



Agronomická
fakulta

Mendelova
univerzita
v Brně



**Vliv mírného teplotního stresu na expresi markerových
genů cytokininů**
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
Mgr. Jan Novák, Ph.D.

Vypracovala:
Adéla Horáková



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Adéla Horáková**
Studijní program: Agrobiologie
Obor: Molekulární biologie a biotechnologie
Konzultant: Ing. Zuzana Medvedřová
Název tématu: **Vliv mírného teplotního stresu na expresi markerových genů cytokininů**
Rozsah práce: 30-40 stran

Zásady pro vypracování:

1. Základem teoretické části práce bude literární přehled metabolismu cytokininů a jejich vliv na růst a vývoj rostlin. Teoretická část bude doplněna o přehled vlivu teplotního stresu na rostliny.
2. V praktické části se studentka seznámí s metodou kultivace semenáčků *Arabidopsis thaliana* in vitro a přípravou rostlinného materiálu pro následnou analýzu qRT-PCR.
3. Hlavní náplní laboratorní práce bude stanovení exprese markerových genů cytokininů u rostlin kultivovaných za standardních teplotních podmínek a podmínek mírného teplotního stresu.
4. Data z qRT-PCR budou doplněny o analýzu transgenních linií exprimujících GFP v závislosti na síle cytokininové signalizace.
5. Součástí práce bude řádné vedení laboratorního deníku, do kterého bude studentka zapisovat veškeré relevantní informace, které se mohly promítnout do konečných výsledků experimentů.



Seznam odborné literatury:

1. SAKAKIBARA, H. – KIBA, T. – KUDO, T. Metabolism and Long-distance Translocation of Cytokinins. [online]. 2010. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7909.2010.00898.x/pdf>.
2. DAVIES, P J. *Plant hormones : biosynthesis, signal transduction, action!*. 3. vyd. Dordrecht: Springer, 2004. 16 s. ISBN 1-4020-2685-4.
3. FRÉBORTOVÁ, J. – GALUSZKA, P. – FRÉBORT, I. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. [online]. 2011. URL: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/62/8/2431.full.pdf+html>.
4. FRANKLIN, K A. – WIGGE, P A. *Temperature and PLant Development*. UK: Wiley Blackwell, 2014. 226 s. ISBN 978-1-1183-0820-2.
5. TAIZ, L. – ZEIGER, E. *Plant physiology*. 5. vyd. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 2010. 782 s. ISBN 978-0-87893-565-9.

Datum zadání bakalářské práce: říjen 2015

Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2017

L. S.

Adéla Horáková

Autorka práce

Mgr. Jan Novák, Ph.D.

Vedoucí práce

prof. RNDr. Břetislav Brzobohatý, CSc.

Vedoucí ústavu

doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.

Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

Vliv mírného teplotního stresu na expresi markerových genů cytokininů

vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

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

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

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu práce Mgr. Janu Novákovi, Ph.D. za jeho vstřícnost, odborné vedení, rady, připomínky a také ochotu a pomoc při psaní mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Ústavu molekulární biologie a radiobiologie za vstřícné jednání a přátelský kolektiv.

ABSTRAKT

Optimální teplota je jednou ze základních podmínek pro správný růst a vývoj rostlin. Jelikož se v současnosti teplota podnebí neustále zvyšuje, je snahou objasnit chování rostlin v odpovědi na zvýšenou teplotu a jiné abiotické stresy. S odpovědí na zvýšenou teplotu je spojováno několik skupin fytohormonů, a to auxiny, gibbereliny, brassinosteroidy a nově také cytokinininy. Vzhledem k tomu, že vliv teploty na modulaci cytokininové signalizace prozatím nebyl popsán, stal se námětem této práce. Analýza transgenních rostlin s cytokininovým reportérem TCSn::GFP odhalila, že zvýšená teplota vede ke zvýšení cytokininové signalizace v kořenové špičce sedmidenních klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana* L. Podrobná analýza exprese genů zapojených do signalizační kaskády cytokininů prokázala, že teplota moduluje expresi některých ARR typu A i B a krátkodobou odpovědí klíčnicích rostlin na zvýšení teploty je represe markerových genů cytokininové odpovědi *ARR5* a *ARR7*.

Klíčová slova: cytokinininy, teplota, cytokininová signalizace, skotomorfogeneze, *Arabidopsis thaliana*

ABSTRACT

Optimal temperature is one of the key environmental factors necessary for regular plant development, growth and production. Since ambient temperature is increasing due to global warming, response of the plants to increased ambient temperature is in the focus of the recent plant research. In this context, phytohormones like auxins, gibberellins, brassinosteroids and newly cytokinins were shown to modulate plant response to increased temperature. Despite of high cytokinin impact on plant development and growth, the effect of the temperature on cytokinin signalling haven't been studied yet. Analysis of cytokinin marker line TCSn::GFP showed that long-time higher temperature treatment increase cytokinin signalling in root tips of model plant *Arabidopsis thaliana*. Detailed RT-qPCR analysis of genes participating in cytokinin signalling showed that temperature modulates expression of both ARR type A and B genes. Moreover, short-time temperature treatment was shown to decrease expression of cytokinin markers *ARR5* and *ARR7* in whole-seedling samples.

Key words: cytokinins, temperature, cytokinin signalling, skotomorphogenesis, *Arabidopsis thaliana*

OBSAH

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | POUŽITÉ ZKRATKY | 9 |
| 2 | ÚVOD | 11 |
| 3 | CÍL PRÁCE | 12 |
| 4 | LITERÁRNÍ PŘEHLED..... | 13 |
| 4.1 | Fytohormony | 13 |
| 4.2 | Cytokininy | 13 |
| 4.2.1 | Biosyntéza cytokininů | 15 |
| 4.2.2 | Inaktivace cytokininů | 16 |
| 4.2.3 | Transport | 17 |
| 4.2.4 | Signální dráha..... | 18 |
| 4.2.5 | Další nekanonické komponenty | 22 |
| 4.3 | Role cytokininů v rostlinách..... | 22 |
| 4.3.1 | Vrcholový apikální meristém..... | 23 |
| 4.3.2 | Kořenový apikální meristém | 23 |
| 4.3.3 | Další role cytokininů | 23 |
| 4.4 | Teplotní stres | 24 |
| 5 | MATERIÁL A METODIKA | 26 |
| 5.1 | Rostlinný materiál a jeho kultivace | 26 |
| 5.2 | Homogenizace rostlinného materiálu a izolace RNA..... | 26 |
| 5.3 | Reverzní transkripce | 27 |
| 5.4 | RT-qPCR | 27 |
| 6 | VÝSLEDKY A DISKUSE | 30 |
| 6.1 | Porovnání vlivu zvýšené teploty a <i>tZ</i> na morfologii klíčnicích rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> | 30 |
| 6.2 | Teplota moduluje cytokininovou signalizaci | 33 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.3 Stanovení relativní hladiny exprese markerových genů cytokininů pomocí RT-qPCR | 35 |
| 7 ZÁVĚR..... | 41 |
| 8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY | 42 |
| 9 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ | 52 |

1 POUŽITÉ ZKRATKY

| | |
|-------|----------------------------------------------------------------|
| ADP | adenosindifosfát |
| AHK | histidinkináza u <i>Arabidopsis</i> |
| AHP | histidinfosfotransferový protein u <i>Arabidopsis</i> |
| AMP | adenosinmonofosfát |
| ATP | adenosintrifosfát |
| APT | adeninfosforibosyltransferáza |
| ARR | regulátory odpovědi u <i>Arabidopsis</i> |
| Asp | aspartát |
| BA | benzyladenin |
| CDK | cyklin-dependentní protein kináza |
| cDNA | komplementární DNA |
| CKX | cytokininoxidáza/dehydrogenáza |
| CPPU | N-fenyl-N'-[2-chloro-4-pyridyl]urea |
| CRF | cytokininové faktory odpovědi (v signální dráze cytokininů) |
| cZ | <i>cis</i> -zeatin |
| DHZ | dihydrozeatin |
| DMAPP | dimethylallyldifosfát |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| ENT | transportéry nukleosidů (Equilibrative Nucleoside Transporter) |
| FAD | flavinadenindinukleotid |
| GFP | zelený fluoreskující protein |

| | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------|
| His | histidin |
| HPt | histidinfosfotransferový protein |
| iP | isopentenyladenin |
| IPT | isopentenyltransferáza |
| iPR | isopentenylribosid |
| KMD | KISS ME DEADLY |
| LOG | fosforibohydroláza (LONELY GUY) |
| MEP | methylerythritolfosfátová dráha |
| MVA | mevalonátová dráha |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PIF | fytochrom interagující faktor |
| PIN | auxinové effluxové přenašeče |
| PUP | purinovápermeáza |
| RNA | kyselina ribonukleová |
| RT-qPCR | kvantitativní RT-PCR |
| RTP | primery pro reverzní transkripci |
| SAM | vrcholový apikální meristém |
| SCF | S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1/Cullin/F-box,E3 ubiquitin ligázový komplex |
| TCSn | Two Component Signaling Sensor, transgenická linie <i>Arabidopsis</i> |
| UBQ10 | ubikvitin 10 (referenční gen) |
| UPL | universal probe library (sondy) |

2 ÚVOD

Teplota je jedním z klíčových faktorů ovlivňujících vývoj a růst rostlin. I malé změny v teplotách mohou mít zásadní vliv na životní procesy, od klíčení až po kvetení. Jedním z aktuálních témat jsou klimatické změny působící na ekosystémy a biodiverzitu. I nepatrné zvyšování teploty může mít na rostliny negativní dopad, jako například zvýšenou spotřebu vody. Pochopení, jak rostlina reguluje adaptaci k teplotním změnám, může přinést nové možnosti pro zemědělství (Franklin a Wigge, 2014).

Tyto adaptivní strategie rostliny jsou regulovány mnoha faktory, zejména fytohormony. Fytohormony nejsou zapojeny pouze v odpovědi na změny podmínek, ale účastní se všech životních procesů v rostlině. Nejvýznamnější z nich jsou auxiny, cytokininy, gibbereliny a kyselina abscisová.

Tato bakalářská práce se zabývá cytokininy. Cytokininy byly objeveny v 50. letech 20. století právě díky jejich schopnosti podporovat buněčné dělení a dle toho také nazvány. Mezi další efekty cytokininů patří také oddálení senescence, podílí se na tvorbě vrcholového apikálního meristému nebo na transportu a příjmu živin. Dále se účastní regulace diferenciací chloroplastů či zvýšení odolnosti vůči suchu. V současné době se rovněž prokázalo, že tato skupina hormonů hraje významnou roli v modulaci odpovědi rostliny ke zvýšené teplotě, ale vliv teploty na hladiny cytokininů a jejich signalizací je zatím nejasný.

3 CÍL PRÁCE

Jelikož dodnes není známo, jak zvýšená teplota ovlivňuje biosyntézu cytokininů a jejich signalizaci, stala se tato problematika tématem mé bakalářské práce. Cílem tedy je zpracovat literární přehled o rostlinných hormonech cytokininech, zejména o jejich metabolismu a signalizaci v rostlině. Nedílnou součástí teoretické části tvoří také přehled vlivu teplotního stresu na rostliny. Pro objasnění vlivu teploty na cytokininovou signalizaci jsme se rozhodli analyzovat rostliny exprimující GFP v závislosti na síle cytokininové signalizace pomocí konfokální mikroskopie. Dále byla v praktické části provedena kvantitativní RT-PCR, pomocí které byla stanovena exprese genů ARR za standardních teplotních podmínek (20 °C) a podmínek mírného teplotního stresu (29 °C). ARR (z angl. *Arabidopsis* Response Regulator) typu A mohou být využity jako markerové geny hladiny cytokininů, neboť jsou exprimovány v celém rostlinném těle a jsou transkripčně indukovány v odpovědi na exogenní cytokininy.

4 LITERÁRNÍ PŘEHLED

4.1 Fytohormony

V rostlinách najdeme látky, které regulují vývojové a růstové procesy. Tyto látky obecně nazýváme růstové regulátory. Mezi růstové regulátory patří rostlinné hormony (fytohormony) a další látky s regulační aktivitou. Dříve byly často také děleny na látky inhibující nebo stimulující, ovšem toto rozdělení není vhodné, neboť některé látky mohou v jistých koncentracích inhibovat, v jiné stimulovat (Procházka, 1998). Jedná se především o auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselinu abscisovou a etylen. Také jsou známy další skupiny fytohormonů, jako jsou brassinosteroidy, strigolaktony, polyaminy, kyselina jasmonová, kyselina salicylová, peptidové hormony a oxid dusnatý (Davies, 2004).

Nejdéle známými fytohormony jsou auxiny. Hlavním účinkem auxinů je stimulace prodlužovacího růstu a také stimulace dělení buněk. Dále udržují apikální dominanci a podporují tvorbu adventivních kořenů (Procházka, 1998). Prodlužovací růst nadzemních částí rostlin stimulují také gibereliny. Děje se tak prostřednictvím stimulace přechodu z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu. Naopak kyselina abscisová působí inhibičně na prodlužovací růst. Kyselina abscisová dále urychluje stárnutí a stimuluje buňky opadové zóny na rozhraní řapíku a čepele, a tím urychluje opad listu. Podobně může působit i plynný fytohormon etylen. Jeho nejvýraznějším účinkem je urychlení zrání plodů prostřednictvím aktivace tvorby hydrolytických enzymů, které způsobují degradaci pektinů, celulózy a škrobu (Procházka, 1998).

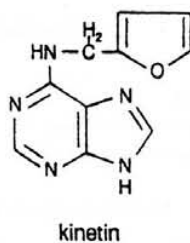
4.2 Cytokininy

Cytokininy jsou fytohormony ovlivňující buněčné dělení, růst, apikální dominanci, příjem živin. Dále se podílejí na vývoji embrya a gametofytu, nebo se také účastní odpovědi na biotický a abiotický stres.

Cytokininy lze podle jejich biologické aktivity definovat jako látky, které stimulují buněčné dělení v přítomnosti auxinu. Strukturně to jsou deriváty adeninu, substituované v poloze N^6 . Po navázání ribózy v poloze N^9 vznikají ribosidy. V případě navázání kyseliny fosforečné v poloze 5 na ribóze dochází ke vzniku ribotidů. Ribosidy i ribotidy

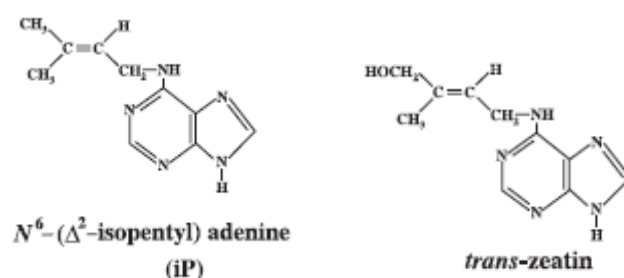
mají sníženou biologickou aktivitu. Nejvyšší aktivitu vykazují cytokininy nacházející se jako volné báze (Procházka et al., 1998).

Jako první byl izolován 6-furfurylaminopurin z autoklávované DNA a nazván kinetin (Miller et al., 1955). Kinetin se v rostlinách přirozeně nenachází, je to vedlejší produkt degradace DNA způsobeným teplotním stresem (Taiz a Zeiger, 2010). O několik let později byla Lethamem izolována látka se stejnou biologickou aktivitou z nezralého endospermu kukuřice (*Zea mays*) a nazvána zeatin. Jelikož postranní řetězec zeatinu obsahuje dvojnou vazbu, nachází se ve dvou konfiguracích: *trans* a *cis*. Ve vyšších rostlinách se nacházejí obě jeho formy (Taiz a Zeiger, 2010).



Obr. 1: Chemická struktura kinetinu (Procházka, 1998)

Nejběžnější cytokininy obsahují isoprenoidní postranní řetězec, podle něhož jsou nazývány isoprenoidní cytokininy (Kieber a Schaller, 2014). Mezi zástupce isoprenoidních cytokininů řadíme isopentenyladenin (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin a dihydrozeatin (Mok a Mok, 2001). Druhou skupinou jsou cytokininy aromatické, mezi které patří *o*- a *m*-topolin, což jsou hydroxylované deriváty benzyladeninu v poloze *ortho*- a *meta*- (Strnad, 1997). Mezi další látky s cytokininovou aktivitou řadíme deriváty močoviny, z nichž některé jsou také vysoce aktivní. Příkladem může být thidiazuron nebo CPPU (N-fenyl-N'-[2-chloro-4-pyridyl]urea) (Mok a Mok, 2001).



Obr. 2: Chemická struktura zástupců isoprenoidních cytokininů isopentenyladeninu a *trans*-zeatinu (Kieber a Schaller, 2014)

4.2.1 Biosyntéza cytokininů

Za biosyntézu cytokininů zodpovídá enzym isopentenyltransferáza. Poprvé byl tento gen *ipt* identifikován u bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a nazván *tmr* gen (z angl. tumour morphology root; Akiyoshi et al., 1984). V genomu *Arabidopsis* se nachází 9 *ipt* genů, a to *AtIPT1* až *AtIPT9*. Fylogenetické analýzy odhalily, že *AtIPT2* (At2g27760) a *AtIPT9* (At5g20040) kódují tRNA-IPT. Zbýlých sedm je blízkce příbuzných s bakteriálními *ipt* geny (Kieber a Schaller, 2014). *AtIPT2* a *AtIPT9* jsou exprimovány ve všech pletivech, ale v proliferujících pletivech vykazují vyšší expresi (Miyawaki et al., 2004). Mezi další enzymy podílející se na biosyntéze patří cytokinin trans-hydroxyláza a cytokinin nukleosid 5'-monofosfátfosforibohydroláza (LOG; Kudo et al., 2010).

Biosyntéza isoprenoidního cytokininu *tZ* může probíhat dvěma způsoby. Enzym isopentenyltransferáza přenáší isopentenylovou skupinu z DMAPP (dimethylallyl difosfát) na ADP (adenosindifosfát) nebo ATP (adenosintrifosfát). Zde DMAPP pochází z methylerythritol fosfátové (MEP) dráhy probíhající v plastidech. Vzniklé iP ribotidy jsou následně hydroxylovány na *trans*-zeatinové ribotidy pomocí CYP735A1 nebo CYP735A2 (Takei et al., 2004). Tyto *trans*-hydroxylázové enzymy jsou kódovány geny *CYP735A1* (At5g38450) a *CYP735A2* (At1g67110; Kieber a Schaller, 2014). Při druhém způsobu prekursor DMAPP pochází z mevalonátové (MVA) dráhy lokalizované v cytosolu, nicméně v *Arabidopsis* většina syntetizovaného *tZ* pochází právě z MEP dráhy (Kasahara et al., 2004). Biosyntéza *cZ* je iniciována tRNA-isopentenyltransferázou, která katalyzuje prenylací tRNA za použití DMAPP (Kudo et al., 2010). Primární produkty syntézy jsou tedy isopentenyladenosin-5'-trifosfát nebo

isopentenyladenosin-5'-difosfát (Zalabák et al., 2013).

Přeměna cytokininů na jejich aktivní volné báze se uskutečňuje buď dvou krokovou dráhou, nebo mohou být přímo přeměny na volné báze pomocí enzymové rodiny LONELY GUY (LOG). LOG kódují enzymy, které se účastní posledního kroku syntézy bioaktivních cytokininů. Tyto enzymy přeměňují neaktivní nukleotid cytokininu na volné báze cytokinin-specifickou fosforibohydrolázovou aktivitou. Jedná se o přeměnu ribosid 5'-monofosfátu na bázi a ribóza-5'-monofosfát (Kurakawa et al., 2007). LOG je specificky zapojen do aktivace cytokininů, neboť hydrolyzuje pouze cytokinin ribosid-5'-monofosfát a nikoli AMP (Kuroha et al., 2009). LOG mediátorové RNA jsou specificky exprimovány v apikálním meristému (Kurakawa et al., 2007). V *Arabidopsis* se nachází devět genů kódujících tyto enzymy (*AtLOG 1* až *AtLOG 9*), nicméně přímá aktivace cytokininů je regulována sedmi z nich (Kuroha et al., 2009). Tyto geny jsou v různých částech rostliny rozdílně exprimovány. Nejčtenější jsou transkripty genů *LOG1* a *LOG8* (Kuroha et al., 2009). Dvoukroková dráha se skládá z defosforylace ribotidů a následné přeměny na volné báze (Kudo et al., 2010).

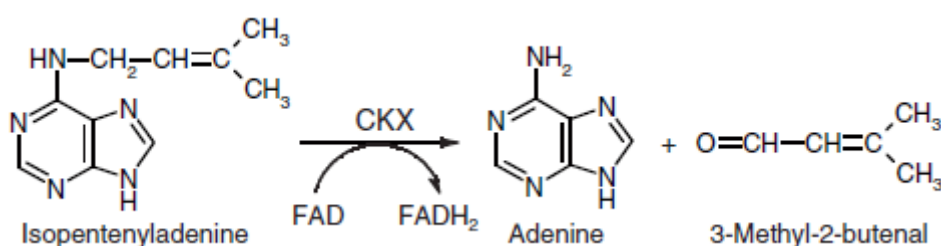
4.2.2 Inaktivace cytokininů

Rostliny mají několik mechanismů, kterými regulují homeostázu cytokininů. Hladina aktivních cytokininů může být snížena degradací nebo konjugací (Frébort et al., 2011). Dalším způsobem může být opačná reakce k reakci katalyzované LOG, tedy konverze aktivních volných bází na neaktivní nukleotidy (Zhang et al., 2013). Klíčovým enzymem v této konverzi je enzym APT1 (z angl. Adenine Phosphoribosyl Transferase 1). Ztráta aktivity APT1 vede k mnoha odpovědím regulovaných cytokininů, jako je například oddálení stárnutí nebo akumulace antokyanů (Zhang et al., 2013).

Cytokininové báze mohou konjugovat s glukózou na pozici N^3 , N^7 a N^9 adeninového kruhu a na hydroxylových skupinách postranního řetězce (Frébort et al., 2011). *N*-glykosylace nastává na dusíku v poloze N^7 nebo N^9 purinového kruhu a je irreverzibilní. *O*-glykosylace může nastat na postranním řetězci zeatinu nebo dihydrozeatinu. Tento děj je vratný, zpět na volné báze se může přeměnit pomocí β -glukosidázy (Brzobohatý et al., 1993). Díky tomuto mechanismu slouží *O*-glykosylované cytokininy jako zásobní formy hormonu. V *Arabidopsis* se nachází 5 genů kódujících tyto glukosyltransferázy, dva kódují proteiny pro *N*-glykosylaci a tři pro *O*-glykosylaci (Kieber a Schaller, 2014). Konjugace

s glukózou znemožňuje cytokininům se navázat na receptory AHK v *Arabidopsis* (Spíchal et al., 2004).

Degradace cytokininů je katalyzována enzymem cytokinin oxidázou/dehydrogenázou (CKX), který nevratně odštěpuje postranní řetězec z polohy N⁶ molekuly adeninu u tZ a iP. Jelikož enzym štěpí nenasycené postranní řetězce, tak u DHZ a BA není toto odštěpení možné (Kieber a Schaller, 2014). Ve všech rostlinných druzích CKX enzymy obsahují kovalentně navázanou molekulu FAD (Frébort et al., 2011). Genom *Arabidopsis* kóduje 7 cytokinin oxidáz, a to *AtCKX1* až *AtCKX7*. Tyto enzymy byly nalezeny i u dalších rostlinných druhů, například u kukuřice bylo charakterizováno 13 *ZmCKX* nebo 11 u rýže. Mohou mít odlišnou regulaci exprese i intracelulární lokalizaci genového produktu (Schmülling et al., 2003; Zalabák et al., 2016). U *Arabidopsis* vykazují nejvyšší enzymatickou aktivitu *AtCKX2* a *AtCKX4*. Všech sedm enzymů působí spíše jako dehydrogenázy než oxidázy, neboť u všech byla zvýšena aktivita při měření s elektronovým akceptorem (Galuszka et al., 2007). Tyto oxidázy/dehydrogenázy irreverzibilně inaktivují cytokinininy (Kieber a Schaller, 2014).



Obr.3: Reakce katalyzovaná enzymem CKX (Schmülling et al., 2003)

4.2.3 Transport

Dříve se myslelo, že cytokinininy jsou syntetizovány v kořenech a dále transportovány xylémem. Dnes je již známo, že cytokinininy jsou syntetizovány i v nadzemních částech rostliny (Kudo et al., 2010). Geny *IPT* a *LOG*, zodpovědné za biosyntézu cytokininů, se exprimují v různých částech *Arabidopsis* (Kieber a Schaller, 2014). Jelikož jsou cytokinininy mobilní hormony, musí vyšší rostliny obsahovat importní a exportní systémy pro transport cytokininů přes plazmatické membrány.

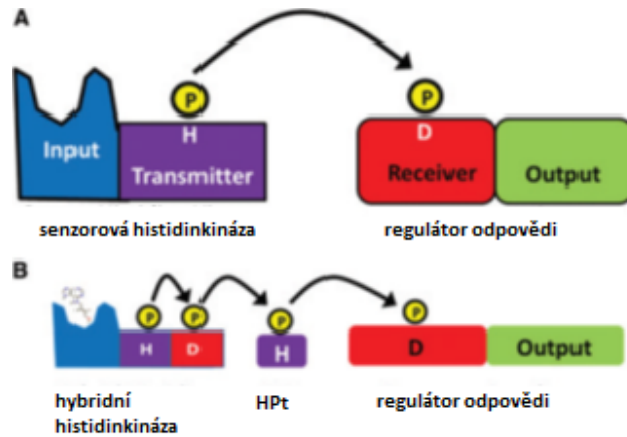
Jako cytokininové přenašeče pracují dvě genové rodiny, a to purinové permeázy PUP

a transportéry nukleosidů ENT (z angl. Equilibrative Nukleoside Transporter). V *Arabidopsis* byla identifikována *AtPUP1* (*Arabidopsis thaliana* purin permeáza 1) a *AtPUP2* (Gillissen et al., 2000). *AtPUP1* přenáší adenin a další nukleobáze. Studiemi s využitím radioaktivně značeného cytokininu bylo dokázáno, že se *AtPUP1* může podílet na transportu cytokininů (Bürkle et al., 2003). *AtPUP1* funguje jako membránový protonový kotransporter, jelikož příjem je závislý na energii a probíhá proti koncentračnímu gradientu. Jeho gen je exprimován ve všech orgánech kromě kořenů, což souvisí se skutečností, že převážná část cytokininů je syntetizována v kořenech a musejí tak být transportovány do nadzemních částí rostliny (Gillissen et al., 2000). Druhým cytokininovým přenašečem je ENT rodina. Tyto přenašeče zprostředkovávají transport cytokininů typu *tZ* (Zhang et al., 2014). V *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno genomovým sekvenováním osm genů ENT (*AtENT1* až *AtENT8*; Li et al., 2003).

Transport cytokininů na dlouhé vzdálenosti se uskutečňuje v xylému, hlavně ve formě *tZ*-ribosidů (Hirose et al., 2007). Pro přenos *tZ* je nezbytný ABCG14 (ATP-binding cassette transporter). ABCG14 zprostředkovává přenos cytokininů syntetizovaných v kořenech do vzrostného vrcholu (Zhang et al., 2014). Floém obsahuje cytokininy typu *iP*, jako jsou *iPR* a *IP*-ribotidy. Jeho funkce zde spočívá ve vedení bazipetálního signálu. Toto rozdělení může být důležité pro rostlinnou buňku v rozpoznání směru signálu zprostředkovaného cytokininu (Hirose et al., 2007).

4.2.4. Signální dráha

Cytokininová signální dráha funguje jako modifikovaný bakteriální dvou-komponentní systém, nicméně s určitými odlišnostmi, jako je například převod signálu do jádra (Keshishian a Rashotte, 2015). Bakteriální dvou-komponentní dráha se skládá ze senzorové histidin-kinázy, která přijímá signál, a regulátoru odpovědi, který často přímo reguluje transkripci cílových genů. Aktivní histidinkináza je dimer, který se obecně *trans*-fosforyluje na konzervovaných histidinových zbytcích. Fosfát je dále přenesen na aspartátový zbytek v přijímačové doméně regulátoru odpovědi (Kieber a Schaller, 2014). Fosforylace vyvolá konformační změny v regulační doméně, které vedou k odpovědi (Stock et al., 2000). U *Arabidopsis thaliana* se cytokininové signální dráhy účastní tři komponenty: hybridní receptorová kináza obsahující histidinkinázovou a přijímačovou doménu, AHP proteiny a regulátory odpovědi ARR typu A, nebo ARR typu B (Schaller et al., 2015).



Obr. 4: Zjednodušené schéma dvoukomponentních fosforylačních systémů, upraveno z Keshishian a Rashotte (2015)

- A) Obecná bakteriální dvoukomponentní dráha, kde je vstupní signál zaznamenán sensorovou histidinkinázou. Histidinový zbytek je fosforylován a fosfát přechází na zbytek kyseliny asparagové v přijímačové doméně regulátoru odpovědi.
- B) Cytokininový vícestupňový fosforylační systém. Vstupní signál je zachycen hybridní sensorovou histidinkinázou obsahující přenašečovou i přijímačovou doménu s His zbytkem i zbytkem Asp, které jsou fosforylovány. Tento fosfát je přenesen na histidinfosfotransferové proteiny a poté na regulátor odpovědi.

4.2.4.1 Cytokininové receptory

Rodina cytokininových receptorů v *Arabidopsis* zahrnuje tři histidinkinázy: AHK2 (At5g35750), AHK3 (At1g27320) a AHK4 (At2g01830), také nazývanou CRE1 nebo WOL1 (Ueguchi et al., 2001). Jedná se o transmembránové proteiny s transmembránovým segmentem, typickou ligand-vázající doménou, konzervovanou histidinkinázovou doménou a přijímačovou doménou (Shi a Rashotte, 2012). Nacházejí se převážně v endoplazmatickém retikulu (Wulfetange et al., 2011). Extracytosolická část obsahuje CHASE doménu, cytosolická část má histidinkinázovou a C-koncovou přijímačovou doménu s vysoce konzervovanými zbytky zodpovědnými za enzymatickou funkci (Kieber a Schaller, 2014). Po navázání cytokininu na CHASE doménu dojde k autofosforylaci na His zbytcích v histidinkinázové doméně a fosforylová skupina je přenesena na Asp zbytek v jeho přijímačové doméně (Osugi a Sakakibara, 2015). CHASE

doména obsahuje 200 až 300 aminokyselinových zbytků a váže nízkomolekulární ligandy (Anantharaman a Aravind, 2001). Tyto receptory vykazují různý stupeň afinity pro různé cytokininy a také mají rozdílnou expresi. Obecně jsou ale nejvíce exprimovány v proliferujících pletivech, jako jsou meristematické oblasti kořene a vzrostného vrcholu, laterální kořenová primordia a mitoticky aktivní oblasti mladých listů (Kieber a Schaller, 2014). AHK2 a AHK3 jsou hlavně exprimovány v nadzemních částech rostliny, zatímco AHK4 je nejhojnější v kořenech (Ueguchi et al., 2001). Z tohoto uspořádání lze určit i funkční roli receptorů, například AHK2 a AHK3 souvisí s regulací senescence listů (Keshishian a Rashotte, 2015). AHK4 je hlavním regulátorem růstu kořene, kde kontroluje buněčnou proliferaci a elongaci (Kieber a Schaller, 2014). Analýza aminokyselinové sekvence ukázala, že sekvence těchto receptorů jsou vysoce homologní (Ueguchi et al., 2001). Každý z receptorů je určen primárně pro jejich funkci, například AHK4 je hlavním regulátorem primárního růstu kořene, AHK3 reguluje cytokininy indukovanou fotomorfogenezi. Nicméně žádná z odpovědí rostliny není regulována pouze jedním receptorem, což potvrzuje funkční překrytí jednotlivých prvků signální dráhy (Kieber a Schaller, 2014).

4.2.4.2 HPt proteiny

Dalšími účastníky signální dráhy jsou HPt proteiny (z angl. Histidin Phosphotransfer Proteins). Jejich funkce spočívá v přenosu fosforylové skupiny z přijímačové domény aktivované histidinkinázy v cytosolu na přijímačovou doménu regulátoru odpovědi v jádře. Genom *Arabidopsis* kóduje 5 HPt proteinů (AHP1 až AHP5), které obsahují konzervované zbytky nezbytné pro jejich aktivitu, a jeden pseudoHPt (AHP6), který neobsahuje His zbytek nezbytný pro fosforylaci (Kieber a Schaller, 2014). Každý z nich obsahuje okolo 150 aminokyselin s velmi podobnými sekvencemi (Suzuki et al., 2000). Fylogenetické analýzy odhalují, že AHP2, AHP3 a AHP5 jsou si blízce příbuzné a také mají podobný expresní profil (Suzuki et al., 2000). AHP6 funguje jako negativní regulátor cytokininové signální dráhy (Mähönen et al., 2006). AHP proteiny si udržují konstantní rozložení mezi jádrem a cytosolem nezávislé na přítomnosti nebo absenci cytokininů (Punwani a Kieber, 2010).

4.2.4.3 Regulátory odpovědi

Regulátory odpovědi jsou proteiny, které fungují jako transkripční faktory aktivované fosforylací, nebo působí jako represory (Kakimoto, 2003). Jsou rozděleny do tří skupin

podle přítomnosti GARP domény na ARR typu A, ARR typu B a ARR typu C (Keshishian a Rashotte, 2015).

Odpověď na úrovni transkripce cílových genů je zprostředkována regulátory odpovědi ARR typu B. V genomu *Arabidopsis* se nachází 11 těchto regulátorů patřících do tří podrodin. Podrodina 1 zahrnuje ARR1, ARR2, ARR10, ARR11, ARR12, ARR14 a ARR18. Do podrodiny 2 patří pouze dva členové, a to ARR13 a ARR21. Třetí podrodina obsahuje také dva členy ARR19 a ARR20 (Kieber a Schaller, 2014). Každý se skládá z přijímačové domény dlouhé okolo 120 aminokyselin a z velké C-koncové extenze, která se může v délce lišit. Přijímačová doména je vysoce konzervovaná a obsahuje Asp zbytek, který je fosforylován (Hosoda et al., 2002). V C-koncové extenzi se nachází také konzervovaná část 60 aminokyselin nazvaná β motiv nebo GARP doména. Tento β motiv je představitelem GARP motivů, díky němuž se regulátor naváže do velkého žlábků cílové DNA a aktivuje tak transkripci příslušného genu (Hosoda et al., 2002). Z analýzy trojnásobných mutantů bylo zjištěno, že ARR1, ARR10 a ARR12 mají nejvýznamnější role v přenosu signálu cytokininů. Mutanti v těchto genech vykazovali menší vzrůst kvůli sníženému buněčnému dělení ve vzrostném vrcholu, pozmeněné koncentrace chlorofylu a antokyanů, nebo také zvýšenou senzitivitu ke světlu (Argyros et al., 2008). ARR typu B mohou tvořit homodimery nebo heterodimery a regulovat tak svou genovou expresi (Veerabagu et al., 2012). Jedním z mechanismů, jak regulovat funkci ARR typu B, je jejich degradace ubikvitin-proteasomovým systémem (Santner a Estelle, 2010).

ARR typu A fungují jako negativní regulátory cytokininové signalizace a jsou transkripčně indukované cytokininy (D'Agostino et al., 2000). Dále postrádají výstupní doménu pro transkripční regulaci (Kieber a Schaller, 2014). V *Arabidopsis* jich existuje deset: ARR3-9 a ARR15-17. Jejich geny jsou uspořádány do pěti párů podle příbuznosti jejich sekvencí (D'Agostino et al., 2000). Transkripce *ARR5-7* a *ARR15* a *ARR16* je indukována cytokininy, zatímco u *ARR4*, *ARR8* a *ARR9* se transkripce razantně nezvyšuje (D'Agostino et al., 2000). Existují dva mechanismy, kterými ARR typu A negativně regulují cytokininovou signalizaci. Jedním z nich je kompetice mezi ARR A a ARR B o fosforylaci AHP proteinů, jelikož typ A i typ B interagují s AHP proteiny (Dortay et al., 2006). Při tomto typu regulace je zpětná inhibice přímo úměrná k množství ARR A v buňce (Dortay et al., 2006). Zvýšení koncentrace ARR A tedy vede ke snížení

fosforylace ARR B, a tím ke snížení transkripčního výstupu ARR B (Kieber a Schaller, 2014). Druhým způsobem regulace mohou být fosfospecifické interakce s regulačními proteiny (To et al., 2007).

ARR typu C se též nechovají jako transkripční faktory a působí jako negativní regulátory CK signalizace, nicméně od ARR typu A se odlišují tím, že jejich exprese není indukovaná cytokininy (Keshishian a Rashotte, 2015). Do této skupiny zařazujeme ARR22 a ARR24 (Kiba et al., 2004).

Dále existuje jeden regulátor nezařazený do žádné z těchto skupin ARR23. Má zkrácenou přijímačovou doménu a nejspíše nepřijímá fosfát (Keshishian a Rashotte, 2015).

4.2.5 Další nekanonické komponenty

V cytokininové signální dráze existují nejen tyto kanonické komponenty, ale i některé další. Jedním z nich jsou proteiny KISS ME DEADLY (KMD), které náleží do rodiny F-boxových proteinů. Jejich funkce spočívá v přímé interakci s ARR typu B a jejich označení pro degradaci (Kim et al., 2013). KMD proteiny tvoří SCF (z angl. S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1/Cullin/F-box) E3 ubiquitin ligázový komplex, který negativně reguluje cytokininovou odpověď kontrolou hladiny ARR B (Kim et al., 2013). Dalšími proteiny spojenými se signální kaskádou jsou CRF proteiny (z angl. Cytokinin-Response Factors). Nejsou přímo součástí fosforylační dráhy, ale fungují jako postranní větve této signalizace a přímo interagují s AHP proteiny (Keshishian a Rashotte, 2015). Tyto proteiny jsou transkripční faktory regulované cytokininy, které se podílejí na kontrole důležitých procesů, podobně jako regulátory odpovědi (Keshishian a Rashotte, 2015).

4.3 Role cytokininů v rostlinách

Cytokininy se účastní v rostlině na mnoha procesech během vývoje a růstu. Ve spolupráci s auxiny jsou nezbytné pro buněčné dělení. Nejvyšší hladiny cytokininů jsou v mitoticky aktivních oblastech, jako jsou kořenové a apikální meristémy (Kieber a Schaller, 2014). Buněčný cyklus je regulován cyklin-dependentními protein kinázami (CDKs) s jejich regulačními podjednotkami cykliny (Taiz a Zeiger, 2010). Cytokininy zvyšují expresi právě genu *CYCD3*, který kóduje cyklin typu D. Aktivují tak buněčné dělení díky indukci *CYCD3* v G1-S fázi buněčného cyklu, a tím indukují přechod z G1

do S fáze (Riou-Khamlichi et al., 1999). V *Arabidopsis* je *CYCD3* exprimován hlavně v apikálním meristému a mladých listových primordiích (Taiz a Zeiger, 2010). Cytokininy hrají roli také v G2/M fázi buněčného cyklu (Lipavská et al., 2011).

4.3.1 Vrcholový apikální meristém

Vrcholový apikální meristém (SAM, z angl. shoot apical meristem) je vysoce specializovaná skupina buněk, z nichž se vyvíjí převážná část rostliny. Cytokininy jsou pozitivní regulátory buněčné proliferace v SAM. KNOTTED-LIKE (KNOX) homeoboxové transkripční faktory, které jsou v SAM exprimované, regulují jeho funkci kontrolou relativní hladiny cytokininů a giberelinů. KNOX proteiny zvyšují hladinu cytokininů a snižují hladinu giberelinů, což je příznivé pro funkci meristému (Kieber a Schaller, 2014). V odpovědi na zvýšení hladiny cytokininů jsou KNOX geny „nadregulovány“ (Rupp et al., 1999). Z toho vyplývá, že zde hraje roli pozitivní zpětná vazba mezi hladinou cytokininů a expresí KNOX genů (Kieber a Schaller, 2014). Homeodoménový transkripční faktor WUSCHEL (WUS) pozitivně reguluje buněčnou proliferaci zvýšením senzitivity na cytokinin represí ARR typu A (Kieber a Schaller, 2014).

4.3.2 Kořenový apikální meristém

Cytokininy jsou nezbytné pro růst apikálního meristému, nicméně naopak v kořenech působí inhibičně na primární růst. Snížení funkce cytokininů vede ke zvětšení a prodloužení kořenů (Werner et al., 2003). Negativně regulují velikost dělicí zóny kontrolou počtu buněčných dělení před diferenciací (Schaller et al., 2014). Cytokininy působí inhibičně také na iniciaci tvorby laterálních kořenů, ale elongaci laterálních kořenů podporují stimulací buněčného cyklu z G₁ do S fáze (Li et al., 2006). Zatímco vývoj vrcholového apikálního meristému je u transgenních rostlin s redukováným obsahem cytokininů zakrnělý, u kořenového apikálního meristému je růst zvýšen. Z tohoto vyplývá, že cytokininy mají opačnou regulační funkci v kořenovém a vrcholovém meristému (Werner et al., 2003).

4.3.3 Další role cytokininů

Mezi další významnou roli cytokininů patří oddálení senescence. Genetické analýzy tří cytokininových receptorů odhalily, že tento efekt závisí zejména na AHK3 (Kieber a Schaller, 2014). Cytokininy s auxiny jsou také základem regeneračních procesů *in vitro*.

Jejich poměr v médiu udává, jakým směrem budou rostliny regenerovat (Procházka, 1998). Cytokininy také souvisí s regulací příjmu živin z prostředí, například dusíku, fosforu nebo síry. Hladina nitrátů dostupných rostlině reguluje endogenní koncentraci cytokininů (Argueso, 2009). Cytokininy hrají určitou úlohu při odpovědi na abiotický stres, jako je teplo, chlad, sucho nebo zasolené prostředí (Kieber a Schaller, 2014). Dále bylo zjištěno, že cytokininy hrají roli v interakcích s patogenem. Aktivace *ipt* genu *Agrobacterium tumefaciens* vede ke zvýšení hladiny endogenního cytokininu a následné hypersenzitivní odpovědi. Při hypersenzitivní odpovědi byla pozorována tvorba lézí ve starších listech, která souvisí s rozsáhlou buněčnou smrtí. Dále také inhibice fotosyntézy, zvýšené hladiny stresových hormonů nebo oxidativní poškození membrán (Novák et al., 2013).

4.4 Teplotní stres

Teplota zasahuje do mnoha životních projevů rostliny, jako je prodlužovací růst, změny v čase kvetení nebo pohyby listů. Teplotní stres přímo ovlivňuje stabilitu membrán, proteinů, RNA a také strukturu cytoskeletu (Franklin a Wigge, 2014). Fenotypovým projevem vysokých teplot může být elongace hypokotylu, řapíku nebo vztyčené listy (Franklin a Wigge, 2014).

Pojem termomorfogeneze obecně označuje řadu morfologických a stavebních změn indukovaných vysokými teplotami, které jsou ještě pod hranicí teplotního stresu (Quint et al., 2016). Při zvýšení teploty dochází u rostlin k anatomickým změnám, jako je elongace hypokotylu, listová hyponastie, nebo i k dřívějšímu nástupu kvetení (přehledový článek Proveniers a Zanten, 2013). Již Gray et al. (1998) dokázali, že teplotně indukovaná elongace hypokotylu je podmíněna auxiny a brassinosteroidy. Tento efekt vysoké teploty je závislý na světle, jelikož při skotomorfogenezi nedochází k teplotně indukované elongaci hypokotylu (Gray et al., 1998). Dnes je již známo, že pro tento proces je nezbytná i aktivita giberelinů (Stavang et al., 2009). Jedním z důležitých transkripčních faktorů zapojených v kontrole termomorfogeneze je PIF4, který v rostlině interaguje s dalšími proteiny a účastní se tak více signálních drah, například giberelinové a auxinové signalizace nebo také světelné signalizace (Koini et al., 2009). PIF4 reguluje hladinu auxinu kontrolou exprese genů zodpovědných za biosyntézu auxinu a SAUR genů, které podporují elongaci za vysoké teploty (Franklin a Wigge, 2014). PIF4 je tedy důležitým

regulátorem auxinové signalizační dráhy, která je zapojena v adaptaci k vysoké teplotě (Koini et al., 2009). PIF4 je také zodpovědný za indukci kvetení v odpovědi na zvýšenou teplotu. Váže se přímo na promotor lokusu FT (z angl. Flowering locus T) za vysoké teploty. Pro brzký nástup kvetení je nezbytná jak abundance PIF4, tak i vysoká teplota, neboť teplota tento transkripční faktor stabilizuje (Kumar et al., 2012). Odpověď k vyšší teplotě zprostředkovaná PIF4 je úzce spjata se světelnou signalizací prostřednictvím jejích klíčových regulátorů DET1 (DE-ETIOLATED1) a COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMOPHOGENESIS 1; Delker et al., 2014). DET1 funguje jako represor fotomorfogeneze. Mutace v tomto genu způsobí fotomorfogenezi i při vývoji za tmy. DET1 přímo ovlivňuje expresi světlem regulovaných genů interakcí s PIF proteiny (Dong et al., 2014). Tyto dva výše zmíněné komponenty světelné signalizační dráhy podporují expresi PIF4, a tím i teplotně indukovaný elongační růst (Gangappa a Kumar, 2017). V regulaci termomorfogeneze je zapojen také transkripční faktor HY5 (Delker et al., 2014). HY5 se váže na promotory genů spojených s elongací, stejně jako PIF4 a mohou tak mít antagonistickou roli v regulaci růstu v odpovědi na environmentální změny. HY5 tedy kontroluje elongaci zprostředkovanou PIF4 díky kompetitivnímu vázání na cílové geny PIF4, nikoliv represí exprese *PIF4* (Gangappa a Kumar, 2017).

V odpovědi na teplotní stres hrají určitou úlohu také cytokinininy. Propojení mezi cytokininovou signalizací a teplotním stresem může být prostřednictvím toku iontů Ca^{2+} . Dále jsou také proteiny cytokininové odpovědi a proteiny odpovědi teplotního stresu lokalizovány v chloroplastech, které by mohly být centrem odpovědi na teplotní stres (Černý et al., 2014). Cytokinininy současně s vysokou teplotou mohou stimulovat biosyntézu auxinu díky zvýšené transkripci genu *CKRC1 a 2* (z angl. Cytokinin Induced Root Curling). Děje se tak prostřednictvím PIF4, který podporuje transkripci těchto genů (Di et al., 2016). Také bylo zjištěno, že vyšší hladina cytokininů zvyšuje biosyntézu proteinů teplotního šoku a proteinů zapojených v odpovědi na teplotní stimul, a pomáhá tak rostlině překonat teplotní stres. Proteomická analýza také odhalila, že se při zvýšené hladině cytokininů zvyšuje výskyt proteinů souvisejících s fotosyntetickým a antioxidačním systémem, jako je superoxiddismutáza nebo ferredoxin-NADP(H)oxidoreduktáza (Skalák et al., 2016).

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Rostlinný materiál a jeho kultivace

Pro sledování vlivu teploty na cytokininovou signalizaci byla vybrána semena transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* TCSn::GFP (z angl. Two Component Signaling Sensor; Zürcher et al., 2013). Tato semena byla povrchově sterilizována 70% ethanolem po dobu 4 minut. Poté byla vysušena na filtračním papíře a vyseta na ½ Murashige a Skoogovo médium s 1% agarem. Médium určené pro rostliny s exogenně zvýšenou hladinou cytokininů obsahovalo 10 μM *trans*-zeatinu rozpuštěného v dimethylsulfoxidu (DMSO). Misky byly oblepeny polopropustnou náplastí Medipor, aby byla zachována sterilita. Rostliny byly kultivovány při 20 °C a 29 °C po dobu 7 dní za režimu dlouhého dne (16 hodin světla/ 8 hodin tma) při světelné intenzitě 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Tyto misky byly vloženy do kultivačních boxů AR361 (Percival Scientific, Inc). Po 7 dnech následovalo fotografování rostlin a analýza konfokální mikroskopií. Intenzita fluorescence byla měřena v programu ImageJ. Získané hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Excel. Celkem byla provedena 3 biologická opakování tohoto experimentu.

Pro stanovení relativní hladiny exprese markerových genů cytokininů byla vybrána semena *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (Col-0). Semena byla povrchově sterilizována 70% ethanolem po dobu 4 minut. Ve sterilním prostředí flowboxu byla vyseta na živné ½ Murashige a Skoogovo médium (Duchefa) s 1% agarem. pH bylo upraveno přidávkem 1M roztoku KOH na hodnotu 5,7 – 5,8. Pro zachování sterility byly Petriho misky oblepeny polopropustnou náplastí Medipor. Tyto misky byly umístěny do kultivačního boxu AR361 (Percival Scientific, Inc) za režimu dlouhého dne (16 hodin světla/ 8 hodin tma) při světelné intenzitě 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a třetí den byly sbírány v časových bodech 2 hod., 4 hod., 8 hod., 12 hod. a 24 hod. po ošetření zvýšenou teplotou.

5.2 Homogenizace rostlinného materiálu a izolace RNA

Rostlinný materiál byl homogenizován za přítomnosti tekutého dusíku na homogenizátoru MM400 (Retsch GmbH). Izolace a purifikace RNA byla provedena s použitím RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Ke vzorkům bylo přidáno 450 μl RLT

pufu s přídatkem β -merkptoethanolu a tyto vzorky byly inkubovány při 56 °C po dobu 3 minut. Lysat byl přenesen do fialových kolon a proběhla centrifugace při 13000 rpm a teplotě 4 °C. K supernatantu bylo přidáno 220 μ l ethanolu, poté byla směs byla nanesena na další kolonu a centrifugována 15 sekund při 14000 rpm. Pro promývání bylo na kolonu přidáno 350 μ l RW1 pufu a centrifugováno 15 sekund při 14000 rpm. Pro odstranění kontaminující DNA byla přidána DNasa I v RDD pufu a ponechána 15 minut při pokojové teplotě. Následně byl přidán RPE pufr na kolonu a proběhla centrifugace 15 sekund při 10000 rpm. Tento krok byl znovu zopakován. Eluce RNA byla provedena přidáním 30 μ l vody zbavené RNas a centrifugací 1 minutu při 10000 rpm.

5.3 Reverzní transkripce

Při reverzní transkripci dochází k přepisu RNA do cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptasy. Do reakční směsi byl napipetován 1 μ g RNA, 3 μ l dNTP a 3 μ l RTP (primery). Reakční směs byla ponechána na cykleru po dobu 10 minut při 70 °C. Následně bylo přidáno 8 μ l RT pufu a 1 μ l reverzní transkriptasy (SuperScript III Reverse transcriptase) a vzorky byly znovu umístěny do cykleru na 55 min při 42 °C. Nakonec proběhla teplotní inaktivace enzymu při 70 °C po dobu 10 min. Výsledný objem směsi činil 40 μ l.

5.4 RT-qPCR

Reakce byla napipetována pomocí pipetovacího stroje Innovadyne NANODROP II. Směs obsahovala 25 μ l cDNA a 115,54 μ l Master Mixu. Složení master mixu je uvedeno v následující tabulce. Pro vizualizaci amplifikované sekvence byly využity UPL sondy (z angl. Universal Probe Library). Jedná se o systém 165 specifických hydrolyzačních sond, které jsou na 5' konci značené fluoresceinem a na 3' konci obsahují zhášeč. Primery byly navrženy v programu ProbeFinder Software (Roche). Pro normalizaci výsledků jsou použity provozní geny elongační faktor 1 (EF-1a), ubikvitin 10 (UBQ10) a aktin 2 (ACT2). Destička byla vložena do termocykleru LightCycler 480 II (Roche) s předem nastaveným programem (viz Tab.3).

Tab.1: Složení reakční směsi Master Mixu

| REAKČNÍ KOMPONENTA | OBJEM (μl) |
|--------------------|------------|
| sonda UPL | 3,08 μl |
| forward primer | 3,08 μl |
| reverse primer | 3,08 μl |
| MM pufr | 77 μl |
| voda | 29,3 μl |

Tab. 2: Sekvence primerů provozních genů, ARR typu A a ARR typu B

| GEN | | FORWARD PRIMER | REVERSE PRIMER | ČÍSLO SONDY |
|---------------|-------|---------------------------|---------------------------|-------------|
| Provozní geny | | | | |
| AT1G07920 | EF-1a | tctctacttgccacttttctacagc | ttacctatgggttagctacttttca | 133 |
| AT4G05320 | UBQ10 | aagatccaggataaggaaggaatc | acgaccatcctccaattggt | 140 |
| AT3G18780 | ACT2 | ccgctctttcttccaagc | ccggtaccattgtcacacac | 30 |
| ARR typu A | | | | |
| AT1G59940 | ARR3 | aggaacaacggaagctga | atcgaggatgtggctgagag | 70 |
| AT1G10470 | ARR4 | gtcatcgagagattgcttctgt | acgccatccaactatctaccg | 4 |
| AT3G48100 | ARR5 | tcagagaacatcttgccctgt | atttcacaggcttcaataagaaatc | 17 |
| AT5G62920 | ARR6 | gaacattttgcctcgtattgatag | cgagagttttaccggcttca | 41 |
| AT1G19050 | ARR7 | tcattctgagaacatcttacctcgt | ctgctagcttcaccggtttc | 6 |
| AT2G41310 | ARR8 | acgttctctgcaagaatctcc | ggtttcaacttggaagatcagc | 17 |
| AT2G40670 | ARR16 | cacaaaaggaatcataaaaagtgg | tggagagagaagacatcgta | 9 |
| ARR typu B | | | | |
| AT3G16857 | ARR1 | gcgcaacttcttaagcaggaa | tggagtatgcgtcaaagtgcg | 147 |
| AT4G31920 | ARR10 | cttcagcgctgccaatc | gttctcctcaacaactccaa | 98 |
| AT1G67710 | ARR11 | ggtcttgaattagacctccctgt | tgttgcaactcccttcatcac | 152 |
| AT2G25180 | ARR12 | ctccacgatgaagcaggaa | aactaaacctccatatcccaaa | 65 |
| AT2G01760 | ARR14 | tgtttctgtggcggttcat | tgtaacgtcacctctctgtctg | 73 |
| AT5G58080 | ARR18 | ccagcatgatgtattcgatga | cactggcaccattccgtta | 63 |

Tab. 3: Program qPCR

| KROK PCR | ČAS | TEPLOTA (°C) |
|----------------------|------------|---------------------|
| počáteční denaturace | 10 min | 95 |
| denaturace | 10 s | 95 |
| nasedání primerů | 30 s | 60 |
| elongace | 1 s | 72 |
| počet cyklů | 45 | |

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Teplota je parametr, který významně ovlivňuje elongační růst rostlin a mnoho dalších procesů (Gray et al., 1998; Franklin a Wigge, 2014). Fytohormony a interakce mezi nimi regulují vývoj a růst rostlin, zejména interakce mezi auxiny a cytokininy. Ukazuje se, že odpověď ke zvýšené teplotě je také významně regulována hormony. Stejně tak teplota ovlivňuje hormony, mění jejich metabolismus a moduluje jejich hladinu (Stavang et al., 2009). Současné práce dokazují, že mimo auxiny, gibereliny a brassinosteroidy, se na regulaci odpovědi k teplotě mohou podílet i cytokininy (Černý et al., 2014; Skalák et al., 2016). Cytokininy významně ovlivňují růstové procesy, neboť se podílí na regulaci buněčného dělení a jsou tedy nezbytné pro správný růst. Není dodnes známo, zda zvýšená teplota ovlivňuje cytokininovou signalizaci, a proto byla sledována odpověď cytokininové signalizace na zvýšenou teplotu. Záměrně byla vybrána pouze vyšší teplota (29 °C), neboť se v současné době při globálním oteplování rostliny musí vypořádat nejen s krátkodobými intervaly extrémních teplot, ale i s dlouhodobě zvýšenou průměrnou teplotou. Navíc vliv teplotního stresu (40 °C) byl již studován (Skalák et al., 2016).

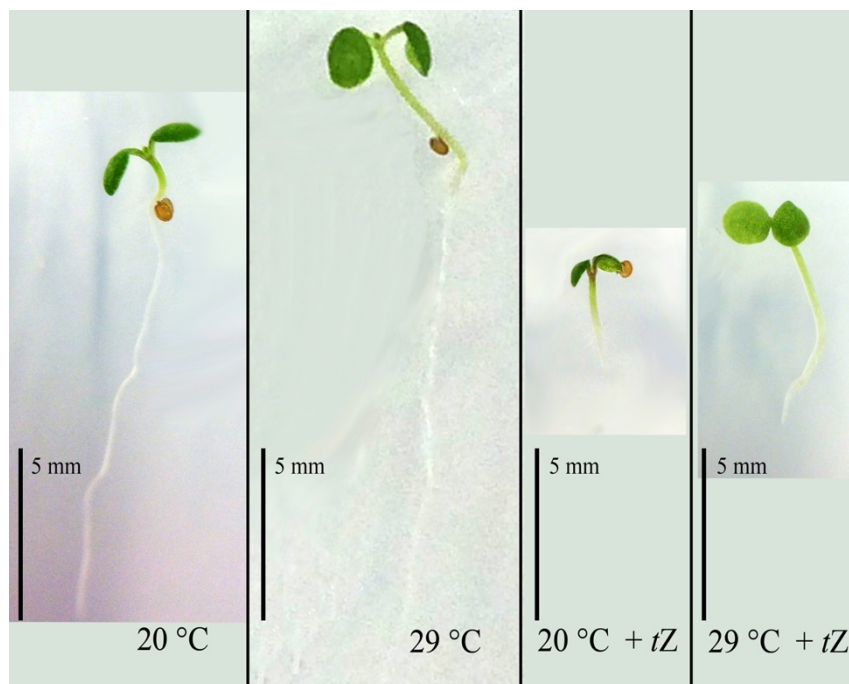
6.1 Porovnání vlivu zvýšené teploty a *tZ* na morfologii klíčnic rostlin *Arabidopsis thaliana*

Sledování vlivu působení zvýšení teploty na morfologii rostlin bylo provedeno na klíčnicích rostlinách modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* L. Analýza morfologie byla provedena na transgenních rostlinách TCSn::GFP (Zürcher et al., 2013). Ty rovněž umožňují sledovat míru cytokininové signalizace, která byla provedena jako následná analýza. Klíčnicí rostliny linie TCSn byly kultivovány 7 dní při 20 °C a 29 °C za snížené intenzity světla ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a to na médiích s nebo bez přídavku 10 μM *tZ* (v DMSO). Koncentrace 10 μM *tZ* byla vybrána jako vysoká hladina, při jejíž aplikaci dochází k významné retardaci růstu hlavního kořene.

Velice nápadnou změnou pozorovanou u klíčnicích rostlin kultivovaných při 29 °C bylo až čtyřnásobné prodloužení embryonálního stonku (dále jen hypokotyl). Tato odpověď patří společně s prodlužováním řapíků k nejnápadnějším změnám způsobených zvýšenou teplotou (Franklin a Wigge, 2014). Tyto morfologické změny jsou v současné době označovány jako termomorfogeneze a jsou do značné míry podobné změnám indukovanými zastíněním nebo kultivací rostlin ve tmě (skotomorfogeneze). Každý

z těchto faktorů vede k indukci dlouhivého růstu ať už u hypokotylů nebo řepíků pravých listů. Elongační růst v důsledku zastínění slouží pro rychlejší dosažení světla v rychle rostoucí populaci (Franklin a Whitelam, 2005). Při skotomorfogenezi je elongační růst důležitý pro dosažení světla (Josse a Halliday, 2008). Při zvýšené teplotě je důvodem elongace lepší ochlazování rostliny díky větší výšce a rozestupu listů (Crawford et al., 2012; Bridge et al., 2013). Podobnost těchto odpovědí je odrazem podobného a částečně sdíleného molekulárního mechanismu regulace těchto odpovědí (Jung et al., 2016). O klíčích rostlinách ve skotomorfogenezi je známo, že při exogenním ošetření cytokininy, je v nich skotomorfogeneze narušena. Cytokininy za tmy mimo jiné inhibují prodlužování hypokotylu (Chory et al., 1994) a právě tento účinek byl pozorován i při působení zvýšené teploty. Přídavek 10 μM *tZ* do růstového média značně inhiboval teplotou indukovaný růst hypokotylu (Obr. 5). Zvýšená hladina cytokininu tedy narušuje teplotou indukovanou termomorfogenezi. Je zajímavé, že podobný projev má i snížení hladiny cytokininu. V práci Černého et al. (2014) bylo prokázáno, že narušená cytokininová signalizace či snížení hladiny cytokininu pomocí ektopicky exprimovaného genu degradace cytokininů *CKX*, vede rovněž ke snížené odpovědi na zvýšenou teplotu. Na základě těchto dat a výsledků zde lze konstatovat, že pro adekvátní odpověď rostliny k teplotě je nutná specifická úroveň cytokininové signalizace a odchýlení směrem k posílení či oslabení cytokininové dráhy vede k inhibici odpovědi ke zvýšené teplotě.

Zatímco auxiny, brassinosteroidy a gibereliny podporují elongaci hypokotylu (Stavang et al., 2009), cytokininy spíše tlumí tuto odpověď k teplotě.



Obr. 5: Fenotyp klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana* kultivovaných při 20 °C, 29 °C a na médiu s *tZ*

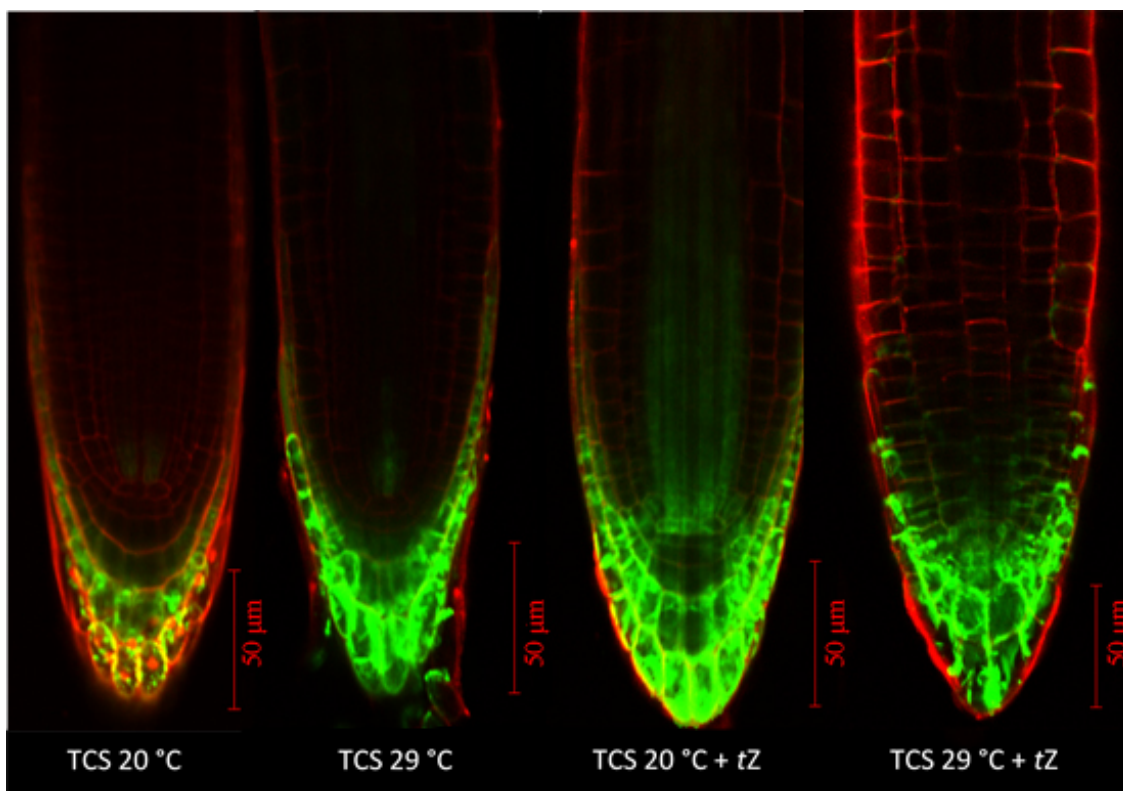
Mezi další účinky cytokininů patří regulace buněčného dělení, oddalování senescence, inhibice růstu hlavního kořene či indukce tvorby ochranných pigmentů (Taiz a Zeiger, 2010). Analýza klíčnicích rostlin odhalila, že některé z efektů cytokininů zůstávají zachovány i za vyšší teploty, ale jiné zachovány nejsou, nebo jsou do značné míry redukovány. Inhibiční působení cytokininů na prodlužovací růst kořene je značný i za zvýšené teploty, což také indikuje, že rostlina je stále citlivá k vysokým dávkám cytokininů. Jak je již známo, cytokininy a auxiny mají antagonistické role ve vývoji kořene. Cytokininy mohou měnit expresi genů auxinových přenašečů PIN, což může ovlivnit distribuci auxinu v kořenovém apikálním meristému (Růžička et al., 2009). Inhibiční efekt cytokininu na elongaci kořene tedy zůstává zachován, ale jinak je tomu u akumulace antokyanů. Antokyaniny jsou fialové pigmenty, které mají fotoprotektivní nebo antioxidační účinky (Gould, 2004) a bylo již před několika dekádami potvrzeno, že aplikace cytokininů vede k jejich zvýšené akumulaci (Deikman a Hammer, 1995). U rostliny kultivované ve vyšší teplotě s *tZ* ovšem nedošlo k akumulaci antokyanů, z čehož je patrné, že teplota brání cytokininy indukované akumulaci antokyanů (viz obr. 5). Tento efekt se zdá být podobný jako u rostlin kultivovaných za nepřítomnosti světla.

Jak již bylo zjištěno, při absenci světla cytokininy také nemají žádný efekt na akumulaci antokyanů (Vandenbussche et al., 2007). Propojení mezi cytokininovou signalizací a světlem spočívá v transkripčním faktoru HY5, který ovlivňuje transkripci světlem indukovaných genů a účastní se transkripční regulace biosyntetických enzymů antokyanů. Cytokininy za tmy mohou stabilizovat HY5 protein a chránit ho před degradací. Stabilizace HY5 vede ke zvýšení exprese genu chalkonsyntázy, která je jedním z biosyntetických enzymů antokyanů (Vandenbussche et al., 2007). Podobnost mezi skotomorfogenezí a termomorfogenezí naznačuje možnost sdílení části regulačních mechanismů, což by mohlo být zajímavým námětem pro další analýzy.

6.2 Teplota moduluje cytokininovou signalizaci

Dřívější práce prokázaly, že odpověď ke zvýšené teplotě je modulována hormony, a naopak teplota reguluje metabolismus a signalizaci hormonů (Stavang et al., 2009). Vzhledem k tomu, že cytokininy dokáží regulovat odpověď k teplotě, bylo snahou ověřit, zda teplota rovněž reguluje cytokininovou signalizaci a metabolismus. Odraz vlivu teploty na cytokininovou signalizaci byl sledován pomocí transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* TCSn::GFP. Tato linie nese uměle vytvořený konstrukt TCS (z angl. Two Component Signaling sensor) složený z promotorové oblasti s opakující se (24 krát) sekvencí 5-(A/G)GAT(C/T)-3 a genu kódujícího zeleně fluoreskující protein GFP (green fluorescent protein). Opakující se sekvence byla získána z promotorových oblastí genů regulovaných cytokininy na základě aktivace pomocí ARR typu B (Zürcher et al., 2013). ARR typu B tedy nasedají na tuto sekvenci a spouští expresi GFP. Hladina GFP tak přímo odráží aktivitu cytokininové signalizace.

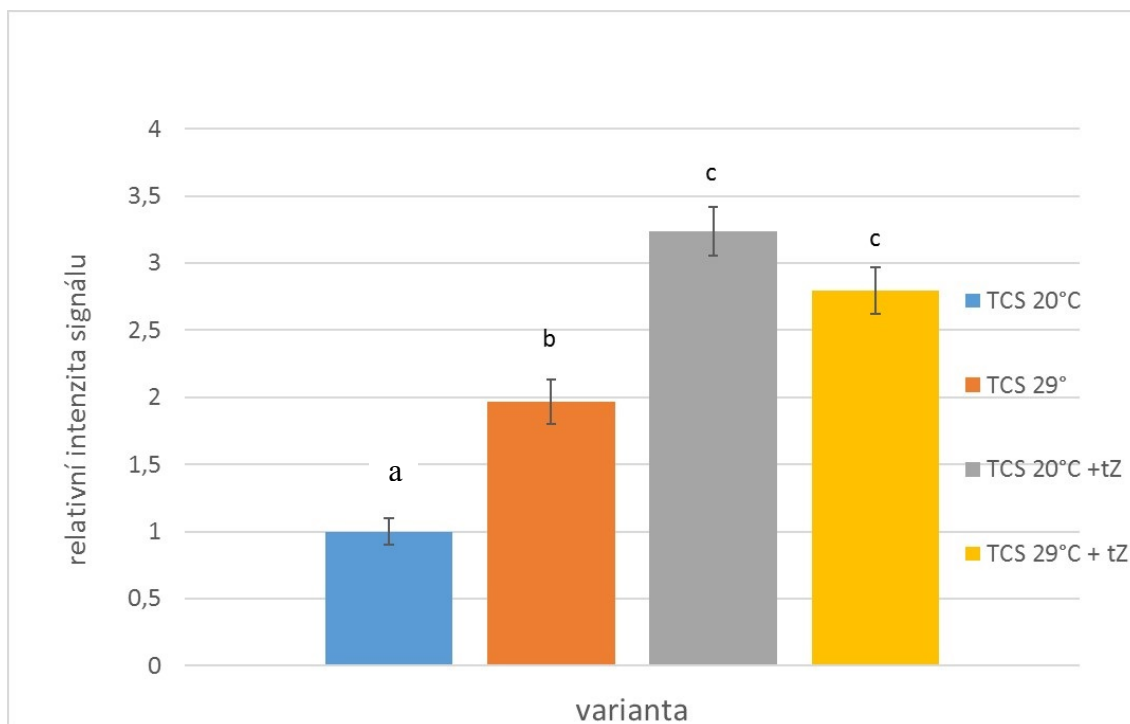
Tyto transgenní rostliny byly po 7 denní kultivaci podrobeny pozorování konfokálním mikroskopem. Nejsilnější signál byl naměřen v kořenových špičkách, proto byla analýza zaměřena právě na tuto oblast. Preparát byl rovněž obarven propidium jodidem, aby byla ověřena intaktnost buněk.



Obr. 6: Fotografie kořenových špiček transgenní linie *Arabidopsis thaliana* TCSn::GFP kultivovaných při 20 °C, 29 °C a na médiu s tZ

Již okometricky bylo zpozorováno, že vyšší intenzitu fluorescence mají kořenové špičky klíčnic rostlin kultivovaných při 29 °C. Analýza tedy potvrdila vliv teploty na cytokininovou signalizaci v oblasti kořenové špičky. Kvantifikace GFP signálu pomocí programu ImageJ ukázala, že klíčnic rostliny kultivované za vyšší teploty vykazovaly v kořenové špičce téměř dvojnásobnou intenzitu signálu GFP. U rostlin nebyl pozorován žádný negativní vliv teploty na porušení buněk. Vzhledem k pozitivnímu účinku teploty na cytokininovou signalizaci bylo v následném experimentu testováno, zda bude mít vysoká dávka cytokininu aplikovaná do média rozdílnou aktivaci cytokininové signalizace. Pro tento experiment byla vybrána 10 µM koncentrace tZ, která vedla k téměř úplné inhibici růstu hlavního kořene u obou teplotních režimů. U obou teplotních variant nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl v míře aktivity cytokininové signalizace. Za předpokladu, že teplotou nebyl ovlivněn transport exogenního cytokininu napříč buňkami kořenové špičky, které jsou v blízkém kontaktu s médiem, lze tvrdit, že zvýšená teplota

již při vysokých hladinách cytokininu nemá na cytokininovou signalizaci další aditivní účinek.



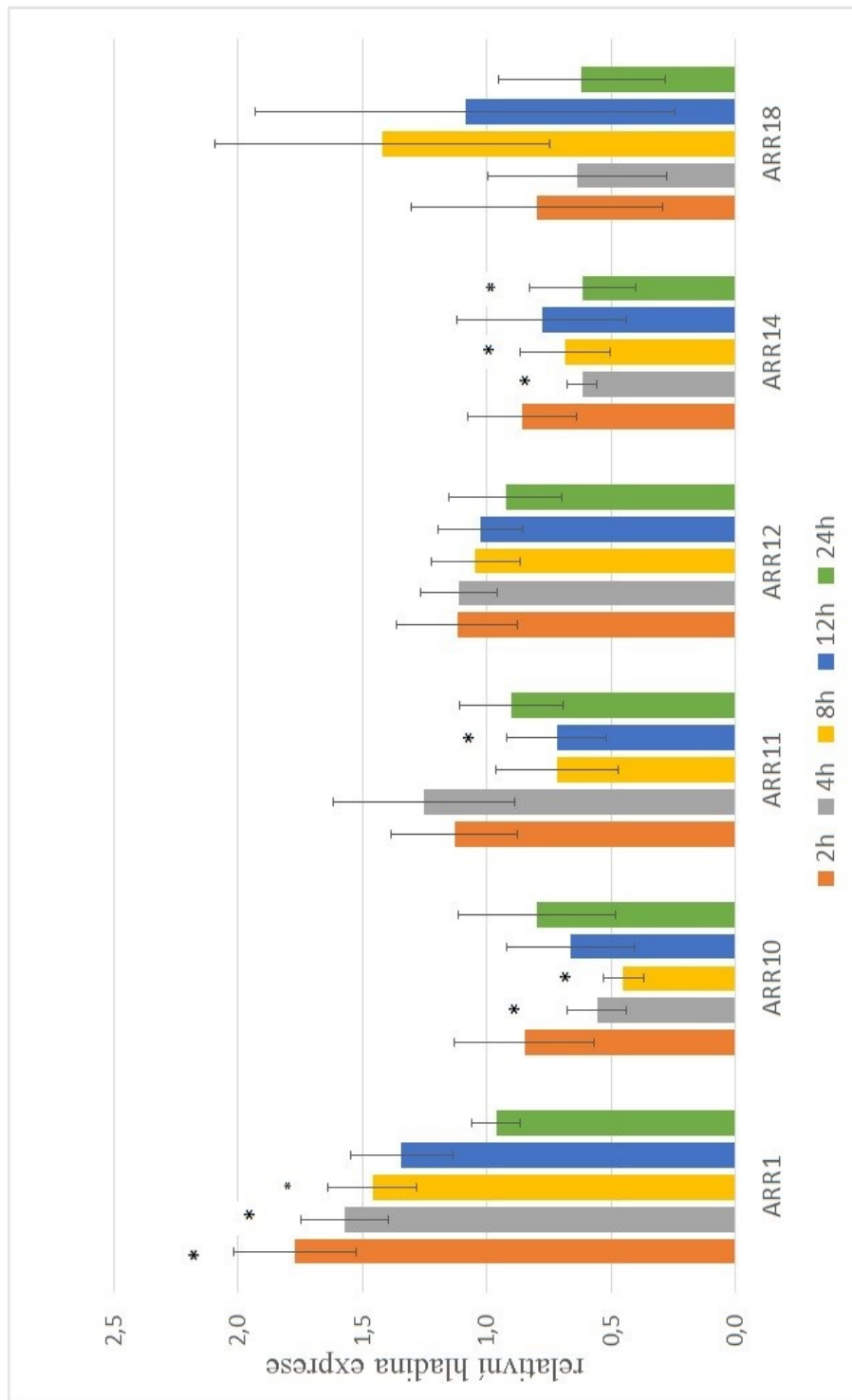
Obr. 7: Intenzity signálu fluorescence GFP. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí ANOVA s post-hoc analýzou provedenou pomocí Scheffova testu.

6.3 Stanovení relativní hladiny exprese markerových genů cytokininů pomocí RT-qPCR

Jelikož bylo dokázáno, že teplota moduluje cytokininovou signalizaci v kořenové špičce, byla následná analýza věnována kinetice změny exprese genů zapojených do cytokininové signalizace. Klíčící rostliny ekotypu Columbia byly kultivovány po dobu 3 dnů při 20 °C a následně přeneseny na zvýšenou teplotu 29 °C. Třetí den byl vybrán na základě předchozích analýz, které ukázaly, že právě třetí den dochází u klíčících rostlin kultivovaných při 29 °C k nejvýraznějšímu prodlužování. Jako markerové geny cytokininové signalizace jsou označovány regulátory odpovědi ARR (*Arabidopsis* response regulators). Produkty těchto genů se účastní regulace odpovědi rostliny na hladinu cytokininů (přehledový článek Keshishian a Rashotte, 2015). ARR typu B jsou

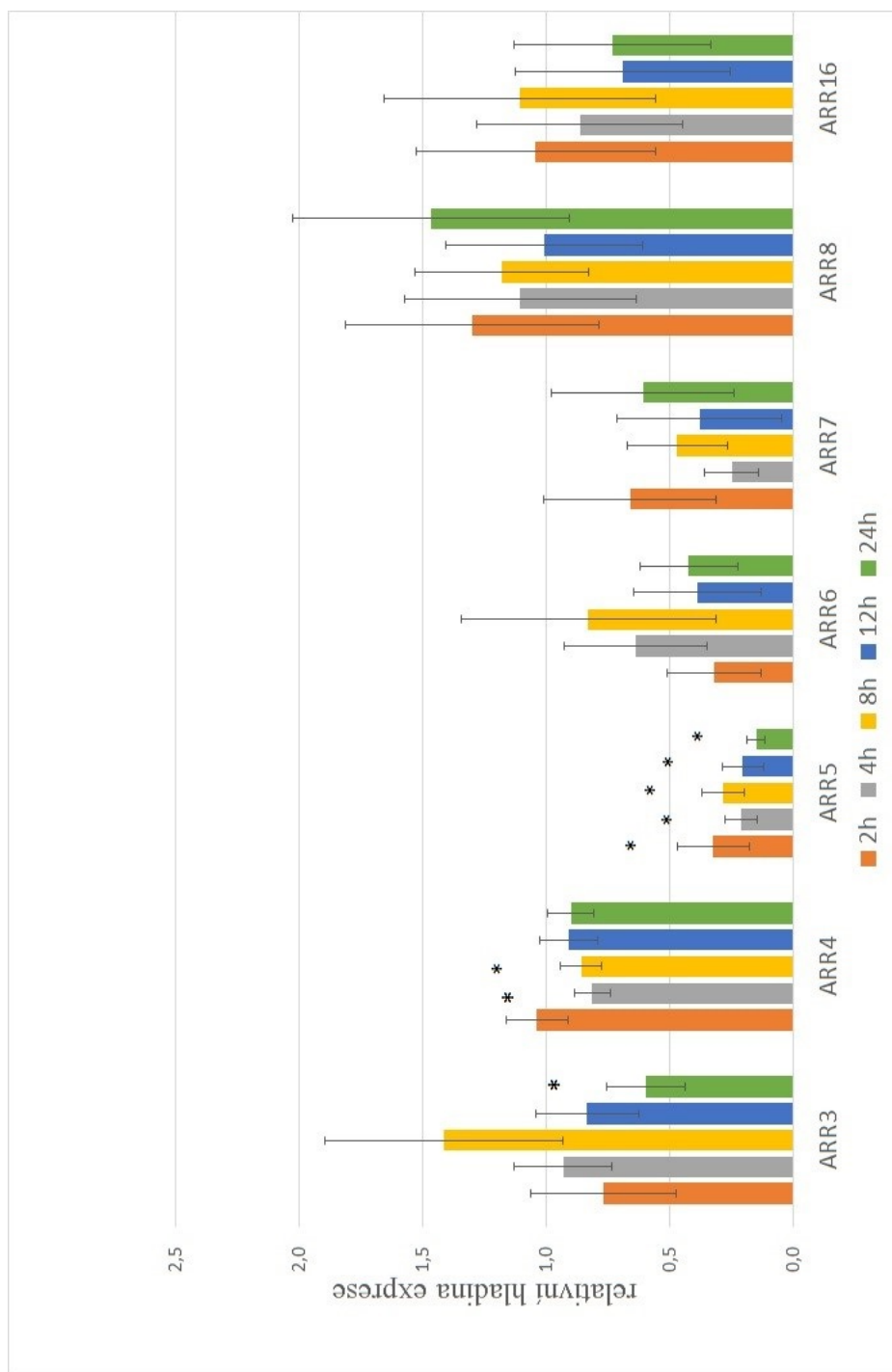
transkripční faktory, které jsou zodpovědné za expresi cytokininu regulovaných genů (Kieber a Schaller, 2014). Dále byla sledována exprese genů ARR typu A, které jsou transkripčně indukovány v odpovědi na cytokininy a staly se tak reportérovými geny pro stanovení cytokininové signalizace.

Hladiny exprese genů byly sledovány po dobu 24 hodin od ošetření zvýšenou teplotou.



Obr. 8: Relativní hladiny exprese genů ARR typu B. Data reprezentují průměrnou hodnotu a směrodatnou odchylku. Hvězdičky označují statisticky signifikantní rozdíl mezi daným ošetřením a kontrolou bez ošetření, hodnoceno na základě Studentova *t*-testu ($P < 0,05$).

Nejvýznamnějšími ARR typu B jsou ARR1, ARR10 a ARR12 (Ishida et al., 2008). Z analýzy trojitých mutantů v těchto genech bylo například zjištěno, že se významně podílí na negativní regulaci odpovědi k suchu prostřednictvím cytokininového fosforylačního systému (Nguyen et al., 2016). Analýza exprese genů odhalila, že u různých transkripčních faktorů působí zvýšená teplota odlišně. Exprese genu *ARR1* dvě hodiny po přenosu do 29 °C prudce vzrostla, nicméně následně postupně klesala. U *ARR10* dochází naopak působením teploty ke snížení exprese. Hladina exprese genu *ARR12* nebyla změněna. Velmi vysoké odchylky v případě ARR18 mohou být způsobeny jeho nízkou abundancí, neboť je exprimován ve velmi malém množství a z toho velkou částí v reprodukčních orgánech (Araport). Analýza exprese ukázala, že zvýšená teplota nepůsobí na různé ARR typu B stejným způsobem. Zatímco u některých dochází k aktivaci, u jiných k inhibici. Aby bylo odhaleno, jaká je změna exprese genů zapojených do cytokininové signální kaskády, byly stanoveny hladiny exprese ARR typu A.



Obr. 9: Relativní hladiny exprese genů ARR typu A. Data reprezentují průměrnou hodnotu a směrodatnou odchylku. Hvězdičky označují statisticky signifikantní rozdíl mezi daným ošetřením a kontrolou bez ošetření, hodnoceno na základě Studentova t-testu ($P < 0,05$).

Jedním z nejvýznamnějších regulátorů odpovědi cytokininové signální dráhy je *ARR4*. Jeho gen je hojně exprimován v hypokotylu klíčící rostliny *Arabidopsis* a po přechodu ke kvetení nejvíce v listové růžici (Araport). *ARR4* přímo interaguje se světelným receptorem *phyB* (z angl. Phytochrome B), který kontroluje délku periody v červeném světle. *phyB* je také zapojen ve vnímání teploty a zastává funkci termosenzoru během noci (Jung et al., 2016). Mutanti postrádající fytochromovou aktivitu mají prodloužené hypokotyly už při 17 °C a jsou již k dalšímu zvyšování teploty necitliví, tudíž jsou fytochromy nezbytné pro termomorfogenezi (Jung et al., 2016). Kontroly cirkadiálního rytmu se účastní také *ARR3*, který má podobnou funkci jako *ARR4* (Salomé et al., 2006). Po stanovení exprese *ARR3* i *ARR4* se ukázalo, že jejich relativní hladiny transkriptů jsou nižší po vystavení teplotě 29 °C. *ARR5* a *ARR7* jsou vhodnými markerovými geny cytokininů, neboť jsou exprimovány ve velkém množství v téměř celém rostlinném těle. Analýza exprese prokázala statisticky signifikantní snížení exprese genu *ARR5*. U *ARR7* byla exprese také snížena, nicméně na hraně statistické signifikance ($P < 0.05$). Velké odchylky u *ARR8* a *ARR16* by mohly být způsobeny opět nízkou abundancí, protože *ARR8* je exprimován v malém množství a *ARR16* spíše až pozdějších vývojových stádiích, zejména v reprodukčních orgánech (Araport).

Celkově výsledky z analýzy exprese genů cytokininové signalizace ukazují, že krátkodobou odpovědí na zvýšení teploty je snížení exprese regulátorů odpovědi. V brzké fázi po přesunu na vyšší teplotu dochází tedy ke snížení exprese cytokininových regulátorů odpovědi *ARR*. Vzhledem k tomu, že zvýšené hladiny cytokininů vedou k oslabení odpovědi k teplotě, může být inhibice cytokininové signalizace předpokladem pro maximální odpověď ke zvýšené teplotě. Nicméně výsledky z dlouhodobé kultivace při zvýšené teplotě získané pomocí analýzy TCS linií ukazují, že tato odpověď může záviset na délce kultivace při zvýšené teplotě či konkrétním pletivu rostliny.

Matematické modely prokázaly, že prodlužovací růst spojený s působením vysokých teplot může mít vliv na ochlazování rostlin (Bridge et al., 2013). Tato práce ukazuje, že cytokinin podobně jako auxiny hrají významnou roli v regulaci odpovědi rostlin na zvýšenou teplotu. Na rozdíl od auxinů se zdá být cytokininová signalizace působením teploty oslabena.

7 ZÁVĚR

Teplota je jedním z abiotických faktorů, který přímo ovlivňuje růst a vývoj rostlin a má dramatický vliv na rostlinnou produkci. Proto je velmi důležité porozumět mechanismům, kterými se rostlina adaptuje na různé teplotní podmínky, a jaké fytohormony jsou v tomto procesu zapojeny. Na rozdíl od teplotního stresu není vliv zvýšené teploty na cytokininovou signalizaci a vliv cytokininů na termomorfogenezi dostatečně prostudován, a to navzdory tomu, že jsou cytokininy významné hormony působící na různé procesy od klíčení až po senescenci rostlin. Tato práce poukazuje na jistou podobnost vlivu působení cytokininů při termomorfogenezi a skotomorfogenezi. U obou těchto procesů je prodlužovací růst inhibován zvýšenou hladinou cytokininů. Cytokininová signalizace je jednak závislá na hladině samotných hormonů a jejich distribuci v rostlinném těle, ale také na systému signalizace. Tato práce poukazuje na dosud neprobádanou problematiku vlivu zvýšené teploty na modulaci cytokininové signalizace. Analýza exprese genů zapojených do fosforylační kaskády cytokininové signalizace odhalila, že teplota moduluje expresi transkripčních faktorů zapojených do cytokininové signalizace, což má ve výsledku negativní vliv na expresi genů primárně odpovídajících na cytokininový signál. Matematické modely prokázaly, že prodlužovací růst spojený s působením vysokých teplot může mít vliv na ochlazování rostlin. Vzhledem k tomu, že zvýšená hladina cytokininů tlumí prodlužování hypokotylu, může být negativní vliv teploty na cytokininovou signalizaci předpokladem pro maximalizaci odpovědi rostliny ke zvýšené teplotě. Nicméně tato hypotéza vyžaduje ještě další experimenty, které by tuto domněnku potvrdily.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory grantu P305/12/2144.

8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

1. AKIYOSHI, D. E., KLEE, H., AMASINO, R. M., NESTER, E. W., GORDON, M. P., 1984: T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(19): 5994–5998. ISSN 0027-8424.
2. ANANTHARAMAN, V., ARAVIND, L., 2001: The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends in Biochemical Sciences.*, 26(10): 579-582. ISSN 09680004.
3. *ARAPORT: Arabidopsis information portal* [online]. ©2016 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <https://apps.araport.org>
4. ARGUESO, C. T., FERREIRA, F. J., KIEBER, J. J., 2009: Environmental perception avenues: The interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell and Environment*, 32(9): 1147-1160. ISSN 1365-3040.
5. ARGYROS, R. D, MATHEWS, M. E., CHIANG Y.-H., PALMER, C. M., THIBAUT, D. M., ETHERIDGE, N., ARGYROS, D. A., MASON, M. G., KIEBER J. J., SCHALLER, G. E., 2008: Type B Response Regulators of *Arabidopsis* Play Key Roles in Cytokinin Signaling and Plant Development. *The Plant Cell online*, 20: 2102-2116. ISSN 1532-298X.
6. BRIDGE, L. J., FRANKLIN, K. A., HOMER, M. E., 2013: Impact of plant shoot architecture on leaf cooling: a coupled heat and mass transfer model. *Journal of The Royal Society Interface*. 10(85), 20130326-20130326. ISSN 1742-5689.
7. 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(5136): 1051-1054. ISSN 1095-9203.
8. BÜRKLE, L., CEDZICH A., DÖPKE, C., STRANSKY, H., OKUMOTO, S., GILLISSEN, B., KUHN, C., FROMMER W. B., 2003: Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 34(1), 13-26. ISSN 09607412.

9. CRAWFORD, A. J., MCLACHLAN, D. J., HETHERINGTON, A. M., FRANKLIN, K. A., 2012: High temperature exposure increases plant cooling capacity. *Current Biology*. 22(10), R396-R397.
10. ČERNÝ, M., JEDELSKÝ, P. L., NOVÁK, J., SCHLOSSER, A., BRZOBOHATÝ, B., 2014: Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*, 37(7): 1641-1655. ISSN 1365-3040.
11. D'AGOSTINO, I. B., DERUÈRE, J., KIEBER, J. J., 2000: Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology*. 124: 1706-1717. ISSN 1532-2548.
12. DAVIES, P. J., 2004: Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!. 3. vyd. Dordrecht: Springer. 16 s. ISBN 1-4020-2685-4.
13. DEIKMAN, J., HAMMER, P. E., 1995: Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 108(1), 47-57.
14. DELKER, C., SONNTAG, L., JAMES, G. V., JANITZA, P., IBANEZ, C., ZIERMAN, H., PETERSON, T., DENK, K., MULL, S., ZIEGLER, J., DAVIS, S. J., SCHNEEBERGER, K., QUINT, M., 2014: The DET1-COP1-HY5 Pathway Constitutes a Multipurpose Signaling Module Regulating Plant Photomorphogenesis and Thermomorphogenesis. *Cell Reports*. 9(6), 1983-1989. ISSN 22111247.
15. DI, D.-W., WU, L., ZHANG, L., AN, C.-W., ZHANG, T.-Z., LUO, P., GAO, H.-H., KRIECHBAUMER, V., GUO, G.-Q., 2016: Functional roles of *Arabidopsis* CKRC2/YUCCA8 gene and the involvement of PIF4 in the regulation of auxin biosynthesis by cytokinin. *Scientific Reports*. 6(1), -. ISSN 2045-2322.
16. DONG, J., TANG, D., GAO, Z., YU, R., LI, K., HE, H., TERZAGHI, W., DENG, X. W., CHEN, H., 2014: *Arabidopsis* DE-ETIOLATED1 Represses Photomorphogenesis by Positively Regulating Phytochrome-Interacting Factors in the Dark. *Cell Reports*. 9(6), 1983-1989. ISSN 22111247.
17. DORTAY, H., MEHNERT, N., BÜRKLE, L., SCHMÜLLING, T., HEYL, A., 2006: Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*. 273(20): 4631-4644. ISSN 1742464x.
18. FRANKLIN, K. A., WIGGE, P. A., 2014: Temperature and Plant

- Development. UK: Wiley Blackwell. 226 s. ISBN 978-1-1183-0820-2.
19. FRANKLIN, K. A., WHITELAM, G. C., 2005: Phytochromes and Shade-avoidance Responses in Plants. *Annals of Botany*. 2005, 96(2), 169-175. ISSN 0305-7364.
 20. FRÉBORT, I., KOWALSKA, M., HLUSKA, T., FRÉBORTOVÁ, J., GALUSZKA, P., 2011: Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8): 2431-2452. ISSN 1460-2431.
 21. GALUSZKA, P., POPELKOVÁ, H., WERNER, A., FRÉBORTOVÁ, J., POSPÍŠILOVÁ, H., MIK, V., KOLLMER, I., SCHMÜLLING, T., FRÉBORT, I., 2007: Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* Expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26(3), 255-267. ISSN 0721-7595.
 22. GANGAPPA, S., N., KUMAR, S. V., 2017: DET1 and HY5 Control PIF4-Mediated Thermosensory Elongation Growth through Distinct Mechanisms. *Cell Reports*. 18(2), 344-351. ISSN 22111247.
 23. GILLISSEN, B., BÜRKLE, L., ANDRE, B., KÜHN, C., RENTSCH, D., BRANDL, B., FROMMER, W. B., 2000: A New Family of High-Affinity Transporters for Adenine, Cytosine, and Purine Derivatives in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 12(2), 291-300. ISSN 10404651.
 24. GOULD, K. S., 2004: Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. (5), 314-320. ISSN 1110-7243.
 25. GRAY, W. M., ÖSTIN, A., SANDBERG, G., ROMANO, C. P., ESTELLE, M., 1998: High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(12), 7197-7202.
 26. HIROSE, N., TAKEI, K., KUROHA, T., KAMADA-NOBUSADA, T., HAYASHI, H., SAKAKIBARA, H., 2007: Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*. 59(1), 75-83. ISSN 0022-0957.
 27. HOSODA, K., IMAMURA, A., KATOH, E., HATTA, T., TACHIKI, M., YAMADA, H., MIZUNO, T., YAMAZAKI T., 2002: Molecular Structure of the

- GARP Family of Plant Myb-Related DNA Binding Motifs of the *Arabidopsis* Response Regulators. *THE PLANT CELL online*. 14(9), 2015-2029. ISSN 10404651.
28. CHORY, J., REINECKE, D., SIM, S., WASHBURN, T., BRENNER, M., 1994: A Role for Cytokinins in De-Etiolation in *Arabidopsis*: det Mutants Have an Altered Response to Cytokinins. *Plant Physiol.* 104(2), 339-347. ISSN 1532-2548.
29. ISHIDA, K., YAMASHINO, T., YOKOYAMA, A., MIZUNO, T., 2008: Three Type-B Response Regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, Play Essential but Redundant Roles in Cytokinin Signal Transduction Throughout the Life Cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology.* 49 (1), 47-57.
30. JOSSE, E.-M., HALLIDAY, K. J., 2008: Skotomorphogenesis: The Dark Side of Light Signalling. *Current Biology.* 18(24), R1144-R1146. ISSN 09609822.
31. JUNG, J.-H., DOMIJAN, M., KLOSE, C., BISWAS, S., EZER, D., GAO, M., KHATTAK, A. K., BOX, M. S., CHAROENSAWAN, V., CORTIJO, S., KUMAR, M., GRANT, A., LOCKE, J. C. W., SCHÄFER, E., JAEGER, K. E., WIGGE, P. A., 2016: Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science.* 354(6314), 886-889. ISSN 0036-8075.
32. KAKIMOTO, T., 2003: Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology.* 54(1), 605-627. ISSN 1543-5008.
33. 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(14), 14049-14054. ISSN 0021-9258.
34. KESHISHIAN, E. A., RASHOTTE, A. M., 2015: Plant cytokinin signalling. *Essays In Biochemistry.* 58, 13-27. ISSN 0071-1365.
35. KIBA, T., AOKI, K., SAKAKIBARA, H., MIZUNO, T., 2004: *Arabidopsis* Response Regulator, ARR22, Ectopic Expression of Which Results in Phenotypes Similar to the *wol* Cytokinin-Receptor Mutant. *Plant and Cell Physiology.* 45(8), 1063-1077. ISSN 1471-9053.
36. KIEBER, J. J., SCHALLER, G. E., 2014: Cytokinins. *The Arabidopsis Book* [online]. 12, e0168- [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1199/tab.0168. ISSN 1543-

8120.

37. KIM, H. J., CHIANG, Y.-H., KIEBER, J. J., SCHALLER, G. E., 2013: SCF^{KMD} controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(24), 10028-10033. ISSN 0027-8424.
38. KOINI, M. A., ALVEY, M., ALLEN, T., TILLEY C. A., HARBERD, N. P., WHITELAM G. C., FRANKLIN, K. A., 2009: High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Current Biology*. 19(5), 408-413. ISSN 09609822.
39. KUDO, T., KIBA, T., SAKAKIBARA, H., 2010: Metabolism and Long-distance Translocation of Cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52(1), 53-60. ISSN 16729072.
40. KUMAR, S. V., LUCYSHYN, D., JAEGER, K. E., ALÓS, E., ALVEY, E., HARBERD, N. P., WIGGE, P. A., 2012: Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*. 484(7393), 242-245. ISSN 0028-0836.
41. KURAKAWA, T., UEDA, N., MAEKAWA, M., KOBAYASHI, K., KOJIMA, M., NAGATO, Y., SAHAKIBARA, H., KYOZUKA, J., 2007: Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 445(7128): 652-655. ISSN 1476-4687.
42. KUROHA, T., TOKUNAGA, H., KOJIMA, M., UEDA, N., ISHIDA, T., NAGAWA, S., FUKUDA, H., SUGIMOTO, K., SAKAKIBARA, H., 2009: Functional Analyses of LONELY GUY Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 21(10), 3152-3169. ISSN 1040-4651.
43. LIPAVSKÁ, H., MAŠKOVÁ, P., VOJVODOVÁ, P., 2011: Regulatory dephosphorylation of CDK at G2/M in plants: yeast mitotic phosphatase cdc25 induces cytokinin-like effects in transgenic tobacco morphogenesis. *Annals of Botany*. 107(7), 1071-1086. ISSN 0305-7364.
44. LI, G., LIU, K., BALDWIN, S. A., WANG, D., 2003: Equilibrative Nucleoside Transporters of *Arabidopsis thaliana*: cDNA CLONING, EXPRESSION PATTERN, AND ANALYSIS OF TRANSPORT ACTIVITIES. *Journal of*

- Biological Chemistry*. 278(37), 35732-35742. ISSN 0021-9258.
45. LI, X., MO, X., SHOU, H., WU, P., 2006: Cytokinin-Mediated Cell Cycling Arrest of Pericycle Founder Cells in Lateral Root Initiation of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. 47(8), 1112-1123. ISSN 0032-0781.
 46. 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*. 311(5757), 94-98. ISSN 0036-8075.
 47. MILLER, C. O., SKOOG, F., OKUMURA, F. S., VON SALTRA, M. H., STRONG, F. M., 1955: Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society*, 77(9): 2662-2663. ISSN 1520-5126.
 48. MIYAWAKI, K., MATSUMOTO-KITANO, M., KAKIMOTO, T., 2004: Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal*. 37(1), 128-138. ISSN 09607412.
 49. MOK, D.WS, MOK, M. C, 2001: Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52(1), 89-118. ISSN 1040-2519.
 50. NGUYEN, K. H., HA, C. H., NISHIYAMA, R., WATANABE, Y., LEYVA-GONZÁLEZ, M. A., FUJITA, Y., TRAN, U. T., LI, W., TANAKA, M., SEKI, M., SCHALLER, G. E., HERRERA-ESTRELLA, L., TRAN, L.-S. P., 2016: *Arabidopsis* type B cytokinin response regulators ARR1, ARR10, and ARR12 negatively regulate plant responses to drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113(11), 3090-3095. ISSN 0027-8424.
 51. NOVÁK, J., PAVLŮ, J., NOVÁK, O., NOŽKOVÁ-HLAVÁČKOVÁ, V., ŠPUNDOVÁ, M., HLAVINKA, J., KOUKALOVÁ, Š., SKALÁK, J., ČERNÝ, M., BRZOBOHATÝ, B., 2013: High cytokinin levels induce a hypersensitive-like response in tobacco. *Annals of Botany*. 112(1), 41-55. ISSN 0305-7364.
 52. OSUGI, A., SAKAKIBARA, H., 2015: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? *BMC Biology*. 13(1), -. ISSN 1741-7007.
 53. PROCHÁZKA, S. a kol., 1999: Fyziologie rostlin. Praha: Academia, 484 s. ISBN

80-200-0586-2

54. PROVENIERS, M. C. G., VAN ZANTEN, M., 2013: High temperature acclimation through PIF4 signaling: a review. *Trends in Plant Science*. 18(2), 59-64. ISSN 13601385.
55. PUNWANI, J. A., KIEBER, J. J., 2010: Localization of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin. *Plant Signaling*. 5(7), 896-898. ISSN 1559-2324.
56. QUINT, M., DELKER, C., FRANKLIN, K. A., WIGGE, P. A., HALLIDAY, K. J., VAN ZANTEN, M., 2016: Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature Plants*. 2(1), 15190. ISSN 2055-026x.
57. RIOU-KHAMLI, C., HUNTLEY, R., JACQARD, A., MURRAY J. A. H., 1999: Cytokinin Activation of Arabidopsis Cell Division Through a D-Type Cyclin. *Science*. 283(5407), 1541-1544. ISSN 00368075.
58. RUPP, H.-M., FRANK, M., WERNER, T., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T., 1999: Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *The Plant Journal*. 18(5), 557-563. ISSN 0960-7412.
59. RŮŽIČKA, K., ŠIMÁŠKOVÁ, M., DUCLERCQ, J., PETRÁŠEK, J., ZAŽÍMALOVÁ, E., SIMON, S., FRIML, J., VAN MONTAGU, M. C. E., BENKOVÁ, E., 2009: Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(11), 4284-4289. ISSN 0027-8424.
60. SALOMÉ, P. A., TO, J. P.C., KIEBER, J. J., MCCLUNG, C., 2006: *Arabidopsis* Response Regulators ARR3 and ARR4 Play Cytokinin-Independent Roles in the Control of Circadian Period. *The Plant Cell online*. 18(1), 55-69. ISSN 1532-298X.
61. SANTNER, A., ESTELLE, M., 2010: The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *The Plant Journal*. 61(6), 1029-1040. ISSN 09607412.
62. SHI, X., RASHOTTE, A. M., 2012: Advances in upstream players of cytokinin phosphorelay: receptors and histidine phosphotransfer proteins. *Plant Cell Reports*. 31(5), 789-799. ISSN 0721-7714.

63. SCHALLER, G. E., BISHOPP, A., KIEBER, J. J., 2015: The Yin-Yang of hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *The Plant Cell Online*, 27(1): 44-63. ISSN 1532-298X.
64. SCHALLER, G. E., STREET, I. H., KIEBER, J. J., 2014: Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*. 21, 7-15. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.05.015. ISSN 13695266.
65. SCHMÜLLING, T., WERNER, t., RIEFLER, M., KRUPKOVÁ, E., Y MANN, I. B., 2003: Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research*. 116(3), 241-252. ISSN 0918-9440.
66. SKALÁK, J., ČERNÝ, M., JEDELSKÝ, P., DOBRÁ, J., GE, E., NOVÁK, J., HRONKOVÁ, M., DOBREV, P., VANKOVÁ, R., BRZOBOHATÝ, B., 2016: Stimulation of ipt overexpression as a tool to elucidate the role of cytokinins in high temperature responses of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 67(9), 2861-2873. ISSN 1460-2431.
67. SPÍCHAL, L., RAKOVA, N. Y., RIEFLER, M., MIZUNO, T., ROMANOV, G. A., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T., 2004: Two Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, Differ in their Ligand Specificity in a Bacterial Assay. *Plant and Cell Physiology*. 2004, 45(9), 1299-1305. ISSN 1471-9053.
68. STAVANG, J. A., GALLEGO-BARTOLOMÉ, J., GÓMEZ, M. D., YOSHIDA, S., ASAMI, T., OLSEN, J. E., GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L., ALABADI, D., BLÁZQUEZ, M. A., 2009: Hormonal regulation of temperature-induced growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 60(4), 589-601. ISSN 09607412.
69. STOCK, A. M., ROBINSON, V. L., GOUDREAU, P. N., 2000: Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*. 69(1), 183-215. ISSN 0066-4154.
70. STRNAD, M., 1997: The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*. 101(4), 674-688. ISSN 0031-9317.
71. SUZUKI, T., SAKURAI, K., IMAMURA, A., NAKAMURA, A., UEGUCHI, C., MIZUNO, T., 2000: Compilation and Characterization of Histidine-Containing Phosphotransmitters Implicated in His-to-Asp Phosphorelay in Plants: AHP

- Signal Transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 64(11), 2486-2489. ISSN 0916-8451.
72. TAKEI, K., YAMAYA, T., SAKAKIBARA, H., 2004: *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 Encode Cytokinin Hydroxylases That Catalyze the Biosynthesis of *trans*-Zeatin. *Journal of Biological Chemistry*. 279(40), 41866-41872. ISSN 0021-9258.
73. TAIZ, L., ZEIGER, E., 2010: *Plant physiology*. 5. vyd. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. 782 s. ISBN 978-0-87893-565-9.
74. 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. *Annual Review of Biochemistry*. 69(1), 183-215. ISSN 0066-4154.
75. UEGUCHI, C., KOIZUMI, H., SUZUKI, T., MIZUNO, T., 2001: Novel Family of Sensor Histidine Kinase Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. 42(2), 231-235. ISSN 14719053.
76. VANDENBUSSCHE, F., HABRICOT, Y., CONDIFF, A. S., MALDINEY, R., Van Der STRAETEN, D., AHMAD, M., 2007: HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 49(3), 428-441. ISSN 09607412.
77. VEERABAGU, M., ELGASS, K., KIRCHLER, T., HUPPENBERGER, P., HARTER, K., CHABAN, K., MIRA-RODADO, V., 2012: The *Arabidopsis* B-type response regulator 18 homomerizes and positively regulates cytokinin responses. *The Plant Journal*. 72(5), 721-731. ISSN 09607412.
78. WERNER, T., MOTYKA, V., LAUCOU, V., SMETS, R., VAN ONCKELEN, H., SCHMÜLLING, T., 2003: Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *The Plant Cell online*. 15(11), 2532-2550. ISSN 1040-4651.
79. WULFETANGE, K., LOMIN, S. N., ROMANOV, G. A., STOLZ, A., HEYL, A., SCHMÜLLING, T., 2011: The Cytokinin Receptors of *Arabidopsis* Are Located Mainly to the Endoplasmic Reticulum. *Plant Physiology*. 156(4), 1808-1818.

ISBN 10.1105/tpc.107.052662. ISSN 0032-0889.

80. ZALABÁK, D., JOHNOVÁ, P., PLÍHAL, O., ŠENKOVÁ, K., ŠAMAJOVÁ, O., JISKROVÁ, E., NOVÁK, O., JACKSON, D., MOHANTY, A., GALUSZKA, P., 2016: Maize cytokinin dehydrogenase isozymes are localized predominantly to the vacuoles. *Plant Physiology and Biochemistry*. 104(4), 114-124. ISSN 09819428.
81. ZALABÁK, D., POSPÍŠILOVÁ, H., ŠMEHILOVÁ, M., MRÍZOVÁ, K., FRÉBORT, I., GALUSZKA, P., 2013: Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnology Advances*, 31: 97-117. ISSN 0734-9750.
82. ZHANG, X., CHEN, Y., LIN, X., HONG, X., ZHU, Y., LI, W., HE, W., AN, F., GUO, H., 2013: Adenine Phosphoribosyl Transferase 1 is a Key Enzyme Catalyzing Cytokinin Conversion from Nucleobases to Nucleotides in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*. 6(5), 1661-1672. ISSN 16742052.
83. ZHANG, K., NOVÁK, O., WEI, Z., GOU, M., ZHANG, X., YU, Y., YANG, H., CAI, Y., STRNAD, M., LIU, C.-J., 2014: *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature Communications*. 5(2), -. ISSN 2041-1723.
84. ZÜRCHER, E., TAVOR-DESLEX, D., LITUIEV, D., ENKERLI, K., TARR, P. T., MULLER, B., 2013: A Robust and Sensitive Synthetic Sensor to Monitor the Transcriptional Output of the Cytokinin Signaling Network in Planta. *Plant Physiology*. 161(3), 1066-1075. ISSN 0032-0889.

9 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Chemická struktura kinetinu
- Obr. 2: Chemická struktura zástupců isoprenoidních cytokininů isopentenyladeninu a *trans*-zeatinu
- Obr. 3: Reakce katalyzovaná enzymem CKX
- Obr. 4: Zjednodušené schéma dvoukomponentních fosforylačních systémů
- Obr. 5: Fenotyp klíčnic rostlin *Arabidopsis thaliana* kultivovaných při 20 °C, 29 °C a na médiu s *tZ*
- Obr. 6: Fotografie kořenových špiček transgenní linie *Arabidopsis thaliana* TCSn::GFP kultivovaných při 20 °C, 29 °C a na médiu s *tZ*
- Obr. 7: Intenzity signálu fluorescence GFP
- Obr. 8: Relativní hladiny exprese genů ARR typu B
- Obr. 9: Relativní hladiny exprese genů ARR typu A