



Akademie věd České republiky

Teze disertace
k získání vědeckého titulu "doktor věd"

Úloha cytokininů při odezvě na abiotické a biotické stresy

Radomíra Vaňková
Ústav experimentální botaniky AV ČR
Praha, červen 2019

Cíle disertace

- 1) Charakterizace dynamiky hladin aktivních cytokininů, jejich prekurzorů a metabolitů v odezvě rostlin na jednotlivé abiotické a biotické stresy
- 2) Stanovení interakcí cytokininů s ostatními rostlinnými hormony během stresových odpovědí
- 3) Korelace hladin cytokininů s fyziologickým stavem rostliny a konkrétní stresovou situací (síla stresu, fáze odezvy)
- 4) Objasnění mechanismu působení cytokininů v odezvě rostlin na jednotlivé abiotické a biotické stresy
- 5) Využití získaných poznatků k navržení vhodné strategie pro zvýšení stresové odolnosti rostlin

Metodika práce

Vyhodnocení fyziologického stavu rostlin

V závislosti na typu stresu byla charakterizována jeho síla. V případě sucha a zasolení byl vyhodnocen poměr mezi čerstvou a suchou hmotností (v jednotlivých orgánech). Dále byla sledována exprese markerových genů (např. *ERD10B*, *P5CSA*, *RD29B*, *RD26*, *COR47*, *Hsfa*, *HSA32*). Relativní obsah vody (RWC) byl stanoven jako podíl rozdílu mezi čerstvou hmotností a sušinou a rozdílu mezi nasycenou hmotností a sušinou. Stabilita membrán byla sledována jako poměr mezi únikem iontů za experimentálních podmínek a po varu (podle Sairam et al., 1997). V případě chladového nebo mrazového stresu byla stanovena mrazuvzdornost jednotlivých experimentálních variant (podle Prášil a Zámečník, 1998). Segmenty listů nebo odnožovacích uzlů byly vystaveny teplotám $-1,5^{\circ}\text{C}$ až -20°C . Byla určena LT50, t.j. teplota při které dojde k 50% navýšení úniku iontů (Janáček a Prášil, 1991). Dále byla mrazuvzdornost hodnocena podle obsahu dehydrinů (po elektroforetickém rozdělení proteinů byly detekovány pomocí imunoblotů, Kosova et al., 2008). Fotosyntetické parametry byly vyhodnoceny pomocí fluorescence chlorofylu použitím FluorCam Handy FC 1000-H (zejména Fv/Fm, nefotochemické zhášení a fotochemické zhášení).

Analýza fytohormonů

Zmražené vzorky listů, kořenů, apexů nebo odnožovacích uzlů (cca 50 mg FW) byly homogenizovány a extrahovány směsí metanol / voda / kyselina mravenčí (15 / 4 / 1, v / v / v, -20°C) podle Dobrev a Kamínek (2002) a Dobrev a Vaňková (2012). Pak byly přidány značené vnitřní standardy (cca 30). Fytohormony byly rozděleny na iontoměničové koloně s reversní fází (Oasis-MCX). Kyselé hormony [auxiny, kyselina abscisová (ABA), kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová (JA)] byly eluovány metanolem, zásadité [cytokininy (CK) a prekursor etylénu] byly eluovány 0.35 M NH_4OH v 60% metanolu. Frakce byly analyzovány pomocí HPLC (Ultimate 3000, Dionex) v kombinaci s hmotnostním spektrometrem (3200 Q TRAP hybridní trojitý kvadrupól s lineární iontovou pastí, Applied Biosystems).

Stanovení exprese vybraných genů

Zmražený materiál (cca 100 mg FW) byl homogenizován a extrahován pomocí RNeasy Plant Kit (Qiagen). Stopy DNA byly odstraněny pomocí rDNázy (NucleoSpin RNA Plant Kit). Reversní transkripce byla provedena reversní transkriptázou (RNase H Minus), při použití oligo-dT primerů a inhibitoru RNázy. Kvantitativní PCR bylo prováděno pomocí kitů LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master nebo LightCycler 480 Probes Master s UPL Probami. Hladiny transkriptů byly korigovány v závislosti na účinnosti exprese

stanovovaného genu a normalizovány vůči genům, které mají stabilní expresi (např. *ubiquitin UBQ10*). Sekvence primerů byly navrženy pomocí programů Primer3Plus (Untergasser et al., 2007), AlleleID (PREMIER Biosoft) a mfold (Zuker et al., 1999).

Statistika

Statistická významnost získaných dat (výsledky stanovení RWC, stability membrán, analýz hormonů a RT-qPCR) byly testovány Mann-Whitney U testem nebo Kruskal-Wallis testem v programu PAST 3.01 (Hammer et al., 2001). PCA (principal component analysis) byla prováděna pomocí OriginPro 2014 (<http://www.originlab.com/>). Dále byla používána ANOVA.

Souhrn výsledků

Články v předkládané v této práci jsou zaměřeny na objasnění funkce fytohormonů, zejména cytokininů, při odezvě na abiotické a biotické stresy. Interakce s patogeny byly sledovány v rámci spolupráce se zahraničními partnery.

Sucho

V rámci studia úlohy CK během odezvy na stres suchem jsme jako první popsali ustavení gradientu aktivních CK ve prospěch vzrostného vrcholu a mladých listů, což podmiňuje polarizaci rostliny (**Havlová et al., 2008**). Prokázali jsme, že CK mají důležitou roli ve strategii "optimální obrany", tedy přednostní ochrany tkání (nebo orgánů), které jsou důležité pro přežití rostliny. Sledovali jsme dynamiku CK v mladých, středních a spodních listech a v kořenech tabáku při mírném, středním a silném suchu a po zotavení. Už v mírném stresu byl ustaven gradient aktivních CK v listech ve prospěch mladých listů, u kterých hladina CK dokonce mírně vzrostla. V průběhu stresu suchem obsah aktivních CK v celé rostlině postupně klesal, ale jejich gradient se stále udržoval zvýšením aktivity cytokinin oxidázy/dehydrogenázy (CKX) ve spodních listech. Zrychlená a zesílená senescence spodních listů, sledovaná pomocí exprese genu *SAG12*, umožnila snížit listovou plochu. Současně byly živiny relokovány do vzrostného vrcholu. Po zalití, během zotavení, byl senescenční program velmi rychle vypnut. Aktivita promotoru *SAG12* byla hluboce pod hladinou v kontrolních rostlinách, které již začaly přirozeně stárnout. Současně se rychle a výrazně zvýšila hladina aktivních CK, s výjimkou spodních listů, ve kterých senescenční program přesáhl bodu návratu. Tyto výsledky ukazují, že zotavení po stresu je aktivním procesem a nikoliv jen návratem k situaci před stresem (**Vaňková et al., 2012**).

Vzhledem k tomu, že snížení hladin CK je obecným rysem odezvy rostlin na sucho (např. u tabáku – **Dobrá et al., 2010**, *Arabidopsis* – **Nishiyama et al., 2011**, lupiny – **Pinheiro et al., 2011** nebo sóji – **Le et al., 2012**), porovnali jsme odezvu na sucho u výchozího genotypu (WT) tabáku a transformantu s konstitutivní expresí *CKX* (tyto rostliny připravili a částečně charakterizovali Werner et al., 2010). Transformanty exprimující *CKX* pod promotorem *35S* mají výrazně zvýšenou toleranci vůči suchu (Werner et al., 2010, **Nishiyama et al., 2011**), ale současně velmi změněný fenotyp. Růst jejich kořenového systému je velmi posílen, zatímco nadzemní část rostliny je zakrslá. Bylo zjištěno, že u těchto rostlin s výrazně zpomalenou ontogenezí je i za optimálních kultivačních podmínek zvýšena hladina exprese obranných genů (např. pyrrolin-5-karboxylát syntázy – **Macková et al., 2013**, **Přerostová et al., 2018a**). Při vystavení stresu suchem reagují tyto rostliny vyšším přechodným nárůstem exprese obranných genů (např. *RAB18*, *RD29B* – Nishiyama et al., 2012). Vyšší odolnost těchto rostlin je patrná z menšího poškození membrán (měřeno jako únik iontů), z menšího

poklesu vodního potenciálu během stresu i z nižšího poklesu exprese genů kódujících chloroplastové antioxidantní enzymy (stromatální askorbát peroxidázy, thylakoidní askorbát peroxidázy a chloroplastové superoxid dismutázy – FeSOD), což naznačuje snížený dopad stresu na fotosyntetický aparát tohoto transformantu (**Lubovská et al., 2014**). Transformant *35S:CKX* si udržoval během sucha rovněž vyšší expresi katalázy 1 a mitochondriální superoxid dismutázy.

Ve snaze odstranit negativní efekt exprese *CKX* na nadzemní část, ale ponechat její pozitivní vliv na kořenový systém byl připraven v laboratoři prof. Thomase Schmöllinga transformant *WRKY6:CKX*. Promotor *WRKY6* je aktivní pouze v kořenech (zejména za kontrolních podmínek), což v podstatě umožňuje odstranit negativní vliv exprese *CKX* na růst nadzemní části. Rovněž morfologie listů *WRKY6:CKX* rostlin je velmi podobná WT a liší se od drobnějších, tuhých a kožnatých listů *35S:CKX*. Analýza hormonálních hladin, exprese vybraných genů a aktivity vybraných antioxidantních enzymů (**Macková et al., 2013, Lubovská et al., 2014**) ovšem ukázala, že zvýšení odolnosti vůči WT je poměrně mírné. Projevilo se nižším poklesem vodního potenciálu během sucha a zejména nižší hladinou exprese markerového genu na sucho *ERD1* v mladých listech.

V rámci společného projektu s Dr. Fabiem Fiorani a Prof. Ulrichem Schurrem jsme uskutečnili rozsáhlou komparativní studii vlivu modulace hladin CK a jejího načasování na odezvu rostlin *Arabidopsis* na střední stres suchem (**Přerostová et al., 2018a**). Vzhledem k tomu, že vysoká odolnost *35S:CKX* rostlin může být dána přímým vlivem nízké hladiny CK, ale i odlišnou morfologií jejich listů nebo nízkou růstovou rychlostí, chtěli jsme vyhodnotit působení těchto jednotlivých faktorů. Proto jsme porovnali odezvu na sucho u transformantů *35S:CKX* a rostlin, u nichž byla exprese *CKX* stimulována těsně před zahájením stresu suchem (a udržována během tohoto stresu až do zastavení růstu rostlin – 13 dní, což odpovídalo poklesu vodního potenciálu substrátu z 60% na 30%). K tomuto účelu jsme využili konstrukt *HvCKX2* pod promotorem *pOp/LhGR* indukovaným dexamethasonem (připravený v laboratoři prof. Břetislava Brzobohatého). Náhlé snížení hladin CK před stresem mělo pozitivní vliv na uzavírání průduchů a vedlo uchování vodního potenciálu v míře obdobné jako u *35S:CKX* (**Přerostová et al., 2018a**). Rychlost zotavení byla rovněž relativně malá, podobná tomuto genotypu. Nicméně ve srovnání s *35S:CKX* došlo po zalití k rychlejšímu útlumu obranných mechanismů.

Vzhledem k tomu, že byl popsán i pozitivní účinek exogenních CK na odolnost rostlin vůči stresu suchem a zejména při následném zotavení (Itai et al., 1978), rozhodli jsme se charakterizovat dopad zvýšení hladin CK během odezvy rostlin na stres suchem. Vzhledem k tomu, že konstitutivní zvýšení tvorby CK expresí *ipt* pod silným promotorem (Synková et al., 1999) má silné nežádoucí účinky na morfologii rostlin, zejména morfogenezi kořenů,

sledovali jsme vliv zvýšené hladiny CK prostřednictvím rostlin, u nichž byla stimulace exprese *ipt* indukována dexamethasonem těsně před začátkem stresu suchem a pak dvakrát v jeho průběhu. Odezva tohoto transformantu byla porovnána s chováním transformantu *SAG12:ipt* a WT, na který byl aplikován exogenní CK m-topolin. Ukázalo se, že *SAG12:ipt* je odolnější vůči suchu než druhé dvě varianty se zvýšenou hladinou CK. Ztráta vodního potenciálu byla srovnatelná s WT, zatímco druhé dvě varianty ztrácely vodní potenciál o něco rychleji. Po zalití byla jejich růstová rychlost vyšší než u WT a mírně vyšší než u *SAG12:ipt*.

Tyto výsledky jsou ve shodě s naší předchozí studií (**Havlová et al., 2008**), kdy jsme porovnávali vliv konstitutivně zvýšené biosyntézy CK prostřednictvím rostlin se zvýšenou expresí *trans-zeatin O-glukosyltransferázy (ZOG1)* pod promotorem *35S* a jejího zvýšení během stresu suchem expresí *ZOG1* pod promotorem *SAG12*. Rostliny *35S:ZOG1* měly za kontrolních podmínek vyšší rychlost fotosyntézy (v horních a středních listech) a větší vodivost průduchů než WT (**Haisel et al., 2008**). Na počátku odezvy na stres suchem (po jednom dni stresu) měly tyto rostliny zpomalenou stresovou reakci (“zpomalené vnímání” stresové situace), což se projevilo např. opožděným nárůstem hladiny ABA. Během stresu ovšem došlo k vyrovnání hladin ABA v transformantu a WT. Vyšší rychlost biosyntézy CK se projevila během zotavení, kdy k navýšení hladin aktivních CK v listech a zvýšení růstové rychlosti došlo dříve než u WT. Mírná stimulace biosyntézy CK tedy vedla pouze k opoždění odezvy na stres. Transformant *SAG12:ZOG* nevykazoval žádnou změnu ve vnímání stresu a aktivaci obrany v porovnání s WT (**Havlová et al., 2008**). Během stresu se ovšem projevoval pozitivní vliv zvýšené tvorby CK, zejména ve starších listech (kde byl promotor aktivován), což vedlo ke snížení inhibice fotosyntézy působením sucha a tedy i k menšímu výpadku energetických zásob. Po opětovném zalití bylo zotavení transformantu rychlejší než u WT, jak na úrovni zvýšení růstové rychlosti, tak hladin aktivních CK a rychlosti fotosyntézy (**Haisel et al., 2008**). *SAG12:ZOG* měl vyšší hladinu fotoprotektivních pigmentů xantofylového cyklu.

Zasolení

Při studiu mechanismu efektivní obrany vůči zasolení jsme porovnávali odezvu citlivé modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* s velmi blízce příbuzným halofytem *Thellungiella halophila (Eutrema salsuginea)* (**Přerostová et al., 2017**). Za kontrolních podmínek vykazovala *Thellungiella* nižší hladinu CK v apexech a v listech, ale vyšší hladinu ABA a JA v apexu. Zdá se tedy, že halofyfy vykazují vyšší “připravenost” vůči stresu. Odezvu *Arabidopsis* jsme charakterizovali v koncentračním rozmezí 2 – 150 mM NaCl a odezvu *Thellungielly* v rozmezí 150 – 350 mM NaCl. Dále jsme porovnávali dynamiku časné odezvy (15 min - 24

hodin) na silný stres. Vzhledem k tomu, že se odezva jednotlivých orgánů rostlin liší, byly zvlášť analyzovány apikální meristémy vzrostného vrcholu (apexy), listy a kořeny.

Při velmi mírném stresu (2 – 25 mM NaCl) byla v *Arabidopsis* mírně zvýšena exprese stresového markeru *AtRD26* v listech, při koncentraci 15 mM NaCl a výše také v apexech. Současně byla mírně zvýšena exprese isopentenyltransferáz (*AtIPT3* a *AtIPT9*) a snížena exprese cytokinin oxidáz/dehydrogenáz (*AtCKX1*, 3, 5, 6) v listech a apexech. Tyto výsledky naznačují, že mírný stres může mít pozitivní účinek na biosyntézu CK. Při mírném až středním stresu (*Arabidopsis* 50 mM NaCl, *Thellungiella* 150 mM NaCl) byla v *Arabidopsis* zvýšena exprese stresových markerů *AtRD26* a *AtRD29B*, spolu se zvýšením obsahu stresových hormonů ABA, JA a SA, především v apexech. Vzhledem k navýšení obsahu *cis*-zeatinu (cZ) byly hladiny aktivních CK v apexech rovněž zvýšeny. Hormonální změny v listech a kořenech byly pouze mírné. Zdá se tedy, že apikální meristém s listovými primordií reaguje na stres přednostně aktivací obranných mechanismů. *Thellungiella* reagovala na expozici 150 mM NaCl také přednostně v apexu – zvýšením JA a SA a snížením auxinů a CK (zejména *trans*-zeatinu). Tato koncentrace soli neovlivnila růst halofytu, představovala pro něj pouze mírný stres (exprese stresového markeru *TsRD29Ba* byla pouze mírně zvýšena v kořenech a *TsCOR47* v listech).

Při aplikaci 75 – 100 mM soli v *Arabidopsis* výrazně vzrostla exprese *AtRD26* v apexech a *AtRD29B* v listech. Při 75 mM NaCl se také v apexech výrazně zvýšil obsah ABA, JA a SA. Je zajímavé, že byl pozorován i nárůst aktivních CK v tomto orgánu. Snížení ABA, JA i aktivních CK při aplikaci 100 mM NaCl naznačuje, že v této koncentraci už síla stresu překonává schopnost účinné obrany *Arabidopsis*. Hladiny stresových hormonů ovšem vzrostly převážně v listech, v kořenech pouze SA. Aktivita signální dráhy CK byla při silném stresu v celé rostlině potlačena. Naše zjištění bylo v souladu s výsledky Masona et al. (2010), kteří popsali, že CK prostřednictvím regulátorů odezvy (RR) typu-B (*ARR1* a *ARR12*) negativně ovlivňují expresi transportéru iontů *AtHKT1;1*.

Thellungiella vystavená 225 – 350 mM NaCl vykazovala vysoké hladiny ABA v nadzemní části. V apexu mohl zvýšený obsah ABA, ale také SA a aktivních CK (převážně cZ), souviset s preferenční obranou této meristemické tkáně. Zvýšený obsah CK byl doprovázen výraznou aktivitou jejich signální dráhy. Vysoká hladina exprese *TsNCED3*, který kóduje klíčový enzym biosyntézy ABA, byla detekována v kořenech. Naproti tomu obsah ABA byl daleko vyšší v listech než v kořenech. Tyto výsledky potvrzují hypotézu, že ABA je primárně syntetizována v kořenech a odtud transportována xylémem. Halofyt také tvořil velké množství glukosidu ABA, což pravděpodobně souvisí s jeho „energii-šetřící“ strategií.

Pokud došlo k dalšímu zvýšení koncentrace NaCl na 150 mM, projevil se u *Arabidopsis* již letální účinky. Nejcitlivější byl apikální meristém.

Dynamika časné odezvy na silný stres (v intervalu 15 min až 24 hod, *Arabidopsis* 150 mM NaCl, *Thellungiella* 350 mM NaCl) vykazovala stimulaci exprese stresových markerů již 15 min po aplikaci zasolení v kořenech přímo vystavených stresu (hydroponické uspořádání). Po 4 hodinách byla pozorována stimulace obrany v listech a apexech. Tato odezva byla mnohem silnější u halofytu. Také zvýšení exprese genu *NCED3* pro biosyntézu ABA bylo v kořenech obou druhů zjištěno již po 15 minutách stresu. Hormonální odezvy rovněž nastupovaly velmi rychle, např. zvýšení hladin ABA, SA a JA bylo v kořenech pozorováno mezi 15 a 60 min. Také v případě stresových hormonů byla odezva halofytu mnohem výraznější. Přejídná maxima JA (v kořenech po 15 min u *Arabidopsis* a po 15 – 60 min u halofytu, v listech v obou druhů po 15 – 60 min) naznačují, že by tento hormon mohl mít klíčovou úlohu v aktivaci obrany. Navýšení SA v listech bylo u halofytu ve stejném časovém intervalu jako v případě JA, u glykofytu až po 24 hod. Rovněž nárůst ABA v apexech byl u halofytu rychlejší (30 min *versus* 60 min). Hladiny ABA byly silně stimulovány v nadzemních tkáních počínaje 4 hodinami stresu (do konce sledovaného období - 24 hodin).

Hladiny aktivních CK zůstaly zachovány v apexech *Arabidopsis* po 30 min, zatímco u *Thellungiella* došlo k jejich mírnému navýšení mezi 15 a 60 min. Posléze (24 hodin stresu), byly hladiny aktivních CK výrazně sníženy v apexech a listech obou druhů, v *Arabidopsis* i v kořenech. Halofyt měl výrazně nižší hladiny CK, jak za kontrolních podmínek, tak za stresu. Snižování exprese komponent CK signální dráhy, zejména *TsHK2*, započalo u *Thellungiella* již během 15 min, u *Arabidopsis* o něco později - po 30 min (zejména *AHK2*, *AHK4* a *ARR1*). Snížení pozitivních regulátorů signální dráhy CK bylo doprovázeno přechodnou stimulací exprese negativních regulátorů - RR typu-A (*ARR8* a *ARR9*) po 2 hod v kořenech. Inhibice signální dráhy CK se zdá být důležitou součástí rané odezvy na zasolení, pro kterou je charakteristické snížení růstové rychlosti a relokace zdrojů energie na aktivaci obranných drah.

Chladový stres

Hormonální změny během odezvy rostlin na stres závisí na druhu stresu, délce jeho trvání, rostlinném druhu (případně kultivaru) a vývojové fázi. Výrazně se liší i odezva jednotlivých tkání (např. v případě obilí - listy vs. odnožovací uzle vs. kořeny). Regulace hladin jednotlivých hormonů a jejich signálních drah se rovněž mění v jednotlivých fázích odezvy. Porovnání odezvy ozimého a jarního kultivaru pšenice *Triticum aestivum* nám umožnilo charakterizovat hormonální změny v jednotlivých fázích odezvy se zřetelem na odolnost rostlin (**Kosová et al., 2012**). Odezva na chladový šok (prvních 24 hodin stresu) byla spojena s rychlým zvýšením hladin obranných proteinů, zejména dehydrinu WCS120. Ozim vykazoval vyšší hladinu dehydrinů již za kontrolních podmínek, zatímco u jarního kultivaru byly dehydriny pod hranicí detekce. Během chladového šoku ozim reagoval na stres rychleji,

výrazněji a déle, a byl schopen dosáhnout mnohem vyšší mrazuvzdornosti. Velmi rychle po snížení teploty na 4°C, poklesla hydraulická vodivost kořenů, což vedlo k poklesu příjmu vody. Rostliny reagovaly krátkodobým, přechodným zvýšením ABA, vedoucím ke snížení apertury průduchů a k omezení ztrát vody. Následný pokles ABA byl doprovázen nárůstem jejího metabolitu kyseliny fazeové. Hladiny aktivních CK velmi rychle poklesly v listech ozimu, zatímco v jarním kultivaru tato odezva pozorována nebyla. V obou kultivarech ovšem došlo k poklesu hladin prekurzorů CK (CK fosfátů) v listech. V meristematických tkáních – odnožovacích uzlech bylo u obou kultivarů pozorováno krátkodobé navýšení *cis*-zeatinu, CK s nízkou biologickou aktivitou (zejména v souvislosti se stimulací buněčného dělení, **Gajdošová et al., 2011, Schäfer et al., 2015a**). Kromě CK byly v odezvě na chlad zapojeny i další hormony. Hladiny auxinu (kyseliny indol-3-oxidové, IAA) poklesly během chladového šoku v listech obou kultivarů. Aktivní giberelin GA₁ poklesl v listech ozimu, u jarního kultivaru pouze v uzlech. Stimulace GA2-oxidázy se projevila mnohem více v případě deaktivace GA₂₀ (prekurzoru GA₁) než samotného GA₁ v listech ozimu a v uzlech obou kultivarů.

Fáze aklimatizace byla pozorována v intervalu 3 – 7 dní stresu. Charakteristickým rysem bylo zvýšení hladin aktivních CK, výraznější v odnožovacích uzlech obou kultivarů. Hladina aktivního giberelinu GA₁ se zvýšila v listech i uzlech obou kultivarů. Velmi poklesla deaktivace prekurzoru GA₂₀ (hladina GA₂₉). Obsah auxinu se zvedl v listech, mírně nad bazální hladinu. Hladina ABA poklesla na začátku fáze aklimatizace, zatímco hladiny SA a JA byly zvýšeny. V případě SA by se mohl ve stresové odezvě uplatnit její vliv na redox systém. Zvýšení JA bylo v souladu s dříve publikovanými pracemi, popisujícími nárůst tohoto hormonu po delším působení chladu, spojený se zvýšenou tolerancí vůči útokům herbivor a nekrotrofních patogenů (Gaudet et al., 2011).

Porovnání doby přechodu z vegetativní do generativní fáze u jarního a ozimého kultivaru *Triticum monococcum* nám umožnilo vyhodnotit vernalizační požadavky ozimu. Zároveň porovnání dynamiky hormonálních změn u těchto kultivarů ukázalo, že nástup raného stádia reprodukčního vývoje je spojen s přechodným nárůstem aktivních CK (**Vaňková et al., 2014**). Výsledky naší analýzy *T. monococcum* jsou v souladu s výsledky studie Tarkowské et al. (2012) na *Brassica napus*. Lze tedy předpokládat, že CK hrají klíčovou úlohu reprogramování vývoje meristému do reprodukční fáze.

Teplotní stres

Teplotní šok představuje velmi akutní ohrožení, vzhledem k tomu, že může dojít k velmi rychlé denaturaci proteinů a poškození lipidů i RNA. Rostliny se snaží zabránit poškození tím, že oddálí zvýšení teploty listů, alespoň po tu dobu než dojde k aktivaci obranných drah. Hlavním mechanismem ochlazování rostlin je transpirace (Wahid a Close, 2007), regulovaná vodivostí průduchů. Po vystavení rostlin tabáku teplotnímu stresu (40°C) jsme pozorovali

přechodné zvýšení otevřenosti průduchů (**Macková et al., 2013**). Přechodné zvýšení vodivosti průduchů v rané fázi odezvy na teplotní stres jsme detekovali i v rostlinách *Arabidopsis thaliana* (**Dobrá et al., 2015**). Když jsme porovnávali tři typy teplotního stresu – aplikace pouze na nadzemní část, na kořeny nebo na celou rostlinu, zjistili jsme, že pokud jsou listy nebo celá rostlina vystaveny teplotnímu šoku dochází v rané fázi odezvy k přechodnému zvýšení vodivosti průduchů, podmíněnému přechodným mírným navýšením hladiny aktivních CK v listech a současně poklesem obsahu ABA. Snížení ABA bylo doprovázeno potlačením exprese biosyntetického genu *AtNCED3* a rovněž genů indukovaných ABA (např. *AtHB6*). Zároveň byla stimulována exprese genů kódujících deaktivací enzymy ABA (např. *AtCYP707A3*). V případě vystavení pouze nadzemní části teplotnímu stresu docházelo ke snížení CK (doprovázeném navýšením exprese *CKX*) po zhruba 45 min, v případě vystavení celé rostliny byl pokles CK pozorován již po 30 min. Současně docházelo k nárůstu ABA. Hladiny fosfátů CK byly zvýšeny po zhruba 30 a 15 min, resp.

Vliv CK na zvýšení vodivosti průduchů jsme si ověřili porovnáním odezvy WT s transformanty, u nichž byla indukována exprese *ipt* a výrazně navýšeny hladiny CK (**Skalák et al., 2016**). Tyto rostliny vykazovaly větší otevřenost průduchů, která nastoupila rychleji a trvala déle. Tyto rostliny ovšem vykazovaly za teplotního stresu pokles vodního potenciálu listů (i v hydroponickém uspořádání).

V případě, že byl teplotní stres aplikován pouze na kořeny, ke zvýšení hladin CK v listech nedošlo. Naopak, velmi rychle byla v listech a apexech zvýšena hladina ABA, současně se stimulací její signální dráhy, což naznačuje rychlou aktivaci obranných drah. Zdá se tedy, že v případě vystavení nadzemní části teplotnímu stresu je pro rostlinu prioritou aktivace ochlazování zvýšením transpirace, zatímco v opačném případě dochází k rychlé stimulaci obrany stimulované navýšením ABA. Je zajímavé, že v orgánech, které nebyly vystaveny teplotnímu stresu, dochází k přechodné stimulaci signální dráhy CK.

Kombinovaný stres

Pokud jsou rostliny vystaveny dvěma silným stresům, odezva na tento kombinovaný stres se liší od obou reakcí na jednotlivé stesy. Transkripční analýza (Rizhsky et al., 2004) ukázala, že z cca 1833 transkriptů ovlivněných suchem a/nebo vysokou teplotou pouze 77 transkriptů bylo ovlivněno kombinovaným stresem stejně jako jednotlivými stesy. Při vystavení rostlin tabáku stresu suchem docházelo k poklesu vodního potenciálu listů, který byl ovšem podstatně výraznější ve spodních listech než v přednostně chráněných horních listech (**Dobrá et al., 2010**). Aplikace teplotního šoku na suchem stresované rostliny ukázala, že tento stres vede k otevření průduchů a zvýšení transpirace i za podmínek nedostatku vody,

což má za následek rychlý pokles vodního potenciálu horních listů (na úroveň spodních listů) a jejich zavadnutí. Je tedy zřejmé, že teplotní stres je velmi akutní, vyžadující rychlou odezvu.

Nedostatek fosfátu

Dalším abiotickým stresem je nedostatek živin, zejména fosfátu. Fosfor je pro rostliny esenciálním prvkem, vzhledem k tomu, že je nezbytnou složkou širokého spektra sloučenin, včetně nukleových kyselin, proteinů, lipidů, cukrů a metabolitů souvisejících s energií. Fosfor je asimilován rostlinami převážně ve formě fosfátu (Pi). Dostupnost Pi v půdě je nízká, zejména z důvodu jeho nerovnoměrného rozložení a omezeného transportu (Nadira et al., 2016). Reakce rostlin *Arabidopsis thaliana* na nedostatek Pi byla charakterizována ve vzrostných vrcholech, listech a kořenech (**Přerostová et al., 2018c**). Deficit Pi vedl ke snížení hladiny *trans*-zeatinu, stejně jako GA₄, v celé rostlině. V kořenech došlo k navýšení *cis*-zeatinu. Tyto výsledky naznačují potlačení plastidové biosyntetické dráhy CK a stimulaci jejich cytoplazmatické dráhy. Současně vedl nedostatek Pi ke zvýšení ABA a JA v celé rostlině, v případě SA pouze v kořenech. Stimulace signální dráhy strigolaktonů byla indikována potlačením exprese represorů strigolaktonů SMXL6 a SMXL8. Dostupnost Pi silně ovlivňovala expresní profily, zejména Pi-transportérů a genů souvisejících s auxiny a strigolaktony. Odezva na deficit Pi byla vysoce orgánově specifická, nejvýraznější změny byly pozorovány v kořenech a v apexech.

Úloha CK v odezvě na biotické stresy

Napadení býložravci a hmyzem

I když jsou klíčovými hormony v případě odezvy na biotické stresy SA a JA (v interakci s etylénem), stále více se ukazuje, že CK rovněž mají důležitou úlohu. Po zranění rostlin *Nicotiana attenuata* jsme zjistili, že dochází k rychlému nárůstu isopentenyladeninu (iP) a jeho ribosidu (iPR). Hladina *cis*-zeatin ribosidu (cZR) se zvyšoval po 1 hod, spolu s jeho O-glukosidem (**Schäfer et al., 2015b**). Navýšení CK korelovalo velmi dobře se stimulací exprese genů některých biosyntetických enzymů CK (*NaLOG1*, *NaLOG4*). Současně došlo k mírnému navýšení exprese genů pro glukosylaci CK (*NaZOG1* a *NaZOG2*). V kořenech i v systemických listech došlo k navýšení cZR po 4 hodinách od zranění. Pokud bylo zranění doplněno aplikací orálního sekretu larvy *Manduca sexta* došlo k výraznému zesílení odezvy - k vyššímu a dlouhodobějšímu navýšení iP a iPR (15 – 30 min). Hladiny cZR, cZROG, tZROG a tZ7G byly navýšeny od 1 hod do konce experimentu (4 hod). Hladiny metabolitů CK korelovaly se zvýšenou expresí genů pro biosyntézu a následně i deaktivaci (glukosyltransferázy) a degradaci (cytokinin oxidázy/dehydrogenázy) CK. Zvýšení hladin CK

(cZ, cZR, iPR) bylo pozorováno po zranění a zejména po aplikaci orálního sekretu také v *Arabidopsis*. Zvýšení hladin CK nezáviselo na aktivaci dráhy JA. Naopak, JA měla mírný negativní vliv, jak na stimulaci hladin CK (iPR), tak na expresi komponent jejich signální dráhy (*NaRRA5*). Zvýšení exprese tohoto regulátoru odezvy bylo velmi výrazně zesíleno v JA-deficientním a JA-insenzitivním mutantu. Zvýšení CK v kořenech a systemických listech naznačuje, že se CK mohou podílet na systemickém šíření aktivace obrany.

Vzhledem k tomu, že rostliny zpravidla nedokáží účinně chránit všechny své tkáně, jsou přednostně chráněny tkáně, které jsou pro rostlinu z hlediska přežití nejdůležitější (teorie optimální obrany – McKey, 1974). Přednostní obrana souvisí s hladinou obranných látek, v případě *Nicotiana attenuata* kafeoylputrescinu (**Brütting et al., 2017**). Hladina tohoto sekundárního metabolitu koreluje s hladinou CK (bazí a ribosidů). V případě mladé rostliny vede aktivace obrany (postřikem metyljasmonátem) k polarizaci rostliny. Nejvyšší hladinu CK a kafeoylputrescinu vykazují mladé listy růžice. Po přechodu do generativního stádia silně klesá indukovatelnost hladin CK i sekundárního metabolitu v listech růžice. Vliv CK na hladinu kafeoylputrescinu byl prokázán po stimulaci exprese *ipt* v prostředním listu růžice kvetoucí rostliny. Zvýšení exprese bylo dosaženo buď aktivací transgenu dexamethasonem (konstrukt *DEX:ipt*) nebo využitím transgenní rostliny exprimující *SAG:IPT4*. V obou případech koincidovalo zvýšení CK s hladinou sekundárních metabolitů. Tyto výsledky jsou v souladu se studií Grosskinsky et al. (2011), kteří popsali, že zvýšení hladin CK (exogenní aplikací CK nebo expresí *SAG:ipt*) zvyšovalo produkci fytoalexinů – skopoletinu a kapsidiolu stimulovanou v rostlinách *Nicotiana tabacum* po napadení hemibiotrofem *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Úloha CK při napadení (hemi)biotrofními patogeny, které produkují CK

Na rozdíl od nekrotrofních patogenů (např. *Borytis cinerea* a *Penicillium expansum*), které nejsou schopny produkovat CK, některé biotrofní patogeny CK tvoří a ovlivňují jejich signální dráhu v rostlinách za účelem regulace buněčného dělení a/nebo atrakce živin. Obligátní biotrof *Plasmodiophora brassicae* vytváří po napadení rostlin z rodiny Brassiceae na kořenech nádory. Při charakterizaci citlivého kultivaru *Brassica napus* Hornet a rezistentnějšího kultivaru SY Alister pěstovaných za optimálních podmínek jsme zjistili, že Hornet má vyšší bazální hladinu JA, zatímco Alister vyšší obsah SA. Porovnáním odezvy kultivarů Hornet a Alister na infekci biotrofem *P. brassicae* bylo zjištěno, že u obou kultivarů dochází krátce po inokulaci ke zvýšení hladin CK a auxinu (IAA) v kořenech i v listech (**Přerostová et al., 2018b**). Rezistentnější kultivar byl schopen rychleji eliminovat navýšení hladin CK. U Hornetu přetrvávalo i navýšení auxinu, což dobře korelovalo se zvýšenou expresí *nitrilázy1*. Nádory obou kultivarů vykazovaly na počátku své tvorby (22 dní po inokulaci – dai) zvýšenou hladinu CK, auxinu a SA. Exprese markeru dráhy SA (*PR1*), byla

v tomto období zvýšena nejen v nádorech, ale i v kořenech a v listech. Ovšem Alister po infekci zvyšoval hladinu SA v kořenech dříve než Hornet. Naopak Hornet vykazoval relativně vyšší hladinu JA. U kultivaru Alister byla po infekci hladina JA snížena a byla potlačena i exprese *JAR1*, genu kódujícího tvorbu aktivního konjugátu JA-Ile, v kořenech i v nádorech. Abychom potvrdili pozitivní funkci SA v rezistenci vůči patogenu, aplikovali jsme tento hormon před infekcí a na počátku tvorby nádorů. V rezistentnějším kultivaru zvýšení SA zabránilo tvorbě nádorů. Naopak aplikace JA podpořila tvorbu nádorů i v tomto kultivaru. Naše výsledky jsou v souladu se studií Lemarie et al. (2015), kteří popsali, že rezistentní ekotyp *Arabidopsis* Bur-0 po infekci *Plasmodiophora brassicae* výrazně zvyšoval hladinu SA, přičemž si udržoval nízkou hladinu JA a aktivitu její signální dráhy. Naopak citlivý ekotyp *Arabidopsis* měl vyšší hladinu JA.

Kromě CK hrají při infekci některými biotrofními patogeny důležitou úlohu auxiny. Značný podíl IAA je v rostlinách ve formě konjugátů. Pokud jsme umlčeli expresi *IAA-amidohydrolázy3* (*IAR3*), jejíž produkt katalyzuje hydrolýzu konjugátů IAA, došlo ke snížení hladin volné IAA a ke zvýšení rezistence *Nicotiana benthamiana* a *Solanum lycopersicum* vůči *Phytophthora infestans* a *Cladosporium fulvum* (D'ippolito et al., 2016).

Vliv endofytů na tvorbu CK

Některé bakterie, které produkují CK, mohou zvyšovat sílu biotického stresu nepřímo. Bakterie *Wolbachia*, endofyt klíněnky jabloňové *Phyllonorycter blancardella*, produkuje CK, které jsou sekretovány larvami do listů jabloně a způsobují zde tvorbu „zelených ostrůvků“. Zvýšená hladina CK zpomaluje senescenci listů a prodlužuje tak dobu, po kterou mohou larvy z listů získávat živiny. Navíc zvýšená hladina CK zvyšuje jejich sílu sinku, takže atrahuje živiny do těchto napadených částí (Zhang et al., 2016). Porovnání s blízce příbuzným druhem *Phyllonorycter mespilela*, který nemá žádného endofyta, ukázalo, že tyto larvy nesekretují CK, ale jsou schopny částečně inhibovat degradaci CK v listech a tímto způsobem oddalovat senescenci napadených listů (Zhang et al., 2018).

Patogeny se smíšeným typem infekce

Na rozdíl od obligátních biotrofů nebo nekrotrofů, řada patogenů mění své chování v závislosti na fázi infekce. Například háďátko řepné *Heterodera schachtii* je ve stádiu vajíčka aktivováno rostlinným kořenovým exudátem, kterým je atrahováno ke kořenům. Pomocí styleta se dostává do kortexu a migruje do středního válce. Zde vylučuje exudát do jedné vybrané buňky, kde dochází ke zvětšení jádra, proliferaci plastidů a mitochondrií a rozložení buněčných stěn sousedních buněk (Golinowski et al., 1996). Fúze této napadené buňky s okolními buňkami vede k tvorbě syncytia, které má vysokou sílu sinku a atrahuje

živiny nezbytné pro růst háďátka a tvorbu vajíček. Při studiu hormonálních změn v počáteční fázi infekce jsme zjistili, že pro atrakci háďátka ke kořenům je nezbytný etylén (**Kammerhofer et al., 2015a**). Při nabodnutí primární buňky rostlina *Arabidopsis* aktivuje dráhu JA. Potlačení této dráhy působením nematody je předpokladem úspěšné infekce. V pozdější fázi tvorby syncytia a samičího vývoje rostlina aktivuje dráhu SA. Tvorba syncytia vyžaduje lokální potlačení signální dráhy SA (**Kammerhofer et al. 2015a**). Naopak, jeho rozvoj je podmíněn zvýšením hladiny auxinu (Goverse et al., 2000). Naše výsledky ukazují, že se úloha jednotlivých hormonů značně mění v závislosti na fázi parazitismu.

Interakce více patogenů

Napadení patogeny ovlivňuje hladiny hormonů nejen v přímo napadeném orgánu, ale vyvolává i systemickou odezvu ve vzdálených tkáních. Infekce kořenů cystickým háďátkem *Heterodera schachtii* tak může ovlivňovat citlivost nadzemní části vůči hmyzím škůdcům. Napadení kořenů háďátkem zvyšovalo hladiny JA a SA (spolu s IAA), i exprese jejich markerových genů, v listech *Arabidopsis* již 12 – 24 hod po infekci (**Kammerhofer et al., 2015b**). Je zajímavé, že toto zvýšení stresových hormonů negativně ovlivňovalo následné napadení larvami třásněnky západní *Frankliniella occidentalis*. Napadení kořenového systému nematodami naopak vedlo ke zvýšení citlivosti rostlin vůči dospělým samicím roztoče svilušky chmelové *Tetranychus urticae*. Možným vysvětlením může být zvýšení hladin aminokyselin a sacharidů v listech napadených rostlin. Naopak primární napadení rostlin třásněnkou západní, které bylo spojeno se zvýšením hladin JA a IAA v kořenech rostlin, zvýšilo citlivost *Arabidopsis* vůči následnému napadení háďátkem *Heterodera schachtii*. Podobné hormonální změny vyvolalo i napadení roztočem *Tetranychus urticae*, které ovšem neovlivnilo susceptibilitu rostlin vůči háďátku. Nicméně je nutno zdůraznit, že ovlivnění citlivosti rostlin vůči následné infekci výrazně závisí na druhu hostitelské rostliny, typu škůdců, i času a způsobu napadení.

Kombinace abiotického a biotického stresu

Vystavením mírnému abiotickému stresu (ozonovaná voda) je možno lokálně zvýšit odolnost vůči patogenům (**Prigigallo et al., 2019**). Zálivka O₃-vodou zvýšila odolnost vůči kořenovému háďátku *Meloidogyne inkognita*. Neovlivnila napadení rostlin, ale výrazně zpomalila vývoj těchto nematod (snížení počtu dospělých samic o cca 29%). Postřik listů snížil dopad infekce TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*) v rostlinách rajčete o cca 20%. V systemických tkáních pozitivní účinek O₃-vody pozorován nebyl.

Zálivka O₃-vodou vedla ke zvýšení hladiny SA i její signální dráhy, jak v kořenech, tak v listech. Hladina JA a JA-Ile ozonem ovlivněna nebyla. Hladina prekursoru etylénu ACC byla

v kořenech zvýšena, dráha etylénu byla přechodně mírně stimulována. Stimulace dráhy etylénu byla podstatně výraznější v listech po zálivce O₃-vodou. Ozon měl negativní vliv na hladiny aktivních CK (ačkoliv hladiny jejich fosfátů a ribosidů byly zvýšeny). Rovněž došlo k přechodnému snížení auxinu IAA. Výsledky naznačují, že ozon stimuluje obranu rostlin aktivací signální dráhy SA a indukci systemické odezvy (SAR).

Literatura

- Brütting C, Schäfer M, **Vaňková R**, Gase K, Baldwin IT, Meldau S (2017) *Plant J* 89: 15-30
- D'Ippolito S, **Vaňková R**, Joosten MHAJ, Casalongue CA, Fiol DF (2016) *Plant Sci* 253: 31-39
- Dobrá J, Černý M, Štorchová H, Dobrev P, Skalák J, Jedelský PL, Lukšanová H, Gaudinová A, Pešek B, Malbeck J, Vanek T, Brzobohatý B, **Vaňková R** (2015) *Plant Sci* 231: 52-61
- Dobrá J, Motyka V, Dobrev P, Malbeck J, Prášil IT, Haisel D, Gaudinová A, Havlová M, Gubiš J, **Vaňková R** (2010) *J Plant Physiol* 167: 1360-1370
- Dobrev PI, Kamínek M (2002) *J Chromatogr A* 950: 21-29
- Dobrev PI, **Vaňková R** (2012) *Methods in Molecular Biology* (Clifton NJ) 913: 251-261
- Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, Hoyerová K, Novák O, Dobrev PI, Galuszka P, Klíma P, Gaudinová A, Žížková E, Hanuš J, Dančák M, Trávníček B, Pešek B, Krupička M, **Vaňková R**, Strnad M, Motyka V (2011) *J Exp Bot* 62: 2827-2840
- Gaudet DA, Wang Y, Frick M, Puchalski B, Penniket C, Ouellet T, Robert L, Singh J, Laroche A (2011) *Plant Sci* 180: 99-110, SI
- Golinovski W, Grundler FMW, Sobczak M (1996) *Protoplasma* 194: 103-116
- Goverse A, Overmars H, Engelbertink J, Schots A, Bakker J, Helder J (2000) *Mol Plant – Microbe Interact* 13: 1121-1129
- Grosskinsky DK, Naseem M, Abdelmohsen UR, Plickert N, Engelke T, Griebel T, Zeier J, Novák O, Strnad M, Pfeifhofer H, van der Graaff E, Simon U, Roitsch T (2011) *Plant Physiol* 157: 815-830
- Ha S, **Vaňková R**, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2012) *Trends Plant Sci* 17: 172-179
- Haisel D, **Vaňková R**, Synková H, Pospíšilová J (2008) *Biol Plant* 52: 49-58
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) *Palaeontol Electron* 4: 1-9
- Havlová M, Dobrev PI, Motyka V, Štorchová H, Libus J, Dobrá J, Malbeck J, Gaudinová A, **Vaňková R** (2008) *Plant Cell Environ* 31: 341-353
- Itai C, Benzioni A, Munz S (1978) *Plant Cell Physiol* 19: 453-459
- Janáček J, Prášil IT (1991) *CryoLetters* 12: 47–52
- Kammerhofer N, Egger B, Dobrev P, **Vaňková R**, Hofmann J, Schausberger P, Wiczorek K (2015a) *J Exp Bot* 66: 7005–7017

- Kammerhofer N, Radakovic Z, Regis JMA, Dobrev P, **Vaňková R**, Grundler FMW, Siddique S, Hofmann, J, Wieczorek, K (2015b) *New Phytol* 207: 778-789
- Kosová K, Prášil IT, Vítámvás P (2008) *Biol Plant* 52: 601–615
- Kosová K, Prášil IT, Vítámvás P, Dobrev P, Motyka V, Floková K, Novák O, Turečková V, Rolčík J, Pešek B, Trávníčková A, Gaudinová A, Galiba G, Janda T, Vlasáková E, Prášilová P, **Vaňková R** (2012) *J Plant Physiol* 169: 567-576
- Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, **Vaňková R**, Tanaka M, Seki M, Ham LH, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2012) *PLOS ONE* 7(8): e42411
- Lemarie S, Robert-Seilaniantz A, Lariagon C, Lemoine J, Marnet N, Jubault M, Manzanares-Dauleux MJ, Gravot A (2015) *Plant Cell Physiol* 56: 2158–2168
- Lubovská Z, Dobrá J, Štorchová H, Wilhelmová N, **Vaňková R** (2014) *J Plant Physiol* 171: 1625–1633
- Macková H, Hronková M, Dobrá J, Turečková V, Novák O, Lubovská Z, Motyka V, Haisel D, Hájek T, Prášil IT, Gaudinová A, Štorchová H, Werner T, Schmülling T, Vaňková R (2013) *J Exp Bot* 64: 2805-2815
- Mason MG, Jha D, Salt DE, Tester M, Hill K, Kieber JJ, Schaller GE (2010) *Plant J* 64: 753-763
- McKey D (1974) *Am Nat* 108: 305–320
- Nishiyama R, Le DT, Watanabe Y, Matsui A, Tanaka M, Seki M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2012) *PLoS One* 7: Article Number: e32124
- Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, **Vaňková R**, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, Sakakibara H, Schmülling T, Tran LSP (2011) *Plant Cell* 23: 2169-2183
- Pinheiro C, António C, Ortuño MF, Dobrev PI, Hartung W, Thomas-Oates J, Ricardo CP, **Vaňková R**, Chaves MM, Wilson JC (2011) *J Exp Bot* 62: 4965-4974
- Prášil IT, Zámečník J (1998) *Environ Exp Bot* 40: 1–10
- Přerostová S, Dobrev PI, Gaudinová A, Hošek P, Soudek P, Knirsch V, **Vaňková R** (2017) *Plant Sci* 264: 188–198
- Přerostová S, Dobrev PI, Gaudinová A, Knirsch V, Korber N, Pieruschka R, Fiorani F, Brzobohatý B, Černý M, Spíchal L, Humplík J, Vaněk T, Schurr U, **Vaňková R** (2018a) *Front Plant Sci* 9: Article Number: 655
- Přerostová S, Dobrev PI, Konradová V, Knirsch V, Gaudinová A, Kramná B, Kazda J, Ludwig-Müller J, **Vaňková R** (2018b) *Int J Mol Sci* 19: 4024
- Přerostová S, Kramná B, Dobrev PI, Gaudinová A, Maršík P, Fiala R, Knirsch V, Vaněk T, Kurešová G, **Vaňková R** (2018c) *Environ Exp Bot* 153: 198-208
- Prigigallo MI, Melillo MT, Bubici G, Dobrev PI, **Vaňková R**, Cillo F, Veronico P (2019) *Pest Management Science*, DOI: 10.1002/ps.5362.
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R (2004) *Plant Physiol* 134: 1683-1696
- Sairam RK, Desmukh PS, Shukla DSJ (1997) *Agron Crop Sci* 178: 171-177

- Schäfer M, Brütting C, Meza-Canales ID, Grosskinsky DK, **Vaňková R**, Baldwin IT, Meldau S (2015a) *J Exp Bot* 66: 4873-4884
- Schäfer M, Meza-Canales ID, Navarro-Quezada A, Brütting C, **Vaňková R**, Baldwin IT, Meldau S (2015b) *J Integr Plant Biol* 57: 198-212
- Skalák J, Černý M, Jedelský P, Dobrá J, Ge E, Novák J, Hronková M, Dobrev P, **Vaňková R**, Brzobohatý B (2016) *J Exp Bot* 67:2861–2873
- Synková H, Van Loven K, Pospíšilová J, Valcke R (1999) *J Plant Physiol* 155: 173-182
- Tarkowska D, Filek M, Biesaga-Koscielniak J, Marcinska I, Macháčková I, Krekule J, Strnad M (2012) *Plant Sci* 187: 105-112
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA (2007) *Nucleic Acids Res* 35: W71–W74
- Vaňková R**, Dobrá J, Štorchová H (2012) *Plant Signal Behav* 7: 1-5
- Vaňková R**, Kosová K, Dobrev P, Vítámvás P, Trávníčková A, Cvikrová M, Pešek B, Gaudinová A, Musilová J, Přerostová S, Galiba G, Prášil IT (2014) *Environ Exp Bot* 101: 12-25
- Wahid A, Close TJ (2007) *Biol Plant* 51: 104–9
- Werner T, Nehnevajova E, Kollmer I, Novák O, Strnad M, Kramer U, Schmölling T (2010) *Plant Cell* 22: 3905-3920
- Zhang H, De Bernonville TD, Body M, Glevarec G, Reichel T M, Unsicker S, Bruneau M, Renou JP, Huguet E, Dubreuil G, Giron D (2016) *J Insect Physiol* 84: 114–127
- Zhang H, Dubreuil G, Faivre N, Dobrev P, Kaiser W, Huguet E, **Vaňková R**, Giron D (2018) *Entomol Exp Appl* 166(5): 428-438 SI
- Zuker M, Mathews DH, Turner DH (1999) In: *RNA Biochemistry and Biotechnology*; Barciszewski J, Clark BFC, Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, Volume 70, ISBN 978-0-7923-5862-6.

6. Summary

In the last seventy years, enormous increase of the yield of new crop varieties has been achieved, mainly due to the “green revolution”. At present, potential for further yield increase by breeding is rather limited. However, in reality, the yield potential of these elite lines is rarely achieved, due to their vulnerability to abiotic and biotic stresses. Adverse environmental conditions may cause more than 50% loss in the yield. Thus, great attention has been recently paid to different approaches to increase stress tolerance of the high yielding crop cultivars. Therefore, much attention has been recently focused on stress physiology. Plant interactions with the environment are governed by plant hormones. The necessary prerequisite of the elevation of the plant stress tolerance by modulation of phytohormone content is elucidation of the mechanisms of their mode of action in specific stress conditions.

The major topic of the papers included in this thesis has been evaluation of the function of individual plant hormones in abiotic and biotic stress responses, with special focus on cytokinins. As our results clearly demonstrated that plant stress responses are organ-specific, hormonal dynamics was followed in apices (or crowns, respectively), leaves and roots separately. In the first part of the thesis cytokinin biosynthesis and signal transduction has been briefly described. The second part has been devoted to abiotic stresses, namely to the evaluation of the hormone roles in responses to drought, salinity, cold, heat and phosphate deficiency. In the study of drought stress responses we demonstrated for the first time that stress induced plant polarization is associated with the establishment of the gradient of active cytokinins in favour of young upper leaves, which was important for their preferential protection (**Havlová et al., 2008**). Using tobacco plants with constitutively enhanced cytokinin turn-over, we showed that elevation of cytokinin biosynthesis before stress initiation resulted in delay of the stimulation of defence mechanisms, namely increase of abscisic acid (ABA) and xanthophyll cycle pigments. By determination of *SAG12* expression we proved that recovery after drought stress is an active process and not only the return to control conditions (**Vaňková et al., 2012**). The comparison of the impact of down-regulation of cytokinin levels by over-expression of *cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX)* driven by either constitutive 35S promoter or targeted to roots (*WRKY6* promoter) showed that changed morphology and slow shoot growth rate played a decisive role in the drought stress tolerance (**Macková et al., 2013**). Using phenotyping unit, the impact of cytokinin suppression, either constitutive (35S promoter) or induced at the onset of drought stress (dexamethasone-inducible *CKX* expression), was compared with the impact of cytokinin elevation, at the stress onset (dexamethasone-inducible *IPT* expression), after exogenous cytokinin application or during stress progression (*SAG12* promoter). Cytokinin decrease was

associated with up-regulation of defence genes, while cytokinin elevation had a strong positive effect on plant growth acceleration after re-watering. Superior response of *SAG:ipt* plants was demonstrated (**Přerostová et al., 2018a**).

Mechanisms underlying salt stress tolerance were studied comparing the stress response of glycophyte *Arabidopsis thaliana* and halophyte *Thellungiella salsuginea* (**Přerostová et al., 2017**). Enhanced salinity tolerance was associated with faster and stronger stress-induced up-regulation of *cis*-zeatin, ABA, jasmonic acid (JA) levels and stress-related gene expression in the halophyte. Enhanced salt tolerance was enabled by preferential protection of the shoot apices, which were the most stress vulnerable in the glycophyte.

Dynamics of a whole set of hormones was characterized for the first time during individual phases of cold stress response in winter and spring wheat (**Kosová et al., 2012**). Hormonal changes during long-term cold response were elucidated in two *Triticum monococcum* cultivars (**Vaňková et al., 2014**). Decisive effect of active cytokinins at the onset of vegetative – generative transition was showed.

Hormonal as well as transcriptome changes were observed at the early phase of heat stress response. Transient elevation of cytokinins and simultaneous down-regulation of ABA was in accordance with the observed transient stomata opening, underlying stimulation of transpiration, the main leaf cooling mechanism (**Dobrá et al., 2010**). The cytokinin role in stimulation of stomata aperture was confirmed using *ipt* over-expressing plants (**Skalák et al., 2016**). In the case of combined drought and heat stress, enhanced transpiration was observed also in drought stressed plants. Targeting of the heat stress to *Arabidopsis* shoots, roots or to the whole plant revealed fast communication within the plant, associated with transient up-regulation of cytokinin signalling in the non-exposed tissue (**Dobrá et al., 2015**). Transcription profiles of genes for antioxidant enzymes during heat and/or drought stress progression showed suppression of the chloroplast antioxidant enzymes, while transcription of the cytoplasmic ones was enhanced (**Lubovská et al., 2014**).

Study of the effect of phosphate deficiency on hormone levels showed negative effect of cytokinins and gibberellins (hormones related to nutrient signalling) and positive role of strigolactones (**Přerostová et al., 2018c**).

The importance of cytokinins in the response to wounding and herbivore attack was evaluated (**Schäfer et al., 2015b, Brüttig et al., 2017**). The elevated cytokinin levels were associated with preferential protection of tissues most valuable for plant survival as well as for biosynthesis of protective secondary metabolites. The mixed mode of response, i.e., upregulation of JA signalling at the early phase of infection and of salicylic acid (SA) in the

later stage after attack of Arabidopsis roots with nematode was described (**Kammerhofer et al., 2015b**). The positive effect of down-regulation of auxin levels by enhanced conjugation on the tolerance of Solanaceous plants to biotrophic and hemibiotrophic pathogens was described (**D'ippolito et al., 2017**). Enhanced tolerance of *Brassica napus* plants to biotroph *Plasmodiophora brassicae* was associated with faster down-regulation of cytokinin and auxin levels, promoted by the pathogen, as well as by stimulation of SA signal transduction (**Přerostová et al., 2018b**). The decisive effect of endophyte Wolbachia on cytokinin production after attack of *Phyllonorycter blancardella*, which is part of the invasion strategy, was proved by comparison with closely related species *Phyllonorycter mespilela*, which is lacking endophyte and is not able to secrete cytokinins (**Zhang et al. 2018**). Pre-treatment with ozone water was able to increase pathogen tolerance at the place of application, but not in systemic tissues (**Prigigallo et al., 2019**).

Altogether I have selected 20 papers from the last 11 years, of which I am co-author (in 13 cases the first one or the coresponding one). Majority of these papers describe the results of PhD. theses, which I supervised.

9. Seznam publikací použitých v DSc. disertační práci (* = sdílený první nebo korespondující autor)

A. Biosyntéza a signální dráha cytokininů

1. Ha* S, Vaňková* R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2012) Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. Trends in Plant Science 17:172-179 (IF₂₀₁₂ 11.808, Citace 214, bez autocitací 208)

B. Sucho

2. Havlová M, Dobrev PI, Motyka V, Štorchová H, Libus J, Dobrá J, Malbeck J, Gaudinová A, Vaňková R (2008) The role of cytokinins in responses to water deficit in tobacco plants over-expressing *trans-zeatin O-glucosyltransferase* gene under 35S or SAG12 promoters. Plant Cell Environment 31: 341-353 (IF₂₀₀₈ 4.666, Citace 92, bez autocitací 80)
3. Dobrá J, Motyka V, Dobrev P, Malbeck J, Prášil IT, Haisel D, Gaudinová A, Havlová M, Gubiš J, Vaňková 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): 1360-1370 (IF₂₀₁₀ 2.677, Citace 78, bez autocitací 71)
4. Macková H, Hronková M, Dobrá J, Turečková V, Novák O, Lubovská Z, Motyka V, Haisel D, Hájek T, Prášil IT, Gaudinová A, Štorchová H, Werner T, Schmülling T, Vaňková R. (2013) Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced *cytokinin oxidase/dehydrogenase* gene expression. Journal of Experimental Botany 64(10): 2805-2815 (IF₂₀₁₃ 5.794, Citace 65, bez autocitací 59)

5. Lubovská Z, Dobrá J, Štorchová H, Wilhelmová N, Vaňková R (2014) Cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression modifies antioxidant defence against heat, drought and their combination in *Nicotiana tabacum* plants. *Journal of Plant Physiology* 171: 1625–1633 (IF₂₀₁₄ 2.557, Citace 16, bez autocitací 15)
6. Přerostová S, Dobrev PI, Gaudinová A, Knirsch V, Korber N, Pieruschka R, Fiorani F, Brzobohatý B, Černý M, Spíchal L, Humplík J, Vaněk T, Schurr U, Vaňková R (2018) Cytokinins: Their impact on molecular and growth responses to drought stress and recovery in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 9: Article Number: 655 (IF₂₀₁₇ 3.677, Citace 4, bez autocitací 4)

C. Zasolení

7. Přerostová S, Dobrev PI, Gaudinová A, Hošek P, Soudek P, Knirsch V, Vaňková R (2017) Hormonal dynamics during salt stress responses of salt-sensitive *Arabidopsis thaliana* and salt-tolerant *Thellungiella salsuginea*. *Plant Science* 264:188–198 (IF₂₀₁₇ 3.712, Citace 5, bez autocitací 5)

D. Chladový stres

8. Kosová K, Prášil IT, Vítámvás P, Dobrev P, Motyka V, Floková K, Novák O, Turečková V, Rolčík J, Pešek B, Trávníčková A, Gaudinová A, Galiba G, Janda T, Vlasáková E, Prášilová P, Vaňková R (2012) Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra. *Journal of Plant Physiology* 169:567-576 (IF₂₀₁₂ 2.699, Citace 73, bez autocitací 66)
9. Vaňková R, Kosová K, Dobrev P, Vítámvás P, Trávníčková A, Cvikrová M, Pešek B, Gaudinová A, Musilová J, Přerostová S, Galiba G, Prášil IT (2014) Dynamics of cold acclimation and complex phytohormone responses in *Triticum monococcum* lines G3116 and DV92 differing in vernalization and frost tolerance level. *Environmental Experimental Botany* 101:12-25 (IF₂₀₁₄ 3.359, Citace 10, bez autocitací 5)

E. Teplotní stres

10. Dobrá J, Černý M, Štorchová H, Dobrev P, Skalák J, Jedelský PL, Lukšanová H, Gaudinová A, Pešek B, Malbeck J, Vaněk T, Brzobohatý B, Vaňková R (2015) The impact of heat stress targeting on the hormonal and transcriptomic response in *Arabidopsis*. *Plant Science* 231: 52-61 (IF₂₀₁₅ 3.362, Citace 18, bez autocitací 17)
11. Skalák J, Černý M, Jedelský P, Dobrá J, Ge E, Novák J, Hronková M, Dobrev P, Vaňková* R, Brzobohatý* B (2016) Stimulation of *ipt*-overexpression as a tool to elucidate cytokinin role in temperature responses of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 67(9): 2861–2873 (IF₂₀₁₆ 5.830, Citace 17, bez autocitací 16)

F. Nedostatek fosfátu

12. Přerostová S, Kramná B, Dobrev PI, Gaudinová A, Maršík P, Fiala R, Knirsch V, Vaněk T, Kurešová G, Vaňková R (2018) Organ-specific hormonal cross-talk in

phosphate deficiency. *Environmental and Experimental Botany* 153: 198-208 (IF₂₀₁₆ 3.666, Citace 0, bez autocitací 0)

G. Biotické stresy

13. Schäfer M, Meza-Canales ID, Navarro-Quezada A, Brütting C, Vaňková R, Baldwin IT, Meldau S (2015) Cytokinin levels and signaling respond to wounding and the perception of herbivore elicitors in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Integrative Plant Biology* 57(2): 198-212 (IF₂₀₁₅ 3.670, Citace 26, bez autocitací 25)
14. Brütting C, Schäfer M, Vaňková R, Gase K, Baldwin IT, Meldau S (2017) Changes in cytokinins are sufficient to alter developmental patterns of defense metabolites in *Nicotiana attenuata*. *Plant Journal* 89 (1): 15-30 (IF₂₀₁₇ 5.575, Citace 10, bez autocitací 10)
15. Přerostová S, Dobrev PI, Konradyová V, Knirsch V, Gaudinová A, Kramná B, Kazda J, Ludwig-Müller J, Vaňková R (2018) Hormonal responses to *Plasmodiophora brassicae* infection in *Brassica napus* cultivars differing in their pathogen resistance. *International Journal of Molecular Science* 19: 4024 (IF₂₀₁₇ 3.687, Citace 0, bez autocitací 0)
16. D'Ippolito S, Vaňková R, Joosten MHAJ, Casalongue CA, Fiol DF (2016) Knocking down expression of the auxin-amidohydrolase IAR3 alters defense responses in *Solanaceae* family plants. *Plant Science* 253: 31-39 (IF₂₀₁₆ 3.437, Citace 1, bez autocitací 1)
17. Kammerhofer N, Egger B, Dobrev P, Vaňková R, Hofmann J, Schausberger P, Wiczorek K (2015) Systemic above- and belowground cross talk: hormone based responses triggered by *Heterodera schachtii* and shoot herbivores in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 66 (22): 7005–7017 (IF₂₀₁₅ 5.677, Citace 7, bez autocitací 7)
18. Kammerhofer N, Radakovic Z, Regis JMA, Dobrev P, Vaňková R, Grundler, FMW, Siddique S, Hofmann, J, Wiczorek, K (2015) Role of stress-related hormones in plant defence during early infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 207 (3): 778-789 (IF₂₀₁₅ 7.210, Citace 41, bez autocitací 41)
19. Zhang H, Dubreuil G, Faivre N, Dobrev P, Kaiser W, Huguet E, Vaňková R, Giron D (2018) Modulation of plant cytokinin levels in the Wolbachia-free leaf-mining species *Phyllonorycter mespilella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 166(5): 428-438 (IF₂₀₁₇ 1.454, Citace 0, bez autocitací 0)
20. Prigigallo MI, Melillo MT, Bubici G, Dobrev PI, Vaňková R, Cillo F, Veronico P (2019) Ozone treatments activate defence responses against *Meloidogyne incognita* and Tomato spotted wilt virus in tomato. *Pest Management Science*, DOI: 10.1002/ps.5362 (IF₂₀₁₇ 3.249, Citace 0, bez autocitací 0)