flowboxu naplněny sterilním ¼ MS médiem s příslušnými látkami (DMSO, 1nM PI-55, 10nM PI-55, 100nM PI-55 nebo 10nM BA). Semena *A. thaliana* byla sterilizována výše popsaným způsobem a na síťku bylo vždy nanášeno cca 50 semen. Následně byly nádobky umístěny do tmy a chladu (4°C). Po 48 hodinách byly přeneseny do fytostronu a dvanáctý den po vysetí byly rostliny sklizeny. Kořeny a nadzemní části byly zmraženy tekutým dusíkem a uchovány v -80°C pro následující extrakci RNA.

5.3. Pěstování *A. thaliana* ve 24-jamkových deskách

Semena *A. thaliana* byla sterilizována výše popsaným způsobem a ve flowboxu byla rozeseta na filtrační papír, který byl položený na ½ MS médiu s 0,6% fytagelem v plastových čtvercových deskách. Po 48 hodinách v chladu (4°C) a ve tmě byly misky na 4 dny přeneseny do fytostronu, kde byly umístěny do vertikální polohy. Do každé jamky 24-jamkových desek bylo ve flowboxu napipetováno 1,5 ml sterilního ½ MS média s 0,6% fytagelem a příslušnými látkami (DMSO, 1nM PI-55, 10 nM PI-55, 100nM PI-55, 10nM BA nebo stejné varianty s 10μM Cd). Po ztuhnutí média byl do každé jamky 24-jamkové desky sterilně přenesen semenáček z vertikálních misek. Desky byly přelepeny průhlednou fólií, ve které byly následně vytvořeny malé otvory pomocí sterilních jehel. Rostliny byly dále pěstovány v XYZ PlantScreen Systému, kde byl nastavený světelný

cyklus (16 světla/8 h tmy), teplota 22°C, vlhkost vzduchu 60 %, intenzita záření 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a každý den byla automaticky měřena plocha listů. Data z měření byla zpracována v programech Microsoft Excel, Microcal Origin a PAST.

5.4. Extrakce RNA a její reverzní transkripce

Zmražené vzorky kořenů, listů a nadzemních částí hydroponicky pěstovaných rostlin *A. thaliana* byly rozmělněny na prach v třecí misce pomocí tekutého dusíku. Zmrzlý rostlinný materiál byl přenesen do mikrozkušavek tak, aby v každé bylo cca 100 g, a následně byla provedena extrakce RNA z rostlinného materiálu pomocí TRI reagentu nebo kitu Spectrum™ Plant Total RNA Kit. Na spektrofotometru pomocí programu Gene5 byla změřena čistota a koncentrace RNA a jednotlivé vzorky byly naředěny tak, aby každý z nich obsahoval 1,5 μg RNA v objemu 6 μl . Pro reverzní transkripci z RNA do cDNA byl použit First Strand cDNA Synthesis Kit. Konečné množství cDNA bylo v objemu 20 μl a pro následující kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR) byla naředěna na 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

5.5. Kvantitativní PCR v reálném čase

Primery pro kvantitativní PCR v reálném čase byly navrženy pro amplifikaci sekvencí genů, jejichž produkty se účastní syntézy cytokininů (AtIPT1, 2, 7 a 9), degradace cytokininů (AtCKX1, 2, 3, 4, 7), signalizace cytokininů (AHK2, 3 a 4; ARR5 a 15), příjmu a transportu kovů (AtABCC1; AtFRO2; AtIRT1; AtNRAMP1 a 3; AtZIP4) nebo odpovědi na stres (AtACS8; AtCAT1 a 2). qRT-PCR byla provedena v optických 96-ti jamkových deskách za standardních podmínek pomocí StepOnePlus™ RT-PCR. Reakce probíhala v celkovém objemu 10 μl , přičemž reakční roztok obsahoval 5 μl SYBR Green Master Mix, 2,5 μl primeru (konečná koncentrace 300 nM) a 2,5 μl cDNA (konečná koncentrace 0,625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Pro normalizaci dat byl použit referenční gen *AtClath* a data byla analyzována pomocí programu Step One Plus. Relativní hladiny exprese (RQ) byly vyhodnocovány podle rovnice $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$. Výsledky byly zpracovány v programech Microsoft Excel a Microcal Origin.

5.6. Western blot

5.6.1. Izolace proteinů z rostlinného materiálu

Pro western blot byly použity kořeny *A. thaliana*, které byly hydroponicky pěstovány v tancích. Nejprve byly zmražené kořeny rozdrceny pomocí třecí misky a kapalného dusíku. Ke každému vzorku, který obsahoval cca 100 mg zhomogenizovaného materiálu, bylo přidáno 300 μ l extrakčního pufru. Vzorky byly 15 minut vortexovány při 10°C a 900 rpm. Následně byly stočeny v centrifuze při 4°C a 14000 g po dobu 15-ti minut a odebraný supernatant byl udržován na ledu.

5.6.2. Stanovení proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové

Do každé jamky 96-ti jamkové desky bylo napipetováno 5 μ l vzorku a 200 μ l činidla kyseliny bicinchoninové (BCA) ve dvou opakováních. Pro kalibrační řadu bylo místo vzorku pipetováno 5 μ l BSA v extrakčním pufru o koncentracích 5; 3; 2; 1; 0,75; 0,5; 0,375; 0,25; 0,125; 0,1 a 0,05 μ M. Jako blank sloužilo 5 μ l extrakčního pufru. Po napipetování proběhla 30-ti minutová inkubace při 37°C ve tmě a následně byla změřena absorbance při 562 nm. Po odečtení blanku byly z kalibrační křivky vypočítány koncentrace proteinů (mg/ml) v jednotlivých vzorcích.

5.6.3. Elektroforéza a Western blot

Připravené vzorky byly naředěny do vzorkovacího pufru tak, aby v každém vzorku byla stejná koncentrace proteinů. Vzorky byly inkubovány 5 minut při 96°C a poté byly krátce stočeny. Do jamek v elektroforéze bylo pipetováno 10 μ l markru a vždy 20 μ l vzorku obsahujícího 15 μ g proteinů. Elektroforéza probíhala nejprve při 90 V, než došlo k zaostření vzorků, a následně bylo napětí zvýšeno na 130 V. Za 1 a půl hodiny byla elektroforéza zastavena a gely byly vloženy do předem vychlazené aparatury pro Western blot. Během transferu proteinů na membránu byl aplikován proud 350 mA po dobu 1 hodiny za neustálého chlazení. Potom byla membrána přenesena do barvicího roztoku Ponceau a po dvou minutách omývána destilovanou vodou do odbarvení pozadí. Z membrány byl podle markru vyříznut proužek zviditelněných proteinů v oblasti kolem 37 kDa.

5.6.4. Detekce proteinů

Destilovanou vodou odbarvený proužek membrány byl 1 hodinu blokován ve 20 ml 5% mléka v TBS s Tweenem. Následně byl proužek inkubován 1 hodinu ve 20 ml 2,5% mléka v TBS s Tweenem, do kterého byla naředěna primární protilátka Anti-IRT1 v poměru 1:5000. Poté byl proužek postupně promýván 5 minut v TBS, 10 minut v TBS s Tweenem, 5 minut v TBS a 1,5 hodiny byl inkubován ve 20 ml 5% mléka v TBS s Tweenem s naředěnou sekundární protilátkou v poměru 1:10000. Po zopakování promývacího procesu byl proužek převrstven 1 ml femto ECL (roztok luminolu a peroxidu v poměru 1:1) a detekce proteinů proběhla pomocí CCD kamery po 80-ti sekundové expozici. Všechny kroky blokace, inkubace a promývání probíhaly za stálého kývání (90 rpm) a při laboratorní teplotě.

5.7. Stanovení flavonoidů

Pro stanovení flavonoidů byly použity zamražené kořeny a nadzemní části *A. thaliana*, které byly hydroponicky pěstované v tancích. Po jejich rozdrcení v třecí misce s kapalným dusíkem bylo vždy k cca 50 mg tohoto materiálu v mikrozkumavce přidáno 500 μ l 100% metanolu. Vzorky byly 10 minut vortexovány při 900 rpm se třemi skleněnými kuličkami v každé eppendorfci a následně byly stočeny v centrifuze při 17000 g po dobu 10-ti minut. Supernatant byl použit pro stanovení flavonoidů podle Arvouet-Grand et al. (1994) s modifikacemi pro měření v mikrotitrační destičce. Do každé jamky 96-ti jamkové desky bylo ve dvou opakováních napipetováno 100 μ l vzorku a 100 μ l 2% chloridu hlinitého ve 100% etanolu. Pro tvorbu kalibrační křivky byla místo vzorku pipetována kalibrační řada, a to 100 μ l quercetinu ve 100% metanolu o koncentracích 100; 75; 50; 25; 12,5; 6,125; 3,125 a 1 μ M. Jako blank sloužilo 100 μ l 100% metanolu se 100 μ l 2% chloridu hlinitého ve 100% etanolu. Po 10-ti minutové inkubaci při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 415 nm. Z kalibrační křivky bylo vypočítáno množství flavonoidů (μ M) v jednotlivých vzorcích. Výsledky byly zpracovány v programech Microsoft Excel a Microcal Origin.

5.8. Stanovení etylenu

Pro stanovení etylenu byly použity 20-ti denní rostliny *A. thaliana* pěstované ve 24-jamkových deskách. Desky byly ve flowboxu přelepeny a utěsněny průhlednou folií určenou pro PCR a byly přeneseny do fytotronu. Po 24 hodinách bylo z každé jamky pomocí jehly a stříkačky odebráno 1 ml vzduchu, který byl ihned vstříknut do plynového chromatografu. Jako blank sloužil vzduch odebraný z utěsněné 24-jamkové desky obsahující ½ MS média s fytagem bez rostlin. Pro analýzu etylenu byla v plynovém chromatografu nastavena teplota vstříku (200°C), trouby (40°C) a detektoru (220°C). Plocha píku byla odečítána v retenčním čase etylenu, a to 2,2 minuty. Pomocí kalibrační křivky bylo vypočítáno množství etylenu (nl/ml) vyprodukovaného rostlinami, které bylo dále vztaženo k hodnotám ploch listů získaných v den měření etylenu. Výsledky byly zpracovány v programech Microsoft Excel a Microcal Origin.

6. Výsledky

6.1. Kvantitativní PCR v reálném čase

Hydroponicky pěstované rostliny, jejichž RNA byla izolována a přepsána do cDNA pro následné provedení qRT-PCR, byly ošetřeny DMSO (kontrola), 10µM Cd + DMSO, 1nM PI-55, 10nM PI-55, 100nM PI-55, 10nM PI55 + 10µM Cd, 10nM BA nebo 10nM BA + 10µM Cd. qRT-PCR byla prováděna celkem s 23 různými geny (viz kapitola 5.5.), jejichž přítomnost byla sledována v kořenech, přízemních růžicích, prýtech s listy nebo celkově v nadzemních částech. K normalizaci dat byl využit referenční gen *AtClath* a relativní hladiny exprese jednotlivých genů byly vždy vztaženy ke kontrole, která v grafech odpovídá hodnotě 1.

6.1.1. Hladina exprese vybraných genů v rostlinách *A. thaliana* vystavených kadmii

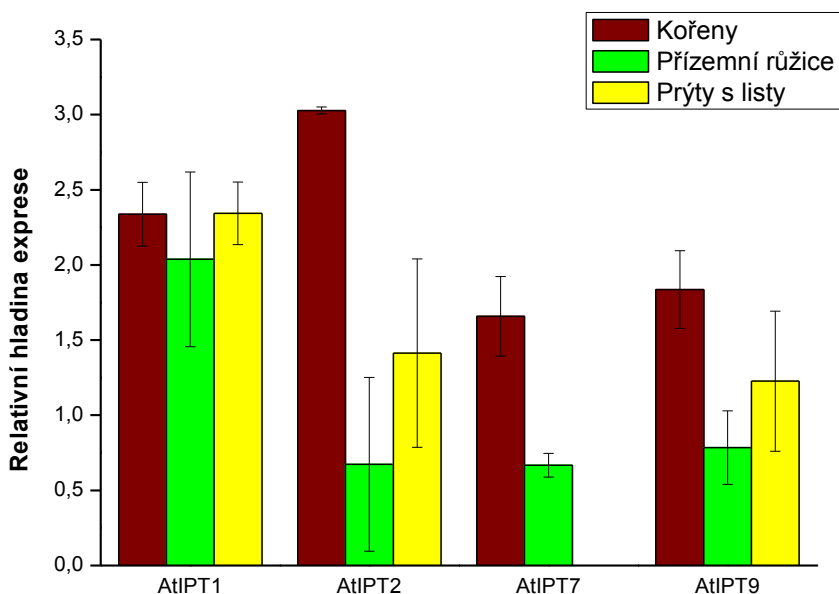
Relativní hladina exprese jednotlivých genů byla stanovována u pětidenních rostlin, které byly ošetřeny 10µM Cd. Zvýšená hladina exprese genů *AtIPT1*, 2, 7 a 9, jejichž produkty se účastní biosyntézy cytokininů, byla pozorována v kořenech. Expese

AtIPT1 byla zvýšena i v přízemních růžicích a prýtech, zatímco exprese ostatních sledovaných genů byla v přízemních růžicích snížena a v prýtech k výrazné změně nedošlo. *AtIPT7* se však v prýtech neexprimoval vůbec (viz Graf 1).

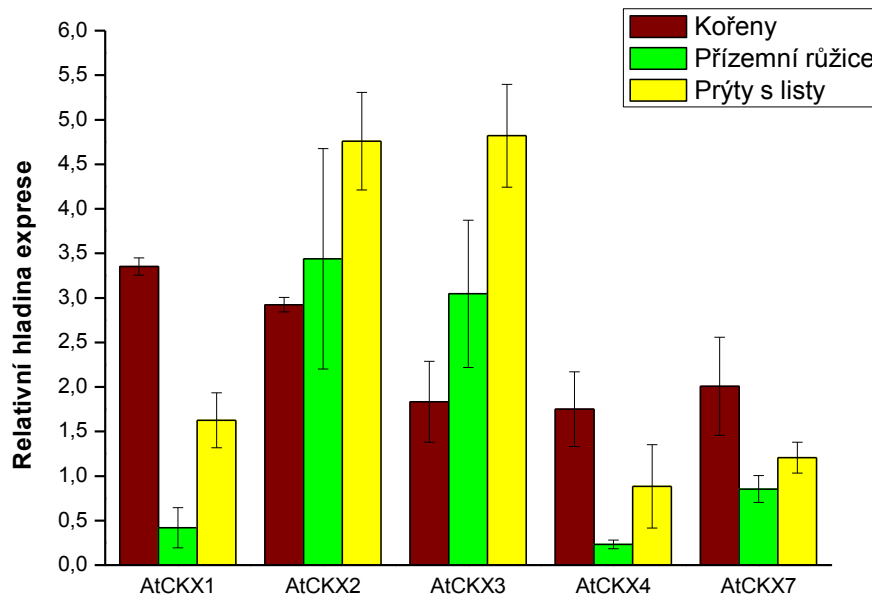
Expresce genů *AtCKX1*, 2, 3, 4 a 7, jejichž produkty se podílí na degradaci cytokininů, byla zvýšena v kořenech. Pokles hladiny exprese v přízemních růžicích byl pozorován v případě genů *AtCKX1* a 4, zatímco u *AtCKX2* a 3 byla exprese v přízemních růžicích i prýtech výrazně zvýšena. Hladina *AtCKX7* se v přízemních růžicích a prýtech oproti kontrole významně nezměnila (viz Graf 2).

V případě genů, jejichž produkty se účastní signalizace cytokininů, byla pozorována zvýšená hladina exprese genu *AHK3* v kořenech, zatímco v přízemní růžici byla jeho exprese snížena. Pokles exprese byl také pozorován v přízemních růžicích a prýtech v případě genů *ARR5* a *ARR15*, naopak ke zvýšení hladiny exprese v prýtech došlo u *AHK4*. K výrazným změnám v hladinách exprese genu *AHK2* nedošlo v žádných rostlinných částech (viz Graf 3).

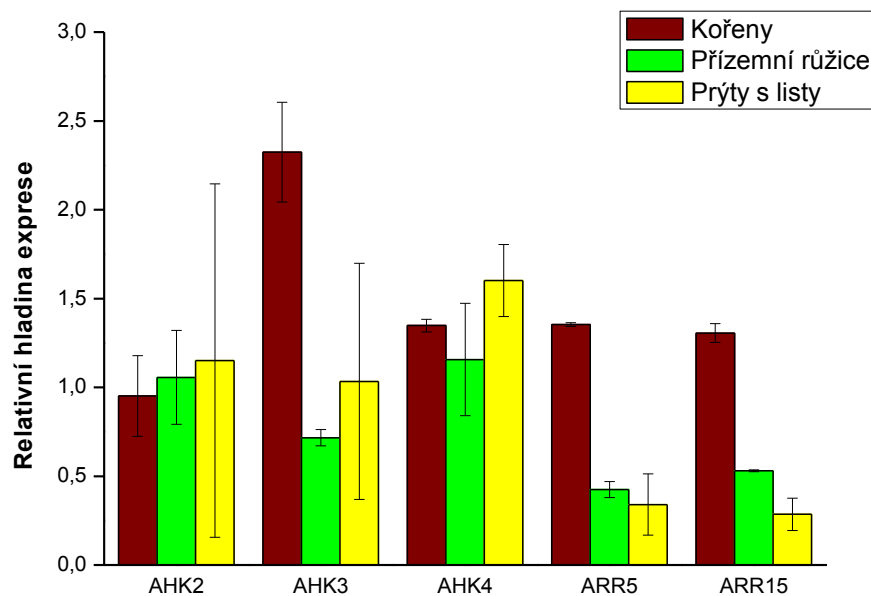
Dále byla na těchto rostlinách sledována hladina exprese genů, jejichž produkty se účastní transportu kovů v rostlinách. V přízemních růžicích byla pozorována zvýšená hladina exprese u všech testovaných genů, a to *AtABCC1*, *AtIRT1*, *AtNRAMP1*, *AtNRAMP3* a *AtZIP4*. V případě *AtNRAMP1* a *AtZIP4* byl nárůst exprese pozorován také v kořenech a u *AtIRT1* v prýtech, avšak exprese tohoto genu v kořenech byla výrazně snížena (viz Graf 4).



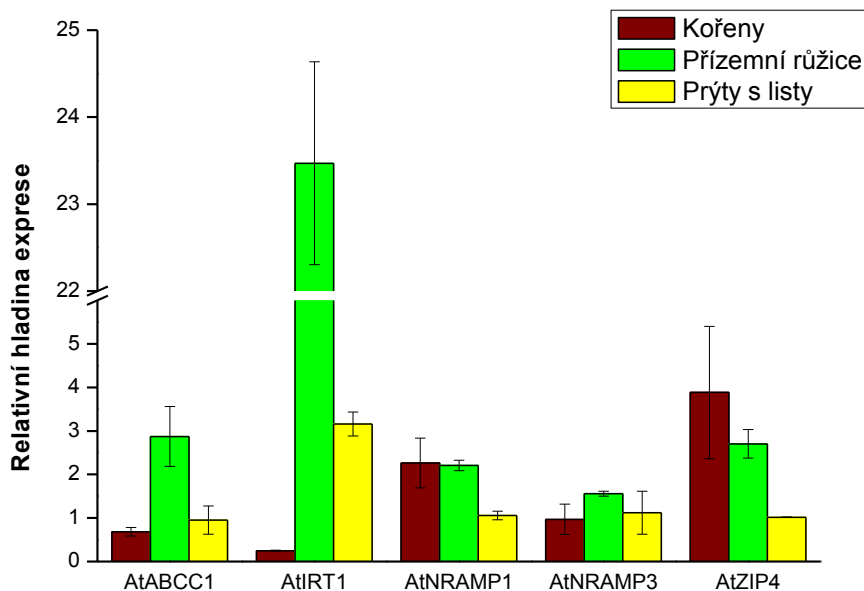
Graf 1: Hladina exprese vybraných genů biosyntézy cytokininů v jednotlivých částech *A. thaliana*, které byly 5 týdnů vystaveny stresu 10 μ M Cd.



Graf 2: Hladina exprese vybraných genů degradace cytokininů v jednotlivých částech *A. thaliana*, které byly 5 týdnů vystaveny stresu 10 μ M Cd.



Graf 3: Hladina exprese vybraných genů důležitých pro cytokininovou signalizaci, která byla sledována v jednotlivých částech *A. thaliana* vystavených stresu 10 μ M Cd po dobu pěti týdnů.



Graf 4: Hladina exprese vybraných genů transportérů kovů v jednotlivých částech *A. thaliana*, které byly 5 týdnů vystaveny stresu 10 μ M Cd.

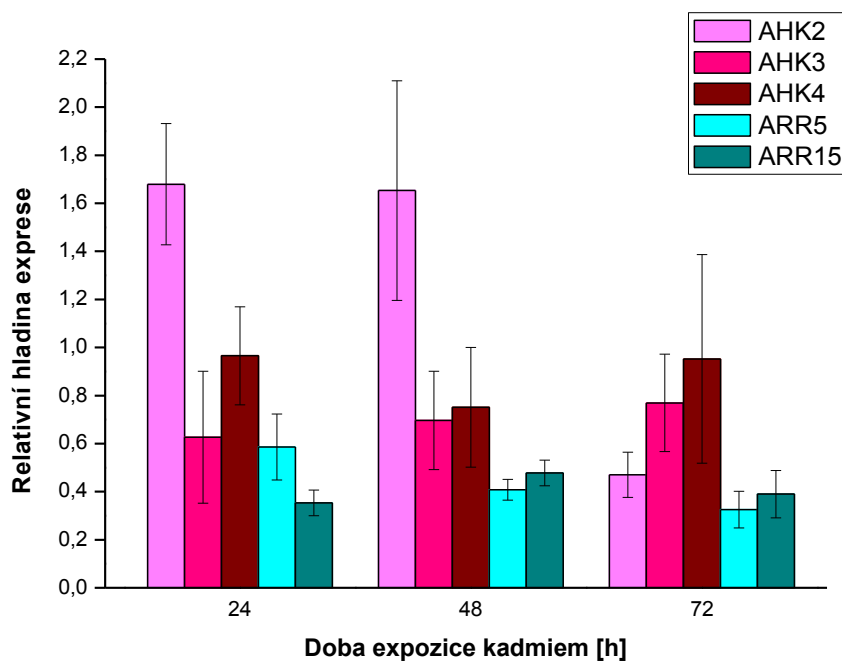
6.1.2. Hladina exprese vybraných genů v *A. thaliana* během třídnenního stresu kadmíem

Expresce genu *AHK2* byla první den po aplikaci kadmia zvýšena v kořenech i nadzemních částech rostlin, ale v následujících dnech došlo k jejímu výraznému poklesu. Hladina exprese *AHK3* v kořenech byla první den po ošetření kadmíem mírně snížena, ale potom docházelo k jejímu postupnému vzrůstu. V nadzemních částech tomu bylo přesně opačně. V případě *AHK4* byl druhý den po vystavení stresu kadmíem zaznamenán pokles exprese jak v kořenech, tak v nadzemních částech, avšak třetí den byla hladina exprese opět normální. V kořenech byla zaznamenána postupně snižující se hladina exprese *ARR5*, která v nadzemních částech naopak rostla. Gen *ARR15* byl v kořenech exprimován méně než v nadzemních částech, kde byla jeho exprese po prvním dni stresu kadmíem výrazně zvýšena (viz Graf 5 a 6).

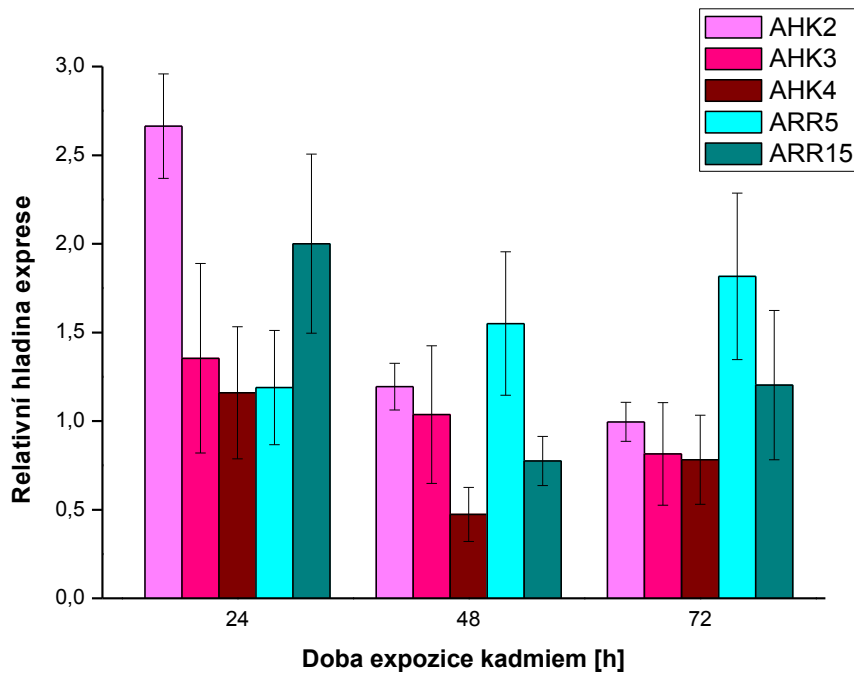
Hladina exprese genu *AtABCC1* byla v kořenech první den po vystavení kadmíu zvýšena a v dalších dnech došlo k jejímu výraznému poklesu. Postupné snižování exprese bylo pozorováno i v nadzemních částech. Druhý den stresu kadmíem byl v kořenech pozorován významný nárůst hladiny exprese *AtIRT1*, který byl následující den

snížen více jak o polovinu. V nadzemních částech nebyl tento gen exprimován vůbec. V případě genu *AtNRAMP1* byla zaznamenána jeho snížená exprese jak v kořenech, tak v nadzemních částech, což bylo také pozorováno u *AtZIP4* druhý a třetí den expozice kadmíem. Hladina exprese *AtNRAMP3* výrazně změněna nebyla, ale během třídního stresu kadmíem docházelo k jejímu mírnému poklesu (viz Graf 7 a 8).

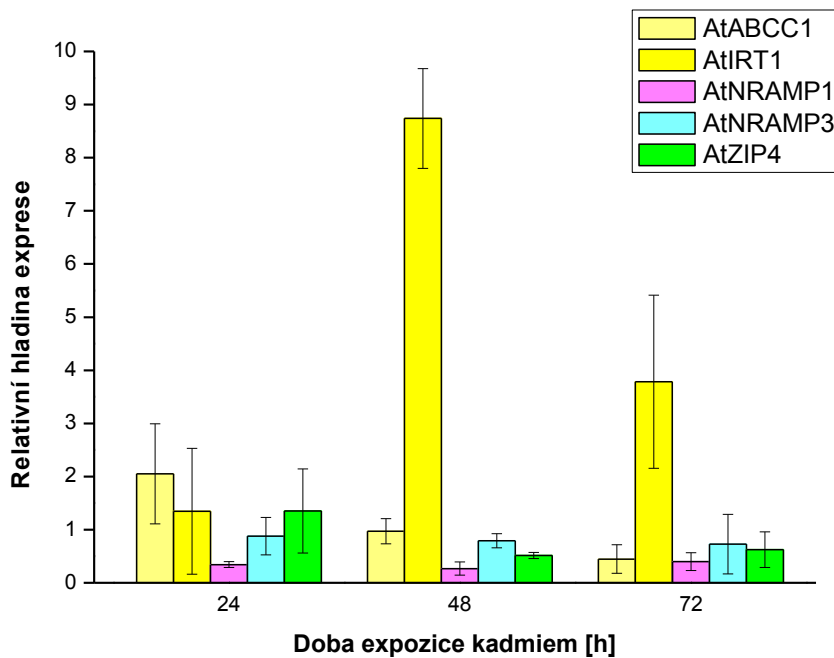
Dále byla na těchto vzorcích sledována exprese genů *AtCAT1* a *AtCAT2*, jejichž produkty se podílí na reakci rostlin proti oxidativnímu stresu. V kořenech byl během prvních dvou dní expozice kadmíem zaznamenán nárůst hladin exprese obou těchto genů, které však třetí den klesly do normálu. V nadzemních částech byla hladina *AtCAT1* a 2 zvýšena po celé tři dny stresu kadmíem, ale postupně docházelo k jejímu snižování (viz Graf 9).



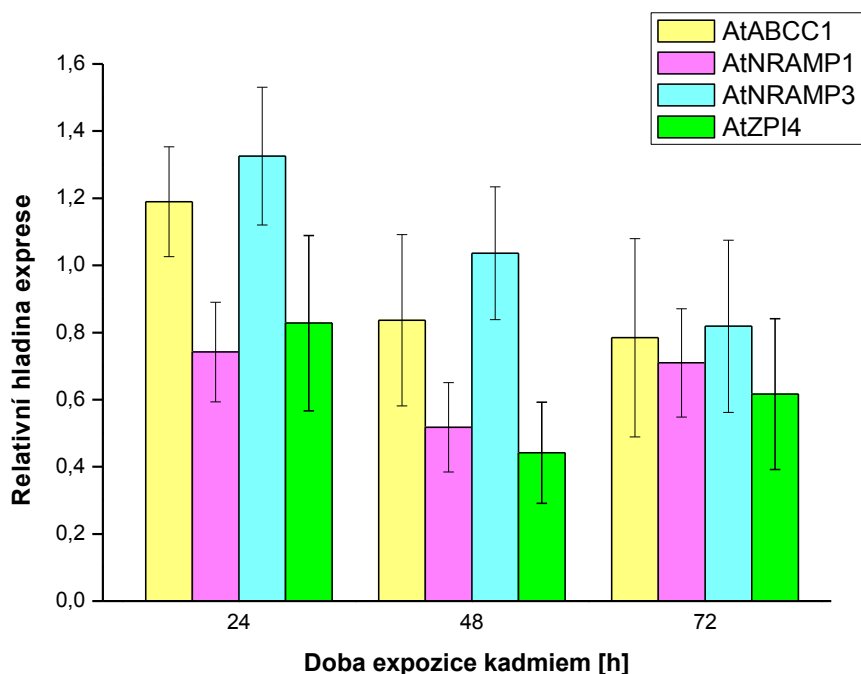
Graf 5: Hladina exprese vybraných genů důležitých pro cytokininovou signalizaci, která byla sledována v kořenech *A. thaliana* během třídního stresu 10 μ M Cd.



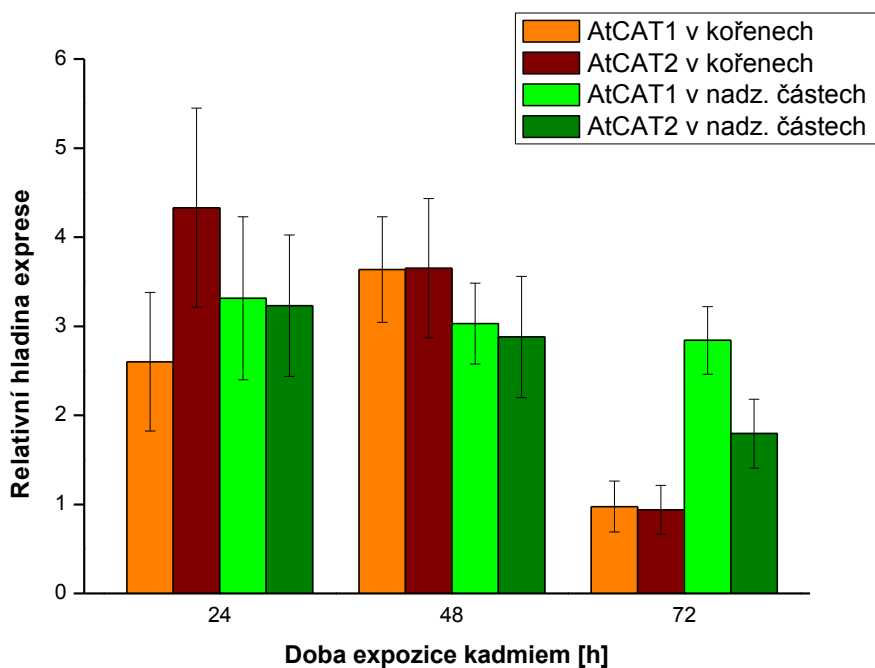
Graf 6: Hladina exprese vybraných genů důležitých pro cytokininovou signalizaci, která byla sledována v nadzemních částech *A. thaliana* během třídnenního stresu 10 μ M Cd.



Graf 7: Hladina exprese vybraných genů transportérů kovů v kořenech *A. thaliana* během třídnenního stresu 10 μ M Cd.



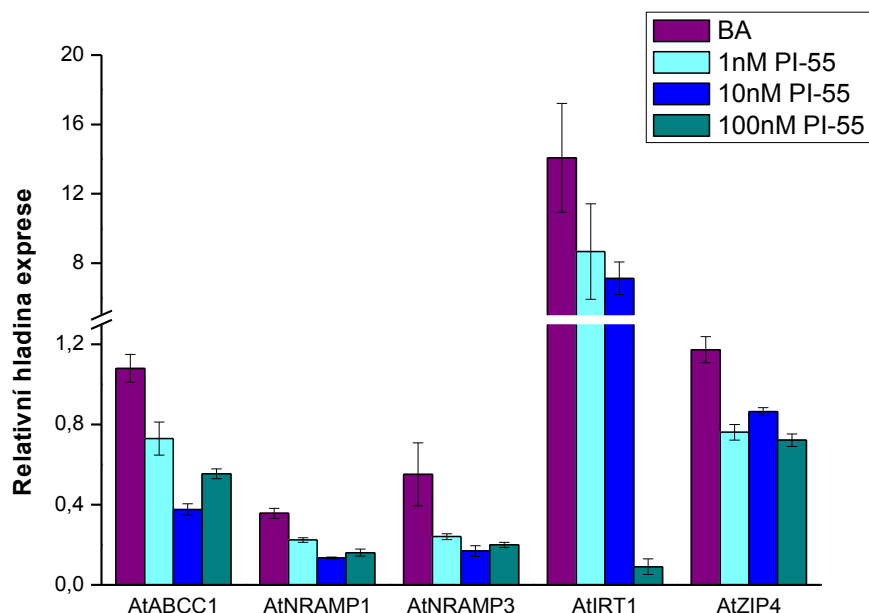
Graf 8: Hladina exprese vybraných genů transportérů kovů v nadzemních částech *A. thaliana* během třídnenního stresu 10 μ M Cd.



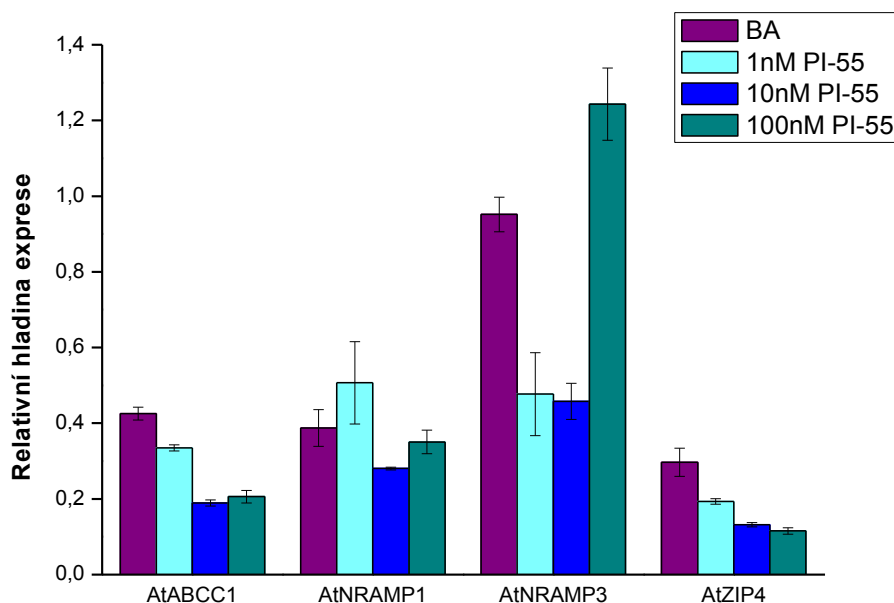
Graf 9: Hladina exprese genů důležitých při odpovědi rostlin na stres, která byla sledována v kořenech a nadzemních částech *A. thaliana* během třídnenního stresu 10 μ M Cd.

6.1.3. Hladina exprese genů transportérů kovů v rostlinách *A. thaliana* ošetřených cytokininem nebo antagonistou cytokininů

V rostlinách ošetřených BA byla po 12-ti dnech pozorována snížená hladina genu *AtABCC1* pouze v nadzemních částech, zatímco v rostlinách vystavených 1-100nM PI-55 byl pokles exprese zaznamenán i v kořenech, přičemž největší úbytek způsobil 10nM PI-55. V kořenech všech ošetřených rostlin došlo ke snížení hladiny exprese *AtNRAMP1* a 3, ale v nadzemních částech byla exprese *AtNRAMP3* snížena pouze v rostlinách vystavených 1 a 10nM PI-55. Největší pokles byl opět zaznamenán v případě 10nM PI-55. Gen *AtIRT1* byl výrazně exprimován v kořenech rostlin ošetřených BA, 1 a 10nM PI-55, ale v případě nejvyšší testované koncentrace PI-55 došlo k významnému poklesu exprese tohoto genu. V nadzemních částech nebyla jeho exprese pozorována vůbec. Hladina *AtZIP4* byla v kořenech rostlin ošetřených antagonistou cytokininů mírně snížena, v nadzemních částech byl však zaznamenán mnohem větší pokles, a to i v případě BA (viz Graf 10 a 11).



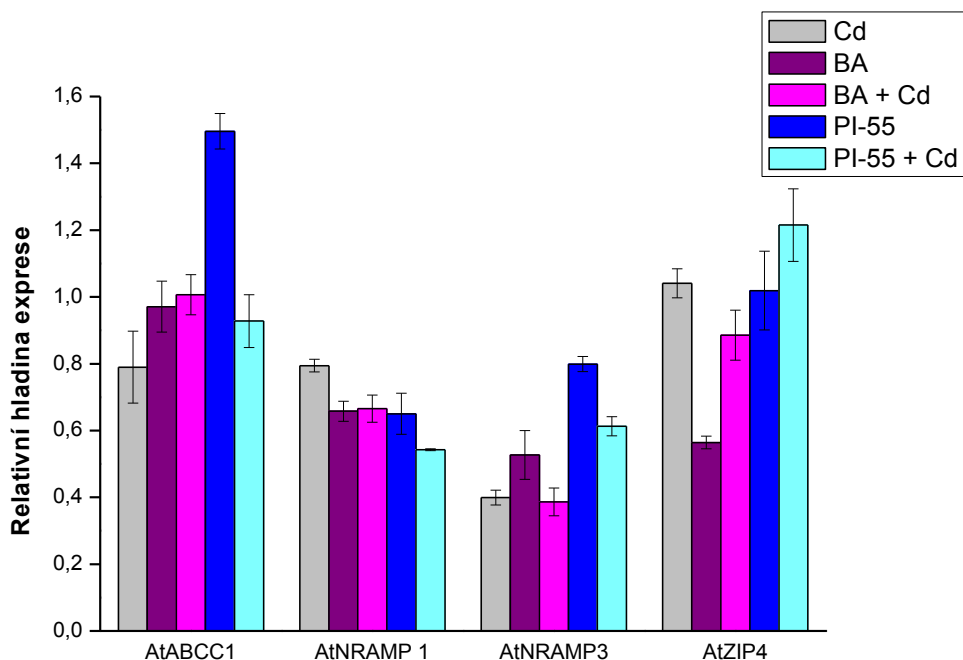
Graf 10: Vliv aplikace cytokininu BA (10nM) nebo antagonisty cytokininů PI-55 (1-100nM) na relativní expresi genů vybraných transportérů kovů v kořenech rostlin *A. thaliana* starých 12 dní.



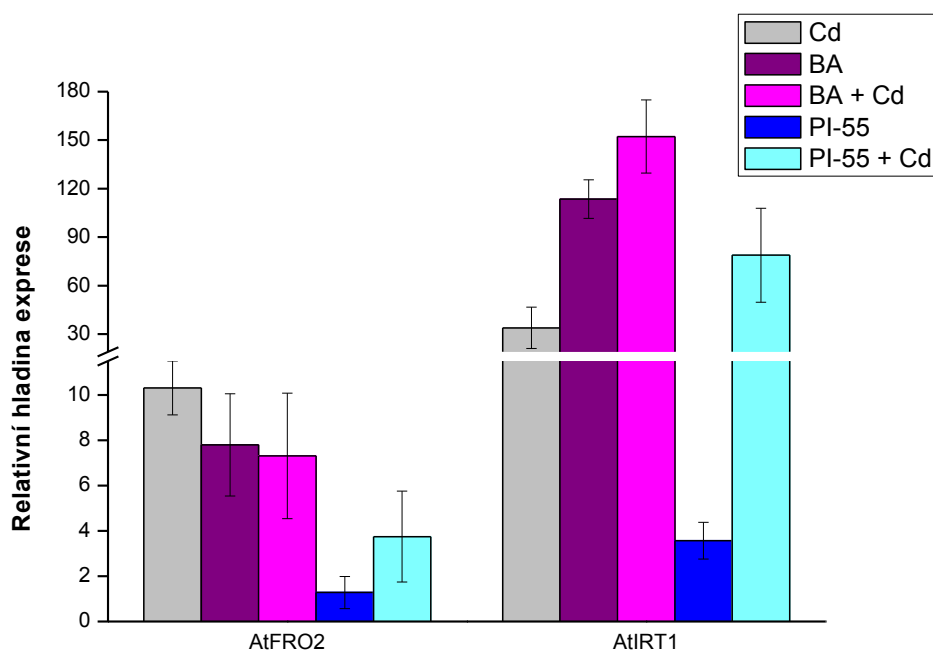
Graf 11: Vliv aplikace cytokininu BA (10nM) nebo antagonisty cytokininů PI-55 (1-100nM) na relativní expresi genů vybraných transportérů kovů v nadzemních částech rostlin *A. thaliana* starých 12 dní.

6.1.4. Hladina exprese genů transportérů kovů v kořenech *A. thaliana* ošetřených kadmíem, cytokininem nebo antagonistou cytokininů

Nárůst exprese genu *AtABCC1* byl pozorován v případě rostlin ošetřených PI-55 a její mírný pokles se vyskytl u rostlin vystavených Cd. V kořenech všech ošetřených rostlin bylo zaznamenáno mírné snížení hladiny exprese *AtNRAMP1*, přičemž nejvíce v tomto smyslu zapůsobila kombinace PI-55 s kadmíem. V případě *AtNRAMP3* byl pozorován pokles exprese ve všech případech a největší pokles byl vždy sledován ve spojení s kadmíem. Vzhledem ke kontrole byl gen *AtZIP4* exprimován ve všech rostlinách normálně kromě rostlin ošetřených BA, kde byla jeho exprese snížena (viz Graf 12). Hladina exprese *AtFRO2* a *AtIRT1* byla výrazně zvýšena ve všech ošetřených rostlinách až na rostliny, které byly vystaveny působení PI-55. Hladina *AtFRO2* byla v tomto případě normální a *AtIRT1* byl zvýšen oproti ostatním variantám daleko méně. Nejvyšší hladina exprese *AtFRO2* byla zaznamenána u rostlin ošetřených pouze kadmíem a v případě *AtIRT1* byla nejvyšší hladina pozorována při použití BA s kadmíem (viz Graf 13).



Graf 12: Vliv kadmia (10 μ M), cytokininu BA (10nM) a antagonistů cytokininů PI-55 (10nM) na hladinu exprese vybraných genů transportérů kovů v kořenech čtyřtydenních rostlin *A. thaliana*.



Graf 13: Vliv kadmia (10 μ M), cytokininu BA (10nM) a antagonistů cytokininů PI-55 (10nM) na hladinu exprese dvou klíčových genů příjmu a transportu železa kořeny čtyřtydenních rostlin *A. thaliana*.

6.1.5. Hladina exprese genu *AtACS8*

Relativní hladina exprese *AtACS8* byla sledována v rostlinách zmíněných v předchozích kapitolách (6.1.2.; 6.1.3.; 6.1.4.). V případě třídenního stresu kadmíem byl pozorován nárůst exprese *AtACS8* v kořenech i nadzemních částech, přičemž největší vzrůst byl zaznamenán třetí den. Působením 1nM PI-55 došlo k poklesu exprese tohoto genu v kořenech i nadzemních částech rostlin, zatímco v případě 100nM PI-55 a 10nM BA byl pokles pozorován pouze v kořenech. Naopak 10nM BA ve spojení s kadmíem způsobil v kořenech významné zvýšení exprese. Hladina *AtACS8* zůstala u rostlin ošetřených 10nM PI-55 nezměněna a v kombinaci s kadmíem byl sledován jen mírný nárůst (viz Tab. 1).

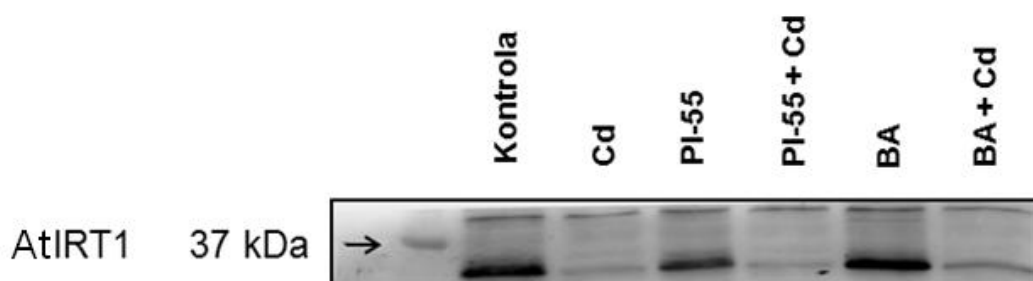
Tab. 1: Hladina exprese genu *AtACS8* v jednotlivých částech *A. thaliana* za různých podmínek. Cd bylo vždy použito 10 μ M.

Ošetření	Kořeny	SD	Nadzemní části	SD
Cd 1. den	3.160	0,673	3.050	0,623
Cd 2. den	2.344	0,239	2.417	0,588
Cd 3. den	3.857	0,515	4.144	0,864
1nM PI-55	0.628	0,088	0.293	0,053
10nM PI-55	1.089	0,174	1.302	0,349
100nM PI-55	0.253	0,016	0.795	0,098
10 nM BA	0.337	0,092	0.885	0,252
Cd	1.733	0,325	-	-
10nM PI-55	0.977	0,108	-	-
10nM PI-55 + Cd	1.451	0,257	-	-
10nM BA	0.211	0,071	-	-
10nM BA + Cd	1.959	0,436	-	-

6.2. Western blot

Po izolaci proteinů z kořenů hydroponicky pěstovaných rostlin, které byly ošetřeny DMSO (kontrola), 10 μ M Cd + DMSO, 10nM PI-55, 10nM PI-55 + 10 μ M Cd, 10nM BA nebo 10nM BA + 10 μ M Cd, byla provedena jejich elektroforéza a western blot. Následně byl pomocí protilátek ve všech vzorcích detekován protein AtIRT1.

Největší množství proteinu AtIRT1 bylo zaznamenáno v rostlinách, které byly ošetřeny BA. O něco méně tohoto proteinu bylo pozorováno u kontrolních rostlin a ještě méně u rostlin, které byly vystaveny působení látky PI-55. V případě variant s kadmíem bylo množství AtIRT1 ještě více sníženo a nejmenší množství tohoto proteinu bylo obsaženo v kořenech rostlin, které byly ošetřeny PI-55 s kadmíem (viz Obr. 11).



Obr. 11: Vliv kadmia (10 μ M), cytokininu BA (10nM) a antagonistů cytokininů PI-55 (10nM) na množství proteinu AtIRT1 v kořenech *A. thaliana*.

6.3. Stanovení flavonoidů

Množství flavonoidů bylo sledováno v hydroponicky pěstovaných rostlinách, které byly ošetřeny DMSO (kontrola), 10 μ M Cd + DMSO, 10nM PI-55, 10nM PI-55 + 10 μ M Cd, 10nM BA nebo 10nM BA + 10 μ M Cd, a dále v nadzemních částech rostlin, které byly vystaveny třídennímu stresu kadmíem.

V kořenech *A. thaliana*, které byly ošetřeny BA, BA s kadmíem a PI-55, bylo větší množství flavonoidů než v kontrolních rostlinách. V nadzemních částech rostlin bylo však zvýšené množství flavonoidů pozorováno pouze v případě BA. Při použití jakékoli kombinace s kadmíem došlo v kořenech i nadzemních částech rostlin ke snížení množství flavonoidů jak vůči kontrolním rostlinám, tak i vůči variantám bez kadmia (viz Tab. 2).

V případě nadzemních částí rostlin, které byly vystaveny třídennímu stresu kadmíem, bylo množství flavonoidů po prvním dni stresu mírně zvýšeno. Další dny však množství flavonoidů klesalo (viz Tab. 3).

Tab. 2: Vliv kadmia (10 μ M), cytokininu BA (10nM) a antagonistů cytokininů PI-55 (10nM) na koncentraci [μ M] a relativní množství flavonoidů [%] v kořenech a nadzemních částech *A. thaliana*. Relativní množství je vztaženo ke kontrolním vzorkům.

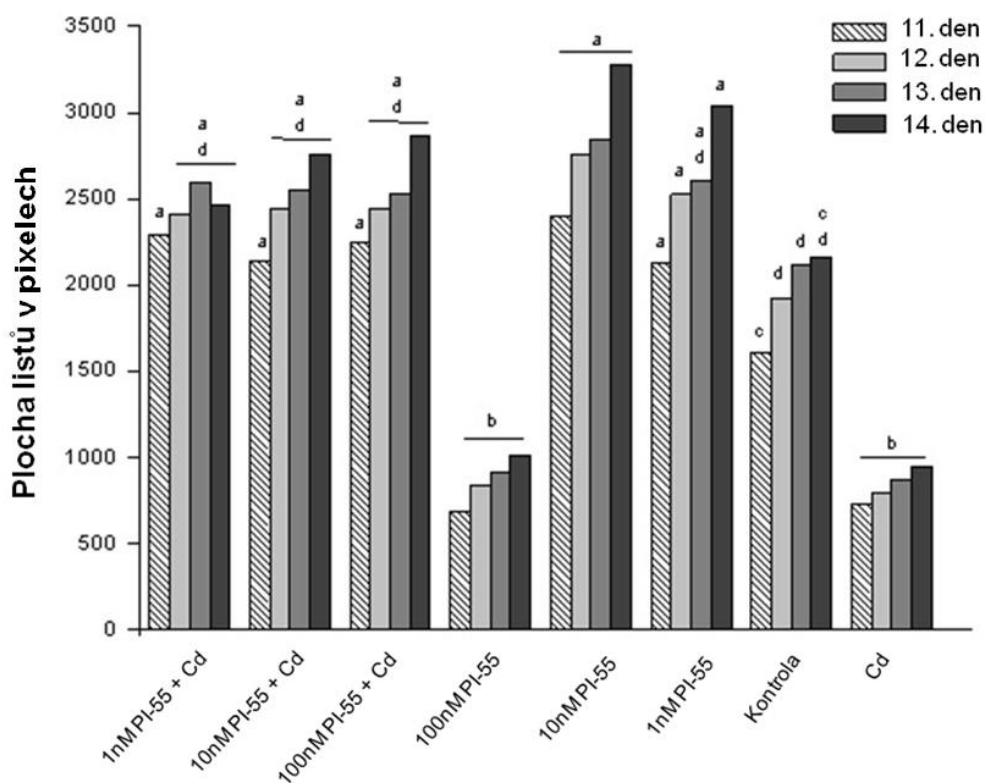
Ošetření	Kořeny		Nadzemní část	
	[μ M]	[%]	[μ M]	[%]
Kontrola	0,857	100	352,732	100
Cd	0,813	95	261,973	74
BA	1,259	147	428,045	121
BA + Cd	0,782	91	260,589	74
PI-55	1,036	121	298,313	85
PI-55 + Cd	0,723	84	197,107	56

Tab. 3: Koncentrace [μ M] a relativní množství flavonoidů [%] v nadzemních částech *A. thaliana* během třídnenního stresu 10 μ M Cd. Relativní množství je vztaženo ke kontrolním vzorkům.

Ošetření	Nadzemní část	
	[μ M]	[%]
Kontrola	340,054	100
Cd 1. den	380,946	109
Cd 2. den	296,125	85
Cd 3. den	270,679	77

6.4. Měření ploch listů *A. thaliana*

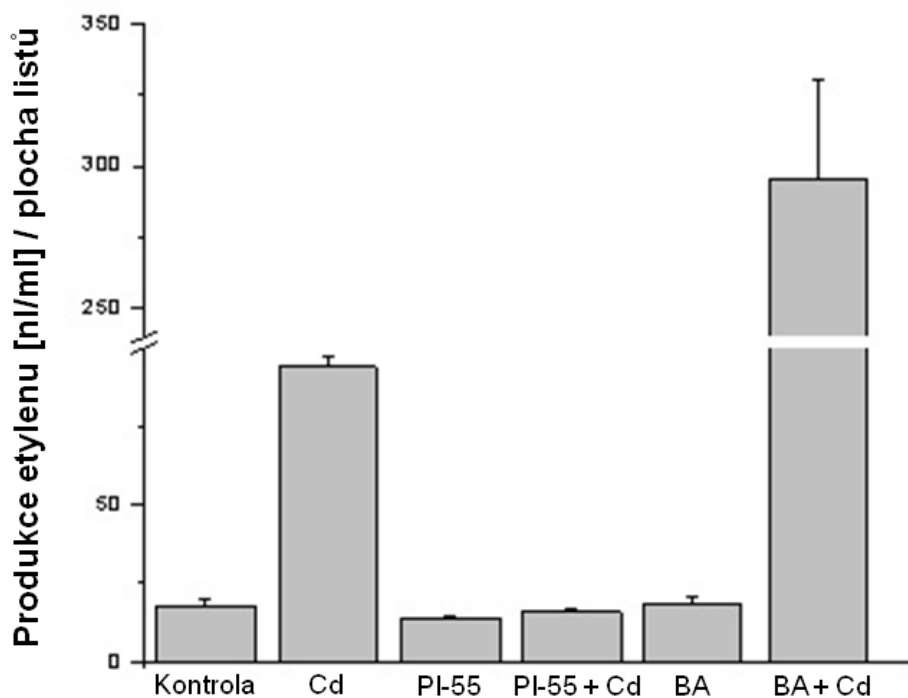
Plochy listů byly měřeny u rostlin, které byly pěstovány na ½ MS médiu s fytagelem a ošetřeny DMSO (kontrola), 10 μ M Cd + DMSO, 1-100nM PI-55 nebo 1-100nM PI-55 + 10 μ M Cd. V grafu 14 jsou uvedeny naměřené plochy listů v průběhu čtyř dnů, přičemž první den byly rostliny staré 11 dní. Je zřejmé, že plocha listů všech rostlin se s přibývajícím dnem postupně zvětšovala. Výrazně menší plochy listů oproti kontrolním rostlinám měly rostliny pod vlivem kadmia a 100nM PI-55, naopak rostliny s významně větší listovou plochou byly vystaveny vlivu 1 a 10nM PI-55. Rostliny, které byly ošetřeny 1-100nM PI-55 s kadmíem, měly plochu listů větší než kontrolní, ale zároveň o něco menší než rostliny pod vlivem 10nM PI-55.



Graf 14: Vliv kadmia (10 μ M) a antagonistů cytokininů PI-55 (1-100nM) na plochu listů *A. thaliana* v průběhu čtyř dnů. Odlišná písmena a, b, c, d označují statistickou významnost jednotlivých ošetření vůči ostatním.

6.5. Stanovení etylenu

Množství vyprodukovaného etylenu za 24 hodin bylo měřeno u rostlin, které byly pěstovány na $\frac{1}{2}$ MS médiu s fytagelem a ošetřeny DMSO (kontrola), 10 μ M Cd + DMSO, 10nM PI-55, 10nM PI-55 + 10 μ M Cd, 10nM BA nebo 10nM BA + 10 μ M Cd. Nejvíce etylenu vyprodukovaly rostliny, které byly pod vlivem BA s kadmíem. Značně větší množství oproti kontrolním rostlinám vyprodukovaly také rostliny stresované pouze kadmíem. Rostliny ošetřené BA a PI-55 s kadmíem vytvořily srovnatelné množství etylenu jako kontrolní. Nejnižší produkce etylenu byla zaznamenána v případě rostlin s PI-55 (viz Graf 15).



Graf 15: Vliv kadmia (10 μ M), cytokininu BA (10nM) a antagonistů cytokininů PI-55 (10nM) na množství vyprodukovaného etylenu [nl/ml].

7. Diskuze

V této práci byl sledován vliv 10 μ M kadmia, cytokininu (10nM BA) nebo antagonistů cytokininů (1-100nM PI-55) na expresi genů v rostlinách, jejichž produkty se účastní metabolismu a signalizace cytokininů, transportu kovů a odpovědi na stres. Dále byl pozorován účinek 10 μ M kadmia, 10nM BA nebo 10nM PI-55 na množství proteinu AtIRT1 v kořenech, na velikost plochy listů rostlin, na množství flavonoidů a vyprodukovaného etylenu rostlinami.

Expresí genů cytokininového metabolismu byla zatím zkoumána zejména při stresu suchem, zaplavením, vysokými koncentracemi solí atd., ale během stresu kadmíem se expresí těchto genů zabývali pouze autoři Sofo et al. (2013), a to jen v omezené míře (*AtCKX1*, *AtIPT7*). Expresí genu *AtIPT1* byla zvýšena v kořenech, přízemních růžicích i prýtech *A. thaliana*, které byly pod dlouhodobým stresem kadmia. V kořenech byl pozorován také nárůst hladiny exprese *AtIPT2*, 7 a 9. Podle výzkumu, který provedl Sofo et al. (2013) však byla hladina exprese v případě *AtIPT7* snížena, což

může být způsobeno jinými podmínkami, za kterých byly rostliny pěstovány. Dále se ukázalo, že kadmium vyvolává pokles hladiny exprese *AtIPT2*, 7 a 9 v přízemních růžicích. Snížená exprese genu *AtIPT7* byla také popsána autory Le et al. (2012), jednalo se však o listy sóji. V rámci této práce se ukázalo, že stres kadmiem působí na biosyntézu cytokininů zejména v kořenech a přízemních růžicích *A. thaliana*.

V kořenech rostlin vystavených dlouhodobému stresu kadmiem byla zvýšena exprese genů *AtCKX1*, 2, 3, 4 a 7. Autoři Sofo et al. (2013) také prokázali nárůst exprese *AtCKX1* v kořenech rostlin *A. thaliana*, které byly pod vlivem kadmia. V dřívějších studiích provedených autory Le et al. (2012), které byly zaměřeny na expresi genů pod vlivem sucha, pozorovali v kořenech sóji vzrůst exprese většiny *GmCKX*. V případě *AtCKX2* a 3 byl zaznamenán nárůst exprese i v přízemních růžicích a prýtech, naopak exprese *AtCKX1* a 4 byla v přízemních růžicích snížena.

Hladina exprese genu *AHK3* v rostlinách, které byly pod dlouhodobým vlivem kadmia, byla v kořenech zvýšena, zatímco v přízemních růžicích byl pozorován její pokles. Dále byla zvýšená hladina zaznamenána v kořenech a prýtech v případě *AHK4*. Z výsledků vyplývá, že při stresu kadmiem dochází v kořenech a prýtech k posílení signálních drah cytokininů. Expese těchto genů byla dále sledována u *A. thaliana*, které byly vystaveny třídennímu stresu kadmiem. První den bylo vždy zaznamenáno vychýlení exprese nad nebo pod normální hladinu, ale během následujících dnů exprese postupně nabývala trendu, který byl pozorován u dlouhodobě stresovaných rostlin. Například hladina exprese *AHK3* v kořenech byla první den po aplikaci kadmia mírně snížena, ale potom docházelo k jejímu postupnému vzrůstu. Expese genu *AHK2* byla první den po ošetření kadmiem zvýšena v kořenech i nadzemních částech rostlin, ale v následujících dnech došlo k jejímu poklesu. To odpovídá faktu, že hladina *AHK2* byla po dlouhodobém stresu nezměněna. V případě *AHK4* byl druhý den po vystavení stresu kadmiem zaznamenán pokles exprese jak v kořenech, tak v nadzemních částech, avšak třetí den byla hladina exprese opět normální. Dle výsledků lze usuzovat, že hladina tohoto genu v následujících dnech dále vzrůstala. Důsledek třídenního stresu kadmiem byl však v případě genů *ARR5* a 15 přesně opačný než u stresu dlouhodobého. Při třídenním stresu docházelo ke snižování hladiny těchto genů v kořenech a naopak ke zvyšování v nadzemních částech. Po dlouhodobém stresu byl pokles exprese zaznamenán v nadzemních částech a hladina v kořenech nepatrně vzrostla. Z výše popsaných výsledků vyplývá, že během dlouhodobého stresu kadmiem dochází ke zvyšování exprese genů *AtCKX*, jejichž produkty se podílí na odbourávání cytokininů. To může způsobovat sníženou hladinu *ARR5* a 15, jelikož na jejich aktivaci se podílí právě cytokininy.

V kořenech *A. thaliana*, které byly po dobu 5-ti týdnů vystaveny účinku kadmia, byla pozorována výrazně nízká exprese genu *AtIRT1*. U rostlin, které byly kadmium vystaveny pouze 4 týdny, byla však hladina *AtIRT1* významně vysoká. I v případě třídního stresu kadmium došlo v kořenech již druhý den ke zvýšení exprese tohoto genu. Kadmium pro svůj přenos v rámci rostliny může využívat transportér *AtIRT1*, což však postupně vede k nedostatku železa (Baxter et al., 2008). Z výsledků lze usuzovat, že se čtyřtýdní rostliny snaží kompenzovat nedostatek železa nadměrnou expresí *AtIRT1*, ale pátý týden je exprese potlačena. To může být způsobeno stářím rostlin, které již mohou mít dostatečné zásoby železa, nebo se tak rostliny brání nechtěnému vstupu kadmia do rostliny. V případě teorie, že rostliny dostatek železa nemají, je možné, že se rostliny snaží doplnit železo jiným způsobem, a to zvýšenou expresí *AtZIP4*. Tento transportér je totiž důležitý pro přenos esenciálních prvků, jako je Zn, Fe a Mn, ale bohužel díky němu opět nechtěně dochází k přenosu kadmia (Maser et al., 2001). Toto tvrzení vyplývá z výsledků, kdy druhý a třetí den stresu kadmium byla zaznamenána snížená exprese *AtZIP4* jak v kořenech, tak v nadzemních částech, ale při dlouhodobém stresu byla jeho exprese naopak normální nebo zvýšená. Hladina exprese genu jiného transportéru kovů, a to *AtABCC1* umístěného v tonoplastech, byla v kořenech první den po vystavení kadmium zvýšena a v dalších dnech docházelo k jejímu poklesu. Mírné snížení exprese *AtABCC1* bylo také pozorováno v kořenech dlouhodobě stresovaných rostlin, ale v přízemních růžicích byla jeho exprese zvýšena. Dá se tedy předpokládat, že rostliny zvyšují svoji toleranci ke kadmium jeho ukládáním do vakuol v listech v přízemní růžici. Během třídního stresu kadmium dále došlo k poklesu hladiny *AtNRAMP3*, což bylo pozorováno i v kořenech rostlin dlouhodobě vystavených kadmium. V přízemních růžicích však byla hladina tohoto genu i genu *AtNRAMP1* zvýšena, což také nasvědčuje tomu, že se rostliny snaží kadmium detoxifikovat ve svých nadzemních částech.

V rostlinách, které byly vystaveny třídnímu stresu kadmium, byla navíc sledována exprese genů *AtCAT1* a *AtCAT2*. Po prvních dvou dnech expozice kadmium bylo v kořenech pozorováno zvýšení hladin jejich exprese, ale třetí den byla hladina stejná jako v kontrolních rostlinách. V nadzemních částech byla hladina *AtCAT1* a 2 zvýšena, ale během tří dnů se postupně snižovala. Autory Saffar et al. (2009) bylo již ukázáno, že vlivem kadmia dochází v nadzemních částech *A. thaliana* k poklesu aktivity katalázy, naopak z bakalářské práce autorky Halířové (2011) vyplývá, že stres kadmium vede k jejímu zvýšení. Je možné, že se výsledky těchto prací liší v důsledku rozdílného stáří rostlin, a je jisté, že kataláza hraje určitou roli v odpovědi rostlin na stres kadmium. Bylo by však vhodné tento enzym dále prozkoumat.

Aplikací cytokininu (10nM BA) a antagonisty cytokininů (1-100nM PI-55) byla ve 12-ti denních rostlinách snížena exprese genu *AtABCC1*. V kořenech čtyřtýdních

rostlin byla však hladina tohoto genu normální a v případě ošetření látkou PI-55 dokonce zvýšena. Dalo by se předpokládat, že PI-55 tímto způsobem rostlinám pomáhá z dlouhodobého hlediska detoxifikovat těžké kovy, ale při ošetření rostlin PI-55 s kadmii zůstala hladina genu *AtABCC1* nezměněna. V kořenech rostlin vystavených vlivu cytokininu nebo PI-55 došlo dále k poklesu exprese *AtNRAMP1* a 3, přičemž tento trend byl dále prohlouben v současné přítomnosti kadmia. Již bylo řečeno, že se *AtNRAMP1* a 3 nejspíš podílejí na distribuci kadmia v nadzemních částech, což vysvětluje jejich pokles v kořenech. V nadzemních částech rostlin, které byly ošetřeny pouze cytokininem nebo různými koncentracemi PI-55, bylo detekováno snížení hladiny genu *AtNRAMP1* ve všech případech a *AtNRAMP3* bylo sníženo pouze při použití 1 nebo 10nM PI-55. Látka PI-55 podporuje růst postranních kořenů, což pravděpodobně vede k dostatečnému příjmu živin. Ke snížení exprese *AtNRAMP3* mohlo dojít díky tomu, že tyto rostliny nepotřebují získávat další železo ze zásob ve vakuolách. Hladina genu *AtZIP4* byla v kořenech 12-ti denních i čtyřtýdenních rostlin ošetřených příslušnými látkami nebo kadmii víceméně stejná jako u rostlin kontrolních. V nadzemních částech rostlin ošetřených BA nebo 1-100nM PI-55 však došlo k poklesu jeho exprese. To by mohlo být užitečné v případě kombinace těchto látek s kadmii, protože by tak mohlo dojít ke snížení jeho příjmu.

Gen *AtIRT1* byl výrazně exprimován v kořenech 12-ti denních rostlin ošetřených 10nM BA nebo 10nM PI-55, což bylo potvrzeno i u čtyřtýdenních rostlin. Nejvyšší koncentrace PI-55 (100nM) způsobila pokles exprese. U čtyřtýdenních rostlin byl sledován i vliv kadmia společně s příslušnými látkami, který způsobil ještě větší nárůst exprese tohoto genu. Podobný trend byl zaznamenán i v případě *AtFRO2*, jehož produkt redukuje železo, které se poté pomocí IRT transportérů dostává do buněk (Robinson et al., 1999). Je ovšem zajímavé, že při detekci proteinu *AtIRT1* bylo jeho množství v rostlinách ošetřených kombinací s kadmii sníženo. Lze tedy předpokládat, že i když dochází k výrazné expresi tohoto genu v rostlinách vystavených kadmii, je zabráněno jeho přepisu do proteinu. Nejmenší množství proteinu *AtIRT1* bylo pozorováno v rostlinách ošetřených PI-55 s kadmii, čímž se pravděpodobně brání dalšímu příjmu kadmia. Z rostlin pod vlivem kadmia bylo největší množství tohoto proteinu zaznamenáno v kombinaci s BA, což odpovídalo i vzhledu těchto rostlin, které nesly nejmarkantnější znaky vyvolané kadmii. K vizuálnímu rozdílu mezi těmito rostlinami (PI-55 + Cd a BA + Cd) může vést také exprese nějakého neprozkoumaného transportéru nebo fakt, že u rostlin s PI-55 dochází k prodlužování kořenů, a tím rostliny přijímají více živin, což jim pomáhá při současném stresu kadmii. BA jako cytokinin právě naopak růst kořenů inhibuje, což vede, stejně jako při stresu kadmii, ke zkracování kořenů. Největší množství proteinu *AtIRT1* bylo v rostlinách s BA, čemuž odpovídala i zvýšená exprese genu *AtIRT1*. Z toho lze odvodit, že v případě těchto rostlin k zablokování přepisu

nedochází. Podle autorů Séguéla et al. (2008) však v přítomnosti BA dochází k poklesu exprese genu *AtIRT1* a následně i vznikajícího proteinu. Zde se naše výsledky rozcházejí, což je způsobeno hlavně tím, že autoři analyzovali rostliny staré maximálně 9 dní.

Dále bylo v rostlinách stanoveno množství flavonoidů. Cytokinin benzylaminopurin a antagonist PI-55 způsobil v kořenech zvýšení množství flavonoidů oproti kontrole a v případě BA byl pozorován nárůst i v nadzemních částech. V celé rostlině způsobila přítomnost kadmia snížení množství flavonoidů jak vůči kontrole, tak i vůči variantám bez kadmia. Tyto výsledky tak potvrzují to, co už zjistila i autorka Halířová (2011) ve své bakalářské práci. Během tří denního stresu kadmíem také postupně docházelo k poklesu flavonoidů. Z výsledků je patrné, že kadmium má na množství flavonoidů negativní vliv.

U rostlin byl také sledován vliv látky PI-55, včetně kombinací s a bez kadmia, na růst plochy listů během prvních čtyř dnů po přenosu do 24-jamkových desek s ½ MS médiem a fytagelem. Největší listovou plochu vykazovaly rostliny ošetřené látkou PI-55 v 1 a 10nM koncentraci. Již dříve bylo prokázáno, že PI-55 podporuje prodlužování kořenů (Spíchal et al., 2009). To může být důvodem pro zvětšení plochy listů, jelikož rostliny s PI-55 svým rozsáhlejším kořenovým systémem získávají více živin pro celkový růst. Nejvyšší použitá koncentrace PI-55 (100nM) se však ukázala jako příliš vysoká, jelikož na velikost plochy listů působila negativně. Toto může být způsobeno i agonistickou aktivitou PI-55 na receptorech. Autoři Gemrotová et al. (2013) ukázali, že k prodlužování kořenů rostlin ošetřených PI-55 dochází i v přítomnosti kadmia, přičemž je známo, že kadmium má negativní vliv na růst kořenů i nadzemních částí rostlin (Barceló et al., 1988). V této práci byly také v přítomnosti kadmia pozorovány menší plochy listů, ale v kombinaci s PI-55 byly listové plochy větší než u kontrolních rostlin. PI-55 tedy opravdu zvyšuje odolnost rostlin i proti stresu kadmíem.

Dále byla pozorována jak exprese genu *AtACS8*, jehož produkt se účastní tvorby etylenu, tak i hormonu etylenu samotného. Rostliny v přítomnosti kadmia vyprodukovaly značné množství etylenu, což bylo potvrzeno i zvýšenou expresí genu *AtACS8*. Největší vzrůst hladiny *AtACS8* byl zaznamenán během prvních tří dnů expozice kadmíem, což poukazuje na velmi rychlou reakci rostlin vůči stresu. V případě testovaných látek došlo k největší produkci etylenu rostlinami pod vlivem BA s kadmíem a nejmenší produkce byla zaznamenána u rostlin s BA, PI-55, PI-55 s kadmíem a kontrolních, čemuž odpovídala i exprese genu *AtACS8*.

Vyvstává otázka, zda rostliny ošetřené PI-55 v přítomnosti kadmia opravdu přijímají tolik kadmia jako rostliny, které ošetřeny nejsou. Jsou opravdu schopny odolávat kadmíu jen díky většímu kořenovému systému a snížené percepci cytokininů nebo v těchto rostlinách existují další mechanismy, které vstupu kadmia buď zabraňují (viz velmi nízké množství proteinu *AtIRT1*), nebo ho nějakým způsobem transportují tam, kde

není tolik škodlivé? Proto by bylo vhodné změřit například pomocí ICP-MS množství kadmia v rostlinách s PI-55 a bez něj. Předběžné výsledky z těchto měření (Gemrotová, nepublikovaná data) ukazují, že rostliny ošetřené antagonistou v 10nM koncentraci mají stejné množství kadmia jako rostliny pouze stresované, přičemž oproti nim vykazují větší biomasu. Látka PI-55 by se tak skutečně mohla využívat pro fytoremediaci.

8. Závěr

Znečištění prostředí těžkými kovy je celosvětový problém, neboť se tyto kovy uvolňují běžnými činnostmi, jako jsou například spalování uhlí, zemního plynu, ropy a jiných odpadních materiálů. Zatímco nízké koncentrace Cu, Fe, Ni, Zn jsou pro rostliny esenciální, jiné kovy včetně kadmia jsou pro rostliny velmi toxické. Kadmium má negativní účinek na fyziologické a biochemické procesy v rostlinách, čímž narušuje jejich růst a vývoj. Pro pochopení mechanismů, které v rostlinách probíhají během reakcí na stres těžkými kovy, je nutné porozumět i metabolismu rostlinných hormonů včetně cytokininů, ale také sledovat transport těchto kovů v rostlinách. Jelikož je kadmium rostlinami snadno přijímáno a transportováno do nadzemních částí, stává se součástí potravního řetězce, čímž může dále ohrožovat zdraví zvířat i lidí. Z životního prostředí je tedy vhodné těžké kovy odstraňovat, a to například pomocí rostlin (fytořemediace). Růstové regulátory, jako například antagonisty cytokininů PI-55 by mohl proces fytořemediace vylepšit, protože pozitivně působí na rostliny i během stresu kadmiiem.

Cílem této práce bylo sledovat expresi genů, jejichž produkty se účastní metabolismu a signalizace cytokininů, transportu kovů a odpovědi na stres v rostlinách *A. thaliana* vystavených kadmii, cytokininu benzylaminopurinu nebo antagonistovi cytokininů PI-55. V případě transportéru AtIRT1, který kromě železa přenáší i kadmium, bylo sledováno také jeho proteinové množství v kořenech. Uvažujeme-li pouze výsledky exprese genů, které v této práci byly sledovány, pak je biosyntéza cytokininů v rostlinách pod vlivem kadmia zvýšena v kořenech a snížena v přízemních růžicích. Ke zvýšené degradaci cytokininů dochází pravděpodobně zejména v kořenech a v případě *AtCKX2* a *AtCKX3* i v nadzemních částech, v kořenech a prýtech jsou také posíleny signální dráhy cytokininů. Transportér AtABCC1 se dle výsledků ukázal být významným při detoxifikaci kadmia v nadzemních částech rostlin, kde hrají důležitou roli také přenašeče AtNRAMP1 a AtNRAMP3. Z výsledků dále vyplývá, že v rostlinách po čtyřtýdenním stresu kadmiiem i v kombinaci s BA nebo PI-55 dochází k potlačení přepisu genu *AtIRT1* do proteinu.

V rámci této práce byl dále sledován vliv kadmia, cytokininu a antagonisty cytokininů na množství flavonoidů, plochy listů a produkci etylenu rostlinami. Bylo zjištěno, že kadmium má na množství flavonoidů negativní vliv. V případě velikosti ploch listů *A. thaliana* byl zaznamenán pozitivní účinek 1 a 10nM PI-55, a to dokonce i v kombinacích s kadmiiem. Podle množství vyprodukovaného etylenu rostlinami bylo potvrzeno, že tento hormon hraje důležitou roli i během stresu kadmiiem.

Pro hlubší pochopení mechanismů účinku cytokininů a transportu kovů během stresu kadmiiem by bylo vhodné provést detekci dalších proteinů, jejichž geny se ukázaly být v reakci na stres zajímavé. Dále by bylo žádoucí změřit množství cytokininů i jiných hormonů v rostlinách během stresu kadmiiem po aplikaci cytokininového antagonisty a také zjistit množství dalších těžkých kovů a jejich celkovou distribuci v těchto rostlinách. Jestliže by se tento růstový regulátor začal někdy používat v zemědělství, zvýšený obsah některých kovů v rostlině by byl určitě nežádoucí. V případě úspěšných výsledků v dalších studiích by mohla tato látka zvýšit celkovou efektivitu fytoimediačních technologií.

9. Seznam použitých zkratek

ABC	ATP-binding cassette
ACS	1-aminocyklopropan-1-karboxylát syntáza
ADP	Adenosin 5`-difosfát
AHK	Histidinkináza v <i>A. thaliana</i>
AHP	Histidinový protein pro přenos fosfátu v <i>A. thaliana</i>
AMP	Adenosin 5`-monofosfát
APS	Peroxodisíran amonný
APX	Asorbát peroxidáza
ARR	Regulátor odpovědi v <i>A. thaliana</i>
Asp	Kyselina asparagová
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin 5`-trifosfát
BA	Benzylaminopurin (benzyladenin)
BCA	Kyselina bicinchoninová
BOMA	N6-(benzyloxymetyl)adenosin
CAT	Kataláza
CAX	Cation/proton exchanger transporter
CDF	Cation diffusion facilitator
CDK	Cyklin dependentní kináza
CHASE	Cyclase/histidine kinase associated sensing extracellular
CKX	Cytokinin dehydrogenáza
Clath	Clathrin
CPPU	N-(2-chlor-pyridin-4-yl)-N'-fenylurea
cZ	<i>cis</i> -zeatin
dH ₂ O	Destilovaná voda
DMAPP	Dimethylalyl pyrofosfát
DMSO	Dimetylsulfoxid
DPU	N,N-difenylmočovina
DHZ	Dihydrozeatin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Kyselina etylendiamintetraoctová
FAD	Flavin adenin dinukleotid
FRO	Ferric reductase oxidase
Gm	<i>Glycine max</i>

GPX	Guajakol peroxidáza
GR	Glutation reduktáza
HA-8	N ⁶ -(buta-2,3-dienyl)adenin
HK	Histidinkináza
HMA	Heavy metal ATPase
HMBDP	Hydroxymetylbutenyl difosfát
HMW	High molecular weight
HP	Histidinový protein pro přenos fosfátu
HRP	Křenová peroxidáza
INCYDE	2-chlor-6-(3-metoxyfenyl)aminopurin
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
iP	Isopentenyladenin
iPRMP	Isopentenylribosid monofosfát
iPRDP	Isopentenylribosid difosfát
iPRTP	Isopentenylribosid trifosfát
IPT	Isopentenyltransferáza
IRT	Iron regulated transporter
LGR-991	6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin
LMW	Low molecular weight
LOG	Lonely guy
MES	Kyselina 2-(N-morfolino)etan sulfonová
MS	Murashige & Skoog
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
MTP	Metal tolerance protein
NRAMP	Natural resistance associated macrophage protein
<i>oT</i>	<i>ortho</i> -topolin
PE	Polypropylen
PC	Fytochelatin
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCS	Fytochelatin syntáza
PI-55	6-(2-hydroxy-3-metylbenzylamino)purin
qRT-PCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
ROS	Volné kyslíkové radikály
RNA	Ribonukleová kyselina
RR	Regulátor odpovědi
RQ	Relativní hladina exprese
SAG	Senescence associated gene

SDS	Dodecylsulfát sodný
SOD	Superoxid dismutáza
TBS	Tris-buffered saline
TDZ	Thidiazuron
TEMED	Tetrametylendiamin
Tmr	Tumour morfology root
Tris	Tris(hydroxymetyl)aminometan
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZRMP</i>	<i>trans</i> -zeatinribosid monofosfát
UGT	Glukosyltransferáza
ZIP	Zinc-regulated transporter/iron-regulated transporter-related protein

10. Seznam použité literatury

Abdel-Ghany S. E., Muller-Moule P., Niyogi K. K., Pilon M., Shikanai T. (2005): Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* **17**, 1233-1251.

Adriano D. C. (2001): Trace elements in the terrestrial environments. *Springer-Verlag, New York*, 2-5.

Akyiوشي 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, USA* **81**, 5994-5998.

Alatorre-Cobos F., Calderón-Vázquez C., Ibarra-Laclette E., Yong-Villalobos L., Pérez-Torres C. A., Oropeza-Aburto A., Méndez-Bravo A., González-Morales S. I., Gutiérrez-Alanís D., Chacón-López A., Peña-Ocaña B. A., Herrera-Estrella L. (2014): An improved, low-cost, hydroponic system for growing *Arabidopsis* and other plant species under aseptic conditions. *BMC Plant Biology* **14**, 69.

Alvarez S., Marsh E. L., Schroeder S. G., Schachtman D. P. (2008): Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant Cell & Environment* **31**, 325-340.

Anjum N. A., Pereira M. E., Ahmad I., Duarte A. C., Umar S., Khan N. A. (2013): Phytotechnologies: Remediation of environmental contaminants. *Taylor and Francis, CRC Press New York*, 8-42.

Arazi T., Sunkar R., Kaplan B., Fromm H. A. (1999): Tobacco plasma membrane calmodulin binding transporter confers Ni⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant Journal* **20**, 171-182.

Armstrong D. J., Firtel R. A. (1989): Cytokinin oxidase activity in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology* **136**, 491-499.

Arvouet-Grand A., Vennat B., Pourrat A., Legret P. (1994): Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de Pharmacie de Belgique* **49**, 462-468.

Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles E. R., Qian Q., Kitano H., Matsuoka M. (2005): Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* **309**, 741-745.

Assunção A. G. L., Schat H., Aarts M. G. M. (2003): *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **159**, 351- 60.

Åstot C., Doležal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N-H., Sandberg G. (2000): An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 14778-14783.

Barceló J., Vázquez M. D., Poschenrieder Ch. (1988): Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytologist* **108**, 37–49.

Barry G. F., Rogers S. G., Fraley R. T., Brand L. (1984): Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **81**, 4776-4780.

Baryla A., Carrier P., Franck F., Coulomb C., Sahut C., Havaux M. (2001): Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: Causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* **212**, 696-709.

Baxter I., Tchieu J., Sussman M. R., Boutry M., Palmgren M. G., Gribskov M., Harper J. F., Axelsen K. R. (2003): Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* **132**, 618-628.

Baxter I. R., Vitek O., Lahner B., Muthukumar B., Borghi M., Morrissey J., Guerinot M. L., Salt D. E. (2008): The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**, 12081-12086.

- Benavides M. P., Gallego S. M., Tomaro M. L. (2005): Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**, 1-18.
- Bereczky Z., Wang H. Y., Schubert V., Ganai M., Bauer P. (2003): Differential regulation of *nramp* and *irt* metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 24697-24704.
- Bilyeu K. D., Laskey J. G., Morris R. O. (2003): Dynamics of expression and distribution of cytokinin oxidase/dehydrogenase in developing maize kernels. *Plant Growth Regulation* **39**, 195-203.
- Blaylock M. J., Huang J. W. (2000): Phytoextraction of metals. In: Raskin I., Ensley B. D., Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment. *Wiley New York*, 53-69.
- Blaylock M. J., Salt D. E., Dushenkov S., Zakharova O., Gussman C., Kapulnik Y., Ensley B. D., Raskin I. (1997): Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science & Technology* **31**, 860-865.
- Brownlee B. G., Hall R. H., Whitty C. D. (1975): 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* **53**, 37-41.
- Brzobohatý 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**, 1051-1054.
- Bughio N., Yamaguchi H., Nishizawa N. K., Nakanishi H., Mori S. (2002): Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1677-1682.
- Burken J. G. (2003): Uptake and metabolism of organic compounds: Green-liver model. In: McCutcheon S. C., Schnoor J. L., Phytoremediation: Transformation and control of contaminants. *Wiley New York*, 59-84.
- Callender E. (2003): Heavy metals in the environment: Historical trends. *Treatise on Geochemistry* **9**, 67-105.

Cailliatte R., Lapeyre B., Briat J. F., Mari S., Curie C. (2009): The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochemical Journal* **422**, 217-228.

Cailliatte R., Schikora A., Briat J. F., Mari S., Curie C. (2010): High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. *Plant Cell* **22**, 904-917.

Campbell N. A., Reece J. B., Urry L. A., Cain M. L., Wasserman S. A., Minorsky P. V., Jackson R. B. (2008): Biology (8th ed.). *Pearson, Benjamin Cummings San Francisco* 827-830.

Clemens S. (2001): Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**, 475-486.

Clemens S., Palmgren M. G., Krämer U. (2002): A long way ahead: Understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* **7**, 309-314.

Cobbett C. (2000): Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* **123**, 825-832.

Cobbett C. S., Goldsbrouhg P. B. (2000): Mechanism of metal resistance: Phytochelatins and metallothioneins. In: Raskin I., Ensley B. D., Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment. *Wiley New York*, 247-269.

Colangelo E. P., Guerinot M. L. (2006): Put the metal to the petal: Metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 322-330.

Conn S. J., Hocking B., Dayod M., Xu B., Athman A., Henderson S., Aukett L., Conn V., Shearer M. K., Fuentes S., Tyerman S. D., Gilliam M. (2013): Protocol: Optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants. *Plant Methods* **9**, 4.

Český hydrometeorologický ústav (2014): Grafická ročenka 2013. Kapitola IV.6 Těžké kovy.

D'Agostino I. B., Deruere J., Kieber J. J. (2000): Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology* **124**, 1706-1717.

Das P., Samantaray S., Rout G. R. (1997): Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution* **98**, 29-36.

Delhaize E., Kataoka T., Hebb D. M., White R. G., Ryan P. R. (2003): Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* **15**, 1131-1142.

Dortay H., Mehnert N., Bürkle L., Schmölling T., Heyl A. (2006): Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* **273**, 4631–4644.

Dushenkov S., Vasudev D., Kapulnik Y., Gleba D., Fleisher D., Ting K. C., Ensley B. (1997): Removal of uranium from water using terrestrial plants. *Environmental Science & Technology* **31**, 3468-3474.

Dushenkov V., Kumar P., Motto H., Raskin I. (1995): Rhizofiltration - the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science & Technology* **29**, 1239-1245.

Eapen S., D'Souza S. F. (2005): Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances* **23**, 97-114.

Eide D., Broderius M., Fett J., Guerinot M. L. (1996): A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 5624–5628.

Eren E., Argüello J. M. (2004): Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metal transporting P_(IB)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiology* **136**, 3712- 3723.

Favas P. J. C., Pratas J., Varun M., D'Souza R., Paul M. S. (2014): Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: Potential of native flora. In: Soriano M. C. H., Environmental risk assessment of soil contamination. *InTech*, 17.

Ferreira F. J., Kieber J. J. (2005): Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 518–525.

Fodor F. (2002): Physiological responses of vascular plants to heavy metals. In: Prasad M. N. V., Strzalka K., Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. *Kluwer Academic*, 147-177.

Fuhrer J. (1982): Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* **70**, 162–167.

Gaillard S., Jacquet H., Vavasseur A., Leonhardt N., Forestier C. (2008): *AtMRP6/AtABCC6*, an ATP-Binding Cassette transporter gene expressed during early steps of seedling development and up-regulated by cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *MBC Plant Biology* **8**, 22-32.

Gaither L. A., Eide D. J. (2001): Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biomaterials* **14**, 251-270.

Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L. (1996): Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: Evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* **121**, 151-159.

Galuszka P., Frébortová J., Luhová L., Bilyeu K. D., English J. T., Frébort I. (2005): Tissue localization of cytokinin dehydrogenase in maize: possible involvement of quinone species generated from plant phenolics by other enzymatic systems in the catalytic reaction. *Plant and Cell Physiology* **46**, 716-728.

Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortová J., Šebela M., Frébort I. (2008): Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. In: Atta-ur-Rahman, Studies in natural products chemistry. *Elsevier Amsterdam* **34**, 203-264.

Gaudinová A., Dobrev P. I., Šolcová B., Novák O., Strnad M., Friedecký D., Motyka V. (2005): The involvement of cytokinin oxidase/dehydrogenase and zeatin reductase in regulation of cytokinin levels in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**, 188-200.

Gemrotová M., Kulkarni M.G., Stirk W. A., Strnad M., Van Staden J., Spíchal L. (2013): Seedlings of medicinal plants treated either a cytokinin antagonist (PI-55) or an inhibitor of cytokinin degradation (INCYDE) are protected against the negative effects of cadmium. *Plant Growth Regulation* **71**, 137-145.

Ghosh M., Singh S. P. (2005): A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecological and Environmental Research* **3**, 1-18.

Gill S. S., Khan N. A., Tuteja N. (2011): Differential cadmium stress tolerance in five Indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars: An evaluation of the role of antioxidant machinery. *Plant Signaling and Behaviour* **6**, 293-300.

Gill S. S., Tujeta N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909-930.

Gorinova N., Nedkovska M., Todorovska E., Simova-Stoilova L., Stoyanova Z., Georgieva K., Demirevska-Kepova K., Atanassov A., Herzig R. (2007): Improved phytoaccumulation of cadmium by genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity. *Environmental Pollution* **145**, 161-170.

Gouia H., Ghorbal M. H., Meyer Ch. (2000): Effect of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 629-638.

Gratao P. L., Polle A., Lea P. J., Azevedo R. A. (2005): Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* **32**, 481-94.

Grill E., Löffler S., Winnacker E. L., Zenk M. H. (1989): Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Biochemistry* **86**, 6838-6842.

Grotz N., Fox T., Connolly E., Park W., Guerinot M. L., Eide D. (1998): Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 7220-7224.

Grúz J., Spíchal L. (2011): Application of purine derivative LGR-1814 improves functional properties of field-grown lettuce (*Lactuca sativa*). International PSE Symposium on Phytochemicals in Nutrition and Health, Giovinazzo, Bari, Italy, 30.

Guerinot M. L. (2000): The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 190-198.

Halířová B. (2011): Vliv analogů cytokininů na růst *Arabidopsis thaliana* v abiotickém stresu. Bakalářská práce (Bc.), Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta 40-42.

Hall J. L. (2002): Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1-11.

Hasanuzzaman M., Hossain M. A., Fujita M. (2012): Exogenous selenium pretreatment protects rapeseed seedlings from cadmium induced oxidative stress by up-regulating the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Biological Trace Element Research* **149**, 248-261.

Havlová M., Dobrev P. I., Motyka V., Štorchová H., Libus J., Dobrá J., Malbeck J., Gaudinová A., Vaňková R. (2008): The role of cytokinins in responses to water deficit in tobacco plants overexpressing trans-zeatin O-glucosyltransferase gene under 35S or SAG12 promoters. *Plant, Cell & Environment* **31**, 341–353.

Hecht S. M., Bock R. M., Schmitz R. Y., Skoog F., Leonard N. J. (1971): Cytokinins: Development of a potent antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **68**, 2608–2610.

Heckathorn S. A., Mueller J. K., La Guidice S., Zhu B., Barrett T., Blair B., Dong Y. (2004): Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany* **91**, 1312-1318.

Hendry G. A. F., Baker A. J. M., Ewart C. F. (1992): Cadmium tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive clones of *Holcus lanatus*. *Acta Botanica Neerlandica* **41**, 271–281.

Heyl A., Schmülling T. (2003): Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 480-488.

Higgins T. J. V., Newbegin E. J., Spencer D., Llewellyn D. J., Craig S. (1988): The sequence of a pea vicilin gene and its expression in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology* **11**, 683–695.

Hirayama T., Kieber J. J., Hirayama N., Kogan M., Guzman P., Nourizadeh S., Alonso J. M., Dailey W. P., Dancis A., Ecker J. R. (1999): Responsive-to-antagonist1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **97**, 383-393.

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**, 75-83.

Hirschi K. D., Korenkov V. D., Wilganowski N. L., Wagner G. J. (2000): Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiology* **124**, 125-133.

Houba-Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M. (1999): Cytokinin oxidase from *Zea mays*: Purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant Journal* **17**, 615-626.

Huang J. W., Chen J. J., Berti W. R., Cunningham S. D. (1997): Phytoremediation of lead-contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science & Technology* **31**, 800-805.

Hussain D., Haydon M. J., Wang Y., Wong E., Sherson S. M., Young J., Camakaris J., Harper J. F., Cobbett C. S. (2004): P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1327-1339.

Hutchison C. E., Kieber J. J. (2002): Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 47-59.

Hutchison C. E., Li J., Argueso C, Gonzalez M., Lee E., Lewis M. W., Maxwell B. B., Perdue T. D., Schaller G. E., Alonso J. M., Ecker J. R., Kieber J. J. (2006): The

Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **18**, 3073– 3087.

Hyunh L., Van Toai T., Streeter J., Banowitz G. (2005): Regulation of flooding tolerance of SAG12:ipt *Arabidopsis* plants by cytokinin. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1397-1407.

Chen C. M. (1997): Cytokinin biosynthesis and interconversions. *Physiologia Plantarum* **101**, 665-673.

Chen X. Wang J., Shi Y., Zhao M. Q., Chi G. Y. (2011): Effects of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard. *Botanical Studies* **52**, 41-46.

Iwamura H. (1994): Cytokinin antagonists: synthesis and biological activity. In: Mok D. W. S., Mok M. C., Cytokinins: Chemistry, activity and function. *CRC Press Boca Raton, Florida*, 43–55.

IARC (1993): Cadmium and cadmium compounds. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humus: Beryllium, cadmium, mercury and exposure in the glass manufacturing industry. *International Agency for Research on Cancer* **58**, 119-237.

Jabeen R., Ahmad A., Iqbal M. (2009): Phytoremediation of heavy metals: Physiological and molecular mechanisms. *Botanical Review* **75**, 339-364.

Järup L. (2003): Hazards of heavy metal contaminaton. *British Medical Bulletin* **68**, 167-182.

Kah M., Levy L., Brown C. (2012): Potential for effects of land contamination on human health. 1. The case of cadmium. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B-Critical Reviews* **15**, 348-363.

Kakimoto T. (2001): Identification of plant biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiology* **42**, 677-685.

Kakimoto T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* **116**, 233-239.

Kakimoto T. (2003): Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 605–627.

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

Kayser A., Wenger K., Keller A., Attinger W., Felix H., Gupta S. K., Schulin R. (2000): Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd and Cu from calcareous soil: The use of NTA and sulfur amendments. *Environmental Science & Technology* **34**, 1778-1783.

Kieber J. J. (2002): Cytokinins. *The Arabidopsis Book* **21**, 1.

Klee H. J., Horsch R. B., Rogers S. G. (1987): *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annual Review of Plant Physiology* **38**, 467-486.

Kobae Y., Uemura T., Sato M. H., Ohnishi M., Mimura T., Nakagawa T., Maeshima M. (2004): Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiology* **45**, 1749-1758.

Köllmer I., Novák O., Strnad M, Schmölling T., Werner T. (2014): Overexpression of the cytosolic cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX7) from *Arabidopsis* causes specific changes in root growth and xylem differentiation. *Plant Journal* **78**, 359-371.

Kopečný D., Briozzo P., Popelková H., Šebela M., Končítíková R., Spíchal L., Nisler J., Madzak C., Frébort I., Laloue M., Houba-Hérin N. (2010): Phenyl- and benzyl- urea cytokinins as competitive inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase: A structural study. *Biochimie* **92**, 1052-1062.

Kopečný D., Šebela M., Briozzo P., Spíchal L., Houba-Hérin N, Masek V., Joly N., Madzak C., Anzenbacher P., Laloue M. (2008): Mechanism-based inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase attack FAD cofactor. *Journal of Molecular Biology* **380**, 886-899.

Korenkov V., Park S., Cheng N. H., Sreevidya C., Lachmansingh J., Morris J., Hirschi K., Wagner G. J. (2007): Enhanced Cd²⁺-selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing *Arabidopsis* cation exchangers. *Planta* **225**, 403-411.

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**, 315-318.

Krämer U. (2005): MTP1 mops up excess zinc in *Arabidopsis* cells. *Trends in Plant Science* **10**, 313–315.

Krämer U. (2010): Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 517- 534.

Krivosheev D. M., Kolyachkina S. V., Mikhailov S. N., Tararov V. I., Vanyushin B. F., Romanova G. A. (2012): N⁶-(benzyloxymethyl)adenosine is a novel anticytokinin, an antagonist of cytokinin receptor CRE1/AHK4 of *Arabidopsis*. *Doklady Biochemistry and Biophysics* **444**, 178-181.

Kučerová P., Macková M., Macek T. (1999): Perspektivy fytořemediace při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí. *Chemické listy* **93**, 19-26.

Kvesitadze G., Khatisashvili G., Sadunishvili T., Ramsden J. J. (2006): The ecological importance of plants for contaminated environments. In: Kvesitadze G. I., Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants: Basis of phytoremediation. *Springer Berlin*, 167-208.

Laloue M., Pethe C. (1982): Dynamics of cytokinin metabolism in tobacco cells. In: Wareing P. F., Plant growth substances. *Academic Press New York*, 185-195.

Lanquar V., Lelievre F., Bolte S., Hames C., Alcon C., Neumann D., Vansuyt G., Curie C., Schroder A., Kramer U., Barbier-Brygoo H., Thomine S. (2005): Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO Journal* **24**, 4041-4051.

- Larsson E. H., Bornman J. F., Asp H. (1999): Influence of UV-B radiation and Cd²⁺ on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. *Journal of Experimental Botany* **49**, 1031-1039.
- Laskey J. G., Patterson P., Bilyeu K., Morris R. O. (2003): Rate enhancement of cytokinin oxidase/dehydrogenase using 2,6-dichloroindophenol as an electron acceptor. *Plant Growth Regulation* **40**, 189-196.
- Le D. T., Nishiyama R., Watanabe Y., Vankova R., Tanaka M., Seki M., Ham L. H., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L. S. P. (2012): Identification and expression analysis of cytokinin metabolic genes in soybean under normal and drought conditions in relation to cytokinin levels. *PLOS ONE* **7**, 1-15.
- Letham D. S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences* **8**, 569-573.
- Lopez-Millan A. F., Ellis D. R., Grusak M. A. (2004): Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology* **54**, 583-596.
- Lösch R. (2004): Plant mitochondrial respiration under the influence of heavy metals. In: Prasad M. N. V., Heavy metal stress in plants: Biomolecules to ecosystem. *Springer Berlin*, 182-200.
- Lyubenova L., Schröder P. (2010): Uptake and effect of heavy metals on the plant detoxification cascade in the presence and absence of organic pollutants. In: Sherameti I., Varma A., Soil heavy metals, soil biology. *Springer Berlin* **9**, 65-85.
- Ma Q. H., Wang X. M., Wang Z. M. (2008): Expression of isopentenyl transferase gene controlled by seed-specific lectin promoter in transgenic tobacco influences seed development. *Journal of Plant Growth Regulation* **27**, 68-76.
- Mähönen A. P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K. M., Kinoshita K., Törmäkangas K., Ikeda Y., Oka A., Kakimoto T., Helariutta Y. (2006): Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science, New York* **311**, 94-98.

Martineau B., Summerfelt K. R., Adams D. F., Deverma J. W. (1995): Production of high solid tomatoes through molecular modification of levels of the plant growth regulator cytokinin. *Bio/Technology* **13**, 250–254.

Maser P., Thomine S., Schroeder J. I., Ward J. M., Hirschi K., Sze H., Talke I. N., Amtmann A., Maathuis F. J., Sanders D., Harper J. F., Tchieu J., Gribskov M., Persans M. W., Salt D. E., Kim S. A., Guerinot M. L. (2001): Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**, 1646-1667.

Mason M. G., Mathews D. E., Agryos D. A., Maxwell B. B., Keber J. J., Alonso J. M., Ecker J. R., Schaller G. E. (2005): Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 3007-3018.

Mehlhorn H. (1990): Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. *Plant, Cell & Environment* **13**, 971–976.

Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H. and Strong M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1329–1334.

Mishra S., Dubey R. S. (2005): Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants. In: Pessaraki M., Handbook of photosynthesis. *Taylor and Francis, CRC Press New York*, 845-863.

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. *Plant Journal* **37**, 128-138.

Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006): Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 16598-16603.

Mok M. C. (1994): Cytokinins and plant development: An overview. In: Mok D. W. S., Mok M. C., Cytokinins: Chemistry, activity and function. *CRC Press Boca Raton, Florida*, 155-156.

- Mok M. C., Mok D. W. S., Armstrong D. J., Shudo K., Tsogai Y., Okamoto T. (1982): Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry* **21**, 1509-1511.
- Mok D. W., Mok M. C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Biology* **52**, 89–118.
- Mohanpuria P., Rana N. K., Yadav S. K. (2007): Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis*. *Environmental Toxicology* **22**, 368-374.
- 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 Communication* **255**, 328-333.
- Nedkovska M., Atanassov A. I. (1998): Metallothionein genes and expression for heavy metal resistance. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* **12**, 11-16.
- Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. (2004): Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1365-1377.
- Nisler J., Zatloukal M., Popa I. Doležal K., Strnad M., Spíchal L. (2010): Cytokinin receptor antagonists derived from 6-benzylaminopurine. *Phytochemistry* **71**, 823-830.
- Nriagu J. O. (1990): Global metal pollution: Poisoning the biosphere? *Environment* **32**, 7-33.
- Nriagu J. O., Pacyna J. M. (1988): Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals. *Nature* **33**, 134-139.
- Park J., Song W. Y., Ko D., Eom Y., Hansen T. H., Schiller M., Lee T. G., Martinoia E., Lee Y. (2012): The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *Plant Journal* **69**, 278-288.
- Patra M., Sharma A. (2000): Mercury toxicity in plants. *Botanical Review* **66**, 379-422.

- Persson B. C., Esberg B., Ólafsen Ó., Björk G. R. (1994): Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie* **76**, 1152-1160.
- Pilon-Smits E., Pilon M. (2002): Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Review in Plant Sciences* **21**, 439-456.
- Prasad M. N. V. (2004): Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystem. *Springer-Verlag Berlin*, 98-100.
- Prasad M. N. V., Freitas H. M. D. (2003): Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* **6**, 285-321.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. (1998): Fyzologie rostlin. *Academia Praha*, 412-430.
- Rascio N., Navari-Izzo F. (2011): Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* **180**, 169-181.
- Rauser W. E. (1999): Structure and function of metal chelators produced by plants: The case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics* **31**, 19-48.
- Rivero R. M., Kojima M., Gepstein A., Sakakibara H., Mittler R., Gepstein S., Blumwald E. (2007): Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**, 19631-19636.
- Robinson N. J., Procter C. M., Connolly E. L., Guerinot M. L. (1999): A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**, 694-697.
- Romanov G. A., Kieber J. J., Schmölling T. (2002): A rapid cytokinin response assay in *Arabidopsis* indicates a role for phospholipase D in cytokinin signalling. *FEBS Lett* **515**, 39-43.
- Saffar A., Najjar M. B. B., Mianabadi M. (2009): Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Sciences* **9**, 44-50.

Sakakibara H. (2006): Cytokinins: Activity, biosynthesis and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431-449.

Salin M. L. (1988): Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplasts. *Physiologia Plantarum* **72**, 681-689.

Salt D. E., Blaylock M., Kumar P. B. A. N., Duschenkov B., Ensley B. D., Chet I., Raskin I. (1995): Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* **13**, 468-475.

Salt D. E., Wagner G. J. (1993): Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport activity. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 12297-12302.

Sanita di Toppi L., Lambardi M., Pazzagli L., Cappugi G., Durante M., Gabbrielli R. (1998): Response to cadmium in carrot *in vitro* plants and cell suspension cultures. *Plant Science* **137**, 119–129.

Satarug S., Garrett S., Sens M., Sens D. (2010): Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental Health Perspectives* **118**, 182-190.

Saxena P., Mishra N. (2010): Remediation of heavy metal contaminated tropical land. In: Sherameti I., Varma A., Soil heavy metals, soil biology. *Springer Dordrecht* **19**, 430-477.

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. *Plant Journal* **55**, 289-300.

Seigneurin-Berny D., Gravot A., Auroy P., Mazard C., Kraut A., Finazzi G., Grunwald D., Rappaport F., Vavasseur A., Joyard J. (2005): HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 2882-2892.

Setia R. C., Navjyot K., Neelam S. Harsh N. (2008): Heavy metal toxicity in plants and phytoremediation. In: Setia R. C., Nayyar H., Setia N., Crop improvement: Strategies and applications. *I. K. International New Delhi*, 206-218.

Shanker A. K., Cervantes C., Loza-Tavera H., Avudainayagam S. (2005): Chromium toxicity in plants. *Environment International* **31**, 739-753.

Sharma P., Dubey R. S. (2007): Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic levels of aluminium. *Plant Cell Reports* **26**, 2027-2038.

Sharma S. S., Dietz K. J. (2008): The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science* **14**, 43-50.

Shikanai T., Muller-Moule P., Munekage Y., Niyogi K. K., Pilon M. (2003): PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* **15**, 1333-1346.

Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* **116**, 241-252.

Skoog F., Schmitz R. Y., Bock R. M., Hecht S. M. (1973): Cytokinin antagonists: Synthesis and physiological effects of 7-substituted 3-methylpyrazolo (4,3-d) pyrimidines. *Phytochemistry* **12**, 25–37.

Skoog F., Schmitz R. Y., Hecht S. M., Frye R. B. (1975): Anticytokinin activity of substituted pyrrolo(2,3-d) pyrimidines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **72**, 3508–3512.

Singh H. P., Batish D. R., Kohli R. K., Arora K. (2007): Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation* **53**, 65-73.

Smigocki A. C., Owens L. D. (1988): Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **85**, 5153–5135.

Sofo A., Vitti A., Nuzzaci M., Tataranni G., Scopa A., Vangronsveld J., Remans T., Falasca G., Altamuram M. M., Degola F., Sanita di Toppi L. (2013): Correlation between

hormonal homeostasis and morphogenic responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings growing in a Cd/Cu/Zn multi-pollution context. *Physiologia Plantarum* **149**: 487-498.

Somashekaraiah B. V., Padmaja K., Prasad A. R. K. (1992): Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiologia Plantarum* **85**, 85-89.

Sondheimer E., Tzou D. S. (1971): The metabolism of hormones during seed germination and dormancy II. The metabolism of 8-14C-zeatin in bean axes. *Plant Physiology* **47**, 516– 520.

Song W. Y., Park J., Mendoza-Cozatl D. G., Suter-Grotemeyer M., Shim D., Hortensteiner S., Geisler M., Weder B., Rea P. A., Rentsch D., Schroeder J. I., Lee Y., Martinoia E. (2010): Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABC-type phytochelatin transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**, 21187-21192.

Spíchal L., Kryštof V., Paprskářová M., Lenobel R., Stýskala J., Binarová P., Cenklová V., De Veylder L., Inzé D., Kontopidis G., Fischer P. M., Schmülling T., Strnad M. (2007): Classical anticytokinins do not interact with cytokinin receptors but inhibit cyclin-dependent kinases. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 14356–14363.

Spíchal L., Werner T., Popa I., Riefler M., Schmülling T., Strnad M. (2009): PI-55 is a purine-derived cytokinin antagonist that blocks cytokinin action via receptor inhibition. *FEBS Journal* **276**, 244–253.

Stock J. B., Ninfa A. J., Stock A. M. (1989): Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiological Reviews* **53**, 450–490.

Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.

Su W., Howell S. H. (1995): The effects of cytokinin and light on hypocotyl elongation in *Arabidopsis* seedlings are independent and additive. *Plant Physiology* **108**, 1423–1430.

Suszcynsky E. M., Shann J. R. (1995): Phytotoxicity and accumulation of mercury subjected to different exposure routes. *Environmental and Toxicological Chemistry* **14**, 61-67.

Tahara S. (2007): A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 1387-1404.

Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405-26410.

Talke I. N., Hanikenne M., Krämer U. (2006): Zinc dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology* **142**, 148-167.

Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Āstot C., Holub J., Fuksová K., Schmülling T., Sandberg G., Strnad M. (2003): Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus canadensis* leaves by LC-ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum* **117**, 579-590.

Tassi E., Pouget J., Petruzzeli G., Barbaferi M. (2008): The effects of exogenous plant growth regulators in the phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere* **71**, 66-73.

Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978): 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545-547.

Thomine S., Lelièvre F., Debarbieux F., Schroeder J. I., Barbier-Brygoo H. (2003): AtNRAMP3, multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant Journal* **34**, 685-695.

Thomine S., Wang R., Ward J. M., Crawford N. M., Schroeder J. I. (2000): Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 4991-4996.

Tlustoš P., Szaková J., Hrubý J., Hartman I., Najmanová J., Nedělník J., Pavlíková D., Batysta M. (2006): Removal of As, Cd, Pb a Zn from contaminated soil by high biomass producing plants. *Plant, Soil and Environment* **52**, 413 - 423

To J. P., Kieber J. J. (2008): Cytokinin signaling: Two-components and more. *Trends in Plant Science* **13**, 85-92.

To J. P. C., Deruère J., Maxwell B. B., Morris V. F., Hutchison C. E., Ferreira F. J., Schaller G. E., Kieber J. J. (2007): Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* **19**, 3901-3914.

Tome F. V., Rodriguez P. B., Lozano J. C. (2008): Elimination of natural uranium and Ra-226 from contaminated waters by rhizofiltration using *Helianthus annuus* L. *Science of the Total Environment* **393**, 351-357.

Tommasini R, Vogt E., Fromenteau M., Hörtensteiner S., Matile P., Amrhein N., Martinoia E. (1998): An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant Journal* **13**, 773-780.

Tran L. S., 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 USA* **51**, 20623–20628.

Tucker M. R., Laux T. (2007): Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends in Cell Biology* **17**, 403-410.

Ul'yanenko L. N., Kruglov S. V., Filipas A. S., Arysheva S. O. (2004): Effects of growth regulators on barley plant development and accumulation of heavy metals and caesium-137. *Agrokhimiya* **12**, 5–22.

van der Lelie, D. (1998): Biological interactions: The role of soil bacteria in the bioremediation of heavy metal-polluted soils. In: Vangrosnveld J., Cunningham D., Metal-contaminated soils: In situ inactivation and phytoremediation. *Springer-Verlag*, 31-50.

van der Zaal B. J., Neuteboom L. W., Pinas J. E., Chardonnens A. N., Schat H., Verkleij J. A., Hooykaas P. J. (1999): Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology* **119**, 1047-1055.

- Vanhoudt N., Vandenhove H., Smeets K., Remans T., Van Mees M., Wannijn J., Vangronsveld J., Cuypers A. (2008): Effects of uranium and phosphate concentrations on oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 987-996.
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H. (2009): Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 364-372.
- Verret F., Gravot A., Auroy P., Leonhardt N., David P., Nussaume L., Vavasseur A., Richaud P. (2004): Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* **576**, 306-312.
- Vreman H. J., Thomas R., Corse J. (1978): Cytokinins in tRNA obtained from *Spinacia oleracea* L. leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiology* **61**, 296-306.
- Wang J., Letham D. S., Cornish E., Stevenson K. R. (1997): Studies of cytokinin action and metabolism using tobacco plants expressing the *ipt* or the *GUS* gene controlled by a chalcone synthase promoter. I. Developmental features of the transgenic plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **24**, 661–672.
- Werner T., Köllmer I., Bartrina y Manns I., Holst K., Schmölling T. (2006): New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology* **8**, 371-381.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmölling T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**, 10487–10492.
- Werner T., Schmölling T. (2009): Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 527–538.
- White P. J., Brown P. H. (2010): Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* **105**, 1073-1080.
- Whitelaw C. A., Le Huquet J. A., Thurman D. A., Tomsett A. B. (1997): The isolation and characterisation of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Molecular Biology* **33**, 503–511.

Woeste K. E., Kieber J. J. (2000): A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* **12**, 443-455.

Wójcik M., Tukiendorf A. (2004): Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* **44**, 71-80.

Wozny A., Schneider J., Gwozdz E. A. (1995): The effects of lead and kinetin on greening barley leaves. *Biologia Plantarum* **37**, 541–552.

Wright D. A., Welbourn P. (2002): Environmental toxicology. *Cambridge University Press*, 23-26.

Yang X. E., Long X. X., Ye H. B., He Z. L., Calvert D. V., Stoffela P. J. (2004): Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). *Plant and Soil* **259**, 181-189.

Yang Z., Chu C. (2011): Towards understanding plant response to heavy metal stress. In: Shanker A., Abiotic stress in plants - mechanisms and adaptations. *InTech*, kapitola 4.

Ye C., Wu S., Kong F., Zhou C., Yang Q., Sun Y. Wang B. (2006): Identification and characterization of an isopentenyltransferase (IPT) gene in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Science* **170**, 542-550.

Young T. E., Giesler-Lee J., Gallie D. R. (2004): Senescence-induced expression of cytokinin reverses pistil abortion during maize flower development. *Plant Journal* **38**, 910-922.

Zatloukal M., Gemrotová M., Doležal K., Havlíček L., Spíchal L., Strnad M. (2008): Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**, 9268-9275.

Zhang P., Wang W. Q., Zhang G. L., Kamínek M., Dobrev P., Xu J., Grissem W. (2010): Senescence-inducible expression of isopentenyl transferase extends leaf life, increases drought stress resistance and alters cytokinin metabolism in cassava. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 653–669.

Zhou Z. S., Guo K., Elbaz A. A., Yang Z. M. (2009): Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa*. *Environmental and Experimental Botany* **65**, 27-34.