

# Středoškolská odborná činnost

Pozdní odezvy krátkodobého působení  
cytokininů: glutathion a metabolismus síry

Tereza Pitrová

Brno 2014

# Středoškolská odborná činnost

Obor SOČ: 7. Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

## Pozdní odezvy krátkodobého působení cytokininů: glutathion a metabolismus síry

Autor: Tereza Pitrová  
Škola: Gymnázium Brno-Řečkovice  
Konzultant: Mgr. Jaroslav Pavlů  
RNDr. Kateřina Cibulková

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně, použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování práce je v souladu se zákonem č.121/2000Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v plném znění.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce.

## Poděkování

Mé poděkování patří panu Mgr. Jaroslavu Pavlů, bez kterého by tato práce nemohla vzniknout. Děkuji mu za pomoc, podnětné připomínky a velkou trpělivost. Dále děkuji paní RNDr. Kateřině Cibulkové za vedení mé práce. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala Jihomoravskému kraji a JCMM za finanční podporu, díky které bylo možné tuto práci tuto práci realizovat.



## **Anotace**

Rostlinné hormony cytokininy ovlivňují množství významných procesů během růstu a vývoje rostliny. Regulují dělení a diferenciaci buněk v meristémech, regulují růst kořene a listů, zpomalují proces stárnutí, zvyšují odolnost vůči stresovým podmínkám apod. Mezi dosud málo popsané účinky cytokininů patří jejich spojení s metabolismem síry a vliv na hladinu glutathionu, významné obranné sloučeniny obsahující síru. Tato středoškolská odborná činnost studuje dopad krátkodobého působení dvou typů cytokininů (*trans*-zeatinu a 6-benzylaminopurinu) na metabolismus síry a hladinu glutathionu u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*.

Bylo zjištěno, že krátkodobé působení cytokininů aktivuje některé geny související s odpovědí na nedostatek síry, čímž bylo prokázáno, že cytokininy stimulují metabolismus síry. Toto krátkodobé působení však nemělo pozitivní dopad na hladinu glutathionu, jenž byla naopak mírně snížena.

## **Klíčová slova**

cytokininy; glutathion; síra; *trans*-zeatin; 6-benzylaminopurin

## **Annotation**

Phytohormones called cytokinins influence many important processes during plant growth and development. They regulate cell division and differentiation in meristems, regulate the growth of root and leaves, decelerate the aging processes, enhance resistance to stress conditions etc. One of the little described effects of cytokinins is their connection with the metabolism of sulfur and influence on the level of glutathione, one of the major defense compounds. This thesis examines the impact of short-term treatment of two cytokinin types (*trans*-zeatin and 6-benzylaminopurine) on the sulfur metabolism and glutathione levels in a model plant *Arabidopsis thaliana*.

It has been found, that short-time effect of cytokinins activates some genes associated with the response to the sulfur shortage, which proves, that cytokinins stimulate sulfur metabolism. However, the short-term treatment didn't have a positive impact on the glutathione level, which has been slightly reduced.

## **Keywords**

cytokinins; glutathione; sulfur; *trans*-zeatin; 6-benzylaminopurine

## Seznam použitých odborných zkratek

ADP – adenosindifosfát

APR – adenosin 5'-fosfosulfátreduktáza

APS – adenosin 5'-fosfosulfát

ARR – regulátor odpovědi *Arabidopsis*

ATP – adenosintrifosfát

ATPS – ATPsulfuryláza

BA – 6-benzylaminopurin

cDNA - komplementární deoxyribonukleová kyselina

CK – cytokininy

CRF – faktor odezvy CK

DMAPP – dimethylallyldifosfát

DMSO - dimethylsulfoxid

DTNB - kyselina 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová

ER – endoplasmatické retikulum

GSH – glutathion

GSSG – oxidovaný glutathion

*Chac-c* – gen *Chac-c-like family protein*

IPT – isopentenyl-transferáza

*LSU2* – gen *RESPONSE TO LOW SULFUR*

mRNA - mediátorová ribonukleová kyselina

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

OAS – O-acetylserin

OASTL – O-acetylserinthiollyáza

PM – plasmatická membrána

qRT-PCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí

SAT – serinacetyltransferáza

SiR – sulfidreduktáza

SULTR – transportér síranu

*tZ* – *trans*-zeatin

# Obsah

Cíl práce	9
<b>1 Teoretická část</b>	<b>10</b>
1.1 Růstové regulátory	10
1.2 Fytohormony	10
1.3 Cytokinininy	10
1.4 Biosyntéza cytokininů	12
1.5 Transport cytokininů	12
1.6 Signální dráha cytokininů	13
1.7 Metabolismus cytokininů	13
1.8 Fyziologické účinky a využití cytokininů	15
1.9 Síra	15
1.10 Příjem a asimilace síry	16
1.11 Význam síry v zemědělství	18
1.12 Role CK v regulaci příjmu a asimilace síry	19
1.13 Glutathion	19
1.14 <i>Arabidopsis thaliana</i> (huseníček rolní)	21
<b>2 Praktická část</b>	<b>22</b>
2.1 Metody a materiál	22
2.1.1 Kultivace rostlin	22
2.1.2 Stanovení glutathionu	22
2.1.3 Izolace RNA	23
2.1.4 Měření koncentrace RNA	23
2.1.5 qRT-PCR	24
2.2 Výsledky	26
<b>3 Diskuze</b>	<b>34</b>



<b>Závěr</b>	<b>38</b>
<b>Seznam použité literatury a internetových zdrojů</b>	<b>39</b>
<b>Seznam obrázků</b>	<b>44</b>

## Cíl práce

Cílem práce je studium vlivu cytokininů na expresi genů souvisejících s metabolismem síry a vlivu cytokininů na hladinu glutathionu. Sloučeniny obsahující síru, podobně jako cytokininy, souvisejí s odolností rostlin vůči stresovým faktorům. Proto bude sledován dopad krátkodobého působení cytokininů na metabolismus síry a na glutathion, který je zásobní formou redukované síry a představuje důležitou obrannou sloučeninu. Jako modelová rostlina bude využita *Arabidopsis thaliana* z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Zástupci čeledi brukvovitých (mezi které patří významné hospodářské plodiny jako jsou řepka nebo hořčice) mají vysoké požadavky na dostupnost síry, a proto právě *A. thaliana* představuje vhodný model pro studium výživy rostlin sírou a metabolismu síry.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Růstové regulátory

Růstové regulátory jsou látky, které regulují růstové a vývojové procesy u rostlin. Dělí se na přirozené a syntetické. Ve starší literatuře bývaly tyto látky často děleny na látky růst stimuluující a látky růst inhibující (tzv. stimulatory a inhibitory). Toto rozdělení však bylo zavádějící, protože látky mohou v určitých koncentracích stimulatovat a v jiných inhibovat. Účinek regulačních látek dále závisí na konkrétním druhu, stáří a fyziologickém stavu rostliny. Proto se dnes již toto dělení neužívá. Mezi přirozené regulátory patří rostlinné hormony (fytohormony) a další látky s regulační aktivitou.[28]

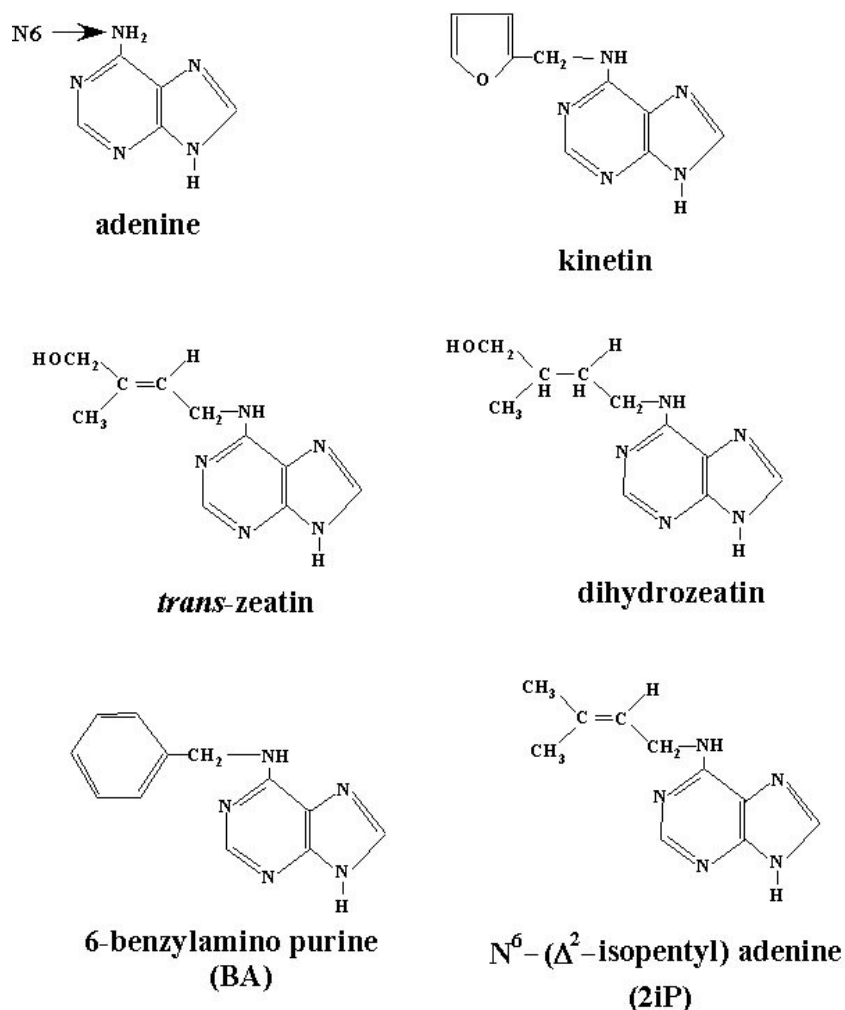
## 1.2 Fytohormony

Fytohormony účinkují již při nízkých koncentracích a jsou schopny ve velmi krátké době zvýšit nebo snížit expresi některých genů. Mezi základní fytohormony se řadí auxiny, cytokininy (CK), gibereliny, kyselina abscisová, etylén, polyaminy, brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová a nově identifikované strigolaktony. Mimo ně existují v rostlinách další látky s růstově regulační aktivitou, které však mezi hormony řazeny nejsou, neboť jsou účinné až ve vyšších koncentracích, anebo není dostatečně známa obecnost jejich působení. I přes jednoduchou chemickou strukturu podstatně ovlivňují fyziologii rostlin. Od živočišných hormonů se fytohormony liší v mnoha aspektech. Většina fytohormonů je syntetizována na více místech v rostlině, jelikož rostliny nemají specifické žlázy s vnitřní sekrecí, které by hormony vytvářely. Fytohormony jsou méně specifické než hormony živočišné. Každý z fytohormonů ovlivňuje několik často odlišných procesů, a rovněž každý proces bývá ovlivněn větším počtem různých látek s regulační aktivitou. I přes tyto rozdíly je však mechanismus účinku fytohormonů velmi blízký mechanismu působení živočišných hormonů. [25] [28]

## 1.3 Cytokininy

V padesátých letech minulého století byly hledány a testovány látky, které by mohly ovlivňovat buněčné dělení. Rozkladem DNA se podařilo získat sloučeninu zvanou

kinetin, která – ač byla velmi účinná - se v rostlinách volně nevyskytovala. Až v šedesátých letech se podařilo izolovat nativní<sup>1</sup> látky s účinky podobnými kinetinu. První izolace byla provedena z endospermu nedozrálých obilok kukuřice (*Zea mays*) a nová sloučenina byla pojmenována zeatin [7]. CK jsou deriváty adeninu s postranním řetězcem navázaným v poloze N6. Podle postranního řetězce je lze rozdělit na isoprenoidní a aromatické. Na každý CK se navíc může napojovat ribóza za vzniku nukleosidu. Po připojení fosfátové skupiny vznikají nukleotidy. Nejsilnějších regulačních účinků dosahují volné báze.



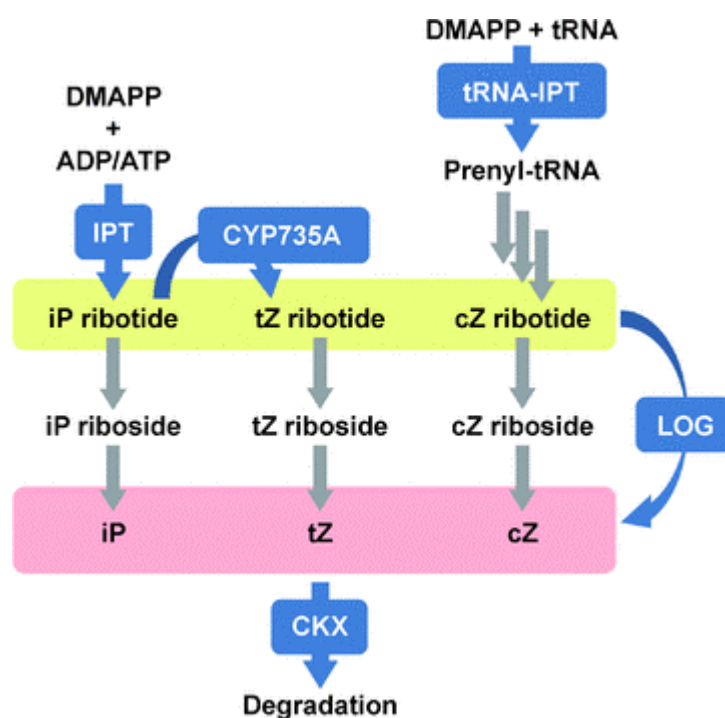
Obrázek 1: Chemická struktura některých cytokininů. Mezi isoprenoidní cytokininy patří např. *trans*-zeatin, mezi aromatické cytokininy BA. Zdroj: <http://labs.bio.unc.edu/Kieber/structures.jpg>

<sup>1</sup>Nativní látky jsou látky přirozeně se vyskytující

## 1.4 Biosyntéza cytokininů

Biosyntéza isoprenoidních CK u vyšších rostlin vychází z ADP (adenosidifosfát) nebo ATP (adenositrifosfát). Klíčový krok biosyntézy CK je katalyzován enzymem isopentenyl transferázou (IPT), který přenáší isopentenylovou skupinu z DMAPP (dimethylallyldifosfát) na N6 ATP/ADP. Takto vznikají ribonukleotidy s isoprenoidním postranním řetězcem, které jsou postupně přeměněny na *trans*-zeatin. [2] [5]

*Arabidopsis thaliana* obsahuje 9 IPT genů, 7 z nich je adenylát IPT<sup>2</sup> a dva jsou tRNA IPT<sup>3</sup>.



Obrázek 2: Zjednodušený model biosyntézy cytokininů. Modré šipky znázorňují reakce enzymů se známými geny, šedé označují reakce, které je třeba identifikovat. (převzato a upraveno z [18])

## 1.5 Transport cytokininů

CK se ve zvýšeném množství nacházejí v nadzemních částech rostliny, především v pupenech a mladých vyvíjejících se listech a v semenech. Hlavní místo biosyntézy jsou kořenové vrcholy, odkud se CK transportují xylémem a floémem do dalších částí

<sup>2</sup>Adenylát IPT připojuje isoprenoidní řetězec na ADP nebo ATP.

<sup>3</sup>tRNA IPT připojuje isoprenoidní řetězec na adenin v molekule tRNA.

rostliny. CK mohou vznikat také ve všech nadzemních orgánech - v tomto případě je však následná distribuce spíše lokální. [31]

## 1.6 Signální dráha cytokininů

Signální dráha CK je podobná bakteriální dvousložkové signální dráze, kterou bakterie vnímá environmentální podněty receptorovou histidinkinázou, která následně přenáší signál na regulátor odpovědi. Rostliny využívají dvousložkovou signální dráhu, odvozenou od výše zmíněné bakteriální, ke vnímání CK. Homologní (nebo odvozené) kinázy dále u rostlin slouží ke vnímání světelných podmínek, etylénu a osmotického prostředí. [2] [11]

U *A. thaliana* se regulátory odpovědi (ARR, Arabidopsis response regulators) dělí do dvou hlavních skupin - ARR typu A a ARR typu B. Mezi ARR typu A se řadí 10 genů (ARR3-ARR9 a ARR15-ARR17), které spadají do pěti párů s velmi podobnou sekvencí. Jejich hlavní funkcí je negativní regulace odpovědi na CK. Expresi ARR typu A je pozitivně regulována přítomností CK. ARR typu B zahrnují 11 genů (ARR1-ARR2, ARR10-ARR14 a ARR18-ARR21), které působí jako transkripční faktory aktivující expresi genů regulovaných CK. [11]

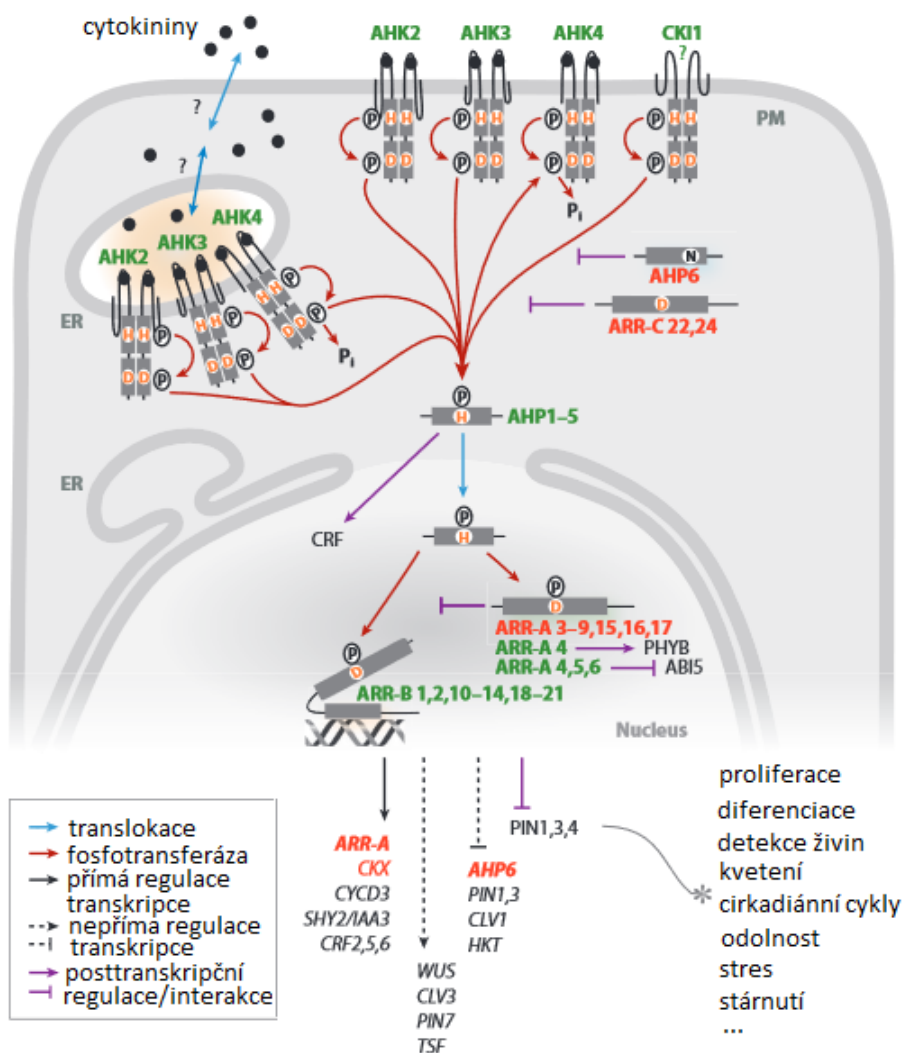
## 1.7 Metabolismus cytokininů

Metabolismus CK lze rozdělit do dvou kategorií. Do první patří modifikace adeninu, což jsou glykosylace<sup>4</sup> na N3, N7 a N9. Tyto N-glykosidy<sup>5</sup> jsou až na několik výjimek biologicky neaktivní. Během N-glykosylace dochází k nevratné deaktivaci CK. Druhá kategorie zahrnuje modifikace postranního řetězce (např. reverzibilní O-glykosylace hydroxylové skupiny). [2]

---

<sup>4</sup>Glykosylace znamená navázání molekuly cukru na nějakou jinou molekulu, nejčastěji bílkovinu.

<sup>5</sup>Glykosidy jsou sloučeniny cukru s necukernatou molekulou, kdy je cukernatá složka označována jako glykon a necukernatá jako aglykon. N-glykosidy, správněji nazývané glykosylaminy, jsou glykosidy s cukernatou složkou vázanou přes atom dusíku.



Obrázek 3: Signální dráha CK znázorňující v modelové buňce histidinkinázy (AHKs; Arabidopsis Histidine Kinase), přenašeče fosfátu (AHPs; Arabidopsis Histidine Phosphotransfer protein) a regulátory odpovědi (ARR) u *Arabidopsis*. Aminokyseliny (histidin a kyselina asparagová), které přijímají fosfátovou skupinu, jsou zvýrazněny červenými písmeny. Tučným písmem jsou vyznačeny signalizační součásti, zelenou jsou znázorněny pozitivní regulátory CK, červenou negativní regulátory CK. Dále jsou zaznačena vybraná spojení k ostatním signálům. Další zkratky: CRF, faktor odezvy CK; PM, plasmatická membrána; ER endoplasmatické retikulum. (převzato a upraveno z [11])

## 1.8 Fyziologické účinky a využití cytokininů

CK v optimální koncentraci regulují dělení a diferenciaci buněk v meristémech nadzemních částí rostliny (nadbytek nebo nedostatek CK rychlost dělení buněk snižuje). Stimulují tvorbu postranních pupenů. V kořenovém meristému podporují diferenciaci buněk, čímž regulují růst kořene a zakládání bočních kořenů. Zvýšený obsah CK snižuje velikost kořene, redukce CK naopak vede k prodlužování kořene a vytváření laterálních kořenů. Ve stonkovém meristému zachovávají nediferencované buňky. Mají vliv na formování cévních svazků. Vlivem ztráty schopnosti dělení v pletivu cév v časně fázi vývoje dochází k nižší hustotě cév v listech. V kombinaci s auxiny umožňují regeneraci rostlin. Zpomalují degradaci bílkovin a destrukci chloroplastů, čímž oddalují stárnutí některých rostlinných orgánů (zejména listů). CK vzájemně interagují s výživou dusíkem. Dusičnany stimulují biosyntézu CK a CK zvyšují asimilaci dusíku aktivací nitrátreduktázy<sup>6</sup>. Pozitivně regulují genovou expresi a také aktivují proteosyntézu<sup>7</sup>. Hrají roli i v cirkadiálních rytmech. Aplikace CK sice neovlivní cirkadiální periodu, vede však ke zpoždění cirkadiální fáze. [7] [31]

Modulace hladiny CK je spojována např. s vyšší produkcí semen, zpomalováním stárnutí a zvětšováním kořene, a proto mají CK velký potenciál pro cílené zlepšení celé řady hospodářsky významných znaků kulturních rostlin [33]. V rostlinných biotechnologiích tvoří součást kultivačních médií. Využívají se také pro stimulaci větvení okrasných plodin nebo v interakci s gibereliny ke tvarování plodů některých jabloní. Velký potenciál mají CK také při zvyšování odolnosti rostlin vůči stresovým podmínkám. Např. modulace hladin CK (tedy jak zvýšení tak snížení hladin CK) zvyšuje odolnost proti suchu u různých druhů rostlin.

## 1.9 Síra

Díky svým specifickým chemickým vlastnostem hraje síra důležitou roli v mnoha metabolických procesech. Je přítomna v aminokyselinách, které jsou často zodpovědné za strukturu a biologickou aktivitu proteinů, v koenzymech a prostetických

---

<sup>6</sup>Nitrátreduktáza je enzym schopný redukovat dusičnanový ion na dusitanový. Umožňuje využití nitrátu jako zdroje dusíku pro syntézu aminokyselin.

<sup>7</sup>Proteosyntéza je proces tvorby bílkovin z aminokyselin, které jsou spojeny do řetězců peptidovou vazbou. Jedná se o anabolický (výstavbový) děj.



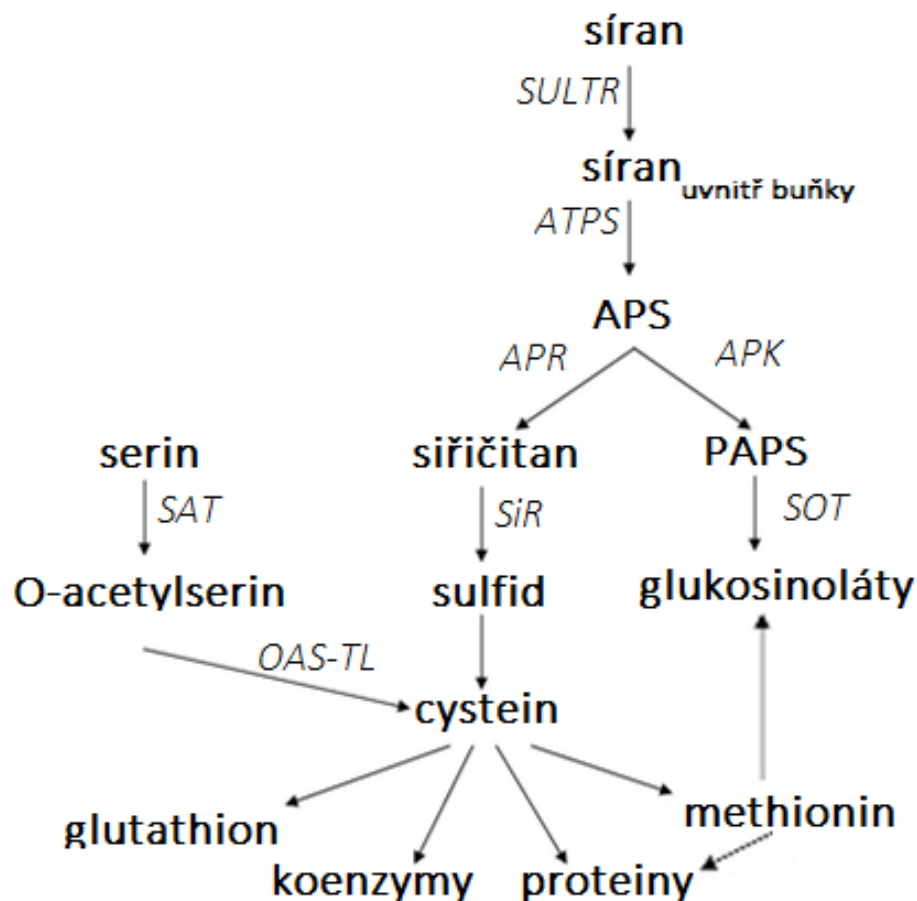
skupinách, jako jsou např. Fe-S centra, kyselina lipoová, thiamin, koenzym A a další [3]. Hlavní využitelnou formou síry pro rostliny je sulfát (síran). Hlavní podíl síry v půdě pochází z organických zbytků, další část z minerálů jako jsou kobaltit, pyrit, sádra a epsomit. Sulfátový anion je v půdě slabě vázán na různých minerálech. Síru organických zbytků a pyritu oxidují v půdě sírné bakterie ve dvou stupních, nejprve na elementární síru a pak na síran.[32]

### 1.10 Příjem a asimilace síry

Ve většině sloučenin je síra přítomna ve formě organických sulfidů, nicméně hlavní dostupnou formou pro rostliny jsou sírany. Příjem a distribuci síranu do rostliny, resp. do buňky, zajišťují transportéry síranu (SULTR). Asimilací je anorganický síran redukován na sulfid, který je následně začleněn do aminokyselinové kostry za vzniku cysteinu. Před redukcí je síran aktivován adenylací za vzniku adenosin 5'-fosfosíranu (APS), která je katalyzována pomocí ATP sulfurylázou. V rostlinných plastidech je APS redukován APS reduktázou (APR) na siřičitan, který je dále redukován sulfidreduktázou (SiR) na sulfid. Sulfid je poté inkorporován do O-acetylserinu (OAS) za vzniku cysteinu. OAS je syntetizován ze serinu a acetyl-koenzymu A serinacetyltransferázou (SAT) a syntéza cysteinu je katalyzována OASThiollyázou (OASTL). SAT a OASTL jsou spojeny do enzymového komplexu zvaného cystein-syntáza. Cystein je tedy konečným produktem asimilace síry [19]. Kvůli své toxicitě neslouží cystein jako zásobní forma síry, ale dále se konvertuje na methionin<sup>8</sup>, vstupuje do proteosyntézy a stává se součástí proteinů, nebo je začleněn do tripeptidu glutathionu (GSH), který představuje hlavní zásobní a transportní formu redukované síry. [3]

---

<sup>8</sup>Methionin je jedna z dvaceti základních aminokyselin tvořících bílkoviny.



Obrázek 4: Zjednodušené schéma asimilace síry.

Klíčovými enzymy, které jsou určující pro rychlost asimilace síry a biosyntézy cysteinu, jsou APR a SAT [17]. Většina enzymů asimilace síranu, s výjimkou sulfidreduktázy, je kódována více geny. Metabolické kroky asimilace síry jsou lokalizovány do různých organel: enzymy redukce síranu jsou lokalizovány v plastidech, zatímco cystein je syntetizován v plastidech, mitochondriích a cytosolu. APS reduktáza je u *Arabidopsis* kódována třemi geny a alespoň dvěma geny u většiny ostatních vyšších rostlin. SAT je kódována pěti geny, jejichž proteinové produkty jsou lokalizovány v mitochondriích, chloroplastech i cytosolu. SAT4 představuje minoritní cytosolickou izoformu, která je pravděpodobně ze všech SAT nejsilněji indukována nedostatkem síry. [3] [17]

### 1.11 Význam síry v zemědělství

Výzkumu potřeby hnojení sírou nebyla ještě v nedávné minulosti věnována patřičná pozornost. Předpokládalo se totiž, že dostatečný přívod síry do půdy je zajištěn ve formě „balastní složky“ řady hnojiv, pesticidů a z imisí oxidu siřičitého do atmosféry po spalování fosilních paliv v tepelných elektrárnách. Tradiční hnojiva s vysokým obsahem síry a dusíku však byla nahrazena hnojivy, která obsahují síru jen v malém množství nebo vůbec. Požadavky mnoha plodin na množství síry se navíc ještě zvýšily v důsledku intenzivního zemědělství a zvyšování výnosů z plodin (v některých případech až dvojnásobně), což vedlo k odstraňování živin z půdy. Tyto změny způsobily velkoplošný výskyt deficitu síry, který se projevuje zvláště u naší na síru nejnáročnější plodiny řepky olejky.

Brukev řepka olejka (*Brassica napus subsp. napus*) je jednoletá rostlina z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Zástupci čeledi brukvovitých jsou na nedostatečné zásobení sírou více citliví než jiné zemědělské plodiny. Např. vypěstování 1 tuny semen řepky vyžaduje 16 kg síry, zatímco na vypěstování stejného množství zrn pšenice jsou potřeba jen 2-3 kg síry [1]. Samotná řepka je indikační plodinou stanovišť s deficitem síry. Pro čeleď brukvovitých jsou charakteristické glukosinoláty, sekundární metabolity nesoucí ve své molekule jeden nebo dva atomy síry, které mají obrannou funkci proti škůdcům. Dále slouží i jako zásobní forma síry při jejím nedostatku v půdě. Jsou považovány za antinutriční látky, a proto byl jejich obsah v řepce radikálně snížen.

Řepka bývá běžně hnojena dusíkem a ke správnému růstu potřebuje vhodný poměr dusíku a síry v půdě. Nedostatek jednoho z těchto nutrientů snižuje příjem a metabolismus druhého (viz 1.12 Role CK v regulaci příjmu a asimilace síry). Deficit síry tak znemožňuje plné využití dusíku, a tento nevyužitý dusík se stává nadměrnou zátěží pro životní prostředí a rizikem kontaminace vod dusičnany. Vyřešení adekvátní výživy řepky sírou by zajistilo návratnost značného množství odebrané síry zpět do půdy, která by poté mohla plně zabezpečit dostatečnou výživu sírou i ostatních méně náročných plodin.

U řepky je prvním vizuálním příznakem nedostatku síry žloutnutí listů, které začíná od kraje listu. Rostliny s nedostatkem síry jsou malé, s krátkými a štíhlými stonky a jsou zpomalené v růstu. Tyto příznaky se objevují až při závažném nedostatku síry. Výnosy a nutriční kvalita plodin však mohou být ovlivněny i bez zřejmých vizuálních příznaků. *A. thaliana* je modelovou rostlinou pro molekulární biologii (viz 1.14 *Arabidopsis thaliana* huseníček rolní). Současně, protože patří do čeledi brukvovitých, u kterých má síra velký význam, může být použita jako vhodná modelová rostlina pro studium výživy sírou a metabolismu síry. Nedostatek síry se u *A. thaliana* projevuje rovněž žloutnutím listů. Dále je charakteristické zvýšení tvorby fialových pigmentů antokyanů. [22]

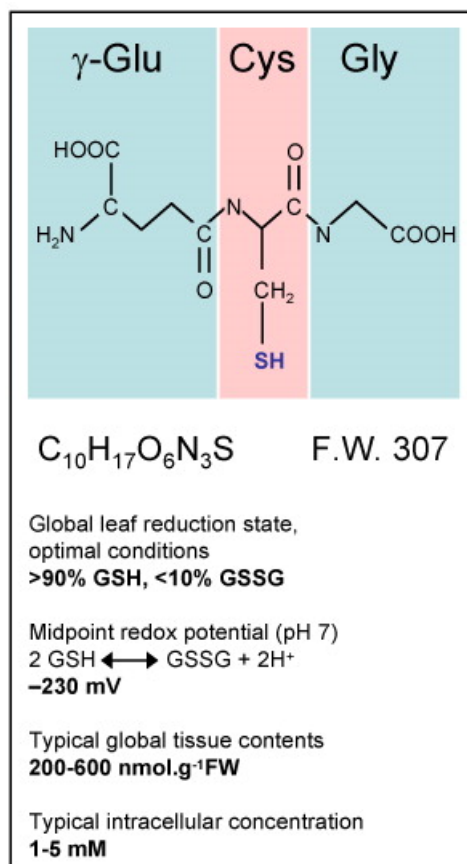
### 1.12 Role CK v regulaci příjmu a asimilace síry

Příjem síranů a redukce APS jsou regulovány mnoha vnitřními a vnějšími faktory, včetně CK. CK indukují klíčový enzym asimilace síry APR1. Příjem síranu a APR ovlivňují CK v opačném směru; zatímco příjem síranu je CK redukován, APR je indukována. Příjem a metabolismus síry je koordinován s příjmem a metabolismem dusíku, který je významně regulován CK. Obecně platí, že nedostatek jednoho z těchto minerálů vede ke snížení příjmu a metabolismu druhého. Koordinace asimilace síry a dusíku je dosaženo regulací příjmu síranu a APR. Právě výživa těmito nutrienty je, jak bylo uvedeno výše, pro brukvovité zvláště důležitá.

### 1.13 Glutathion

GSH je hlavní nízkomolekulární thiol tvořený třemi aminokyselinami: kyselinou glutamovou, cysteinem a glycinem. Jeho chemický název je  $\gamma$ -glutamyl-cystein-glycin. Pro rostliny je nepostradatelný pro řadu funkcí, které v rostlinné buňce vykonává. Je zásobní formou redukované síry a sloučeninou uplatňující se v obranných reakcích. Je to antioxidant, který je zásadní pro detoxifikaci reaktivních forem kyslíku. Dále se účastní i detoxifikace xenobiotik a těžkých kovů (např. Cd). Působí i jako molekula se signální funkcí při regulaci příjmu a metabolismu síry či při regulaci signálních kaskád některých fytohormonů. Podílí se na udržování správného redoxního

prostředí uvnitř buňky a tvorbou disulfidických můstků<sup>9</sup> s proteiny může interagovat s komplexní sítí buněčné signalizace. Šíře uplatnění v reakci na stres a možné signální funkce GSH nejsou zcela známy a jejich soustavné odhalování představuje současný směr a budoucí výzvy studia GSH a redoxní biologie [23]. Hladina a stav GSH jsou ovlivněny řadou faktorů, zejména dostupností síry, ale např. i rostlinnými hormony.



Obrázek 5: Chemická struktura a základní fyzikálně-chemické vlastnosti glutathionu. (převzato a upraveno z [24])

Základní a nejdříve objevenou funkcí GSH byly thiol-sulfidické interakce, ve kterých je redukovaný GSH nepřetržitě oxidován na disulfidickou formu (GSSG) a je regenerován na GSH pomocí NADPH a enzymu glutathionreduktázy. Jestliže je rostlina v normálním stavu, bývá poměr GSSG:GSH konstantní. Pokud v buňce dojde k nárůstu reaktivních forem kyslíku, začne ubývat redukované formy GSH a přibývat oxidované formy. GSH totiž reaguje se vzniklými volnými radikály. Vznik

<sup>9</sup>Disulfidické můstky jsou kovalentní vazby mezi dvěma atomy síry.

GSSG je dále spojen s regenerací monodehydroaskorbátu, oxidované formy dalšího významného antioxidantu - kyseliny askorbové. Po určitou dobu je rostlina schopna regenerovat GSH na redukovanou formu. Při závažných a dlouhotrvajících stresových podmínkách se však GSSG akumuluje, což může vést až k buněčné smrti. [24]

#### 1.14 *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní)

Huseníček rolní je dvouděložná rostlina z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Lodyha je holá a má modravý nádech. Ve spodní části stonku vyrůstá přízemní růžice listů. Listy jsou obkopynaté<sup>10</sup>, na lodyze mívají i eliptický tvar. Plodem je šešule, která se typicky vyskytuje právě u čeledi brukvovitých. Květy jsou bílé, při základně lehce nažloutlé. Huseníček je schopen autogamie (květy jsou samosprašné). Je to jednoletá nebo ozimá rostlina. Kveté od dubna do května a později znovu od srpna do října. Nadzemní část po odkvetení a dozrání semen rychle hyne. Z jedné dospělé rostliny je velký výnos semen. Je rozšířen po celé Evropě s výjimkou nejsevernějších oblastí, dále pak ve východní Africe a střední Asii. Roste na polích, rumišťích, na skalnatých a kamenitých svazích a náspech, v pásmu od nížin až do hor. V molekulární biologii se hojně využívá jako modelový organismus a to především kvůli nenáročnosti a krátké generační době, která ho řadí mezi tzv. efeméry. Má poměrně malý genom rozložený na 5 chromozomech. Sekvenace genomu *A. thaliana*, jakožto prvního rostlinného genomu, byla dokončena v roce 2000. [8] [10]

---

<sup>10</sup>List obkopynatý (*folium oblanceolatum*) je jednoduchý list s čepelí třikrát až čtyřikrát delší než širší. V horní třetině je nejširší.

## 2 Praktická část

### 2.1 Metody a materiál

#### 2.1.1 Kultivace rostlin

Semínka *A. thaliana* (ecotyp Col-0) byla sterilizována 5 minut v 75% ethanolu. Cca 150 semínek bylo vyseto na polyamidovou sítku (Uhelon 120 T, Silk & Progress) položenou na agarové poloviční Murashige and Skoog (MS) médium (pH 5,7) v 12 × 12cm Petriho misce. Semínka byla stratifikována ve tmě při 4 °C po 3 dny. Kultivace rostlin probíhala v růstové komoře (AR36LX, Percival) při šestnáctihodinovém denním (21 °C) a osmihodinovém nočním (19 °C) režimu, při 60% relativní vlhkosti a světelné intenzitě 120-150  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Při ošetření CK byla síťka s jedenáctidenními semenáčky položena do tekutého MS média s 5 × 10<sup>-4</sup>% (v/v) DMSO (kontrola) nebo s CK (*trans*-zeatin nebo 6-benzylaminopurin) rozpuštěnými v DMSO (konečná koncentrace DMSO jako u kontroly). Fotografie rostlin byly pořízeny fotoaparátem Olympus SP-350. Po sběru byly vzorky rychle mrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C.

#### 2.1.2 Stanovení glutathionu

GSH a GSSG byly stanoveny spektrofotometricky pomocí specifické enzymatické metody s využitím DTNB (tzv. Ellmanova metoda<sup>11</sup>). Vzorky semenáček o navážce 200 mg čerstvé váhy byly rozdrceny v kapalném dusíku a extrahovány do 900  $\mu\text{l}$  2% kyseliny metafosforečné. Vzorky byly centrifugovány (2 °C, 10 000 otáček/min.) po dobu 10 minut. Poté byl 1 ml supernatanu odpipetován do nové zkumavky. Těsně před měřením byly vzorky neutralizovány 0,28M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> v poměru 1 : 10 (50  $\mu\text{l}$  vzorku + 500  $\mu\text{l}$  Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Reakční směs byla tvořena:

- 0,7 ml 0,3mM NADPH (rozpuštěný v 125mM K/K2-fosfátovém pufru o pH 7,5 s 6,3mM EDTA)
- 0,1 ml 6mM DTNB (rozpuštěný v 128 mM K/K2-fosfátovém pufru o pH 7,5 s 6,3mM EDTA)

---

<sup>11</sup>Ellmanova metoda je založena na interakci thiolové skupiny aminokyseliny s DTNB.

- 1 U glutathionreduktázy
- 0,1 ml neutralizovaného extraktu

GSH byl stanoven v kinetické reakci, ve které byla redukce DTNB na žlutý TNB měřena jako změna absorbance při 412 nm/min. pomocí spektrofotometru Helios. Rychlost vzniku žlutého TNB je úměrná koncentraci GSH ve vzorku. Množství celkového GSH bylo zjištěno pomocí standardní křivky redukováného GSH.

GSSG byl stanoven po odstranění redukováného GSH. K neutralizovaným vzorkům (100  $\mu$ l extraktu bylo neutralizováno 500  $\mu$ l 0,07M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) bylo přidáno 40  $\mu$ l 2-vinylpyridinu (97%), který s redukováným GSH reaguje za mírně kyselého pH a tím jej vyváže. Inkubace probíhala 1 hodinu při 25 °C. Stanovení množství GSSG bylo provedeno obdobně jako u celkového GSH. Množství GSSG bylo zjištěno pomocí standardní křivky GSSG.

### 2.1.3 Izolace RNA

Rostlinná pletiva byla homogenizována v tekutém dusíku. Ještě před roztáním byl přidán 1 ml Trizolu. Každý vzorek byl promíchán převrácením a asi 5 minut se inkuboval při laboratorní teplotě. Bylo přidáno 200  $\mu$ l chloroformu, vzorky byly 15 sekund intenzivně protřepávány a znovu se 3 minuty inkubovaly při laboratorní teplotě. Po dobu 15 minut byly centrifugovány (4 °C, 12 000 otáček/min.) a poté byla bez porušení proteino-DNA vrstvy odebrána horní vodní fáze, do které bylo přidáno 500  $\mu$ l isopropanolu a RNA se 10 minut srážela při laboratorní teplotě. Poté byly centrifugovány po dobu 10 minut (4 °C, 10 000 otáček/min.). Ze zkumavek byl odpipetován supernatant, k peletu bylo přidáno 500  $\mu$ l 70% ethanolu. Zkumavky se několikrát obrátily a krátce stočily při 7 000 otáčkách. Ethanol byl pečlivě odsát a zkumavky se nechaly vyschnout. Podle velikosti byl pelet rozpuštěn v 20 – 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

### 2.1.4 Měření koncentrace RNA

RNA byla naředěna 50 – 200 x (tak aby byla výsledná absorbance  $A_{260}$  v rozmezí 0,1 – 1). Absorbance byla měřena při 260 nm a výsledná koncentrace RNA byla



vypočtena podle vzorce:

$$c = 40 \cdot A_{260} \cdot \text{ředění}/1000 [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

### 2.1.5 qRT-PCR

Hladina transkriptu genů *ARR5*, *APR1*, *SAT4*, *Chac-c* a *LSU2* byla zjištěna pomocí reverzní transkripce s následnou kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (qRT-PCR) pomocí fluorescenčního barviva SYBR Green I.

#### Reverzní transkripce

Reverzní transkripce slouží k přepisu z mRNA do cDNA. Pro reverzní transkripci bylo použito 1-5 mg RNA, oligo(dT) primer a reverzní transkriptáza SuperScript II (Invitrogene). Reakční směs byla připravena podle doporučení výrobce. Po počáteční denaturaci RNA (70 °C) a nasednutí oligo(dT) primerů (4 °C) proběhla reverzní transkripce při 42 °C. Výsledná cDNA byla následně 5krát naředěna.

#### qPCR

Složení reakční směsi:

- 12,8  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O
- 2,5  $\mu\text{l}$  10 x pufru
- 1  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  dNTPs (Invitrogene)
- 1  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  přímého primeru (f)
- 1  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  zpětného primeru (r)
- 1  $\mu\text{l}$  SYBR Green I (1000x ředěného)
- 0,7 U ( $\mu\text{l}$ ) Taq polymerázy (Top-bio)
- 5  $\mu\text{l}$  cDNA

Sekvence použitých primerů:

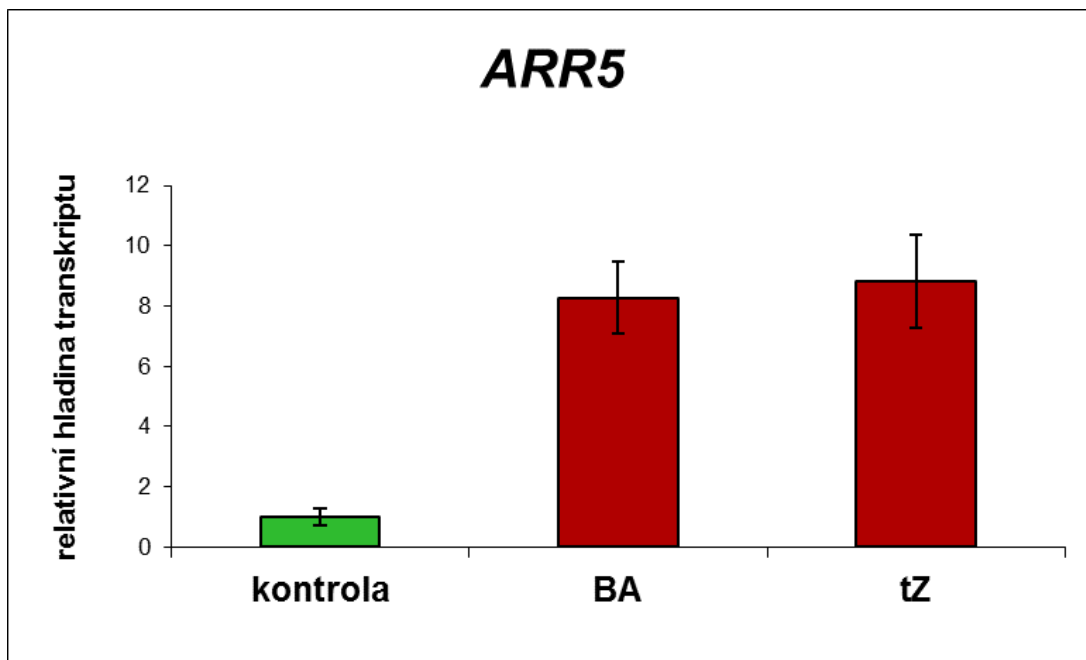
fARR5 (GCTGATAGAACCAAGACTGA)

rARR5 (CTTCCAAAATAACACACCAC)  
fAPR1 (TGCTAAAGTGAACGGGGAA)  
rAPR1 (AGCCAATTTATCCGCCAGT)  
fSAT4 (CCATCTATGACAATGGAGCA)  
rSAT4 (TTGATGATGAAAACCGCCT)  
fChac-c (TTGTGGGAACAACCGAGAG)  
rChac-c (GACCCGTTGACGAGTGGA)  
fLSU2 (GCCGAGCTTGAAGCAGA)  
rLSU2 (GATATGAGCCGATAAGAGGA)  
fUBQ10 (AACGGGAAAGACGATTAC)  
rUBQ10 (ACAAGATGAAGGGTGGAC)  
fACT2 (GCTTCCCTCAGCACATTC)  
rACT2 (GTCACACACAAGTGCATC)

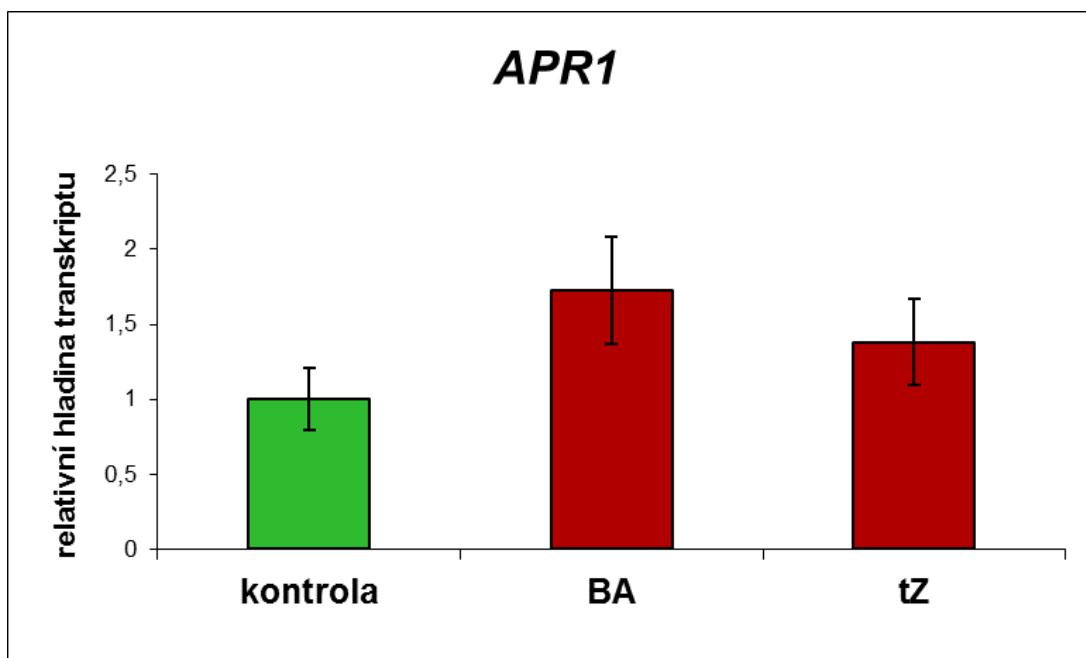
qPCR proběhla na Light Cycleru 480 (Roche). Teplotní režim qPCR zahrnoval: 94 °C/15 s (denaturace DNA), 58 °C/15 s (nasedání primerů, tzv. annealing), 72 °C/20 s (syntéza DNA, tzv. elongace) a následnou detekci fluorescenčního signálu. Relativní množství mRNA bylo spočítáno pomocí koncentrační řady cDNA. Genová exprese byla normalizována na referenční geny *UBQ10* a *ACT2*.

## 2.2 Výsledky

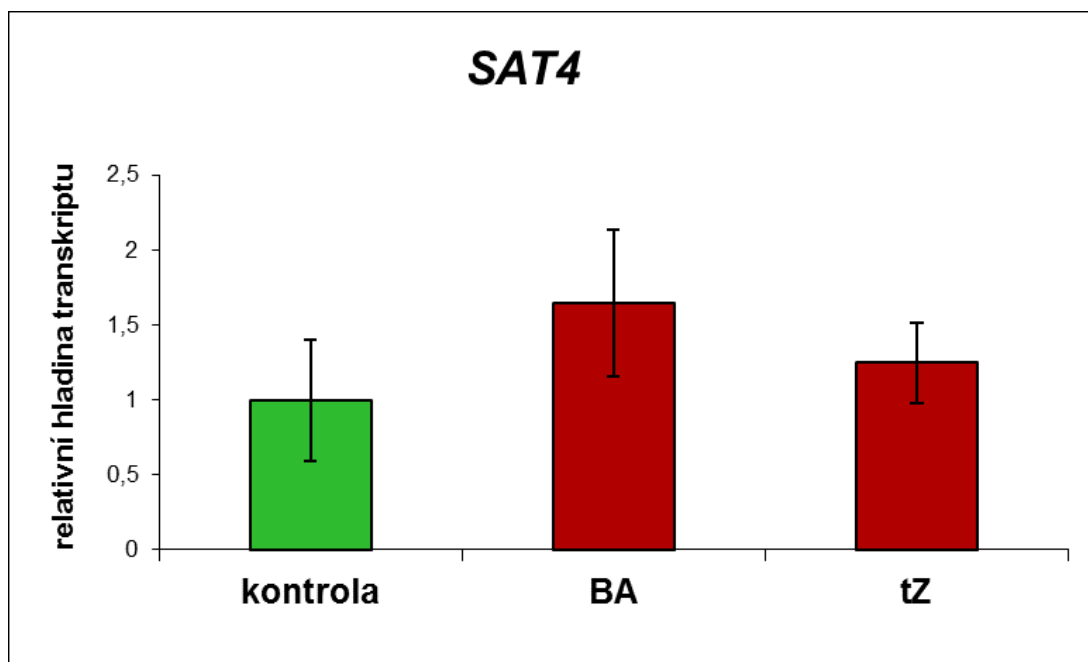
Jedenáctidenní semenáčky *Arabidopsis thaliana* byly ošetřeny dvěma typy cytokininů (CK), 6-benzylaminopurinem (BA) a *trans*-zeatinem (*tZ*), po dobu dvou hodin. Po tomto 2h působení byla sledována exprese genu *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 5* (*ARR5*), který je markerem hladiny CK (Obr. 6), genů asimilace síry *ADENOSIN 5'-PHOSPHO-SULFATE REDUCTASE 1* (*APR1*) a *SERINE-ACETYLTRANSFERASE 4* (*SAT4*) a markerových genů nedostatku síry, představovaných geny *RESPONSE TO LOW SULFUR 2* (*LSU2*) a *Chac-c-like family protein* (*Chac-c*). Ke zjištění přesné hladiny transkriptu daného vzorku bylo využito metody qRT-PCR. Hladina transkriptu *ARR5* se po 2h působení 5 $\mu$ M BA a *tZ* zvýšila 8,27krát, resp. 8,83krát (Obr. 6). Indukce genu *ARR5* potvrdila zvýšení hladiny CK (vstup CK do buňky a aktivaci signální dráhy CK). Zvýšená hladina CK dále vedla ke zvýšení exprese genů metabolismu síry a dalších genů spojených s odpovědí na její nedostatek. Hladina transkriptu *APR1* se po 2h působení 5 $\mu$ M BA zvýšila 1,73krát, zatímco po 2h působení 5 $\mu$ M *tZ* nebylo zvýšení statisticky signifikantní (Obr. 7). Hladina transkriptu *SAT4* se po 2h působení 5 $\mu$ M BA zvýšila 1,64krát, po 2h působení 5 $\mu$ M *tZ* však zvýšení opět nebylo statisticky signifikantní (Obr. 8). Hladina transkriptu *Chac-c* se po 2h působení 5 $\mu$ M BA zvýšila 4,36krát a po 2h působení 5 $\mu$ M *tZ* 2,96krát. Hladina transkriptu *LSU2* se po 2h působení 5 $\mu$ M BA zvýšila 3,83krát, po 2h působení 5 $\mu$ M *tZ* 2,16krát.



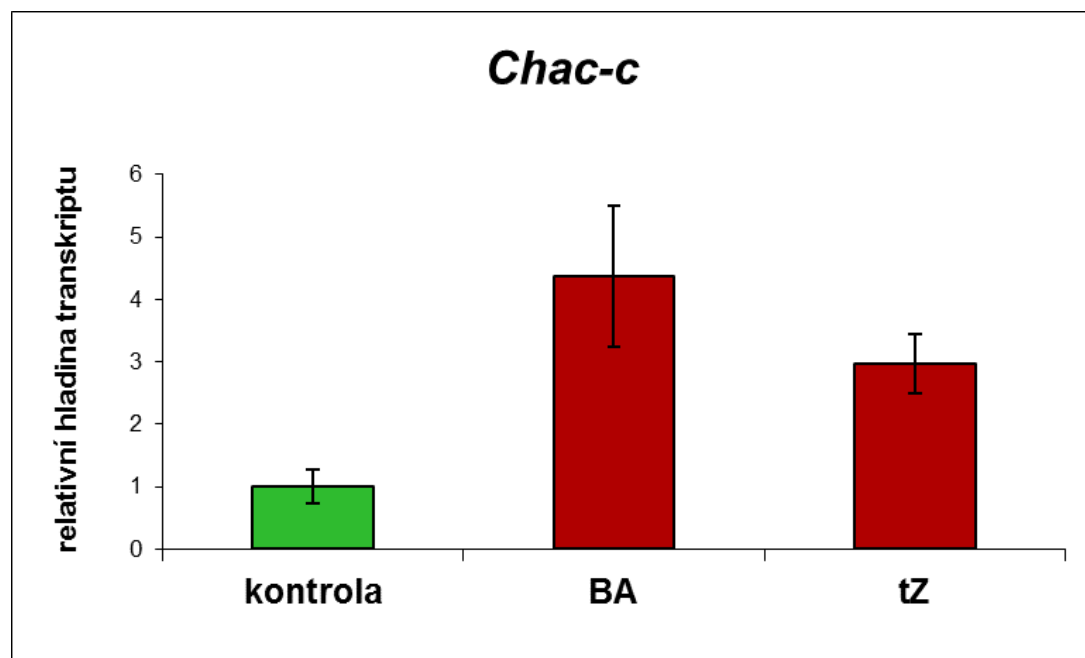
Obrázek 6: Relativní hladina transkriptu genu *ARR5* u jedenáctidenních semenáčků *A. thaliana* po působení  $5\mu\text{M}$  BA a *tZ* po dobu 2 h. Data představují průměr  $\pm$  směrodatná odchylna z nejméně čtyř nezávislých vzorků.



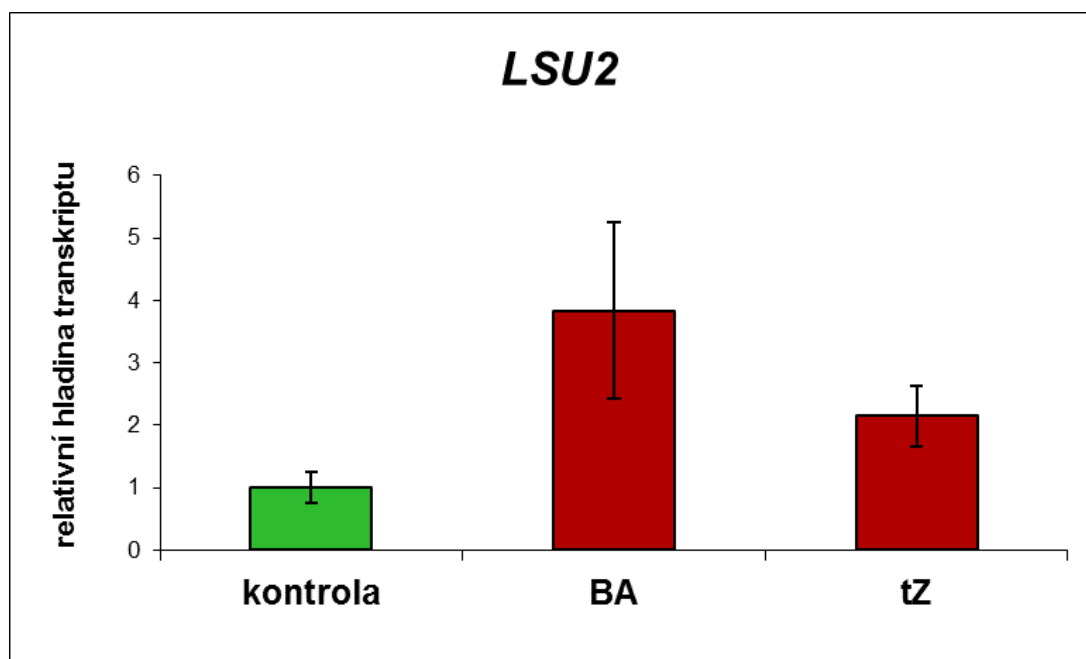
Obrázek 7: Relativní hladina transkriptu genu *APR1* u jedenáctidenních semenáčků *A. thaliana* po působení  $5\mu\text{M}$  BA a *tZ* po dobu 2 h. Data představují průměr  $\pm$  směrodatná odchylna z nejméně čtyř nezávislých vzorků.



Obrázek 8: Relativní hladina transkriptu genu *SAT4* u jedenáctidenních semenáčků *A. thaliana* po působení 5 $\mu$ M BA a tZ po dobu 2 h. Data představují průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z nejméně čtyř nezávislých vzorků.

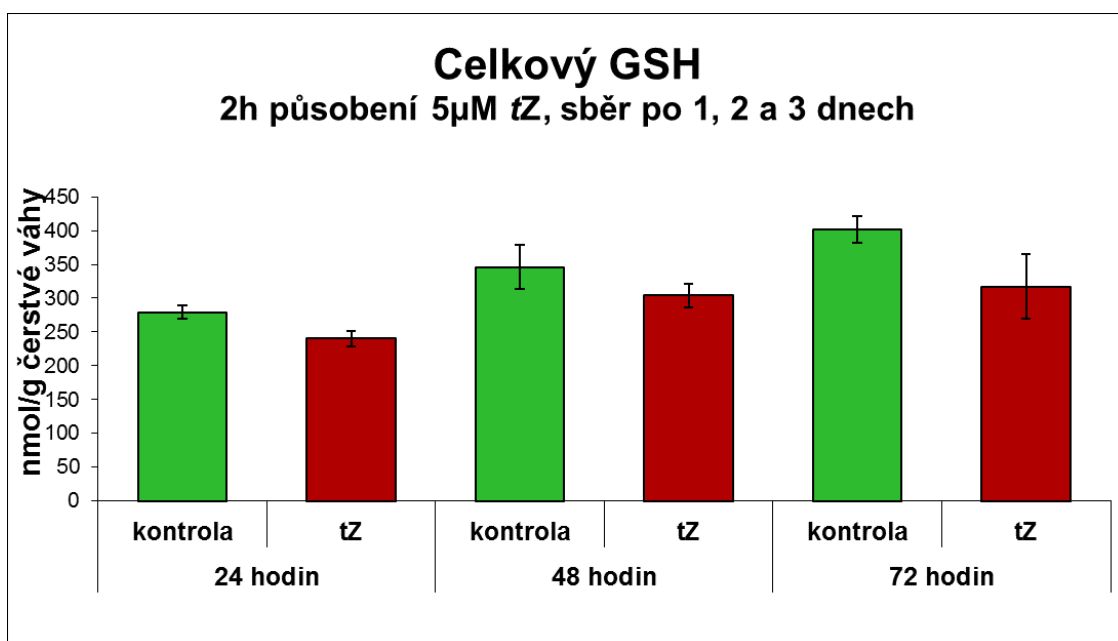


Obrázek 9: Relativní hladina transkriptu genu *Chac-c* u jedenáctidenních semenáčků *A. thaliana* po působení 5 $\mu$ M BA a tZ po dobu 2 h. Data představují průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z nejméně čtyř nezávislých vzorků.

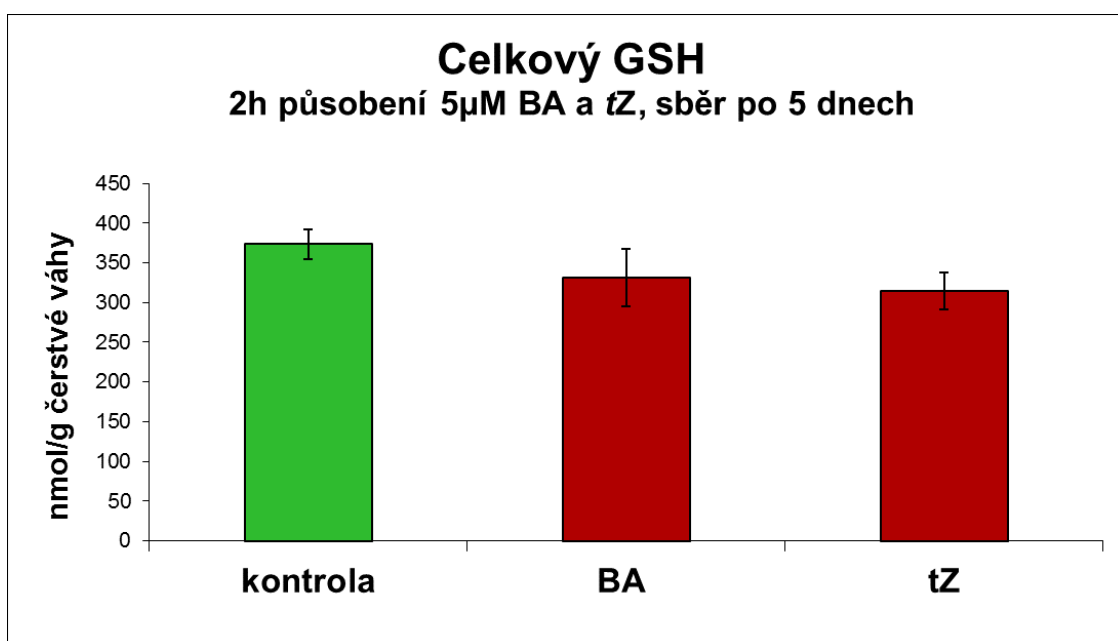


Obrázek 10: Relativní hladina transkriptu genu *LSU2* u jedenáctidenních semenáčků *A. thaliana* po působení  $5\mu\text{M}$  BA a *tZ* po dobu 2 h. Data představují průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z nejméně čtyř nezávislých vzorků.

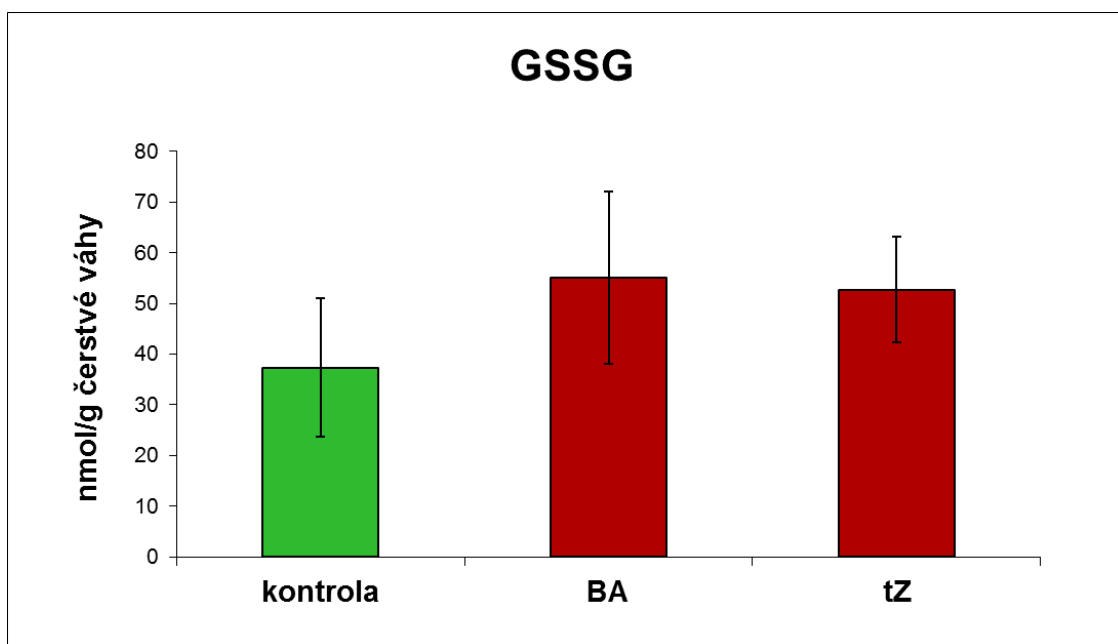
Po 2h působení byly CK ze semenáčků vymyty. Semenáčky na síťce byly opět položeny na agarové plotny a kultivace pokračovala po dobu 1, 2, 3 a 5 dní. V těchto časových intervalech byla stanovena hladina celkového glutathionu (GSH). U semenáčků bylo ve všech časových intervalech zjištěno nízké, ale již signifikantní snížení hladiny celkového GSH. Po 5 dnech byl rovněž stanoven oxidovaný glutathion (GSSG). Po 24 hodinách od 2h působení  $5\mu\text{M}$  *tZ* byl GSH snížen o 13,7 %, po 48 hodinách o 12,2 % a po 72 hodinách o 21,1 % (Obr. 11). Po 5 dnech od 2h působení  $5\mu\text{M}$  BA byl GSH snížen o 11,4 % a ve vzorcích ošetřených  $5\mu\text{M}$  *tZ* byl GSH snížen o 15,7 % (Obr. 12). GSSG se u vzorků ošetřených  $5\mu\text{M}$  BA a *tZ* mírně zvýšil o 47,6 % resp. 41,3 %. Zvýšení však byla nad hladinou statistické signifikance při  $P=0,070$  resp.  $P=0,058$ . Poměr GSH : GSSG se po 5 dnech od ošetření CK snížil z 9:1 u kontrolních vzorků na poměr 5:1 u vzorků ošetřených BA a *tZ* (Obr. 13). Po 2h působení a následném vymytí CK vykazovaly tyto semenáčky oproti kontrole mírné zpomalení růstu patrné z menší velikosti semenáčků, a to jak kořene (Obr. 17-19), tak i nadzemní části (Obr. 14-16).



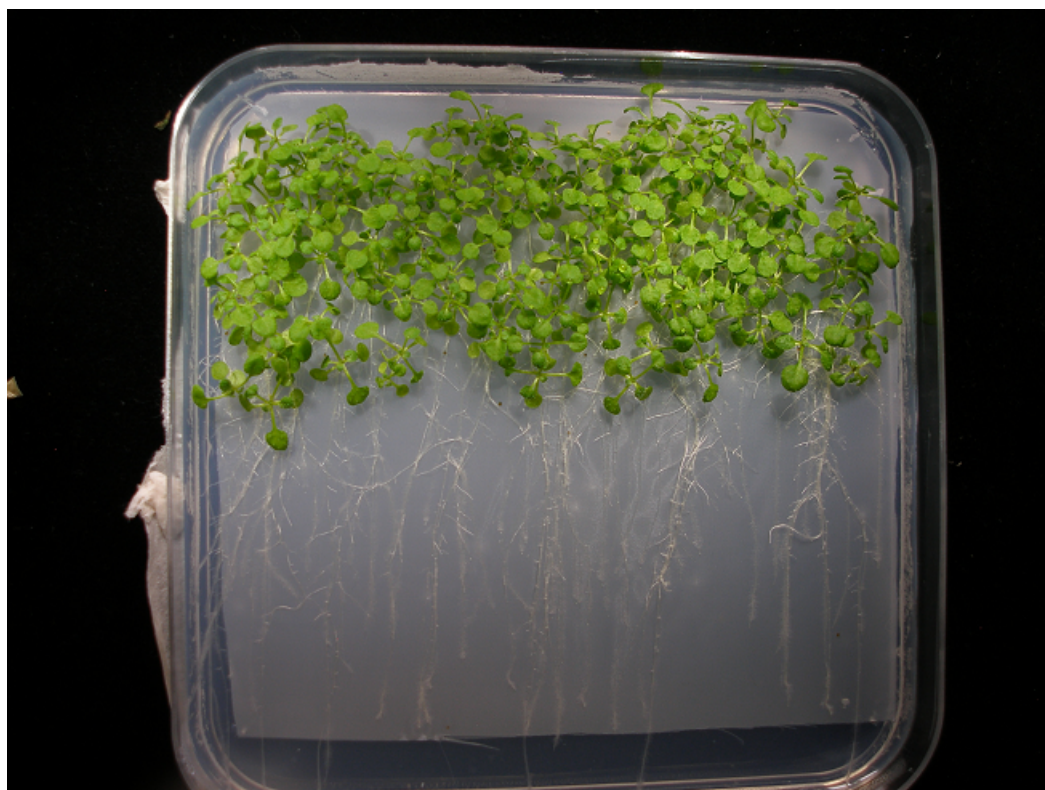
Obrázek 11: Stanovení celkového GSH v semenáčcích *A. thaliana* po 2h působení 5 $\mu$ M tZ, vzorky byly sbírány 24, 48 a 72 hodinách po tomto krátkodobém působení CK.



Obrázek 12: Stanovení celkového GSH v semenáčcích *A. thaliana* po 2h působení 5 $\mu$ M BA a tZ, vzorky byly sbírány 5 dní od tohoto krátkodobého působení CK.

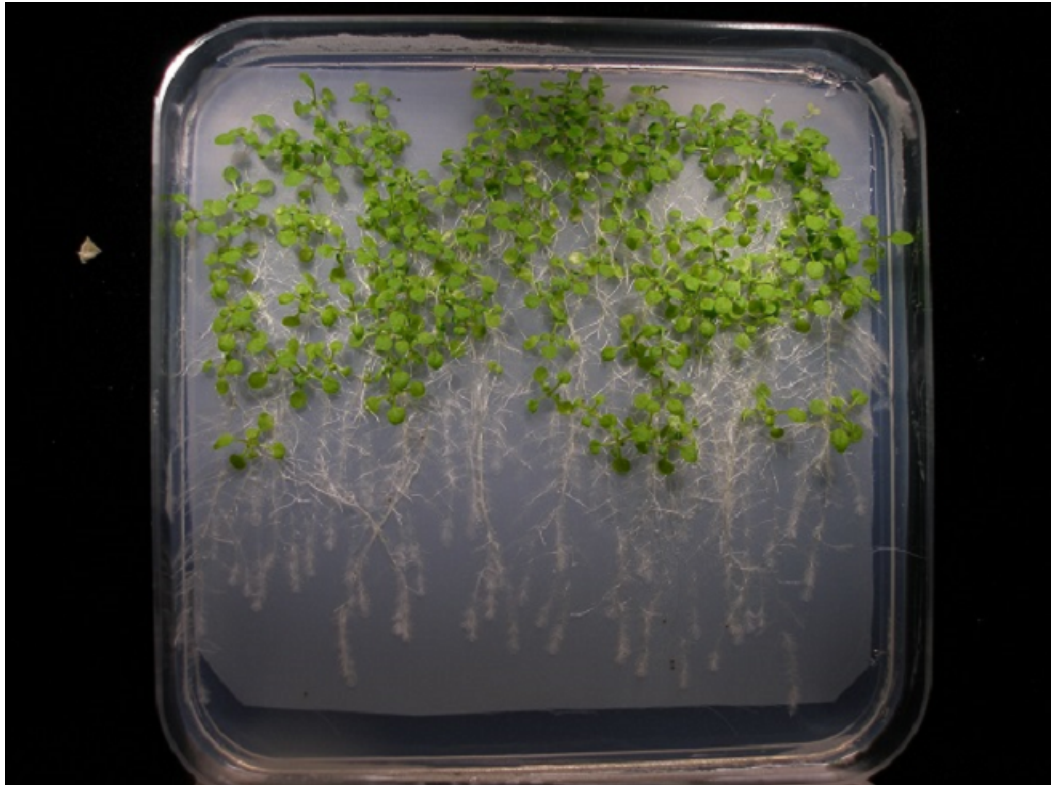


Obrázek 13: Stanovení množství GSSG v semenáčcích *A. thaliana* po 5 dnech od 2h působení  $5\mu\text{M}$  BA a tZ.



Obrázek 14: Kontrolní semenáčky *A. thaliana*, které nebyly ošetřeny CK.

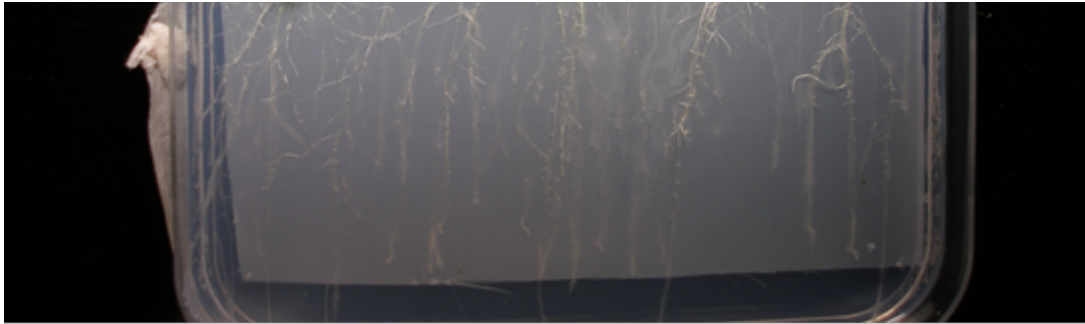




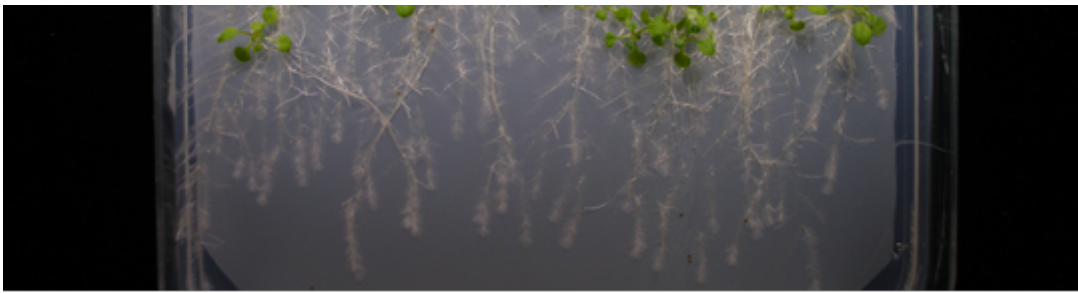
Obrázek 15: Semenáčky *A. thaliana* 5 dní od 2h působení BA.



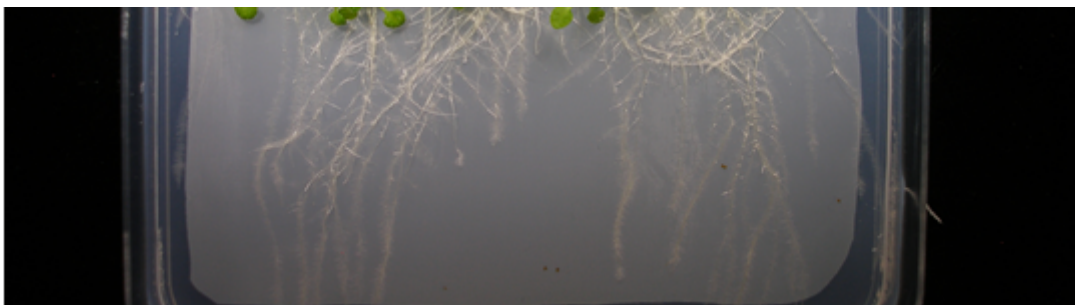
Obrázek 16: Semenáčky *A. thaliana* 5 dní od 2h působení tZ.



Obrázek 17: Kořenová část kontrolních semenáčků *A. thaliana*, které nebyly ošetřeny CK.



Obrázek 18: Kořenová část semenáčků *A. thaliana* 5 dní od 2h působení BA.



Obrázek 19: Kořenová část semenáčků *A. thaliana* 5 dní od 2h působení tZ.

### 3 Diskuze

V průběhu posledních desetiletí se ukázalo, že dostupnost síry je v některých částech světa pro zemědělství limitující, což je paradoxně výsledek snížení silného znečištění ovzduší v průmyslových oblastech vyspělých zemí. Jednalo se zejména o snížení emisí sloučenin síry z elektráren. Konkrétní opatření pro snížení emisí oxidu siřičitého na Zemi se region od regionu liší - jsou to výsledky environmentálních právních předpisů uložené místními vládami. Jak snížení síry, což má za následek pokles atmosférické depozice síry na zemědělské půdě, tak použití bezsirných hnojiv (zato však bohatých na dusík a fosfor) vedly k nedostatečnému zásobování síry u řady plodin, zejména u těch, které mají na síru vysoké požadavky (např. řepka aj. zástupci čeledi brukvovitých, mezi které patří i námi studovaná *Arabidopsis thaliana*).

Při optimálním vývoji by se měl celkový obsah síry v sušině v závislosti na rostlinném druhu pohybovat mezi 0,1 až 0,5 % (obsah síry je u čeledi brukvovitých přibližně třikrát vyšší než např. u obilnin). Typickým vizuálním projevem nedostatku síry u rostlin je žloutnutí listů (důsledek poklesu obsahu chlorofylu), které začíná od vrcholu, ale po delší době se objevuje i na spodních listech. Dále dochází ke snížení aktivity enzymů a zpomalení syntézy proteinů, což vede ke hromadění organických dusíkatých látek a nitrátů. Nedostatek síry v půdě může ovlivnit výnosy plodin, jejich nutriční kvalitu a dále i odolnost vůči stresovým podmínkám [9] [19] [30]

I přes svůj relativně nízký obsah v rostlinách je tedy pro rostliny síra nezbytně důležitá. Sloučeniny obsahující síru hrají zásadní roli v obraně rostlin vůči stresovým podmínkám, zejména vůči suchu a napadení patogeny [12] [13] [29]. Glutathion (GSH) představuje klíčovou molekulu pro detoxifikaci těžkých kovů. S rezistencí ke stejným stresovým podmínkám jsou spojeny i cytokininy (CK) [26]. Bylo rovněž popsáno, že i krátkodobé působení CK zvyšuje odolnost rostlin vůči suchu, solím, patogenům a herbivorům [4] [14] [15] [16] [27]. Jednorázová aplikace syntetického derivátu CK, 2-chloro-6-(3-methoxyphenyl)aminopurinu známého pod názvem INCYDE (inhibitor of cytokinin degradation), která způsobuje patrně jen mírné zvýšení CK, vede k větší toleranci vůči těžkým kovům, pro jejichž detoxifikaci je klíčovým metabolitem GSH [6]. Modulace hladiny GSH účinkem CK může proto

představovat faktor, který je příčinou vyšší tolerance vůči stresovým podmínkám. Bylo zjištěno, že modulovaná hladina CK ovlivňuje expresi genů souvisejících se sírou a hladinou GSH. Zvýšená hladina CK u *A. thaliana* vedla k indukci genů metabolismu síry a dalších genů spojených s odpovědí na její nedostatek. Snížená hladina CK vyvolala represi těchto genů. Zvýšená hladina CK dále způsobila snížení hladiny GSH, zatímco snížení hladiny CK vedlo ke zvýšení hladiny GSH (Pavlů, nepublikováno). Krátkodobé ovlivnění CK a následné sledování dopadu tohoto ovlivnění po určité časové periodě mívá často specifické účinky a představuje další způsob experimentálního sledování dopadu CK. Z tohoto důvodu a z důvodu výše zmíněných souvislostí mezi sloučeninami obsahujícími síru, modulací hladin CK a odolností ke stresovým podmínkám, byla testována hypotéza, zdali nemá krátkodobé působení CK pozitivní dopad na metabolismus síry a na hladinu metabolitů obsahujících síru, z nichž je v mnoha směrech klíčový GSH. Jednorázová aplikace CK (např. ve formě postřiku) navíc představuje nejjednodušší možné a praktické využití CK v zemědělství.

V experimentu byly jedenáctidenní semenáčky *A. thaliana* nejprve ošetřeny CK po dobu 2 hodin. Poté byla sledována exprese genů souvisejících s metabolismem síry a odezvou na její nedostatek. Hladina transkriptu *ARR5* se po 2h působení  $5\mu\text{M}$  BA zvýšila 8,27krát, po 2h působení  $5\mu\text{M}$  tZ 8,83krát, čímž bylo prokázáno, že CK aktivují v semenáčcích *A. thaliana* patřičnou odezvu.

Hladina transkriptu *APR1* (*ADENOSIN 5'-PHOSPHOSULFATE REDUCTASE*) se po 2h působení  $5\mu\text{M}$  BA zvýšila 1,73krát, po 2h působení  $5\mu\text{M}$  tZ nebylo zvýšení statisticky signifikantní. APR1 představuje jednu z izoform adenosin 5'-fosfosulfát reductázy, které jsou klíčovými enzymy asimilace síry. CK tedy pozitivně regulují asimilaci síry. Hladina transkriptu *SAT4* (*SERINE ACETYLTRANSFERASE 4*) se po 2h působení  $5\mu\text{M}$  BA zvýšila 1,64krát, po 2h působení  $5\mu\text{M}$  tZ nebylo zvýšení statisticky signifikantní. SAT4 představuje minoritní cytosolickou izoformu serinacetyltransferáz (SAT). SAT jsou klíčové enzymy pro tvorbu cysteinu. Spolu s asimilací síry tedy CK pozitivně regulují i navazující biosyntézu cysteinu. Indukce *SAT4* po 2h působení CK nebyla doposud popsána a představuje tedy nový poznatek o dopadu CK na metabolismus síry.

Hladina transkriptu *Chac-c* (*Chac-c-like family protein*) se po 2h působení 5 $\mu$ M BA zvýšila 4,36krát a po 2h působení 5 $\mu$ M tZ 2,96krát. Hladina transkriptu *LSU2* (*RESPONSE TO LOW SULFUR 2*) se po 2h působení 5 $\mu$ M BA zvýšila 3,83krát, po 2h působení 5 $\mu$ M tZ 2,16krát. Funkce LSU genů byla studována u tabáku, kde byla ukázána jejich role ve správné odpovědi na nedostatek síry [20]. I když funkce genů odpovědi na nedostatek síry není přesně známá, jejich indukce patrně vede k mobilizaci síry díky zvýšení transportu sirných sloučenin a jejich metabolizaci.

Jelikož byla pozorována indukce genů *APR1* a *SAT4*, které jsou klíčové pro metabolismus síry, bylo očekáváno zvýšení množství sloučenin obsahujících redukovanou síru, z nichž je nejcharakterističtější GSH, který *de facto* představuje konečný produkt asimilace síry a je rovněž zásobní a transportní formou redukované síry. Nicméně, po 2h ošetření a následném vymytí CK bylo pozorováno mírné snížení celkového GSH v rozsahu 11,4-21,1 % po 1,2,3 a 5 dnech od krátkodobého ošetření CK. CK tedy patrně vyvolávají i další změny v metabolismu síry a GSH, v důsledku kterých nebyl GSH zvýšen. Příkladem může být snížení příjmu síranů z půdy vyvolané CK [21]. Je nutné poznamenat, že krátkodobá aplikace vysoké hladiny CK je (i přes odmytí CK) pravděpodobně následována působením zbytkových CK, které nebyly odmyty nebo přetrvávají uvnitř rostlinného těla.

Zajímavé je, že byla pozorována tendence ke zvýšení GSSG. Poměr GSH:GSSG se po 2h působení 5 $\mu$ M BA a tZ snížil z 9:1 (u kontrol) na 5:1. Zvýšení hladiny GSSG se přechodně objevuje po působení biotických a abiotických stresů. Změna poměru GSH:GSSG naznačuje změnu redoxního potenciálu GSH, o kterém se předpokládá, že má dopady na mnoho buněčných procesů. Např. zvýšení GSSG se připisuje indukce genů obrany proti patogenům, včetně genu *PATHOGENESIS-RELATED1 (PR1)* [23] [24]. Indukce *PR1* genu po působení CK již byla popsána [14] [15]. Zvýšení GSSG po krátkodobém působení CK tedy může představovat mechanismus, kterým CK aktivují odpověď podobnou reakci na napadení patogenem. Zvýšený GSSG může aktivovat další geny obrany proti stresovým faktorům, jejichž indukce může být příčinou zvýšené odolnosti proti suchu po krátkodobém ovlivnění rostliny CK. [16] [27]

Krátkodobé ošetření CK se po následné pětidenní kultivaci u semenáčků *A. thaliana* projevilo změnou fenotypu. Semenáčky byly mírně zpomalené v růstu. Zajímavé bylo vyšší množství bočních kořínků, které je charakteristické pro rostliny se sníženou hladinou CK. Nicméně pozorované změny fenotypu nebyly kvantifikovány. Analýza fenotypu semenáčků po krátkodobém vystavení semenáčků vysoké hladině CK může rozšířit poznatky o dopadech tohoto specifického způsobu ovlivnění rostliny CK. CK aktivují homeostatické mechanismy, které tlumí signální dráhu CK a snižují hladinu aktivních CK. Indukce homeostatických mechanismů může představovat příčinu některých podobností u rostlin se sníženou hladinou CK a rostlin krátkodobě ošetřených CK.

## Závěr

Práce studuje pozdní dopad krátkodobého působení cytokininů (CK) *trans*-zeatinu a 6-benzylaminopurinu na metabolismus síry a hladinu glutathionu (GSH). Ukázalo se, že zvýšená hladina CK indukuje geny metabolismu síry a geny spojené s odezvou na její nedostatek, což indikuje zvýšení metabolismu síry a patrně i její remobilizaci. Tato aktivace metabolismu síry se však pozitivně neprojevila na hladině celkového GSH, který představuje charakteristickou sloučeninu obsahující síru. Nicméně byla pozorována tendence ke zvýšení hladiny oxidovaného glutathionu (GSSG). Hledání možných souvislostí mezi zvýšením GSSG a zvýšenou rezistencí rostlin krátkodobě ošetřených CK k abiotickým a biotickým stresům může být předmětem dalších experimentálních studií.

## Seznam použité literatury a internetových zdrojů

- [1] ANJUM, N.A., GILL, S.S., UMAR, S., AHMAD, I., DUARTE, A.C., PEIRE, E. Improving growth and productivity of Oleiferous Brassicas under changing environment: significance of nitrogen and sulphur nutrition, and underlying mechanisms. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:657808. doi: 10.1100/2012/657808. Epub 2012 May 1. PubMed PMID: 22629181; PubMed Central PMCID: PMC3353521.
- [2] ARGUESO, C. T., FERREIRA, F. J. and KIEBER, J. J. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell & Environment*, 2009. 32: 1147–1160. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01940.x
- [3] DAVIDIAN, J.C., KOPRIVA, S. Regulation of Sulfate Uptake and Assimilation — the Same or Not the Same? *Mol. Plant* (2010) 3 (2): 314-325. doi: 10.1093/mp/ssq001
- [4] DERVINIS, CH., FROST, CH., LAWRENCE, S., NOVAK, N., DAVIS, J. Cytokinin Primes Plant Responses to Wounding and Reduces Insect Performance. *Journal of Plant Growth Regulation* (2010) 29;289-296. doi:10.1007/s00344-009-9135-2.
- [5] FRÉBORT, I., KOWALSKA, M., HLUSKA, T., FRÉBORTOVÁ, J., GALUSZKA, P. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J Exp Bot*. 2011 May;62(8):2431-52. doi: 10.1093/jxb/err004. Epub 2011 Feb 14. Review. PubMed PMID: 21321050.
- [6] GEMROTOVÁ, M., KULKARNI, M.G., STIRK, W.A., STRNAD, M., STADEN, J.V., SPÍCHAL, L. Seedlings of medicinal plants treated with either a cytokinin antagonist (PI-55) or an inhibitor of cytokinin degradation (INCYDE) are protected against the negative effects of cadmium. *Plant Growth Regulation*, Volume 71, Issue 2 , pp 137-145. doi:10.1007/s10725-013-9813-8.
- [7] GLOSER Jan. *Fyziologie rostlin*, 3.část – růst a vývoj, 9.4.2013  
Dostupné z: [http:// is.muni.cz/el/1431/jaro2013/Bi4060/um/ Skripta3\\_ Rust\\_2013NS.pdf](http://is.muni.cz/el/1431/jaro2013/Bi4060/um/Skripta3_Rust_2013NS.pdf) (1.1.2014)



- [8] HÁJKOVÁ, J. Huseníček rolní – Arabidopsis Thaliana, 2011. Příroda.cz  
Dostupné z: <http://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=1349> (1 .10. 2013)
- [9] HAWKESFORD, M. J. and DE KOK, L. J. Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell & Environment*, 2006. 29: 382–395. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01470.x
- [10] HOSKOVEC, L. ARABIDOPSIS THALIANA (L.) Heynh. – huseníček rolní / arábkovka Thalova, 2007. BOTANY.cz  
Dostupné z:<http://botany.cz/cs/arabidopsis-thaliana/> (1 .10. 2013)
- [11] HWANG, I., SHEEN, J., MÜLLER, B. Cytokinin signaling networks. *Annu Rev Plant Biol.* 2012;63:353-80. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105503. Review. PubMed PMID: 22554243
- [12] CHAN, K.X., WIRTZ, M., PHUA, S.Y., ESTAVILLO, G.M., POGSON, B.J. Balancing metabolites in drought: the sulfur assimilation conundrum. *Trends Plant Sci.* 2013 Jan;18(1):18-29. doi: 10.1016/j.tplants.2012.07.005. Epub 2012 Oct 2. Review. PubMed PMID: 23040678.
- [13] CHEN, J.H., JIANG, H.W., HSIEH, E.J., CHEN H.Y., CHIEN, C.T., HSIEH, H.L. Drought and salt stress tolerance of an Arabidopsis glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. *Plant Physiol.* 2012 Jan;158(1):340-51. doi: 10.1104/pp.111.181875. Epub 2011 Nov 17. PubMed PMID: 22095046; PubMed Central PMCID: PMC3252094.
- [14] CHOI, J., HUH, SU., KOJIMA, M., SAKAKIBARA, H., PAEK KH., HWANG, I. The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis. *Dev Cell.* 2010 Aug 17;19(2):284-95. doi: 10.1016/j.devcel.2010.07.011.
- [15] CHOI, J., CHOI, D., LEE, S., CHOONG-MIN, R., HWANG, I. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends in plant science* doi:10.1016/j.tplants.2011.03.003 (volume 16 issue 7 pp.388 - 394).
- [16] KANG, NY., CHO C., KIM. NY, KIM J. Cytokinin receptor-dependent and receptor-independent pathways in the dehydration response of Arabidopsis tha-

- liana. *J Plant Physiol.* 2012 September 15; 169(14): 1382–1391. Published online 2012 June 15. doi: 10.1016/j.jplph.2012.05.007.
- [17] KOPRIVA, Stanislav. Regulation of Sulfate Assimilation in Arabidopsis and Beyond. *Annals of Botany*, Vol. 97, No. 4. (April 2006), pp. 479-495, doi:10.1093/aob/mcl006
- [18] KUDO, T., KIBA, T., SAKAKIBARA, H. Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *J Integr Plant Biol.* 2010 Jan;52(1):53-60. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00898.x. Review. PubMed PMID: 20074140.
- [19] LEWANDOWSKA, M., SIRKO, A. Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochim Pol.* 2008;55(3):457-71. Epub 2008 Sep 12. Review. PubMed PMID: 18787711.
- [20] LEWANDOWSKA, M., WAWRZYNSKA, A., MONIUSZKO, G., LUKOMSKA, J., ZIENTARA, K., PIECH, M., HONDUREK, P., ZHUKOV, I., LISZEVSKA, F., NIKIFOROVA, V., SIRKO, A. 2010. A Contribution to Identification of Novel Regulators of Plant Response to Sulfur Deficiency: Characteristics of a Tobacco Gene UP9C, Its Protein Product and the Effects of UP9C Silencing. *Mol Plant.* 2010 March; 3(2): 347–360. Published online 2010 February 10. doi: 10.1093/mp/ssq007.
- [21] MARUYAMA-NAKASHITA, A., NAKAMURA, Y., YAMAYA, T., TAKAHASHI, H. A novel regulatory pathway of sulfate uptake in Arabidopsis roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *Plant J.* 2004 Jun;38(5):779-89. PubMed PMID: 15144379.
- [22] NIKIFOROVA, V., FREITAG, J., KEMPA, S., ADAMIK, M., HESSE, H., HOFFGEN, R. Transcriptome analysis of sulfur depletion in Arabidopsis thaliana: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J.* 2003 Feb;33(4):633-50. PubMed PMID: 12609038.
- [23] NOCTOR, G., MHAMDI, A., CHAOUCH, S., HAN, Y., NEUKERMANS, J., MARQUEZ-GARCIA, B., QUEVAL, G. FOYER, C. H. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, 2012. 35: 454–484. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x

- [24] NOCTOR, G., QUEVAL, G., MHAMDI, A., CHAOUCH, S., FOYER, CH. (2011) Glutathione. *The Arabidopsis Book* 9:e0142. doi:10.1043/tab.0142
- [25] NOVÁČEK, František. *Fytochemické základy botaniky*. Vyd. 2., dopl. Olomouc: Fontána, 2008, 284 s. ISBN 978-80-7336-457-1.
- [26] O'BRIEN, JA., BENKOVÁ, E. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Front Plant Sci.* 2013; 4: 451. Published online 2013 November 19. doi: 10.3389/fpls.2013.00451 PMID: PMC3833016
- [27] POSPISILOVA, J., VAGNER, M., MALBECK, J., TRAVNICKOVA, A., BATAKOVA, P. Interactions between abscisic acid and cytokinins during water stress and subsequent rehydration. *Biologia Plantarum* 12-2005, Volume 49, Issue 4, pp 533-540 . doi: 10.1007/s10535-005-0047-0.
- [28] PROCHÁZKA Stanislav, MACHÁČKOVÁ Ivana. *Fyziologie rostlin*. Academia, 1998 ISBN 80-200-0586-2
- [29] RAUSCH, T., WACHTER, A. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci.* 2005 Oct;10(10):503-9. Review. PubMed PMID: 16143557.
- [30] RYANT, Pavel. Význam síry (příjem, asimilace, metabolické funkce, obsah S v rostlinách).  
Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_221\\_multitext/vyziva\\_rostlin/pdf/biogenni\\_prvky/sira\\_teorie.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/pdf/biogenni_prvky/sira_teorie.pdf) (4.1.2013)
- [31] ŠETLÍK, SEIDLOVÁ, ŠANTRŮČEK. *Fyziologie rostlin*, 2. regulace růstu,  
Dostupné z: [http://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220\\_S02.pdf](http://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220_S02.pdf) (1.1.2014)
- [32] ŠETLÍK, SEIDLOVÁ, ŠANTRŮČEK. *Fyziologie rostlin*, 10. minerální a organická výživa rostlin.  
Dostupné z: [http://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220\\_S10.pdf](http://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220_S10.pdf) (3.1.2014)
- [33] ZALABÁK, D., POSPÍŠILOVÁ, H., ŠMEHILOVÁ, M., MRÍZOVÁ, K., FRÉBORT, I., GALUSZKA, P. Genetic engineering of cytokinin metabolism: prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnol Adv.*

2013 Jan-Feb;31(1):97-117. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.12.003. Epub 2011 Dec 16. Review. PubMed PMID: 22198203.

## Seznam obrázků

- 1 Chemická struktura některých cytokininů. Mezi isoprenoidní cytokininy patří např. *trans*-zeatin, mezi aromatické cytokininy BA. Zdroj: <http://labs.bio.unc.edu/Kieber/structures.jpg> . . . . . 11
- 2 Zjednodušený model biosyntézy cytokininů. Modré šipky znázorňují reakce enzymů se známými geny, šedé označují geny, které je třeba identifikovat. (převzato a upraveno z [18]) . . . . . 12
- 3 Signální dráha CK znázorňující v modelové buňce histidinkinázy (AHKs; Arabidopsis Histidine Kinase), přenašeče fosfátu (AHPs; Arabidopsis Histidine Phosphotransfer protein) a regulátory odpovědi (ARR) u *Arabidopsis*. Aminokyseliny (histidin a kyselina asparagová), které přijímají fosfátovou skupinu, jsou zvýrazněny červenými písmeny. Tučným písmem jsou vyznačeny signalizační součásti, zelenou jsou znázorněny pozitivní regulátory CK, červenou negativní regulátory CK. Dále jsou zaznačena vybraná spojení k ostatním signálům. Další zkratky: CRF, faktor odezvy CK; PM, plasmatická membrána; ER endoplasmatické retikulum. (převzato a upraveno z [11]) . . . . . 14
- 4 Zjednodušené schéma asimilace síry. . . . . 17
- 5 Chemická struktura a základní fyzikálně-chemické vlastnosti glutathionu. (převzato a upraveno z [24]) . . . . . 20
- 6 Relativní hladina transkriptu genu *ARR5* u jedenáctidenních semenáčků *A. thaliana* po působení 5 $\mu$ M BA a *tZ* po dobu 2 h. Data představují průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z nejméně čtyř nezávislých vzorků. . . . . 27
- 7 Relativní hladina transkriptu genu *APR1* u jedenáctidenních semenáčků *A. thaliana* po působení 5 $\mu$ M BA a *tZ* po dobu 2 h. Data představují průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z nejméně čtyř nezávislých vzorků. . . . . 27

8	Relativní hladina transkriptu genu <i>SAT4</i> u jedenáctidenních semenáčků <i>A. thaliana</i> po působení 5 $\mu$ M BA a <i>tZ</i> po dobu 2 h. Data představují průměr $\pm$ směrodatná odchylka z nejméně čtyř nezávislých vzorků. . . . .	28
9	Relativní hladina transkriptu genu <i>Chac-c</i> u jedenáctidenních semenáčků <i>A. thaliana</i> po působení 5 $\mu$ M BA a <i>tZ</i> po dobu 2 h. Data představují průměr $\pm$ směrodatná odchylka z nejméně čtyř nezávislých vzorků. . . . .	28
10	Relativní hladina transkriptu genu <i>LSU2</i> u jedenáctidenních semenáčků <i>A. thaliana</i> po působení 5 $\mu$ M BA a <i>tZ</i> po dobu 2 h. Data představují průměr $\pm$ směrodatná odchylka z nejméně čtyř nezávislých vzorků. . . . .	29
11	Stanovení celkového GSH v semenáčcích <i>A. thaliana</i> po 2h působení 5 $\mu$ M <i>tZ</i> , vzorky byly sbírány 24, 48 a 72 hodinách po tomto krátkodobém působení CK. . . . .	30
12	Stanovení celkového GSH v semenáčcích <i>A. thaliana</i> po 2h působení 5 $\mu$ M BA a <i>tZ</i> , vzorky byly sbírány 5 dní od tohoto krátkodobého působení CK. . . . .	30
13	Stanovení množství GSSG v semenáčcích <i>A. thaliana</i> po 5 dnech od 2h působení 5 $\mu$ M BA a <i>tZ</i> . . . . .	31
14	Kontrolní semenáčky <i>A. thaliana</i> , které nebyly ošetřeny CK. . . . .	31
15	Semenáčky <i>A. thaliana</i> 5 dní od 2h působení BA. . . . .	32
16	Semenáčky <i>A. thaliana</i> 5 dní od 2h působení <i>tZ</i> . . . . .	32
17	Kořenová část kontrolních semenáčků <i>A. thaliana</i> , které nebyly ošetřeny CK. . . . .	33
18	Kořenová část semenáčků <i>A. thaliana</i> 5 dní od 2h působení BA. . . . .	33
19	Kořenová část semenáčků <i>A. thaliana</i> 5 dní od 2h působení <i>tZ</i> . . . . .	33