



**Vliv mírného teplotního stresu na expresi genů
metabolismu cytokininů a kinetiku růstu klíčnic
rostlin *Arabidopsis thaliana***

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Mgr. Jan Novák, Ph.D.

Vypracovala:

Truong Thanh Huong

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

Vliv mírného teplotního stresu na expresi genů metabolismu cytokininů a kinetiku růstu klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana*

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

Na tomto místě bych ráda upřímně poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Janu Novákovi, Ph.D., za veškerý věnovaný čas spojený s vedením mé diplomové práce, za cenné rady a připomínky, a především za jeho vstřícnost a trpělivost.

Veliké poděkování patří i Mgr. Jaroslavu Pavlů za jeho rady k analýzám genové exprese a pomoc při vypracovávání závěrečné podoby mé práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Zuzaně Medvěďové za pomoc během analýz genové exprese. Také děkuji všem pracovníkům Ústavu molekulární biologie a radiobiologie Mendelovy univerzity v Brně za vytvoření přátelské atmosféry a jejich ochotu kdykoliv poskytnout potřebnou pomoc či radu.

V poslední řadě bych ráda poděkovala všem, kteří mi byli podporou během mých studijních let a psaní této práce.

ABSTRAKT

Vzhledem ke klimatickým změnám, které negativně dopadají na výnosy hospodářsky významných plodin, představuje teplotní stres hrozbu pro udržitelné zemědělství. Studium adaptace a aklimace rostlin vůči zvýšené teplotě proto patří mezi současné výzvy vědeckého úsilí. Rostliny jsou během svého života vystaveny různým teplotním podmínkám. Odpověď na nepříznivé teploty zahrnuje řadu signálních drah, které regulují mnoho dalších vývojových a buněčných procesů. Koordinace vývojových procesů za podmínek zvýšené teploty nebo jiných vnějších faktorů je primárně řízena rostlinnými hormony. Tato práce se věnovala studiu interakce mírně zvýšené teploty (29 °C) a rostlinných hormonů cytokininů u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Pro sledování vlivu cytokininů za zvýšené teploty byly provedeny experimenty sledující morfologii rostlin, kinetiku růstu, genovou expresi a kvantifikaci cytokininů. Sledováním elongace embryonálního stonku (hypokotylu), která představuje charakteristickou odpověď rostlin na zvýšenou teplotu, bylo prokázáno, že cytokininy mají významnou úlohu při regulaci odpovědi na zvýšenou teplotu. Analýzou genové exprese a přímým stanovením hladin endogenních cytokininů jsme zjistili, že hladina cytokininů je snížena v odpovědi na mírně zvýšenou teplotu, což dále ukazuje na význam cytokininů při adaptaci na teplotní stres.

Klíčová slova: cytokininy, teplota, morfologie, RT-qPCR, kvantifikace

ABSTRACT

Climate change and thermal stress poses a problem for sustainable agriculture. Research in the adaptation and acclimation of plants to the elevated temperature is therefore one of the current scientific issues. Plants are exposed to different ambient temperatures during their life. The response to adverse temperatures includes a number of signalling pathways affecting development and growth processes in plants. Coordination of developmental processes under elevated temperature and other external factors is primarily controlled by plant hormones. Here effect of cytokinins on plant morphology, growth kinetics, gene expression and quantification in combination with increased temperature was observed. By determination of the hypocotyl growth during increased temperature, cytokinins were found to play important role in this process. Cytokinins were found to inhibit temperature induced hypocotyl growth and inversely seedlings treated with higher temperature showed decreased level of cytokinins which was confirmed on the level of marker gene expression and determination of levels of cytokinins.

Key words: cytokinins, heat, morphology, RT-qPCR, quantification

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	8
3	SEZNAM ZKRATEK	9
4	TEORETICKÁ ČÁST	10
4.1	CY TOKININY.....	10
4.1.1	<i>Historie objevu</i>	10
4.1.2	<i>Struktura cytokininů</i>	11
4.1.3	<i>Biosyntéza cytokininů</i>	14
4.1.4	<i>Metabolismus cytokininů</i>	17
4.1.5	<i>Degradace cytokininů</i>	18
4.1.6	<i>Signální dráha cytokininů</i>	19
4.1.6.1	Hybridní kinasové receptory (AHK).....	20
4.1.6.2	Histidin fosfotransferové proteiny (AHP).....	21
4.1.6.3	Regulátory odpovědi (ARR).....	21
4.1.7	<i>Transport cytokininů</i>	22
4.1.7.1	Transport cytokininů na dlouhou vzdálenost.....	22
4.1.7.2	Transport cytokininů přes plazmatickou membránu.....	23
4.2	TEPLOTNÍ STRES A ROSTLINY.....	24
4.2.1	<i>Působení teplotního stresu na rostliny</i>	24
4.2.2	<i>Proteiny teplotního šoku (HSP – angl. <u>H</u>eat <u>S</u>hock <u>P</u>rotein)</i>	25
5	MATERIÁL A METODIKA	27
5.1	ROSTLINNÝ MATERIÁL A JEHO KULTIVACE.....	27
5.2	HOMOGENIZACE ROSTLINNÉHO MATERIÁLU A IZOLACE RNA.....	29
5.3	REVERZNÍ TRANSKRIPCE RNA NA CDNA.....	30
5.4	KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR (RT-QPCR)	31
5.5	KVANTIFIKACE CY TOKININŮ	32
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
6.1	POROVNÁNÍ MORFOMETRICKÝCH PARAMETRŮ KLÍČNÍCH ROSTLIN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ZA PODMÍNEK STANDARDNÍ A MÍRNĚ ZVÝŠENÉ TEPLoty S <i>tZ</i>	33

6.2 CYTOKININY MODULUJÍ RŮST HYPOKOTYLU V ZÁVISLOSTI NA MÍRNĚ ZVÝŠENÉ TEPLOTĚ 29 °C	36
6.3 EXPRESE GENŮ SOUVISEJÍCÍCH S METABOLISMEM A SIGNÁLNÍ DRÁHOU CYTOKININŮ	38
6.3.1 <i>Expresse genů ARR</i>	39
6.3.2 <i>Expresse genů IPT</i>	41
6.3.4 <i>Expresse genů CKX</i>	43
6.4 ENDOGENNÍ HLADINA CYTOKININŮ KLESÁ V ZÁVISLOSTI NA MÍRNĚ ZVÝŠENÉ TEPLOTĚ 29 °C	44
7 ZÁVĚR.....	48
8 SEZNAM OBRÁZKŮ	49
9 SEZNAM TABULEK.....	50
10 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY.....	51
11 SEZNAM PŘÍLOH	65
12 PŘÍLOHY	1

1 ÚVOD

Rostliny jsou během svého života vystaveny působení různých abiotických stresových faktorů. V reakci na stresové faktory jsou rostliny nuceny odpovídajícím způsobem přizpůsobit své růstové a vývojové procesy, a to adaptivními reakcemi na stres regulovanými řadou vnitřních faktorů, které zahrnují rostlinné hormony. Příkladem takových hormonů jsou již dlouho známé rostlinné hormony v odpovědi na teplotu, kterými jsou auxiny, brasinosteroidy a gibereliny (Gray *et al.*, 1998). Teplotní stres patří mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující hospodářské výnosy. Pojem teplotní stres je chápán jako překročení fyziologické meze o 10-15 °C (Wahid *et al.*, 2007). Vedle sucha patří teplotní stres mezi nejvýznamnější faktory a vedou k nevyhnutelnému snižování vitality rostlin, a tím i k poklesu hospodářských výnosů. Z tohoto důvodu je řada vědeckých publikací věnována intenzivnímu výzkumu teplotního stresu, který je pro rostliny jednou ze zásadních zátěžových zkoušek vnějšího prostředí. Nicméně rostliny jsou schopné zaznamenat i nepatrné změny teploty byť jen o 1 °C nad nebo pod jejich optimální mez a mohou vést ke změnám na různých úrovních životního cyklu rostlin od klíčení přes morfologické změny až po vývoj reprodukčních orgánů (Franklin a Wigge, 2014). Proto je důležité pochopit komplexní molekulární mechanismy odpovědi na teplotní změny v intervalu před přechodem do teplotního šoku. Vzhledem k měnícím se klimatickým podmínkám je v současnosti v zemědělství snaha šlechtit rostliny rezistentní vůči nepříznivým faktorům prostředí, a proto je důležité pochopit fungování komplexního mechanismu odpovědi na jednotlivé limitující faktory.

V této práci jsem se zabývala souvislostmi mezi odpovědí na mírně zvýšenou teplotu (29 °C) a cytokininy. Tato problematika nabízí širokou škálu možností studia mechanismu vlivu cytokininů, které ještě nebyly plně objasněny. Vliv cytokininu v odpovědi na teplotní stres byl v posledních letech dokázán již v řadě prací (Černý *et al.*, 2014, Skalák *et al.*, 2016). Vliv mírně zvýšené teploty byl v této práci sledován u klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana*.

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vypracování literární rešerše, která shrne poznatky o rostlinných hormonech cytokininech se zaměřením na jejich metabolismus a vliv na růst a vývoj. Teoretická část byla dále doplněna o přehled vlivu teplotního stresu na rostliny. Experimentální část práce byla studována odpověď na zvýšenou teplotu u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Experimenty byly zaměřeny na sledování kinetiky změn morfometrických parametrů klíčících rostlin za podmínek standardní teploty 20 °C a podmínek mírného teplotního stresu 29 °C. Získaná data z morfometrické analýzy byla obohacena o analýzu exprese genů zapojených do metabolismu cytokininů. V závěru práce bylo na základě získaných výsledků v širším významovém kontextu diskutováno působení rostlinných hormonů v odolnosti vůči teplotnímu stresu.

3 SEZNAM ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
Asp	kyselina asparagová
AHK	hybridní histidinkináza (receptor cytokininů)
AHP	histidin fosfotransferový protein u <i>Arabidopsis</i>
AMP	adeninmonofosfát
ARR	regulátor odpovědi u <i>Arabidopsis</i>
CKX	cytokinin dehydrogenáza
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
DMAPP	dimethylallyl pyrofosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DZ	dihydrozeatin
ENT	ekvilibrativní nukleosidový transportér
FAD	flavinadenindinukleotid
His	histidin
IAA	indolyl-3-octová kyselina
iP	isopentenyladenin
IPP	isopentenyl-difosfát
iPMP	isopentenyl-adenosin-5'-monofosfát
IPT	isopentenyltransferáza
iPR	isopentenyladenosin
PUP	purin-permeasový transportér
RNA	ribonukleová kyselina
TAA	tryptofan aminotransferáza
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatinribosidy

4 TEORETICKÁ ČÁST

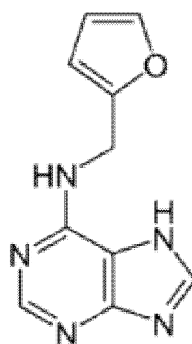
4.1 Cytokininy

4.1.1 Historie objevu

Je to již více než 60 let, co vědci z univerzity ve Wisconsinu (University of Wisconsin, Botany and Biochemistry departments) izolovali a identifikovali vůbec první cytokinin s chemickým názvem 6-furfurylaminopurin, dnes známý pod triviálním označením kinetin (Miller *et al.*, 1955). Před objevem cytokininů ve vzduchu visela nezodpovězená otázka: Co je zodpovědné za stimulaci dělení buněk neboli cytokinezi? Již na konci 19. století Wiesner (1892) přišel s hypotézou, že v organismu existují sloučeniny o velmi nízké koncentraci, které iniciují buněčné dělení. Experimentálně byla myšlenka Wiesnera podpořena rakouským botanikem Haberlandtem (1913) považovaného za otce rostlinných explantátů, který prokázal, že exudáty floému různých druhů rostlin vedou ke stimulaci dělení buněk v parenchymu brambor (*Solanum tuberosum*). Dalších několik let se Haberlandt na základě získaných poznatků snažil izolovat z poraněné tkáně neznámé substance zodpovědné za cytokinezi, ale ve finále neúspěšně. S postupem času se v testech vystřídala velká řada látek, která by mohla potenciálně aktivovat schopnost dělení, ale bez většího úspěchu. Bez pochyby nejlepšího výsledku dosáhli Van Overbeek *et al.* (1941), kteří poprvé vědecké komunitě představili kokosové mléko jako nový komponent živného média. Kokosové mléko během kultivace mladých embryí *Datura stramonium* podpořilo stabilní proliferaci buněk. Následně byly testovány i jiné přírodní látky vykazující v kombinaci s auxiny pozitivní výsledky, například rajčatová a pomerančová šťáva, kvasničný extrakt nebo banánový extrakt, nejvíce se však osvědčilo kokosové mléko (Caplin a Steward, 1948). I přes vynaložené úsilí přijít na kloub záhadným látkám zodpovědným za proliferaci buněk, první chemická identifikace indukujících látek přišla až roku 1955 (Miller *et al.*, 1955). Hlavními důvody prvotního neúspěchu byly pravděpodobně nedostatečná znalost účinků rostlinných regulátorů, nevhodné použití rostlinného materiálu a kontaminace vzorků (Amasino, 2005).

Když již bylo známo, co ovlivňuje stimulaci dělení buněk, vstupuje na scénu talentovaný Miller v roli postdoktoranda pod vedením prof. Skooga. Ústředním zájmem Millera bylo nalezení příčiny proliferace buněk a tvorby prýtlů. V souladu se svými

přecházejícími experimenty vydedukoval, že součástí navozujících faktorů mohou být nukleové báze puriny a pyrimidiny, hlavní složky DNA. K těmto závěrům vedly výsledky studie prof. Skooga s Cheng Tsui, kteří přidavkem adeninu a auxinu navodili slabou indukci tvorby prýtů (Skoog a Tsui, 1951), proto se rozhodl pro použití spermatu sledě, bohatého na DNA. Stejně jako u extraktu z kultury *Saccharomyces cerevisiae* a kokosového mléka došlo i po aplikaci spermatu sledě k iniciaci dělení buněk v kultuře tabáku. Problémy s reprodukovatelností nastaly v opakovaných experimentech, ve kterých bylo použito čerstvé sperma. Miller posléze zjistil, že pokud ponechá sperma sledě při pokojové teplotě po dobu několika měsíců, aktivita navozujících faktorů je opět přítomna. Objev paticných faktorů Miller posléze navodil aplikací DNA, která byla degradována autoklávováním. Objasnění chemické struktury záhadného faktoru přišlo v roce 1955, kdy byl identifikován první cytokinin pojmenovaný kinetin (Miller *et al.*, 1955). Dlouho po objevu kinetinu se předpokládalo, že se v organismech přirozeně nevyskytuje. Až roku 1996 kdy byly testovány různé vzorky izolované DNA z rostlin a lidí, kde se prokázala přítomnost kinetinu (Barciszewski *et al.*, 1996). V roce 2000 byl kinetin stanoven i v lidské moči (Barciszewski *et al.*, 2000). První přirozeně se vyskytující cytokinin byl nalezen v kukuřici (*Zea mays*), z jejichž obilek se podařilo purifikovat první rostlinný cytokinin, nazvaný *trans*-zeatin (*tZ*) (Miller, 1961; Letham, 1963).



Obr. 1: Strukturní vzorec kinetinu (6-furfurylaminopurin)

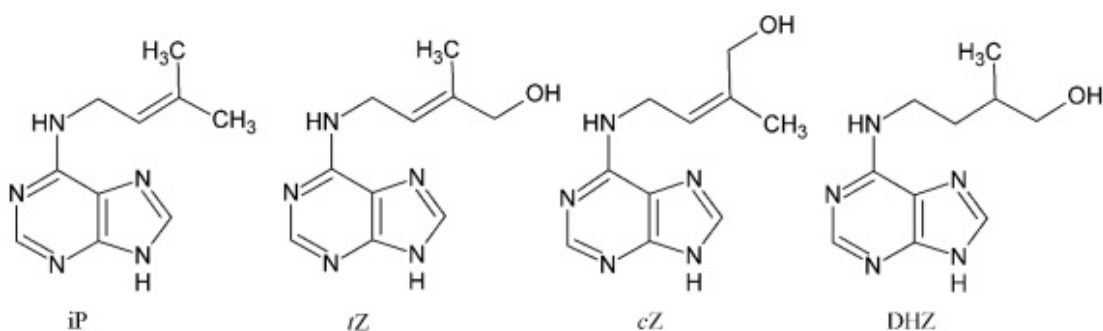
4.1.2 Struktura cytokininů

Dnes už víme, že cytokininy jsou nezastupitelným růstovým regulátorem rostlin zapojujícím se do mnoha procesů na různých úrovních růstu a vývoje rostlin. Tyto procesy zahrnují převážně dělení buněk, oddalování senescence, klíčení semen, *de novo*

organogenezi, potlačování apikální dominance nebo odpověď rostlin na biotický a abiotický stres (Hwang *et al.*, 2012).

Cytokininy můžeme rozdělit do dvou skupin: přirozené a syntetické. Všechny přirozeně se vyskytující cytokininy jsou z chemického hlediska substituované puriny, konkrétně deriváty 6-aminopurinu s připojeným postranním řetězcem v poloze N⁶. V závislosti na charakteru připojeného postranního řetězce v poloze N⁶ klasifikujeme cytokininy jako aromatické a isoprenoidní (Schmülling, 2004).

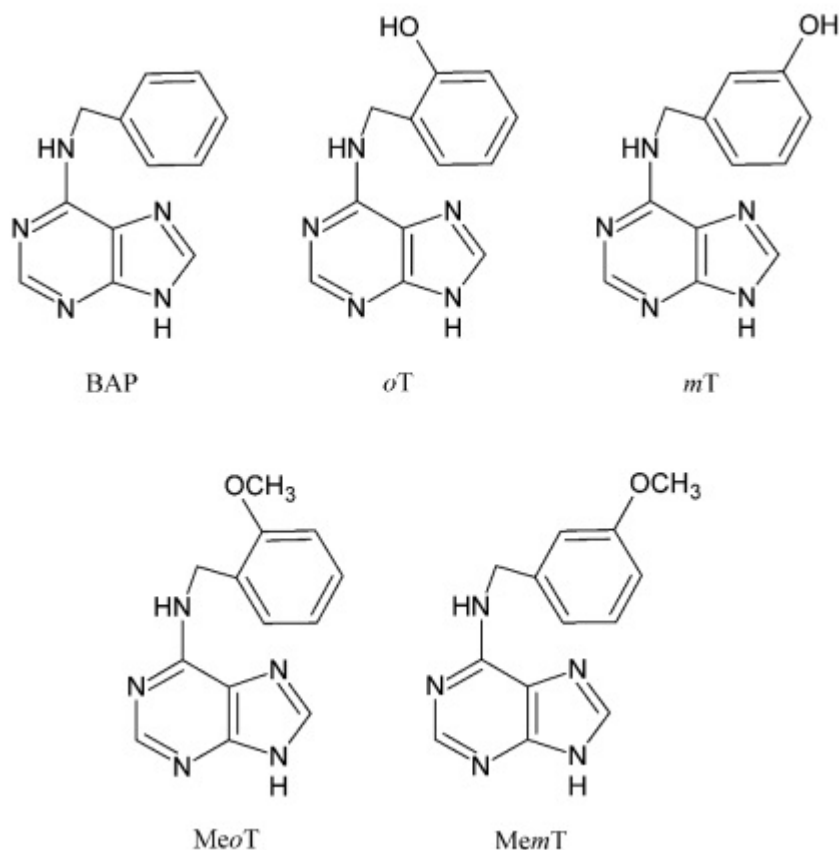
Do první skupiny přirozených isoprenoidních cytokininů řadíme N⁶-isopentenyladenin (iP), *tZ*, *cis*-zeatin (*cZ*) a dihydrozeatin (DZ) (Obr. 2). Nejčastějším přirozeným cytokininem je zeatin (trans-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin). Zásluhou hydroxyskupiny vázané v postranním řetězci je zeatin schopen tvořit dva odlišné izomery *cis* a *trans* (*tZ* a *cZ*) (Zürcher a Müller, 2016). Po objevu cytokininů do popředí zájmu vstoupily především biologicky aktivní formy, kam řadíme *trans*-konfigurace, naopak *cis*-konfigurace, zůstaly v jeho stínu z důvodu nižší biologické aktivity u mnoha druhů rostlin. V posledních letech se objevily studie vyzdvihující její potenciální roli v odpovědi obranných reakcí rostlin proti patogenům a herbivorům (Schäfer *et al.*, 2015).



Obr. 2: Strukturní vzorce isoprenoidních cytokininů: N⁶-isopentenyladenin (iP), trans-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), dihydrozeatin (DHZ)

Druhou skupinou jsou aromatické cytokininy obsahující benzyl v poloze N⁶ (Schmülling, 2004). Mezi zástupce aromatických cytokininů patří *ortho*-topolin (*oT*), *meta*-topolin (*mT*) a *para*-topolin (*pT*) tzv. topoliny purifikované z topolu (*Populus canadensis*) a dále jejich methoxy deriváty (MeoT a MemT) a benzyladenin (BA) (Obr. 3). Aromatické cytokininy se vyskytují u několika specifických druhů rostlin, jejichž

výskyt byl v přírodě potvrzen, například u druhů *Populus canadensis* a *Consolida regalis* (Strnad, 1997; Sakakibara, 2006). Mezi aromatické cytokinininy z chemického hlediska dále řadíme deriváty močoviny a thiomčoviny, které jsou většinou syntetické povahy. Například derivát močoviny thidiazuron má podobný účinek jako přirozené cytokinininy a byl syntetizován pro komerční použití s cílem defoliace bavlníku (Arndt *et al.*, 1976; Guo *et al.*, 2011).



Obr. 3: Strukturní vzorce aromatických cytokininů: 6-benzyladenin (BA), ortho-topolin (*o*T), meta-topolin (*m*T), ortho-methoxytopolin (MeoT) a meta-methoxytopolin (MemT).

Cytokinininy se vyskytují napříč rostlinnými druhy ve formě derivátů volných bází, ribosidů, ribotidů a nukleotidů. Cytokinininy se po konjugaci s glukózou vyskytují ve formě N-glukosidů a O-glukosidů, další formou cytokininů mohou být i konjugáty s aminokyselinami (Kieber *et al.*, 2004).

4.1.3 Biosyntéza cytokininů

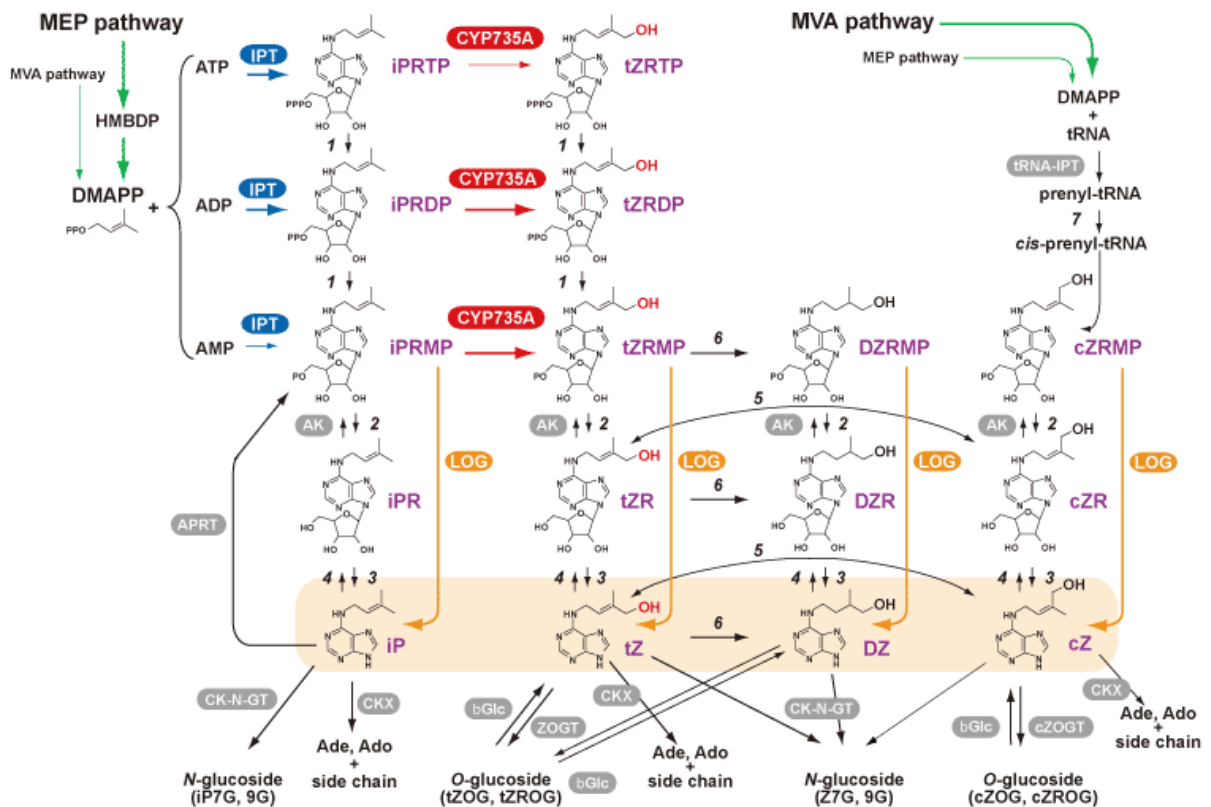
V předchozích odstavcích jsme byli seznámeni se dvěma skupinami cytokininů, jimiž jsou isoprenoidní a aromatické cytokininy. Následující kapitola bude věnována výhradně biosyntéze isoprenoidních cytokininů, jejíž mechanismus je nám známý již od konce 20. století (Frébort *et al.*, 2011). Co se týče biosyntézy aromatických cytokininů, i po uplynutí 44 let od objevu prvního aromatického cytokininu stále neexistuje žádný náznak toho, jak jsou cytokininy nesoucí postranní řetězec s aromatickým kruhem v rostlinách syntetizovány (Horgan *et al.*, 1973; Kamínek, 2015).

Biosyntéza isoprenoidních cytokininů je lokalizovaná především do meristému a mladých vyvíjejících se pletiv (Letham, 1994). Tým Taya *et al.* (1978) jako první detekoval biosyntetickou aktivitu v *Dictyostelium discoideum*, jehož extrakt katalyzoval přenos isopentenylu z dimethylallyldifosfátu (DMAPP) na adeninmonofosfát (AMP). Produktem reakce je diskadenin, který působí jako inhibitor klíčení spor a jeho aktivita byla dokázána dokonce i v tabákové kultuře. Avšak první gen zodpovědný za *de novo* biosyntézu cytokininů byl nalezen až u patogenní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, jenž je hlavním iniciátorem nádorů u rostlin. Vznik infekčního onemocnění probíhá skrze oblast T-DNA nalézající se na tzv. Ti-plazmidu. Specifická oblast T-DNA je schopna se začlenit do rostlinného genomu (Kakimoto, 2003). Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* disponuje dvěma geny *ipt*, označovanými *tmr* a *tzs*. Gen *Tmr* je kódován v oblasti T-DNA, důkaz jeho biosyntetické aktivity byl proveden na modelu *Escherichia coli*. A po klonování do *Escherichia coli* bylo prokázáno, že její extrakt posléze katalyzoval tvorbu isopentenyl-adenosin-5'-monofosfát (iPMP) z DMAPP a AMP. Gen *Tzs* je lokalizován na virulentní oblasti nopalínu na T-DNA (Sakakibara, 2006). Oba geny *tmr* a *tzs* řadíme do DMAPP:AMP isopentenyltransferáz.

Geny *IPT* kódují isopentenyltransferázu (IPT), a rozlišujeme adenylát-IPT schopné připojit isoprenoidní řetězec do polohy N⁶ na AMP, ADP nebo ATP (nikoli na adenosin nebo na adenin) a dále na tRNA-IPT schopné připojit isoprenoidní řetězec na adenin v molekule tRNA (Kakimoto, 2003). Biosyntéza isoprenoidních cytokininů tedy začíná konverzí isoprenoidního řetězce na adenin v podobě nukleotidů nebo vázan v RNA. Mezi prekurzory isoprenoidních postranních řetězců řadíme dimethylallylpyrofosfáty (DMAPP) a 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-difosfáty (HMBDP). Meziproduktem deoxy-D-xylulosa-5-fosfátové dráhy (DXP) je HMBDP, který dále slouží jako donor

pro syntézu konečných produktů DMAPP a isopentenylidifosfát (IPP), jehož syntéza probíhá v plastidech za pomoci genu *IspG*. Tato dráha se mimo rostliny vyskytuje například i v bakteriích a zahrnuje v sobě i metylerytritolfosfátovou dráhu (MEP). Syntéza DMAPP je dále realizována mevalonátovou dráhou (MVA) lokalizovanou v cytosolu a mitochondriích, jejíž cesta již nezahrnuje syntézu HMBDP (Hecht *et al.*, 2001).

U rostlin jsou zdrojem isoprenoidních jednotek dráhy kyseliny mevalonové (MVA) a metylerytritolfosfátové (MEP) dráhy. Mimo rostliny se MVA dráha vyskytuje i u jiných organismů jako například živočichů, hub či *Archaea*, kde slouží jako producent prekurzorů biosyntézy sterolů, seskviterpenů a postranního řetězce ubiquinonu. MEP dráha je v konečném důsledku rovněž zodpovědná za produkci dalších látek, mezi kterými jsou monoterpeny, některé seskviterpeny, diterpeny, karotenoidy a postranní řetězce chlorofylu (Laule *et al.*, 2003).



Obr. 4: Model biosyntézy a metabolismu cytokininů (Převzato z Sakakibara, 2006)

Biosyntéza cytokininů typu *tZ* zahrnuje tvorbu N⁶-isopentenyladenosin 5'-fosfátů (iPRMP, iPRDP, iPRTP) z adenosin-5'-fosfátů (z AMP u bakterií, v případě vyšších rostlin z ADP nebo ATP) a z DMAPP či HMBDP. Tuto klíčovou reakci katalyzuje enzym adenylát-IPT. Prenylovaný isoprenoidní postranní řetězec ribonukleotidů (přednostně iPRMP a iPRDP) je za katalýzy cytochrom-P450-monooxygenázou 735A (CYP735A) hydroxylován za vzniku cytokininů typu *tZ* (Takei *et al.*, 2004). Biosyntéza cytokininů typu *cZ* vychází z tRNA a je katalyzována enzymem tRNA-IPT. Posledním krok degradace tRNA je doprovázen vznikem volných bází *cZ* (Murai, 2014).

Identifikace prvních genů *IPT* u rostlin byla umožněna až po odhalení kompletní sekvence genomu *Arabidopsis thaliana*. Geny *AtIPT* byly specifikovány na základě vyhledávání a porovnávání homologních sekvencí metodou BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) vůči již známým bakteriálním genům *ipt* (Takei *et al.*, 2001). V současnosti je známo 9 genů *IPT* (*AtIPT1- AtIPT9*), z nichž geny *AtIPT2* a *AtIPT9* kódují enzymy tRNA-IPT. Funkce genu *AtIPT2* byla potvrzena ve studii se *Saccharomyces cerevisiae* (Golokov *et al.*, 2002). Studium jednotlivých genů dokázaly význam *AtIPT3*, který determinuje biosyntézu cytokininů (*tZR* a *tZ*-ribotidů) v odpovědi na hladinu NO₃⁻ akumulující se v kořenech (Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004).

Geny *AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT5* a *AtIPT8* jsou lokalizovány v plastidech, což bylo potvrzeno selektivním značením C¹³ jednotlivých isoprenoidních drah a následnou fúzí s GFP v buňkách listu a kořenové špičky (Kasahara *et al.*, 2004). Výsledek experimentu byl taktéž v souladu s tvrzením, že většina *tZ* a *iP* je poskytována z prekurzoru DMAPP z MEP dráhy, které jsou rovněž lokalizovány do plastidů. Geny tRNA *AtIPT2* a *AtIPT4* byly detekovány v cytosolu a *AtIPT7* v mitochondriích.

Místa exprese jednotlivých genů byly odhaleny studiem exprese genů *AtIPT* v orgánově specifickém materiálu použitím promotorových:reportérových genů. *AtIPT1* je exprimována v xylému prekurzorových buněk kořene, prašnicích a zrajících semenech, exprese *AtIPT3* je lokalizována do xylému, *AtIPT4* a *AtIPT8* jsou nejvíce exprimovány v místě chazálního endospermu nezralého semene, *AtIPT5* je aktivní v oblastech laterálního kořenového primordia, v kolumele kořenové špičky, v abscisové zóně plodu, *AtIPT6* je dominantní v šešuli, *AtIPT7* převládá v místech trichomů

mladých listů, v pylových láčkách, ve floému a v prodlužovací zóně endodermis kořene (Sakakibara, 2006).

Dalším enzymem v biosyntetické dráze cytokininů enzym ribozid-5'-monofosfátfosforibohydroláza zvaný LONELY GUY (LOG) objevený v roce 2007 v rýži (*Oryza sativa*) nalezen. Později bylo identifikováno 7 genů kódující LOG enzymy v *Arabidopsis thaliana* (Frébort *et al.*, 2011; Kieber a Schaller, 2014). Enzymy LOG jsou v jediném kroku schopny převést ribotidy cytokininů na volné báze (iP, tZ, DZ, cZ), které představují neaktivnější formy cytokininů. LOG enzymy však nejsou schopné pracovat se substráty di- a tri-fosfátů, z tohoto důvodu je třeba je nejdříve defosforylovat na mono-fosfáty, které jsou LOG enzymy přeměnitelné. Lokalizace exprese LOG enzymů v *Arabidopsis thaliana* je především v prýtu, s výjimkou *AtLOG7*, který vykazuje 5× vyšší aktivitu v kořenech (Kuroha *et al.*, 2009).

4.1.4 Metabolismus cytokininů

Regulace endogenních hladin cytokininů je obecně zajišťována konverzí mezi cytokininovými bázemi, ribosidy, ribotidy, modifikovanými postranními řetězci, konjugacemi a v poslední řadě degradací cytokininů (Schmülling, 2004). Podrobně je přeměna cytokininových bází a degradace cytokininů popsána v kapitolách výše a níže, v této části se zaměřím zejména na glykosylace cytokininů.

Pokles aktivních cytokininových hladin může být způsobena reverzibilní či ireverzibilní konjugací cukrů glukózy nebo xylózy, převážně glukózy. V současnosti jsou nám známy dvě možné cesty glykosylace, a to buď na adeninovém kruhu nebo na postranním řetězci cytokininů. Mezi modifikace adeninové kostry řadíme ireverzibilní N-glykosylaci adeninového kruhu v pozici N³-, N⁷- a N⁹- nebo konjugaci na aminokyselinu alanin v pozici N⁹- (Mok, 2001). Glykosylace adeninového kruhu v pozicích N⁷- a N⁹- způsobí nevratnou inaktivaci cytokininů. Preference připojení glykosylu je vícenásobně vyšší v pozici N⁷- a to platí jak pro tZ, tak i pro cZ. Za zprostředkovatele N-glukosylace je považován enzym N-glukozyltransferáza, který připojuje cukerný zbytek na dusík adeninového kruhu. Do procesu konjugace alaninu se zapojuje enzym β-(9-cytokinin)-alanin syntéza, který zodpovídá za konverzi tZ, cZ, iP a DZ (nejčastěji tZ a DZ) za vzniku 9-alanylovaných derivátů. Donorem alaninu pro danou reakci je O-acetylserin (Sakakibara, 2010).

Mimo N-glykosylace na adeninový kruh je možné navázání cukerného zbytku (glukózy nebo xylózy) na hydroxylovou skupinu postranního řetězce (tzv. O-glykosylace) za vzniku O-glykosidů (O-glukosidy a O-xylosidy) prostřednictvím katalytické aktivity O-glykosyltransferázy. Donorem glykosylu pro enzym O-glykosyltransferázy (ZOG) slouží uridin-5'-difosfoglukóza (UDPG) a UDP-xylóza (UDPX), s výrazně vyšší afinitou k UDPG, substrátovou jednotkou je *tZ* (Mok, 2000). Zpětná konverze O-glykosidů na aktivní formy cytokininů probíhá deglykosylací působením enzymu β -glukosidázy, který byl nalezen v kořeni kukuřice. Enzym β -glukosidáza je taktéž schopen deaktivovat N³-glukosidy (Brzobohatý *et al.*, 1993).

4.1.5 Degradace cytokininů

Proces degradace cytokininů hraje významnou roli v regulaci hladin aktivních forem cytokininů a distribuci v rostlinném těle (Galuszka *et al.*, 2000). Poprvé byl enzym degradace popsán roku 1971 profesorem Pačesem a jeho kolegy v kultuře tabáku (Pačes *et al.*, 1971), a byl pojmenován Whittym a Hallem jako cytokininoxidáza. (Whitty a Hall, 1974). Celá léta se předpokládalo, že finálním akceptorem elektronů je výlučně molekulární kyslík. Pozdější studie však našly jiné a efektivnější elektronové akceptory chinonového typu. Dnes již enzym řadíme do třídy dehydrogenáz, tzv. cytokininoxidáza/dehydrogenáza (CKX) (Galuszka *et al.*, 2001; Frébortová *et al.*, 2004). CKX je jedním z hlavních enzymů, který katalyzuje ireverzibilní inaktivaci cytokininů u rostlin. Izolace CKX z rostlinných pletiv byla v minulosti extrémně obtížná, především díky jejich nízkému obsahu, průlom přišel až s přesnou identifikací sekvencí genu *ZmCKX1* kódující CKX v kukuřici (*Zea mays*) (Morris *et al.*, 1999). Od té chvíle byly geny CKX identifikovány v různých prokaryotických i eukaryotických organismech například *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Dictyostelium discoideum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Funaria hygrometrica* (Frébort *et al.*, 2011).

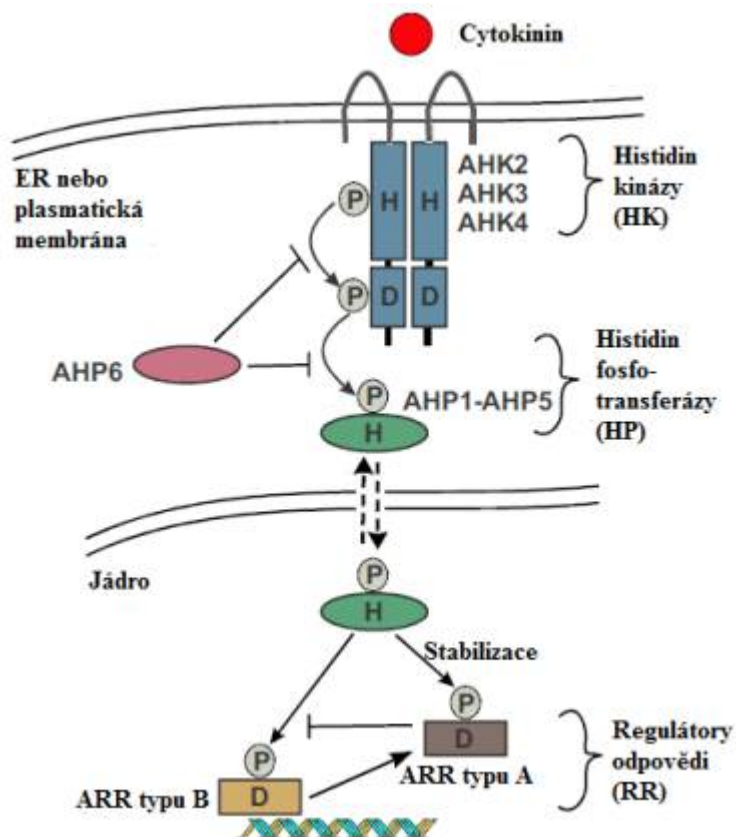
Společným znakem enzymů CKX je přítomnost kovalentně vázané FAD vazebné domény a substrát vazebné domény. Kofaktor FAD je připojen přes metylovou skupinu v pozici 8 na isoalloxazinový kruh na histidinovém zbytku motivu GHS (Frébort *et al.*, 2011). V genomu *Arabidopsis thaliana* byla odhalena rodina sedmi homologních genů kódující CKX (*AtCKX1* – *AtCKX7*) sestávající z vysoce konzervativních sekvencí zahrnující 5 exonů a 4 introny (Bilyeu *et al.*, 2001).

Ireverzibilní degradace cytokininů probíhá oxidativním štěpením postranního řetězce N⁶ adeninu a odpovědným enzymem této reakce je výše uvedený CKX. V prvním kroku, degradace podléhá dehydrogenaci, kdy jsou z cytokininu převedeny dva elektrony na FAD kofaktor, za vzniku iminového meziprojektu. Současné jsou elektrony přeneseny na finální akceptor. Výslednými produkty oxidativního štěpení jsou adenin (nebo deriváty N⁹-substituovaných cytokininů) a aldehyd z postranního řetězce. (Frébort *et al.*, 2011).

4.1.6 Signální dráha cytokininů

Molekulárně genetické studie odhalily, že je přenos signálů cytokininové aktivity uskutečňován přes dvoukomponentní His-Asp fosforylační signální dráhy. Signální dráha je zahájena percepcí na hybridním histidinkinasovém receptoru, která spouští víceúrovňovou fosforylaci až ke konečné regulaci genové exprese. Dvoukomponentní systém nalezneme i u bakterií, hub a *Dictyostelium*. Systém je založen na principu přenosu fosfátové skupiny mezi signálními přenašeči (Cheng *et al.*, 2015). Do signalizační dráhy cytokininů u *Arabidopsis thaliana* se zapojují tři hlavní složky, jmenovitě hybridní histidinkinasové receptory (AHK), histidin fosfotransferové proteiny (AHP) a regulátory odpovědi (ARR) (Hwang *et al.*, 2012).

Percepce signální molekuly cytokininu je zahájena vazbou do vazebné domény CHASE (součást AHK) lokalizované na plazmatické membráně nebo endoplazmatickém retikulu, která způsobí autofosforylaci dimeru hybridního receptoru AHK na His, odkud je posléze fosfátová skupina přemístěna na zbytek Asp její přijímačové domény, fosfátová skupina pokračuje do cytoplazmy a naváže se na AHP1-AHP5 (El-Showk *et al.*, 2013). Histidin fosfotransferový protein (AHP) slouží jako můstek mezi receptory AHK lokalizované na membráně a ARR typu A a typu B lokalizovaných v jádře. Přenosem fosforu z AHP dojde k fosforylaci C-koncových domén ARR typu B, které obsahují přijímačovou doménu a konzervovanou DNA-vazebnou doménu. Tento děj podmíní aktivaci regulátorů odpovědi jako transkripčních faktorů, ty jsou zodpovědné za aktivaci primárně indukovaných genů. V cytokininové signální kaskádě hraje ARR typu B roli pozitivního regulátoru, zatímco ARR typu A mají roli negativního regulátoru signalizace cytokininů (Zalabák *et al.*, 2013).



Obr. 4: Mechanismus přenosu cytokininového signálu v *Arabidopsis thaliana* (El-Showk et al., 2013, upraveno a převzato) P – fosfátová skupina, H – zbytek histitinu, D – zbytek kyselina asparagové, ER – endoplazmatické retikulum

4.1.6.1 Hybridní kinasové receptory (AHK)

U *Arabidopsis thaliana* je obecně známo na 11 AHK, z nichž AHK2, AHK3, CRE1/AHK4 se přímo podílí na percepci a signalizaci cytokininů. Jsou lokalizovány na plazmatické membráně endoplazmatického retikula (Caesar et al., 2011). Receptory cytokininů AHK sestávají ze dvou až tří transmembránových domén, z cytokininové vazebné domény CHASE (angl. Cyclase/Histidine-kinase Associated Sensory Extracellular) na N-konci, histidinkinásové domény, přijímací domény na C-konci, homologní doména k přijímačové doméně (Ferreira a Kieber, 2005).

Struktura histidinkinázových receptorů je vzájemně velmi podobná, avšak liší se vazebnou preferencí. Receptory CRE1/AHK4 a AHK3 vykazují poměrně vysokou afinitu k *tZ* a *iP* na rozdíl od *cZ*. Zajímavé je, že v kukuřici (*Zea mays*) AHK rozpoznává *cZ* a váže je s vysokou afinitou oproti *Arabidopsis thaliana*, která přítomnost *cis*-forem vůbec nezaznamená (Cheng et al., 2015). Vazebné ligandy *iP* typu

disponují nejvyšší afinitou k CRE1/AHK4, ovšem AHK3 je stabilnější za působení zvýšené teploty na rozdíl od CRE1/AHK4 (Romanov *et al.*, 2006).

4.1.6.2 Histidin fosfotransferové proteiny (AHP)

AHP jsou nepostradatelnou spojkou transmembránových a jaderných transkripčních faktorů v cytokininové signální dráhy. Přečtený genom *Arabidopsis thaliana* posloužil k dekodování pěti různých proteinů přenašečů fosfátu (angl. histidin phosphotransfer protein; HPT) (AHP1- AHP5) (Suzuki *et al.*, 1998). Přenos AHP1-AHP5 fosfátových skupin je zajištěn vysoce konzervovaným motivem (XHQXKGSSXS). Později byl nalezen tzv. pseudo-fosfotransferový protein AHP6, který neplní svou primární funkci přenosu fosfátové skupiny z důvodu chybějícího konzervativního His a působí jako inhibitor signalizace cytokininů (Mahönen *et al.*, 2006).

4.1.6.3 Regulátory odpovědi (ARR)

Regulátory odpovědi (ARR) jsou další složkou v signální kaskádě cytokininů. U *Arabidopsis thaliana* byla objevena existence 23 funkčních ARR (To *et al.*, 2007). Na základě struktury domén a podobnosti aminokyselinových sekvencí přijímací domény ARR dělíme do 4 hlavních tříd: typ A, typ B, typ C a regulátory pseudoodpovědi (ARRR). Z nichž do signalizace se zapojují typ A a typ B ARR (Cheng *et al.*, 2015).

Fosforylace ARR typu B aktivuje schopnost vazby na DNA. Společně s cílovými geny cytokininové odpovědi a geny ARR proteinů typu A jsou pod transkripční kontrolou ARR typu B (El-Showk *et al.*, 2013). ARR typu B obsahuje stejně jako ARR typu A přijímačovou doménu na N-konci, liší se však charakteristickým prodlouženým C-koncem s GARP doménou společnou pro všechny ARR typu B (Müller *et al.*, 2007).

ARR typu A jsou proteiny o relativně malé velikosti složené z přijímačové domény s variabilní středovou částí a ze zkráceného C-konce. Stabilizace regulátoru ARR typu A je vyvolána fosforylací (El-Showk *et al.*, 2013). Za transkripci je primárně zodpovědná signální dráha cytokininů, rovněž jsou indukovatelné nitráty či abiotickými stresovými faktory jako jsou nízká teplota, dehydratace a zasolení půdy (Ureo *et al.*, 1998).

4.1.7 Transport cytokininů

Pro rostliny je charakteristická absence lokomočních pohybů (=pohyb z místa na místo), což vede ke vzniku celé řady specifických drah zapojujících se do regulace morfologických, fyziologických nebo genetických vývojových procesů. V okamžiku vyklíčení je rostlina upoutána ke konkrétnímu biotopu a neexistuje pro ni možnost úniku, je doslova nucena čelit nepříznivým vlivům vnějšího prostředí. Mezi nepříznivé faktory řadíme např. sucho, teplotní výkyvy, nedostatek živin či napadení rostlinným patogenem (Lacombe *et al.*, 2016). K překonání zmíněných limitů ve stále se měnícím prostředí si rostliny vyvinuly mechanismus komunikace signálních molekul (fytohormony, mRNA, malé RNA, proteiny) mezi jednotlivými buňkami a orgány, které předávají signál k cílovému orgánu a tak koordinují jejich následný růst a vývoj (Ruiz-Medrano *et al.*, 2001).

Transport cytokininů může probíhat na buněčné úrovni, tedy na plazmatické membráně nebo na dlouhé vzdálenosti přes vodivé svazky (Liu *et al.*, 2009).

4.1.7.1 Transport cytokininů na dlouhou vzdálenost

Transport signálních molekul včetně cytokininů je zabezpečen pomocí vodivých pletiv, tzn. na dlouhou vzdálenost. Vodivá pletiva sestávají z dřevní části (xylém) zajišťující rozvádění vody a anorganických látek z kořene do nadzemní části rostlin tzv. transpiračním tokem a lýkové části (floém) zajišťující přenos produktů syntetizovaných ve fotosyntéze (Procházka *et al.*, 1998)

Původní model předpokládal, že cytokinininy jsou syntetizovány převážně v kořenech a prýtem jsou rozváděny do celého rostlinného těla, pozdější studie však dokázali, že cytokinininy podléhají syntéze v různých částech rostliny (Sakakibara *et al.*, 2006). Při transportu cytokininů xylémem se primárně uplatňují *trans*-zeatinribosidy (*tZR*), které v kořeni slouží jako akropetální signály (Kuroha *et al.*, 2002). Naopak ve floému je cytokininový tok bazipetální a majoritní část je zastoupena isopentenyladeniny (*iP*) typy isopentenylribosidy a isopentenylribotidy (Kudo *et al.*, 2010).

ABC transportní proteiny jsou jedna z největších transportních proteinových rodin vůbec, u rostlin jsou ABC transportéry v porovnání s ostatními organismy hojně zastoupeny a jsou lokalizovány na plazmatické membráně (Durán-Medina *et al.*, 2017). V roce 2014 dvě na sobě nezávislé skupiny pod vedením Koa a Zhanga oznámili objev

možného transportéru cytokininů ABCG14 z rodiny ABC (angl. ATP Binding Cassette) transportních proteinů. K tomuto objevu přispěla mutace genu *AtABCG14* u *Arabidopsis thaliana*, která vedla k defektu akropetálního transportu *tZ* na dlouhou vzdálenost, to se projevilo jeho nadměrnou akumulací v kořenech a výrazným poklesem koncentrace v prýtu (Ko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

V pokusech s *ipt* mutantními a divokými formami *Arabidopsis thaliana* Matsumoto-Kitano *et al.* (2008) prokázali přítomnost toku cytokininů *iP* a *tZ* mezi kořenem a prýtem. To bylo potvrzeno analýzou čtyřnásobného mutantu v genech *AtIPT1*, 3, 5, 7 s deaktivovanými geny pro biosyntézu cytokininů, kde se narušila proliferace kambia a následně došlo k redukci prýtů a kořenů. Tyto morfologické změny byly důkazem absence *iP* a *tZ* v prýtu a kořenu a vedly k myšlence, že mezi kořenem a prýtem musí docházet k transportu cytokininů.

V roce 2001 Takei *et al.* zjistili, že množství nahromaděných cytokininů souvisí s přítomností a koncentrací dusíku nacházejícího se v půdě. Analýza probíhala na kukuřici s nedostatkem dusíku, po exogenním přidavku dusičnanů byl sledovatelný nárůst cytokininů již po 1 h nejprve v kořeni, postupně v xylému a na závěr v listech, čímž prokázali, že cytokininy skutečně působí jako signální molekuly na dlouhou vzdálenost mezi kořenem a prýtem v kooperaci s NO_3^- (Takei *et al.*, 2001).

4.1.7.2 Transport cytokininů přes plazmatickou membránu

Při transportu přes plazmatickou membránu mohou cytokininy putovat přímo do lumenu endoplazmatického retikula, centra percepce cytokininů (Wulfetange *et al.*, 2011). U *Arabidopsis* se na přenosu různých forem cytokininů uvnitř buňky pravděpodobně podílí rodiny proteinů PUP (angl. Purine permease) a ENT (angl. Equilibrative nucleoside transporter).

Rodina proteinů PUP má zastoupení pouze v rostlinné říši a předpokládanými transportéry jsou *AtPUP1* a *AtPUP2* schopné přenášet cytokininy ve formě aktivních volných bází *tZ* a *iP* přes membránu za pomoci vodíkových protonů H^+ (Gillissen *et al.*, 2000; Burkle *et al.*, 2003). U rýže (*Oryza sativa*) mezi importéry cytokininů řadíme i *OsPUP7*, který se v pokusech jeví jako selektivní transportér, čemuž napovídá zvýšená hladina *iP* a *iPR* v nezralých klasech oproti nezměněné úrovni *tZ* a *tZR* (Qi a Xiong, 2013). Nedávná studie Zürcher *et al.*, (2016) použitím značeného *tZ*

odhalila další možný přenašeč *AtPUP14*, ten je exprimován v různých vývojových stádiích a tkáních. Studie také naznačuje, že by mohl hrát roli i v inhibici signálních drah cytokininů.

Transportér nukleosidů ENT zprostředkovává přenos ribosidů iP a ribosidů tZ (Hirose *et al.*, 2008). Transportér ENT nacházíme kromě rostlin i v jiných organismech, u *Arabidopsis* je doposud známo 8 genů *AtENT1* - *AtENT8* (Li *et al.*, 2003). Další analýzou skupiny genů ENT pomocí kvasinkového systému byl u rýže (*Oryza sativa*) objeven transportérový gen *OsENT2* s vysokou afinitou k adenosinu, exprimován převážně v kořenech (Hirose *et al.*, 2005).

4.2 Teplotní stres a rostliny

Změny teplot jsou jedním z nejdůležitějších environmentálních faktorů, které významně ovlivňují vývoj a růst všech organismů. Obecně můžeme žijící organismy klasifikovat do tří skupin dle jejich teplotního optima: psychrofilů (teplota nižší než 16 °C), mezofilů (teplota mezi 15 °C a 40 °C) a termofilů (teplota vyšší než 45 °C). Většinu vyšších rostlin řadíme do skupiny mezofilů, jejíž optimální teplota růstu se nachází mezi teplotami 10 °C a 30 °C (Žróbek-Sokolník, 2012). Jakmile v okolním prostředí nastane zvýšení teploty obvykle o 10-15 °C, dojde v rostlinách k překročení fyziologické meze, které vedou k ireverzibilním změnám růstu a vývoje rostlin. Tento proces definujeme jako teplotní stres (Wahid *et al.*, 2007).

4.2.1 Působení teplotního stresu na rostliny

Vliv zvýšené teploty na rostliny je často považován za nejdůležitější limitující faktor růstu a vývoje rostlin. Tento faktor vede k různým změnám na morfologické, anatomické, fyziologické či hormonální úrovni. Aklimatizaci rostlin ke zvýšené teplotě chápeme především jako mechanismus optimalizující fyziologické a vývojové procesy, jejímž hlavním cílem je zachování vitality rostlin (Van Zaten *et al.*, 2013). Dynamika aklimatizace rostlin na teplotní změny je podle Atkin *et al.* (2006) závislá na druhu rostlin. A těmi jsou především rostliny s krátkým životním cyklem, které jsou schopné rychlé aklimatizace k prostředí, vhodnými modelovými rostlinami jsou jednoletky například *Arabidopsis thaliana*.

V experimentu z roku 1998 tým Gray *et al.* prokázal, že působením zvýšené teploty (27 °C) u *Arabidopsis thaliana* bylo indukováno rapidní prodlužování hypokotylu rostlin. Taktéž byla prokázána zvýšená hladina bioaktivního auxinu IAA v rozmezí teplot 20-29 °C (Gray *et al.*, 1998). Možné zapojení auxinu do prodlužování hypokotylu bylo podpořeno studií mutanta s deficiencí v genu *TAA1/TIR2* (angl. *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS/TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 2*) zodpovědného za biosyntézu auxinu v odpovědi na teplo (Yamada *et al.*, 2009). Dalším rostlinným regulátorem zapojujícím se do prodlužování hypokotylu za zvýšené teploty je kyselina giberelinová. Ta se tohoto procesu účastní zejména v rané fázi prodlužování hypokotylu. Začlenění kyseliny giberelinové do prodlužování hypokotylu bylo prokázáno analýzou transkriptů enzymů zapojených do její biosyntézy; hladina kyseliny giberelové vzrostla společně s rostoucí teplotou (Stavang *et al.*, 2009).

Mimo rostlinné regulátory se do odpovědi rostlin na zvýšenou teplotu v rozmezí od 22 °C do 29 °C podílí transkripční faktor PIF4, který působí jako specifický regulátor termomorfogeneze (Koini *et al.*, 2009). PIF4 byl původně objeven jako represor vyhnutí se zastínění („shade-avoidance“) (Huq a Quail, 2002). Pozdější studie u mutanty *pif4* ukázaly, že PIF4 stimuluje hladinu IAA za podmínek zvýšené teploty (Franklin *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2012).

4.2.2 Proteiny teplotního šoku (HSP – angl. Heat Shock Protein)

Vystavení rostlin vlivům zvýšené teploty vede k syntéze specifických proteinů teplotního šoku, jejichž hlavní úlohou je chránit nukleové kyseliny a geneticky významné orgány jako je například jádro před ireverzibilními změnami struktury. Proteomické odpovědi rostlin na teplotní stres byly studovány například na rýži, pšenici nebo ječmenu, mimo obiloviny byly vlivy studovány na *Arabidopsis thaliana* či topolu eufratském (Neilson *et al.*, 2010).

Proteiny tepelného šoku byly poprvé identifikovány roku 1979 u *Drosophila melanogaster* (Ashburner a Bonner, 1979). V buňce jsou HSP lokalizovány v jádře, cytosolu, mitochondriích, chloroplastech nebo endoplazmatickém retikulu (Boston *et al.*, 1996). Rozdělujeme je do pěti tříd dle jejich velikostí: HSP110, HSP90 (80–95kD), HSP70 (63–78 kD), HSP60 (53–62 kD) a nízkomolekulární (LMW) HSP (14–30 kD) (Murthy *et al.*, 2016). Komplementační studií Keelera *et al.* (2000) byla dokázána funkce proteinu teplotního šoku HSP100 mutanta kvasinky s delecí v HSP104, v níž

došlo ke ztrátě termotolerance. Následnou komplementací standardní variantou genu HSP100 z *Arabidopsis* byla opět navozena termotolerance kvasinky (Keeler *et al.*, 2000).

Pro jednotlivé typy proteinů teplotního šoku jsou určeny konkrétní rodiny genů (*AtHSP110*, *AtHSP90*, *AtHSP70* aj.). Aktivace těchto genů je podmíněna zvýšenou teplotou a opakujícími se konzervativními motivy 5'-nGAAn-3' v protomotorových úsecích (Nishizawa *et al.*, 2006). K vazbě na specifické místo jsou potřeba nejméně 3 opakující se motivy v odlišných orientacích (Schöffl *et al.*, 1998). Odpovědí rostlin ke zvýšené teplotě o 10-15 °C nad prahovou hodnotu je zahájení transkripce a translace typů mRNA pro proteiny teplotního šoku. Ve všech buňkách jsou obsaženy tzv. molekulární chaperony (proteiny příbuzné k HSP) fungující jako HSP. Molekulární chaperony jsou v buňkách klíčovými prvky pro skládání, translokaci a degradaci proteinů, a zároveň jsou zodpovědné za stabilizaci proteinů a buněčných membrán (Wang *et al.*, 2004). Během tepelného šoku se hladina těchto HSP zvyšuje a translace původních proteinů ustává. Na daná specifická místa promotoru (HSE – angl. Heat Shock Element) se naváže regulační protein aktivovaný tepelným šokem označovaný HSF (angl. Heat Shock Transcription Factor), čímž dojde k aktivaci veškerých obranných mechanismů (Al-Waibi, 2011).

5 MATERIÁL A METODIKA

Experimentální část diplomové práce byla věnována vlivu mírně zvýšené teploty 29 °C na klíčící rostliny *Arabidopsis thaliana*. Experiment byl rozdělen na 3 části. V první části byla sledována kinetika růstu po dobu 7 dní, společně s morfologií klíčících rostlin po 7 dnech kultivace. Druhá část práce zahrnuje analýzu hladin genové exprese markerových genů cytokininů stanovené metodou RT-qPCR. Byly stanoveny geny regulátorů odpovědi *ARR5* a *ARR7*, geny zapojené do metabolismu cytokininů *IPT2-9*, *LOG1*, 3-6, 8 a poslední řadě geny zajišťující cytokininovou degradaci *CKX1-7*. V třetí části byly stanoveny hladiny cytokininů ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky na pracovišti Laboratoře růstových regulátorů v Olomouci. Veškeré experimenty probíhaly za podmínek mírně zvýšené teploty 29 °C za snížené intenzity světla (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

5.1 Rostlinný materiál a jeho kultivace

Vliv účinku mírně zvýšené teploty na morfologii semenáčků a expresi genů zapojených do metabolismu cytokininů byl sledován na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Columbia, Col-0). V prvním kroku experimentu bylo připraveno živné $1/2$ Murashige a Skoogovo médium (Duchefa) s 1% agarem (Duchefa). V médiu byla provedena úprava pH přidávkem 1M roztoku KOH na hodnotu v rozmezí 5,7 – 5,8. Sterilita kultivačního média byla zajištěna autoklávováním. Použitá semena byla povrchově sterilizována 75% etanolem po dobu 5 minut. Následně byla umístěna do laminárního boxu, který zabezpečuje sterilní prostředí pro její výsev. Semena byla vysušena na filtračním papíře a vyseta na kulaté Petriho misky. U experimentu zaměřeného na zkoumání kinetiky růstu byl do médií přidán *tZ* a dimethylsulfoxid (DMSO), přičemž do první poloviny médií byl přidán *trans*-zeatin rozpuštěný v DMSO a do druhé poloviny pro kontrolní rostliny bylo přidáno jen DMSO. Semena byla vyseta na živné médium do řady zhruba po deseti semenech na jednu 8x8cm Petriho misku. Poslední krokem v laminárním boxu bylo oblepení misek polopropustnou náplastí Medipor. Takto oblepené misky jsou odolné vůči kontaminaci z vnějšího okolí.

Připravené misky s vysetými semeny byly umístěny do lednice o teplotě 4 °C po dobu tří dnů pro stratifikaci semen. Po uplynutí tří dnů byly misky přesunuty do

kultivačního boxu (Percival Scientific, Inc.). Misky byly umístěny kolmo (vertikálně) k podložce boxu.

Kultivace rostlin pro analýzu exprese genů cytokininů probíhala pouze v podmínkách mírného teplotního stresu při 29 °C. V kultivačním boxu byly rostliny vystaveny režimu dlouhého dne (16 h světla/8 h tma) při intenzitě světla 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Po 3denní kultivaci byly klíčící rostliny sbírány v časové řadě v bodech 2 h, 4 h, 8 h, 12 h a 24 h. Nezbytnou součástí sběru byla rychlost sběru a okamžité zmrazení v tekutém dusíku. Takto zmrazené vzorky byly před analýzou uchovány v hlubokomrazícím boxu až do izolace RNA.

Kultivace rostlin pro analýzu sledování kinetiky změn morfometrických parametrů probíhala za podmínek standardní teploty při 20 °C a mírného teplotního stresu při 29 °C. Kultivační média byla rozdělena na dvě poloviny, jedna polovina médií byla obohacena přídavkem *tZ* a druhá polovina pouze DMSO. Rostliny byly stejně jako v předchozím experimentu kultivovány za stejných podmínek intenzity světla 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a stejného režimu dlouhého dne (16 h světla/8 h tma). Petriho misky se semeny byly kultivovány po dobu 7 dní, přičemž sběr rostlin byl prováděn každý den v tutéž hodinu. Každý den (1 den růstu, 2 dny růstu, 3 dny růstu, 4 dny růstu, 5 dní růstu, 6dní růstu, 7 dní růstu) byly sbírány 4 varianty misek, jednotlivá varianta byla zastoupena dvěma miskami (Tab. 1).

Tab. 1: Jednotlivé varianty rostlin pro analýzu kinetiky růstu morfologických znaků:

Varianta	Ošetření	Teplota
1	DMSO (kontrola)	20 °C
2	DMSO (kontrola)	29 °C
3	10 μM <i>tZ</i>	20 °C
4	10 μM <i>tZ</i>	29 °C

Po každodenní kultivaci po dobu 7 dní bylo provedeno fotografování jednotlivých misek. Vyklíčené rostliny na miskách byly před samotným fotografováním urovnané do pozic vhodných pro následující měření délky hypokotylů v programu ImageJ. Hodnoty získané z programu ImageJ byly zpracovány v programu Microsoft Excel.

5.2 Homogenizace rostlinného materiálu a izolace RNA

Navážka rostlinného materiálu na každý vzorek byla přibližně 80 mg, navážka materiálu větší než 100 mg by mohla vést k významné redukci výtěžnosti a kvality izolované RNA. Pro analýzu exprese genů byly vzorky homogenizovány pomocí tekutého dusíku a následně byly umístěny na homogenizátor MM400 (Retsch GmbH, Německo). Izolace RNA byla provedena pomocí komerčního kitu RNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN.

Do mikrozkušavek s homogenizovanými vzorky bylo napipetováno 450 μ l RLT pufru s přidavkem β -merkaptoethanolu a důkladně zvortexováno. Vzorky byly krátce inkubovány po dobu 3 minut při 56 °C, což pomohlo rozrušit pletivo. Lyzát byl přenesen do QIAshredder spin kolonky (fialové), umístěné do 2 ml sběrné zkumavky. Vzorky byly centrifugovány při 12 000 [ot./min.]. Supernatant byl bez peletu přenesen do 1,5ml zkumavky a k lyzátu bylo přidáno 220 μ l ethanolu (96-100%). Vzniklý extrakt byl přenesen, včetně sraženin vzniklých přidáním ethanolu, do RNeasy kolonky (růžové) umístěné v 2ml sběrné zkumavce. Následná centrifugace probíhala po dobu 15 sec při 14 000 [ot./min.]. Proteklá část byla vylita a sběrná zkumavka byla použita i v dalším kroku. Po promytí bylo přidáno 350 μ l RW1 pufru do RNeasy kolonky a centrifugováno dobu 15 sec při 14 000 [ot./min.], aby se promyla membrána. Proteklá část byla vylita a sběrná zkumavka byla použita i v dalším kroku. Po centrifugaci byly vyprázdněny sběrné zkumavky a pro odstranění kontaminující DNA byla přidána DNasa I v RDD pufru a ponechána 15 minut při pokojové teplotě. Po uplynulých 15 minutách bylo na kolonky přidáno 250 μ l RPE pufru a opět byla provedena centrifugace vzorků po dobu 1 min při 10 000 [ot./min.]. Poté byl předchozí krok zopakován. Po dvojité centrifugaci byly RNeasy kolonky přeneseny do 1,5ml sběrné zkumavky. Přidáním 30 μ l RNeasy-free water (zbavené RNas) přímo na membránu kolonky byla provedena eluce RNA. Pro vymytí RNA byla provedena centrifugace po dobu 1 min 10 000 [ot./min.] a následně byl tento krok zopakován. Koncentrace a čistota vyizolované RNA byla stanovena spektrometricky pomocí NanoDrop2000 (Thermo Scientific). Purifikovaná RNA byla skladována při -20 °C v RNase-free water. V těchto podmínkách lze vzorky RNA skladovat po dobu 1 roku.

5.3 Reverzní transkripce RNA na cDNA

Reverzní transkripce je enzymová reakce, která umožňuje přepis RNA do komplementární DNA (cDNA). Tato reakce je katalyzována enzymem reverzní transkriptázou.

V prvním kroku byla namíchána reakční směs složená z jednotlivých komponentů dle Tab. 2.. Reakční směs byla inkubována na cykleru po dobu 10 min při teplotě 65 °C z důvodu rozvolnění sekundárních struktur mRNA. Abychom zabránili vzniku vyšších struktur RNA, vzorky byly po inkubaci okamžitě zchlazeny v ledové tříšti. V druhém kroku byly přidány poslední komponenty reakční směsi dle Tab. 3 a inkubovány v cykleru po dobu 55 min při 42 °C. Inaktivace reverzní transkriptázy proběhla teplotní inaktivací při teplotě 70 °C po dobu 10 min.

Tab. 2: Složení reakční směsi I

Složka	Objem [μl] na 1 reakci
H ₂ O	25 μl
Primer dNTP	3 μl
Primer RTP	3 μl
Vzorek RNA [1ug/ul]	1 μl
Celkem	32 μl

Tab. 3: Složení reakční směsi II

Složka	Objem [μl] na 1 reakci
RT pufr	8 μl
SuperScript III Reverse transcriptase	1 μl
Celkem	9 μl

5.4 Kvantitativní real-time PCR (RT-qPCR)

RT-qPCR umožňuje přímou kvantifikaci cDNA v průběhu reakce, která byla získána reverzní transkripcí RNA. Principem metody RT-qPCR je zaznamenávání PCR produktů v reálném čase tzn. bezprostředně po jejich vzniku a v každém jednotlivém cyklu reakce. Kvantitativní detekce produktů je založena na emisi světla fluorescenční značky, v našem případě se pro vizualizaci využila fluorescenčně značená sonda UPL (z angl. Universal Probe Library). UPL sondy jsou založeny na systému 165 krátkých hydrolytických sond, které jsou značeny na 5' konci fluoresceinem (FAM) a na 3' konci zhášečem.

Prvním krokem reakce bylo namíchání reakční směsi Master Mixu dle Tab. 4. Pro jednotlivé Master Mixy byli použity odlišné primery F a R, které specifikovaly oblast zkoumaných genů.

Tab. 4: Složení reakční směsi Master Mixu pro RT-qPCR

Složka	Objem [μl]
UPL sonda	3,08 μl
Primer F	3,08 μl
Primer R	3,08 μl
MM (Master Mix) pufr	77 μl
voda	29,3 μl
Celkem	115,54 μl

Reakční směs Master Mixu o objemu 115,54 μl a jednotlivé vzorky cDNA o objemu 25 μl byly napipetovány na 96-ti jamkovou destičku. Následně byly vzorky rozpipetovány na 384 jamkovou destičku pomocí pipetovacího stroje Innovadyne NANODROP II. Každý vzorek byl na destičku nanášen ve dvou technických opakováních. Takto připravená destička byla vložena do termocycleru LightCycler 480 II (Roche) s nastaveným teplotním programem Monocolor Hydrolysis Probe.

Normalizace reakce byla stanovena programem geNorm, který na základě geometrického průměru umožňuje stanovit normalizační faktor genové exprese vzorků pomocí referenčních genů (Vandesompele *et al.*, 2002). Jako referenční geny byly

použity *elongační faktor 1 (EF-1 α)*, *ubikvitin 10 (UBQ10)* a *aktin 2 (ACT2)*. Sekvence všech použitých primerů v RT-qPCR jsou uvedeny v Přílohách (viz kapitola 12). Výsledky byly zpracovány programem Microsoft Excel. Statistická analýza rozdílů mezi jednotlivými variantami ošetření oproti kontrole byla provedena Studentovým t-testem. Významná statistická signifikace byla stanovena na hladině pravděpodobnosti $p < 0,05$.

5.5 Kvantifikace cytokininů

Analýza endogenních hladin cytokininů byla stanovena na Univerzitě Palackého v Olomouci ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky na pracovišti Laboratoře růstových regulátorů. Stanovení cytokininů proběhlo použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie následovanou tandemovou hmotnostní spektrometrií. Výsledky endogenních hladin cytokininů v kořenech a hypokotylech jsou reprezentovány třemi biologickými vzorky. Podrobný popis celé metodiky je popsán Svačinovou *et al.* (2012).

Pro analýzu hladin endogenních cytokininů byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* typu Col-0. Analýza byla provedena pro vzorky kultivované za podmínek standardní teploty 20 °C a mírně zvýšené teploty 29 °C v časových bodech 4 h, 8 h, 12 h a 24 h.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

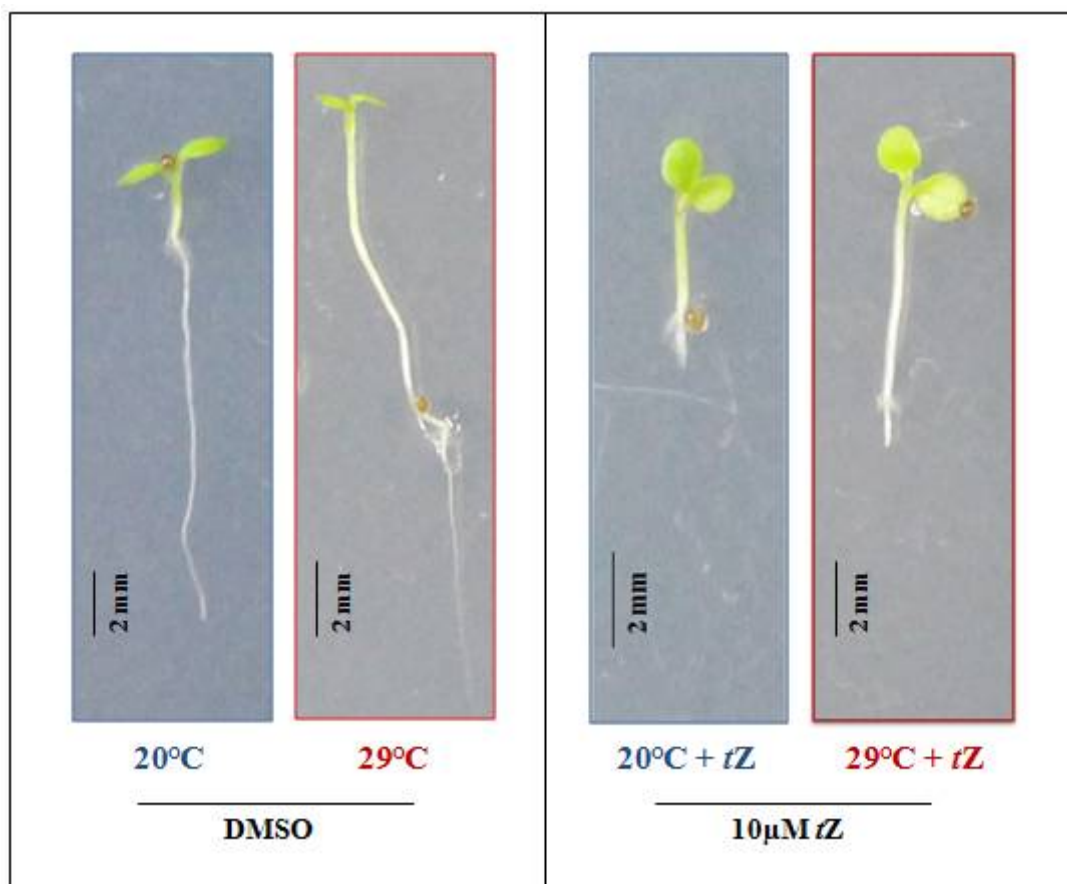
Je známo, že rostliny vzhledem ke svému přisedlému životu, byly nuceny se během evoluce adaptovat na různé stanoviště. K adaptaci rostlin na dynamicky se měnící prostředí bylo nezbytné vytvořit komplexní systém, který je schopný vnímat a reagovat na vnější podněty. Velice významným podnětem provázejícím evoluci rostlin je teplota. Většina dosud publikovaných studií se zabývá otázkou teplotního stresu (cca 30-40 °C) například z hlediska proteomické, transkriptomické nebo hormonální odpovědi rostlin. Na druhou stranu je již méně pozornosti věnováno podmínkám mírně zvýšené teploty. Jedním z pilířů komplexního systému rostlin jsou rostlinné regulátory. Bylo prokázáno, že na odpovědi rostlin na teplotní stres se podílí auxiny, brassinosteroidy, gibbereliny a dále i ABA (Gray *et al.*, 1998; Larkindale *et al.*, 2005). Avšak studie publikované v posledních letech prokázaly, že dalšími rostlinnými regulátory zapojeného do teplotní odpovědi rostlin jsou i cytokininy (Černý *et al.*, 2014; Skalák *et al.*, 2016). Experimentální část diplomové práce je z tohoto důvodu věnována právě roli cytokininů v odpovědi na mírně zvýšenou teplotu.

6.1 Porovnání morfometrických parametrů klíčnic rostlin *Arabidopsis thaliana* za podmínek standardní a mírně zvýšené teploty s *tZ*

Morfometrické parametry byly stanoveny u klíčnic rostlin *Arabidopsis thaliana* ekotypu Col-0 za podmínek nízké intenzity světla ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). V experimentu byl porovnáván vliv standardní teploty 20 °C a mírně zvýšené teploty 29 °C s přídatkem 10 μM *tZ* na morfometrické parametry klíčnic rostlin. Studovaná látka zájmu *tZ* byla rozpuštěna v DMSO. Pro kontrolní rostliny bylo do média přidáno pouze rozpouštědlo DMSO (výsledná koncentrace 0,002%), aby jedinou proměnnou mezi médii byla pouze přítomnost *tZ*.

Pro sledování morfometrických změn byl vybrán hypokotyl. Hypokotyl je obecně ideální pro studium interakce různých faktorů z důvodu prodlužování buněk, a tedy poměrně jednoduchého růstu. Působení zvýšené teploty 29 °C bez přídatku *tZ* můžeme pozorovat na změně fenotypu klíčnic rostlin (Obr. 5). V porovnání se standardní teplotou 20 °C bez přídatku *tZ* mají klíčnic rostliny *Arabidopsis* až pětinašobně prodloužený hypokotyl. Podobný účinek byl prokázán již v roce 1998, kdy rostliny při teplotě 28/29 °C vykazovaly taktéž výrazně prodloužený hypokotyl, dále hyponastii

listů a sníženou produkci biomasy (Gray *et al.*, 1998). Se stejnou fenotypovou odpovědí prodlužování hypokotylu se v přírodě setkáváme během morfogeneze klíčnicích rostlin ve tmě tzv. skotomorfogeneze (Josse *et al.*, 2008). Zároveň během skotomorfogeneze u rostlin dochází k výrazné redukci kořenů, obě tyto morfologické odpovědi se dějí za účelem rychlejšího dosažení světla. Již před lety byl zjištěn vliv cytokininů během přechodu rostlin mezi skotomorfogenezí a fotomorfogenezí (vývoj na světle) (Chory *et al.*, 1994). Zapojení cytokininů do fotomorfogeneze bylo prokázáno exogenní aplikací cytokininu u klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana* kultivovaných ve tmě. Důkazem byly odpovědi rostlin korespondující s fotomorfogenezí: inhibice prodlužování hypokotylu, iniciace vývoje listů, otevření kotyledonů a exprese genů regulovaných světlem (Lochmanová *et al.*, 2008). Studie Sweere *et al.* z roku 2001 dokázala, že ARR4 interferují s signálizací červeného světla pomocí fytochromů PHYB, které primárně slouží jako světelné senzory pro červené světlo. ARR4 modulují hladiny PHYB tak, že stabilizují aktivní Pfr formu PHYB.



Obr. 5: Fenotyp klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana* po 7denní kultivaci při teplotách 20 °C a 29 °C bez a s přidavkem *tZ*. Na obrázku jsou zobrazeny reprezentativní rostliny kultivované na médiu bez přidavku látky zájmu *tZ* (vlevo) a s přidavkem 10 μ M *tZ* (vpravo).

Na rostlinách kultivovaných při teplotách 20 °C a 29 °C na médiu s přidavkem 10 μ M *tZ* jsou v porovnání s kontrolními rostlinami bez přidavku *tZ* patrné morfologické rozdíly. Jedním z rozdílů oproti kontrolním rostlinám u obou variant 20 °C a 29 °C s *tZ* jsou kořeny, které byly asi jedenáctinásobně zkráceny. Efekt zkrácených kořenů není redukován teplotou. Aplikací exogenního cytokininu 10 μ M *tZ* bylo dosaženo regulace hladin endogenních cytokininů. Regulace hladin cytokininů vede k zvýšené expresi genu *IPT*, který vede k inhibici kořenového růstu (Kuderová *et al.*, 2008). U rostlin kultivovaných za podmínek mírně zvýšené teploty 29 °C se opakuje stejný fenotypový projev jako u kontrolních rostlin bez *tZ* (prodloužený hypokotyl). Hypokotyly varianty 29 °C s *tZ* byly asi třikrát delší oproti variantě 20 °C s *tZ*. Jak bylo zmíněno výše, elongace hypokotyly vyvolaná teplotou u kontrolních rostlin byla až

5× vyšší. Cytokininy tedy inhibují dlouhivý růst hypokotylu indukovaný vysokou teplotou. Dlouhivý růst hypokotylu je z hormonálního hlediska regulován zejména auxiny, brassinosteroidy a gibereliny (Gray *et al.*, 1998) a dle studie z posledních let také cytokininy (Černý *et al.*, 2014). K tomuto morfologickému jevu dochází během zvýšení teploty 28 °C nad optimální hranici, což rostlině pomáhá k vytvoření většího rozestupu mezi listy a napomáhá významnému ochlazení rostliny uvolňováním páry z průduchů (Crawford *et al.*, 2012). Souhrně nazýváme vliv zvýšené teploty vnějšího okolí na změnu morfologie rostlin termomorfogeneze.

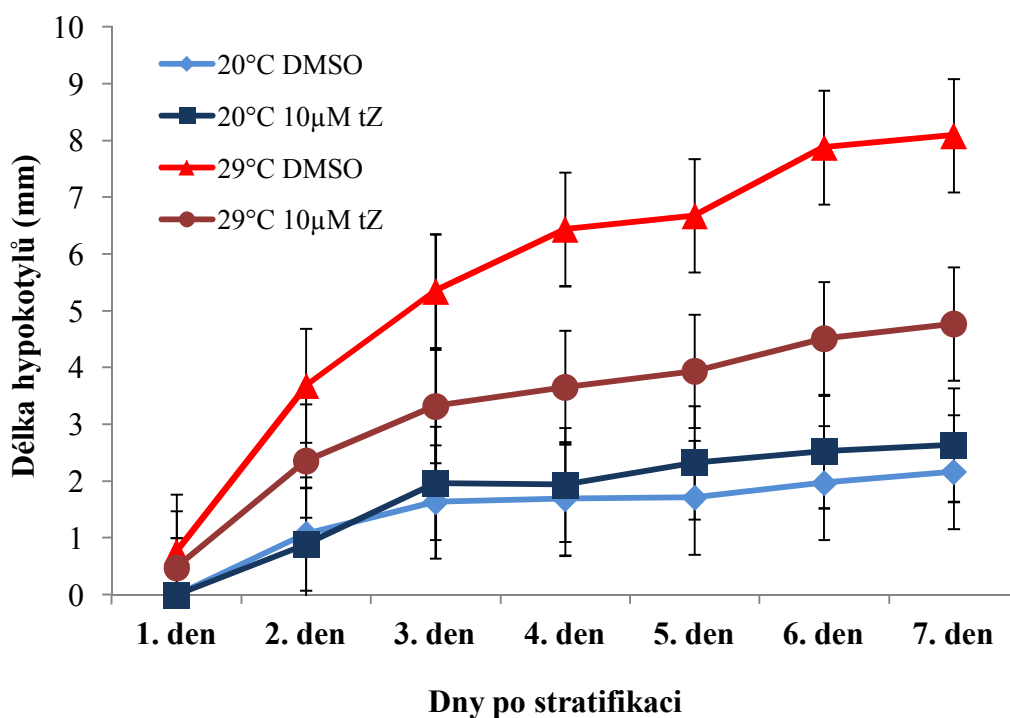
6.2 Cytokininy modulují růst hypokotylu v závislosti na mírně zvýšené teplotě 29 °C

Kinetika růstu délky hypokotylů byla sledována u *Arabidopsis thaliana*. Po stratifikaci byla semena přenesena do podmínek standardní teploty 20 °C a mírně zvýšené teploty 29 °C. Význam zvýšené hladiny cytokininů na růst hypokotylu byl sledován na rostlinách s exogenně přidaným *tZ* o finální koncentraci 10μM *tZ* a pro kontrolní rostliny byly použity média bez *tZ*. Kinetika růstu byla sledována po dobu 7 dní. Délka hypokotylů byla měřena vždy ve stejný čas jednotlivé dny: 1. den, 2. den, 3. den, 4. den, 5. den, 6. den, 7. den.

Z bodového grafu (Obr. 6) je viditelné, že 1. den růstu nedochází u žádných z variant k žádnému výraznému růstu. Ve variantě 20 °C s přídavkem *tZ* oproti variantě 20 °C bez *tZ* nebyl od 1. – 3. dne růstu zaznamenán zvýšený nárůst hypokotylů, ten byl pozorován až v následujícím 4. dni růstu. Výrazný nárůst hypokotylů byl zaznamenán u variant se zvýšenou teplotou 29 °C, především u kontrolní varianty 29 °C. Aplikace *tZ* způsobila snížení elongace hypokotylů při 29 °C; tento fenomén byl patrný již u 2denních semenáčků. Nejintenzivnější nárůst hypokotylů u variant 29 °C byl pozorován 3. den růstu, proto byly pro pozdější analýzy genové exprese vybrány 3denní klíčící rostliny (viz kapitola 6.3.). Nárůst hypokotylů od 2. dne růstu k 3. dni růstu činil u varianty 29 °C bez *tZ* zvýšení o 45% a u varianty 29 °C s *tZ* zvýšení o 40%. Naopak redukce růstu hypokotylů byla zaznamenána ke konci kultivace rostlin 6 –7. den, kde byl průměrný nárůst hypokotylů v 7. dni oproti 6. dni asi 6%.

Studie Stavanga *et al.* (2009) ukázala, že v počáteční fázi odpovědi na zvýšenou teplotu, prodlužováním hypokotylu, jsou významnými regulátory gibereliny. Dalším

klíčovým regulátorem podílející se na dlouhivém růstu za zvýšené teploty jsou auxiny, což bylo dokázáno zvýšením hladiny aktivních auxinů IAA ve studii Gray *et al.* (1998). V této práci bylo zjištěno, že dalším hormonem, který se podílí na regulaci elongace hypokotylu v odpovědi na zvýšenou teplotu je cytokinin, který je ve vysokých koncentracích inhibítozem dlouhivého růstu hypokotylu. Na druhou stranu v práci Černého *et al.* (2014) bylo ukázáno, že mutanti v receptorech signalizace cytokininů měli rovněž oslabenou odpověď k teplotě tzn., že k zvýšení i snížení cytokininové signalizace vede ke snížení reakce na teplotu. K navození adekvátní odpovědi na teplo, tedy musí být signalizace CK v optimální hladině. Cytokininu rovněž aktivují růst za snížené teploty a působí tak v závislosti na teplotě (Xia *et al.*, 2009). Regulace elongace hypokotylů při zvýšené teplotě je podmíněna činností transkripčního faktoru PIF4 (Sun *et al.*, 2012). Za aktivaci PIF4 jsou zodpovědné brasinosteroidy a kyselina giberelinová, posléze je transkripčním faktorem PIF4 aktivován metabolismus buněčné stěny. To je zprostředkováno zvýšením exprese genů biosyntézy auxinů jako *TAA1* a *YUC8* (De Lucas *et al.*, 2014). Výsledky nedávné studie ukazují, že transkripce samotného transkripčního faktoru PIF4 je zprostředkována přes signalizační cytokininovou dráhu AHK-ARR1 a dokazuje, že cytokininu se zapojují i do regulace biosyntézy auxinů (Di *et al.*, 2016).



Obr. 6: Grafické znázornění kinetiky růstu délky hypocotylů u *Arabidopsis thaliana*. Jednotlivé body reprezentují průměrné hodnoty a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku naměřeného souboru. Označení DMSO představuje kontrolní rostliny. Statistická signifikance dat byla vyhodnocena ANOVA a následnou post-hoc analýzou (viz Přílohy kapitola 12 Tab. 2).

6.3 Exprese genů souvisejících s metabolismem a signální dráhou cytokininů

Relativní hladiny genové exprese byly stanoveny na 3denních klíčcích rostlinách *Arabidopsis thaliana* pomocí metody RT-qPCR. Z provedené analýzy kinetiky růstu (viz kapitola 6.2.) bylo zjištěno, že nejintenzivnější růst byl mezi 2. a 3. dnem růstu, proto byly vybrány 3denní klíčcí rostliny. V tomto bodě byla očekávána nejvyšší aktivita genů, které se na elongaci hypocotylu podílejí. Třídenní klíčcí rostliny byly vystaveny působení zvýšené teploty 29 °C a byly sbírány po dobu 2 h, 4 h, 8 h, 12 h a 24 h. Jako kontrolní rostliny posloužily rostliny kultivované při teplotě 20 °C. Expresse genů zájmu byla dále sledována s využitím online databáze ARAPORT

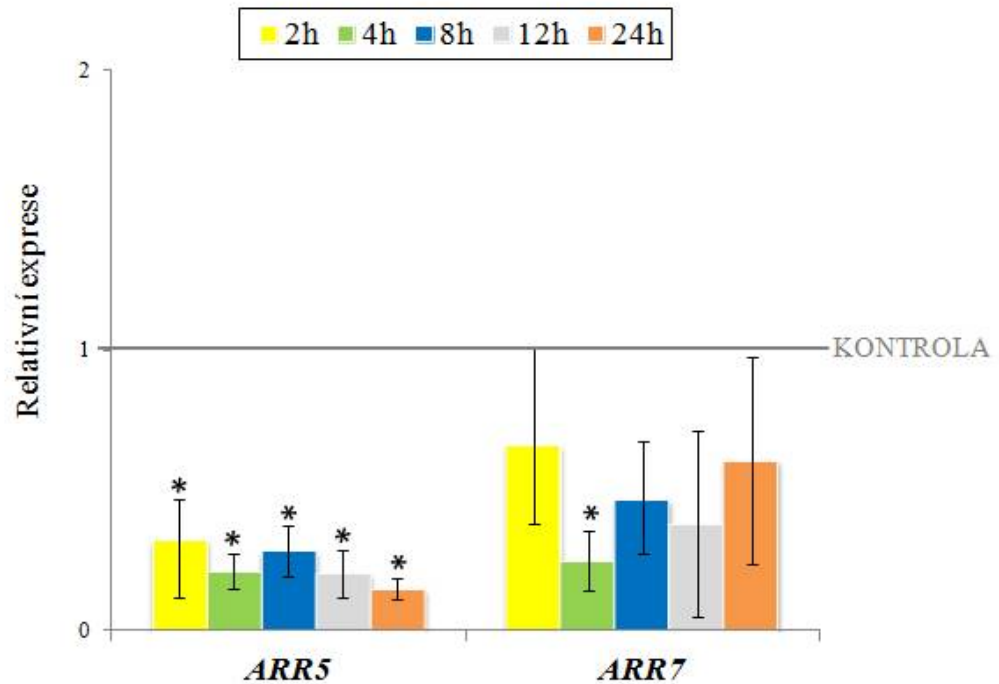
(ARABIDOPSIS INFORMATION PORTAL: <https://www.araport.org/>), kde je možné sledovat změny genové exprese u *Arabidopsis thaliana* v různých částech rostlin v podobných časových bodech jako v našem experimentu po dobu 24 h v porovnání s různými abiotickými stresy, především však s teplotním stresem 38 °C.

6.3.1 Exprese genů *ARR*

Pro analýzu genové exprese byly vybrány geny regulátorů odpovědi *ARR* typu A, jmenovitě *ARR5* a *ARR7*, které slouží jako transkripčními markery cytokininů (D'Agostino *et al.*, 2000; Brenner *et al.*, 2012). V cytokininové signální dráze *ARR* typu A slouží jako negativní regulátory odpovědi.

Stanovené relativní hladiny markerového genu *ARR5* byly statisticky významně odlišné ve všech časových bodech sběru naproti *ARR7*, kde byla statistická signifikance zaznamenána jen v bodě 4h (Obr. 8). U *ARR5* byl sledován pokles hladiny transkriptů od 2h po 24h, což naznačuje i pokles endogenních hladin cytokininů v odpovědi na teplotu. Pokles hladin *ARR5* byl prokázán i u experimentu Danilové *et al.* (2016) s *Arabidopsis*, kde byly rostliny vystaveny teplotnímu šoku 38 °C v různých časových intervalech po dobu 24h. *ARR5* má nejvyšší hladinu exprese v kořenech a v hypokotylech (D'Agostino *et al.*, 2000). Změny růstu v odpovědi na teplo jsou nejvýraznější právě u kořene a hypokotylu, proto je lákavé spekulovat, že sledované *ARR* typu A se v těchto orgánech podílejí na regulaci signální dráhy cytokininů. Databáze ARAPORT ukazuje, že v odpovědi na teplotní stres 38 °C nedochází k výrazným změnám v expresi genu *ARR5* v jednotlivých částech rostliny a taktéž ukazuje podobný profil snižování a zvyšování genové exprese *ARR7*. Avšak co je zajímavé, exprese genů *ARR5* a *ARR7* výrazně stoupne v reakci na chlad 4 °C v hypokotylu a kořeni, což dále ukazuje, že teplota je negativním regulátorem *ARR5* a *ARR7*. Řada výsledků tedy ukazuje, že hladina a signalizace cytokininů je teplotou negativně regulována – během tepla je hladina cytokininů snížena a během chladu je hladina cytokininů zvýšena, jak lze odvodit ze změn exprese markerů cytokininů (Obr. 8; Jeon *et al.*, 2010; Jeon a Kim, 2012) i přímého měření jeho hladiny (viz níže). Snížená hladina cytokininů u čtyřnásobného mutantu *ipt1, 3, 5, 7* a u *ipt8* koreluje se zvýšenou odolností k stresům zasolení a sucha (Nishiyama *et al.*, 2012; O'Brien a Benková, 2013). V přírodních podmínkách je rostlina vystavena typicky kombinaci více stresu a právě stres teplem je doprovázen současně i suchem. Proto navrhuji, že

snížení signální dráhy cytokininů je součástí adaptačních mechanismů při stresu teplem, suchem i její kombinaci.

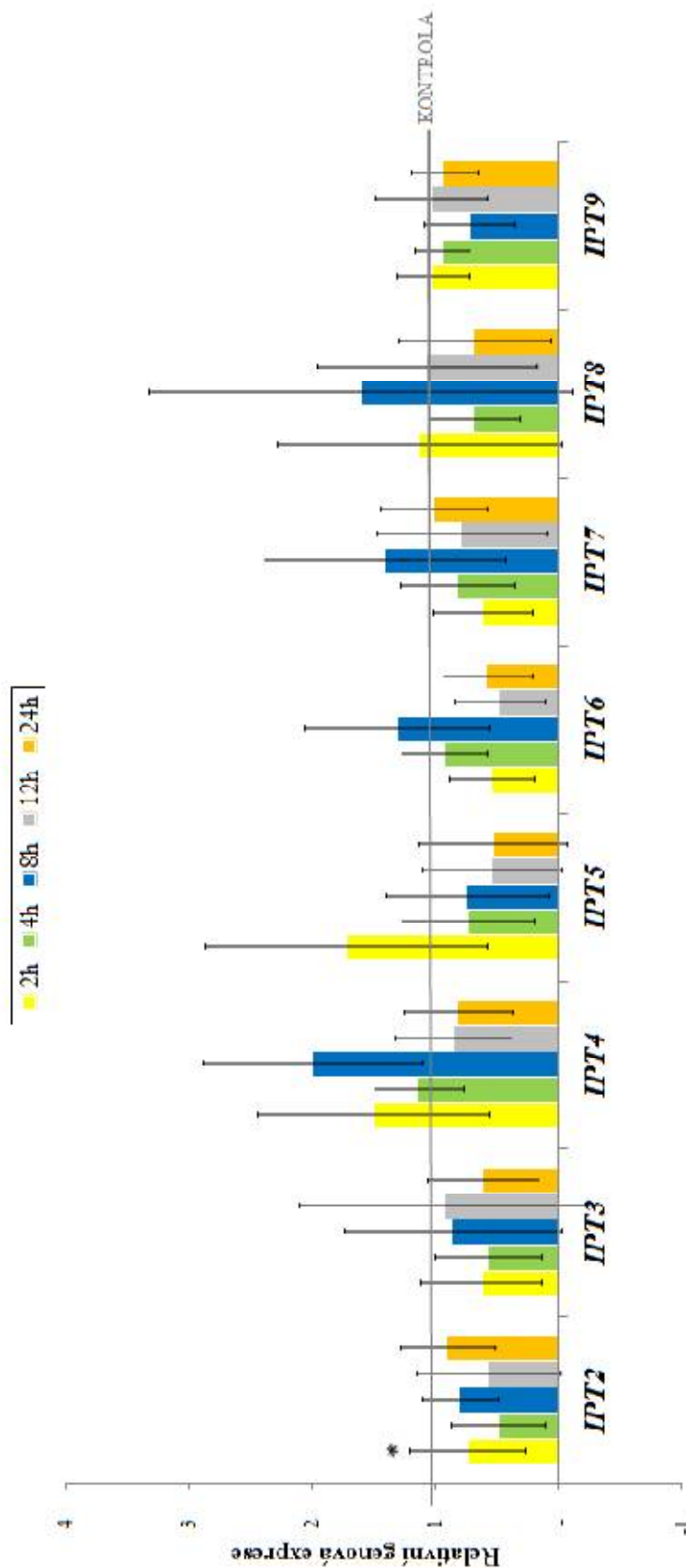


Obr. 8: Relativní hladiny genové exprese genů *ARR5* a *ARR7* za podmínek mírně zvýšené teploty 29 °C. Sloupce reprezentují relativní hladinu genové exprese a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hvězdičky označují statisticky signifikantní rozdíl po působení zvýšené teploty oproti kontrole ($p < 0,05$).

6.3.2 Exprese genů *IPT*

Na začátku metabolické kaskády vzniku aktivních cytokininů stojí geny *IPT*, které jsou schopné připojovat isoprenoidní řetězec do polohy N⁶ na AMP, ADP nebo ATP. Hladiny genů *IPT* jsou klíčovými geny pro regulaci hladin endogenních cytokininů. Metodou RT-qPCR byly detekovány geny *IPT2-9*, vyjma genu *IPT1*, který je obecně v rostlinném těle v malém množství, avšak nejvíce je exprimován v prašnicích. Vzhledem k tomu, že analýza probíhala na 3denních klíčících rostlinách, prašníky zatím nebyly přítomny a to byl patrně důvod, proč byl gen *IPT1* nedetekovatelný.

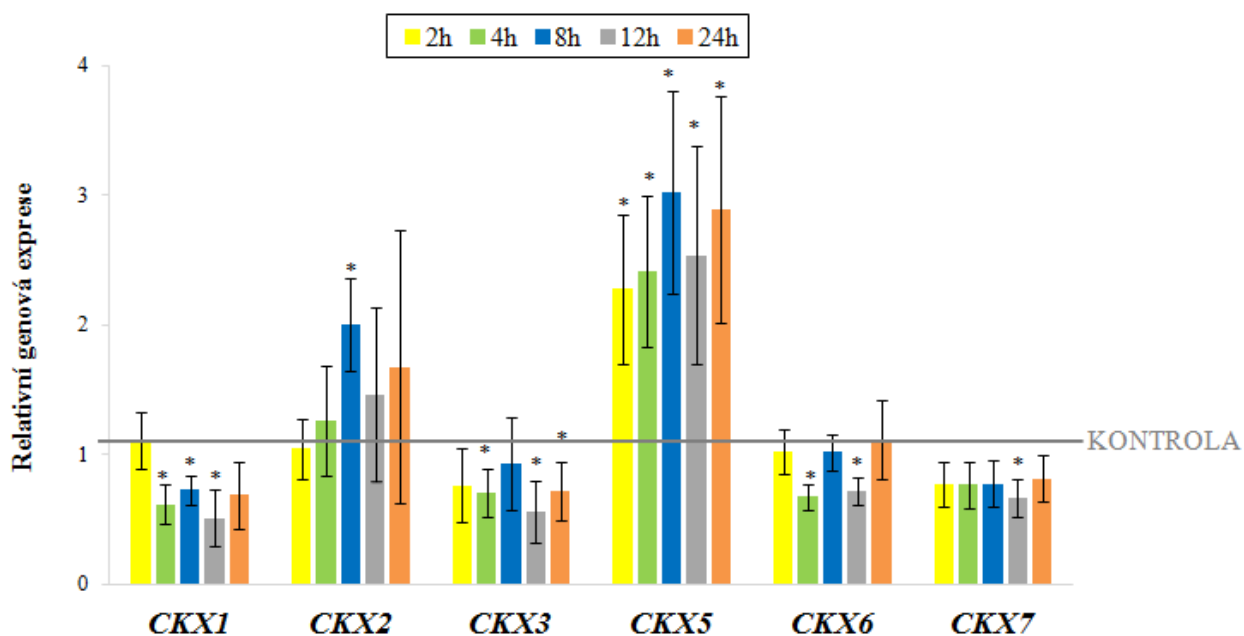
Exprese genů *IPT* nebyla v odpovědi na teplotu regulována s výjimkou podregulace *IPT2* po 2h působení tepla. Nejvýznamější isoforma *IPT*, *IPT3* byla snížena ve všech časových bodech, nicméně toto snížení nebylo signifikantní. Podregulaci *IPT3* v odpovědi na zvýšenou teplotu dále potvrzují data v databázi ARAPORT. Snížená exprese *IPT3* tedy může představovat jeden z mechanismů, který vede ke snížení obsahu (viz níže) a aktivity signální dráhy cytokininů v odpovědi na zvýšenou teplotu.



Obr. 9: Relativní hladiny genové exprese genů IPT 2-9 za podmínek mírně zvýšené teploty 29 °C. Sloupce reprezentují relativní hladinu genové exprese a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hvězdičky označují statisticky signifikantní rozdíl po působení zvýšené teploty oproti kontrole ($p < 0,05$).

6.3.4 Exprese genů *CKX*

Vedle biosyntézy a přechody mezi aktivními a neaktivními formami cytokininů je pro obsah cytokininů určující jejich degradace. Za tento proces jsou zodpovědné geny *CKX*. Zatímco geny *CKX1*, *CKX3*, *CKX7* mají oproti kontrole mírně sníženou expresi po působení zvýšené teploty, gen *CKX2* a zejména *CKX5* výrazně nadregulovány oproti kontrole (Obr. 11). Nadregulace *CKX5* by tedy mohla mít význam pro námi pozorované snížení obsahu cytokininů a související podregulací *ARR5* a *ARR7*. V souladu námi pozorovanou nadregulací *CKX2* a zejména *CKX5* jsou i výsledky studie Dobré *et al.* (2010), která prokázala, že při vystavení rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*) teplotnímu šoku 40 °C dochází k výraznému zvýšení hladin *CKX* v kořeni. Práce Nomoto *et al.*, 2012 ukázala spojení *CKX5* s odpovědí na zvýšenou teplotu a s regulací skotomorfogeneze prostřednictvím transkripčního faktoru PIF4. Hladina *CKX5* je zvyšována za tmy spolu s PIF4 za podmínek zvýšené teploty 28 °C. *CKX5* ve tmě patrně odbourával cytokininy ve prospěch prodlužování hypokotylu (Nomoto *et al.*, 2012). Studie Nomoto *et al.* 2012 dále ukázala, že za tmy jsou *CKX5* postupně zvyšovány a na světle je jejich hladina snižována stejně jako u PIF4, který jsou na světle degradován díky vazbě na PHYB (Lorrain *et al.*, 2008). Gen *CKX5* tedy může být klíčovým hráčem, který se uplatňuje v elongaci hypokotylu v odpovědi na zvýšenou teplotu i v podmínkách našeho experimentu.



Obr. 11: Relativní hladiny exprese genů CKX1-7 za podmínek mírně zvýšené teploty 29 °C. Sloupce reprezentují relativní hladinu genové exprese a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hvězdičky označují statisticky signifikantní rozdíl po působení zvýšené teploty oproti kontrole ($p < 0,05$).

6.4 Endogenní hladina cytokininů klesá v závislosti na mírně zvýšené teplotě 29 °C

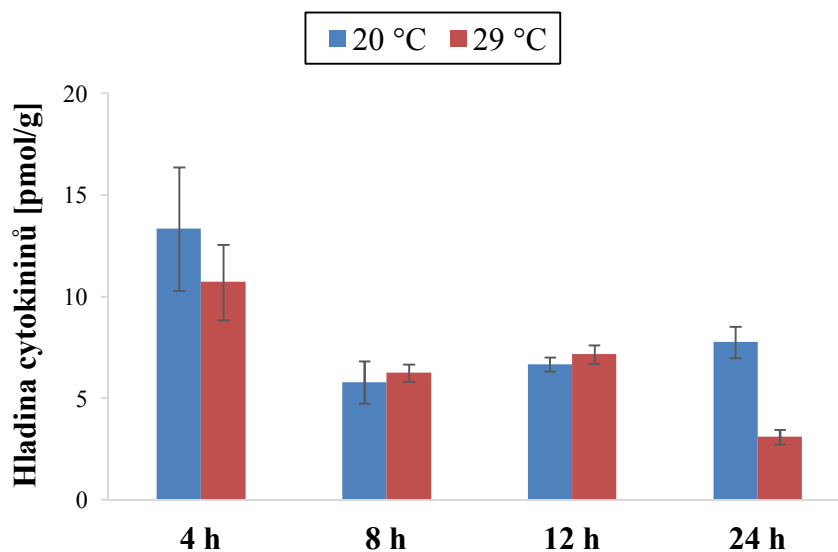
Po analýze genové exprese, v níž byly stanoveny relativní hladiny exprese genů metabolismu a signalizace cytokininů, byl následně sledován vliv mírně zvýšené teploty 29 °C na endogenní hladiny cytokininů. Hladiny cytokininů byly stanoveny v podobných časových bodech (4 h, 8 h, 12 h, 24 h) jako u genové exprese s tím rozdílem, že zde chybí časový bod 2 h.

Podregulace transkripčních markerů cytokininů *ARR5* a *ARR7* (Obr. 8), podregulace klíčového genu biosyntézy cytokininů *IPT3* a nadregulace genu pro degradaci cytokininů *CKX5* indikovala snížení obsahu cytokininů v odpovědi na zvýšenou teplotu. Analýza potvrdila očekávaný pokles hladin cytokininů v odpovědi na mírně zvýšenou teplotu 29 °C. Snížený byl obsah aktivních cytokininových bází, ribosidů i nukleotidů (Tab. 5 a 6). Ve studii Skaláka *et al.* (2016) byl sledován vliv teplotního stresu 40 °C na

obsah ribotidů a nukleotidů cytokininů. Byl pozorován střídavě nárůst a pokles – tyto transienční změny obsahu cytokininů naznačují, že zatímco zvýšená hladina cytokininů je důležitá pro odpověď na krátkodobé působení teplotního stresu, snížené hladiny cytokininů jsou součástí adaptivních mechanismů při delším působení teplotního stresu. Hladina aktivních forem cytokininů je snižována glykosylací – tento mechanismus se však patrně při podmínkách zvýšené teploty výrazně neuplatňuje, protože obsah N-glukosidů a O-glukosylkosidů nebyl v odpovědi na zvýšenou teplotu signifikantně změněn (Tab. 7).

Odpovědi na teplotní stres se účastní řada fytohormonů. Působením teplotního stresu dochází ke změnám hladin různých rostlinných regulátorů, jako jsou auxiny, ABA, salicylová kyselina nebo etylén (Bita *et al.*, 2013). Naše práce identifikovala cytokininy jako další z fytohormonů, který se významně účastní odpovědi na zvýšenou teplotu.

Signální dráha cytokininů je důležitá pro toleranci řady abiotických stresů, jako je chlad, sucho, zasolení i fotooxidační stres (Pospíšilová *et al.*, 1999; Dobrá *et al.*, 2010; Jeon *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012; O'Brien a Benková, 2013; Cortleven *et al.*, 2014). V přírodních podmínkách je rostlina vystavena typicky kombinaci více stresů a právě stres teplem je doprovázen současně i suchem. Studium role cytokininů v odpovědi na kombinaci těchto dvou stresů tak může představovat zajímavé téma dalších výzkumů.



Obr. 11: Endogenní hladiny cytokininových bází za podmínek standardní teploty 20 °C a mírně zvýšené teploty 29 °C. Sloupce reprezentují endogenní hladiny cytokininů a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Jako kontrola slouží standardní teplota 20 °C. Označení CK je pro cytokininy.

Čas	Teplota	CK ribosidy		CK nukleotidy	
		Hladina CK [pmol/g]	Směrodatná odchylka	Hladina CK [pmol/g]	Směrodatná odchylka
4 h	20 °C	5,18	± 0,67	15,42	± 1,63
	29 °C	3,79	± 0,25	12,22	± 1,31
8 h	20 °C	4,11	± 0,65	15,44	± 1,15
	29 °C	2,76	± 0,36	11,38	± 0,34
12 h	20 °C	5,52	± 1,41	16,70	± 0,64
	29 °C	2,97	± 0,58	10,58	± 0,86
24 h	20 °C	3,48	± 0,58	8,25	± 0,41
	29 °C	1,90	± 0,24	5,12	± 0,67

Tab. 5: Endogenní hladiny cytokininových ribosidů a nukleotidů stanovené za podmínek standardní teploty 20 °C a mírně zvýšené teploty 29 °C. Uvedená hladina cytokininů v tabulce byla stanovena na 1 g extrahovaného materiálu v pmol/g. Jako kontrola slouží standardní teplota 20 °C. Označení CK je pro cytokininy.

Čas	Teplota	CK O-glukosidy		CK N-glukosidy	
		Hladina CK [pmol/g]	Směrodatná odchylka	Hladina CK [pmol/g]	Směrodatná odchylka
4 h	20 °C	23,87	± 1,23	3,96	± 0,47
	29 °C	27,09	± 4,14	3,24	± 0,36
8 h	20 °C	27,85	± 4,11	4,01	± 0,34
	29 °C	29,10	± 4,19	3,80	± 0,20
12 h	20 °C	17,42	± 1,65	3,81	± 0,20
	29 °C	14,63	± 2,36	3,28	± 0,15
24 h	20 °C	11,55	± 1,52	4,80	± 0,10
	29 °C	9,67	± 1,62	4,86	± 0,39

Tab. 6: Endogenní hladiny cytokininových O-glukosidů a N-glukosidů stanovené za podmínek standardní teploty 20 °C a mírně zvýšené teploty 29 °C. Uvedená hladina cytokininů v tabulce byla stanovena na 1 g extrahovaného materiálu v pmol/g. Jako kontrola slouží standardní teplota 20 °C. Označení CK je pro cytokininy.

7 ZÁVĚR

V důsledku klimatických změn dochází celosvětově k neustálému zvyšování teploty. Od roku 1880 došlo k zvýšení o 1,4 °C a předpokládá se, že teplota bude stále vzrůstat. Již taková změna je pro rostliny významná, protože rostliny jsou schopné zaznamenat změny teplot o 1 °C a na základě této informace dále koordinovat svůj vývoj. Teplotní stres pak patří jeden z nejvýznamnějších abiotických stresových faktorů, který způsobuje ztráty výnosů v zemědělské produkci. Tato práce byla zaměřena na studium mírně zvýšené teploty 29 °C, což je teplotní bod, který u *Arabidopsis thaliana* představuje spodní hranici teplotního stresu.

Mírně zvýšená teplota vedla ke snížení obsahu aktivních cytokininů, což korespondovalo se snížením aktivity signální dráhy cytokininů (podregulace genů primární odpovědi na cytokininy *ARR5* a *ARR7*). Byly rovněž identifikovány kandidátní geny metabolismu cytokininů, které se mohou podílet na regulaci obsahu cytokininů v odpovědi na zvýšenou teplotu. Těmy jsou podregulovaný gen *IPT3*, který kóduje klíčový enzym biosyntézy cytokininů, a gen *CKX5* kódující enzym katalyzující degradaci cytokininů. Regulační úloha cytokininů při odpovědi na mírně zvýšenou teplotu byla rovněž prokázána i na fyziologické úrovni. Elongace hypokotylu v odpovědi na stres je narušena při disbalanci signální dráhy cytokininů, jak ukázala tato práce i práce Černý *et al.*, 2014. Odpověď prodlužováním hypokotylu na zvýšenou teplotu je do jisté míry podobná skotomorfogenezi. Zahrnutí transkripčního faktoru PIF4 v elongaci hypokotylu v odpovědi na zvýšenou teplotu i tmu naznačuje, že tyto procesy jsou úzce spjaty (Sun *et al.*, 2012) a mohl by být regulován cytokininy.

Předmětem navazujících studií může být identifikace složek signální dráhy cytokininů, které se podílejí na odpovědi na teplotní stres. Dostupnost řady mutantů u *Arabidopsis thaliana* poskytuje jednoduchý nástroj pro identifikaci těchto regulačních faktorů.

Tato práce vznikla s podporou grantu GAP305/12/2144 (GAČR) a podpoře MŠMT v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601). Výstupy a výsledky (publikace, BcP, DP, Ph.D., projektu apod.) byly zpracovány na přístrojovém vybavení financovaném z projektu OP VaVpI CZ.1.05/4.1.00/04.0135 Výukové a výzkumné kapacity pro biotechnologické obory a rozšíření infrastruktury.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Chemický strukturní vzorec kinetinu (6-furfurylaminopurin)
- Obr. 2: Strukturní vzorce isoprenoidních cytokininů: N⁶-isopentenyladenin (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), dihydrozeatin (DHZ)
- Obr. 3: Strukturní vzorce aromatických cytokininů: 6-benzyladenin (BA), *ortho*-topolin (*oT*), *meta*-topolin (*mT*), *ortho*-methoxytopolin (MeoT) a *meta*-methoxytopolin (MemT)
- Obr. 4: Model biosyntézy a metabolismu cytokininů
- Obr. 5: Mechanismus přenosu cytokininového signálu v *Arabidopsis thaliana*
- Obr. 6: Fenotyp klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana* po 7denní kultivaci při teplotách 20 °C a 29 °C bez a s přidavkem *tZ*
- Obr. 7: Grafické znázornění kinetiky růstu délky hypokotylů u *Arabidopsis thaliana*
- Obr. 8: Relativní hladiny genové exprese genů *IPT2-9* za podmínek mírně zvýšené teploty 29 °C
- Obr. 9: Relativní hladiny genové exprese genů *ARR5* a *ARR7* za podmínek mírně zvýšené teploty 29 °C
- Obr. 10: Relativní hladiny genové exprese genů *CKX1-7* za podmínek mírně zvýšené teploty 29 °C

9 SEZNAM TABULEK

- Tab. 1: Jednotlivé varianty rostlin pro analýzu kinetiky růstu morfologických znaků
- Tab. 2: Složení reakční směsi I
- Tab. 3: Složení reakční směsi II
- Tab. 4: Složení reakční směsi Master Mixu pro RT-qPCR
- Tab. 5: Endogenní hladiny cytokininových bází stanovené za podmínek standardní teploty 20°C a mírně zvýšené teploty 29°C
- Tab. 6: Endogenní hladiny cytokininových ribosidů a nukleotidů stanovené za podmínek standardní teploty 20°C a mírně zvýšené teploty 29°C
- Tab. 7: Endogenní hladiny cytokininových O-glukosidů a N-glukosidů stanovené za podmínek standardní teploty 20 °C a mírně zvýšené teploty 29 °C

10 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

1. AL-WHAIBI, M. H., 2011: Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University - Science*. 23(2): 139-150. ISSN 10183647.
2. AMASINO, R., 2005: Kinetin Arrives. The 50th Anniversary of a New Plant Hormone. *PLANT PHYSIOLOGY*. 138(3): 1177-1184. ISSN 00320889.
3. ASHBURNER, M.; BONNER, J. J., 1979: The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell*. 17(2): 241-254. ISSN 0092-8674
4. ATKIN, O. K., LOVEYS, B. R., ATKINSON, L. J., PONS, T. L., 2006: Phenotypic plasticity and growth temperature: understanding interspecific variability. *Journal of Experimental Botany*, 57(2): 267-281. ISSN 0022-0957.
5. ARNDT, F., *et al.*, 1976: SN 49537, a new cotton defoliant. In: *Plant Physiology*. 15501 MONONA DRIVE, ROCKVILLE, MD 20855 USA: AMER SOC PLANT BIOLOGISTS. 99-99. ISSN 1532-2548.
6. BARCISZEWSKI, J., SIBOSKA, G. E., PEDERSEN, B. O., CLARK, B. F. C. a RATTAN S. I. S. 1996: Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Letters*. 393(2-3): 197-200. ISSN 00145793.
7. BARCISZEWSKI, J., MIELCAREK, M., STOBIECKI, M., SIBOSKA, G. a CLARK, B. F. C. 2000: Identification of 6-Furfuryladenine (Kinetin) in Human Urine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 279(1): 69-73. ISSN 0006291x.
8. BILYEU, K. D., COLE, J. L., LASKEY, J. G., RIEKHOF, W. R., ESPARZA, T. J., KRAMER, M. D. a MORRIS, R. O., 2001: Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology*, 125(1): 378-386. ISSN 1532-2548.
9. BOSTON, R. S., VIITANEN, P. V. a VIERLING, E., 1996: Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*. 32(1-2): 191-222. ISSN 01674412.
10. BRZOBOHATÝ, B., MOORE, I., KRISTOFFERSEN, P., BAKO, L., CAMPOS, N., SCHELL. J., PALME, K., 1993: Release of aktive cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, 262(5136): 1051-1054. ISSN 1095-9203.

11. BRENNER, W. G., RAMIREDDY, E., HEYL, A. a SCHMÜLLING T., 2012: Gene Regulation by Cytokinin in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 3. ISSN 1664462x.
12. BURKLE, L., CEDZICH, A., DOPKE, C., STRANSKY, H., OKUMOTO, S., GILLISSEN, B., KUHN, C. a 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.
13. CAESAR, K., *et al.*, 2011: Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of experimental botany*, 238. ISSN 0022-0957
14. CAPLIN, S. M. a STEWARD, F. C., 1948: Effect of Coconut Milk on the Growth of Explants From Carrot Root. *Science*, 108(2815): 655-657. ISSN 00368075
15. CRAWFORD, A. J, MCLACHLAN, D. H., HETHERINGTON, A. M., a FRANKLIN, K. A., 2012: High temperature exposure increases plant cooling capacity. *Current biology*, 22(10): 396-397. ISSN 0960-9822.
16. ČERNÝ, M., JEDELSKÝ, P., 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 0140-7791.
17. CORTLEVEN, A., NITSCHKE, S., KLAUMUNZER, M., ABDELGAWAD, H., ASARD, H., GRIMM, B., RIEFLER, M. a SCHMÜLLING, T., 2014: A Novel Protective Function for Cytokinin in the Light Stress Response Is Mediated by the ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE3 Receptors. *PLANT PHYSIOLOGY*, 164(3): 1470-1483. ISSN 00320889.
18. DANILOVA, M. N., KUDRYAKOVA, N. V., DOROSHENKO, A. S., ZABRODIN, D. A., VINOGRADOV, N. S. a KUZNETSOV, V. V., 2016: Molecular and physiological responses of Arabidopsis thaliana plants deficient in the genes responsible for ABA and cytokinin reception and metabolism to heat shock. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(3): 308-318. ISSN 10214437.

19. D'AGOSTINO, I. B., DERUÈRE, J. a KIEBER, J. J., 2000: Characterization of the response of the Arabidopsis ARR gene family to cytokinin. *Plant Physiology*, 124(4): 1706-1717. ISSN 10214437.
20. DE LUCAS, M. a PRAT, S., 2014: PIFs get BRright: PHYTOCHROME INTERACTING FACTORs as integrators of light and hormonal signals. *New Phytologist*, 202(4): 1126-1141. ISSN 0028646x.
21. 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.
22. DOBRA, J., MOTYKA, V., DOBREV, P., MALBECK, J., PRASIL., T., HAISEL, D., GAUDINOVA, A., HAVLOVA, M., GUBIS, J., VANKOVA, R., 2010: Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content. *Journal of Plant Physiology*, 167(16): 1360. ISSN 01761617.
23. DURÁN-MEDINA, Y., DÍAZ-RAMÍREZ, D., MARSCH-MARTÍNEZ, N. 2017: Cytokinins on the Move. *Frontiers in Plant Science*, 8: 146. ISSN 1460-2431.
24. EL-SHOWK, S., RUONALA, R. a HELARIUTTA, Y., 2013: Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development*, 140(7): 1373-1383. ISSN 09501991.
25. FERREIRA, F. J a KIEBER, J. J., 2005: Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5): 518-525. ISSN 13695266.
26. FRANKLIN, K. A., LEE, S. H., PATEL, D., KUMAR, S. V., SPARTZ, A. K., GU, C., YE, S., YU, P., BREEN, G., COHEN, J. D., WIGGE, P. A., GRAY, W. M., 2011: Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 20231–20235. ISSN 1091-6490.
27. FRÉBORT, I., KOWALSKA, M., HLUSKA, T., FRÉBORTOVÁ, J., GALUSZKA, P., 2011: Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal Experimental Botany*, 62 (8): 2431-2452. ISSN 1460-2431.

28. FRÉBORTOVÁ, J., FRAAIJE, M. W., GALUSZKA, P., *et al.* 2004: Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal*, 380(1): 121-130. ISSN 02646021.
29. GALUSZKA, P., FRÉBORT, I., ŠEBELA, M. a PEČ, P. 2000: Degradation of cytokinins by cytokinin oxidases in plants. *Plant Growth Regulation*, 32(2/3): 315-327. ISSN 01676903.
30. GALUSZKA, P., FRÉBORT, I., ŠEBELA, M., SAUER, P., JACOBSEN, S. a PEČ P., 2001: Cytokinin oxidase or dehydrogenase? *European Journal of Biochemistry*, 268(2): 450-461. ISSN 00142956.
31. GILLISSEN, B., 2000: A New Family of High-Affinity Transporters for Adenine, Cytosine, and Purine Derivatives in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 12(2): 291-300 ISSN 10404651.
32. GOLOVKO, A., SITBON, F., TILLBERG, E. a NICANDER, B., 2002: Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 49(2): 161-169. ISSN 01674412.
33. GRAY, W. M., OSTIN, A., SANDBERG, G., ROMANO, C. P a ESTELLE, M. 1998: High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12): 7197-7202. ISSN 00278424.
34. GUO, H., BILAL, A., AMIR, ZEB, L., XU, L. a WEI Y. H., 2011: Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10(45). ISSN 16845315.
35. CHENG, C.-Y. a KIEBER, J. J. 2015: Signaling: Cytokinin Signaling. *Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 1. ISBN 9781493902637.
36. CHORY, J., REINECKE, D., SIM, S., WASHBURN, T., BRENNER, M., 1994: A role for cytokinins in de-etination in Arabidopsis. Det mutants have an altered response to cytokinins. *Plant Physiology*, 104: 339-347. ISSN 1532-2548.
37. HABERLANDT, G., 1913: Zur physiologie der zellteilung. *Sitzungsber Akad Wiss Berlin Phys Math*: 318-345. ISSN 0233-0954
38. HECHT, S., EISENREICH, W., ADAM, P., AMSLINGER, S., KIS, K., BACHER, A., ARIGONI, D. a ROHDICH, F. 2001: Studies on the

- nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26): 14837-14842. ISSN 00278424.
39. HIROSE, N., 2005: Functional Characterization and Expression Analysis of a Gene, OsENT2, Encoding an Equilibrative Nucleoside Transporter in Rice Suggest a Function in Cytokinin Transport. *PLANT PHYSIOLOGY*, 138(1): 196-206. ISSN 00320889.
40. HIROSE, N., TAKEI, K., KUROHA, T., KAMADA-NOBOSADA, T., HAYASHI, H., SAKAKIBARA, H., 2008: Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 59(1): 75-83. ISSN 1460-2431.
41. HORGAN, R., HEWETT, E. W., PURSE, J. G. a. WAREING, P. F., 1973: ChemInform Abstract: A NEW CYTOKININ FROM POPULUS ROBUSTA. *Chemischer Informationsdienst*, 4(43). ISSN 00092975.
42. HUQ, E., QUAIL, P.H., 2002: PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, 22: 2441–2550. ISSN 1460-2075.
43. HWANG, I., SHEEN, J., MÜLLER, B., 2012: Cytokinin Signaling Networks. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1): 353-380. ISSN 15435008.
44. JEON, J., N. Y. KIM, S. KIM, KANG, N., NOVÁK, O., KU, S.-J., CHO, CH., LEE, D. J., LEE, E.-J., STRNAD, M., KIM, J., 2010: A Subset of Cytokinin Two-component Signaling System Plays a Role in Cold Temperature Stress Response in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. 285(30): 23371-23386. ISSN 00219258.

45. JEON, J. a KIM, J., 2012: Arabidopsis Response Regulator1 and Arabidopsis Histidine Phosphotransfer Protein2 (AHP2), AHP3, and AHP5 Function in Cold Signaling. *PLANT PHYSIOLOGY*, 161(1): 408-424. ISSN 00320889.
46. JOSSE, E.-M. a HALLIDAY, K. J., 2008: Skotomorphogenesis: The Dark Side of Light Signalling. *Current Biology*, 18(24): 1144-1146. ISSN 09609822.
47. KAKIMOTO, T., 2003: Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research*, 116(3): 233-239. ISSN 09189440.
48. KANG, N. Y., CHO, C., KIM, N. Y., KIM, J., 2012: Cytokinin receptor-dependent and receptor-independent pathways in the dehydration response of Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Physiology*, 169(14): 1382-1391. ISSN 01761617.
49. KAMÍNEK, M., 2015: Tracking the Story of Cytokinin Research. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4): 723-739. ISSN 07217595.
50. KASAHARA, H., TAKEI, K., UEDA, N., HISHIYAMA, S., YAMAYA, T., KAMIYA, Y., YAMAGUCHI, S. a SAKAKIBARA, H., 2004: Distinct Isoprenoid Origins of cis- and trans-Zeatin Biosyntheses in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14): 14049-14054. ISSN 00219258.
51. KEELER, S. J., BOETTGER, C. M., HAYNES, J. G., KUCHES K. A., JOHNSON M. M., THUREEN, D. L., KEELER, C. L., KITTO, S. L., 2000: Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of lima bean. *Plant Physiology*, 123(3): 1121-1132. ISSN 1532-2548.
52. KIEBER, J. J. a SCHALLER, G. E., 2014: Cytokinins. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 12:168. ISSN 0024-3205.
53. KO, D., KANG, J., KIBA, T., PARK, J., KOJIMA, M., DO, J., KIM, K. Y., KWON, M., ENDLER, A., SONG, W.-Y., MARTINOIA, E., SAKAKIBARA, H., LEE, Y., 2014: Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(19): 7150-7155. ISSN 1091-6490.
54. KOINI, M. A., ALVEY, L., 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: 408–413. ISSN 0960-9822.

55. KUDO, T., KIBA, T. a SAKAKIBARA, H., 2010: Metabolism and Long-distance Translocation of Cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1): 53-60. ISSN 16729072.
56. KUDEROVA, A., URBANKOVA, I., VALKOVA, M., MALBECK, J., BRZOBOHATY, B., NEMETHOVA, D. a HEJATKO, J., 2008: Effects of Conditional IPT-Dependent Cytokinin Overproduction on Root Architecture of Arabidopsis Seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 49(4): 570-582. ISSN 00320781.
57. KUROHA, T., KATO, H., ASAMI, T., YOSHIDA, S., KAMADA, H., SATOH, S., 2002: A trans-zeatin riboside in root xylem sap negatively regulates adventitious root formation on cucumber hypocotyls. *Journal of Experimental Botany*, 53(378): 2193-2200. ISSN 1460-2431.
58. 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 10404651.
59. LACOMBE, B. a ACHARD, P., 2016: Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Current Opinion in Plant Biology*, 34: 1-8. ISSN 13695266.
60. LARKINDALE, J., HALL, J. D., KNIGHT, M. R., a VIERLING, E., 2005: Heat Stress Phenotypes of Arabidopsis Mutants Implicate Multiple Signaling Pathways in the Acquisition of Thermotolerance. *Plant Physiology*, 138(2): 882–897. ISSN 00320889.
61. LAULE, O., FURHOLZ, A., CHANG, H.-S., ZHU, T., WANG, X., HEIFETZ, P. B., GRUISSEM, W.a LANGE, M., 2003: Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11): 6866-6871. ISSN 00278424.
62. LETHAM, D. S., 1973: Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry*, 12(10): 2445-2455. ISSN 0031-9422.
63. LETHAM, D. S., 1994: Cytokinins as phytohormones: sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. *Mok, D. W.S.; Mok, M. C.*

- Cytokinins Chemistry, activity, and function. Boca Raton, FL: CRC Press, 57–80. ISSN 0-8493-6252-0.*
64. LI, G., 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 00219258.
65. LIU, T.-Y., CHANG, C.-Y. a CHIOU, T.-J., 2009: The long-distance signaling of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3): 312-319. ISSN 13695266.
66. LOCHMANOVÁ, G., ZDRÁHAL, Z., KONEČNÁ, H., KOUKALOVÁ, Š., MALBECK, J., SOUČEK, P., VÁLKOVÁ, M., KIRAN, N. S., BRZOBOHATÝ, B., 2008: Cytokinin-induced photomorphogenesis in dark-grown *Arabidopsis*: a proteomic analysis. *Journal Experimental Botany*, 59: 3705–3719. ISSN 1460-2431.
67. LORRAIN, S., ALLEN, T., DUEK, P. D., WHITELAM, G. C. a FANKHAUSER, C., 2008: Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *The Plant Journal*, 53(2): 312-323. ISSN 09607412.
68. MACKOVÁ, H., HRONKOVÁ, M., DOBRÁ, J., TUREČKOVÁ, V., NOVÁK O., LUBOVSKÁ, Z., MOTYKA V., HASEL, D., HÁJEK T., PRÁŠIL, I. T., GAUDINOVÁ, A., ŠTORCHOVÁ, H., WERNER, T., SCHMÜLLING, T., VANKOVÁ R.. 2013: Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *Journal Experimental Botany*, 64(10): 2805-2815. ISSN 1460-2431.
69. MAHÖNEN, 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: 94-98. ISSN 1095-9203.
70. MILLER, C. O., SKOOG, F., MALCOLM, H., SALTZA, V. a STRONG, F. M. 1995: Kinetin, A Cell Division Factor From Deoxyribonucleic Acid 1. *Journal of the American Chemical Society*. 1955, 77(5): 1392-1392. ISSN 00027863.

71. MILLER, C. O., 1961: A Kinetin-Like Compound In Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 47(2): 170-174. ISSN 00278424.
72. MIYAWAKI, K., MATSUMOTO-KITANO, M. a 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.
73. MOK, M. C., MARTIN, R. C. a MOK W. S., 2000: Cytokinins: Biosynthesis metabolism and perception. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36(2): 102-107. ISSN 10545476.
74. MORRIS, R. O., BILYEU, K. D., LASKEY, J. G. a CHEIKH, N. N. 1999: Isolation of a Gene Encoding a Glycosylated Cytokinin Oxidase from Maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255(2): 328-333. ISSN 0006291x.
75. MULLER, B. a SHEEN, J. 2007: Arabidopsis Cytokinin Signaling Pathway. *Science's STKE*, 407. ISSN 15258882.
76. MURAI, N., 2014: Review: Plant growth hormone cytokinins control the crop seed yield. *American Journal of Plant Sciences*, 5(14): 2178-2187. ISSN 1091-6490
77. MURTHY, V. S. a RAVISHANKAR, K. V. 2016: Molecular Mechanisms of Heat Shock Proteins and Thermotolerance in Plants. *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops*. New Delhi: Springer India, 71. ISBN 9788132227236.
78. NEILSON, K. A., GAMMULLA, C. G., MIRZAEI, M., IMIN, N. a HAYNES, P. A. 2010: Proteomic analysis of temperature stress in plants. *PROTEOMICS*, 10(4): 828-845. ISSN 16159853.
79. NISHIZAWA, A., YABUTAY, I., YOSHIDA, E., MARUTA, T., YOSHIMURA, K. a SHIGEOKA, S., 2006: Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *The Plant Journal*, 48(4): 535-547. ISSN 09607412.
80. NISHIYAMA, R., WATANABE, Y., FUJITA, Y., LE, D. T., KOJIMA, M., WERNER, T., VANKOVA, R., YAMAQUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K., KAKIMOTO, T., SAKAKIBARA, H., SCHMÜLLING, T., TRAN, L. S., 2012: Analysis of Cytokinin Mutants and Regulation of Cytokinin Metabolic Genes Reveals Important Regulatory Roles of Cytokinins in Drought,

- Salt and Abscisic Acid Responses, and Abscisic Acid Biosynthesis. *The Plant Cell*, 23(6): 2169-2183. ISSN 10404651.
81. NOMOTO, Y., KUBOZONO, S., MIYACHI, M., YAMASHINO, T., NAKAMICHI, N. a MIZUNO, T., 2012: A Circadian Clock and PIF4-Mediated Double Coincidence Mechanism is Implicated in the Thermosensitive Photoperiodic Control of Plant Architectures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 53(11): 1965-1973. ISSN 00320781.
 82. PAČES, V., WERSTIUK, E., HALL, R. H., 1971: Conversion of N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology*, 48: 775–778. ISSN 1532-2548.
 83. POSPÍŠILOVÁ, J., SYNKOVÁ, H., RULCOVÁ, J., 1999: Cytokinins and Water Stress. *Biologia Plantarum*. 43(3), 321-328 ISSN 00063134.
 84. PROCHÁZKA, S., 1998: *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia. ISBN 8020005862.
 85. O'BRIEN, J. A. a BENKOVÁ, E., 2013: Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 4. ISSN1664462x.
 86. QI, Z. a XIONG, L., 2013: Characterization of a Purine Permease Family Gene Os PUP 7 Involved in Growth and Development Control in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(11): 1119-1135. ISSN 16729072.
 87. ROMANOV, G. A., LOMIN, S. N., SCHMÜLLING, T., 2006: Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal Experimental Botany*, 57: 4051-4058. ISSN 1460-2431.
 88. RUIZ-MEDRANO, R., XOCONOSTLE-CÁZARES, B. a LUCAS, W. J., 2001: The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3): 202-209. ISSN 13695266.
 89. SAKAKIBARA, H., 2006: Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 431–449. ISSN 1543-5008.
 90. SAKAKIBARA, H., 2010: Cytokinin Biosynthesis and Metabolism. *Plant Hormones*. Dordrecht: Springer Netherlands, 95. ISBN 9781402026843.
 91. SCHAFER, M., BRUTTING, C., MEZA-CANALES, I. D., GROßKINSKY, D. K., VANKOVAR, R., BALDWIN, I. T., MELDAU S., 2015: The role of *cis*-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to

- environmental interactions. *Journal Experimental Botany*, 66(16): 4873-4884. ISSN 1460-2431.
92. SCHÖFFL, F.; PRÄNDL, R.; REINDL, A. 1998: Regulation of the heat-shock response. *Plant physiology*, 117(4): 1135-1141. ISSN 1532-2548.
93. 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 Experimental Botany*, 67(9): 2861-2873. ISSN 1460-2431.
94. SKOOG, F., TSUI, C., 1951: Growth substances and the formation of buds in plant tissues. In F Skoog, ed, Plant Growth Substances. *University of Wisconsin Press*, Madison, 263–285
95. SCHMÜLLING, T., 2004: Cytokinin. In Encyclopedia of Biological Chemistry (Eds. Lennarz, W., Lane, M. D.) Academic Press/Elsevier Science. ISBN 97800123786302.
96. STAVANG, J. A., GALLEGO-BARTOLOME, J., GOMEZ, M. D., YOSHIDA, S., ASAMI, T., OLSEN, J. E., GARCIA-MARTINEZ, J. L., ALABADI, D., BLAZQUEZ, M., 2009: Hormonal regulation of temperature-induced growth in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 60: 589–601. ISSN 1365-313X.
97. STRNAD, M., 1997: The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, 101(4), 674-688. ISSN 00319317.
98. SUN, J., QI, L., LI, Y., CHU, J., LI, C., 2012: PIF4-Mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating *Arabidopsis* hypocotyl growth. *PLoS Genet*. ISSN 1002594.
99. SUZUKI, T., IMAMURA, A., UEGUCHI, C., MIZUNO, T., 1998: Histidine-containing phosphotransfer (HPT) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology*, 39(12): 1258-1268. ISSN 1471-9053.
100. SVAČINOVÁ, J., NOVÁK, O., PLAČKOVÁ, L., LENOBEL, R., HOLÍK, J., STRNAD, M. a DOLEŽAL, K., 2012: A new approach for cytokinin isolation from *Arabidopsis* tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods*, 8(1): 17. ISSN 17464811.

101. SWEERE, U., EICHENBERG, K., LOHRMANN, J., MIRA-RODADO, V., BAURLE, I., KUDLA, J., NAGY, F., SCHAFFER, E., HARTER, K., 2001: Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signalling, *Science*, 294: 1108–1111. ISSN 00368075.
102. TO, J. P. C., DERUÈRE, J., MAXWELL, B. B., MORRIS, V. F., HUTCHISON, C. E., FERREIRA, F. J., SCHALLER, G. E. a KIEBER, J. J., 2007: Cytokinin regulates type-A Arabidopsis Response Regulator activity and protein stability via twocomponent phosphorelay. *Plant Cell*, 19: 3901-3914. ISSN 1532-298X.
103. TAKEI, K., SAKAKIBARA, H., TANIGUCHI, M., SUGUYAMA, T., 2001: Nitrogen-Dependent Accumulation of Cytokinins in Root and the Translocation to Leaf: Implication of Cytokinin Species that Induces Gene Expression of Maize Response Regulator. *Plant and Cell Physiology*, 42(1): 85-93. ISSN 1471-9053.
104. TAKEI, K., SAKAKIBARA, H. a SUGIYAMA, T., 2001: Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28): 26405-26410. ISSN 00219258.
105. TAKEI, K., 2004: AtIPT3 is a Key Determinant of Nitrate-Dependent Cytokinin Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 45(8): 1053-1062. ISSN 14719053.
106. TAKEI, K., YAMAYA, T. a 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 00219258.
107. TAYA, Y., TANAKA, Y.; NISHIMURA, S., 1978: 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in Dictyostelium discoideum. *Nature*, 271: 545-547. ISSN 0028-0836.
108. TOKUNAGA, H., KOJIMA, M., KUROHA, T., ISHIDA, T., SUGIMOTO, K., KIBA, T. a SAKAKIBARA, H., 2012: Arabidopsis lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *The Plant Journal*, 69(2): 355-365. ISSN 09607412.

109. VAN OVERBEEK, CONKLIN, J. a BLAKESLEE, A. F., 1941: Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, 94(2441): 350-351. ISSN 00368075.
110. VAN ZANTEN, M., R., PONS, T. L. a PROVENIERS, M. C. G., 2014: Plant acclimation and adaptation to warm environments. *Temperature and Plant Development*. Oxford: John Wiley, 49. ISBN 9781118308240.
111. VANDESOMPELE, DE PRETER, J., PATTYN, K., POPPE, F., VAB ROY, B., DE PAEPA, N., SPELEMAN A., 2002: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3 (7): RESEARCH0034. ISSN 1474-760X.
112. VASEVA, I., TODOROVA, D., MALBECK, J., TRAVNIČKOVA, A. a MACHAČKOVA, I., 2009: Mild temperature stress modulates cytokinin content and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity in young pea plants. *Acta Agronomica Hungarica*, 57(1): 33-40. ISSN 02380161.
113. URAO, T., YAKUBOV, B., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. SHINOZAKI, K., 1998: Stress-responsive expression of genes for two-component response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 427(2): 175-178, ISSN 00145793.
114. WAHID, A., GELANI, S., ASHRAF, M. a FOOLAD, M., 2007: Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3): 199-223. ISSN 00988472.
115. WANG, V., SHOSEYOV, B. a ALTMAN, A., 2004: Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*. 9(5), 244-252. ISSN 13601385.
116. WHITTY, C. D.; HALL, R. H., 1974: A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian journal of biochemistry*, 52(9): 789-799. ISSN 0008-4018.
117. WIESNER, J., 1892: Elementarstruktur und das Wachstum der lebenden Substanz. A. Holder, Wien;
118. WULFETANGE, K., LOMIN, S. N., ROMANOV, G. A., STOLZ, A., HEYL, A. a SCHMÜLLING, T., 2011: The Cytokinin Receptors of *Arabidopsis* Are Located Mainly to the Endoplasmic Reticulum. *Plant Physiology*. 156(4): 1808-1818. ISSN 00320889.

119. XIA, J., ZHAO, H., LIU, W., LI L. a HE, Y., 2009: Role of cytokinin and salicylic acid in plant growth at low temperatures. *Plant Growth Regulation*. 57(3): 211-221. ISSN 01676903.
120. YAMADA, M., GREENHAM, K., PRIGGE, M. J., JENSEN, P. J. a ESTELLE, M., 2009 : The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 Gene Is Required for Auxin Synthesis and Diverse Aspects of Plant Development. *Plant Physiology*. 151(1): 168-179. ISSN 00320889.
121. ZALABÁK, D., POSPÍŠILOVÁ, H., ŠMEHILOVÁ, M., MRÍZOVÁ, K., FRÉBORT, I. a GALUSZKA, P., 2013: Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnology Advances*, 31(1): 97-117 ISSN 07349750.
122. ŽRÓBEK-SOKOLNIK, A., 2012: Temperature Stress and Responses of Plants. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. New York, NY: Springer New York, 113. ISBN 9781461408147.
123. ZÜRCHER, E., LIU, J., DONATO, M., GEISLER, M., MÜLLER, B., 2016: Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science*, 353.6303: 1027-1030. ISSN 1095-9203.
124. ZÜRCHER, E. a MÜLLER, B., 2016: Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function, Advances and New Insights. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 324: 1-38. ISSN 1937-6448.
125. ZHANG, K., NOVAK, O., WEI, Z., GOU, M., ZHANG, X., YU, Y., YANG, CAI, Y., STRNAD, M., LIU, C.-J., 2014: Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature communications*, 5. ISSN 2041-1723.

11 SEZNAM PŘÍLOH

Tab. 1: Sekvence použitých primerů pro RT-qPCR

Tab. 2: Post-hoc analýza kinetiky růstu délky hypokotylů *Arabidopsis thaliana*
(Obr. 7)

12 PŘÍLOHY

Tab.1: Sekvence použitých primerů pro RT-qPCR

<i>Produkt genu</i>	<i>Zkratka</i>	<i>Lokus</i>	<i>Primer (5'–3')</i>	<i>Sekvence</i>	<i>Číslo UPL sondy</i>
Elongační faktor 1a	<i>EF-1a</i>	At1g07920	F	TCTCTACTTGTCCACTTTTCTACAGC	133
			R	TTACCCATGGTTAGCTACTTTTCA	
Polyubikvitin 10	<i>UBQ10</i>	At4g05320	F	AAGATCCAGGATAAGGAAGGAATC	140
			R	ACGACCATCCTCCAATTGTT	
Aktin 2	<i>ACT2</i>	At3g18780	F	CCGCTCTTTCTTTCCAAGC	30
			R	CCGGTACCATTGTCACACAC	
Arabidopsis regulátor odpovědi 5	<i>ARR5</i>	At3g48100	F	TCAGAGAACATCTTGCCTCGT	17
			R	ATTCACAGGCTTCAATAAGAAATC	
Arabidopsis regulátor odpovědi 7	<i>ARR7</i>	At1g19050	F	TCATCTGAGAACATCTTACCTCGT	6
			R	CTGCTAGCTTCACCGGTTTC	
Isopentenyltransferáza 2	<i>IPT2</i>	At2g27760	F	AGGCTCCTTCGTCTCAA	151
			R	CCATGATTCTTCAGATTTGCTTAATA	
Isopentenyltransferáza 3	<i>IPT3</i>	At3g63110	F	GGTTAATTTACGCCAATGGTACTT	9
			R	CGTAGCCTCGTATATTTTGATCG	
Isopentenyltransferáza 4	<i>IPT4</i>	At4g24650	F	GTTGGAACCGTGTGTGAAGA	92
			R	TTGCGGTGATATTAGTCCAAAC	
Isopentenyltransferáza 5	<i>IPT5</i>	At5g19040	F	AGTTACAGCGATGACCACCA	97
			R	GGCAGAGATCTCCGGTAGG	

Isopentenyltransferáza 6	<i>IPT6</i>	At1g25410	F	GATAAGGTGGTTCTCATCACAGG	98
			R	ATCGACTGAGAGGCGTGACT	
Isopentenyltransferáza 7	<i>IPT7</i>	At3g23630	F	TGTGACATTTACCCCGAGAGA	143
			R	TGAACTCGTAGTCAATAGGTATCAAAC	
Isopentenyltransferáza 8	<i>IPT8</i>	At3g19160	F	CGAGATTACTGCTCGTGGAA	138
			R	CAAGGAGAGCATGAATGAAGG	
Isopentenyltransferáza 9	<i>IPT9</i>	At5g20040	F	TGGATTGTATCTGCGATGGTT	133
			R	TGGGCCTCAGCGATAACTT	
Lonely guy 1	<i>LOG1</i>	At2g28305	F	GGCATCCATGATAAACCAGTG	86
			R	CGAGCAGTTGGTCAAATGAA	
Lonely guy 3	<i>LOG3</i>	At2g37210	F	AACTTGGGCTCAGCTTGGTA	108
			R	CCTTCTTCGACTGCTTTGTCA	
Lonely guy 4	<i>LOG4</i>	At3g53450	F	TTTCTGCACCTACTGCCAAG	65
			R	TTTCATGGCAAGGCGAAT	
Lonely guy 5	<i>LOG5</i>	At4g35190	F	CTTTACCAGGTGGGTATGGAAC	25
			R	TCCACATTTAACAACCCACAG	
Lonely guy 6	<i>LOG6</i>	At5g03270	F	GGGTTTGGTGTCTCAAGCTG	157
			R	AAAAAGAGCATCATCATTACCATTATT	
Lonely guy 8	<i>LOG8</i>	At5g11950	F	ATTGCACTCCCTGGAGGTTA	17
			R	CCCATCAACATTCAATAGACCA	
Cytokinin oxidáza/dehydrogenáza 1	<i>CKX1</i>	At2g41510	F	CTGAGAAGCGGAATTCTGAAC	142
			R	GAGTACCCTGATCCATTTAACCA	

Cytokinin oxidáza/dehydrogenáza 2	<i>CKX2</i>	At2g19500	F	TCCAACAAACCGGAATAAATG	126
			R	TTGGGGTAGCGGATTGTAGT	
Cytokinin oxidáza/dehydrogenáza 3	<i>CKX3</i>	At5g56970	F	TCTCAATACACAGTCAACGAGGA	25
			R	TCGTACATAAACCCTCTTACATGG	
Cytokinin oxidáza/dehydrogenáza 4	<i>CKX4</i>	At4g29740	F	CCCTTCCCATTATTGACCAG	1
			R	CGAAATACGGAACATCTTGTACG	
Cytokinin oxidáza/dehydrogenáza 5	<i>CKX5</i>	At1g75450	F	CCATGGTCCTCAAATTAGTAACG	48
			R	TCTGAGCATCTCATCACCTCTC	
Cytokinin oxidáza/dehydrogenáza 6	<i>CKX6</i>	At3g63440	F	CGTCTACCCAGTGAACAAATCA	69
			R	GTTAGGATCGCCACCAGGTA	
Cytokinin oxidáza/dehydrogenáza 7	<i>CKX7</i>	At5g21482	F	CACCAGAGCTAGGGTTTTGC	17
			R	CATCGAACTCGGTGTATACTACTCTT	

Tab. 2: Post-hoc analýza kinetiky růstu délky hypokotylů *Arabidopsis thaliana* (Obr. 7)

	1.den	2.den	3.den	4.den	5.den	6.den	7.den
20 °C	a	a	a	a	a	a	a
20 °C tZ	a	a	b	a	b	b	b
29 °C	b	c	d	c	d	d	d
29 °C tZ	b	b	c	b	c	c	c