

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Doktorský studijní program: biochemie
Ph.D. study program: biochemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



**Studium úlohy cytokininů při abiotickém stresu
Study of cytokinin role in abiotic stress response**

Jana Dobrá

Školitel/Supervisor: RNDr. Radomíra Vaňková, CSc.

Školitel-konzultant/Co-supervisor: RNDr. Helena Štorchová, CSc.

Praha 2012

ABSTRAKT

Během evoluce si rostliny, vzhledem ke svému přisedlému způsobu života, vyvinuly řadu mechanismů, které jim umožňují vyrovnat se s nepříznivými vlivy prostředí. Reakce rostlin na abiotický stress je regulována rostlinnými hormony, zejména cytokininy (CK) a kyselinou abscisovou (ABA).

Vztah mezi odolností rostlin vůči suchu, zvýšené teplotě a kombinovanému stresu a regulací hladin rostlinných hormonů (CK, auxin a ABA) a polyaminů (PA) byl sledován u rostlin tabáku se zvýšenou hladinou osmoprotektantu prolinu a u výchozího genotypu. Vystavení rostlin zvýšené teplotě (40°C) způsobilo přechodný nárůst hladiny aktivních CK, doprovázené poklesem ABA, což indikuje stimulaci transpirace, procesu důležitého pro snížení ohřevu listů, zejména v počáteční fázi teplotního stresu. Současně byl pozorován přechodný nárůst hladin spermidinu a sperminu, výraznější v odolnějším transformantu. Aktivity jednotlivých enzymů metabolismu PA dobře korelují s jejich hladinami. Sucho vedlo ke tvorbě gradientu aktivních CK ve prospěch nejmladších listů, který zásadním způsobem přispívá k jejich přednostní ochraně. Teplotní stres aplikovaný na konci sucha, spojený s další ztrátou vody zvýšenou transpirací, výrazně zvýšil sílu stresu. Zachování vyšší hladiny CK, rychlejší odezva na stres a stimulace obranných mechanismů v transformantu naznačují jeho zvýšenou odolnost vůči stresu.

Porovnání odezvy rostlin se zvýšenou hladinou CK (prostřednictvím exprese genu pro *trans*-zeatin O-glukosyltransferasu *ZOG1* indukované promotorem *SAG12*, který je aktivován spuštěním senescence, nebo konstitutivním promotorem 35S) umožnilo charakterizovat důležité fyziologické funkce CK při odezvě na sucho.

Součástí odezvy na nedostatek vody je zvýšení hladiny prolinu, které dobře koreluje se stimulací transkripce genu pro biosyntetický enzym (pyrrolin-5-karboxylát syntetasy, *P5CS A*, který jsme identifikovali na základě sekvenční homologie s ostatními druhy) a potlačením exprese genů pro degradační enzymy (prolin dehydrogenasy, PDH) *NtPDH2* a *CIG1* („cytokinin-inducible PDH“).

Zotavení je přísně regulovaný proces spojený s rychlým potlačením senescenčního programu (vypnutí aktivity promotoru *SAG12*) a s výrazným poklesem hladiny exprese dehydrinu *NtERD10B*. Ochranné mechanismy (zvýšená hladina prolinu a ABA) zůstaly aktivované ještě minimálně 24 hodin po zalití, což zvyšuje odolnost vůči dalším potenciálním obdobím stresu.

ABSTRACT

Plants had to evolve, due to their sessile growth habit, a complex system of defence against adverse environmental conditions. Plant abiotic stress responses are regulated by plant hormones, especially by cytokinins (CKs) and abscisic acid (ABA).

In order to evaluate the effect of enhanced stress tolerance on the dynamics of hormones (CKs, auxin and ABA) as well as polyamine levels during the drought and/or heat stress (HS) progression, response of tobacco plants with enhanced level of osmolyte proline was compared with the corresponding wild-type. HS (40°C) caused a transient increase in bioactive CK content, accompanied by decrease of ABA, which indicated stimulation of transpiration, important mechanism to cool down the leaf temperature at the early phase of HS. Simultaneously, a transient increase in spermidine and spermine levels was found, more profound in proline-over-producing transformant. The activities of particular polyamine metabolic enzymes correlated well with their content. Drought stress resulted in the establishment of a gradient of bioactive CKs in favour of the upper leaves, crucial for their preferential protection. Application of HS at the end of drought period strongly enhanced the stress severity, mainly due to additional water loss caused by enhanced transpiration. Maintenance of higher CK content, faster stress response and defence stimulation in proline over-producing transformant indicated its elevated stress tolerance.

CK physiological functions in the drought stress were evaluated in detail comparing response of tobacco plants with elevated CK content, either before stress initiation (*35S::ZOG1*) or targeted to senescing tissues (*SAG12::ZOG1*) and corresponding wild-type.

Drought response was associated with elevation of proline levels, which correlated well with stimulation of the transcription of gene for proline biosynthetic enzyme (pyrroline-5-carboxylate synthetase, *P5CS A*, identified by us on the basis of sequence homology with other species) and suppression of the expression of proline dehydrogenase genes *NtPDH2* and *CIG1* (cytokinin-inducible PDH).

Recovery was characterized as precisely regulated process, associated with fast down-regulation of senescence programme (switch-off of *SAG12* expression), as well as by suppression of expression of dehydrin *NtERD10B*. Protective mechanisms (elevated proline and ABA content) were maintained activated for at least 24 h, probably in anticipation of subsequent stress period.

Obsah / Content:

Kapitoly v české části autoreferátu:

Seznam zkratk	2
1. Úvod	3
2. Cíle práce.....	5
3. Materiál a metodika.....	6
4. Výsledky a diskuse.....	9
5. Závěry.....	20

Kapitoly v anglické části autoreferátu:

Abbreviations	22
1. Introduction	23
2. Aims of the study	25
3. Material and methods	26
4. Results and discussion.....	29
5. Conclusions	41
Použitá literatura/References.....	43
Curriculum vitae.....	47
Seznam publikací / List of publications	48
Seznam vybraných příspěvků do sborníků / Selected abstracts	48

Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
Act9	aktin
ADC	arginin dekarboxylasa
Asp	asparagová kyselina
cDNA	komplementární DNA
<i>CIG1</i>	cytokininem-indukovatelný gen
CK	cytokinin
CKX	cytokinin dehydrogenasa
CSP41	endoribonukleasa zapojená do obratu chloroplastové mRNA
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
DAO	diamin oxidasa
DHZ	dihydrozeatin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GC	plynová chromatografie
His	histidin
HPLC	vysoko účinná kapalinová chromatografie
IAA	kyselina indol-3-octová
IPT	isopentenyltransferasa
iP	N ⁶ -(2-isopentenyl)-adenin
iPR	iP ribosid
LEA	„late embryogenesis abundant“
MDA	malondialdehyd
MS	hmotnostní spektrometrie
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
<i>NtERD10B</i>	gen kódující dehydrin
<i>NtPDH</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> prolin dehydrogenasa
ODC	ornithin dekarboxylasa
PA	polyamin
PAO	polyamin oxidasa
PCR	polymerasová řetězová reakce
P5CS	pyrroline-5-karboxylát syntetasa
PDH	prolin dehydrogenasa
Put	putrescin
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkripce
RWC	relativní obsah vody
<i>SAG</i>	senescence-associated gene
SAMDC	S-adenosylmethionin dekarboxylasa
Spm	spermin
Spd	spermidin
TBA	thiobarbiturová kyselina
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
WT	„wild-type“, výchozí genotyp
ZOG1	<i>trans</i> -zeatin O-glukosyltransferasa

1. Úvod

Rostlinné hormony (fytohormony) hrají významnou úlohu v regulaci růstu a vývoje rostlin a rovněž při jejich odpovědi na stres. Cytokininy (CK), jako jedna z nejdůležitějších skupin fytohormonů, byly definovány jako látky, které jsou schopné (v přítomnosti auxinu) stimulovat buněčné dělení („cytokinesi“). Přirozeně se vyskytující CK jsou N⁶-substituované deriváty adeninu nesoucí buď isoprenoidní, nebo aromatický postranní řetězec (Strnad 1997, Mok a Mok 2001). Isoprenoidní CK rozdělujeme na isopentenyladeninové (iP)-, *trans*-zeatinové (*tZ*)-, *cis*-zeatinové (*cZ*)- a dihydrozeatinové (DHZ)- metabolity. Aromatické CK jsou výrazně méně časté. (Strnad a kol. 1997, Sakakibara 2006). Zastoupení jednotlivých metabolitů CK závisí na druhu, pletivu a vývojovém stadiu rostliny.

CK se mohou v rostlině vyskytovat ve formě volných bází, ribosidů, ribotidů nebo N- a O-glykosidů. Fysiologicky aktivní formy CK, interagující s CK receptory, jsou volné báze, obzvláště *tZ*, v menší míře také CK ribosidy (Inoue a kol. 2001, Yamada a kol. 2001, Spichal a kol. 2004). Krok limitující rychlost biosyntézy isoprenoidních CK je katalyzován enzymem isopentenyltransferasou (IPT). Degradaci CK katalyzuje CK dehydrogenasa (CKX). Příjem a přenos signálu CK jsou zajištěny vícekrokovou fosforylační kaskádou („phosphorelay“), která zahrnuje hybridní sensorovou histidinovou kinasu, histidinové fosfotransferové proteiny a regulátory odpovědi (Ferreira a Kieber 2005, Schaller a kol. 2002). CK jsou zapojeny do regulace celé řady procesů, jako přechod mezi fázemi buněčného cyklu, morfogeneze, tvorba výhonků, tvorba apikálního meristému prýtu, vývoj květu i semen, oddálení senescence, mobilizace živin (CK zvyšují sílu sinku), apikání dominance (podporují růst postranních pupenů), reakce na světlo, včetně vývoje chloroplastů, nebo tvorba vodivých pletiv. Přestože nepatří mezi „stresové hormony,“ hrají CK důležitou roli v odpovědi na stres. Bylo prokázáno, že aplikace exogenních CK zvyšuje toleranci vůči mírnému stresu a urychluje zotavení (Itai a kol. 1978), také stimuluje obnovení vodivosti průduchů a rychlost fotosyntézy po zalití (Rulcova a Pospisilova 2001). Dále CK mohou zvyšovat transkripci mnoha genů stresem indukovaných (Hare a Van Staden 1997).

Kyselina abscisová (ABA) je hlavním hormonem řídícím odpověď rostliny na nedostatek vody, způsobený abiotickým stresem nebo při určitých vývojových stadiích, např. během vývoje semen při jejich desikaci. ABA ovlivňuje jak rychlé odpovědi, jako zavírání průduchů, tak dlouhodobé procesy, zejména aktivaci exprese mnoha genů spojených se stresem. Signální dráha ABA začíná vazbou ABA na receptor. Této dráhy se účastní také řada druhých posílů. Signál ABA působí stimulaci transkripce řady genů, především genů kódujících LEA proteiny, proteasy, chaperoniny, iontové a vodní kanály, antioxidační enzymy, enzymy sacharidového metabolismu (Finkelstein 2006). Navíc ABA ovlivňuje degradaci specifických mRNA, jejich stabilitu, sestřih a transport (Hirayama a Shinozaki 2007).

Více než před půl stoletím Kemble a MacPherson (1954) ukázali, že vadnoucí jílek vytrvalý

akumuluje prolin. Od té doby mnoho studií prokázalo, že zvýšení obsahu prolinu je důležitou součástí odpovědi na nepříznivé podmínky prostředí. Díky své cyklické struktuře se sekundární aminoskupinou, je prolin unikátní mezi proteinogenními aminokyselinami a je nezbytný pro tvorbu sekundární struktury proteinů. Také jako volná aminokyselina hraje důležitou roli. Bylo prokázáno, že plní funkci osmolytu, stabilizuje proteiny, membrány a subcelulární struktury, zabraňuje peroxidaci lipidů a vychytává reaktivní kyslíkové radikály. Vedle posledně zmiňované funkce, je známo, že prolin chrání a stabilizuje také antioxidantní enzymy a aktivuje alternativní detoxifikační dráhy ve stresovaných buňkách tabáku. Dále je prolin zapojen do udržování cytosolického pH a redoxní rovnováhy. V neposlední řadě se prolin zdá být zapojen do metabolických signálních drah řídicích mitochondriální funkce, zotavení po odeznění stresu a vývoj (shrnuto v: Verbruggen a Hermans 2008, Szabados a Savoure 2010). Obsah prolinu je regulován rychlostí jeho biosyntézy a odbourávání, které mohou být ovlivněny na úrovni genové exprese i enzymové aktivity. Biosyntetický enzym Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylát syntetasa (P5CS) a degradační enzym prolin dehydrogenasa (PDH) reprezentují nejdůležitější regulační body. Zvýšená exprese genu *P5CS* se běžně používá ke zvýšení hladiny prolinu v rostlinách. Protože přirozený enzym P5CS podléhá inhibici konečným produktem, často se upřednostňuje gen upravený bodovou mutací (Zhang a kol. 1995). S použitím tohoto konstruktu byly v nedávné době připraveny rostliny tabáku s významně zvýšeným obsahem prolinu (Gubis a kol. 2007).

Polyaminy (PA) jsou všudypřítomné nízkomolekulární polykationty obsahující několik aminoskupin ve své molekule. Patří mezi významné regulátory růstu a vývoje, jak v prokaryotech, tak v eukaryotech (Tiburcio a kol. 1997). V rostlinách můžeme PA nalézt jako volné báze nebo v konjugované formě. Mezi PA vyskytujícími se ve vyšších rostlinách převažují diamin putrescin (Put), triamin spermidin (Spd) a tetramin spermin (Spm). Biosyntéza PA začíná tvorbou Put, a to buď přímo z ornithinu za katalýzy ornithin dekarboxylasou (ODC) nebo nepřímo z argininu pomocí arginin dekarboxylasy (ADC). Spd a Spm vznikají z Put postupným přidáváním aminopropylové skupiny. Degradace PA je zprostředkována diamin oxidasou (DAO) a polyamin oxidasou (PAO). Oxidací PA vzniká H_2O_2 , který pravděpodobně hraje důležitou roli v obranných reakcích a přenosu stresového signálu. Zvýšená hladina H_2O_2 ovšem může být cytotoxická a může způsobit oxidativní stres (shrnuto v: Wallace a kol. 2003). Ukazuje se, že rostlinné PA se zapojují do celé řady biologických procesů. PA přispívají k ochraně rostlin před nepříznivými podmínkami prostředí, díky své schopnosti udržování osmotické rovnováhy, zachování stability membrán a vychytávání volných radikálů (Bouchereau a kol. 1999). Zdá se, že PA signalizace je součástí komplexních hormonálních signálních drah (Alcázar a kol. 2010). Nedávno Alcázar a kol. (2011) naznačili, že stimulace tvorby PA je jednou z odpovědí rostliny na abiotický stres.

Pochopení mechanismu odezvy rostliny na jednotlivé stresy a rovněž zotavení po jejich odeznění může přispět k vývoji strategie pro zlepšení odolnosti vůči stresu u zemědělských plodin v rychle se měnícím prostředí.

2. Cíle práce

Vzhledem ke svému přisedlému způsobu života si rostliny vyvinuly komplexní systém obrany proti nepříznivým podmínkám okolního prostředí, kterým jsou vystaveny v průběhu svého růstu a vývoje. Odezva rostlin na abiotický stres je regulována fytohormony, zejména cytokininy a kyselinou abscisovou. Porovnání odezvy rostlin se zvýšenou hladinou osmoprotektantu prolinu a výchozího genotypu umožnilo charakterizovat vztah mezi změnami hladin hormonů a odolnosti rostliny vůči stresu.

Práce byla zaměřena především na:

- Stanovení vlivu zvýšeného obsahu prolinu na hormonální odezvu a toleranci rostlin vůči abiotickému stresu (suchu, zvýšené teplotě a jejich kombinaci).
- Stanovení transkripčních profilů klíčových genů zodpovědných za biosyntézu prolinu (*P5CS*) a jeho degradaci (*PDH*) v závislosti na poloze listu a v kořenech rostlin v průběhu stresu suchem a během zotavení.
- Objasnění funkce cytokininů při odezvě na nedostatek vody a vzájemné interakce s dalšími hormony - auxinem a kyselinou abscisovou, porovnáním odezvy rostlin tabáku se zvýšenou hladinou CK (prostřednictvím exprese genu pro *trans*-zeatin O-glukosyltransferasu *ZOG1* indukované promotorem *SAG12*, který je aktivován spuštěním senescence, nebo konstitutivním promotorem *35S*) a výchozího genotypu.
- Porovnání aktivace senescence v jednotlivých listech ve stresu suchem, po rehydrataci a v průběhu přirozeného stárnutí pomocí rostlin tabáku *SAG12:ZOG1*.
- Charakterizaci vlivu obsahu prolinu na změny hladin polyaminů při vystavení zvýšené teplotě.

3. Materiál a metodika

Rostlinný materiál

- 1) Rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. M51) a transgenní rostliny 35S:P5CSF129A (M51-I) (Gubis a kol. 2007).
- 2) Rostliny *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 (prof. Machteld a David Mok, Oregon State University).
- 3) Transgenní rostliny tabáku nesoucí gen pro *trans*-zeatin O-glukosyltransferasu z *P. lunatus* pod senescenčním promotorem *SAG12* (*SAG12::ZOG1*) a pod konstitutivním promotorem CaMV 35S (*35S::ZOG1*)(prof. Machteld a David Mok, Oregon State University, detaily viz. Martin a kol. 2001).

Metodika

3. 1. Růstové podmínky, aplikace stresu a odběr vzorků

3. 1. 1. Růstové podmínky

Rostliny byly pěstovány v půdě v růstové komoře po 6 týdnů při fotoperiodě 16-h při 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, teplotě 25/23°C a relativní vlhkosti cca. 80%.

3. 1. 2. Aplikace stresu a odběr vzorků

Sucho: rostliny byly přeneseny do stejné růstové komory s relativní vlhkostí sníženou na 35% (ostatní růstové podmínky zůstaly stejné). Tyto rostliny nebyly zalévány po několik následujících dní (1, 6, 10). Poté byly zality („zotavení“).

Teplotní stres: rostliny byly vystaveny zvýšené teplotě (40 °C) po 2 h nebo 6 h (bez dodatečného přísunu vody). Poté byly některé přeneseny zpět do 25 °C a následovalo dvouhodinové zotavení.

Sucho+teplotní stres: na konci fáze sucha (10 dní) byla část rostlin vystavena zvýšené teplotě 40 °C po dobu 2 h.

Pro izolaci RNA byly odebírány vzorky z každého listu, pro stanovení dalších parametrů byly odebrány vzorky horních, středních a dolních listů. Všechny vzorky byly bezprostředně po odběru zmrazeny v kapalném dusíku. Kořeny byly zbaveny hlíny, krátce omyty, vysušeny a zmrazeny v kapalném dusíku.

3. 2. Chromatografické metody

3. 2. 1. Stanovení fytohormonů

Fytohormony byly izolovány podle Dobřeva a Kamínka (2002). Pro analýzy endogenních CK byly přidávány deuteriem značené standardy. Tritiované vnitřní standardy byly použity pro stanovení

kyseliny indol-3-octové (IAA) a ABA.

Kvantifikace CK byla prováděna metodou HPLC-MS podle Dobřeva a kol. (2002). Hladiny IAA a ABA byly určeny dvourozměrnou HPLC podle Dobřeva a kol. (2005). Metoda byla ověřena porovnáním s GC-MS.

3. 2. 2. Stanovení polyaminů

Extrakce a HPLC analýza benzoylovaných polyaminů byla prováděna podle Slocuma a kol. (1989).

3. 2. 3. Stanovení fotosyntetických pigmentů

Pigmenty xanthofylového cyklu byly stanoveny v acetonových extraktech podle Haisla a kol. (2008).

3. 3. Stanovení enzymových aktivit

3. 3. 1. Stanovení aktivity cytokinin dehydrogenasy

CKX (EC 1.5.99.12) byla izolována a částečně purifikována metodou popsanou Motykou a kol. (2003). Aktivita CKX byla stanovena *in vitro* analýzou založenou na přeměně $[2\text{-}^3\text{H}]\text{N}^6\text{-(2-isopentenyl)adeninu}$ na $[^3\text{H}]\text{adenin}$. Separace substrátu od produktu byla prováděna pomocí HPLC.

3. 3. 2. Stanovení aktivit ornithin dekarboxylasy, arginin dekarboxylasy a S-adenosylmethionin dekarboxylasy

Aktivita ODC (EC 4.1.1.17), ADC (EC 4.1.1.19) a S-adenosylmethionin dekarboxylasy (SAMDC; EC 4.1.1.50) byly stanoveny radiochemickou metodou podle Tassoniho a kol. (2000). Obsah proteinů ve vzorcích byl určen podle Bradforda (1976).

3. 3. 3. Stanovení aktivity DAO a PAO

Aktivita DAO (EC 1.4.3.6) a PAO (1.5.3.11) byla stanovena modifikovanou radiometrickou metodou podle Paschalidise a Roubelakis-Angelakis (2005).

3. 4. Spektrofotometrické metody

3. 4. 1. Stanovení hladiny prolinu

Hladina volného prolinu byla stanovena podle Batese a kol. (1973).

3. 4. 2. Stanovení obsahu malondialdehydu

Obsah malondialdehydu (MDA) byl určen s použitím NWLSS-Malondialdehyde Assay kitu. Stanovení je založeno na reakci MDA s kyselinou thiobarbiturovou (TBA), se kterou se tvoří adukt MDA-TBA₂ silně absorbující při 532 nm. Byla použita korekce na nespecifickou turbiditu popsaná Estebanem a kol. (2008).

3. 5. Stanovení exprese genů

3. 5. 1. Izolace RNA a reverzní transkripce

Celková RNA byla izolována pomocí RNeasy Plant Kit (Qiagen). Pro odstranění zbytků DNA byla použita DNasa I (kit DNA-free, Ambion), pro reverzní transkripci (RT) oligo dT nebo náhodné hexamery jako primery, společně s Protector RNase Inhibitor (Roche) a Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche).

3. 5. 2. Kvantitativní RT PCR

Kvantitativní RT PCR byla prováděna s použitím FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I Kitu a/nebo LightCycler 480 SYBR Green I Master Kitu (Roche) s primery čištěnými pomocí HPLC (Metabion). Pro normalizaci naměřených hladin exprese byl využit gen pro *Act9* (Volkov a kol. 2003) a 18S rRNA (pro případ cDNA připravené s pomocí náhodných hexamerů). Neměnná hladina transkriptu *Act9* za stresových podmínek byla potvrzena přímou kvantifikací cDNA, popsané Libusem a Štorchovou (2006).

3. 6. Stanovení vodního potenciálu, osmotického potenciálu a relativního obsahu vody

Vodní potenciál listů byl stanoven postupem popsaným Boyerem (1995). Osmotický potenciál byl určen psychrometricky z xylémové šťávy. Relativní obsah vody (RWC) byl vypočítán podle:

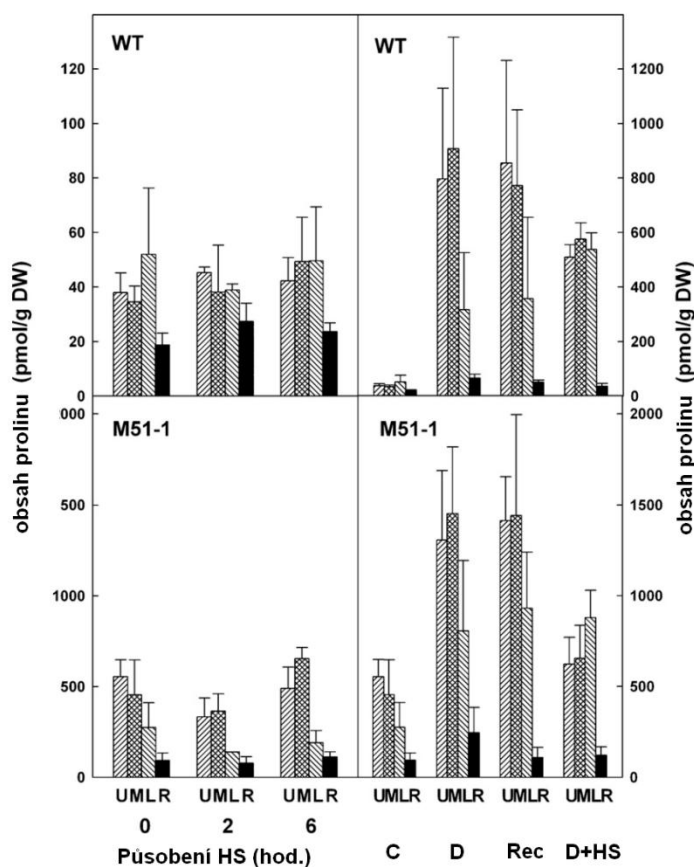
$$\text{RWC (\%)} = \frac{(\text{FM} - \text{DM})}{(\text{SM} - \text{DM})} \times 100$$

FM: čerstvá hmota; SM: hmotnost po nasycení vodou; DM: sušina.

4. Výsledky a diskuse

Mezi hlavní abiotické stresory patří sucho a teplotní stres. Zatímco vliv jednotlivých stresů na rostliny byl poměrně často studován, jen málo pozornosti bylo věnováno jejich kombinaci, která se vyskytuje běžně v přírodě. Odezva rostlin na kombinovaný stres se ovšem diametrálně liší od odpovědi rostlin, vystavených jednotlivým stresorům zvláště (Rizhsky a kol. 2004, Zhang a kol. 2008). Abychom stanovili vliv zvýšené teploty a sucha jednotlivě i v kombinaci na hladiny CK, IAA a ABA, použili jsme tabákové linie lišící se v obsahu prolinu, rostliny tabáku přirozeného typu (WT) *Nicotiana tabacum* L. cv. M51 a transgenní rostliny *35S:P5CSF129A* (M51-1).

Významně zvýšená tvorba prolinu v transformantech (Obr. 1) odpovídala negativnějšímu osmotickému potenciálu listů (jak za podmínek kontrolních, tak stresových) a také zvýšené tvorbě ochranných pigmentů xanthofylového cyklu ve srovnání s odpovídajícím WT. Tyto výsledky ukazují na zvýšenou odolnost transgenních rostlin vůči suchu. Protože prolin má velmi důležitou úlohu, zejména při odezvě na nedostatek vody, stanovili jsme rovněž transkripční profily genů kódujících degradační enzymy prolinu (proline dehydrogenasy, PDH), a biosyntetické enzymy, Δ^1 -pyrroline-5-karboxylát synthasy (P5CS) v kořenech a jednotlivých listech.

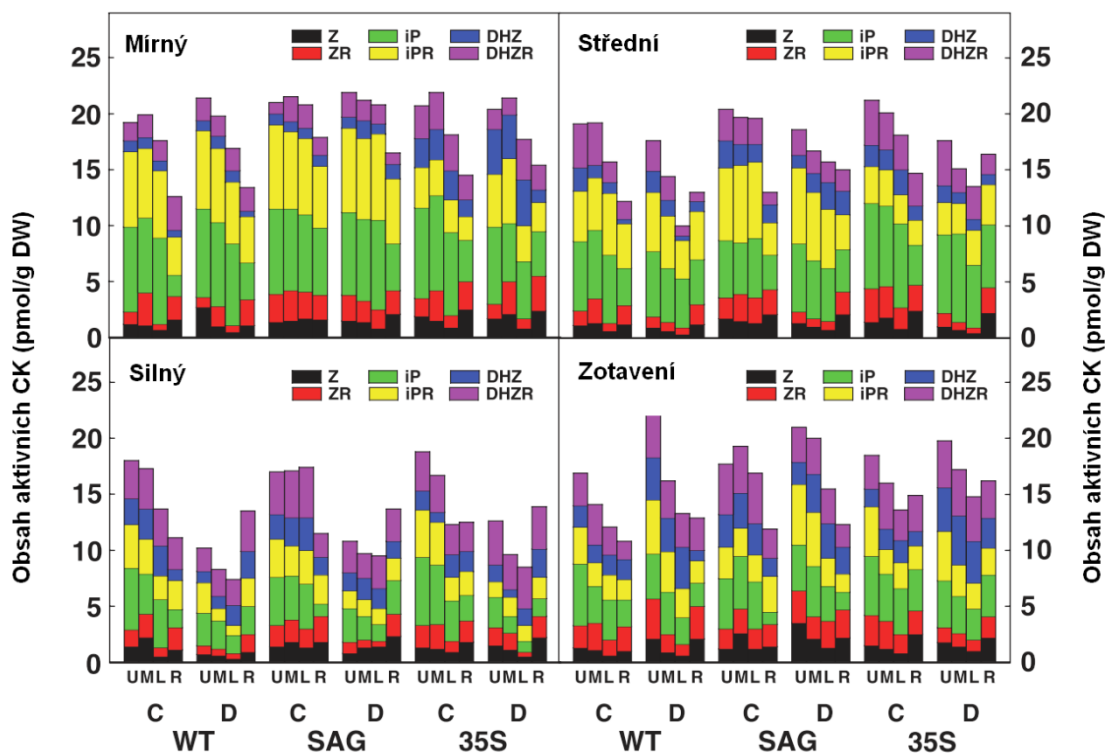


Obr. 1. Obsah prolinu v listech a kořenech rostlin tabáku výchozího genotypu (WT) a transformantů M51-1. V levé části obrázku: rostliny vystavené zvýšené teplotě (40 °C po dobu 0, 2 a 6 h). V pravé části obrázku: rostliny vystavené suchu; kontroly (C), sucho (D; 10 d bez závlivky), zotavení (Rec; 24 h po zalití) a kombinace sucha a zvýšené teploty (D+HS). U: horní listy, M: střední listy, L: spodní listy, R: kořeny; DW: sušina.

V další části práce jsme se zaměřili důkladněji na sucho a následnou rehydrataci. Použili jsme rostliny s konstitutivně zvýšenou hladinou CK (již před samotným zahájením stresu suchem, 35S::ZOG1), rostliny vykazující zvýšený obsah CK lokalizovaný do stárnoucích pletiv (SAG12::ZOG1) a také výchozí genotyp *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38.

4. 1. Odezva rostlin na sucho

Stres suchem koreluje s výrazným poklesem vodního potenciálu listů a relativního obsahu vody (RWC) ve všech studovaných genotypech. Tento pokles je znatelně menší v horních listech. Dlouhodobé vystavení rostlin nedostatku vody je spojeno se značným nárůstem hladiny prolinu (Obr. 1) a také obsahu ABA, hlavně v horních listech. Rostliny 35S::ZOG1 nevykazují odezvu na mírný stres. Zdá se, že zvýšená hladina CK před zahájením stresu může mít nepříznivé následky, zvláště v případě dlouhotrvajícího sucha, tím, že zpomalí aktivaci obranných mechanismů. Ve všech testovaných genotypech sucho indukovalo tvorbu gradientu aktivních CK, tím, že byla snížena aktivita CKX v horních listech, zatímco v dolních byla výrazně stimulována. Tvorba tohoto gradientu aktivních CK ve prospěch horních listů (Obr. 2) odráží nezbytnost jejich přednostní ochrany za nepříznivých podmínek okolního prostředí. Zvýšený obsah aktivních CK ve spodních listech SAG12::ZOG1 transformantu ve srovnání s WT, vedl ke zmírnění negativních důsledků stresu.



Obr. 2. Hladiny aktivních CK (*trans*-zeatin, Z; N⁶-(2-isopentenyl)adenin, iP; dihydrozeatin, DHZ a jejich ribosidy ZR, iPR, DHZR) v listech a kořenech tabáku tří genotypů: výchozí genotyp (WT), SAG12::ZOG1 (SAG) a 35S::ZOG1 (35S) v průběhu stresu suchem a následného zotavení. DW: sušina.

Zvýšení hladiny IAA bylo pozorováno během stresu ve spodních listech všech genotypů. Podobně Quirino a kol. (1999) popsal nárůst volného auxinu ve stárnoucích listech *Arabidopsis*.

Vzhledem k tomu, že je senescence přísně regulovaný proces, může se vyšší hladina IAA podílet na jeho kontrole. Je možné, že zvýšený rozklad proteinů ve stárnoucích listech vede ke zvýšení obsahu tryptofanu, který může být metabolizován na IAA, což umožní transport živin ze stárnoucích listů, před jejich abscisí.

Naše pozorování, že konstitutivní exprese *ZOG1* ovlivňuje morfologii kořene (prodloužení hlavního kořene a snížené větvení) je v souladu s konceptem apikální dominance popsané Alonim a kol. (2006). V průběhu sucha docházelo v kořenech všech testovaných genotypů k akumulaci CK, což korelovalo se stimulací růstu primárních kořenů a zvýšením poměru hmoty kořene vůči prýtu.

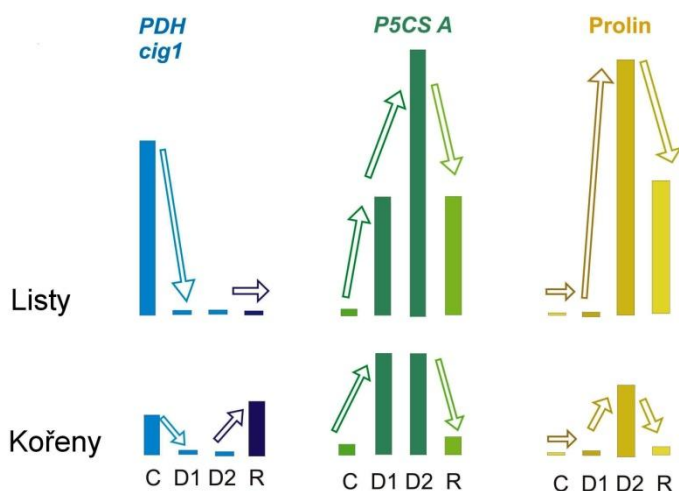
V průběhu dlouhotrvajícího sucha dochází k nárůstu obsahu IAA v kořenech tabáku, obdobně jako v kořenech kukuřice (Ribaut a Pilet 1994, Xin a kol. 1997), což může být důsledek polárního transportu auxinu. Zvýšená koncentrace auxinu může vést k dalšímu navýšení koncentrace CK, protože bylo prokázáno, že auxin může v kořenech zvyšovat expresi genů pro biosyntetické enzymy CK (Miyawaki a kol. 2004). Díky tomu, že CK potlačují tvorbu postranních kořenů, zvýšený obsah obou hormonů, které stimulují buněčné dělení v kořeni, vede k prodloužení hlavního kořene.

Odezva na sucho byla doprovázena také velkým navýšením obsahu prolinu. Studium exprese genů pro degradační enzymy prolinu ukázalo, že všechny *PDH* geny byly velmi rychle potlačeny jak v listech, tak v kořenech během prvního dne bez závlivky a byly v průběhu stresu udržovány na nízké hladině. Gen *NtPDH1* byl suchem nejméně ovlivněn, což je v souladu s předpokládanou funkcí této isoformy poskytovat energii a metabolity při odbourávání prolinu, jak ve stresovaných, tak vodou dobře zásobených rostlinách (Ribarits a kol. 2007). Naproti tomu, nejsilněji reagoval na sucho gen *NtPDH2*, opět v souladu se zjištěním Ribaritse a kol. (2007). Exprese genu *CIG1* (identifikovaného jako gen indukovatelný CK) byla také silně a rychle potlačena nedostatkem vody, přesto ale hladina jeho mRNA zůstávala relativně vysoká, což naznačuje významnou roli tohoto genu v regulaci hladiny volného prolinu v tabáku.

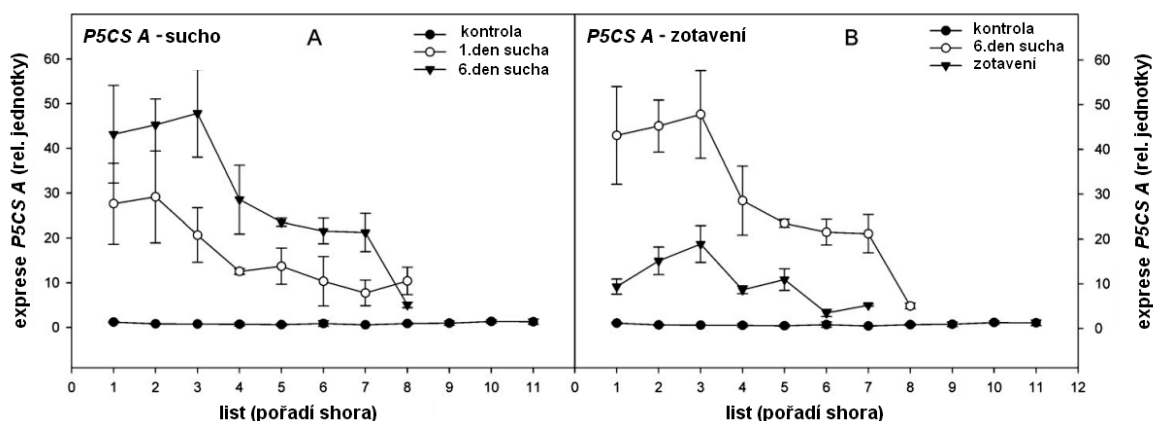
Na základě homologie s geny *P5CS* v jiných rostlinných druzích jsme našli dva geny pro *P5CS* v tabáku, které mají podobnou míru transkripce za podmínek dobrého zásobení vodou, srovnatelnou ve všech listech a kořenech. Diametrálně se však odlišuje jejich odezva na sucho. Zatímco *P5CS B* není ovlivněn suchem, velmi silná aktivace exprese genu *P5CS A* naznačuje jeho zásadní roli v odezvě tabáku na nedostatek vody. Duplikace genu *P5CS* nastala během evoluce krytosemenných rostlin několikrát (Turchetto-Zolet a kol. 2009) a jednotlivé kopie genu získaly rozdílné funkce. V *Arabidopsis* je *P5CS1* vysoce stimulovaný vodním deficitem. Má důležitou roli v hromadění prolinu iniciovaným suchem, zatímco *P5CS2* je důležitý ve vývoji semen (Szekely a kol. 2008). Objasnění úlohy genu *P5CS B* v regulaci vývoje semen tabáku, podobně jako *P5CS2* v *Arabidopsis*, bude předmětem dalšího studia.

Expresí genů spojených s prolinovým metabolismem se liší mezi listy a kořeny tabáku vystavených suchu a následnému zotavení (Obr. 3). V listech vystavených suchu je gen *P5CS A* stimulovaný daleko více než v kořenech. Také se liší hladina jeho exprese v jednotlivých listech.

Nárůst exprese je podstatně vyšší v horních než ve spodních listech (Obr. 4A). Současně je transkripce genů *PDH* téměř úplně vypnuta ve všech orgánech. Expresní profil genu *P5CS A* koreluje dobře s nárůstem hladiny volného prolinu, která je nejvyšší v horních listech a nejnižší v kořenech.



Obr. 3. Změny exprese genů pro degradaci a biosyntézu prolinu v korelaci s hladinami prolinu v listech a kořenech tabáku v průběhu sucha a následného zotavení. C: kontrola, D1: 1 den sucha, D6: 6 dní sucha a R: zotavení.



Obr. 4. *P5CS A* exprese v jednotlivých listech rostlin tabáku vystavených suchu (A) a 24 h po zalití (B).

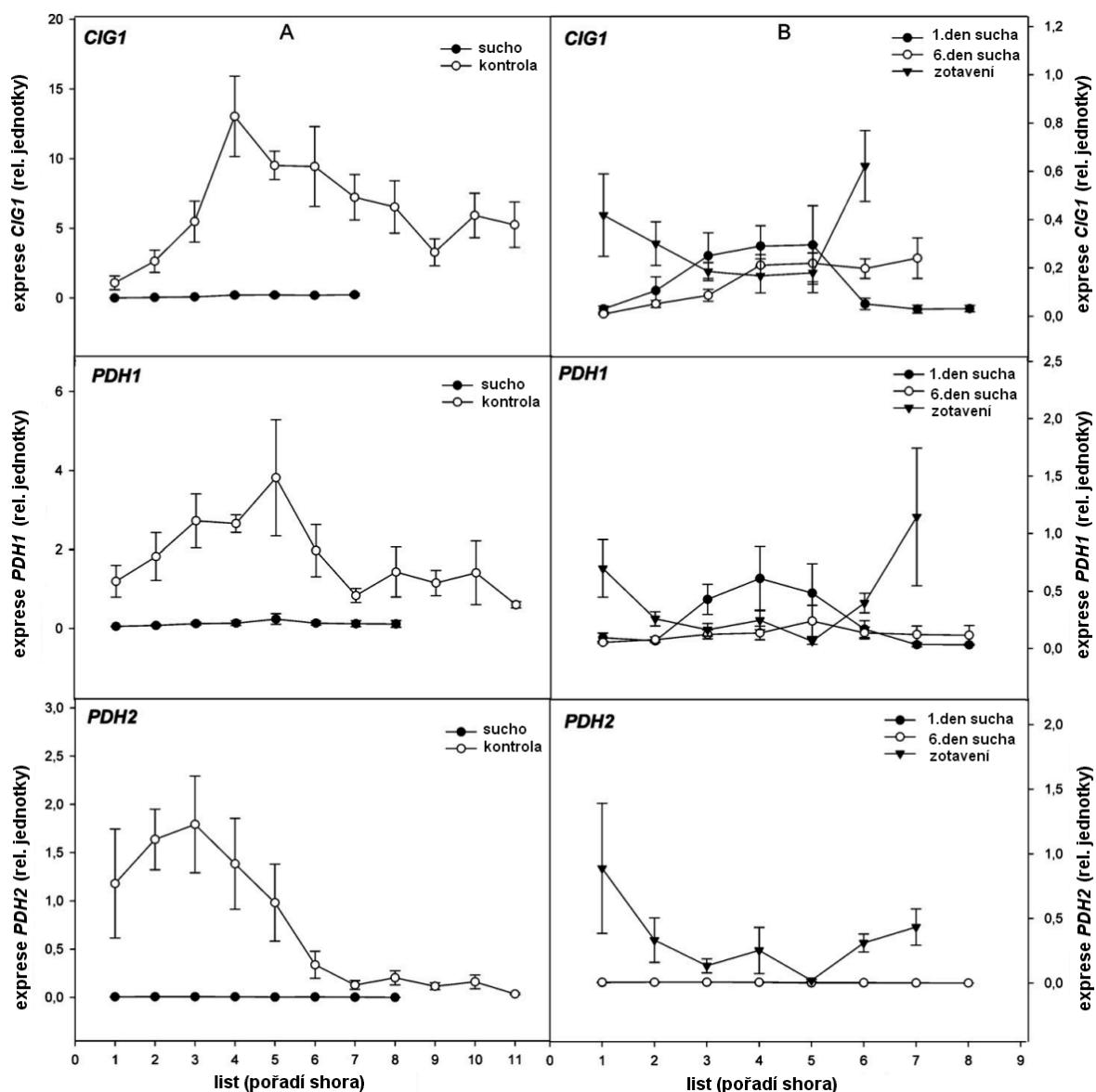
Jako dobrý marker vnímání nedostatku vody rostlinou se ukázala transkripce genu kódujícího dehydrin *NtERD10B*. Rychlý nárůst exprese dehydrinu v listech, bez ohledu na jejich pozici na stonku a silnější a rychlejší než v kořenech, odráží skutečnost, že listy jsou vystavené daleko větší ztrátě vody (prostřednictvím průduchů) než kořeny. Obdobně, koncentrace ABA byla mnohem nižší v kořenech než v listech.

4. 2. Zotavení po stresu suchem v rostlinách tabáku

Opětovné zalití vedlo k navýšení hladin bioaktivních CK (obzvláště *tZ* a jeho ribosidu) v listech tabáku (Obr. 2), což může být, alespoň částečně, způsobené obnovením toku xylémové šťávy z kořenů do nadzemní části. Aloni a kol. (2006) prokázal významnost transpiračního proudu při transportu CK z kořenů. Tomu odpovídá pozorovaný pokles celkových CK po obnovení závlivky v kořenech všech testovaných genotypů. Současně byl zjištěn nárůst aktivity CKX v listech,

pravděpodobně ve vztahu k regulaci hladin aktivních CK, po obnovení transpiračního toku. Indikátory stresu (aktivita promotoru *SAG12* i hladina ABA) ostře poklesly.

Zdá se, že nárůst koncentrace IAA ve středních listech (v rostlinách *SAG12::ZOG1* také v horních listech) je spojený s obnovením růstu. O trochu rychlejší obnova růstu rostlin *SAG12::ZOG1* ve srovnání s WT je v souladu se známým pozitivním efektem CK na zotavení (např. Itai a kol. 1978). Pomalejší zotavení *35S::ZOG1* transformantů ukazuje, že zvýšení hladiny CK již před vystavením rostliny stresu nemusí nutně být výhodné, zvláště v případě dlouhodobého silného sucha, což je v souladu s výsledky Synkové a kol. (1999).



Obr. 5. Hladiny transkripce PDH genů v jednotlivých listech rostlin tabáku (A) vystavených suchu (6-d) a za kontrolních podmínek; (B) v průběhu sucha (1-d a 6-d bez závlaky) a 24 h po zalití.

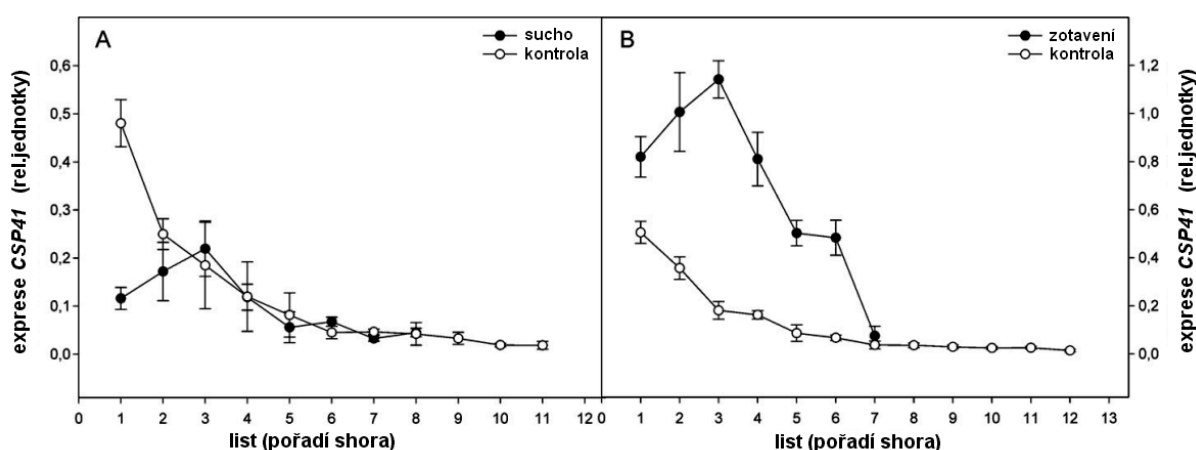
Po rehydrataci dosáhla transkripce všech tří genů *PDH* kontrolní hladiny v kořenech, ale nikoliv v listech (Obr. 3 a Obr. 5B). Současně, transkripce *P5CS A* poklesla v kořenech na hladiny srovnatelné s kontrolou, zatímco v listech zůstala oproti bazální úrovni výrazně vyšší (Obr. 3 a

Obr. 4B). Koncentrace volného prolinu, která zůstala zvýšená v listech a klesla téměř na úroveň kontrolních rostlin v kořenech, odpovídala dobře expresnímu profilu studovaných genů. Jedním z vysvětlení je, že opožděná odezva tabákových genů *PDH* a *P5CS A* na rehydrataci (a s tím související zvýšená hladina prolinu) může odrážet účinnou ochranu fotosyntetického aparátu v listech. Vedle přímé antioxidační aktivity prolinu (Matysik a kol. 2002), představuje jeho biosyntéza v chloroplastech za sucha významný faktor důležitý pro udržování redoxní rovnováhy a předcházející tvorbě singletového kyslíku v této organelle (Szekely a kol. 2008, Chaves a kol. 2009). Odlišné výsledky byly popsány v *Arabidopsis* (Kiyosue a kol. 1996, Oono a kol. 2003), kde byla zjištěna bezprostřední odezva těchto genů po odeznění stresu. Rozpor mezi výsledky v *Arabidopsis* a našimi daty, získanými studiem rostlin tabáku, lze vysvětlit rozdílnou odolností těchto druhů vůči stresu.

Expresse genů prolinového metabolismu se liší v závislosti na poloze jednotlivých listů. *P5CS A* exprese byla vyšší a *CIG1* exprese mírně nižší ve dvou nejmladších listech ve srovnání s ostatními listy stresované rostliny (Obr. 4A a 5A). Tato negativní korelace regulace klíčových genů zodpovědných za biosyntézu a degradaci prolinu se zdá mít velký podíl na relativně vysoké hladině volného prolinu v horních listech a tím přispívá k jejich efektivnější ochraně za sucha.

Vzhledem k tomu, že dehydriny mění složení membrán a tím i fotosyntetickou kapacitu (Beck a kol. 2007), jejich zvýšená hladina za podmínek dobrého zásobení vodou může být nežádoucí. Rychlý pokles transkripce *NtERD10B* po zalití demonstruje velmi rychlou fyziologickou odezvu na zavlažení. Tento předpoklad podporuje také prudký pokles hladiny ABA v listech v průběhu zotavení.

Dále byl analyzován expresní profil genu *CSP41*, kódujícího endoribonukleasu zapojenou do regulace „turn-over“ chloroplastové mRNA (Bollenbach a kol. 2003). *CSP41* je velmi důležitým regulátorem transkripce v chloroplastech (Bollenbach a kol. 2009). Hladina exprese genu *CSP41* významně závisí na pozici listu na stonku (Obr. 6A). Klesající exprese genu *CSP41* pravděpodobně zachycuje pokles rychlosti metabolismu v chloroplastech se stářím listu.

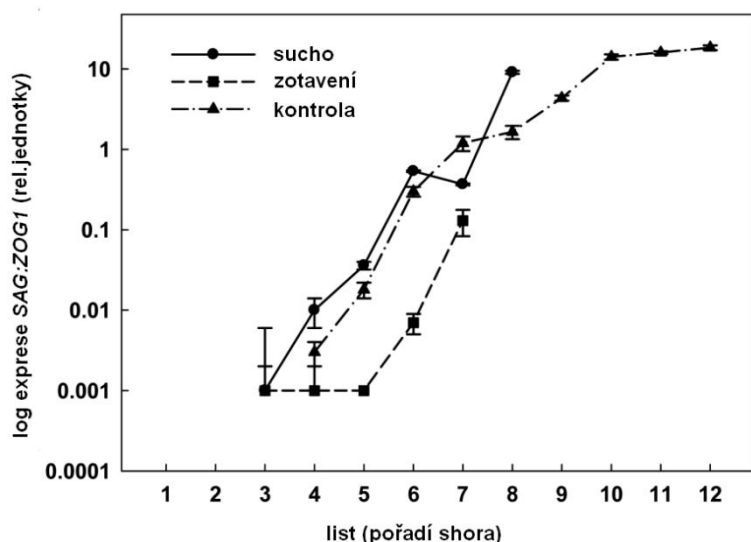


Obr. 6. Expresse *CSP41a* v jednotlivých listech rostlin tabáku za kontrolních podmínek a sucha 6 dní bez závlivky (A) nebo 24 h po zalití (B).

Zatímco exprese *CSP41a* je jen velmi málo ovlivněna suchem (Obr. 6A), odezva tohoto genu

na zalití je velmi výrazná. Během 24 h po zavlažení se transkripce *CSP41* dramaticky zvýší nad hladinu v zalévaných kontrolních rostlinách. Nicméně, transkripční profily rehydratovaných a kontrolních rostlin se liší (Obr. 6B). Toto pozorování naznačuje, že *CSP41* má důležitou funkci při zotavení po suchu. V *Arabidopsis* bylo zjištěno, že gen *CSP41b* je potlačován ABA a aktivován poraněním (Raab a kol. 2006). Stimulace genu *CSP41* po zalití je podobný proces jako aktivace *CSP41b* poraněním, pravděpodobně zajišťující nárůst transkripce a translace chloroplastové mRNA.

Aktivita promotoru *SAG12* po zalití prudce klesla pod hodnoty odpovídající zalévaným kontrolám, ve kterých již probíhala přirozená senescence (Obr. 7). Přesto spodní žluté, suchem stresované listy, které vykazovaly nejvyšší aktivitu *SAG12* promotoru, již nebyly schopny regenerace. Toto pozorování naznačuje existenci prahové hodnoty v procesu senescence, za níž již není možný návrat do metabolicky aktivního stavu. Zdá se, že listy podléhají dvěma vzájemně se lišícím scénářům v průběhu zotavení - obnovení fotosyntetické a metabolické aktivity nebo zánik, v závislosti na stupni senescence v jednotlivých listech.



Obr. 7. Aktivita promotoru *SAG12* v jednotlivých listech transgenních rostlin tabáku *SAG12:ZOG1*.

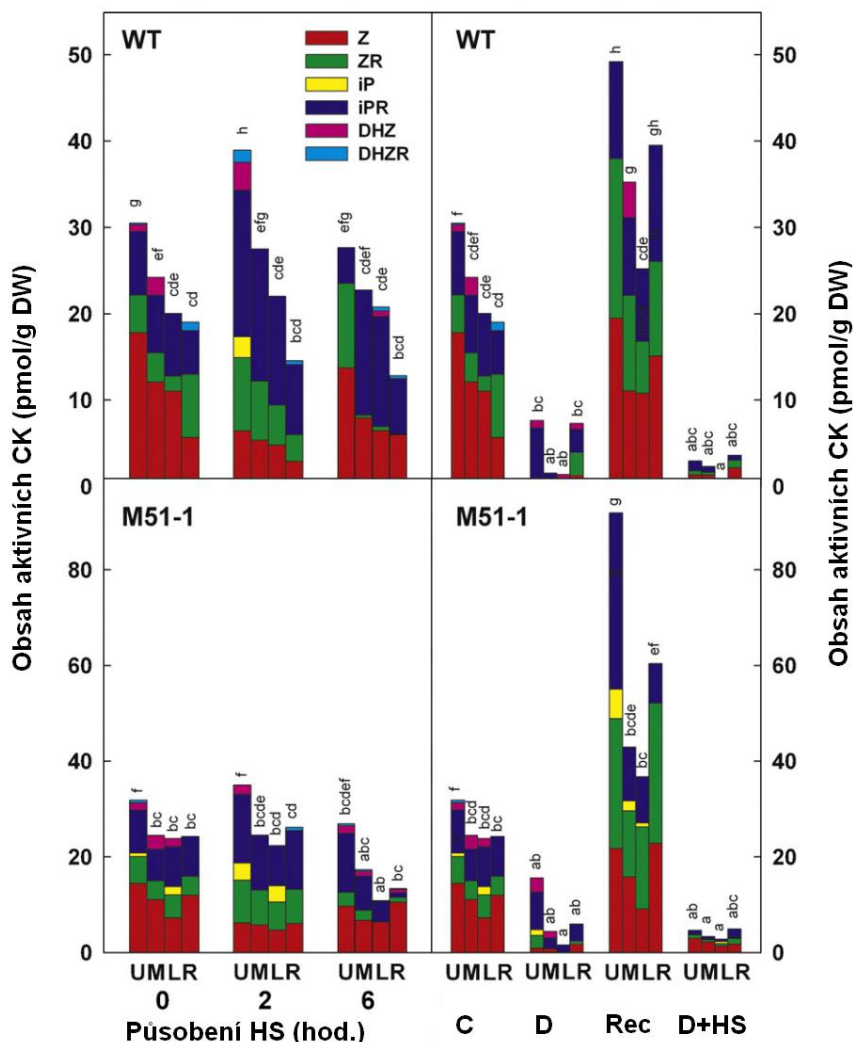
Mladé a střední listy, chráněné během sucha, výrazně zvýšily rychlost fotosyntézy (Martin a kol. 1999, Chaves 1991), která přispívá k obnovení růstu rostliny. Přesto nejstarší listy v pokročilém stupni senescence, nejsou schopny regenerace. Proto se listová plocha dále zmenší během zotavení ze stresu, ale přeživší listy vykazují vyšší metabolickou aktivitu než kontrolní, které nebyly vystaveny stresu (Pereira a Chaves 1993, Shinozaki a Yamaguchi-Shinozaki 1996, Oono a kol. 2003).

Naše výsledky dokumentují, že zotavení po stresu je velmi komplexní proces zahrnující přenastavení mnoha metabolických drah, ne pouze návrat do stavu před stresem (Díaz a kol. 2010, Oono a kol. 2003).

4. 3. Odezva rostlin se zvýšenou hladinou prolinu na teplotní stres

Vystavení rostlin zvýšené teplotě (40 °C) představuje náhlý, akutní stres. Jednou z prvních součástí odezvy na teplotní stres je přechodné zvýšení hladiny aktivních CK a změna zastoupení

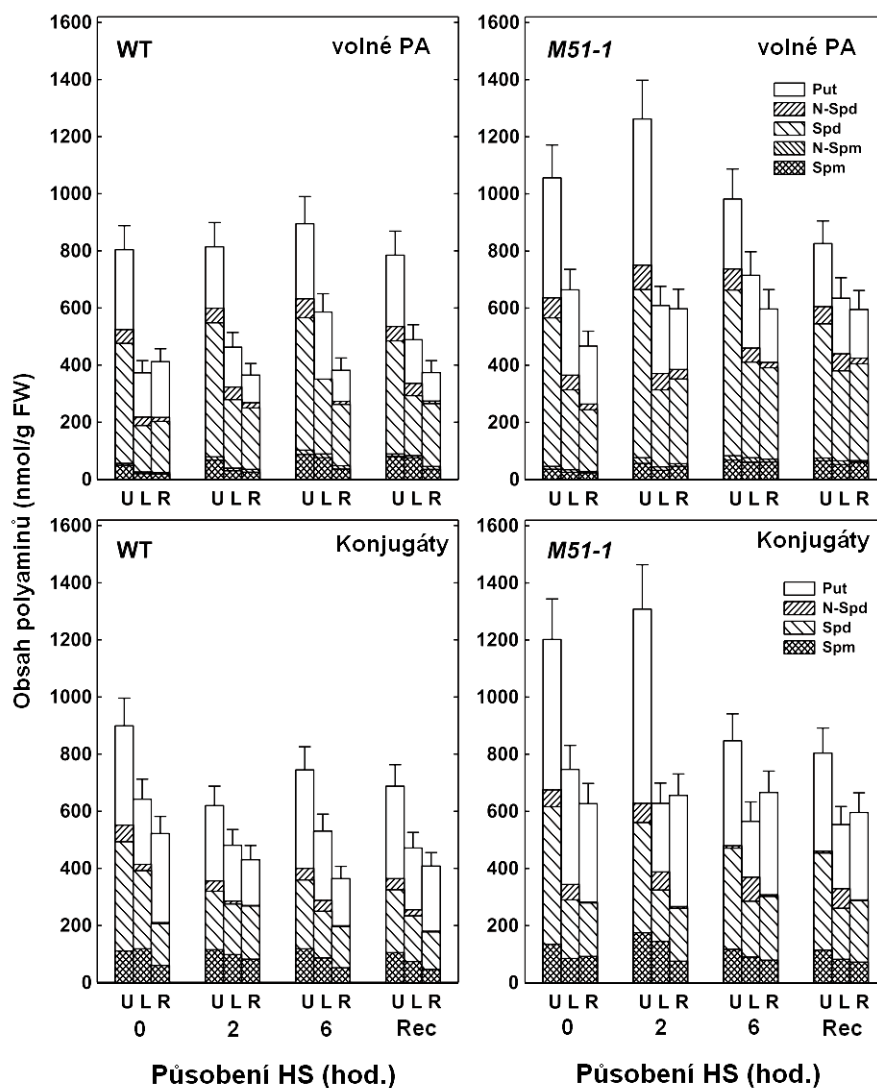
jednotlivých CK derivátů (Obr. 8). Navýšení obsahu iP ribosidu (iPR) a současné snížení hladiny *tZ*, fyziologicky neaktivnějšího CK stimulujícího buněčné dělení, naznačuje, že dělení buněk je ve stresu potlačeno, ale ostatní funkce CK jsou zachovány. Jednou z nich může být pozitivní vliv na otvírání průduchů, což je nezbytná podmínka zvýšené transpirace. Vzhledem k tomu, že ABA stimuluje zavírání průduchů a zabraňuje jejich otevírání, přechodný pokles hladiny ABA (výraznější v transgenech se zvýšenou hladinou prolinu) ukazuje na zapojení obou hormonů do regulace transpirace, mechanismu zajišťujícího ochlazení povrchu listu. Stimulace transpirace zvýšenou teplotou byla poměrně nedávno popsána Zhangem a kol. (2008). O CK je dále známo, že stimulují aktivitu invertasy (Roitsch a Ehneß 2000), která štěpí sacharosu na glukosu a fruktosu. Proto zvýšený obsah CK může přispívat i k osmotické stabilizaci rostlin. Mimoto zvýšení CK během časné fáze odezvy na stres oddálí snížení fotosyntézy, což může pozitivně přispět k aktivaci obranných reakcí náročných na energii.



Obr. 8. Hladiny aktivních cytokininů (CK) (*trans*-zeatin, Z; N⁶-(2-isopentenyl)adenin, iP; dihydrozeatin, DHZ a jejich ribosidy ZR, iPR, DHZR) v listech a kořenech rostlin tabáku výchozího genotypu (WT) a transformantu M51-1. V levé části obrázku: rostliny vystavené zvýšené teplotě (40 °C po dobu 0, 2 a 6 h). V pravé části obrázku: rostliny vystavené suchu; kontroly (C), sucho (D; 10-d bez závlivky), zotavení (Rec; 24-h po zalití) a kombinace sucha a zvýšené teploty (D+HS). U: horní listy, M: střední listy, L: spodní listy, R: kořeny; DW: sušina.

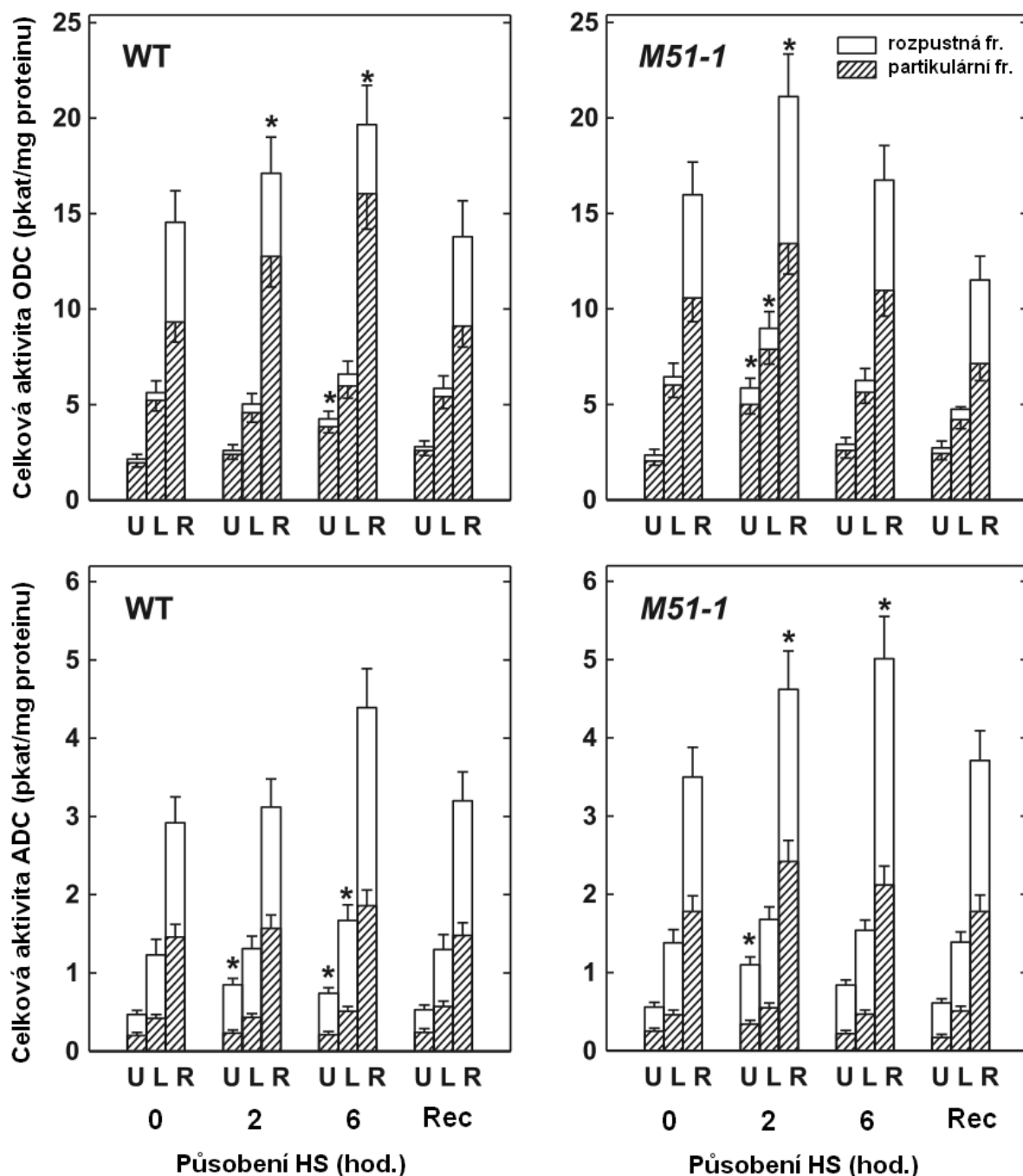
Mnohé studie z nedávné doby ukazují, že PA přispívají k odolnosti vůči abiotickým stresům (Liu a kol. 2007). Transformanty se zvýšeným obsahem prolinu mají, ve srovnání s WT, vyšší množství volných i konjugovaných PA (Obr. 9) za kontrolních podmínek a reagují mnohem rychleji na stres, což ukazují změny v množství i zastoupení jednotlivých PA v rostlině. Jedním z možných vysvětlení pro současné zvýšení hladiny prolinu i PA může být, že akumulace prolinu za nepřítomnosti stresu může fungovat jako signál schopný aktivovat různé procesy, které jsou součástí obraných reakcí (mj. také zvýšenou tvorbu PA).

Zdá se, že mírný pokles hladiny prolinu v listech transformantu v počáteční fázi teplotního stresu může být způsoben degradací prolinu na glutamát (Kaplan a kol. 2007), který může sloužit jako substrát pro biosyntézu PA (Nanjo a kol. 2003). Tento předpoklad je podporován zjištěním, že zvýšení aktivity enzymů zapojených do biosyntézy PA (ODC, ADC a SAMDC) v počáteční fázi teplotního stresu v transformantech je v souladu s poklesem hladiny prolinu (Obr. 10).



Obr. 9. Hladiny volných a konjugovaných polyaminů v listech a kořenech rostlin tabáku výchozího genotypu (WT) a transformantu *M51-1*, vystavených zvýšené teplotě (40 °C po dobu 0, 2 a 6 h) a během zotavení (Rec; 2 h při 25°C). U: horní listy, L: spodní listy, R: kořeny; FW: čerstvá hmota, HS: teplotní stres.

Nárůst aktivity biosyntetických enzymů ADC a ODC stimulovaný působením zvýšené teploty v obou genotypech, se dříve a výrazněji projevuje v transformantu (Obr. 10). Zvýšená teplota také zvyšuje aktivitu katabolických enzymů DAO a PAO ve všech studovaných rostlinách. V kontrolních i stresových podmínkách byly aktivity těchto enzymů významně vyšší v kořenech. Obdobné výsledky byly získány v kořenech pšenice vystavené vysoké teplotě, kde pokles aktivity katalasy a askorbát peroxidasy vedl ke zvýšení hladin DAO a PAO (Goyal a Asthir 2010).



Obr. 10. Aktivity biosyntetických enzymů polyaminů arginin dekarboxylasy (ADC) a ornithin dekarboxylasy (ODC) v listech a kořenech rostlin tabáku výchozího genotypu (WT) a transformantu *M51-1*, vystavených zvýšené teplotě (40 °C po dobu 0, 2 a 6 h) a během zotavení (Rec; 2 h při 25°C). U: horní listy, L: spodní listy, R: kořeny; FW: čerstvá hmota, HS: teplotní stres, fr.: frakce.

Rychlost peroxidace lipidů (ilustrovaná změnami hladiny MDA) může být vztažena k antioxidační aktivitě. V listech obou testovaných genotypů se obsah MDA výrazně neměnil v průběhu teplotního stresu, s výjimkou spodních listů rostlin WT, kde byl pozorován mírný nárůst. Naopak v kořenech rostla hladina MDA v průběhu expozice zvýšené teplotě kontinuálně. Tyto výsledky naznačují, že v horních listech působí účinný obranný antioxidační mechanismus, který je chrání před oxidativním stresem.

Naše výsledky dále potvrzují, že zvýšená hladina prolinu v transformantech má mírný, ale zřetelně pozitivní vliv na jejich odolnost vůči abiotickému stresu.

4. 4. Hormonální odezva na zvýšenou teplotu, sucho a jejich kombinaci v rostlinách se zvýšenou hladinou prolinu

Vystavení zvýšené teplotě po dlouhotrvajícím suchu způsobilo odlišnou reakci než aplikace stresů jednotlivě. Krátkodobý teplotní stres (2 h) na konci stresu suchem vyústil v pokles hladiny prolinu (Obr. 1) a také hladin ABA v horních listech WT a v horních a středních listech transformantu. Hladiny aktivních CK v horních listech se snížily, což vedlo ke zrušení gradientu CK (Obr. 8). Kombinovaný stres neovlivnil již nízké hladiny aktivních CK ve zvadlých středních a spodních listech, ale hladiny v horních listech a kořenech poklesly. Tyto změny dobře odpovídaly vysoké stimulaci aktivit CKX v horních listech a kořenech. Tato data ukazují na velmi silný stres. Naše výsledky jsou v souladu s Brugière a kol. (2003), který publikoval silné zvýšení *CKXI* transkriptu v zrnech kukuřice vystavené nedostatku vody nebo zvýšené teplotě.

I když samotný teplotní stres neměl výrazný vliv na hladinu IAA v horních listech a způsobil pouze přechodný nárůst v dolních listech a kořenech, zatímco sucho vedlo k výraznému poklesu obsahu IAA v horních listech a akumulaci IAA ve spodních a středních listech a kořenech, kombinace stresů vedla k dalšímu zvýšení IAA v rostlinách WT, ale ne v odolnějším transformantu. Zvýšení hladiny auxinu pravděpodobně přispívá k transportu živin z listů, před jejich odpadnutím. Bartel a Fink (1994) v případě biotického stresu pozorovali zvýšení biosyntézy auxinu. Zdá se tedy, že zvýšení hladiny IAA za stresových podmínek je obecným jevem.

Naše výsledky ukazují, že cytokininy spolu s auxinem, a stresovým hormonem ABA, dynamicky regulují fyziologické procesy, které jsou součástí odezvy rostlin na abiotický stres. Zvýšená hladina prolinu má mírný, ale zřetelně pozitivní vliv na odolnost vůči abiotickému stresu. Ve srovnání s výchozím genotypem, rostliny tabáku se zvýšenou hladinou prolinu vykazují rychlejší stimulaci obranných mechanismů a oddálení stresem vyvolaného poklesu hladiny CK.

5. Závěry

- Rostlinné hormony cytokininy (CK) spolu s dalším hormonem stimulujícím růst, auxinem, a stresovým hormonem ABA, dynamicky regulují fyziologické procesy, které jsou součástí odezvy rostlin na abiotický stres.
- Zvýšená hladina prolinu má mírný, ale zřetelně pozitivní vliv na odolnost vůči abiotickému stresu. Ve srovnání s výchozím genotypem, rostliny tabáku se zvýšenou hladinou prolinu vykazují rychlejší stimulaci obranných mechanismů a oddálení stresem vyvolaného poklesu hladiny CK. Tyto rostliny (spolu s výchozím genotypem) představují dobře využitelný model pro srovnávání hormonálních odpovědí v rostlinách lišících se v odolnosti vůči stresu.
- Sucho koreluje se značným zvýšením obsahu prolinu, které je spojeno stimulací exprese genu pro biosyntetický enzym P5CS A (ale nikoliv P5CS B) a potlačením exprese genů kódujících degradační enzymy NtPDH2 a CIG1 (identifikován jako gen indukovaný CK), s odlišnými expresními profily v listech a kořenech rostlin tabáku.
- Expresní profily *SAG12::ZOG1* ukazují, že aktivita promotoru *SAG12* je při stresu suchem výrazně stimulována, zejména v dolních (nejstarších) listech tabáku, zatímco po rehydrataci dochází k jejímu úplnému potlačení.
- Podrobné studium metabolismu CK v průběhu sucha ukazuje, že CK významně přispívají k přednostní ochraně vzrostného vrcholu a nejmladších listů, díky vytvoření gradientu aktivních CK ve prospěch mladých listů, který významně zvyšuje sílu jejich sinku a je udržován v průběhu stresu zvyšováním aktivity CKX ve spodních listech a jejím snížením v horních listech.
- Akumulace CK, ABA a auxinu v kořenech rostlin vystavených suchu významně mění morfologii kořene (podporuje růst primárních kořenů a zabraňuje zakládání laterálních kořenů).
- Rovnoměrné zvýšení hladiny CK, již před vystavením rostliny stresu, může mít negativní dopad na rostlinu, obzvláště v případě dlouhodobého sucha. Naopak, cílené zvýšení obsahu CK stimulací exprese genu *ZOG1* ve stárnoucích pletivech, má pozitivní vliv na oddálení senescence ve spodních listech stresované rostliny a zrychlení jejího zotavení po zalití.
- Zotavení po suchu je velmi komplexní proces zahrnující přenastavení mnoha metabolických drah, ne pouze návrat do stavu před zahájením stresu. Ačkoli některé své části rostlina zmladí (dochází k úplnému vypnutí aktivity promotoru *SAG12*), jiné jsou obětovány, v závislosti na stupni jejich senescence.
- Analýza hladin prolinu a transkripčních profilů genů spojených s jeho metabolismem ukázala,

že minimálně 24 hodin po rehydrataci zůstává v listech obsah prolinu zvýšen, dochází pouze k částečnému snížení exprese genu *P5CS A* a geny *PDH* jsou stále vypnuté. Současně expresní profily dvou různých genů (*NtERD10B* a *CSP41*) prokázaly, že listy tabáku vnímají opětovné zalití rychle a účinně. Zvýšená hladina prolinu tedy není způsobena opožděnou reakcí rostlin na zalití, ale zachováním aktivity ochranných mechanismů, což umožní jejich rychlejší stimulaci v případě následných stresů.

- Přechodné zvýšení hladiny CK a přechodné snížení obsahu ABA, spolu s poklesem vodního potenciálu v listech vystavených zvýšené teplotě, ukazují, že stimulace transpirace v počáteční fázi teplotního stresu představuje zásadní mechanismus oddalující zvýšení teploty listů, než mohou být aktivovány další obranné mechanismy.
- Spermidin a spermin mají důležitou úlohu v reakci rostliny vůči zvýšené teplotě. Významný nárůst volného a konjugovaného putrescinu v nejmladších listech transgenních rostlin se zvýšenou hladinou prolinu, pozorovaný v počáteční fázi odpovědi rostliny na zvýšenou teplotu, pravděpodobně přispívá k jejich vyšší odolnosti vůči stresu. Nárůst hladiny putrescinu může být způsoben jeho *de novo* syntézou, ale také odbouráváním prolinu, který může být dalším zdrojem prekurzorů pro syntézu polyaminů.
- Vysoká hladina prolinu a polyaminů, stejně jako změny v jejich metabolismu potvrzují přednostní ochranu nejmladších listů v rostlinách vystavených stresu, což je v souladu s téměř neměnnou hladinou malondialdehydu v těchto listech, která odráží vysokou účinnost obranných mechanismů a vysoký stupeň ochrany mladých pletiv.

Abbreviations

ABA	abscisic acid
Act9	actin
ADC	arginine decarboxylase
Asp	aspartic acid
cDNA	complementary DNA
<i>CIG1</i>	cytokinin-induced gene
CK	cytokinin
CKX	cytokinin dehydrogenase
CSP41	endoribonuclease involved in chloroplast mRNA turnover
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
DAO	diamine oxidase
DHZ	dihydrozeatin
DNA	deoxyribonucleic acid
GC	gas chromatography
His	histidine
HPLC	high performance liquid chromatography
IAA	indol-3-acetic acid
IPT	isopentenyl transferase
iP	N ⁶ -(2-isopentenyl)-adenine
iPR	iP riboside
LEA	late embryogenesis abundant
MDA	malondialdehyde
MS	mass spectrometry
mRNA	messenger ribonucleic acid
<i>NtERD10B</i>	gene coding for dehydrin
<i>NtPDH</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> proline dehydrogenase
ODC	ornithine decarboxylase
PA	polyamine
PAO	polyamine oxidase
P5CS	pyrroline-5-carboxylate synthetase
PDH	proline dehydrogenase
Put	putrescine
RH	relative humidity
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
rRNA	ribosomal RNA
RT	reverse transcription
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
RWC	relative water content
<i>SAG</i>	senescence-associated gene
SAMDC	S-adenosylmethionine decarboxylase
Spm	spermine
Spd	spermidine
TBA	thiobarbituric acid
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
WT	wild-type
ZOG1	<i>trans</i> -zeatin O-glucosyltransferase

1. Introduction

Plant hormones (phytohormones) have crucial role in the regulation of plant growth, development as well as stress responses. Cytokinins (CKs), one of the most important groups of phytohormones, were defined as substances which stimulate (in the presence of auxin) cell division (“cytokinesis”). Naturally occurring CKs are N⁶-substituted adenine derivatives carrying either isoprenoid, or aromatic side chain (Strnad 1997, Mok and Mok 2001). Isoprenoid CKs can be distinguished as isopentenyladenine (iP)-, *trans*-zeatin (*tZ*)-, *cis*-zeatin (*cZ*)- or dihydrozeatin (DHZ)-type derivatives. Aromatic CKs are found in plants much less frequently (Strnad *et al.* 1997, Sakakibara 2006). The abundance of particular CK derivatives depends on plant species, tissue and developmental stage. CKs can occur in plants in the form of free bases, ribosides, ribotides or N- and O-glycosides. Physiologically active CK forms, recognized by CK receptors, are free CK bases, especially *tZ*, and in lesser extent also CK ribosides (Inoue *et al.* 2001, Yamada *et al.* 2001, Spichal *et al.* 2004). The rate-limiting step of isoprenoid CK biosynthesis is catalyzed by isopentenyltransferases (IPTs). CK breakdown is catalyzed by CK dehydrogenases (CKXs). CK perception and signalling is mediated by a multistep two-component His-Asp phosphorelay pathway, which includes hybrid sensor histidine kinases as well as histidine phosphotransfer proteins and response regulators (Ferreira and Kieber 2005, Schaller *et al.* 2002). CKs are involved in regulation of multiple processes, such as cell cycle progression, morphogenesis, shoot initiation, shoot apical meristem formation, floral and seed development, delay of senescence, movement of nutrients (CKs increase sink strength), modulation of apical dominance by promotion of lateral bud growth, light responses, including chloroplast development, or vasculature formation. In spite of not belonging to “stress hormones,” CKs play an important role in the stress responses. Application of exogenous CKs was proved to enhance tolerance to mild stress and accelerate recovery (Itai *et al.* 1978), stimulate recovery of stomatal conductance and net photosynthesis after rehydration (Rulcova and Pospisilova 2001). Furthermore, CKs could up-regulate transcription of many stress-induced genes (Hare and Van Staden 1997).

Abscisic acid (ABA) is the major hormone in plant response to dehydration, caused by the abiotic stresses as well as during specific developmental stages, namely during seed maturation. ABA is involved in both fast responses, such as stomata closure, and longer-term effects on the expression of many stress-associated genes. ABA signal transduction starts with binding of ABA to its receptors. The ABA signaling network includes several second messengers. ABA signal transduction results in stimulation of transcription of the stress-inducible genes, such as genes coding for LEA proteins, proteases, chaperonins, ion and water channels, antioxidant enzymes and enzymes participating in metabolism of compatible solutes (Finkelstein 2006). Furthermore, ABA influences degradation of specific mRNAs, mRNA stability, splicing and transport (Hirayama and Shinozaki 2007).

More than half century ago, Kemble and MacPherson (1954) showed that proline accumulates

in wilting perennial rye grass. Since then, many studies have proved that proline content increases in response to adverse environmental conditions. Due to its cyclic structure with a secondary amino group, proline is a unique proteinogenic amino acid, essential for arrangement of secondary structure of proteins. Proline as a free amino acid plays also other crucial roles. It has been shown to act as a compatible osmolyte, a stabilizer of protein, membrane and subcellular structures, an inhibitor of lipid peroxidation, and a scavenger of ROS. In addition to its direct ROS scavenging activity, proline has been reported to protect and stabilize antioxidant enzymes and activate alternative detoxification pathways in stressed tobacco cells. Furthermore, proline is involved in the maintenance of cytosolic pH as well as the redox balance. Last but not least, proline appears to be a component of metabolic signalling networks controlling mitochondrial functions, stress relief and development (reviewed in Verbruggen and Hermans 2008, Szabados and Savoure 2010). The content of free proline is controlled by the ratio of the rates of its biosynthesis and back-conversion, which can be regulated at the level of both gene expression as well as enzyme activity. Biosynthetic enzyme pyrroline 5-carboxylate synthetase (P5CS) and degrading enzyme proline dehydrogenase (PDH) represent the most important regulatory points. Over-expression of the *P5CS* gene is commonly used to enhance proline content. Due to feed-back inhibition of native P5CS by the end-product, genes with site-directed mutagenesis (Zhang *et al.* 1995) are usually preferred for transformation. Using this construct, tobacco plants with significantly increased proline levels were recently prepared (Gubis *et al.* 2007).

Polyamines (PAs) are widespread low molecular weight polycations containing several aminogroups in their molecules. They belong to important regulators of growth and development in prokaryotes and eukaryotes (Tiburcio *et al.* 1997). In plants, PAs may be found as free bases as well as conjugated. The most prevalent PAs occurring in higher plants are diamine putrescine (Put), triamine spermidine (Spd) and tetramine spermine (Spm). The PA biosynthesis is initiated by the formation of Put either directly from ornithine by ornithine decarboxylase (ODC) or indirectly from arginine by arginine decarboxylase (ADC). Put can be then converted to Spd and Spm by sequential addition of aminopropyl groups. PA degradation is performed by diamine oxidase (DAO) and polyamine oxidase (PAO). Oxidation of PAs produces H₂O₂, which possibly plays an important role in defence and signalling. However, high content of H₂O₂ is cytotoxic and may cause oxidative stress (reviewed in Wallace *et al.* 2003). Plant PAs appear to be involved in a wide range of biological processes. PAs contribute to plant protection under adverse environmental conditions, due to their roles in osmotic adjustment, maintenance of membrane stability and free-radical scavenging (Bouchereau *et al.* 1999). PA signalling seems to participate in a complex hormonal cross-talk (Alcázar *et al.* 2010). Recently, Alcázar *et al.* (2011) proposed that stimulation of PA production is one of the responses to abiotic stress.

The understanding of the mechanisms of plant responses to individual stresses as well as of their recovery after stress release may contribute to the establishment of a strategy for improvement of stress tolerance of crop plants in the rapidly changing environment.

2. Aims of the study

Due to their sessile growth habit, plants had to evolve a complex system of defence against adverse environmental conditions, to which they are exposed during their growth and development. Plant abiotic stress responses are regulated by plant hormones, especially cytokinins and abscisic acid. In order to find relationship between hormonal changes and plant stress tolerance, response of tobacco plants with enhanced level of osmolyte proline was compared with the corresponding wild-type.

Therefore, the work has been focused on:

- evaluation whether elevated proline content may affect (and to what extent) tolerance and hormonal responses to abiotic stresses (drought, heat and combined drought and heat stress).
- estimation of the impact of proline levels on the dynamics of PA levels under heat stress conditions.
- elucidation of the dynamics of the transcription profiles of the key genes responsible for proline biosynthesis (P5CS) and degradation (PDH) along the plant axis and in roots in response to plant water deficit in tobacco.
- contribution to the understanding of CK function during the drought stress and their cross-talk with other hormones - auxin and ABA, comparing the response of tobacco plants with a uniform elevation of CK content before stress initiation (*35S::ZOG1*), those exhibiting CK elevation localized to senescing tissues (*SAG12::ZOG1*) as well as corresponding wild-type.
- evaluation the expression of stress related genes using *SAG12:ZOG1* transgenic tobacco plants under drought stress and subsequent recovery.

3. Material and methods

Plant material

- 1) Wild-type tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. M51) and transgenic *35S:P5CSF129A* plants (*M51-1*) (for characterization see Gubis *et al.* 2007).
- 2) Plants of *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 (prof. Machteld and David Mok, Oregon State University).
- 3) Transgenic tobacco plants harbouring *trans*-zeatin O-glucosyltransferase gene from *P. lunatus* under senescence-specific *SAG12* promoter (*SAG12::ZOG1*) and under a constitutive CaMV 35S promoter (*35S::ZOG1*) (prof. Machteld and David Mok, Oregon State University, for detailed information see Martin *et al.* 2001).

Methods

3. 1. Growth conditions, stress application and sample collection

3. 1. 1. Growth conditions

Tobacco plants were grown in soil in a growth chamber for 6 weeks on a 16-h photoperiod at $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, at 25/23°C and relative humidity (RH) ca 80%. Water was permanently available to plants.

3. 1. 2. Stress application and sample collection

Drought treatment: plants were transferred into another growth chamber under the same light and temperature regimes, but with RH decreased to 35%. These plants were not watered for several days (1, 6, 10). Then they were re-watered again (“recovery”).

Heat stress treatment: plants were subjected to heat stress (40 °C) for 2 h or 6 h (with no external water source). Then some of them were transferred back to 25 °C and allowed a 2-h recovery.

Drought + heat stress treatment: at the very end of the drought period (10 days), part of the plants was subjected to heat stress at 40 °C for 2 h.

Samples from each leaf along the plant axis were taken for RNA extraction, samples of upper, middle and lower leaves were collected for determination of other parameters. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen. Roots were shaken to remove the soil, washed briefly, dried and frozen in liquid nitrogen.

3. 2. Chromatographic methods

3. 2. 1. Plant hormone determination

Phytohormones were extracted and purified according to Dobrev and Kaminek (2002). For analyses of endogenous CKs, deuterium labelled standards were added. Tritiated internal standards were used for the determination of indol-3-acetic acid (IAA) and ABA.

CKs quantification was performed by HPLC-MS method according to Dobrev *et al.* (2002). Levels of IAA and ABA were determined using two-dimensional HPLC according to Dobrev *et al.* (2005). The method was verified by comparison with GC-MS.

3. 2. 2. Polyamine analysis

Extraction and HPLC analysis of benzoylated polyamines was performed according to Slocum *et al.* (1989).

3. 2. 3. Photosynthetic pigment analysis

Xanthophyll cycle pigments were determined in acetone extracts according to Haisel *et al.* (2008).

3. 3. Determination of enzymes activities

3. 3. 1. Determination of cytokinin dehydrogenase activity

CKX (EC 1.5.99.12) was extracted and partially purified using the method described by Motyka *et al.* (2003). CKX activity was determined by *in vitro* assay based on the conversion of [2-³H]*N*⁶-(2-isopentenyl)adenine to [³H]adenine. Separation of the substrate from the product was achieved by HPLC.

3. 3. 2. Determination of ornithine decarboxylase, arginine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase activity

The activities of ODC (EC 4.1.1.17), ADC (EC 4.1.1.19) and S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC; EC 4.1.1.50) were determined by a radiochemical method according to Tassoni *et al.* (2000). The sample protein contents were measured according to Bradford (1976).

3. 3. 3. Determination of DAO and PAO activity

The activities of DAO (EC 1.4.3.6) and PAO (1.5.3.11) were estimated by a modification of the radiometric method of Paschalidis and Roubelakis-Angelakis (2005).

3. 4. Spectrophotometric methods

3. 4. 1. Determination of free proline levels

The levels of free proline were determined according to Bates *et al.* (1973).

3. 4. 2. Determination of malondialdehyde content

The malondialdehyde (MDA) content was determined using the NWLSS-Malondialdehyde Assay kit. The assay is based on the reaction of MDA with thiobarbituric acid (TBA), which forms an MDA–TBA₂ adduct that absorbs strongly at 532 nm. The correction for non-specific turbidity described by Esteban *et al.* (2008) was used.

3. 5. Molecular methods

3. 5. 1. RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted by means of the RNeasy Plant Kit (Qiagen) and treated with DNase I (DNA-free; Ambion). For RT, oligo dT or random hexamers were used as primers, together with Protector RNase Inhibitor (Roche) and Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche).

3. 5. 2. Quantitative RT PCR

Quantitative RT PCR was performed using FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I Kit and/or LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) with the HPLC purified primers (Metabion). Transcript levels were normalized against *Act9* (Volkov *et al.* 2003) and 18S rRNA (in case of random primed cDNA). The invariant levels of *Act9* transcript under stress conditions were confirmed by direct quantification of cDNA, as described by Libus and Storchova (2006).

3. 6. Determination of water potential, osmotic potential and relative water content

Leaf water potential was determined using the procedure described by Boyer (1995). Osmotic potential was determined psychrometrically from the leaf sap. Relative water content (RWC) was calculated as follows: $RWC (\%) = [(FM - DM) / (SM - DM)] \times 100$

FM: fresh mass; SM: saturated mass; DM: dry mass.

4. Results and discussion

The predominant abiotic stress factors are drought and heat stress. While the impact of these stresses on plants has been studied extensively, relatively little attention has been given to the effects of their combination, which occurs frequently in nature and substantially differs from responses to individual stresses (Rizhsky *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2008). In order to evaluate impact of heat and drought stress alone and their combination on the CK, IAA and ABA pools, we used tobacco lines differing in their proline content, wild-type (WT) tobacco plants *Nicotiana tabacum* L. cv. M51 and transgenic *35S:P5CSF129A* plants (*M51-1*).

Significantly enhanced proline production in the transformant (Fig. 1) coincided with a more negative leaf osmotic potential (both at control and stress conditions) and enhanced production of protective xanthophyll cycle pigments in comparison with the corresponding WT plants. These results indicated enhanced stress tolerance of proline-overproducing transformant plants. As proline seems to be of high importance, especially in response to dehydration, we determined expression profiles of genes encoding proline degrading enzymes (proline dehydrogenases, PDH), and biosynthetic enzymes, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetases (P5CS) in roots and individual leaves.

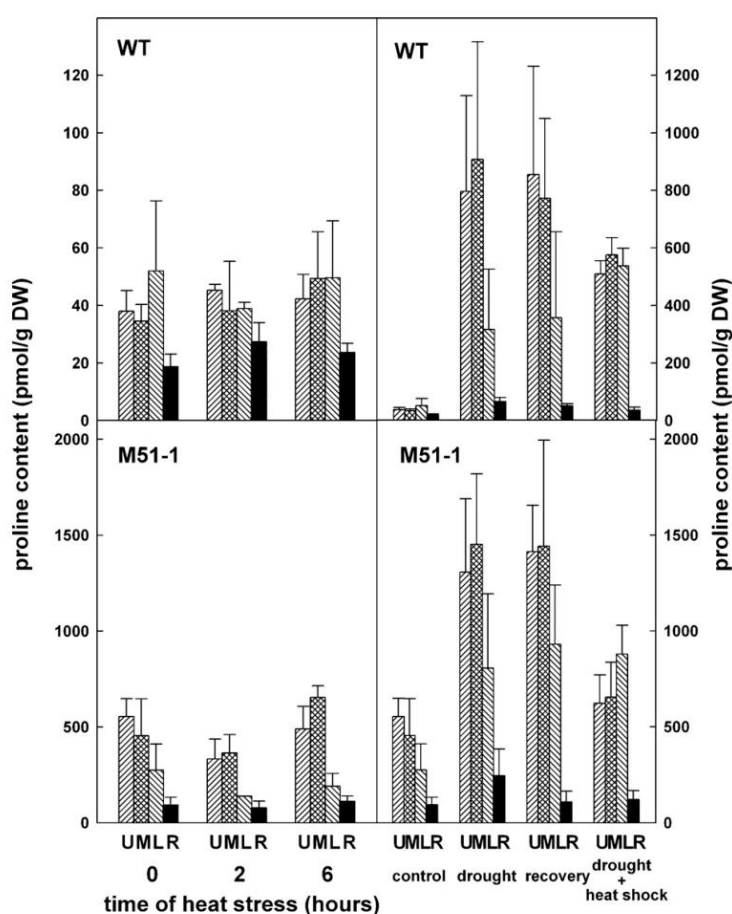


Fig. 1. Proline content in leaves and roots of tobacco wild type (WT) plants and *M51-1* transformants. Left-hand figures: plants subjected to heat stress conditions (40 °C for 0, 2 and 6 h). Right-hand figures: plants subjected to drought stress; controls (no stress), drought stress (10-d dehydration), recovery (24-h rehydration) and combined drought and heat stress. U: upper leaves, M: middle leaves, L: lower leaves, R: roots.

In the other part we focus on drought stress and subsequent re-watering in more details. We employed tobacco plants with a uniform elevation of CK content before stress initiation (*35S::ZOG1*), those exhibiting CK elevation localized to senescing tissues (*SAG12::ZOG1*) as well as corresponding wild-type *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38.

4. 1. Plant responses to drought

Drought stress coincided with a vast decrease of leaf water potential and RWC in all studied genotypes. The decrease was considerably smaller in upper leaves. Prolonged exposure to water deficit was associated with a large increase in proline (Fig. 1) as well as a ABA content, especially in upper leaves. *35S::ZOG1* plants did not exhibit any significant response to mild stress. Thus, elevated CK content before stress initiation might postpone stimulation of the defence to adverse environmental conditions, which might be detrimental under prolonged drought. In all the tested genotypes we found that drought induced gradient in bioactive CKs was promoted by decreased CKX activity in upper leaves and its strong stimulation in the lower ones. The formation of a gradient of bioactive CKs in favour of the upper leaves (Fig. 2) might reflect the necessity for their preferential protection under unfavourable environmental conditions. The content of bioactive CKs was in lower leaves of *SAG::ZOG1* transformants less suppressed by the drought than in WT, which diminished negative stress effects.

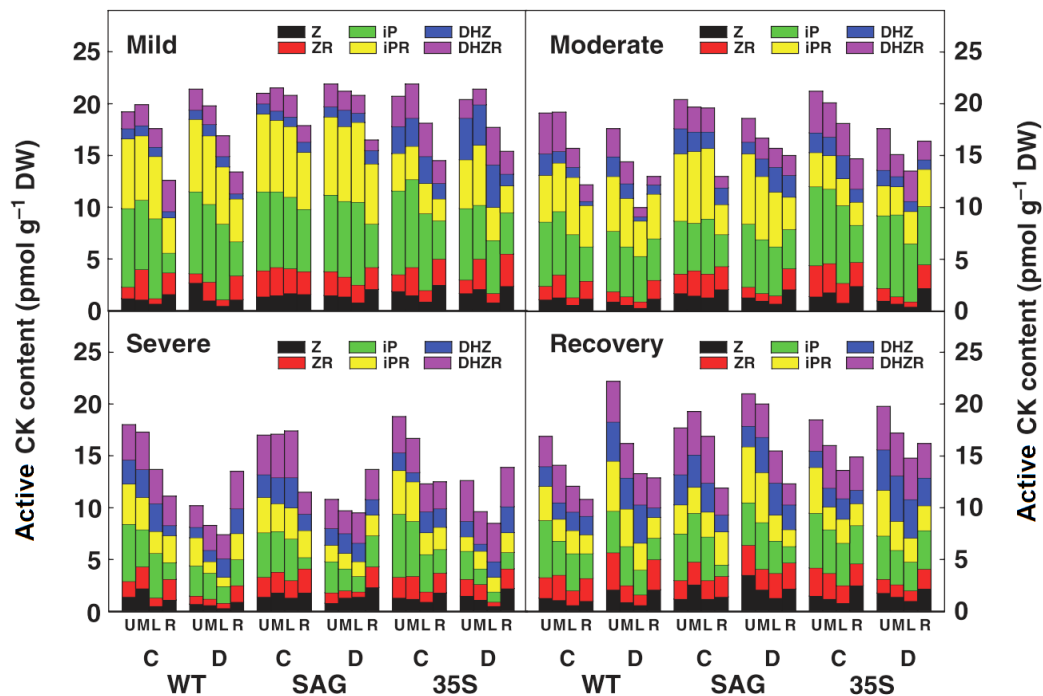


Fig. 2. Endogenous bioactive cytokinin (CK) levels (*trans*-zeatin, Z; N^6 -(2-isopentenyl)adenine, iP; dihydrozeatin, DHZ and the corresponding ribosides ZR, iPR, DHZR) in tobacco leaves and roots during the drought stress progression in wild-type (WT), *SAG12::ZOG1* (SAG) and *35S::ZOG1* (35S) plants.

Large up-regulation of IAA level was observed in the stressed lower leaves in all genotypes.

Similarly, Quirino *et al.* (1999) reported an increase in the free auxin levels in senescing *Arabidopsis* leaves. As senescence is a strongly regulated process, high IAA levels might be required for its control. Possibly, the increased protein breakdown in senescing leaves results in an enhancement in the content of tryptophan, which may be converted to IAA, in order to facilitate nutrient transport from senescing leaves.

Our observation that constitutive *ZOG1* expression affected the root system morphology (primary root elongation and diminished branching) is in agreement with the concept of root apical dominance described by Aloni *et al.* (2006). During drought progression, roots of all tested genotypes accumulated CKs, which might be important for the stimulation of primary root growth and an increase of the root-to-shoot ratio.

During the prolonged drought stress, the elevation of IAA content was observed in roots, similarly as in maize roots (Ribaut and Pilet 1994, Xin *et al.* 1997), which might be a consequence of auxin polar transport. Enhanced auxin concentration might lead to an additional elevation of CK content, as auxin was found to promote the expression of genes for CK biosynthetic enzymes in roots (Miyawaki *et al.* 2004). An elevated content of both hormones might stimulate root cell division, which resulted in primary root elongation, due to the suppression of lateral root formation by CKs.

Drought response was accompanied by high elevation of proline content. When expression of proline degrading genes was followed, all *PDH* genes were down-regulated rapidly both in leaves and roots within one day of dehydration and maintained low during drought stress progression. The *NtPDH1* gene was least influenced, consistently with the proposed role for this PDH isoform to provide energy and metabolites from proline degradation in both stressed and well watered plants (Ribarits *et al.* 2007). In contrast, the strongest stress response was shown by *NtPDH2* gene, again in agreement with Ribarits *et al.* (2007). *CIG1* (identified as CK induced gene) was also strongly and quickly down-regulated by water deficit, but its mRNA level remained relatively high, which suggested an important role of this gene in the regulation of free proline content in tobacco.

The two putative *P5CS* genes produced similar transcript levels in well-watered plants comparable in all leaves and roots. They differed substantially in their response to drought. Whereas *P5CS B* was not affected by the stress conditions, the dramatic activation of the *P5CS A* gene suggested its crucial role in drought stress responses of tobacco. *P5CS* duplication occurred several times during angiosperms evolution (Turchetto-Zolet *et al.* 2009) and the gene copies acquired different functions. In *Arabidopsis*, *P5CS1*, highly stimulated by water deficit, seemed to be responsible for the drought-induced proline elevation, whereas *P5CS2* appeared to be important in seed development (Szekely *et al.* 2008). Whether the *P5CS B* gene plays any role in seed development in tobacco, similarly to *P5CS2* in *Arabidopsis*, remains to be elucidated.

The expression of proline metabolism-related genes differed between leaves and roots of tobacco exposed to drought stress and subsequent recovery (Fig. 3). In drought-stressed leaves, the *P5CS A* gene was up-regulated to much higher extent than in roots. Also it differed in the particular

leaves. The up-regulation was much higher in the upper leaves than in the lower ones (Fig. 4A). At the same time, transcription of *PDH* genes was almost completely switched off in all organs. The expression pattern of *P5CS A* correlated well with an increase in free proline concentration, which was highest in upper leaves and lowest in roots.

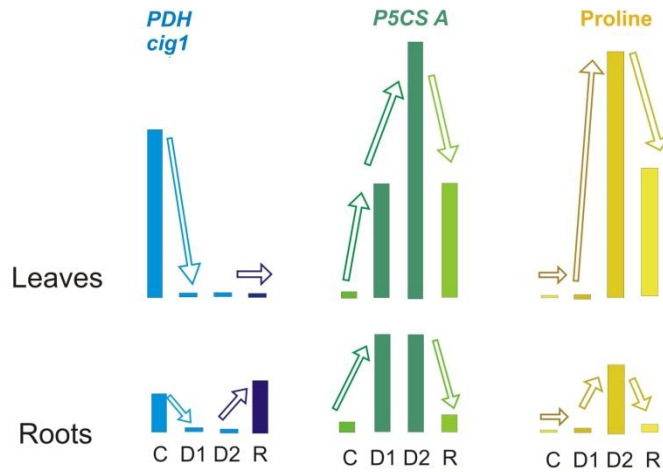


Fig. 3. Dynamics of the expression of genes for proline degradation and biosynthesis in correlation with proline content in tobacco leaves and roots during the drought stress progression and subsequent recovery. C: control, D1: 1-d dehydration, D2: 6-d dehydration, R: 24-h recovery.

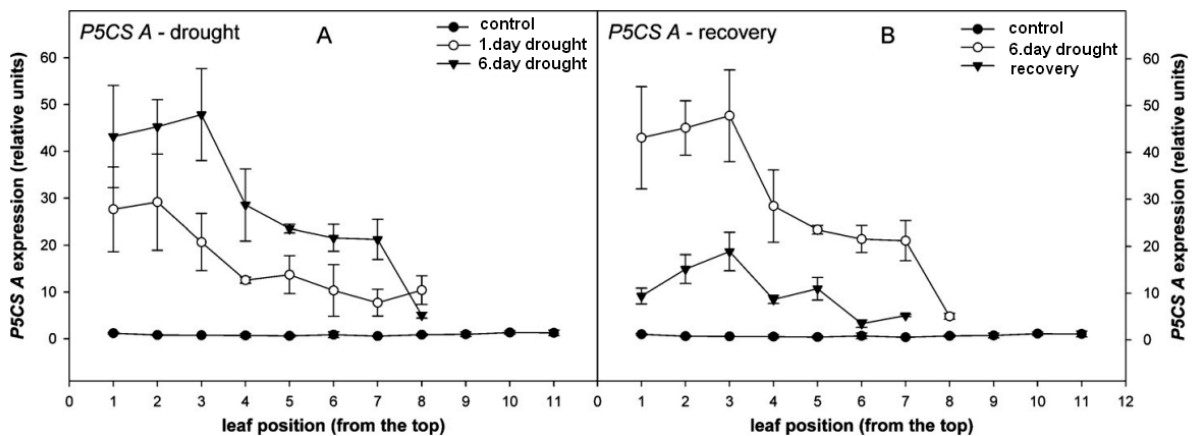


Fig. 4. *P5CS A* expression in the individual leaves of tobacco along the plant axis under drought stress (A) or 24 h after rehydration (B).

As a marker of water deficit sensing, transcription of the gene coding for dehydrin *NtERD10B* proved to be very suitable. The fast increase of dehydrin expression in leaves, regardless of their position and stronger and earlier than in roots, reflected the fact that leaves are exposed to much bigger water loss (via stomata) than roots. Accordingly, the ABA concentration was much lower in roots than in leaves.

4. 2. Recovery from drought stress in tobacco

Rehydration led to an increase in bioactive CK levels (especially of *tZ*/riboside) in tobacco leaves (Fig. 2), which might be, at least partially, due to the re-establishment of xylem sap flow from the roots. Aloni *et al.* (2006) demonstrated the great importance of the transpiration stream on CK

transport from the roots. Consistently, a decrease in the total CK content was observed in the roots in all tested genotypes following watering. Also a rise in CKX activity in the leaves was found, probably to regulate bioactive CK levels after the re-establishment of the transpiration flow. The stress indicators (*SAG* promoter activity as well as ABA level) dropped sharply.

Elevation of IAA concentrations in the middle leaves (and, in *SAG::ZOG1* plants, also in the upper leaves) appears to be related to growth re-establishment. The slightly faster growth initiation in *SAG::ZOG1* plants in comparison with WT is consistent with the known positive effect of CKs on plant recovery (e.g. Itai *et al.* 1978). The slower recovery of *35S::ZOG1* transgenics indicated that elevated CK content before onset of stress need not be advantageous in case of prolonged, severe drought stress, which is in accordance with Synková *et al.* (1999).

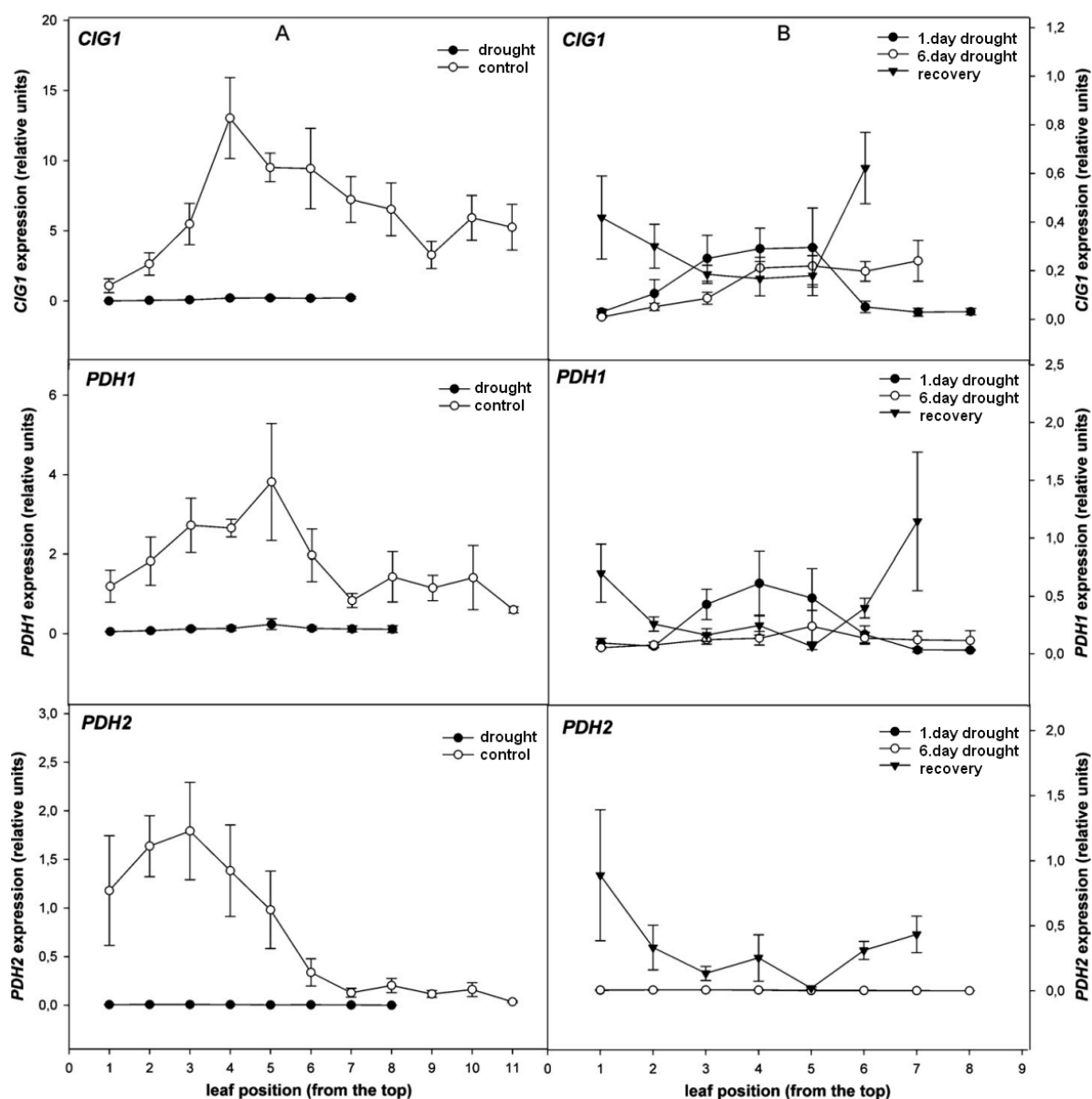


Fig. 5. Transcription levels of three *PDH* genes in the individual leaves of tobacco along the plant axis (a) under strong drought stress (6-d) and well-watered conditions; (b) during the drought stress progression (1-d and 6-d dehydration) and 24-h recovery. (Note expression scale changes).

After re-watering, the transcription of all three *PDH* genes reached the control levels in roots, but not in leaves (Fig. 3 and Fig. 5B). At the same time, down-regulation of *P5CS A* to the level comparable with control plants was found in roots, whereas it remained much higher as compared to control in leaves (Fig. 3 and Fig. 4B). Free proline concentrations coincided with expression pattern of the genes under investigation, remaining elevated in leaves, but returning to almost control levels in roots. As explanation we suggest that the delayed response of tobacco *PDH* and *P5CS A* genes to rehydration may reflect efficient protection of photosynthetic apparatus in leaves. In addition to direct ROS scavenging activity exhibited by proline (Matysik *et al.* 2002), proline biosynthesis in chloroplasts under drought stress is an important factor maintaining redox balance and preventing singlet oxygen production in those organelles (Szekely *et al.* 2008, Chaves *et al.* 2009). Strikingly different results were described in *Arabidopsis* (Kiyosue *et al.* 1996, Oono *et al.* 2003), where immediate response of these genes to stress relief was found. Discrepancy between the results on *Arabidopsis* and our data on tobacco may be explained by different stress tolerance between these two species.

The proline metabolic gene expression was not uniform across the leaves along the plant axis. *P5CS A* expression was higher and *CIG1* expression slightly lower in the two uppermost leaves than in the remaining leaves in stressed plants (Fig. 4A and 5A). This reciprocal regulation of key genes responsible for proline biosynthesis and degradation appears to contribute to relatively high free proline concentration in upper leaves and therefore to their more efficient protection under drought stress.

As dehydrins were reported to change membrane composition and concomitantly the photosynthetic capacity (Beck *et al.* 2007), their high content might be unfavourable under well-watered conditions. Fast down-regulation of *NtERD10B* transcription caused by rehydration demonstrates very fast physiological response to re-watering in tobacco leaves. This view was also supported by the rapid decrease of ABA content in leaves during recovery.

Furthermore, we analyzed the expression of another gene sensitive to re-watering, *CSP41*, an endoribonuclease involved in chloroplast mRNA turnover (Bollenbach *et al.* 2003). *CSP41* was recently found to be essential for transcription in chloroplasts (Bollenbach *et al.* 2009). The transcription of the *CSP41* gene was clearly dependent on the leaf position along the plant axis (Fig. 6A). Declining gradient in gene expression might have reflected a leaf age-dependent decrease in the dynamics of chloroplast metabolism.

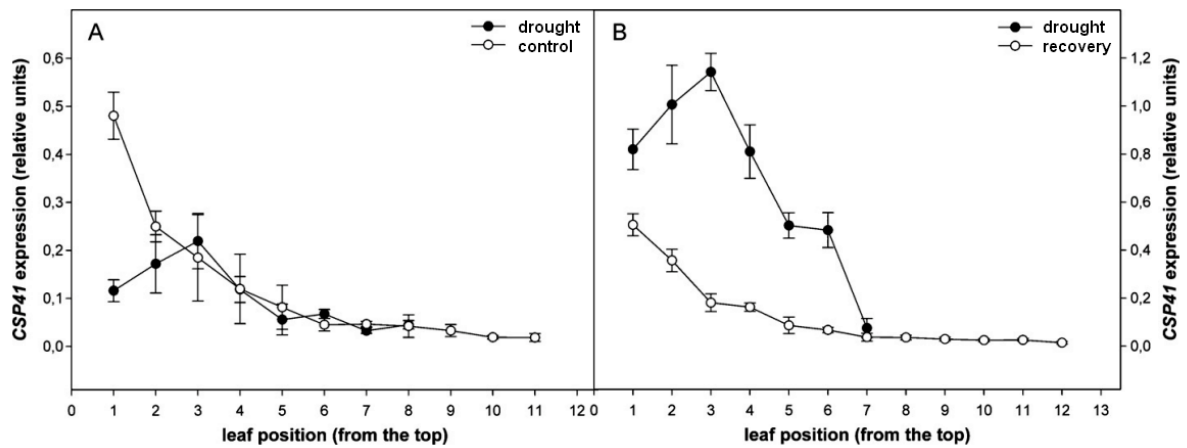


Fig. 6. *CSP41a* expression in the individual leaves of tobacco along the plant axis at well-watered conditions and (A) under strong drought stress (6-d) or (B) 24 h after rehydration.

Whereas *CSP41a* expression was little influenced by drought (Fig. 6A), *CSP41* response to rehydration was much stronger. Within 24 h after re-watering, *CSP41* transcription dramatically increased above the levels found in well-watered control plants. Nevertheless, different transcription profiles were found in rehydrated and control plants (Fig. 6B). This observation suggests that *CSP41* may play an important role in the recovery from drought stress. In *Arabidopsis*, the *CSP41b* gene was found to be repressed by ABA and activated by wounding (Raab *et al.* 2006). The up-regulation of *CSP41* by rehydration could be a similar process to the activation of *CSP41b* by wounding, possibly ensuring an increase of chloroplast mRNA transcription and translation.

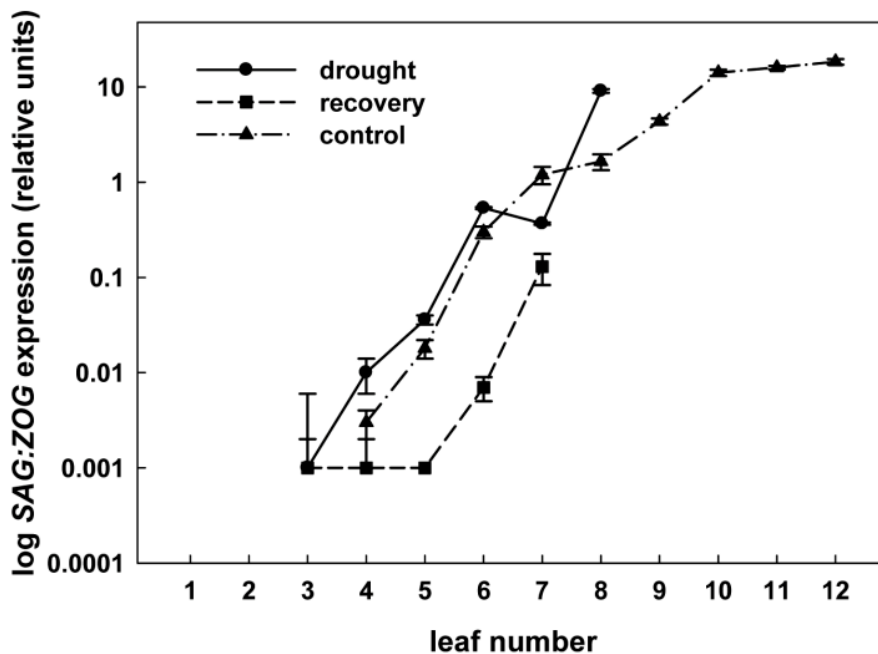


Fig. 7. The activity of *SAG12* promoter in transgenic *SAG12:ZOG1* tobacco leaves along the axis, numbered from the top and expressed in logarithmic scale. Low *ZOG1* expression and thus low activity of a senescence-related *SAG12* promoter was measured in all surviving leaves during recovery.

After re-watering, *SAG12* activity was sharply suppressed under the values of the corresponding well-watered controls, which already exhibited natural senescence (Fig. 7). However, the lower yellow drought-stressed leaves, which exhibited the highest *SAG* activity, died. This indicates existence of a threshold in the process of leaf senescence, beyond which reversal to an active metabolic state is no longer possible. Leaves seem to follow two mutually exclusive scenarios on recovery - restoration of photosynthesis and metabolism or death, depending on the degree of senescence in a particular leaf.

The young and middle leaves, protected during the drought stress, rapidly increase their rate of photosynthesis (Martin *et al.* 1999, Chaves 1991), which promote the re-establishment of plant growth. However, the oldest leaves, in which senescence is most advanced, are lost. Thus, canopy area is further reduced on drought recovery, but surviving leaves show higher metabolic activity than leaves of control plants which were not exposed to the stress (Pereira and Chaves 1993, Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 1996, Oono *et al.* 2003).

Our results document that recovery after stress is a very complex process involving rearrangements of many metabolic pathways, not just a return to the state before stress initiation (Díaz *et al.* 2010, Oono *et al.* 2003). Whereas the plant rejuvenates some parts, others are sacrificed depending on the degree of their senescence.

4. 3. Plant responses to heat in proline over-producing plants

Transfer of plants to an elevated temperature (40 °C) represents a fast, acute stress. The integral part of the heat stress response was a transient elevation of bioactive CKs and change of the ratio of individual bioactive CK species (Fig. 8). The elevation of iP ribiside (iPR) content (higher in WT) and simultaneous down-regulation of *tZ*, the most physiologically active CK in stimulation of cell division, suggests that cell division is suppressed, while other CK functions are maintained. One of them might be positive effects on stomata opening, a necessary prerequisite of enhanced transpiration. As ABA is known to stimulate stomata closure and prevent their opening, a transient decrease in ABA content (more pronounced in proline-overproducing transformant) might implicate involvement of both hormones in regulation of transpiration, important mechanism for cooling of the leaf surface. Stimulation of transpiration by heat stress was recently described by Zhang *et al.* (2008). CKs are also known to stimulate the activity of invertase (Roitsch and Ehneß 2000), which cleaves sucrose into glucose and fructose. Thus, the enhanced CK content might contribute to the osmotic stabilization of plants. In addition, CK elevation during the early phase of the stress response might postpone down-regulation of photosynthesis, which positively affects activation of highly energy-demanding defence pathways.

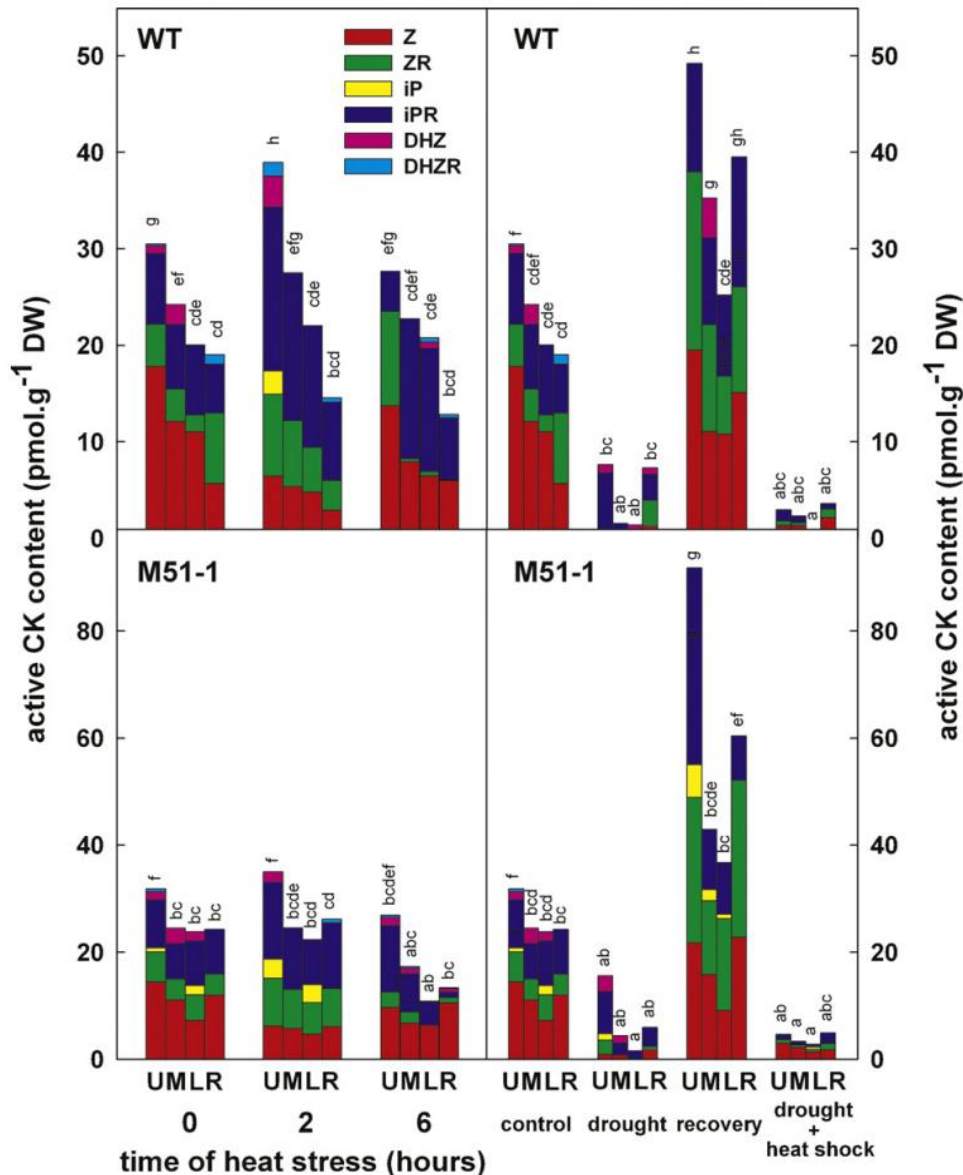


Fig. 8. Endogenous bioactive cytokinin (CK) levels (*trans*-zeatin, Z; N⁶-(2-isopentenyl)adenine, iP; dihydrozeatin, DHZ and the corresponding ribosides ZR, iPR, DHZR) in leaves and roots of tobacco wild type (WT) plants and *M51-1* transformants subjected to heat or drought stresses. Left-hand figures: plants subjected to heat stress conditions (40 °C for 0, 2 and 6 h). Right-hand figures: plants subjected to drought stress; controls (no stress), drought stress (10-d dehydration), recovery (24-h rehydration) and combined drought and heat stress. U: upper leaves, M: middle leaves, L: lower leaves, R: roots.

Recently, many studies have shown that PAs are also involved in the acquisition of tolerance to environmental stresses (Liu *et al.* 2007). As compared to the WT, the proline over-producing transformants contained higher levels of free and conjugated PAs (Fig. 9) under non stress conditions and responded more rapidly to the stress as indicated by the changes in quantity as well as the composition of PA pool. One of the possible explanations for the cause of the parallel increase in proline and PA contents can be that proline accumulation in the absence of any stress might act as a signal able to activate multiple responses that are part of defence (i.e. also enhanced production of PAs).

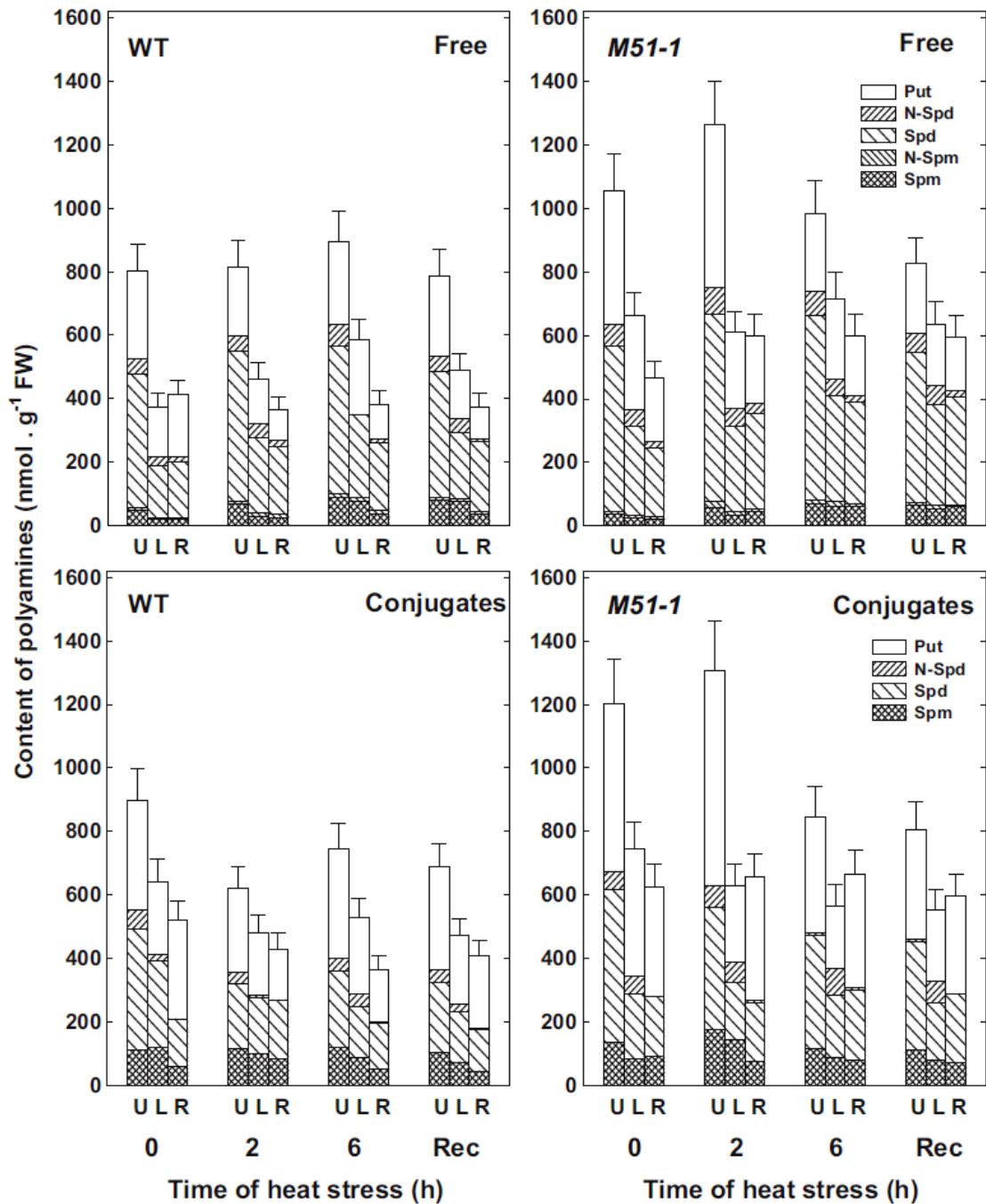


Fig. 9. Levels of polyamine and soluble conjugates in leaves and roots of tobacco wild type (WT) plants and *M51-1* transformants subjected to heat stress (40 °C for 0, 2 and 6 h) and after the recovery phase (Rec; 2 h at 25°C). U: upper leaves, L: lower leaves, R: roots.

We propose that the mild decrease of proline level in the leaves of the transformant in the early stages of heat stress might be caused by its degradation to glutamate (Kaplan *et al.* 2007), which might serve as a substrate in PA biosynthesis (Nanjo *et al.* 2003). This idea is supported by the finding that the increased activity of the enzymes involved in PA biosynthesis (ODC, ADC and SAMDC) in the early stages of heat stress in the transformants coincided with a decrease in proline levels (Fig. 10).

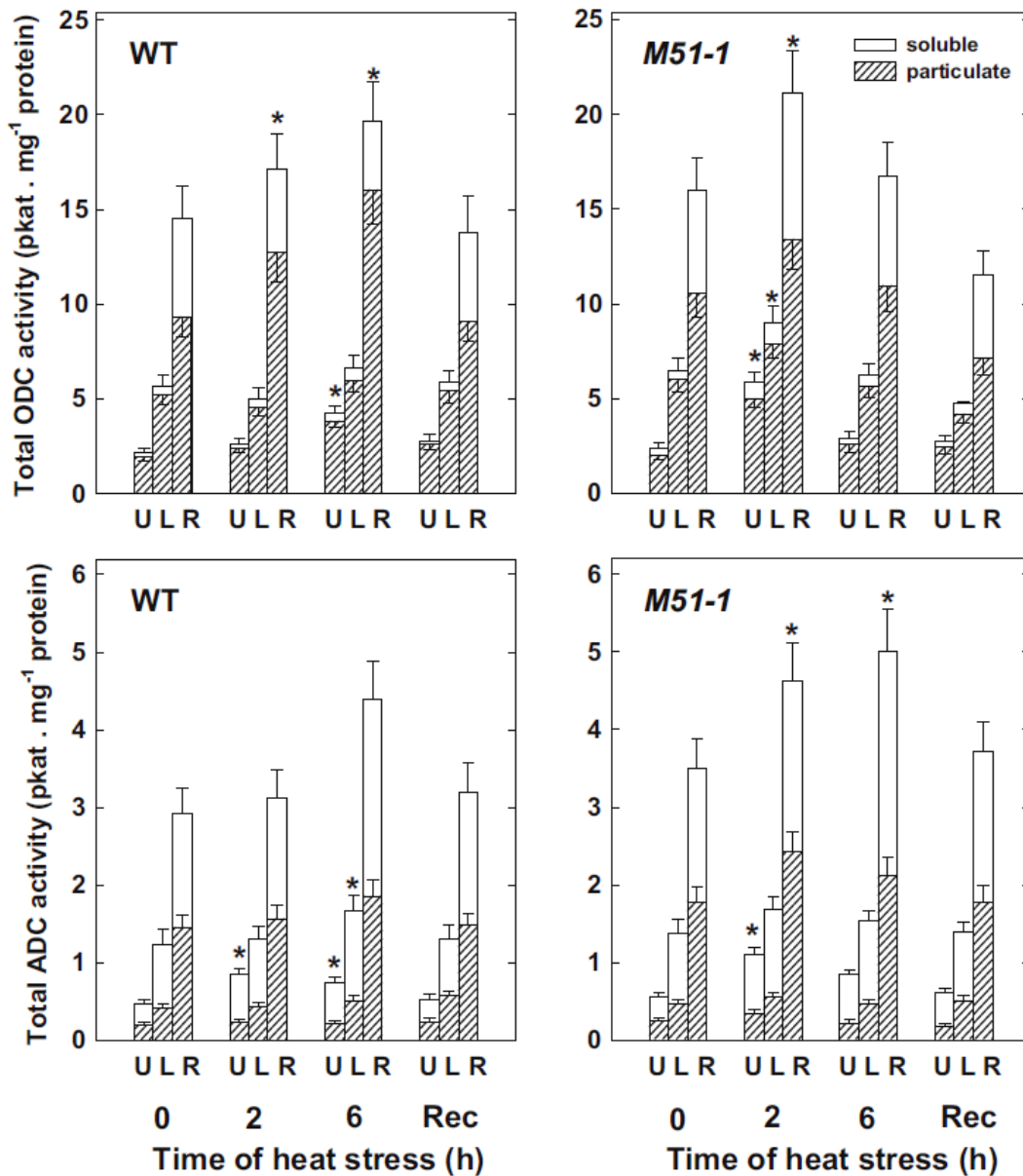


Fig. 10. Activities of the PA biosynthetic enzymes ADC and ODC in leaves and roots of tobacco wild type (WT) plants and *M51-1* transformants subjected to heat stress (40 °C for 0, 2 and 6 h) and after the recovery phase (Rec; 2 h at 25°C). U: upper leaves, L: lower leaves, R: roots.

Heat stress stimulated elevation of activity of biosynthetic enzymes ADC and ODC in both genotypes, the activity increase began earlier and was more pronounced in the transformants than in the WT plants (Fig. 10). Heat stress also up-regulated activity of catabolic enzymes DAO and PAO in both WT and transformant plants; the enzyme activities were considerably higher in the roots under both control as well as stress conditions. Similar phenomena were observed in the roots of heat-stressed wheat, where decline in catalase and ascorbate peroxidase activity resulted in increases in the levels of DAO and PAO (Goyal and Asthir 2010).

The rate of lipid peroxidation (illustrated by changes in the MDA content) can be related to antioxidant activity. In the leaves of both tested genotypes MDA levels did not vary significantly

following heat shock, with the exception of the lower leaves of the WT plants, where a mild elevation was observed. Conversely, the MDA levels in the roots increased continually as the heat shock treatment proceeded. These results indicated that in upper leaves the plant antioxidant defence mechanisms were adequate to protect them from oxidative stress.

Our results further corroborate that the increased proline levels in the transformants had a mild, but distinct positive effect on their abiotic stress tolerance.

4. 4. Hormonal responses to heat, drought and combined stress in proline over-producing plants

Exposure to heat treatment after prolonged drought had different effects than when the stresses were applied separately. A short heat stress period (2 h) at the end of drought resulted in a decrease in proline (Fig. 1) and also in ABA levels in upper leaves of WT plants and in upper and middle leaves of transformant. Levels of bioactive CKs in upper leaves decreased, causing the abolition of the CK gradient (Fig. 8). Combined stress did not affect already low bioactive CK content in wilted middle and lower leaves, but decreased CK levels in upper leaves and roots. These changes correlated well with strongly stimulated CKX activity in upper leaves and in roots. These data indicate very strong stress, which might easily overcome plant abilities to survive. Our results are in agreement with Brugière *et al.* (2003), who reported a strong increase in CKX1 transcripts in maize kernels under water deficit or heat stress.

While heat stress applied to well-watered plants did not impose any significant effect on IAA levels in upper leaves and only transient enhancement in lower leaves and roots, drought resulted in a significant decrease in IAA in upper leaves, whereas in lower and middle leaves and roots, the elevation of IAA was observed. Combined stress resulted in further IAA elevation in WT plants, but not in the more tolerant transformant. Increase of auxin seems to contribute to relocation of nutrients from leaves before their final death due to delay of leaf abscission. The general occurrence of IAA elevated content under stress conditions seems to be supported by stimulation of auxin biosynthesis in case of biotic stress (Bartel and Fink 1994).

Our results indicate that growth-promoting phytohormones, such as IAA and CKs, in concert with stress hormones, such as ABA, regulate distinct physiological processes occurring during responses to abiotic stresses. Elevation of proline content had a mild, but distinct positive effect on abiotic stress tolerance. In comparison with WT, proline over-producing transformants exhibited earlier stimulation of defence mechanisms and delayed stress-induced inhibition of the CK pool.

5. Conclusions

- Plant hormones CKs in concert with another growth-promoting hormone, auxin, and stress hormone ABA, dynamically regulate physiological processes underlying plant responses to abiotic stresses.
- Elevation of proline content had a mild, but distinct positive effect on abiotic stress tolerance. In comparison with WT, proline over-producing transformants exhibit earlier stimulation of defence mechanisms and delayed stress-induced inhibition of the CK pool. They represent (in combination with wild type) a suitable model for comparison of hormonal responses in plants differing in their stress tolerance.
- Drought stress coincides with high elevation of proline content associated with stimulation of the expression of the proline biosynthetic gene *P5CS A* (but not *P5CS B*) and down-regulation of proline deactivation genes *NtPDH2* and *CIG1* (the latter one being identified as CK induced gene), with the different expression patterns in tobacco leaves and roots.
- Data on *SAG12* promoter activity demonstrated that drought strongly accelerates the senescence of lower leaves in tobacco plants.
- Detail analysis of CK metabolism during drought stress revealed that CKs decisively contribute to preferential protection of apex and young leaves by establishment of the gradient of bioactive CKs in favour of the upper leaves, which is maintained during stress progression by the stimulation of the activity of CKX in the lower leaves and by its suppression in the upper leaves.
- Accumulation of CKs, ABA and auxin in the drought stressed roots plays an important role in modification of the root morphology (stimulation of primary root growth and suppression of lateral root formation).
- The uniform elevation of CK content before stress initiation might have a negative effect during the prolonged, severe drought. Conversely, targeted, senescence-induced elevation of *ZOG1* expression, coinciding with stimulation of CK formation, exhibits a positive effect on both the delay of senescence of the stressed lower leaves and acceleration of the recovery.
- Recovery after drought stress is a very complex process involving rearrangements of many metabolic pathways, not just a return to the state before stress initiation. Whereas the plant rejuvenates some parts (complete switch off of *SAG12* promoter activity), the others are sacrificed, depending on the degree of their senescence.
- The initial phase of recovery (1 d) after rehydration coincides with the lack of activation of tobacco *PDH* genes and incomplete reduction of the *P5CS A* gene in leaves, which is not caused by delayed plant response to re-watering, however, by anticipation of potential

subsequent stresses and the need to maintain the protective mechanisms active. The expression of two different genes (*NtERD10B* and *CSP41*) confirmed that tobacco leaves are able to sense rehydration quickly and efficiently.

- Temporary elevation of CKs and transient decrease of ABA, together with decrease of water potential in heat stressed leaves, indicate that stimulation of transpiration at the early phase of heat stress represents crucial mechanisms for cooling down of leaves, before the multiple defence mechanisms can be activated.
- Spd and Spm play an important role in plant responses to heat stress. The significant increase in free and conjugated Put in the upper leaves of proline over-producing transformant, observed in the initial phase of heat stress response, seems to contribute to its higher stress tolerance. Elevation of Put may originate from due to *de novo* synthesis. Proline degradation, however, may provide additional source of precursors for polyamine synthesis.
- Higher proline as well as PAs content and changes in their metabolism confirmed the preferential protection of upper leaves exposed to abiotic stress. Furthermore, the near-invariant MDA levels in these leaves reflect the efficiency of their induced antioxidant defence mechanisms and the high degree of protection afforded to young tissues.

Použitá literatura / References

- Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF. 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231(6): 1237-1249.
- Alcázar R, Cuevas JC, Planas J, Zarza X, Bortolotti C, Carrasco P, Salinas J, Tiburcio AF, Altabella T. 2011. Integration of polyamines in the cold acclimation response. *Plant Science* 180: 31-38.
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot* 97: 883-893.
- Bartel B, Fink GR. 1994. Differential regulation of an auxin-producing gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6649-6653.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Beck JG, Mathieu D, Loudet C, Buchoux S, Dufourc EJ. 2007. Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J* 21: 1714-1723.
- Bollenbach TJ, Tatman DA, Stern DB. 2003. CSP41a, a multifunctional RNA-binding protein, initiates mRNA turnover in tobacco chloroplasts. *Plant J* 36: 842-852.
- Bollenbach TJ, Sharwood RE, Gutierrez R, Lerbs-Mache S, Stern DB. 2009. The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 69: 541-552.
- Bouchereau A, Aziz A, Lahrer F, Martin-Tanguy J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140: 103-125.
- Boyer JS. 1995. Measuring the water status of plants and soils. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, pp. 1-178.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microquantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brugière N, Jiao S, Hantke S, Zinselmeier C, Roessler JA, Niu X, Jones RJ, Habben JE. 2003. Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiol* 132: 1228-1240.
- Chaves MM. 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J Exp Bot* 42: 1-16.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* 103: 551-560.
- Díaz P, Betti M, Sanchez DH, Udvardi MK, Monza J, Marquez AJ. 2010. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. *New Phytol* 188: 1001-1013.
- Dobrev PI, Havlicek L, Vagner M, Malbeck J, Kamínek M. 2005. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *J Chrom A* 1075: 159-166.
- Dobrev PI, Kamínek M. 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J Chrom A* 950: 21-29.
- Dobrev PI, Motyka V, Gaudinová A, Malbeck J, Trávníčková A, Kamínek M, Vaňková R. 2002. Transient accumulation of *cis*- and *trans*-zeatin type cytokinins and its relations to cytokinin oxidase activity during cell cycle of synchronized tobacco cells. *Plant Physiol Biochem* 40: 333-337.

- Esteban E, Moreno E, Peñalosa J, Cabrero JI, Millán R, Zornoza P. 2008. Short and long-term uptake of Hg in white lupin plants: kinetics and stress indicators. *Environ Exp Bot* 62: 316-322.
- Ferreira FJ, Kieber JJ. 2005. Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol* 8: 518-525.
- Finkelstein R. 2006. Abscisic acid: A seed maturation and antistress signal. In: *Plant Physiology*, 4th edition. Taiz L, Zeigler E. (eds), Sinauer Associates, Inc. Sunderland, USA, pp. 593-616.
- Goyal M, Asthir B. 2010. Polyamine catabolism influences antioxidative defense mechanism in shoots and roots of five wheat genotypes under high temperature stress. *Plant Growth Regul* 60: 13-25.
- Gubis J, Vankova R, Cervena V, Dragunova M, Hudcovicova M, Lichtnerovia H, Dokupil T, Jurekova Z. 2007. Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought. *SA J Bot* 73: 505-511.
- Haisel D, Vankova R, Synkova H, Pospisilova J. 2008. The impact of *trans*-zeatin O-glucosyltransferase gene over-expression in tobacco on pigment content and gas exchange. *Biol Plant* 52: 49-58.
- Hare PD, Van Staden J. 1997. The molecular basis of cytokinin action. *Plant Growth Regul* 23: 41-78.
- Hirayama T, Shinozaki K. 2007. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci* 12(8): 343-351.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T. 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063.
- Itai C, Ben-Zioni A, Munz S. 1978. Heat stress: effects of abscisic acid and kinetin on response and recovery of tobacco leaves. *Plant Cell Physiology* 19: 453-459.
- Kaplan F, Kopka J, Sung DY, Zhao W, Popp M, Porat R, Guy CL. 2007. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Plant J* 50: 967-981.
- Kemble AR, MacPherson HT. 1954. Liberation of amino acids in perennial ray grass during wilting. *Biochem J* 58: 46-59.
- Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 1323-1335.
- Libus J, Storchova H. 2006. Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization. *Biotechniques* 41: 156-164.
- Liu JH, Kitashiba H, Wang J, Ban Y, Moriguchi T. 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnol* 24: 117-126.
- Martin RC, Mok DWS, Smets R, Van Onckelen HA, Mok MC. 2001. Development of transgenic tobacco harboring a zeatin O-glucosyltransferase gene from *Phaseolus*. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 37: 354-360.
- Martin RC, Mok MC, Mok DWS. 1999. Isolation of a cytokinin gene, *ZOG1*, encoding zeatin O-glucosyl-transferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 284-289.
- Matysik J, Ali A, Bhalu B, Mohanty P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr Sci* 82: 525-532.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T. 2004. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* 37: 128-138.

- Mok DWS, Mok MC. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 89-118.
- Motyka V, Vaňková R, Čapková V, Petrášek J, Kamínek M, Schmölling T. 2003. Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Plant Physiol* 117: 11-21.
- Nanjo T, Fujita M, Seki M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K. 2003. Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol* 44: 541-548.
- Oono Y, Seki M, Nanjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, Satou M, Sakurai T, Ishida J, Akiyama K, Iida K, Maruyama K, Satoh S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2003. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J* 34: 868-887.
- Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA. 2005. Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant. Correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. *Plant Physiol* 138: 2174-2184.
- Pereira JS, Chaves MM. 1993. Plant water deficits in Mediterranean ecosystems. In: *Plant responses to water deficits – from cell to community*. Smith JAC, Griffiths H. (eds), Oxford: BIOS Scientific, pp. 237-251.
- Quirino BF, Normanly J, Amasino RM. 1999. Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol Biol* 40: 267-278.
- Raab S, Toth Z, de Groot C, Stamminger T, Hoth S. 2006. ABA-responsive RNA-binding proteins are involved in chloroplast and stromule function in *Arabidopsis* seedlings. *Planta* 224: 900-914.
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R. 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* 134: 1683-1696.
- Ribarits A, Abdullaev A, Tashpulatov A, Richter A, Heberle-Bors E, Touraev A. 2007. Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development. *Planta* 225: 1313-1324.
- Ribaut JM, Pilet PE. 1994. Water-stress and indol-3yl-acetic acid content of maize roots. *Planta* 193: 502-507.
- Roitsch T, Ehneß R. 2000. Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regul* 32: 359-367.
- Rulcova J, Pospisilova J. 2001. Effect of benzylaminopurine on rehydration of bean plants after water stress. *Biol Plant* 44: 75-81.
- Sakakibara H. 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* 57: 431-449.
- Schaller GE, Mathews DE, Gribskov M, Walker JC. 2002. Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. In: *The Arabidopsis book*. Somerville C, Meyerowitz E. (eds), The American Society of Plant Biologists. Rockville, MD, pp. 1-9.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol* 7: 161-167.
- Slocum RD, Flores HE, Galston AW, Einstein LH. 1989. Improved method for HPLC analysis of polyamines, agmatine and aromatic monoamines in plant tissue. *Plant Physiol* 89: 512-517.
- Spichal L, Rakova NY, Riefler M, Mizuno T, Romanov GA, Strnad M, Schülling T. 2004. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol* 45: 1299-1305.

- Strnad M. 1997. The aromatic cytokinins. *Plant Physiol* 101: 674-688.
- Strnad M, Hanus J, Vanek T, Kaminek M, Hanke DE. 1997. *Meta*-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench, cv *Robusta*). *Phytochemistry* 45: 213-218.
- Synková H, Van Loven K, Pospíšilová J, Valcke R. 1999. Photosynthesis of transgenic *pssu-ipt* tobacco. *J Plant Physiol* 155: 173-182.
- Szabados L, Savoure A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15: 89-97.
- Székely G, Abraham E, Cseplo A, Rigo G, Zsigmond L, Csiszar J, Ayaydin F, Strizhov N, Jasik J, Schmelzer E, Koncz C, Szabados L. 2008. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J* 53: 11-28.
- Tassoni A, van Buuren M, Franceschetti M, Fornale S, Bagni N. 2000. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiol Biochem* 38: 383-393.
- Tiburcio AF, Altabella T, Borrell A, Masgrau C. 1997. Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol Plant* 100: 664-674.
- Turchetto-Zolet AC, Margis-Pinheiro M, Margis R. 2009. The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. *Mol Genet Genomics* 281: 87-97.
- Verbruggen N, Hermans C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753-759.
- Volkov RA, Panchuk II, Schoffl F. 2003. Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *J Exp Bot* 54: 2343-2349.
- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. 2003. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 376: 1-14.
- Xin Z-Y, Zhou X, Pilet PE. 1997. Level changes of jasmonic, abscisic and indole-3yl-acetic acids in maize under desiccation stress. *J Plant Physiol* 151: 120-124.
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Mizuno T. 2001. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol* 42: 1017-1023.
- Zhang CS, Lu Q, Verma DPS. 1995. Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthase, a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps of proline biosynthesis in plants. *J Biol Chem* 270: 20491-20496.
- Zhang X, Wollenbeweber B, Jiang D, Liu F, Zhao J. 2008. Water deficits and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing *ABP9*, a bZIP transcription factor. *J Exp Bot* 59: 839-848.

Curriculum vitae

Osobní data

Jméno a příjmení: **Jana Dobrá**

Datum a místo narození: 27.12.1980, Plzeň

Adresa: Hlavanova 10, 326 00 Plzeň

Kontakt: email: JanaDobra@centrum.cz

Vzdělání

- 2005 – současnost **Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha,**
studium doktorského programu, obor biochemie
státní doktorská zkouška v r. 2008
- 1999 – 2005 **Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha,**
obor biochemie
diplomová práce: Studium heterogenity fotosystému II vyšších
rostlin a sinic
- 1992 – 1999 Gymnázium, Plzeň, Mikulášské nám. 23

Pracovní zkušenost

- 2005 – 2011 Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.,
Laboratoř hormonálních regulací u rostlin

Pedagogická činnost

Vedení jedné ze skupin Pokročilého praktika II - projekt: „Vliv teplotního stresu na hladiny rostlinných hormonů a expresi vybraných genů u rostlin *Arabidopsis thaliana*“ (transkriptomická část, 3 semestry).

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Seznam publikací / List of publications

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 Environ* 31: 341-353. (IF= 4.666)

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 *J Plant Physiol* 167: 1360–1370. (IF=2.500)

Dobrá J, Vaňková R, Havlová M, Burman AJ, Libus J, Štorchová H. (2011) Tobacco leaves and roots differ in the expression of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery. *J Plant Physiol* 168, 1588-1597. (IF=2.677)

Vaňková R, Dobrá J, Štorchová H. (2012) Recovery from drought stress in tobacco - an active process associated with the reversal of senescence in some plant parts and the sacrifice of others. *Plant Signal Behav* 7: 1-3. (IF=2.000)

Cvikrová M, Gemperlová L, Dobrá J, Martincová O, Prášil I, Gubiš J. (2012) Effect of heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. *Plant Science* 182: 49-58. (IF=2.481)

Seznam vybraných příspěvků do sborníků / Selected abstracts

Dobrá J, Štorchová H, Libus J, Vaňková R: The comparison of the constitutive (35S) and senescence driven (SAG12) expression of *trans*-zeatin O-glucosyltransferase gene in tobacco at control and drought stress conditions in shoots and roots. In: Abstracts of XVth FESPB 2006 Congress (Lyon, France 16-21 July).

Dobrá J, Štorchová H, Libus J, Vaňková R: Vliv sucha na konstitutivní (35S promotor) a senescencí indukovanou (SAG12 promotor) expresi genu pro *trans*-zeatin O-glucosyltransferasu v listech a kořenech tabáku. Ve sborníku: Bulletin ČSEBR, 4. METODICKÉ DNY (Srní 1. - 5. 10. 2006, P6 str. 56).

Dobrá J, Štorchová H, Libus J, Havlová M, Vaňková R: Drought stress related changes in transcription profiles of proline dehydrogenase and dehydrin in dependence on leaf position in tobacco plants over-expressing gene for *trans*-zeatin O-glucosyltransferase (SAG12::ZOG1). Ve sborníku abstraktů: Bulletin ČSEBR, Konference experimentální biologie rostlin: 11. dny fyziologie rostlin (Olomouc 9. - 12. 7. 2007)

Dobrá J, Štorchová H, Libus J, Vaňková R: Vliv sucha na expresi vybraných genů u rostlin tabáku. Ve sborníku: VLIV ABIOTICKÝCH A BIOTICKÝCH STRESORŮ NA VLASTNOSTI ROSTLIN 2008 (ČZU v Praze, 12. - 13. 2. 2008, str. 96 - 99).

Dobrá J: Characterization of the drought response of tobacco plants and their subsequent recovery. In: Book of Abstracts. Fresh Insights in Plant Affairs (International Conference of PhD Students on Experimental Botany, Nové Hrady, 8. - 11. 4. 2008, p. 10).

Dobrá J, Štorchová H, Libus J, Vaňková R: The impact of drought stress on the expression of selected genes in tobacco plants. In: Abstracts of 16th Congress of the FESPB, August 17-22, Tampere, Finland, *Physiol. Plant.* 133(3), P09-38.

Dobrá J, Cvikrová M, Štorchová H, Malbeck J, Motyka V, Dobrev P, Gaudinová A, Gubiš J, Vaňková R: The Impact of Proline on Phytohormone and Polyamine Pools during Drought and/or Heat Stress Response in Tobacco Plants. In: Abstracts of International Conference "Plant Abiotic Stress Tolerance". (Viena, Austria 8 - 11 February 2009, p. 83).

Dobrá J, Štorchová H, Kolář J, Vaňková R: Vliv teplotního stresu na expresní profily genů spojených s biosyntézou či degradací cytokininů u *Arabidopsis*. Ve sborníku: VLIV ABIOTICKÝCH A BIOTICKÝCH STRESORŮ NA VLASTNOSTI ROSTLIN 2009 (Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. Praha – Ruzyně, 4. - 5. 3. 2009, str. 105 - 107).

Dobrá J, Štorchová H, Vaňková R: Využití UPL sond pro stanovení hladin exprese jednotlivých komponent signální dráhy cytokininů v rostlinách *Arabidopsis*. Ve sborníku: Bulletin ČSEBR, 5. METODICKÉ DNY (Malenovice 11. - 14. 10. 2009, P5 str. 48)

Dobrá J, Štorchová H, Vaňková R: The effect of heat stress on the expression of genes associated with cytokinin signalling and metabolism in *Arabidopsis* plants. In: IPGSA Conference 2010. (20th International Conference on Plant Growth Substance, Tarragona-Spain 28th June to 2nd July 2010, PS11-06 p. 115)

Dobrá J, Štorchová H, Kolář J, Vaňková R: Vliv teplotního stresu na expresní profily genů spojených se signální a metabolickou dráhou cytokininů u *Arabidopsis*. Ve sborníku: VLIV ABIOTICKÝCH A BIOTICKÝCH STRESORŮ NA VLASTNOSTI ROSTLIN 2011 (Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. Praha-Ruzyně, 9. - 10. 3. 2011, str. 289-291).

Dobrá J, Štorchová H, Vaňková R: The effect of heat stress on the expression of genes associated with cytokinin and abscisic acid signalling and metabolism in *Arabidopsis* plants, In: Abstract Book. Plant Organellar Signaling - from algae to higher plants (FEBS workshop 2011, 31. 8. - 3. 9. 2011, Primošten, Croatia, p. 121).