

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Vliv syntetických regulátorů růstu na homeostázu
rostlinných hormonů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Lucie Šidlíková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2022

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Lucie Šidlíková
Název práce	Vliv syntetických regulátorů růstu na homeostázu rostlinných hormonů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Růst a vývoj rostlin je regulován rostlinnými hormony, které řídí mnoho fyziologických procesů. Auxiny, jedny z fytohormonů, hrají významnou roli při prodlužování kořene, jelikož indukují dělení buněk v kořenovém meristému a také se podílí na vývoji embrya. Již dříve byla publikována odlišná distribuce fytohormonů v jednotlivých orgánech, ale i na úrovni pletiva. Jejich rovnovážný stav, homeostáza, je ovlivněna jak biosyntézou, metabolismem tak transportem. Fytohormony mohou být transportovány symplastickou (buněčnou) i apoplastickou (mezibuněčnou) dráhou. Předpokládá se, že v těchto částech jsou koncentrace fytohormonů rozdílné. Cílem této práce je studium vlivu auxinových inhibitorů biosyntetických drah či transportu narušující homeostázu auxinů v <i>Arabidopsis thaliana</i>, kterou díky těmto látkám lze studovat.</p> <p>V praktické části byla provedena optimalizace izolace apoplastu a symplastu z kořenů nebo prýtlů a podmínek inkubace <i>A. thaliana</i> se zvolenými syntetickými inhibitory. Dále byla provedena purifikace fytohormonů za využití metody extrakce pevnou fází (SPE) s jejich následným stanovením pomocí metody kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Výsledky ukázaly rozdílnou distribuci auxinů a cytokininů mezi symplastem a apoplastem, fenotypové změny a ovlivněné fytohormonální profily po ošetření rostlin auxinovými inhibitory.</p>
Klíčová slova	Fytohormony, SPE, auxin, <i>A. thaliana</i> , inhibitory
Počet stran	75
Počet příloh	3
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Lucie Šidlíková
Title of thesis	Effect of synthetic growth regulators on plant hormone homeostasis
Typ of thesis	Master
Departement	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
The year of presentatiton	2022
Abstract	<p>Plant growth and development is regulated by plant hormones that control many physiological processes. Auxins, one of the phytohormones, play an important role in root elongation, throught the induction of cell division in the root meristem, and also participate in embryo development. Different distribution of phytohormones in individual organs, but also at the tissue level, has been previously published. Their equilibrium state, homeostasis, is affected by biosynthesis, metabolism and transport. Phytohormones can be transported by both the symplastic (cellular) and apoplastic (intercellular) pathways. It is assumed that the concentrations of phytohormones are different in these compartments. The aim of this work is to study the effect of auxin inhibitors of biosynthetic pathways or transport that disrupting auxin homeostasis in <i>Arabidopsis thaliana</i> that can be studied applying these substances.</p> <p>In the practical part, extraction, the isolation of apoplast and symplast from roots or shoots and incubation conditions of <i>A. thaliana</i> with selected synthetic inhibitors was performed. Furthermore, purification of phytohormones was done using the solid phase extraction (SPE) method, followed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The results showed different distribution of auxins and cytokinins between symplast and apoplast, phenotypic changes and affected phytohormonal profiles after treatment of plants with auxin inhibitors.</p>
Keywords	Phytohormones, SPE, auxin, <i>A. thaliana</i> , inhibitors
Number of pages	75
Number of appendices	3
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně, pod vedením doc. Mgr. Ondřeje Nováka, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Lucie Šidlíková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce doc. Mgr. Ondřeji Novákovi, Ph.D. a konzultantovi, Mgr. Vladimíru Skalickému, Ph.D., za odborné vedení, dohled, trpělivost a cenné rady při vypracovávání diplomové práce.

Tato diplomová práce byla realizována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2022_016).

Obsah

Seznam zkratk	7
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	10
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
2.2 Rostlinné hormony	11
2.2.1 Auxiny	12
2.2.1.1 Biosyntéza auxinů	14
2.2.1.2 Metabolismus auxinu	16
2.2.1.2 Transport auxinu	17
2.2.1.3 Auxinová signální dráha	19
2.2.2 Cytokininy	20
2.2.2.1 Biosyntéza CKs	22
2.2.2.2 Metabolismus a transport CKs	22
2.2.2.3 Degradace CK	24
2.2.3 Propojení auxinů a cytokininů	24
2.3 Apoplastická a symplastická dráha	25
2.4 Regulátory růstu	26
2.4.1 Inhibitory biosyntézy IAA	27
2.5 Stanovení rostlinných hormonů	30
2.5.1 Extrakce fytohormonů	30
2.5.2 Purifikace fytohormonů	31
2.5.3 Stanovení pomocí LC–MS/MS	31
3 MATERIÁL A METODY	34
3.1 Přístroje a pomůcky	34
3.2 Použité chemikálie a roztoky	35
3.3 Rostlinný materiál	36
3.4 Metody a postupy	36
3.4.1 Výsev rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
3.4.2 Izolace apoplastu a symplastu	37
3.4.3 Test inhibice růstu primárního kořene	38
3.4.4 Konfokální mikroskopie	39
3.4.5 Extrakce a purifikace vzorků pro stanovení auxinů a cytokininů	39
3.4.5 LC-MS/MS analýza auxinů a cytokininů	42

4 VÝSLEDKY	43
4.1 Izolace symplastu a apoplastu	43
4.1.1 Optimalizace izolace apoplastu a symplastu	43
4.2 Vliv syntetických inhibitorů na homeostázi auxinů u <i>A. thaliana</i>	45
4.2.1 Stanovení účinné koncentrace auxinových inhibitorů.....	45
4.2.2 Vliv syntetických inhibitorů na auxinový signaling.....	46
4.2.3 Vliv syntetických auxinových inhibitorů na profil auxinů.....	49
5 DISKUZE	53
6 ZÁVĚR	57
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
8 PŘÍLOHY	73

Seznam zkratek

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
4-Cl-IAA	kyselina 4-chlorindolooctová
ABC	ATP-BINDING CASSETTE
ACN	acetonitril
ADP	adenosindifosfát
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
<i>At</i> CKX	cytokinin oxidáza/dehydrogenáza u <i>Arabidopsis</i>
<i>Ath</i> -Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> ekotyp Columbia-0
ATP	adenosintrifosfát
Aux	auxin
Aux/IAA	Auxin/indol-3-acetonová kyselina
AUX1	auxin transportérový protein 1
AUX1/LAX	proteinový nosič AUXIN1/LIKE-AUX1
CKs	cytokininy
CKX	cytokinin oxidáza/dehydrogenáza
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
č.h	čerstvá hmota
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DMSO	Dimethyl sulfoxid
ndTomato	červený fluorescenční protein
GH3	enzym IAA-amidosyntetáza
gh3	gen gretchen hagen3
GUS	β-glukuronidáza
HMBDP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IAA	kyselina indolyl-3-octová
IAA-Asp	N-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-asparagová kyselina
IAA-glc	1-O-indol-3-ylacetyl-β-D-glukosid
IAA-Glu	N-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-glutamová kyselina
IAM	Indol-3-ylacetamid
IAN	indol-3-acetonitril
IAOx	indol-3-ylacetaldoxim
IBA	kyselina indolyl-3-máselná
iP	N6-izopentenyladenin
IPT	Isopentenyltransferáza
IPyA	indol-3-ylpyrohroznová kyselina
IS	Interní standard
Kin	Kinetin
KYN	L-kynurenin

<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i>
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LLE	Extrakce kapalina-kapalina
LOG	enzym LONELY GUY
mg	miligram
MS	hmotnostní spektrometrie
MS médium	Murashige & Skoog médium
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NAA	kyselina α -naftyloctová
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NPA	kyselina N-1-(naftyl)ftalamová
oxIAA	2-oxindol-3-yloctová kyselina
oxIAA-glc	2-oxoindol-3-ylacetyl-1-O- β -D-glukóza
PAA	Kyselina fenylactová
PAT	polární transport auxinu
PILS	PIN LIKES proteiny
PIN	PIN-tvořený protein, proteinová rodina auxinových transportérů
PUP	purinové permeázy
rpm	Jednotka úhlové rychlosti (otáčky/min)
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SCF ^{TIR1}	Skp1-Cullin-F-box
SKP2A	S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A
SPE	extrakce na pevné fázi
TAA1	Tryptofan amiotransferasa Arabidopsis 1
TIR1/AFB	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX
tRNA	Transferová RNA
Trp	L-tryptofan
TSR	targer-site resistance
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
UGT	UDP-glukosyltransferáza
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
YUCCA	flavin monooxygenáza
μ SPE-PT	mikroextrakce pevnou fází pomocí plněných pipetovacích špiček

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Rostliny se vzhledem ke svému přisedlému způsobu života musí v místě svého růstu přizpůsobit na rychlé změny prostředí. Rostlina díky systému signálních drah je schopna reagovat a přizpůsobit se např. slunečnímu záření, teplotě ale i změně obsahu vody v půdě, změně v minerální výživě, přítomnosti patogenů a dalších stresových i nestresových faktorů. Rostlinné hormony regulují metabolismus, růst a koordinují odpověď na biotické i abiotické faktory.

Auxiny, rostlinné hormony, které byly objeveny ve 20. století, zásadním způsobem ovlivňují u rostlin velkou část dějů. Jedná se o regulátory růstu, které se taktéž podílí na vývoji rostliny. Nejdůležitější aktivním přirozeným auxinem je indol-3-ylactová kyselina (IAA), která se je zapojena do růstu, vývoje a environmentálních reakcí rostliny v průběhu celého jejího života. Naopak syntetické inhibitory jsou látky, které inhibují růst a vývoj rostliny.

V rámci teoretické části byla vypracována rešerše zaměřená na problematiku: (sub)buněčné homeostázy rostlinných hormonů (biosyntetické dráhy a metabolismus, transport, percepce se zaměřením na auxiny), biologické úlohy auxinů v živých systémech, účinky syntetických inhibitorů, které narušují biosyntézu, metabolismus a transport auxinů v rostlině *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) a dále využití moderních analytických metod při stanovení fytohormonů.

Cílem diplomové práce bylo studium vlivu syntetických inhibitorů biosyntetických drah fytohormonů a jejich transportu na dynamické změny homeostázy hormonů v rostlině *A. thaliana*.

V praktické části byly realizovány experimenty zaměřené na seznámení se s metodami izolace symplastu a apoplastu a jejich optimalizací. Dále byl studován vliv syntetických inhibitorů na homeostázu auxinů u *A. thaliana* zahrnující: optimalizaci podmínek inkubace s vybranými inhibitory (koncentračních závislosti), ovlivnění auxinového signálu a homeostáze. Byla také provedena purifikace fytohormonů za využití metod extrakce pevnou fází (SPE) a následné stanovení fytohormonálních profilů vybraných skupin hormonů pomocí kapalně chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (česky huseniček rolní) je 7-40 cm malá rostlina patřící do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). *A. thaliana* je jednoletá rostlina, která má silnou reprodukční schopnost a umožňuje získat velké množství semen za krátkou dobu. Jedná se o organismus, který je nenáročný, snadno se s ním manipuluje a jeho pěstování nevyžaduje vysoké náklady. V roce 2000 byl osekvenován celý genom o velikosti 125 MB, který je tvořen pěti chromozomy (Zhu a kol., 2016). Náklady a obtížnost sekvenování tedy nejsou příliš obtížné (Sivasubramanian a kol., 2015). Nejen díky těmto vlastnostem rostlina považována za modelovou a je součástí studia procesů v biologickém výzkumu.

2.2 Rostlinné hormony

Rostlinné hormony, fytohormony, se v rostlinných pletivech vyskytují většinou ve velmi nízkých koncentracích, na rozdíl od interferujících (abundantních) látek, které se vyskytují ve vyšších koncentracích (Tarkowská a kol., 2014). Jedná se o signální molekuly, které ovlivňují významným způsobem růst a vývoj rostliny. Fytohormony regulují fyziologické reakce na vnější i vnitřní podněty prostřednictvím signálních drah.

Nejnámější popsanými skupinami fytohormonů, které rostliny produkují, jsou fytohormony auxiny a cytokininy, které jsou přítomny ve všech rostlinách (Pavlová a Fisher, 2011). Dalšími fytohormony jsou gibereliny, kyselina abcisová a etylen. K látkám, které také vykazují regulující růstovou aktivitu, patří brassinosteroidy, jasmonáty a kyselina salicylová a nejnověji objevené strigolaktony (Novák a kol., 2017). Fytohormony mohou při regulaci funkce rostliny působit jak synergicky, tak antagonisticky (Schaller a kol., 2015; Šimášková a kol., 2015). Jedná se o regulaci senescence, reakci na environmentální podněty, dělení buněk a pletiv, klíčení semen aj. (Procházka a kol., 1998; Tarkowská a kol., 2014). Koncentrace fytohormonu hraje zásadní roli na regulaci fyziologického procesu. Např. vysoké koncentrace auxinů mohou inhibovat růst kořene, naopak nízké koncentrace růst stimulovat. Neméně důležitou roli hraje, kde je auxin syntetizován, jak je distribuován a na jakém vývojovém procesu se podílí (spatio-temporal distribution).

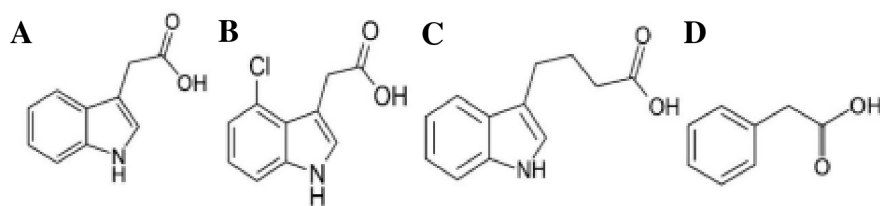
2.2.1 Auxiny

Ve 20. století byla objevena existence regulačních látek, které jsou schopny ovlivňovat růst rostlin. Látky, které jsou ve velké míře zastoupeny u rostlin, byly pojmenovány auxiny. Jedná se o fytohormony, jejichž název je odvozen z řeckého *auxein* neboli růst, zvětšovat se (Darwin a Darwin, 1880; Procházka a kol., 1998; Pavlová a Fisher, 2011). Auxiny se účastní mnoha důležitých aspektů vývoje i růstu rostlin.

Auxiny mají efekt na dělení buněk, buněčnou diferenciaci i vývoj pletiv. Také stimuluje prodlužovací růst, apikální dominanci (Friml, 2003) a tvorbu adventivních kořenů. Zasahují do pohybu orgánů, tedy fototropismu, gravitropismu, embryogeneze, organogeneze. Vliv mají na rychlost dozrávání plodů a jejich růst (Davies, 2004; De Smet a kol., 2015). Ovlivňují diferenciaci vodivých pletiv i aktivitu kambia. Poměr auxinu k cytokininu v jistých rostlinných pletivech určuje zahájení tvorby kořenů nebo prýtu. Význam auxinů je také velmi důležitý v oddálení senescence a ovlivňují růst plodů i polarizaci embrya.

Auxiny se řadí mezi organické kyseliny o nízké molekulární hmotnosti. Obsahují jak aromatický kruh, tak postranní řetězec karboxylové kyseliny. Tyto rostlinné hormony jsou účinné již ve velmi nízkých koncentracích 10^{-7} až 10^{-13} mol.l⁻¹) (Procházka a kol., 1998). Nejznámější a první popsanou přirozeně se vyskytující sloučeninou s přímou auxinovou aktivitou v rostlinách je kyselina indol-3-ylactová (IAA) (Obr. 1), která byla poprvé identifikována v lidské moči (Kögl a kol., 1934), později byla nalezena v houbě *Rhizopus suinus* (Thimann, 1935). U rostlin je IAA převážně přítomna v mladých částech rostliny, které se rychle dělí, tedy v meristémech, plodech, listech a semenech. IAA je z těchto míst polárním transportem vysílána do kořenové špičky, kde se obrací směr transportu a IAA putuje do prodloužené části kořene (Friml, 2003). Koncentrace auxinu není ve všech částech rostliny stejná a její koncentrační hladinu si rostlina reguluje sama (Peterson a kol., 2009; Pavlová a Fischer, 2011). IAA také hraje důležitou roli při přímé morfogenezi explantátů. Bývá přidávána do rostlinných kultivačních medií, kde podléhá oxidaci. Navíc v rostlinných pletivech rychle metabolizuje (George a kol., 2008).

V rostlinách se kromě IAA přirozeně vyskytují látky podobné struktury (Obr. 1): kyselina indol-3-ylmásečná (IBA), kyselina 4-chlorindol-3-ylactová (4-Cl-IAA) nebo kyselina fenylactová (PAA) (Pavlová a Fisher, 2011; Korasick a kol., 2013; Simon a Petrášek, 2011; Procházka a kol., 1998). Kyselina fenylactová se vyskytuje v řádově vyšších koncentracích, ale má menší účinnost než IAA (Procházka a kol., 1998). Slovem auxin je často myšleno IAA.



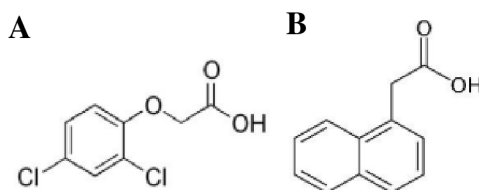
Obr. 1. Přehled přírodních auxinů: kyselina indol-3-ylactová (IAA; A), kyselina 4-chlorindol-3-ylactová (4-Cl-IAA; B), kyselina indol-3-ylmásečná (IBA; C) a kyselina fenylactová (PAA; D).

IBA funguje nejen jako zásobní forma IAA, ale také sama vykazuje auxinovou aktivitu (Ludwig-Muller, 2000; Simon a Petrášek, 2011). U některých luštěnin i borovice lesní (*Pinus sylvestris*) byla zjištěna přítomnost 4-Cl-IAA (Reinecke, 1999), nikoliv však u huseníčku rolního (Simon a Petrášek, 2011).

Kromě přirozeně se vyskytujících sloučenin existuje i rozmanitá skupina syntetických auxinů, které mají podobné biologické vlastnosti, ale liší se chemickou strukturou a účinkem. Syntetické auxiny našly své primární využití pro růst tkáňových kultur (Procházka a kol., 2003; Campanoni, 2005).

Mezi syntetické auxiny (Obr. 2) se řadí kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), která je často složkou herbicidů, kyselina α -naftyloctová (NAA) (Procházka a Šebánek, 1997), kyselina 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionová (2,4-DP) a kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T) (Cao a kol., 2019). Narozdíl od přirozených auxinů, syntetické auxiny rostlina nedokáže odbourávat, což představuje velký potenciál v jejich využití. Auxiny v nízkých koncentracích slouží jako regulátory, ve vyšších koncentracích jako inhibitory.

Většinou se auxiny v rostlinách nachází v neaktivní formě, protože vyšší koncentrace volných auxinů jsou pro rostliny toxické. Z tohoto důvodu je důležitá kontrola hladiny auxinů u rostlin, která probíhá pomocí biosyntézy, degradace, transportu nebo skladování v buňkách ve formě aminokyselinových, peptidových, sacharidových konjugátů jako neaktivních forem auxinů (Ludwig-Muller, 2011; Ljung a kol, 2002).



Obr. 2. Přehled hlavních syntetických auxinů. A: kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), B: kyselina α -naftyloctová (NAA).

Rostlinný hormon IAA je jeden z nejdůležitějších a nejméně studovaných hormonů, z důvodu jeho zapojení do velkého množství vývojových a růstových procesů v rostlinách. Změny koncentrace IAA jsou spouštěny pomocí lokálního minima a maxima, tvorba těchto minim a maxim je přísně regulována pomocí rovnováhy v biosyntéze, metabolismu a transportu IAA. O stavbě orgánů a pletiv u rostliny rozhoduje gradient, který vzniká během regulace (Zhao, 2010).

2.2.1.1 Biosyntéza auxinů

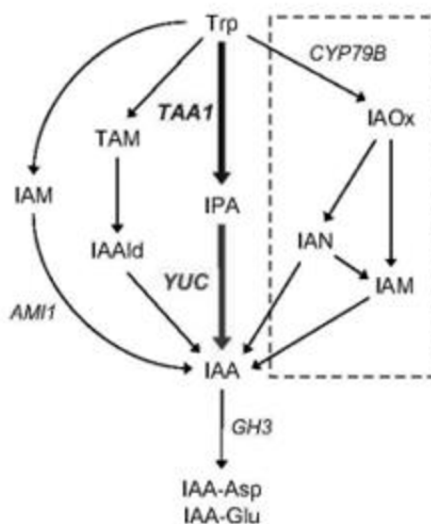
Biosyntéza auxinu probíhá hlavně v apikálních částech mladých listů, stonku a vyvíjejících se semenech (Swarup a kol., 2001). Z důvodu podobnosti auxinu a L-tryptofanu (Trp), mnoho studií vychází z předpokladu, že právě Trp je prekurzorem biosyntézy IAA (Taiz a Zeiger, 2002). Pro biosyntézu auxinů v rostlinách existují dvě hlavní cesty. Biosyntéza auxinů *de novo* (z Trp) a zahrnuje čtyři různé metabolické dráhy, které využívají různé prekurzory, podle kterých jsou biochemické dráhy pojmenovány: IPyA (kyselina indol-3-ylpyrohroznová dráha (IPyA), IAM (indol-3-ylacetamid), TAM (tryptamin) a IAOx (indol-3-ylacetaldoxim) (Woodward a Bartel, 2005, Di a kol., 2015). Jedná se na tryptofanu závislou dráhu (TD, Trp-dependentní). Dle nejnovějších publikací jsou dominantní dráhy TD, jakožto hlavní cesty biosyntézy IAA u rostlin. Dále je známo, že existuje dráha tryptofanu nezávislá (TI, Trp-independentní), která stále není komplexně objasněna (Di a kol., 2015; Woodward a Bartel, 2005). Prekurzorem je nejspíše indol-3-glycerol fosfát (IGP) (Ouyang a kol, 2000). TI dráha je ale málo prozkoumanou dráhou, a proto znalosti o této dráze jsou založeny pouze na studiích s použitím stabilně značených prekurzorů IAA (Normanly, Cohent a Fink, 1993; Wright a kol, 1991).

Většina auxinů vznikajících z Trp je syntetizována dvoustupňovou IPyA dráhou (Zhao a kol., 2014). Další TD dráhou je syntéza IAA přes IAOx (Obr. 3), která se vyskytuje primárně u čeledi *Brassicaceae*, kam patří i *A. thaliana* (Enders a Strader, 2015). Dále může být biosyntéza auxinu prováděna peroxizomální β -oxidací z kyseliny indol-3-máselné (IBA) na IAA (Strader a Bartel, 2011).

IPyA dráhy se účastní enzym TRYPTOFAN AMINOTRANSFERASE ARABIDOPSIS (TAA) z rodiny tryptofan aminotransferas a YUCCA z rodiny flavinových monooxygenas. V *A. thaliana* bylo identifikováno pět genů pro TAA (Cao a kol., 2019) a 11

genů YUCCA. Inaktivace *yucca* genu nemá vliv na vývoj rostliny, zatím co mutace celé genové rodiny vede k poruše embryogeneze i růstu a kvetení (Zhao, 2012).

Nejprve je z Trp je pomocí reverzibilní aminotransferázové reakce za účasti enzymu aminotransferázy TAA1 přenesena aminoskupina na α -ketokyselinu (ketoglutarát) a vzniká IPyA a glutamát aminokyseliny (Štěpánová a kol., 2008; Tao a kol., 2008). Donorem aminů mohou být i aminokyseliny Tyr, Gin, Phe, Leu, Met, Ala. Nejčastějším donorem podle biochemických analýz je aminokyselina Trp (Tao a kol., 2008). Poté je IPyA převedena na IAA reverzibilní oxidační dekarboxylací katalyzovanou proteinem YUCCA (YUC) (Obr. 3). Při nadprodukci YUCCA byl zaznamenán zvýšený nárůst auxinů (Zhao, 2012). Do dnešního dne nejvíce zkoumaným proteinem je YUC6, který je NADPH oxidázou. Reakce katalyzovaná YUC6, kterou vzniká IAA z IPyA se skládá z více kroků. Prvním krokem je předání dvou elektronů NADPH z YUC6 molekule FAD (oxidovaný flavinadenindinukleotid), ze které se stává FADH2. Tato redukováná forma FAD reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku C4a-(hydro)peroxyflavinu, ze kterého oxidační dekarboxylací vzniká IAA (Zhao a kol., 2014). Reakcí FADH2 s molekulárním kyslíkem vzniká peroxid vodíku, který řadíme k reaktivním formám kyslíku (ROS). ROS jsou pro rostlinné tělo nebezpečné, podílejí se na mnoha fyziologických a patologických procesech, ale vzhledem k nízkým hladinám auxinů u rostlin není tento proces v produkci ROS proti jiným metabolickým procesům významný.



Obr. 3. Biosyntéza auxinu – hlavní dráha vycházející z Trp za účasti enzymů TAA A YUC. Vedlejší dráhy IAM, TAM a IAOx (převzato a upraveno podle Mashiguchi a kol., 2011).

2.2.1.2 Metabolismus auxinu

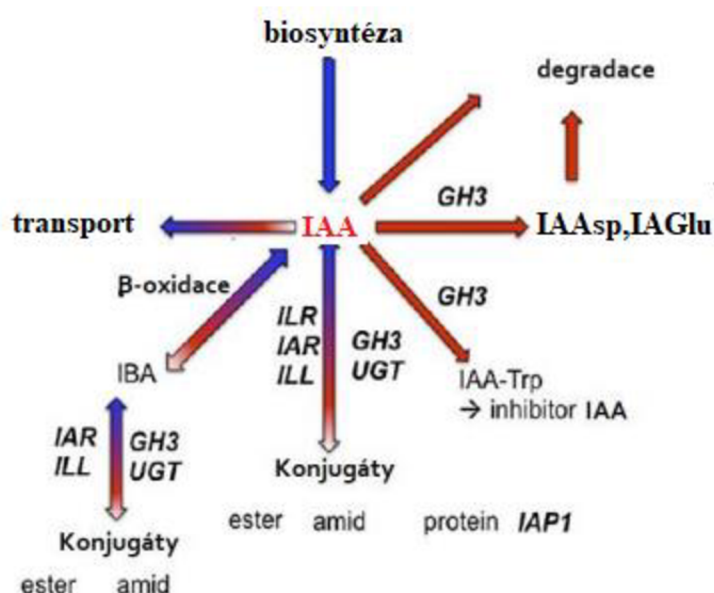
Hladina volné IAA, která je uvnitř buněk velmi biologicky aktivní, je rostlinou modulována biosyntézou, polárním transportem a inaktivačními dráhami (Hayashi a kol., 2021). Na udržení homeostázy auxinů (Obr. 4) se podílí auxin aminohydrolasy, které zajišťují hydrolyzu amidové vazby aminokyselin, která je konjugována s auxinem a dochází k uvolnění aktivní volné formy IAA. Tyto enzymy slouží také jako katalyzátory v reakcích deaminace, dechlorace, defosforylace nebo izomerace a své uplatnění mají také při metabolismu aminokyselin a nukleotidů. Identifikovány byly u huseničku rolního (*A. thaliana*) i rýže seté (*Oryza sativa*).

V cytoplazmě může být IAA modulovaná oxidací, metylací nebo konjugací (Skalický a kol., 2018). U *A. thaliana* byly objeveny enzymy, které aktivní auxin inaktivují. Jedná se o IAA karboxylmethyltransferasu (IAMT1), která modifikuje IAA na IAA methylester. Dále UDP-glukosyltransferasa (UGT84B1), která z IAA tvoří 1-O-indol-3-ylacetyl- β -D-glukosid (IAA-glc). Tyto dva metabolity jsou neaktivní, tedy skladovací. Bylo zjištěno že, při inaktivaci těchto dvou enzymů, *A. thaliana* nevykazuje změněný fenotyp odpovídající zvýšené hladině auxinu uvnitř buněk, tedy tyto enzymy nemají příliš velkou roli v homeostáze/inaktivaci IAA (Hayashi a kol., 2021).

Podle Staswick a kol. (2005) enzym IAA-amidosyntetasa (GRETCHEN HAGEN 3, GH3) katalyzuje konjugaci auxinu s aminokyselinami. Navíc v roce 2021 bylo zjištěno, že při zvýšené hladině IAA může docházet k inaktivaci enzymů GH3 ze skupiny II. Tato skupina zahrnuje u *A. thaliana* osm genů *gh3*, které katalyzují vznik nejčastěji se vyskytujících konjugátů aminokyselin – IAA-glutamátu (IAA-Glu) a IAA-aspartátu (IAA-Asp). Skupina specifických amidohydrolas (např. IAA-LEUCIN-RESISTANT 1/ILR1-LIKE, ILR1/ILL) může tyto konjugáty přeměňovat zpět na aktivní auxin (Hayashi a kol., 2021). Uvolnění IAA z konjugované formy také napomáhá amidohydrolasa IAA-ALANINE-RESISTANT (IAR1) (Kakei a kol., 2015).

Z důvodu přítomnosti vysoké hladiny inaktivní oxidované formy IAA, kyseliny 2-oxo-indol-3-ylactové (oxIAA), v buňkách *Arabidopsis* byla dříve za dominantní cestu považována oxidace IAA (Zhang a Peer., 2017; Pěničik a kol., 2013). Bylo zjištěno, že velký význam v této deaktivaci má dioxygenasa DAO, která oxiduje IAA (Porco a kol., 2016; Zhang a kol., 2017). Navíc bylo zjištěno, že oxIAA není tvořena pouze přímou oxidací ale také hydrolyzou (Hayashi a kol., 2021; Brunoni a kol., 2019). Bylo ukázáno, že enzym DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION 1 (DAO1) oxiduje i aminokyselinové konjugáty IAA na oxIAA-aspartát (oxIAA-Asp) a oxIAA-glutamát (oxIAA-Glu). Tyto poté podléhají hydrolyze enzymem ILR1

za uvolnění neaktivní formy oxIAA. Navíc v případě nepřítomnosti *dao1* byl u rostlin *A. thaliana* změněný fenotyp zapříčiněn nahromaděním auxinu, naopak při nadměrné expresi tohoto genu nebyl fenotyp *A. thaliana* změněn (Hayashi a kol., 2021). Dále mutanti *dao* vykazovaly zvýšenou expresi GH3, jelikož u nich byla snižená degradace IAA a v rostlině docházelo k akumulaci aminokyselinových konjugátů. Byl také objeven inhibitor GH3 pojmenovaný KKI, který zvyšuje hladiny IAA, jelikož zabraňuje přeměně IAA na její aminokyselinov konjugáty. KKI dále inhibuje přeměnu oxIAA na 3-hydroxy-oxIAA (dioxIAA). Dle Hayashi a kol. (2021) vzniká oxIAA z IAA během vícestupňové biosyntézy zahrnující konjugaci, oxidaci i hydrolýzu pomocí GH3, DAO a IRL1: IAA ↔ IAA-Glu/IAA-Asp → oxIAA-Glu/oxIAA-Asp → oxIAA → DioxIAA.



Obr. 4. Schéma zapojení auxinových konjugátů do auxinového metabolismu (převzato a upraveno podle Ludwig-Müller, 2011).

2.2.1.2 Transport auxinu

U rostliny může být auxin rychle nespecificky transportován na dlouhé vzdálenosti z místa syntézy cévními svazky (floémem) nebo pomalým přesně regulovaným transportem mezi jednotlivými buňkami (polární auxinový transport). Pasivní i aktivní transport vede k tvorbě lokálních auxinových gradientů, které zapříčiňují tvorbu nových pletiv a orgánů (Adamowski a Friml, 2015).

Na krátké vzdálenosti je auxin z mezibuněčného prostoru přenesen polárním transportem přes specifické přenašeče do buňky. Poté putuje auxin z buňky zpět do

mezibuněčného prostoru za pomoci specifických auxinových transportérů. Transport do dalších buněk je prováděn stejným způsobem (Vieten a kol., 2005). Významnou roli taktéž hraje pH prostředí, ve kterém se auxin vyskytuje. V apoplastu (pH 5,5) má auxin protonovou formu (IAAH) a v neutrální cytoplazmě (pH 7,0) je ionizován (IAA^-). Ionizovaná forma může být přenášena pouze pomocí specifických auxinových přenašečů. Nedisociovaná forma IAAH vstupuje do buňky (vnitřní cytoplazmy) přes cytoplazmatickou membránu, díky své hydrofobní povaze, pasivní difuzí. V buňce dochází k disociaci na anionty IAA^- a vzniklá ionizovaná forma nemůže projít přes membránu (Li a kol., 2006). Tato forma je transportována z buňky pomocí specifických auxinových exportérů nebo ovlivňuje auxinové signální dráhy.

2.2.1.2.1 Auxinové přenašeče

Dodnes jsou známy čtyři skupiny proteinů specifických auxinových přenašečů: proteiny zajišťující tok auxinu do buňky, z rodiny AUXIN TRANSPORTER PROTEIN 1 (AUX1) a AUXIN TRANSPORTER-LIKE PROTEINS (LAX) (AUX1/LAX) (Bennett a kol., 1996). Dále proteiny umožňující tok auxinu z buňky, PGP (P-glykoproteiny) z proteinové rodiny ABC (ATP-BINDING CASSETTE), PIN-FORMED (PIN) (Okada a kol., 1991; Galweiler a kol., 1998) a PIN-LIKES (PILS) (Barbez a kol., 2012).

Proteiny z rodiny AUX1/LAX slouží pro transport auxinu přes cytoplazmatickou membránu do buňky. Bennett a kol. v roce 1996 popsal gen pro permeázu AUX1, který je součástí zmíněné rodiny transportérů. Poté byly nalezeny příbuzné permeázy LAX1, LAX2 a LAX3 (Parry a kol., 2001). Znalost, že AUX1 je schopný vázat molekuly IAA s vysokou afinitou byla potvrzena roku 2006 (Yang a kol., 2006). Symport jednoho nebo dvou vodíkových protonů umožňuje přenos auxinu přes membránu pomocí AUX1/LAX (Yang a kol., 2006). Proteiny AUX1 a PIN1 jsou na spodní straně cytoplazmatické membrány umístěny asymetricky, takže přenos auxinu IAA v rostlině je orientován akropetálně (Swarup a kol., 2001). Skutečnost, že protein AUX1 je schopen přenášet IAA byla potvrzena díky rostlinám s mutací *aux1*, u kterých byla naměřena menší koncentrace IAA ve vrcholu kořene v porovnání s rostlinami přirozeného fenotypu (wild-type).

Auxinové transportéry, proteiny z rodiny PIN, jsou charakteristické, tím že jsou schopny exportovat auxiny z buňky ven. Lokalizace proteinů PIN v cytoplazmatické membráně určuje směr polárního auxinového toku a důsledkem je polarita růstu orgánů i celého rostlinného organismu (Friml a kol., 2003). Pokud je *pin* mutovaný, směr transportu auxinu je změněn (Wisniewska a kol., 2006).

U *A. thaliana* je známo celkem osm proteinů PIN. PIN dělíme podle délky hydrofobní smyčky ve středu polypeptidového řetězce, která slouží k udržení na membráně do dvou tříd (Zažímalová a kol., 2007; Zažímalová a kol., 2010). Proteiny PIN (PIN1-PIN4 a PIN7), sloužící k přenosu přes plazmatickou membránu, mají dlouhou smyčku a řadíme je do první třídy. Proteiny druhé třídy (PIN5, PIN6 a PIN8) mají uprostřed polypeptidového řetězce smyčku zkrácené. Jejichž funkcí je transport z cytosolu do endoplazmatického retikula (Adamowski a Friml, 2015). Mutace *pin6* u *A. thaliana* způsobuje zpomalení růstu kořene a taktéž vývoj laterálních kořenů (Cazzonelli a kol., 2013). Pokud je *pin6* naopak exprimován ve vysoké míře, rostlina nemá kořenové vlásky a její kořeny jsou krátké a vlnité (Mravec a kol., 2009; Bosco a kol., 2012). Naopak rostliny s mutací v genu *pin1* jsou typické korunními lístky širšími než přirozené typy a neobsahují tyčinky ani semeník (Okada a kol., 1991). Gen *pin1* u *A. thaliana* kóduje protein PIN1, který obsahuje transmembránové úseky, které napomáhají k ukotvení proteinu na membráně. U některých dalších genů *A. thaliana* byly dále objeveny podobné úseky kódující protein PIN1, jako je PIN2 (*EIR1*) (Luschnig a kol., 1998). Rostliny s mutací v tomto genu ztrácí schopnost gravitační odpovědi (Friml a kol., 2002). PIN3 se podílí na gravitační odpovědi kořene. Mutace v *pin4* zapříčiní v kořenových meristémech změnu orientace buněčného dělení i buněčnou smrt. Směr apikálního a bazálního růstu v raném stádiu rostliny je také ovlivněna proteiny PIN, které jsou lokalizovány v embryu (Friml a kol., 2003; Ueda a kol., 2011).

2.2.1.3 Auxinová signální dráha

Dle Lavy a Estelle (2015) auxinová signální dráha auxinů vychází ze tří proteinových rodin:

- F-box TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN (TIR1/AFB) koreceptory auxinů,
- Auxin/INDOLE-3-ACETIC-ACID (Aux/IAA) transkripční represory,
- AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) transkripční faktory.

Tyto faktory jsou složeny z oblastí, které jsou nezbytné pro signalizaci auxinů, jejichž součástí jsou neméně důležité domény.

Auxin se při vstupu do buňky váže na jaderný proteinový receptor SCF^{TIR1} (Skp1-Cullin-F-box) a ovlivňuje genovou expresi. Součástí proteinové rodiny F-box TIR1/AFB je gen *TIR1* kódující protein AFB, který je propojen s molekulami CULLIN1 (CUL1) a ASKP1-LIKE PROTEIN (ASK1,2), které tvoří SCF^{TIR1} (Gray a kol., 2001). TIR1/AFB F-box je podjednotkou komplexu ubikvitin ligázy a má schopnost ubikvitinovat represorový protein Aux/IAA, které

jsou degradovány proteozomy 26S (Ramos a kol., 2001). Po degradaci Aux/IAA jsou uvolněny transkripční faktory ARF, které se váží na AuxRE (AUXIN RESPONSE ELEMENT) a regulují genovou expresi. Důsledkem je změna transkripce auxinem ovlivněných genů (Liu a kol., 1994; Chapman, Estelle, 2009; Boer a kol., 2014).

U modelové rostliny *Arabidopsis* rozeznáváme 29 Aux/IAA proteinů a 6 TIR/AFB. Jejich různé kombinace vykazují různou afinitu k jednotlivým auxinům (Ender a Strader, 2015). Při nízkých koncentracích auxinu je omezena aktivita ARF s proteiny Aux/IAA. V případě, že dojde ke zvýšení hladiny IAA, dochází k interakci F-box proteinu TIR1/AFB s Aux/IAA a vzniká auxinový koreceptor, na který se auxin přím váže.

Dále byl u *A. thaliana* objeven protein S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEINS2A (SKP2A) (Jurado a kol., 2010), na který se auxin může vázat. Protein SKP2A regulující buněčné dělení, patří mezi F-box proteiny SKP2. Po asociaci SKP2 a auxinu jsou transkripční faktory degradovány a je zahájen buněčný cyklus a dělení (Jurado a kol., 2008; Jurado a kol., 2010; Del Pozo a kol., 2007). Rostliny s mutací v *skp2* mají narušené dělení v meristému kořene, tedy růst kořene je kompletně inhibován (Jurado a kol., 2010).

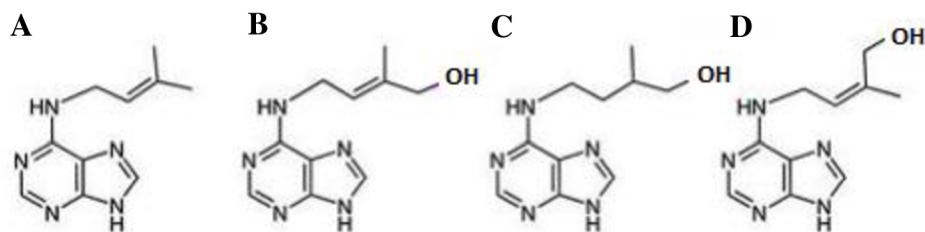
2.2.2 Cytokininy

Cytokininy (CKs) jsou významnou třídou rostlinných hormonů a byly poprvé objeveny v *in vitro* kultuře tabáku, kde hráli úlohu při dělení buněk. V padesátých letech minulého století byl prvním izolovaným cytokininem, 6-furfurylaminopurin (Miller a kol., 1955; Amasino 2005). Vzhledem k tomu, že tato sloučenina vyvolávala dělení buněk byl adeninový derivát označen jako kinetin (z *cytos* a *kinesis* – řecky buňka a pohyb). Kinetin se však nevyskytuje v rostlinách přirozeně.

V roce 1963 Letham provedl z nezralého endospermu kukuřiči seté (*Zea mays*) izolaci purinu s vlastnostmi kinetinu a objevil první přirozený CK. Byl určen jeho chemický strukturní vzorec, *trans*-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin a pojmenován jako zeatin (*trans*-zeatin, *tZ*) (Frébort a kol., 2011; Kang a kol., 2017).

Přirozené CK jsou sloučeniny pocházející z adeninu (Mok a Mok, 2001) a dělíme je na isoprenoidní, které mají v poloze N6 nasycený nebo nenasycený postranní řetězec a hydroxylovou skupinu, a cytokininy aromatické, které nesou aromatický postranní řetězec substituovaný v odlišných polohách aromatického kruhu adeninu (Spíchal, 2012). Fyziologický efekt a metabolismus CKs je ovlivněn chemickou strukturou adeninu, která umožňuje substituce v poloze N7 a N9. V rostlinách se přirozené CKs vyskytují jako volné báze,

nukleosidy, glykosidy (*O*-, *N*-glykosidy) a nukleotidy (Mok a Mok,2001; Sakakibara 2006). Jsou rozřazeny do čtyřech základních typů: *N*6-isopentenyladenin (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*) a dihydrozeatin (DHZ) (Obr. 5; Kamada-Nobusuda a Sakakibara, 2009).



Obr. 5. Strukturální vzorce isopentenyladeninu (iP; A), *trans*-zeatinu (*tZ*; B), dihydrozeatinu (DHZ; C), *cis*-zeatinu (*cZ*; D) (převzato a upraveno podle Hirose a kol., 2008).

Pokud isoprenoidní postranní řetězec není pozměněn, jedná se o isopentenylový typ, v případě hydroxylace postranního řetězce na koncovém uhlíku mluvíme o zeatinovém typu (Takei a kol., 2004). Syntetické CK se u rostlin přirozeně nevyskytují (Mok a Mok, 2001). Významnými isoprenoidními zástupci jsou iP a *tZ*, kteří patří mezi nejdůležitější, jelikož jsou velmi aktivní. Stereoizomer *cZ* je poněkud méně aktivní. Do skupiny aromatických cytokininů řadíme kinetin, *N*6-benzyladenin (BA) a jeho hydroxylové deriváty (topoliny) a methoxyderiváty (Strnad, 1997). Kromě přirozeně se vyskytujících CK jsou známy i syntetické deriváty odvozených od močoviny a thiomčoviny (Feng a kol., 2017).

CKs jsou u rostlin zapojeny do řady procesů spojených s růstem a vývojem. Stimulují růst prýtu, laterálních kořenů (De Smet a kol., 2015) podporují zvětšování buněk. Ovlivňují dělení buněk, organogenezi a potlačují apikální dominanci a oddalují senescenci (Frébort a kol., 2011; Kamínek 2015; Davies, 2010). Účinky na růst kořenů záleží na přítomné koncentraci. CKs jsou taktéž potřebné pro udržování meristémové aktivity kořene (Perilli a kol., 2010). Dále se podílí na kontrole apoptózy, která probíhá během klíčení, vývoji a senescenci semen. Kunikowska a kol. (2005) zjistili, že kinetin a BA při vysokých koncentracích spouští buněčnou smrt u rostlin s tím rozdílem, že kinetin indukuje apoptózu v živých rostlinných pletivech, zatímco BA je účinný v kultuře rostlinných buněk. Cytokinininy se vyskytují také u bakterií, hmyzu i člověka, kde hrají roli při účinnosti a přesnosti transkripce kodonů, začínajících uracilem.

2.2.2.1 Biosyntéza CKs

Existují dvě cesty, které jsou využívány pro biosyntézu isoprenoidních cytokininů:

První biosyntetická dráha je odvozena od isopentenylace volných adeninových nukleotidů (Davies, 2004). Prvním krokem biosyntézy CK je reakce zprostředkována enzymy ATP/ADP-isopentenyltransferasami (IPT). U *A. thaliana* bylo popsáno devět genů z této rodiny (*AtIPT1 – AtIPT9*) (El-Showk a kol., 2013; Kakimoto, 2001; Takei a kol., 2001). IPT katalyzuje přenos DMAPP (produkt mevalonátové dráhy, cytosol eukaryot) nebo HMBDP (metabolit MEP dráhy u bakterií) (Hwang Sakakibura; 2006) na ADP nebo ATP za vzniku dvou typů CK (isopentenyl ribotidy). Z DMAPP vznikají cytokininy iP-typu a z HMBDP vznikají tZ-typy. Cytochrom P450 monooxygenáza provádí hydroxylaci a z iP prekurzorů vznikají tZ – nukleotidy (Zalabák a kol., 2014; Takei a kol., 2004; Frébort a kol., 2011). Dále může být CK biosyntéza katalyzována pomocí fosforibohydrolasy (vzniká exprimací *Lonely guy* (LOG) genu). V přítomnosti LOG vznikají aktivní formy CK přímo z jejich ribotidů (Hirose a kol., 2008, Frébort a kol., 2011). Je také možná dvoukroková cesta, která vede ke tvorbě aktivních forem a dochází během ní k defosforylaci a deribosylaci. CKs mohou podléhat izomeraci a tvořit reverzibilní/ireverzibilní konjugáty s cukry a aminokyselinami modifikací adeninové části nebo postranního řetězce. Některé konjugáty jsou méně aktivní, jiné slouží jak zásobní formy (Bajguz a Pitrowska 2009).

Druhá biosyntetická dráha je nepřímá. Zahrnuje syntézu cZ z DMAPP a degradované tRNA za účasti enzymu tRNA-isopentenyltransferasy (*AtIPT2* a *AtIPT9*). Produktem je *cis*-zeatin ribotid (Miyawaki a kol., 2006). Prvním krokem je isopentenylace zbytku adeninu tRNA za účasti enzymu IPT (Taller, 1994). tRNA je postupně degradována na konjugáty CKs a volné formy cZ (Mok a Mok, 2001).

2.2.2.2 Metabolismus a transport CKs

Hladiny CKs v rostlinách jsou regulovány nejen biosyntézou ale i metabolickými přeměnami, jako je přeměna CKs na neaktivní produkty degradace, zásobní formy nebo sloučeniny, podobné CKs s pozměněnou aktivitou. Transportní formy představují CK ribotidy a ribosidy (Lomin a kol., 2015).

Modifikace může probíhat dvěma způsoby, a to modifikací adeninového cytoskeletu nebo za účasti specifických enzymů, které ovlivňují postranní řetězec (Davies, 2004; Spíchal, 2012).

Enzymy, které se účastní přeměny adeninového cytoskeletu jsou 5' nukleotidasa, adenosinnukleotidasa, adeninfosforibosyltransferasa (APT), adenosinkinasa (ADK) a nukleosidfosfatasa, které rozpoznají adenosin a přemění volné CK báze, ribosidy a ribotidy (Spíchal, 2012). Enzym adenosinfosforylasa přeměňuje volné CKs na nukleosidy (Chen a Eckert, 1977). APT tvoří CK ribosidy z volných CKs (Allen a kol., 2002). *N*-glykosylace u všech typů CKs je možná na pozici *N7* a *N9* za účasti *N*-glykosyltransferasy, při které jsou CKs inaktivovány (Entsch a kol., 1979; Davies, 2010; Brzobohatý a kol., 1993). *O*-glukosylace isoprenoidního řetězce *tZ* je prováděna *O*-glukosyltransferasami (Brzobohatý a kol., 1993). Enzym, který je schopen převést glukosidy na aktivní CKs je β -glukosidasa, ale v rostlinách jsou přítomny pouze *O*-glukosidy jako substráty tohoto enzymu. *O*-glukosidy jsou tedy zásobní formy CKs (Frébort a kol., 2011), naopak *N*-glukosidy s *cZ* jsou považovány za málo aktivní formy CKs (Gajdošová a kol., 2011; Hluska a kol., 2016; Kamínek, 1987; Schmitz a Skoog 1972). Dále je možná reakce alaninu na pozici *N9* prováděná enzymem β -(9-cytokinin)-alanin syntetasou (Entsch a kol., 1983). Cytokininová forma, *tZ*, může být pomocí redukce přeměněna na dihydrozeatin (DHZ) (Martin a kol., 1989). DHZ není substrát pro CKX, takže DHZ není degradován (Davies, 2010).

Role transportu CKs není dodnes zcela známá. Místo působení CK není vždy stejné jako místo syntézy, a proto musí být CK někdy transportovány do cílových buněk difuzí nebo aktivními transportními mechanismy (Kang a kol., 2017). Volné CKs primárně vznikají v apikální meristému kořene, mladých listech a embryu. Transport CKs není zcela tak dobře prozkoumán jako transport auxinů. Rozdíl lze nalézt v distribuci CKs na dlouhé vzdálenosti. CK *tZ*-typu jsou transportovány xylémem a CK *iP*-typu naopak floémem, to ukazuje zapojení unikátního transportního systému (Bishopp a kol., 2011). V xylému dochází k akropetálnímu transportu (transpirační tok). V xylému se CKs vyskytují v aktivní nukleobázové formě a v inaktivní ribosidové konjugované formě. V *A. thaliana* je hlavním exportérem CKs floémem ATP-vážíci transportér (ABC transportér) ABCG14 (Kang a kol., 2017).

Další transportéry, které u CKs známe, jsou ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT) a purinové permeasy (PUP) (Muraro a kol., 2011). Při transportu přes membránu se domníváme, že jsou zapojeny transportéry PUP, které jsou u *A. thaliana* označeny AtPUP1 a AtPUP2). Tyto transportéry ale nemůžou být funkční kvůli kinetice, jelikož fyziologické hladiny CKs a purinů jsou rozdílné. Dalšími specifickými transportéry pro CKs jsou PUP14 (Zurcher 2016). Pouze CK nukleosidy mohou být transportovány specifickými transportéry ENT (Kudo a kol., 2010). U *A. thaliana* se vyskytuje osm genů z rodiny ENT (*AtENT1-*

AtENT8) (Li a kol., 2003). Předpokládáme, že na transport CKs je potřeba mnoho buněčných importérů a exportérů, jen mechanismus dodnes není zcela identifikován.

2.2.2.3 Degradace CK

Degradace je zprostředkována cytokinin dehydrogenasami (flavoproteiny) (Frébort a kol., 2011), dříve cytokinin oxigenasou – CKX (Frébortová a kol., 2004). CKX ireverzibilně katalyzují štěpení postranních řetězců a konečnými produkty jsou deriváty adeninu a aldehydy (Zalabák a kol., 2014). Enzym CKX je u *A. thaliana* kódován geny *AtCKX1* až *AtCKX7* (Galuszka a kol., 2007). Jednotlivé izoformy se liší aktivitou i substrátem, který štěpí. Aktivita CKs je regulována právě degradací CK.

2.2.3 Propojení auxinů a cytokininů

Skutečnost, že mezi jednotlivými skupinami fytohormonů je určitá spolupráce a že se podílí na regulaci stejného fyziologického procesu, byla prokázána v několika studiích (Höxtermann, 1997). Dříve byly cytokininy považovány za antagonisty auxinů, nicméně bylo zjištěno, že jejich spolupráce je mnohem složitější a rozmanitější (Schaller a kol., 2015).

Za účasti auxinů cytokininy stimulují dělení buněk. Auxiny jsou spolu s cytokininy základními složkami pro tkáňové kultury. V případě pěstování rostlinných explantátů, jsou v určitém poměru přidávány auxiny a CKs pro růst a diferenciaci rostlinného pletiva (Skoog a Miller, 1957). Tvorba kalusu je započata právě rovnovážnou hladinou těchto fytohormonů (Skoog a Miller, 1965). Používání exogenních auxinů pro podporu růstu rostliny způsobuje pouze mírnou a krátkodobou stimulaci. Dnes jsou využívány v zahradnictví ke stimulaci zrání plodin a zakořeňování řízků. U některých typů semenáčků může mít vnější aplikace auxinu inhibiční účinky. Koncentrace, která stimuluje prodlužovací růst u rostliny je 10^{-6} až 10^{-5} M (Taiz a Zeiger, 2002).

Apikální dominance je ovlivněna poměrem těchto dvou fytohormonů (CKs apikální dominanci inhibují, auxiny ji stimulují), což bylo potvrzeno experimenty u rostliny *A. thaliana*, které měly odebrány nebo upraveny geny pro tyto fytohormony (Tanaka a kol., 2006). Taktéž jejich vzájemné působení můžeme pozorovat na omezeném vlášení kořene, způsobené vysokými hladinami CKs, kdy dochází k potlačení transkripce PIN proteinů (Laplaze a kol., 2007).

Navíc auxiny jsou významně zapojeny do biosyntézy CKs regulací exprese *ipt* genů. Po exogenním přidání auxinu bylo 4 hodiny po aplikaci u kořenů *A. thaliana* zaznamenána zvýšení transkripce genů *IPT5* a *IPT7*, což bylo zjištěno pomocí Real-time PCR. Naopak rostliny *A. thaliana*, které byly vystaveny hodinové exogenní aplikaci auxinu, vykazovaly restriktci tvorby CKs (Miyawaki a kol., 2004). Nicméně bylo zjištěno, že u *A. thaliana* cytokininy povzbuzují i tvorbu *IPT8* v dělicích se mladých pletivech a tímto se zapojují do regulace biosyntézy IAA (Jones a kol., 2010). Mezi auxiny a CKs tedy existuje komplexní síť, kterými tyto látky mezi sebou kooperují. Hladina fytohormonů je rostlinou regulována. Auxiny ovlivňují tvorbu CKs okamžitě, a proto jsou auxiny využívány k regulaci CKs. Naopak působení CKs na biosyntézu auxinů je pomalejší a účinek se neprojeví ihned, rostlina nemůže reagovat rychle a okamžitě, ale účinek je naopak dlouhodobější (Nordstrom a kol., 2004).

2.3 Apoplastická a symplastická dráha

V rostlině jsou dvě hlavní cesty, kterými je voda a minerální látky transportovány mezi jednotlivými buňkami. Jedná se o apoplastickou a symplastickou cestu.

Apoplast, neboli mezibuněčný prostor, je důležitou součástí rostliny, protože rozvádí minerální látky (ionty) a živiny rozpustné ve vodě po celém rostlinném těle. Apoplastická cesta probíhá bez spotřeby energie, je uskutečňována díky koncentračnímu spádu, hromadným tokem a je rychlejší než symplastická dráha. Apoplastická dráha probíhá od kořenů k povrchu listů. Apoplastem je také myšlen roztok, který omývá buňky. V kořenech jsou velké mezibuněčné prostory a rostlina musí mít kontrolu nad příjmem minerálních látek i vody, a proto je ve většině kořenů apoplastická dráha blokována Caspariho proužky. Buňky endodermis se skládají z řetízků, které jsou těmito proužky vyztuženy. Caspariho proužky jsou hydrofobní svazky, které zabraňují transportu vody apoplastem (Canny 1995), kontrolují příjem vody a zabraňují nadměrnému zavodnění rostliny (aby nedošlo k inhibici respirace kořenů). V kořenech tedy většinou probíhá dráha symplastická (Zhan a kol., 2017). Apoplast se také zapojuje při obraně rostliny proti patogenům (Yu a kol., 1999). V listech je apoplastická tekutina složena z malátu, citrátu a askorbátu (kyseliny) a vápenatých, draselných a hořečnatých kationtů. Jsou zde také obsaženy anorganické anionty jako je síranový a hydrogenuhličitanový aniont (Lopez-Millán a kol., 2001).

Symplast, neboli tekutina uvnitř buněk, je uspořádaný, propojený prostor v rostlinách, který je tvořen cytoplazmami buněk, představujícími komplexní síť podél celé rostliny. Pro symplastickou cestu je vyžadována aktivace energií a tato cesta probíhá na delší vzdálenosti.

Transport mezi buňkami je prováděn pomocí plazmodesmat (propojení mezi cytoplazmou a buňkami), které umožňují přenos nízkomolekulárních látek, tedy cukrů, aminokyselin nebo iontů (Robert a Friml, 2009). U symplastu se uplatňuje difúze a přenos látek do buňky iontovými přenašeči. Symplastická cesta má své uplatnění pro transport látek kořeny. Symplastická cesta probíhá v buňkách endodermis (na povrchu středního válce – pericyklu). Symplastem je také myšleno prostředí za cytoplazmatickou membránou uvnitř buněk.

2.4 Regulátory růstu

Regulátory jsou organické sloučeniny, které vznikají v určité části rostliny, ze které jsou transportovány do dalších částí rostliny, kde spouští odpověď již při velmi nízké koncentraci. Působení růstových regulátorů může mít na rostlinu stimulační i inhibiční účinek. Regulátory povzbuzující růst ve fyziologických koncentracích jsou označovány jako stimulatory a naopak ty, které růst rostliny brzdí, jako inhibitory. Velmi důležitou roli hraje koncentrace, při které regulátor působí. Jednotlivé regulátory se mohou mezi sebou ovlivňovat, a to synergicky nebo antagonisticky (Šebánek a kol., 1983). Rozlišujeme dvě skupiny, a to organické a syntetické (Délye a kol., 2013; Quareshy a kol., 2017).

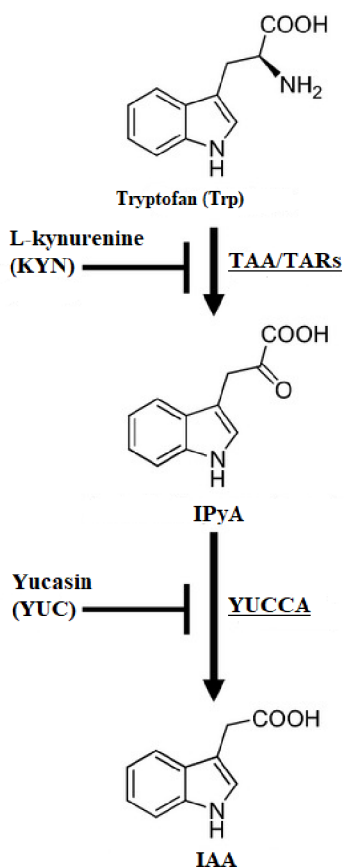
Syntetické regulátory rostlin z kategorie herbicidů jsou sloučeniny, které měly v minulosti primárně své uplatnění v zemědělství pro odstraňování plevelů. Používání těchto látek bylo kvůli jejich vysoké toxicitě (škodlivé účinky na lidské zdraví) omezeno nebo plně zakázáno. Syntetické regulátory, ať už inhibitory nebo stimulatory růstu, jsou často odvozeny od rostlinných hormonů. Inhibitory se mohou podílet na zástavě metabolických drah rostlinných hormonů. Ovlivňují růst, vývoj kořenů i nadzemních částí rostliny. Rostliny si během dlouhodobé exogenní aplikace herbicidu mohou vytvořit rezistenci na danou látku pomocí mechanismu target-site resistance (TSR), stimující up-expresi cílového proteinu. TSR zabraňuje vazbě herbicidu na exprimovaný cílový protein. Druhým mechanismem je non-target resistance (NTSR), který mění strukturu vazebního místa herbicidu (Délye a kol., 2013; Quareshy a kol., 2017).

V zemědělství jsou využívány jak cytokininové syntetické inhibitory, tak auxinové stimulatory/inhibitory. Ve většině případů využíváme auxiny syntetické, protože IAA není příliš stálá. K syntetickým látkám s účinkem auxinů, které jsou dnes nejvíce využívané a jsou součástí herbicidů, řadíme kyselinu 2,4-dichlorfenoxyoctovou (2,4-D) a kyselinu 1-naftyloctovou (NAA) (Taiz a Zeiger, 2014; Korasick a kol., 2013). Dalšími auxinovými syntetickými inhibitory jsou inhibitor auxinového transportu, kyselina N-1-(naftyl)ftalamová

(NPA) (Zhang a kol., 1995), Picloram (aktivní syntetický auxin derivát kyseliny pikolinové) nebo Dicamba (derivát kyseliny benzoové) (Korasick a kol., 2013). Mezi inhibitory biosyntézy auxinu patří Yucasin (YUC) a Kynurenin (KYN), jejichž funkce bude popsána v následující kapitole.

2.4.1 Inhibitory biosyntézy IAA

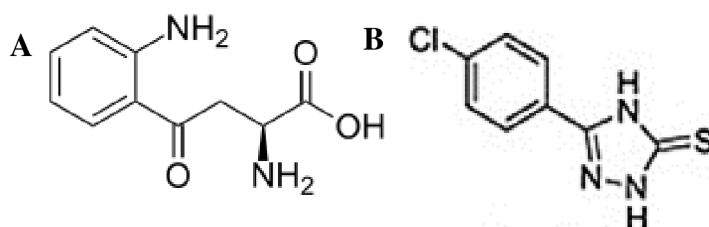
Pro biosyntézu aktivního auxinu bylo popsáno několik metabolických drah. Jak již bylo zmíněno, hlavní cestou u většiny rostlin představuje IPyA dráha (McSteen, 2010; Čao, 2014). V prvním kroku je Trp přeměněn enzymy TAA1, TAR1/TAR2 na IPyA, poté následně enzym YUCCA katalyzuje přeměnu IPyA na IAA (Brumos a kol, 2014; Čao, 2014) (Obr. 5). Mechanismus, kterým je regulována hladina IAA v buňce není stále zcela jasný, jelikož všechny kroky biosyntézy, transportu a inaktivace nebyly zcela objasněny.



Obr. 5. Syntéza IAA – metabolická dráha IPyA. Využité enzymy TAA/TARs, YUCCA a inhibitory L-Kynurenin (KYN), Yucasin (YUC). (Převzato a upraveno podle Nishimura a kol. 2014).

Biosyntéza IAA může být inhibována určitými látkami. Malá molekula L-kynurenin (KYN; Obr. 6) je metabolitem aminokyseliny L-tryptofanu a zároveň jeden ze silných auxinových inhibitorů biosyntézy, který se váže na skupinu proteinů TAA/TARs, které inhibuje, ale ne na jiné skupiny aminotransferas. Po aplikaci KYN, dochází v jádře k potlačení akumulace TF faktoru ETHYLEN INSENSITIVE3 (EIN3), takže míra biosyntézy auxinu v kořenech je snížena (He a kol., 2011).

Expresí genů kódujících enzymy IPyA dráhy je regulována zvýšenými nebo sníženými hladinami aktivního auxinu. V případě, že jsou syntetické auxiny (NAA, 2,4-D) exogenně aplikovány na sazenice *A. thaliana*, snižuje se expresí enzymů TAR2 (Trp → IPyA) a YUC1, YUC2, YUC4 a YUC6 (IPyA → IAA). Výsledkem tohoto ošetření je snížení endogenní hladiny IAA. Biosyntetický auxinový inhibitor KYN zvyšuje expresí genů *YUCCA* a dochází ke zvýšení endogenní hladiny IAA. Expresí genů *YUCCA* je tedy regulována hladinou aktivních forem auxinu. Pokud je na sazenice *A. thaliana* exogenně aplikován současně KYN a IPyA, dochází ke zvýšení hladiny IAA (He a kol., 2011). Při exogenní aplikaci 2,4-D, endogenní hladina IAA klesá ve srovnání se sazenicemi ošetřenými pouze IPyA. Přeměna IPyA na IAA je zvýšena při nižších hladinách auxinu a potlačena v nadbytku auxinu (Suzuki a kol., 2015).

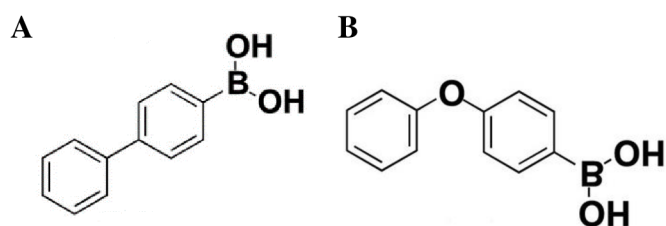


Obr. 6. Molekuly auxinových inhibitorů biosyntézy. A: L-kynurenin (KYN), B: Yucasin (YUC) (YUC-převzato a upraveno podle Nishimura a kol., 2014).

V biosyntéze IAA hrají významnou roli také enzymy *YUCCA*, které omezují rychlost IPyA dráhy a zapojují se do vývojových procesech rostliny skrze regulaci hladin IAA v buňce. Auxinový inhibitor těchto enzymů, 5-(4-chlorfenyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (Yucasin; Obr.6) (Nishimura a kol., 2014), se uplatňuje při vysokých koncentracích IAA v rostlině, nadměrné expresí *YUCCA*, ale nemá zásadní vliv (inhibiční aktivitu) na fenotyp kořene. Bylo zjištěno, že za inhibici enzymu *YUCCA* je zodpovědná složka Yucasinu 1,2,4-triazole-3-thiol. Zvýšení vazby derivátu YUC na *YUCCA* je způsobeno modifikací fenylové složky (5-(4-chlorfenyl)-4H). Z tohoto důvodu byla modifikována aromatická složka a syntetizovány analogy YUC,

kteře by měly fenotyp ovlivňovat ve větší míře než YUC. Jedním z nich je stabilnější a silnější inhibitor analog YUC, difluorovaný Yucasin (YDF), jehož cílem je také enzym YUCCA. YDF tedy blokuje také biosyntézu IAA v rostlině. YDF mění fenotyp u rostlin s nedostatkem auxinů. *In vitro* má ale mnohem menší aktivitu než samotný YUC (Tsugafane a kol., 2017; Nishimura a kol. 2014)

Kromě inhibitoru biosyntézy auxinu YUC jsou známé další inhibitory vyskytující se v dráze IPyA. Jedná se o L- α -aminooxyfenylpropionovou kyselinu (AOPP) a její derivát pyruvamine (PVM), které inhibují enzymy TAA. TAA je enzym, který je závislý na pyridoxal fosfátu (PLP). PLP má aminooxy složku, která váže PLP, a tak inhibuje tvoření oximu PLP se substrátem (Tsugafune a kol., 2017). Kakei a kol. (2015) prokázal, že deriváty YUC, 4-bifenyloboroniková kyselina (BBo) a 4-fenoxyfenylboroniková kyselina (PPBo) (Obr. 7) inhibují YUCCU a potlačují tvorbu IAA (u *A. thaliana* se projeví fenotyp s nedostatkem auxinu).



Obr. 7. Deriváty Yucasinu – 4-bifenyloboroniková kyselina (BBo; A) a 4-fenoxyfenylboroniková kyselina (PPBo; B). (Převzato a upraveno podle Kakei a kol. 2015).

Polární transport auxinu je inhibován syntetickým auxinem, NPA, který inhibuje gravitropické a fototropické reakce, neboť blokuje funkci auxinového exportního přenašeče (Rubery, 1990). Účinek auxinu závisí na jeho místní biosyntéze a polárnímu transportu mezi jednotlivými buňkami, kde hrají roli exportní proteiny PIN (Petrášek a Friml, 2009; Adamowski a Friml, 2015; Bennett, 2014). Fakt, že je transport auxinu velmi důležitý ve vývoji rostlin, bylo zjištěno při použití inhibitorů polárního transportu auxinu (PAT), kam řadíme právě NPA. Pokud je NPA exogenně aplikována dochází k poruše vegetativního i reprodukčního vývoje a embryogenezi (Wu a McSteen, 2007).

2.5 Stanovení rostlinných hormonů

V rostlinách se fytohormony nacházejí v nízké koncentraci, což má za následek, že je jejich kvantitativní i kvalitativní stanovení poměrně složité. Rostlinný extrakt je komplexní matrice, která obsahuje také balastní látky (sacharidy, lipidy, proteiny), které se mnohdy nachází ve vyšších koncentracích než analyzované fytohormony. Proto je nutné použít správné množství rostlinného materiálu, využít vhodné postupy extrakce cílové látky (fytohormonu), purifikační metody (izolace od interferujících/abundantních látek) a propojit je s koncovými analytickými metodami (Fu a kol., 2011; Tarkowská a kol., 2014). Velmi důležité je skladování rostlinného materiálu při nízké teplotě, aby nedocházelo k degradaci cílových látek. Pro stanovení analytů se využívá plynová nebo kapalinová chromatografie i kapilární elektroforéza, které jsou často spojeny s hmotnostní spektrometrií.

2.5.1 Extrakce fytohormonů

Pro identifikaci a kvantifikaci musí být rostlinný materiál homogenizován, tak aby došlo k rozrušení buněčné stěny (Harrison, 2011). Je možné využít homogenizaci v třecí misce pomocí kapalného dusíku (-196°C) nebo vibrační kulový mlýnek (ke vzorku jsou přidány homogenizační kuličky). Poté je ke zhomogenizovanému materiálu přidáno extrakční činidlo (Ljung a kol., 2004; Davies, 2010) a cílové látky jsou extrahovány po stanovenou dobu. Účinnost extrakce můžeme dále zvýšit ultrazvukem. Centrifugace s úhlovým rotorem, chlazeným na 4°C , nám pomůže oddělit zbytky rostlinného pletiva ze suspenze.

Účinnost extrakce je závislá na formě extrakčního činidla. Extrakčním činidlo by mělo dobře rozpouštět cílové látky a minimalizovat extrakci interferujících (abundantních) látek (Tarkowská a kol., 2014). Vhodné je činidlo, které bude zabraňovat degradačním reakcím fytohormonů (např. Bielekého pufru) (Laloue a kol., 1974) a jeho polarita by měla být podobná polaritě analyzované látky (Fu a kol., 2011).

Pro extrakci fytohormonů se využívají pufrы s neutrálním pH, methanol, aceton, voda nebo Bielského činidlo (Bielski, 1964; Bai a kol., 2010). Ztráty jsou monitorovány pomocí interních standardů (IS), značených stabilními izotopy, které jsou ke vzorku přidávány v extrakčním kroku (Ljung a kol., 2004). Je nutné podotknout, že extrakce musí být prováděna při nízkých teplotách (4°C) pro minimalizaci nechtěných degradačních reakcí.

2.5.2 Purifikace fytohormonů

Vzorky po extrakci obsahují balastní látky, které mohou reagovat s analytem a zásadním způsobem ovlivňovat analýzu. Proto je nutné provést purifikační proces, během kterého jsou interferující látky odstraněny. Tento krok je pro samotné stanovení rostlinných hormonů velmi důležitý (Novák a kol., 2017; Du a kol., 2012).

Purifikační metody se dělí podle typu finální analýzy (kvalitativní nebo kvantitativní) a výběru analytického přístroje. Nejvíce rozšířené techniky jsou extrakce kapalina-kapalina (LLE) a extrakce na pevné fázi (SPE) (Porfirio a kol., 2016). U těchto metod je velkou výhodou možnost optimalizace, jednoduchost a velmi široké uplatnění s možností automatizace.

Princip SPE: cílem je na sorbentu, který je umístěn v SPE koloně, zachytit analyt a vymýt interferující látky. SPE kolony obsahují pevný sorbent, na který je navázána například reverzní fáze nebo iontoměnič (katex/anex) (Tarkovská a kol., 2014). Dle typu sorbentu je analyt interagován se sorbentem slabými vazebnými interakcemi (vodíkové můstky, Van der Waalsovy síly), hydrofobními, nepolárními i iontovými interakcemi nebo na základě velikosti částic. Výběr sorbentu je řízen podle fyzikálně-chemických vlastností analytu a je důležitý pro jeho správnou izolaci. Při obecném postupu je vzorek nanesen na aktivovaný sorbent a interferující látky jsou vymývány zvoleným rozpouštědlem. Následuje eluce cílových hormonů rozpouštědlem, který rozruší vazbu mezi sorbentem a analytem.

U fytohormonů se nejčastěji využívá extrakce na reverzní fázi (C18) (Izumi a kol., 2009) nebo polymerní reverzní fázi (např. Oasis HLB). Dále jsou využívány polymerní sorbenty se smíšeným mechanismem zachytu (Oasis MCX nebo Oasis MAX), které jsou kombinací reverzní fáze a některého iontoměniče. Konvenční SPE techniky vyžadují větší množství biologického materiálu (20-200 mg čerstvé hmoty) a jedná se zdlouhavý proces. Proto byly zavedeny techniky mikroextrakční – mikroextrakce na pevné fázi a disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina. Např. auxiny mohou být také extrahovány pomocí Stage-tips (μ SPE-PT), kde kolonou je plněná pipetovací špička (Pěňčík a kol., 2018).

2.5.3 Stanovení pomocí LC–MS/MS

Po extrakci a purifikaci můžeme přistoupit k samotné analýze, kdy analyzujeme jeden nebo více fytohormonů. Dlouhodobě preferovanými metodami pro stanovení fytohormonů jsou v biologii chromatografické techniky (v současnosti nejrozšířenější kapalinová chromatografie), které můžeme kombinovat s různými detektory (např. hmotnostní spektrometr) (Novák a kol., 2017). Kromě těchto metod využíváme i tlakovou kapilární

elektrochromatografie nebo micelární elektrochemickou kapilární chromatografií (Porfirio a kol., 2016).

Princip chromatografie: Vzorek (látky), které jsou rozpuštěny v mobilní fázi (MF) separujeme na jednotlivé složky. MF prochází stacionární fází (SF) a na základě rozdělovacích koeficientů dochází k zachytávání látek na SF (interakce MF a SF). MF může být kapalina (kapalinová chromatografie, LC), nebo plyn (plynová chromatografie, GC). SF může být pevný sorbent nebo nemobilní kapalina (Fu a kol., 2011).

Pro identifikaci a kvantifikaci fytohormonů byla dříve využívána GC-MS. Tato technika je však zdlouhavá (např. z důvodů nutné deprivatizace analytů), a proto byla později upřednostněna LC-MS analýza (Novák a kol., 2003). Nověji byly zařazeny do stanovení fytohormonů také metody, které poskytují větší účinnost separace, vyšší rychlost a citlivost i málo zastoupených nízkomolekulárních látek v rostlinné matrici (Nguyen a kol., 2006; Novák a kol., 2014). Mezi tyto metody patří mikrokapilární kapalinová chromatografie nebo ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC), která je odolnější vůči vyšším zpětným tlakům.

Analytickou metodou, která je hojně využívána pro identifikaci tak kvantifikaci fytohormonů je hmotnostní spektrometrie (MS). Dnes je UHPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií v tandemovém uspořádání často využívána pro analýzu auxinů (Pěničik a kol., 2009; Novák a kol., 2012), cytokininů (Novák a kol., 2008; Svačinová a kol., 2012), jasmonátů (Liu a kol., 2010; Floková a kol., 2014), i pro stanovení více skupin zároveň (Kojima a kol., 2009; Šimura a kol., 2018).

Princip MS: Rozlišujeme různé typy hmotnostních spektrometrů, které se skládají ze tří částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Analyty, které byly separovány (GC nebo LC), jsou vpraveny do iontového zdroje a pomocí zvolených ionizačních technik (ionizace elektrosprejem nebo chemické ionizace za atmosférického tlaku) dochází k ionizaci látek (Tarkowski a kol., 2009). Ionty jsou poté ve svazku poslány do hmotnostního analyzátoru (kvadrupóly, analyzátor doby letu nebo orbitrap), kde jsou rozděleny dle poměru hmoty ku náboji (m/z).

Pro zlepšení selektivity využíváme tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS). Jedním z typů MS/MS uspořádání je trojitý kvadrupól, kdy na prvním analyzátoru je vybrán prekurzorový (základní) ion a odstraněny rušivé látky. Poté dochází k fragmentaci v kolizní cele na finální produktové ionty, které vstupují přes třetí kvadrupól na detektor (Pan a Wang, 2009; Ljung a kol., 2004). MS/MS se často kombinuje s GC a LC, jelikož je tato metoda velmi

citlivá a selektivní, a navíc dokáže pracovat i se složitou biologickou maticí (Novák a kol., 2017).

Nejrozšířenějším MS skenovacím módem pro citlivou LC-MS/MS kvantifikaci fytohormonů je selektivní záznam jedné nebo více reakcí (*selected reaction monitoring*, SRM, popř. *multi reaction monitoring*, MRM). Při stanovení cytokinů takovýto způsob detekce umožňuje sledovat signál několika charakteristických fragmentací současně (Tarkowski a kol., 2004). Tento způsob detekce je ale nedostatečný v případě detekce cytokininových izomerů (stejná MS/MS fragmentace). Proto je důležitá dokonalá chromatografická separace, která zvýší rozlišení kritických párů izomerních píků a umožní jejich přesné stanovení (Svačinová a kol., 2012).

Při kvantifikaci auxinů se poměrně často setkáváme s problémy, z důvodu oxidace při extrakci a nízké návratnosti při purifikaci (Barkawi a kol., 2010). Z tohoto důvodu, pro odhalení případných ztrát jsou před extrakcí v určitém množství přidávány izotopicky značené látky (interní standardy – IS), které mají podobné fyzikálně chemické vlastnosti jako analyt. Pokud tedy během purifikace dojde ke ztrátám, nachází se analyt i IS ve stejném množství. Pro kvantifikaci auxinů se nejčastěji využívají izotopicky značené standardy pomocí pěti až šesti stabilních izotopů ^2H nebo ^{13}C . Jelikož při LC-MS/MS je hmotnostní rozdíl mezi analytem dostačující, přesněji řečeno IS je pětikrát až šestkrát těžší než stanovovaný analyt, nedochází tak k překryvu izotopických píků. Jsme tedy schopni zřetelně rozlišit IS od analytu a z HPLC-MS/MS chromatogramu získáme velikost plochy píků (jak izotopicky značené, tak analyzované látky), tyto plochy porovnáváme a vypočítáme koncentraci výsledného analytu.

Dále prekuzor IAA, IPyA, která je v roztoku nestabilní a začíná se neenzymaticky přeměňovat na IAA (Bentley a kol., 1956) a proto je potřeba provést jeho derivatizaci již po extrakci. Je popsáno několik způsobů rychlé a jednoduché kvantifikace IPyA založené na derivatizaci karbonylové skupiny hydroxylaminem na oxim za použití 2,4-dinitrofenylhydrazonem (Mashiguchi a kol., 2011) nebo reakce cysteaminu s aldehydickou skupinou IPyA za vzniku thiazolinového kruhu (thiazolidinu) (Novák a kol., 2012).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Přístroje a pomůcky

100 µl sítko Collector Tissue Sieve – Thermo Fischer Scientific (USA)
Analytické váhy – Satorius Weighing Technology GmbH (Německo)
Autokláv Labo MLS-3781L – Sanyo (Japonsko)
Centrifuga Avanti TM 30 – Beckman Coulter (USA)
Centrifuga Alegra 64R – Beckman Coulter (USA)
Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge – Thermo Fischer Scientific (Německo)
Falkonové zkumavky (5 ml, 15 a 50 ml) – VWR (USA)
Injekční stříkačky (2 ml) – VWR (USA)
Konfokální mikroskop Zeiss LSM 800 – Zeiss (Německo)
Kulový mlýnek MM301 – Retsch GmbH (SRN)
Laboratorní sklo – odměrný válec, kádinky, skleněné zkumavky – Fisherbrand (USA)
Laminární box Heraguard™ ECO – Thermo Fischer Scientific (USA)
LC kolony – UPLC® BEH Shield RP18 (150 x 2,1 mm, velikost částic: 1,7 µm) – Waters (USA); Kinetex C18 (50 x 2,1 mm, velikost částic 1,7 µm) – Phenomenex (USA)
Magnetická míchačka MM7 – Fisherbrand (USA)
Membránová vývěva Mini Laboport Vacuum Pump – KNF Neuberger GmbH (Německo)
Micro Spin Filter (Nylon, 0,2 µm) – Chromservis s.r.o. (Česká republika)
Mikrozkumavky – Eppendorf (Německo)
Oasis® HLB kolony (30 mg/1 ml) – Waters (USA)
Oasis® MCX kolony (30 mg/1 ml) – Waters (USA)
pH metr Oakton® pH 700 Benchtop Meter, elektroda polyplast Hamilton – Cole-Parmer (USA)
Program ImageJ 1.52a – LOCI, University of Wisconsin (USA)
Rotační míchačka na mikrozkumavky – Stuart rotator SB3 BioCote – Cole-Parmer (UK)
Sada automatických pipet Brand – Eppendorf (Německo),
Skener Perfection V550 Photo – Epson (Japonsko)
Stolní centrifuga Microstar 17 – VWR (USA)
Systém UHPLC-MS/MS – Acquity UPLC I-Class System (Binary solvent manager, Sample manager) – Waters (USA); hmotnostní detektor Xevo™ TQ-S – Waters MS Technologies (UK)

Třepačka orbitální BIOSAN OS-10 – Biosan (Lotyšsko)
Ultrazvuková lázeň Transsonic 310 – Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. (Německo)
Vakuová komůrka Visiprep™ – Merck KGaA (Německo)
Vakuová rotační odparka Rotavapor® R-200 – Buchi Labortechnik AG (Švýcarsko)

3.2 Použité chemikálie a roztoky

Agar – Duchefa Biochemie B.V. (Nizozemsko)

Amoniak (25%) – Merck KGaA (Německo)

Deionizovaná voda – připravená v Direct-Q® 3 UV

Dimethylsulfoxid (DMSO) – Acros organics (Belgie)

Ethanol (96%) – VWR Chemicals (Francie)

Interní izotopicky značené standardy auxinů přidávané ke vzorkům v látkovém množství:

5 pmol auxinů ($[^{13}\text{C}_6]$ IAA, $[^{13}\text{C}_6]$ oxIAA, $[^{13}\text{C}_6]$ IAAsp, $[^{13}\text{C}_6]$ IAGlu) – Olchemim (Česká republika)

Interní izotopicky značené standardy cytokininů přidávané ke vzorkům v látkovém množství:

0,2 pmol CK báží ($[^{13}\text{C}_5]$ cZ, $[^{13}\text{C}_5]$ tZ, $[^2\text{H}_3]$ DHZ, $[^2\text{H}_6]$ iP), 0,2 pmol CK *N*-glukosidů ($[^2\text{H}_5]$ tZ7G, $[^2\text{H}_5]$ tZ9G, $[^2\text{H}_3]$ DHZ9G, $[^2\text{H}_6]$ iP7G, $[^2\text{H}_6]$ iP9G); 0,5 pmol CK *O*-glukosidů ($[^2\text{H}_5]$ tZOG, $[^2\text{H}_7]$ DHZOG, $[^2\text{H}_5]$ tZROG) a 0,5 pmol CK nukletidů ($[^2\text{H}_5]$ tZRMP, $[^2\text{H}_3]$ DHZMP, $[^2\text{H}_6]$ iPRMP) – Olchemim (Česká republika)

L-Kynurenin (KYN) – Merck KGaA (Německo)

Kyselina dusičná (65%) – Lach-Ner s.r.o (Česká republika)

Kyselina mravenčí (98%) – Merck KGaA (Německo)

Kyselina *N*-1-(naftyl)ftalamová (NPA) – Merck KGaA (Německo)

Kyselina (naftalen-1-yl)octová (NAA) – Merck KGaA (Německo)

Kyselina octová (99,8%) – Merck KGaA (Německo)

MES (kyselina 2-(*N*-morfolino)ethansulfonová) – Carl Roth GmbH (Německo)

Methanol (> 99,9%) – Merck KGaA (Německo)

Murashige-Skoog médium – Duchefa Biochemie B.V (Nizozemsko)

Sacharóza – Lach-Ner s.r.o (Česká republika)

Tween – Lach-Ner s.r.o (Česká republika)

Yucasin (YUC) – abcr GmbH (Německo)

Roztoky

Pro přípravu vodných roztoků byla použita deionizovaná voda.

0,1% DMSO – 500 ml ½ MS média (400 µl DMSO)

0,8% DMSO – 40 ml ½ MS média (40 µl DMSO)

1M HCOOH – 250 ml roztoku (9,625ml HCOOH a 240,375ml H₂O)

1M HCl – 100 ml roztoku (91,9 ml H₂O a 8,1 ml 37 % HCl)

50% HNO₃ – 250 ml roztoku (192,25 ml HNO₃ a 57,75 ml H₂O)

5% methanol – 100 ml (95 ml H₂O a 5 ml methanolu)

10% methanol – 100 ml (90 ml H₂O a 10 ml methanolu)

80% methanol – 100 ml (20 ml H₂O a 80 ml methanolu)

½ MS médium pro kultivaci rostlin: 2,2 g/l Murashige-Skoog soli a vitamíny, 10 g/l sacharóza, pH = 5,7 upravené pomocí 1M NaOH, 1,1% agar (při přípravě tekutého ½ MS média nebyl agar přidán)

0,35M NH₄OH – 250 ml (6,25 ml 25% NH₄OH a 243,75 ml H₂O)

0,35M NH₄OH v 60% MeOH - 250 ml (150 ml MeOH, 6,25 ml 25% NH₄OH a 93,75ml H₂O)

Okyselený methanol – methanol s přídavkem 1% kyseliny mravenčí

Okyselená voda – 15 ml H₂O a 75 µl HCl

Sterilizační roztok – 0,01% roztok TWEEN v 70 % EtOH

3.3 Rostlinný materiál

Pro experimenty v rámci diplomové práce byl použit *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia-0 (*Ath-Col-0*), ekotyp Landsberg *erecta* (*Ath-Ler*), *DR5v2::ntdTomato* (Liao a kol., 2015).

3.4 Metody a postupy

3.4.1 Výsev rostlin *Arabidopsis thaliana*

Výsev rostlin probíhal po sterilizaci na kultivační desky s ½ MS médiem.

Sterilizace semen

- Do 2 ml mikrozkušavky bylo lžičkou přidáno potřebné množství semen, ke kterým byl automatickou pipetou přidán 1 ml sterilizačního roztoku (0,01% Tween v 70% ethanolu).
- Mikrozkušavka se semeny byla umístěna na rotační míchačku (kolotoč) na 10 minut.

- Poté byl ve flowboxu odpipetován sterilizační roztok a semena byla promyta 3x sterilní vodou.

Příprava MS média

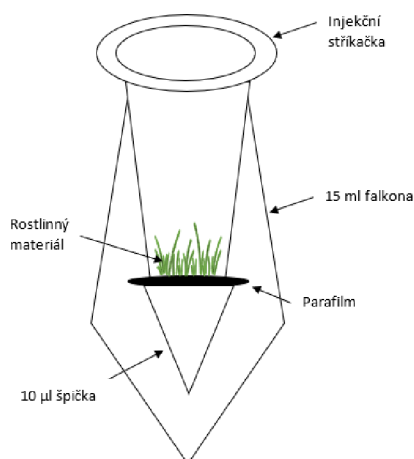
- Pro výsev semen bylo použito ½ MS médium. Látky (MS obsahující vitamíny, sacharóza, MES) nezbytné pro přípravu byly naváženy a rozpuštěny. Poté byl přidán 1,1% agar. Připravené médium bylo autoklávované.

Výsev semen na kultivační desky

- K semenům *A. thaliana* po sterilizaci bylo přidáno 200-400µl sterilní vody (dle množství semen).
- Poté byla sterilní semena (100µl) v horní části horizontálně desky vysetá automatickou pipetou na ½ MS médium.
- Semena byla stratifikována po 2 dny ve tmě při 4°C za účelem synchronizace klíčení semen.
- Poté byly desky umístěny do fytotronu ve vertikální poloze.
- Rostliny byly kultivovány po dobu 8 dní v podmínkách 23°C, při fotoperiodě 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

3.4.2 Izolace apoplastu a symplastu

Z kořenů a nadzemní části (prýt, přizemní růžice) osmidenních rostlin *Ath- Ler* byla provedena izolace apoplastu a symplastu dle Antoniadí a kol. (2020). Kořeny rostlin byly odřezány těsně pod listy. Kořeny i nadzemní část byly zváženy na laboratorních vahách (přibližně 300mg kořenů i prýtu). Rostlinný materiál byl opláchnut na 100 µm sítku v deionizované vodě. Následně byl materiál osušen buněčnou vatou a umístěn do 3 ml injekční stříkačky bez pístu posazené v 15 ml falkoně na ledu (Obr. 8), než byly posbírány další vzorky. Apoplastická frakce byla jímána při centrifugaci rostlinného materiálu při 900 × g (4°C) po 20 min. Následně byla stříkačka přemístěna do nové falkony, zabalená do dvou vrstev hliníkové folie, umístěna do tekutého dusíku. Po zmrazení byla ponechána v laboratorní teplotě do rozmrazení. Pro získání symplastické frakce byla falkona se stříkačkou centrifugována 15 minut při 2500 × g (4°C). Apoplastická i symplastická frakce byly přeneseny do 2 ml mikrozkuvek. Mikrozkuvky byly zmrazeny v tekutém dusíku a umístěny do -80°C. Do experimentu byly zařazeny jednotlivé optimalizační kroky (Tab. 1).



Obr. 8. Schéma zobrazující složení falkony pro izolaci symplastu a apoplastu.

Před samotnou centrifugací bylo do 15ml falkony napipetováno 900ul/vzorek okyseleného methanolu (MeOH), do kterého byly izolované frakce zachytávány. Navíc do poloviny vzorků bylo přidáno dvojnásobné množství CK a auxinových IS – 0,4 pmol [$^{13}\text{C}_5$]cZ, [$^{13}\text{C}_5$]tZ, [$^2\text{H}_3$]DHZ, [$^2\text{H}_6$]iP, ([$^2\text{H}_5$]tZ7G, [$^2\text{H}_5$]tZ9G, [$^2\text{H}_3$]DHZ9G, [$^2\text{H}_6$]iP7G, [$^2\text{H}_6$]iP9G), 1 pmol [$^2\text{H}_5$]tZOG, [$^2\text{H}_7$]DHZOG, [$^2\text{H}_5$]tZROG), [$^2\text{H}_5$]tZRMP, [$^2\text{H}_3$]DHZMP, [$^2\text{H}_6$]iPRMP a 10 pmol [$^{13}\text{C}_6$]IAA, [$^{13}\text{C}_6$]oxIAA, [$^{13}\text{C}_6$]IAA_{sp}, [$^{13}\text{C}_6$]IAGlu. Stejný postup byl prováděn s okyseleným acetonitrilem (ACN). Do druhé poloviny vzorků byl IS přidán před samotnou purifikací.

Tab. 1. Izolace apoplastu a symplastu z kořenů a přízemní růžice rostliny *A. thaliana*

Materiál	Izolovaná frakce	Centrifugace	Čas	Teplota (°C)
Kořeny a nadzemní část	apoplast	900 x g	20 minut	4
	symplast	2500 x g	15 minut	4

3.4.3 Test inhibice růstu primárního kořene

U osmidenních rostlin *Ath-Col-0* byl proveden test inhibice růstu kořene.

- $\frac{1}{2}$ MS médium bylo vyautoklávované a rozděleno na části do skleněných lahví.
- Do média byly přidány auxinové syntetické inhibitory KYN, YUC a NPA o finální koncentraci (0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM), kontroly 0,1 μM NAA (pozitivní kontrola) a 0,1 % DMSO (negativní kontrola).

- Medium bylo nalito do kultivačních desek a po zatuhnutí byly do jedné řady párátkem vysety semena rostliny *Ath-Col-0*.
- Desky byly oblepeny průsvitným leukoplastem, zabaleny do hliníkové folie a umístěny na 2 dny do 4 °C.
- Poté byly rostliny ponechány 8 dní ve vertikální poloze ve fytotronu.
- Rostliny byly skenovány a délka primárních kořenů byla změřena v programu ImageJ.

Následně bylo provedeno vyhodnocení v Excelu.

3.4.4 Konfokální mikroskopie

Pro konfokální mikroskopii byly rostliny *A. thaliana* vysety párátkem na Petriho misky obsahující ½ MS médium.

Pětidenní rostliny reportérové linie DR5v2::ntd-Tomato byly 16h inkubovány s auxinovými inhibitory. Do šesti jamkové kultivační desky bylo napipetováno tekuté ½ MS médium. Do každé jamky bylo vloženo 8 semenáček testované reportérové linie a přidáno příslušné množství auxinového syntetického inhibitoru (0,01 µM KYN, 0,01 µM YUC, 1 µM NPA) a syntetického auxinu (0,01 µM a 0,1 µM NAA). Negativní kontrolou bylo 0,1% DMSO.

Poté byla uskutečněna konfokální mikroskopie kořenové špičky ošetřených rostlin pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 800. Rostliny byly položeny na mikroskopické sklíčko, aplikovány 100 µl média a přeloženy krycím sklíčkem. Preparáty byly pozorovány při excitační vlnové délce 561 nm. Vyhodnocení probíhalo v programu ImageJ. Změřena byla fluorescence při inkubaci s danou koncentrací určité látky.

3.4.5 Extrakce a purifikace vzorků pro stanovení auxinů a cytokininů

Vzorky pro analýzu auxinů a cytokininů byly připraveny dvěma způsoby:

- Objemy izolátu symplastu a apoplastu byly změřeny a polovina objemu každého vzorku byla přenesena do nové 2 ml mikrozkušavky. Ke vzorkům určeným pro analýzu auxinů, které ještě IS neobsahovaly byl přidán auxinový IS (5 pmol/vzorek ($^{13}\text{C}_6$]IAA, $^{13}\text{C}_6$]oxIAA, $^{13}\text{C}_6$]IAA_{sp}, $^{13}\text{C}_6$]IAGlu). Pro analýzu CKs byl ke vzorkům bez IS přidán CK IS (0,2 pmol/vzorek ($^{13}\text{C}_5$]cZ, $^{13}\text{C}_5$]tZ, $^2\text{H}_3$]DHZ, $^2\text{H}_6$]iP, $^2\text{H}_5$]tZ7G, $^2\text{H}_5$]tZ9G, $^2\text{H}_3$]DHZ9G, $^2\text{H}_6$]iP7G, $^2\text{H}_6$]iP9G); 0,5 pmol/vzorek ($^2\text{H}_5$]tZOG, $^2\text{H}_7$]DHZOG, $^2\text{H}_5$]tZROG, $^2\text{H}_5$]tZRMP, $^2\text{H}_3$]DHZMP, [$^2\text{H}_6$]iPRMP).

Poté byly vzorky centrifugovány při 14000 × g po dobu 15 minut v 4°C. Následně okyseleny 4 ml 1M HCOOH (finální pH vzorků 2,7).

- Rostlinný materiál určený pro purifikaci auxinů pomocí μ SPE-PT (StageTips) byl zhomogenizován v třecí misce za přítomnosti tekutého dusíku a následně navážen cca 10 mg na analytických váhách. Uschován v -80°C pro následující experimenty.

SPE purifikace symplastu a apoplastu

Pro stanovení auxinů v izolovaném symplastu a apoplastu byla použita Oasis HLB kolona (30mg/1ml) (Obr. 9). HLB purifikace se skládala z následujících kroků:

- **Aktivace kolon** – 1 ml 100% MeOH, poté 1 ml H₂O a 0,25 ml H₂O s přidavkem 1M HCl (5 μ l/ml).
- **Nanášení okyseleného vzorku** (pH = 2,7)
- **Promývání kolony** – 2 ml 5% MeOH
- **Eluce vzorku** – 2 ml 80% MeOH do skleněných zkumavek

Purifikované vzorky byly odpařené do sucha ve vakuové odparce a před následující analýzou uloženy v -20°C.

1. Aktivace kolon
2. Nanášení vzorku
3. Promývání kolon
4. Eluce IAA



Odpad a eluce

Obr. 9. Schéma konvenční SPE purifikace – kolona HLB (30mg/1ml) Oasis.

Pro stanovení cytokininů v symplastu a apoplastu byla použita Oasis MCX kolona (30mg/1ml). MCX purifikace zahrnuje následující kroky:

- **Aktivace kolon** – 1 ml 100% MeOH, 1 ml H₂O, 1 ml 50% HNO₃, 1 ml H₂O a 1 ml 1M HCOOH
- **Nanášení okyseleného vzorku** (pH = 2,7)
- **Promývání kolony** – 1 ml 1M HCOOH a 1 ml 80% MeOH

- **Eluce CK nukleotidů** – 1 ml 0,35M NH₄OH zachycen do skleněných zkumavek
- **Eluce CK bází a CK O-/N-glukosidů** – 2 ml 0,35M NH₄OH v 60% MeOH

Purifikované vzorky byly odpařené do sucha ve vakuové odparce a před následující analýzou uloženy v -20°C.

Purifikace auxinů pomocí μSPE-PT (Obr. 10)

Byly připraveny StageTips kolony obsahující dané typy sorbentů: C18 (3x)/SDB-XC (3x) a vzorky byly purifikovány podle dříve publikovaného protokolu (Pěničik a kol., 2018).

K 10 mg vzorku chlazeném na ledu byly přidány 3 keramické kuličky. Poté byl přidán 1 ml fosfátového pufru o pH 7,0 a auxinový IS (5 pmol/vzorek [¹³C₆]IAA, [¹³C₆]oxIAA, [¹³C₆]IAAsp, [¹³C₆]IAGlu). Vzorky byly dány na 10 min na kulový mlýnek a následně centrifugovány po dobu 15 min při 15 000 rpm (4°C). Do nově připravených mikrozkušavek bylo napipetováno 200 μl extraktu, ke kterým bylo přidáno 100 μl 0,1M HCl. Další část extraktu (200 μl) byla smíchána se 100 μl 0,75M cysteaminu o pH 8,2. Tato směs byla inkubována 15 minut a poté uschována v -20°C. Následná purifikace probíhala v následujících krocích:

- Připravené μSPE-PT kolony byly vloženy do víček mikrozkušavek.
- **Aktivace kolon** – Kondicionace sorbentu byla provedena následovně: 50 μl acetonu, centrifugace po dobu 10 min při 2000 rpm (4 °C), 50 μl MeOH s centrifugací probíhající za stejných podmínek a posledním krokem byla aplikace 50 μl H₂O s následnou centrifugací.
- **Nanášení vzorku** – 300 μl okyseleného vzorku bylo nanášeno na Stage-Tip kolonu, vzorky byly centrifugovány 30 min při 4200 rpm za chlazení 8°C.
- **Promývání kolony** – Následně bylo provedeno promývání 50μl 0,1% kyseliny octové (centrifugace 20 minut při 3200 rpm, 8 °C).
- **Eluce vzorku** – Poté byly sorbentem plněné špičky přemístěny do prázdné mikrozkušavky a následně bylo na každou kolonu nanášeno 50 μl 80% MeOH za účelem eluce. Vzorky byly centrifugovány 20 min při 3200 rpm za chlazení 8°C. Eluát byl přepipetován do vialek a odpařen dosucha na vakuové odparce.
- Vzorky obsahující 0,75M cysteamin byly okyseleny (20 μl 3M HCl) a následně byly provedeny výše uvedené kroky aktivace, nanášení, promytí a eluce vzorku.
- Všechny vzorky byly poté rozpuštěny v 30 μl 10% MeOH a umístěny před LC-MS/MS analýzou do -20°C.



Obr. 10. Metoda μ SPE-TP – Stage-Tip kolona obsahující SPE disky C18 (3x)/SDB-XC (3x).

3.4.5 LC-MS/MS analýza auxinů a cytokininů

Odpařené vzorky purifikované konvenčním SPE protokolem (HLB i MCX) byly rozpuštěny v 40 μ l 10% MeOH pro analýzu fytohormonů. Následně byly vortexovány a dány do sonifikační lázně po dobu 3 minut. Vzorky byly opět vortexovány a přepipetovány do filtračních zkumavek MicroSpin s filtrem (0,2 μ m), poté byly centrifugovány při 7500 rpm (5 minut) a napipetovány do konických insertů umístěných do vialek.

Vzorky byly změřeny na přístroji Acquity UPLC[®] I-Class System, který byl propojen s hmotnostním spektrometrem Xevo[™] TQ-S MS (Waters). Cytokininové i auxinové metabolity byly stanoveny v režimu MRM (sken protonovaných prekurzorů a příslušných produktových iontů) a kvantifikovány metodou izotopického zředování (Rittenberg a Foster, 1940). Separace auxinů probíhala na koloně Kinetex C18 (50 \times 2,1 mm, 1,7 μ m) podle dříve optimalizovaných LC–MS/MS podmínek (Pěničik a kol., 2018). Stanovení cytokininů bylo provedeno podle publikované metodiky na reverzní koloně UPLC[®] BEH Shield RP18 (150 \times 2,1 mm, 1,7 μ m) a za použití optimalizovaných MS parametrů (Novák a kol., 2017).

4 VÝSLEDKY

4.1 Izolace symplastu a apoplastu

Prvním cílem předložené diplomové práce bylo seznámení s protokolem pro izolaci symplastu a apoplastu z kořene a nadzemní části mladých rostlin *A. thaliana* a stanovení metabolických profilů auxinů a cytokininů pomocí LC–MS/MS. V předchozí diplomové práci (Koničková D., UP Olomouc, 2020) byla publikována vysoká variabilita fytohormonálních hladin. Úkolem tedy bylo snížit směrodatné odchylky mezi jednotlivými biologickými opakováními a zvýšit robustnost izolační metody. Z těchto důvodů byl předešlý publikovaný postup (Antoniadi a kol., 2020) dále optimalizován.

4.1.1 Optimalizace izolace apoplastu a symplastu

Z kořene a nadzemní části *Ath-Ler* byl izolován apoplast a symplast podle protokolu uvedeném v kapitole 3.4.2. Izolované frakce obsahují různé aktivní enzymy, které mohou degradovat analyty a tak změnit profil sledovaných fytohormonů. Proto byly frakce nejprve jímány do okyseleného MeOH, který inhibuje enzymatickou aktivitu a způsobuje precipitaci proteinů (PP) (Tarkowská a kol. 2014). Pro zjištění vlivu tohoto kroku na fytohormonální profily (kvalitu a kvantitu analytů) byla k okyselenému MeOH napipetována směs IS před samotnou izolací (frakce označena „*před PP*“). Do druhé poloviny vzorků byl IS přidán po precipitaci proteinů před samotnou SPE purifikací (ozn. „*po PP*“). Porovnáván byl vliv srážení na výsledné koncentrační hladiny auxinů a cytokininů jako poměr „*před PP*“/„*po PP*“ (Příloha A).

Celkově výsledky ukázaly vyšší hladiny fytohormonů ve variantě, kdy byl IS přidán před srážením proteinů. Pokud byl IS přidán do okyseleného MeOH před PP, byla naměřená hladina IAA ve frakci symplastu izolovaného z kořenové části 7,2x vyšší než hladina fytohormonu v okyselené methanolické frakci, do které byl IS přidán po PP. U apoplastické frakce izolované z kořenů *Ath-Ler* byla detekována dokonce 27,9x vyšší hladina IAA při porovnání vzorků „*před PP*“ vs „*po PP*“ (Tab. 2).

Cytokininové profily vykazovaly podobný trend. Hladiny CK bazí i CK ribosidů byly nejvyšší (6,9x a 5,6x) v případě přidání IS před PP u symplastické frakce izolované z nadzemní části (Tab. 2). U glykosilovaných CK derivátů (*O*-glukosidů a *N*-glukosidů) byl největší nárůst nameřených koncentrací detekován u obou „*před PP*“ frakcí izolovaného apoplastu (v průměru 23,5x vyšší pro OG metabolity a 15,7x vyšší pro NT metabolity).

Z výsledků bylo tedy zjištěno, že vhodnějším způsobem je sbírat symplastickou i apoplastickou frakci do okyseleného MeOH obsahujícího směs IS, jelikož jsou takto pokryty ztráty fytohormonů během precipitace proteinů.

Tab. 2. Poměr koncentračních hladin metabolitů stanovených metodou izotopického zředování ve vzorcích s přidavkem směsi interních standardů v různých fázích sběru symplastických a apoplastických frakcí izolovaných z kořenů a nadzemních částí (prýtu) rostlin *A. thaliana* ekotyp Landsberg *erecta*. Směs IS byla přidána do okyseleného MeOH před a po sběru frakcí a poté byl vypočten poměr průměrných hladin fytohormonů vypočtených pro vzorky „před PP“/„po PP“. Stanovené koncentrace fytohormonů jsou uvedeny v Příloze 1 (pmol/g č.h., n=4).

<i>Organické čínidlo</i>	<i>Izolovaná frakce</i>	<i>Materiál</i>	<i>Auxiny</i>		<i>Cytokininy</i>		
			<i>IAA</i>	<i>B</i>	<i>R</i>	<i>OG</i>	<i>NG</i>
MeOH	Symplast	Kořen	7,2	3,3	4,4	1,6	1,7
		Prýt	2,4	6,9	5,6	3,0	2,9
	Apoplast	Kořen	27,9	3,0	2,2	21,5	14,7
		Prýt	4,6	2,9	2,0	25,5	16,7

IAA, kyselina indol-3-yloctová; B, CK báze; R, CK ribosidy; OG, CK *O*-glukosidy; NG, CK *N*-glukosidy

Z důvodů velké variability v naměřených hladinách analyzovaných metabolitů auxinů a cytokininů v izolovaných frakcích symplastu a apoplastu srážených do okyseleného MeOH (Příloha A) bylo také otestováno jímání apoplastických izolátů přímo do okyseleného ACN. Toto organické čínidlo se často používá jakožto alternativní srážedlo k MeOH (Nováková a Vlčková, 2009). Cílem tohoto srovnání bylo snížit variabilitu výsledků a zvýšit robustnost dané metody. Porovnání relativních směrodatných odchylek (%RSD) u obou rozpouštědel ukázalo vyšší rozpytl výsledů u MeOH oproti ACN (Tab. 3). Z hodnot je také patrné, že v případě jímání do okyseleného ACN byly větší variabilita výsledků u hladin IAA ve vzorcích izolovaných z kořene než z prýtu. U CK metabolitů byly hodnoty %RSD srovnatelné, avšak hladiny CKs v těchto vzorcích byly několikanásobně nižší než u vzorků sbíraných do MeOH. Navíc CK nukleotidy nebyly jednoznačně kvantifikovány (nízké hladiny blízko nebo pod limitou detekce) u obou organických rozpouštědel.

Na základě získaných výsledků (Tab. 3) můžeme uvést, že okyselený ACN v porovnání s okyseleným MeOH je vhodnějším extrakčním čínidlem z důvodů nižší variability výsledků. Na druhou stranu vyšší koncentrační hladiny vybraných fytohormonů byly stanoveny po izolaci apoplastu do okyseleného MeOH (Příloha A).

Tab. 3. Variabilita výsledků stanovených koncentračních hladin vybraných fytohormonů je vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky (%RSD). Kvantifikace metabolitů byla provedena metodou izotopického zředování ve vzorcích okyseleného MeOH nebo ACN s přidavkem směsi IS před sběrem frakcí apoplastu z kořenů a nadzemních částí (prýtu) rostlin *A. thaliana* ekotyp Landsberg *erecta*. Stanovené koncentrace fytohormonů jsou uvedeny v Příloze 1 (pmol/g č.h., n=4).

<i>Izolovaná frakce</i>	<i>Materiál</i>	<i>Organické činidlo</i>	<i>Auxiny</i>		<i>Cytokininy</i>		
			<i>IAA</i>	<i>B</i>	<i>R</i>	<i>OG</i>	<i>NG</i>
Apoplast	Kořen	MeOH	135%	63%	71%	98%	102%
		ACN	68%	6%	28%	20%	23%
	Prýt	MeOH	120%	60%	60%	96%	96%
		ACN	7%	24%	14%	12%	22%

IAA, kyselina indol-3-ylactová; B, CK báze; R, CK ribosidy; OG, CK *O*-glukosidy; NG, CK *N*-glukosidy

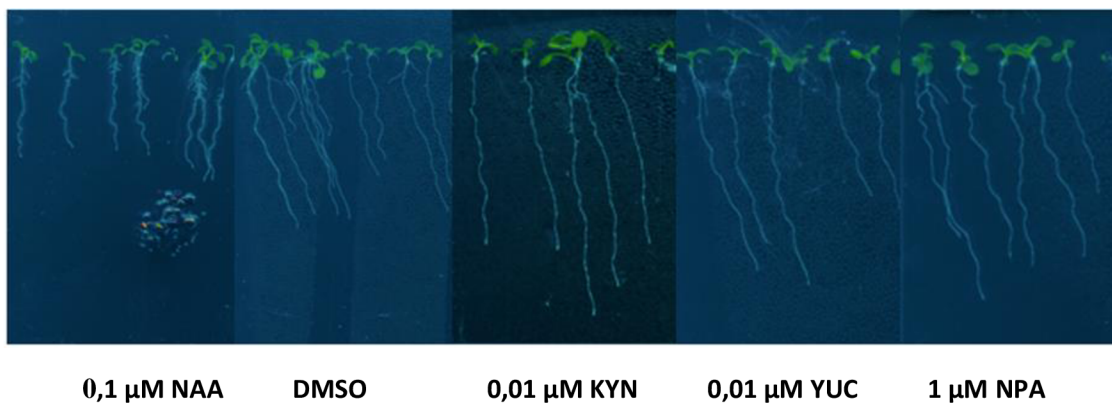
4.2 Vliv syntetických inhibitorů na homeostázi auxinů u *A. thaliana*

Cílem dalšího experimentu bylo zjistit efekt vybraných syntetických auxinových inhibitorů na specifické biosyntetické auxinové dráhy. Byl testován vliv inhibitorů auxinové biosyntézy (KYN, YUC) a inhibitoru polárního transportu (NPA) na délku primárního kořene, na auxinový signaling v kořenové špičce a na metabolický profil auxinů.

4.2.1 Stanovení účinné koncentrace auxinových inhibitorů

Rostliny *Ath-Col-0*, které 8 dnů rostly na ½ MS médiu obsahujícím danou koncentraci inhibitorů (0,01 μM; 0,1 μM; 1 μM ; 10 μM pro KYN, YUC a NPA), byly naskenovány (Příloha B) a pomocí programu ImageJ byla změřena délka primárního kořene. Byl pozorován efekt inhibitorů na fenotyp kořene a stanovena jejich účinná koncentrace (Obr. 11).

Délka primárního kořene po ovlivnění KYN byla inhibována při koncentraci vyšší než 1 μM. Nejvyšší testovaná koncentrace KYN (10 μM) se zdála být pro rostlinu toxická, protože došlo k výraznému zkrácení primárního kořene. V případě ovlivnění YUC se v celém rozsahu zkoumaných koncentrací délka kořene výrazně neměnila. Při vyšších koncentracích NPA (1 μM a 10 μM) rostliny ztrácely schopnost gravitropismu (kořeny rostly do boku, nohoru), zatímco rostliny ošetřené nižšími koncentracemi NPA (0,01 μM a 0,1 μM) nevykazovaly zásadní změnu délky primárního kořene. U pozitivní kontroly (rostliny ošetřeny syntetickým auxinem NAA) byl při zvolené koncentraci 0,1 μM zaznamenán výrazný pokles délky primárního kořene.



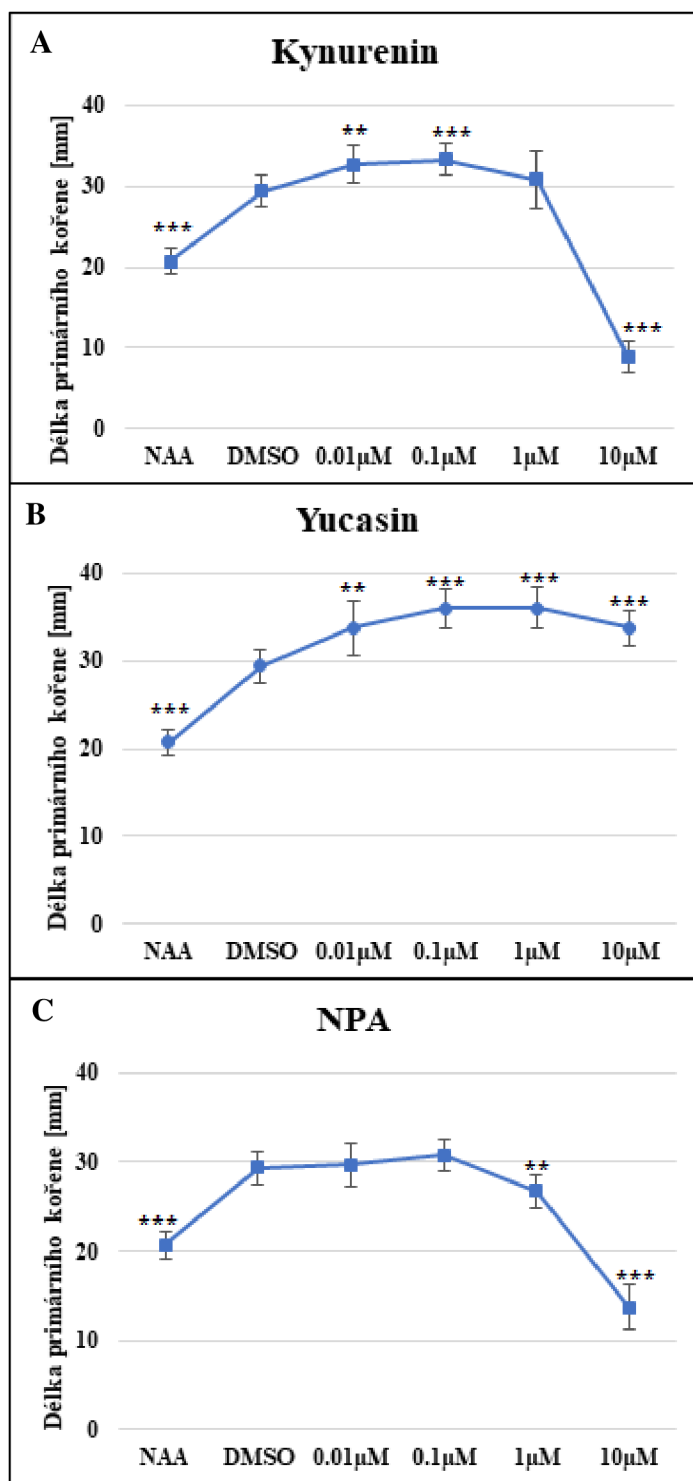
Obr. 11. Efekt inhibitorů na růst primárního kořene *A. thaliana* ekotyp Columbia-0. Reprezentativní fotografie, které byly použity k vyhodnocení délek primárních kořenů pomocí programu ImageJ, měřítko 1 cm.

Ze všech získaných výsledků byl sestrojen graf závislosti koncentrace jednotlivých syntetických auxinových inhibitorů na délce primárního kořene (Obr. 12). Negativní kontrolou bylo $\frac{1}{2}$ MS médium obsahující 0,1% DMSO a pozitivní kontrolou byla NAA o koncentraci 0,1 μM . Byly odvozeny účinné koncentrace jednotlivých inhibitorů, u kterých byla pozorována první signifikantní změna v délce primárního kořene oproti kontrole (DMSO). Pro následující experimenty byla tedy vybrána účinná koncentrace inhibitorů 0,01 μM pro KYN i YUC a 1 μM pro NPA.

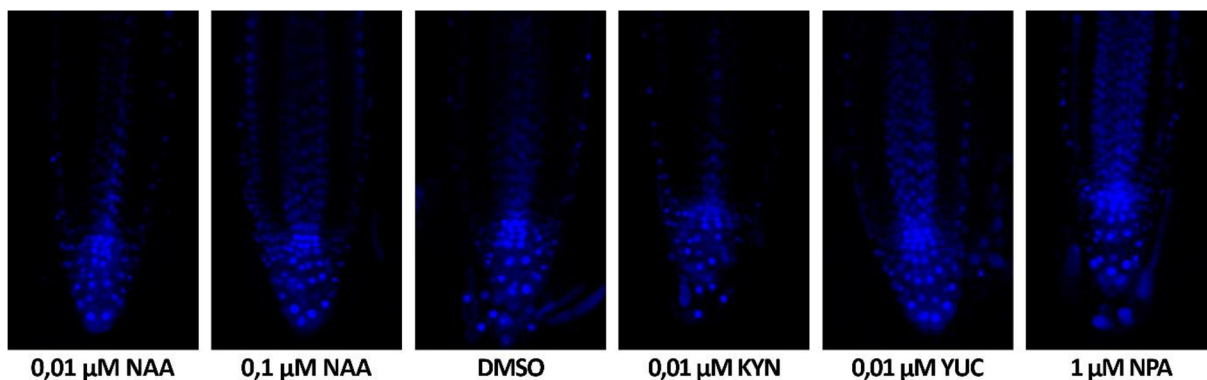
4.2.2 Vliv syntetických inhibitorů na auxinový signaling

Na základě přechodného experimentu (sledování efektu inhibitorů na fenotyp kořene) byly stanoveny aktivní koncentrace auxinových inhibitorů, které byly dále použity při studiu ovlivnění auxinových signálních drah v kořenové špičce.

Pro experiment byla použita reportérová linie *DR5v2::ntdTomato*. Syntetický promotor DR5 je citlivý na přítomnost auxinu, jehož koncentrace v kořenové špičce může být ovlivněna přidávkem testovaných inhibitorů (Pařízková a kol., 2017). Je-li v daném pletivu přítomná látka schopná vyvolat auxinovou odpověď, dochází k syntéze červeně svítícího proteinu *ntdTomato*. Na tomto základě bychom měli vidět, jak inhibitory spouští auxinový signalling a tím expresi cílových genů, jejíž tkáňově-specifickou distribuci můžeme pomocí konfokálního mikroskopie vizualizovat.



Obr. 12. Zjištění aktivní koncentrace syntetických auxinových inhibitorů. Test závislosti délky primárního kořene na testovaných koncentracích jednotlivých inhibitorů – Kynurenin (A), Yucasin (B) a N-1-(naftyl)ftalamová (C). Použité koncentrace 0,01 μM-0,1 μM-1 μM-10 μM KYN, YUC a NPA, 0,1 μM NAA a 0,1% DMSO obsažené v ½ MS. Výsledky fenotypizace růstu primárního kořene byly statisticky zpracovány, vyhodnoceny v excelu (t-test) se signifikantním výsledkem (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), graf zobrazuje průměr \pm směrodatná odchylka pro 10 kořenů z každé variant, $n=10$).



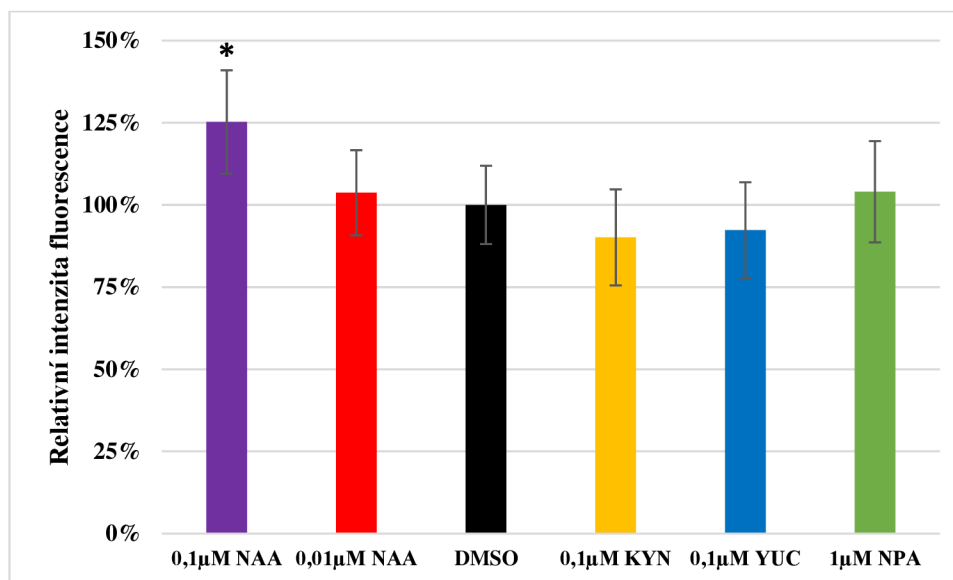
Obr. 13. Distribuce fluorescence v kořenových špičkách linie *DR5v2::ntdTomato* po inkubaci se syntetickými inhibitory auxinové biosyntézy (KYN a YUC), auxinového transportu (NPA), syntetickým auxinem (NAA, pozitivní kontrola) a DMSO (negativní kontrola).

Na pětidenních rostlinách inkubovaných 16 h v tekutém $\frac{1}{2}$ MS médiu s obsahem jednotlivých syntetických auxinových inhibitorů (0,01 μ M YUC, 0,01 μ M KYN a 1 μ M NPA) byla provedena konfokální mikroskopie (Obr. 13). Z důvodů malých zkušeností se syntetickým auxinem NAA a také z obav saturace fluorescenčního signálu jsme u této pozitivní kontroly testovali nižší (0,01 μ M) i vyšší (0,1 μ M) koncentraci. Jako negativní kontrola byl opět zvolen 0,1% DMSO.

Na Obr. 13 vidíme náznaky rozdílné auxinové signalizace v rámci meristematické a elongační zóny, stélé a pericyklu, což naznačuje různou distribuci auxinu v rámci kořenové špičky. U snímků kořenových špiček byla poté kvantitativně změřena fluorescence pomocí programu ImageJ (Obr. 14). Výsledkem tohoto vyhodnocení bylo předpokladané snížení fluorescence v kořenech inkubovaných s KYN oproti kontrole, jelikož se jedná o inhibitor biosyntézy. Byl pozorován mírný pokles fluorescence, ale výsledek nebyl signifikantní, což může být zapříčiněno nevhodným nastavením inkubačního času či samotné koncentrace inhibitoru. Podobný pokles relativní intenzity fluorescence byl detekován také u YUC (Obr. 14). I když rozdíly v intenzitě nebyly signifikantní, lze pozorovat patrný trend efektu inhibitorů biosyntézy auxinů.

Inhibitor polárního transportu NPA, blokuje export auxinu z buňky, lze tedy předpokládat, že zvýšený obsah IAA v buňce může vést k následnému nárůstu fluorescence. Ze získaných dat lze vyčíst, že došlo k mírnému zvýšení fluorescence, oproti negativní kontrole (0,1 % DMSO). Míra fluorescence kořenové špičky ošetřená 1 μ M NPA byla na úrovni 0,01 μ M NAA, jakožto pozitivní kontroly. Signifikantní nárůst fluorescence v porovnání s DMSO byl pozorován pouze v kořenové špičce v případě aplikace desetkrát vyšší koncentrace NAA (0,1 μ M).

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že syntetické inhibitory auxinové biosyntézy i transportu jsou účinné, ale je stále nutné najít přesné aktivní koncentrace nebo testovat různé časy inkubace.



Obr. 14. Relativní intenzita fluorescence *DR5v2::ntdTomato* po ošetření vybranými syntetickými auxinovými inhibitory (0,1µM KYN; 0,1µM YUC; 1µM NPA) a pozitivní kontrolou (0,01 µM a 0,1µM NAA). Výsledky byly statisticky porovnány s negativní kontrolou (0,1% DMSO), vyhodnoceno v Excelu (t-test) se signifikantním výsledkem (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Sloupcový graf zobrazuje průměr \pm směrodatná odchylka pro 5 kořenů z každé varianty, $n=5$).

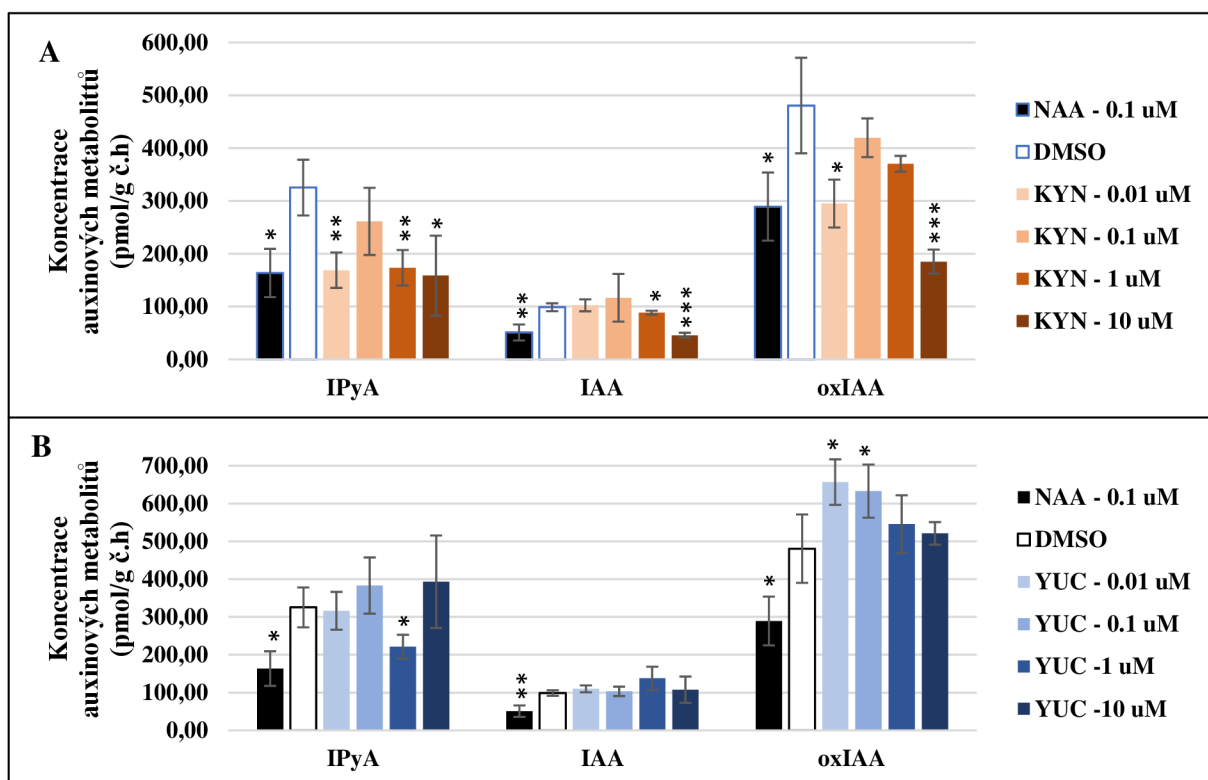
4.2.3 Vliv syntetických auxinových inhibitorů na profil auxinů

Cílem posledního experimentu bylo zjistit vliv vybraných syntetických inhibitorů (KYN, YUC a NPA) na metabolismus auxinů. U osmidenních rostlin *Ath-Col-0*, pěstovaných na $\frac{1}{2}$ MS médiu obsahujícím různé koncentrace inhibitorů (0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM a 10 µM), byly proměřeny celkové auxinové profily (Příloha C). Ty byly poté porovnány s hladinami vybraných auxinových prekurzorů a metabolitů stanovených v kontrolních rostlinách ošetřených 0,1% DMSO (negativní kontrola) a 0,1µM NAA (pozitivní kontrola).

4.2.3.1 Klíčící rostliny *A. thaliana* ovlivněné inhibitory auxinové biosyntézy

Jak již bylo zmíněno v teoretické části této diplomové práce, auxinová biosyntetická dráha IPyA může být blokována inhibitory KYN a YUC na různých úrovních (Obr. 5).

Inhibitor KYN blokuje přeměnu Trp na IPyA. Očekávaným výsledkem auxinového profilování u rostlin *Ath-Col-0* inkubovaných s KYN bylo tedy snížení koncentrace přímého prekursoru IAA. Naše výsledky potvrdily tento předpoklad (Obr. 15). V případě ošetření KYN byla zaznamenána snížená koncentrace IPyA se zvyšujícími se koncentracemi inhibitoru. Účinek KYN na přeměnu Trp na IPyA tedy narůstá se změnou aplikovaných koncentrací. Byl také pozorován pokles koncentrace volné IAA se zvyšující se koncentrací KYN, jakožto následek nedostatku hlavního prekursoru. Také koncentrace hlavního metabolitu oxIAA s narůstající se koncentrací klesala. Bližší analýza auxinových profilů ukazuje, že 0,01 μM a 0,1 μM KYN neovlivňuje hladinu samotné IAA a to je pravděpodobně kompenzováno sníženou tvorbou oxIAA.



Obr. 15. Profil vybraných metabolitů auxinů u rostlin ošetřených KYN (A) a YUC (B). Koncentrace IAA metabolitů (pmol/g č.h.) po ovlivnění rostlin různými koncentracemi inhibitorů auxinové biosyntézy (0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM a 10 μM). Výsledky byly statisticky zpracovány a porovnány s negativní kontrolou (0,1% DMSO), vyhodnoceny v excelu (t-test) se signifikantním výsledkem (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Sloupcové grafy zobrazují průměr \pm směrodatná odchylka ($n=4$).

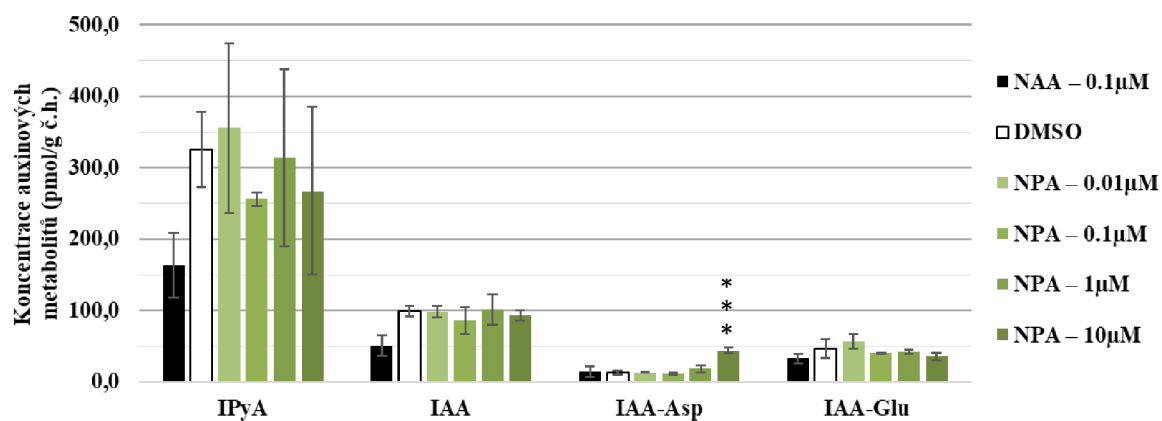
Inhibitor YUC blokuje přeměnu IPyA na aktivní IAA. Při ovlivnění mladých rostlin *A. thaliana* inhibitorem YUC bylo tedy předpokladem zvýšení koncentrace IPyA. Uskutečněný experiment celkově potvrdil, že při zvyšujících se koncentracích YUC dochází k akumulaci IPyA (Obr. 15). I když nebyly koncentrační změny ve srovnání s kontrolou (DMSO) statisticky významné a pro aktivní koncentraci 1 μM YUC byla hladina IPyA signifikantně snížena. Překvapivě došlo k mírnému zvýšení hladiny IAA při zvyšující se koncentraci YUC. Hlavní biosyntetická dráha IPyA byla inhibována, ale pravděpodobně se zapojily další dráhy syntetizující IAA (Obr. 3). Koncentrace katabolitu oxIAA byla pro nižší koncentrace YUC také zvýšena. Ale náš experiment nakonec potvrdil, že celkový koncentrační patern oxIAA se zvyšující se množství YUC v médiu dle předpokladů klesal (Obr 15).

Celkové profily IAA prekurzorů i metabolitů jsou prezentovány v Příloze C. Bližší pohled na výsledky u rostlin ošetřených KYN ukazuje podobný metabolický trend, který byl detekován u IAA i oxIAA. Pouze nejvyšší koncentrace KYN (10 μM) vedla k signifikantnímu snížení auxinového metabolismu, ale k nárůstu hladin Trp. U inhibitoru YUC byla kromě IPyA zjištěna částečně signifikantní akumulace dalších auxinových prekurzorů (Trp a IAN) a oxIAA podobný metabolický profil cukerného konjugátu oxIAA-glc (2-oxoindol-3-ylacetyl-1-O-β-D-glukóza). Na základě získaných výsledků lze oběma testovaným inhibitorům přisoudit podíl na blokování IPyA biosyntetická dráhy.

4.2.3.2 Klíčící rostliny *A. thaliana* ovlivněné inhibitorem auxinového transportu

Celková auxinová homeostáze u rostlin je kontrolována pomocí biosyntézy, degradace, transportu nebo skladování. Hladiny auxinů mohou být tedy ovlivněny i inhibitorem auxinového transportu NPA.

Naše výsledky tento předpoklad jednoznačně nepotvrdily. Ani hladiny prekurzoru IPyA, ani hladiny IAA nevyjadřovaly žádný trend (Obr. 16). Signifikantní nárůst koncentračních hladin u rostlin ošetřených NPA byl nalezen pouze pro nejvyšší aplikovanou koncentraci u dvou auxinových metabolitů – IAA-Asp a oxIAA-glc (Příloha 3). Tento výsledek je asi v souvislosti s nalezeným fenotypem ošetřených rostlin a toxicitou vysoké koncentrace NPA (kapitola 4.2.1).



Obr. 16. Profil vybraných metabolitů auxinů u rostlin ošetřených NPA. Koncentrace IAA metabolitů (pmol/g č.h.) po ovlivnění rostlin různými koncentracemi inhibitoru (0,01 μM; 0,1 μM; 1 μM a 10 μM). Výsledky byly statisticky zpracovány a porovnány s negativní kontrolou (0,1% DMSO), vyhodnoceny v excelu (t-test) se signifikantním výsledkem (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Sloupkové grafy zobrazují průměr \pm směrodatná odchylka (n=4).

5 DISKUZE

Auxiny a cytokininy jsou jedny z hlavních rostlinných hormonů. Cílem této diplomové práce bylo potvrzení hypotéz o vlivu syntetických regulátorů na fytohormonální metabolismus a optimalizace izolace symplastu a apoplastu. Během diplomové práce bylo potvrzeno, že syntetické auxinové inhibitory mají vliv na auxinový metabolismus a že vznik jednotlivých metabolitů IAA musí být ještě prozkoumán, jelikož nebylo objasněno, jaká koncentrace inhibitoru je optimálně biologicky aktivní.

Experimenty izolace apoplastu a symplastu byly uskutečňovány na osmidenních rostlinách *Ath-Ler* podle publikovaného protokolu Antoniadi a kol. (2020) a diplomové práce Koničková D. (UP Olomouc, 2020). Byla provedena optimalizace postupu (v izolačním kroku) a pomocí metod LC-MS/MS byly stanoveny hladiny metabolitů fytohormonů (auxinů a cytokininů) v apoplastické (MeOH, ACN) a symplastické (MeOH) frakci, a to jak z kořenů, tak nadzemní části (Příloha A).

Nejprve byly izoláty sráženy v MeOH okyseleném 1% kyselinou mravenčí (Hoyerová a kol., 2006). Optimalizace byla provedena v izolačním kroku, kdy k polovině vzorků byl IS přidán do okyseleného MeOH ještě před srážením, k druhé polovině až po vysrážení. Poté byly stanoveny hladiny metabolitů v obou frakcích (symplastické i apoplastické) a studován byl vliv srážení na výsledný profil auxinů a cytokininů. Porovnáván byl poměr koncentračních hladin metabolitů („před PP“/„po PP“) stanovených metodou izotopického zředování ve vzorcích s přídavkem směsi IS v různých fázích sběru (Tab. 2). Při použití okyseleného MeOH bylo dokázáno, že vhodnější je, aby byl IS přidáván před srážením nasbíraných frakcí. Tento závěr je ve shodě s obecně přijímanými postupy přídavku IS na počátku zpracování rostlinných vzorků (nejlépe před extrakčním krokem) (Ljung a kol., 2004). Bylo zjištěno, že hladina IAA v apoplastické frakci izolované z kořenové části se výrazně lišila (27,9x u MeOH vyšší hladina ve vzorcích „před PP“) a stejně jako hladina CK *O*-glukosidů (narůst 21,5x v methanolické frakci s přídavkem IS před PP). Z tohoto důvodu je nutné optimalizovat protokol za účelem přesnějších výsledků, zvolit větší množství biologického opakování, zaměřit se na výtěžnost a zkusit použít další (jiné) extrakční činidlo. V dalších SPE krocích se pro analýzu auxinů a jejich metabolitů pomocí SPE nejčastěji využívají polymerní reverzní sorbenty a pro cytokininy polymerní sorbenty se smíšeným mechanismem záchytu (Novák a kol., 2014). V této práci byla také použita μ SPE-PT využívající kombinaci sorbentů C18/SDB-XC (Pěňčík a kol., 2018). Vysrážením proteinů pomocí organického srážedla by měla zamezit enzymatické degradaci

a aplikace IS k extrakčnímu činidlu by měla zvýšit pokrytí ztrát fytohormonů při extrakci i při následné SPE purifikaci.

Pomocí LC-MS/MS byly analyzovány endogenní hladiny auxinů a cytokininů. Detekovány byly jednotlivé metabolity fytohormonů (u CKs – báze, ribosidy, *O*-glukosidy, *N*-glukosidy a u auxinů – IAA) v obou frakcích. Detekována byla i část auxinů, která se vyskytuje v konjugované formě (data nejsou prezentovány). Tyto formy jsou zásobní formy IAA a u *A. thaliana* představují až 10% z celkového obsahu IAA (Tam a kol., 2000; Ljung a kol., 2002). U cytokininů tvořily glykosylované formy (OG i NG) přes 50% z celkového zastoupení detekovaných CK metabolitů u symplastu i apoplastu izolovaného z kořenů. U obou frakcí jimaných z prýtu dosahoval podíl těchto forem 93-96% a zastoupení aktivních CK bází bylo nižší než 1%. I tento nálezný je ve shodě s předešlými publikovanými výsledky zastoupení CK metabolitů v klíčících rostlinách *A. thaliana* (Svačinová a kol., 2012).

Celkově výsledky dokazují, že MeOH je vhodným extrakčním činidlem. Tento fakt potvrzuje naši hypotézu, jelikož právě MeOH s přidavkem různých aditiv se nejčastěji využívá pro extrakci fytohormonů (Tarkowská a kol., 2014). Avšak CK nukleotidy nebyly jednoznačně kvantifikovány. Jejich koncentrační hladiny byly blízko nebo pod limitou detekce, což může být dáno jejich špatnou rozpustností v organických činidlech (Hoyerová a kol., 2006). Na druhou stranu byl izolační protokol optimalizován za účelem snížení variability výsledků (Tab. 2). Pro srovnání byl zvolen okyselený ACN (Nováková a Vlčková, 2009), který při porovnání relativních směrodatných odchylek poskytoval nižší rozptyl výsledků a zvyšoval robustnost izolační metody. I když byl metabolický profil srovnatelný u obou činidel (Příloha A), tak u ACN byly kvantifikovány nižší hladiny fytohormonů (69x u IAA a 2-7x u CKs). Příčina tohoto efektu může být dána rozdílnou rozpustností rostlinných hormonů a také nižší extrakční účinností ACN pro izolaci námi studovaných metabolitů z rostlinné matrice.

Druhá část této diplomové práce byla věnována studiu vlivu syntetických inhibitorů na homeostázi auxinů u *A. thaliana* ekotyp Columbia-0. Byl testován vliv inhibitorů auxinové biosyntézy (kynureninu a yucasinu) a inhibitoru polárního transportu (kyseliny N-1-(naftyl)ftalamové) na délku primárního kořene, na auxinový signální v kořenové špičce a na metabolický profil auxinů.

Byla stanovena aktivní koncentrace auxinových inhibitorů ovlivňující růst primárního kořene (Obr. 12). Bylo potvrzeno, že NAA (pozitivní kontrola) způsobuje zkrácení primárního kořene (Obr. 11). Po aplikaci KYN byl zaznamenán nárůst délky kořene se zvyšující se koncentrací, ale nejvyšší koncentrace 10 μM byla již pro rostlinu toxická. Byla potvrzena hypotéza, že účinná koncentrace KYN je 0,01 μM a že při vysokých koncentracích (30 μM) se

začíná tvořit kořenové vlášení (He a kol., 2011). U YUC byl zaznamenán obdobný trend, délka kořene rostla, nicméně od koncentrace 1 μM se jeho délka postupně zkracovala (Obr. 12). Za našich experimentálních podmínek nebyl YUC při vyšších koncentracích pro rostlinu toxický. Již dříve bylo zjištěno, že 20 μM YUC snižuje značně endogenní hladinu IAA u mutantů *yuc* po 5 h inkubaci ale také u rostlin divokého typu. Rostliny ošetřené 20 μM YDF (difluorovaný Yucasin) vykazují fenotyp charakteristický nedostatkem auxinu (Tsugafune a kol., 2017). U rostlin ošetřených NPA byla pro nízké koncentrace (0,01 μM a 0,1 μM) pozorována ztráta schopnost gravitropismus a vyšší koncentrace (1 μM a 10 μM) vedly ke zkrácení délky primárního kořene (Obr. 12).

Stanovené účinné koncentrace inhibitorů (0,01 μM pro KYN i YUC a 1 μM pro NPA) byly poté použity pro další experiment zabývající se studiem ovlivnění auxinových signálních drah v kořenové špičce. Byly použity pětidenní rostliny auxinové reportérové linie *DR5v2::ntdTomato* (Liao a kol., 2015), které byly ovlivněny 16 h syntetickými inhibitory blokujícími auxinovou biosyntézu nebo transport. Syntetický promotor DR5 je citlivý na přítomnost auxinu a vyvolaná auxinová odpověď vede k syntéze proteinu *ntdTomato* (Pařízková a kol., 2017). Testované inhibitory spouštěly auxinový signalling a tím expresi cílových genů, jejichž tkáňově-specifickou distribuci jsme sledovali pomocí mikroskopie (Obr. 13). Fluorescence z konfokálního mikroskopu byla také kvantifikována (Obr. 14). Předpokládali jsme, že dojde ke snížení fluorescence u inhibitorů biosyntézy (KYN, YUC) oproti negativní kontrole (DMSO). Nižší hladina fluorescence naznačující snížení auxinového signallingu byla sice zaznamenána, nicméně výsledky nebyly signifikantní (Obr. 14). Naopak u NPA došlo k nárůstu fluorescence oproti kontrole, což bylo ve shodě s očekáváním. U vyšší koncentrace pozitivní kontroly (0,1 μM NAA) vykazovala nejvyšší fluorescenci, nicméně očekávána byla vyšší fluorescence. Distribuce fluorescence v rámci kořenové špičky byla po ovlivnění různým inhibitorem nebyla výrazně rozdílná (Obr. 13). Pro další experimenty bude vhodné zvolit jinou reportérovou linii (např. *p35S::DII-Venus*; Brunoud a kol, 2012), jinou dobu inkubace než 16h a použít pro experiment větší počet opakování (biologických jedinců).

Posledním experimentem bylo sledování profilů auxinů (prekurzorů i metabolitů IAA) v klíčících rostlinách *Ath-Col-0* ovlivněných námi studovanými syntetickými inhibitory (KYN, YUC i NPA). Nejvyšších hodnoty byly naměřené u IAN a Trp, jejichž koncentrace byla 10.000-100.000 pmol/g č.h. (Příloha C), což bylo ve shodě s publikovanými koncentračními hladinami těchto metabolitů (Novák a kol, 2012). Trp je důležitá aminokyselina a prekurzor pro mnoho důležitých aromatických látek (Maeda a Dudareva, 2012) i aktivního auxinu (Di a kol., 2015).

Nejnižší hodnoty vykázal IAM a konjugáty IAA-Asp, IAA-Glu, které jsou nejzastoupenějšími konjugáty IAA v *A. thaliana* (Kowalczyk a Sandber, 2001).

Získané výsledky podvrdily, že inhibitor KYN blokuje přeměnu Trp na IPyA. U mladých rostlin *Ath-Col-0* inkubovaných s KYN byla detekována snížená koncentrace IPyA se zvyšujícími se koncentracemi inhibitoru (Obr. 15). Podobný trend byl zaznamenán také u katabolitu oxIAA, avšak hladiny aktivního auxinu byly pravděpodobně kompenzovány dalšími biosyntetickými drahami a byly signifikantně sníženy pouze při aplikaci nejvyšších koncentrací KYN (1 μ M a 10 μ M). Také u YUC se potvrdilo jeho inhibiční zapojení do biosyntézy IAA přeměnou z IPyA, jehož hladiny byly po inkubaci rostlin mírně zvýšeny (Obr. 15). Překvapivě byly zvýšeny i koncentrace aktivního IAA, které byly pravděpodobně kompenzovány dalšími biosyntetickými drahami (Mashiguchi a kol., 2011). Dle předpokladu bylo u některých metabolitů (oxIAA a oxIAA-glc) v testované koncentrační závislosti detekován signifikantní pokles koncentračních hladin (Příloha C). U poslední inhibitoru auxinového transportu (NPA) se předpokládalo, že by mohl také ovlivňovat biosyntétu IAA skrze auxinovou homeostazu. Jeho vliv na hladiny IAA, IAA prekurzorů a metabolitů byl minimální a pouze nejvyšší aplikovaná koncentrace signifikantně ovlivnila koncentrační hladiny u dvou auxinových metabolitů – IAA-Asp a oxIAA-glc (Příloha C).

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se věnovala optimalizaci metod izolace symplastu a apoplastu a dále studiu vlivu vybraných syntetických inhibitorů biosyntetických drah (kynurenin a yucasin) a transportu (N-1-(naftyl)ftalamová) na dynamické změny homeostázy auxinů v rostlině *A. thaliana*. V úvodu je podrobně shrnuta problematika fytohormonální homeostázy, účinky syntetických inhibitorů narušujících biosyntézu, metabolismus a transport auxinů v rostlinách a také využití moderních analytických metod při stanovení fytohormonů.

V rámci diplomové práce bylo zjištěno, že auxinové inhibitory biosyntetických drah jsou účinné, ale jejich aktivní koncentrace není zcela objasněna a měla by být cílem dalších studií. Dále by měla být zvážena delší inkubace rostlin s auxinovými inhibitory ovlivňujících homeostázu hormonů v rostlině *A. thaliana*. Také vliv syntetických inhibitorů na auxinový signalling nebyl jednoznačně prokázán. Například použití jiných reportérových linií, optimalizace účinných koncentrací nebo doby ošetření si zaslouží další výzkum.

Pro další experimenty týkajících se izolace symplastu a apoplastu navrhuje pokračovat v optimalizaci podmínek protokolu, např. vybrat jiná extrakční činidla. Neméně důležitou roli hraje také volba rostlinného materiálu. Navrhujeme tedy, aby pro izolaci apoplastu a symplastu byly testovány rostliny různého stáří, pěstované na plném MS médiu nebo na médiu obsahujícím rozdílné typy inhibitorů. Dalším řešením je použití jiného rostlinného ekotypu *A. thaliana*, u kterého by byl vliv inhibitorů na fytohormonální profil víc jednoznačný.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adamowski M., Friml J. (2015). PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution“ *Plant Cell* **27(1)**, 20–32.
- Allen M., Qin W., Moreau F., Moffatt B. (2002). Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of Arabidopsis and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiologia Plantarum* **115(1)**, 56–68.
- Antoniadi I., Novák O., Gelová Z., Johnson A., Plíhal O., Simerský R., Mik V., Vain T., Mateo-Bonmatí E., Karady M., Pernisová M., Plačková L., Opassathian K., Hejátko J., Robert S., Friml J., Doležal K., Ljung K., Turnbull C. (2020). Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins. *Nat Commun* **11**, 4284.
- Bai Y., Du F., Bai Y., Liu H. (2010). Determination strategies of phytohormones: recent advances. *Analytical Methods* **2(12)**, 1867–1873.
- Bajguz A., Piotrowska A. (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70(8)**, 957–969.
- Barbez E., Kubeš M., Rolčík J., Béziat C., Pěňčík A., Wang B., Rosquete M. R., Zhu J., Dobrev P. I., Lee Y., Zažímalová E., Petrášek J., Geisler M., Friml J., Kleine-Vehn J. (2012). A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* **485(7396)**, 119–122.
- Barkawi L. S., Tam Y.-Y., Tillman J. A., Normanly J., Cohen J. D. (2010). A high-throughput method for the quantitative analysis of auxins. *Nature protocols* **5(10)**, 1609–1618.
- Bennett M. J., Marchant A., Green H. G., May S. T., Ward S. P., Millner P. A., Walker A. R., Schulz B., Feldmann K. A. (1996). Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273(5277)**, 948–950.
- Bennett T., Brockington S. F., Rothfels C., Graham S. W., Stevenson D., Kutchan T., Rolf M., Thomas P., Wong G. K., Leyser O., Glover B. J., Harrison C. J. (2014). Paralogous radiations of PIN proteins with multiple origins of noncanonical PIN structure. *Molecular Biology and Evolution* **31(8)**, 2042–2060.
- Bentley J. A., Farrar K. R., Housley S., Smith G.F., Taylor W.C. (1956). Some chemical and physiological properties of 3-indolylpyruvic acid. *Biochemical Journal* **64(1)**, 44–49.
- Bielecki R. L. (1964). The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry* **9**, 431–442.

- Bishopp A., Help H., El-Showk S., Weijers D., Scheres B., Friml J., Benková E., Mähönen A. P., Helariutta Y. (2011). A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology* **21(11)**, 917–926.
- Boer D. R., Freire-Rios A., van den Berg W.A.M., Saaki T., Manfield I. W., Kepinski S., López-Vidriero I., Franco-Zorrilla J.M., de Vries S.C., Solano R., Weijers D., Coll M. (2014). Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell* **156(3)**, 577–589.
- Bosco C. D., Dovzhenko A., Liu X., Woerner N., Rensch T., Eismann M., Eimer S., Hegermann J., Paponov I. A., Ruperti B., Heberle-Bors E., Touraev A., Cohen J. D., Palme K. (2012). The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis: Endoplasmic reticulum localized PIN8. *Plant Journal* **71(5)**, 860–870.
- Brumos J., Alonso J. M., Stepanova A. N. (2013). Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiologia Plantarum* **151(1)**, 3–12.
- Brunoni F., Collani S., Šimura J., Schmid M., Bellini C., Ljung K. (2019). A bacterial assay for rapid screening of IAA catabolic enzymes. *Plant Methods* **15(1)**, 126.
- Brunoud G., Wells D. M., Oliva M., Larrieu A., Mirabet V., Burrow A. H., Beeckman T., Kepinski S., Traas J., Bennett M.J., Vernoux T. (2012). A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* **482**, 103–106.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993). Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262(5136)**, 1051–1054.
- Campanoni P., Nick P. (2005). Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology* **137(3)**, 939–948.
- Canny M.J., (1995). Apoplastic Water and Solute Movement – New Rules for an Old Space. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46(1)**, 215–236.
- Cao X., Yang H., Shang C., Ma S., Liu L., Cheng J. (2019). The Roles of Auxin Biosynthesis YUCCA Gene Family, *Plants. International Journal of Molecular Sciences*, **20(24)**, 6343.
- Cazzonelli C.I., Vanstraelen M., Simon S., Yin K., Carron-Arthur A., Nisar N., Tarle G., Cuttriss A.J., Searle I.R., Benkova E., Mathesius U., Masle J., Friml J., Pogson B.J. (2013). Role of the Arabidopsis PIN6 auxin transporter in auxin homeostasis and auxin-mediated development. *PLoS ONE* **8(7)**, e70069.
- Darwin C, Darwin F. (1880). *The power of movement in plants*. Appleton-Century, New York, USA.

Davies P. J. (2004). *Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Davies P. J. (2010): *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* 3rd edition Springer, Dordrecht, Netherlands.

De Smet S., Cuypers A., Vangronsveld J., Remans T. (2015). Gene Networks Involved in Hormonal Control of Root Development in *Arabidopsis thaliana*: A Framework for Studying Its Disturbance by Metal Stress. *International Journal of Molecular Sciences* **16(8)**, 19195–19224.

Del Pozo J. C., Diaz-Trivino S., Cisneros N., Gutierrez C. (2007). The E2FC-DPB transcription factor controls cell division, endoreplication and lateral root formation in a SCFSKP2A-dependent manner. *Plant Signaling & Behavior* **2(4)**, 273–274.

Délye C., Jasieniuk M., Le Corre V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics* **29**, 649–658.

Di D. W., Zhang C., Luo P., An Ch. W., Guo G.Q. (2015). The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? *Plant Growth Regulation* **78**, 275–285.

Du F., Ruan G., Liu H. (2012). Analytical methods for tracing plant hormones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403(1)**, 55–74.

El-Showk S., Ruonala R., a Helariutta Y. (2013). Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140(7)**, 1373–1383.

Enders T.A., Strader L.C. (2015). Auxin activity: Past, present, and future. *American Journal of Botany* **102(2)**, 180–196.

Entsch B., Parker C.W., Letham D.S., Summons R.E. (1979): Preparation and characterization, using high-performance liquid chromatography, of an enzyme forming glucosides of cytokinins. *Biochimica et Biophysica Acta* **570(1)**, 124–139.

Feng J., Shi Y., Yang S., Zuo J. (2017). *Cytokinins, Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. 1st Edition, Academia Press, Cambridge, USA, pp. 77–106.

Floková K., Tarkowská D., Miersch O., Strnad M., Wasternack C., Novák O. (2014). UHPLC – MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* **105**, 147–157.

Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation, *Journal of Experimental Botany* **62(8)**, 2431–2452.

- Frébortová J., Fraaije M. W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2004). Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121–130.
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jürgens G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**, 147–153.
- Friml J., Wiśniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* **415**, 806–809.
- Fu J., Sun X., Wang J., Chu J., Yan C. (2011). Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Science Bulletin* **56**, 355–366.
- Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P. I., Galuszka P., Klíma P., Gaudinová A., Žizková E., Hanus J., Dancák M., Trávníček B., Pešek B., Krupička M., Vaňková R., Strnad M., Motyka V. (2011). Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany* **62(8)**, 2827–2840.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmülling T., Frébort I. (2007). Biochemical characterization of cytokinin oxidase/dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L., *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 255–267.
- Galweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282(5397)**, 2226–2230.
- George E. F., Hall M. A., Klerk, G. J. De. (2008). Plant tissue culture procedure – Background. In *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition, Springer, Netherlands, pp. 1–28.
- Gray W. M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O., Estelle M. (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414(6861)**, 271–276.
- Harrison S. T. L. (2011). Cell disruption. In: *Comprehensive biotechnology*, 2nd edition (Moo-Young M., ed.), Elsevier, Oxford, UK, pp. 619–640.
- Hayashi K, Arai K, Aoi Y, Tanaka Y, Hira H, Guo R, Hu Y, Ge C, Zhao Y, Kasahara H, Fukui K. (2021). The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communications* **12**, 6752.
- He W., Brumos J., Li H., Ji Y., Ke M., Gong X., Zeng Q., Li W., Zhang X., An F., Wen X., Li P., Chu J., Sun X., Yan C., Yan N., Xie D. Y., Raikhel N., Yang Z., Stepanova A. N., Guo H. (2011). A small-molecule screen identifies L-kynurenine as a competitive inhibitor of TAA1/TAR activity in ethylene-directed auxin biosynthesis and root growth in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **23(11)**, 3944–3960.

Hirose N., Takei K., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* **59**(1), 75–83.

Hluska T., Dobrev P. I., Tarkowská D., Frébortová J., Zalabák D., Kopečný D., Plíhal O., Kokáš F., Briozzo P., Zatloukal M., Motyka V., Galuszka, P. (2016). Cytokinin metabolism in maize: Novel evidence of cytokinin abundance, interconversions and formation of a new trans-zeatin metabolic product with a weak anticytokinin activity. *Plant Science* **247**, 127–137.

Höxtermann E. (1997). Cellular 'elementary organisms' in vitro. The early vision of Gottlieb Haberlandt and its realization, *Physiol Plantarum* **100**(3), 716–728.

Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P. I., Kocábek T., Solcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006). Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**, 1151–1159.

Hwang I., Sakakiara H. (2006). Cytokinin biosynthesis and perception. *Physiologia Plantarum*. **126**(4), 528–538.

Chapman E. J., Estelle M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual Review of Genetics* **43**, 265–285.

Izumi Y., Okazawa A., Bamba T., Kobayashi A., Fukusaki E. (2009). Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **648**(2), 215–225.

Jones, B., Gunnerås, S. A., Petersson, S. V., Tarkowski, P., Graham, N., May, S., Dolezal, K., Sandberg, G., Ljung, K. (2010). Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell*, **22**(9), 2956–2969.

Jurado S., Abraham Z., Manzano C., Lopez-Torrejon G., Pacios L.F., Del Pozo J.C. (2010). The *Arabidopsis* Cell Cycle F-Box Protein SKP2A Binds to Auxin. *Plant Cell* **22**(12), 3891–3904.

Jurado S., Díaz-Triviño S., Abraham Z., Manzano C., Gutierrez C., Pozo C. del (2008). SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. *Plant Journal* **53**(5), 828–841.

Takei Y., Yamazaki C., Suzuki M., Nakamura A., Sato A., Ishida Y., Kikuchi R., Higashi S., Kokudo Y., Ishii T., Soeno K., Shimada Y. (2015). Small-molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. *Plant Journal*, **84**(4), 827–837.

Kakimoto T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiology* **42(7)**, 677–685.

Kamada-Nobusada T., Sakakibara H. (2009). Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* **70(4)**, 444–449.

Kamínek M. (2015) Tracking the Story of Cytokinin Research. *Journal Plant Growth Regulation* **34(4)**, 723–739.

Kamínek M., Vaněk T., Motyka V. (1987). Cytokinin activities of *N*⁶-benzyladenosine derivatives hydroxylated on the side-chain phenyl ring, *Journal Plant Growth Regulation* **6**, 13–120

Kang J., Lee Y., Sakakibara H., Martinoia E. (2017). Cytokinin Transporters: GO and STOP in Signaling. *Trends in Plant Science* **22(6)**, 455–461.

Kögl F., Haagen-Smith A. J., Erxleben H. (1934). Über ein neues Auxin („Hetero-auxin“) aus Harn. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*. **228**, 90–103.

Kojima M., Kamada-Nobusada T., Komatsu H., Takei K., Kuroha T., Mizutani M., Ashikari M., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M., Suzuki K., Sakakibara H. (2009). Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: An application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant and Cell Physiology* **50(7)**, 1201–1214.

Koničková D. (2020). Vplyvy syntetických inhibítorov na homeostázu rastlinných hormónov. UP Olomouc, ČR.

Korasick D. A., Enders, T. A., Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, **64(9)**, 2541–2555.

Kowalczyk M. Sandberg G. (2001). Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**, 1845–1853.

Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, **52(1)**, 53–60.

Kunikowska A., Byczowska A., Doniak M., Kaźmierczak A. (2013). Cytokinins résumé: their signaling and role in programmed cell death in plants. *Plant Cell Reports* **32(6)**, 771–780.

Laloue M., Terrine C., Gawer M. (1974). Cytokinins: Formation of the nucleoside-5'-triphosphate in tobacco and *Acer* cells. *FEBS Letters* **46**, 1–2.

Laplaze L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M. B., Offringa, R., Graham, N., Doumas, P., Friml, J., Bogusz,

- D., Beeckman, T., Bennett, M. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* **19**(12), 3889–3900.
- Lavy M., Estelle M. (2016). Mechanisms of auxin signaling, *Development* **143**(18), 3226–3229.
- Letham D. S. (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Science* **8**, 569–573.
- Li X., Mo X., Shou H., Wu P. (2006). Cytokinin-Mediated Cell Cycling Arrest of Pericycle Founder Cells in Lateral Root Initiation of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **47**(8), 1112–1123.
- Li G. Y., Liu K. F., Baldwin S. A., Wang, D. W. (2003). Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana* - cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *The Journal of Biological Chemistry* **278**(37), 35732–35742.
- Liao C.-Y., Smet W., Brunoud G., Yoshida S, Vernoux T., Weijers D. (2015). Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. *Nature Methods* **210**(2), 207–210.
- Liu Z. B., Ulmasov T., Shi X., Hagen G., Guilfoyle T. J. (1994). Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell* **6**(5), 645–657.
- Liu, X., Yang, Y., Lin, W., Tong, J., Huang, Z., Xiao, L. (2010). Determination of both jasmonic acid and methyl jasmonate in plant samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chinese Science Bulletin* **55**, 2231–2235.
- Ljung K., Sandberg G., Moritz T. (2004). Methods of plant hormone analysis. In: *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (Davies P.J., ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 671–694.
- Ljung, K., Hull, A. K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J. D., & Sandberg, G. (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, **50**(3-4), 249–272.
- Lomin S. N, Krivosheev D. M, Steklov M. Y, Arkhipov D. V, Osolodkin D. I, Schmülling T., Romanov G. A. (2015.) Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *Journal of Experimental Botany* **66**(7), 1851–1863.
- López-Millán A. F., Morales F., Abadía A., Abadía J. (2001) Iron deficiency-associated changes in the composition of the leaf apoplastic fluid from field-grown pear (*Pyrus comunis* L.) trees. *Journal of Experimental Botany*, **52**(360), 1489–1498.

- Ludwig-Müller J. (2010). Hormonal responses in host plants triggered by arbuscular mycorrhizal fungi. in *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function* Springer, Netherlands, pp. 169–190.
- Luschnig C., Gaxiola R. A., Grisafi P., Fink G. R. (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* **12(14)**, 2175–2187.
- Maeda H., Dudareva N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 73–105.
- Martin R. C., Mok M. C., Shaw G., Mok D.W. (1989). An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in phaseolus embryos. *Plant Physiology* **90(4)**, 1630–1635.
- Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara S., Kawaide H., Natsume M., Hanada A., Yaeno T., Shirasu K., Yao H., McSteen P., Zhao Y., Hayashi K., Kamiya Y., Kasahara H. (2011). The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108(45)**, 18512–18517.
- Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara S., Kawaide H., Natsume M., Hanada A., Yaeno T., Shirasu K., Yao H., McSteen P., Zhao Y., Hayashi K.-I., Kamiya Y., Kasahara H. (2011). The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18512–18517.
- Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F.M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid1. *Journal of the American Chemical Society* **77(5)**, 1392–1392.
- Miyake T., Shibamoto T. (1993). Quantitative analysis of acetaldehyde in foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41(11)**, 1968–1970.
- 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 Journal* **37(1)**, 128–138.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006). Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America* **103(44)**, 16598–16603.
- Mok D. W., Mok M. C. (2001). Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.
- Mravec J., Skůpa P., Bailly A., Hoyerová K., Křeček P., Bielach A., Petrášek J., Zhang J., Gaykova V., Stierhof Y. D., Dobrev P. I., Schwarzerová K., Rolčik J., Seifertová D., Luschnig Ch., Benková E., Zažímalová E., Geisler M., Friml J. (2009). Subcellular homeostasis of

phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**, 1136–1140.

Muraro, D., Wilson M., Bennet M. J. (2011). Root Development: Cytokinin Transport Matters, Too! *Current Biology* **21(11)**, R423–R425.

Nguyen D. T., Guillaume D., Rudaz S., Veuthey J.L. (2006) Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *Journal of Separation Science* **29(12)**, 1836–1848.

Nishimura T., Hayashi K., Suzuki H., Gyohda A., Takaoka C., Sakaguchi Y., Matsumoto S., Kasahara H., Sakai T., Kato J., Kamiya Y., Koshiba T. (2014). Yucasin is a potent inhibitor of YUCCA, a key enzyme in auxin biosynthesis. *Plant Journal* **77(3)**, 352–366.

Nordström A., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Astot C., Sandberg G., Moritz T. (2004). Derivatization for LC-electrospray ionization-MS: a tool for improving reversed-phase separation and ESI responses of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Analytical Chemistry* **76(10)**, 2869–2877.

Normanly J., Cohen J. D., Fink G. R. (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan- independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90(21)**, 10355–10359.

Normanly J., Slovin J. P., Cohen J. D. (2010). Auxin Biosynthesis and Metabolism. In: *Plant Hormones*: (Davies P. J., ed.), Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 36–62.

Novák O., Hauserová E., Amakorová P., Doležal K., Strnad M. (2008): Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69(11)**, 2214–2224.

Novák O., Hényková E., Sairanen I., Kowalczyk M., Pospíšil T., Ljung K. (2012). Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant Journal* **72(3)**, 523–536.

Novák O., Napier R., Ljung K. (2017). Zooming in on plant hormone analysis: tissue- and cell-specific approaches. *Annual Review Plant Biology* **68**, 323–348.

Novák O., Pěňčík A., Ljung K. (2014). Identification and Profiling of Auxin and Auxin Metabolites. In: *Auxin and Its Role in Plant Development*. 1st ed., (Zažímalová E., Petrášek J., Benková E., eds.), Springer-Verlag, Wien, Austria, pp. 39–60.

Novák O., Tarkowski P., Doleža, K., Lenobel R., Strnad M. (2003). Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **480(2003)**, 207–218.

Nováková L., Vlčková H. (2009.) A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* **656**, 8–35.

Okada K., Ueda J., Komaki M. K., Bell C. J., Shimura Y. (1991). Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation. *Plant Cell* **3(7)**, 677–684.

Ouyang J., Shao X., Li J. (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **24(3)**, 327–333.

Pan X., Wang Y. (2009). Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *Journal of chromatography B* **877(26)**, 2806–2813.

Parry G, Delbarre A, Marchant A, Swarup R, Napier R, Perrot-Rechenmann C, Benner M. J. (2001). Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1. *Plant Journal* **25(4)**, 399–406.

Pařízková B., Pernisová M., Novák O. (2017). What Has Been Seen Cannot Be Unseen-Detecting Auxin In Vivo. *International Journal of Molecular Sciences* **18(12)**, 2736.

Pavlová L., Fischer L. (2011). Fytohormony. In: Růst a vývoj rostlin (Pavlová L. a Fischer L., eds.). Nakladatelství Karolinum, Praha, Česká republika, pp. 87–121.

Pěňčík A., Casanova-Sáez R., Pilarová V., Žukauskaite A., Pinto R., Micol J. L., Ljung K. a Novák O. (2018). Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **69(10)**, 2569–2579.

Pěňčík A., Rolčík J., Novák O., Magnus V., Barták P., Buchtík R., Salopek-Sondi B., Strnad M. (2009): Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta* **80(2)**, 651–655.

Pěňčík A., Simonovik B., Petersson S. V., Henyková E., Simon S., Greenham K., Zhang Y., Kowalczyk M., Estelle M., Zažímalová E., Novák O., Sandberg G., Ljung K. (2013). Regulation of auxin homeostasis and gradients in Arabidopsis roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole-3-acetic acid. *Plant Cell* **25(10)**, 3858–3870.

Perilli S., Moubayidin L., Sabatini S., (2010). The molecular basis of cytokinin function. *Current Opinion in Plant Biology* **13(1)**, 21–26.

Petersson S. V, Johansson A. I., Kowalczyk M., Makoveychuk A., Wang J. Y., Moritz T., Grebe M., Benfey P.N., Sandberg G., Ljung K. (2009). An Auxin Gradient and Maximum in the Arabidopsis Root Apex Shown by High-Resolution Cell-Specific Analysis of IAA Distribution and Synthesis. *Plant Cell* **21(6)**, 1659–1668.

- Petrášek J., Friml J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**, 2675–2688.
- Porco S., Pěnčík A., Rashed A., Voß U., Casanova-Sáez R., Bishopp A., Golebiowska A., Bhosale R., Swarup K., Peňáková P., Novák O., Staswick P., Hedden P., Phillips A. L., Vissenverg K., Bennett M. J., Ljung K. (2016). Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 11016–11021.
- Porfírio S., Gomes da Silva M. D. R., Peixe A., Cabrita M. J. a Azadi P. (2016). Current analytical methods for plant auxin quantification – a review. *Analytica Chimica Acta* **902**, 8–21.
- Procházka J., Šebánek, J. (1997). Regulátory Rostlinného Růstu. *Biologia Plantarum* **40**, 479.
- Procházka S., Macháčková I., Křehule J., Šebánek J., (1998). Fyziologie rostlin. Vydání 1. Academia, Praha, ČR.
- Quareshy M., Prusinska J., Li J., Napier R. (2017). A cheminformatics review of auxins as herbicides. *Journal of Experimental Botany* **69(2)**, 265–275.
- Ramos J. A., Zenser N., Leyser O., Callis J. (2001). Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *Plant Cell* **13(10)**, 2349–2360.
- Reinecke D. M. (1999). 4-Chloroindole-3-acetic acid and plant growth. *Plant Growth Regulation* **27(1)**, 3–13.
- Rittenberg D., Foster L. (1940) A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **133**, 727–744.
- Robert H. S., Friml J. (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology* **5**, 325–332.
- Rubery P. H. (1990.) Phytotropins: receptors and endogenous ligands. *Symposia of the Society for Experimental Botany* **44**, 119–146.
- Sakakibara H. (2006). Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual review of Plant Biology* **57**, 431–449
- Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. (2013). Auxin: Simply complicated. *Journal Experimental Botany* **64(9)**, 2565–2577.
- Schaller E. G., Bishopp A., Kieber J. J. (2015). The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *Plant Cell* **27(1)**, 44–63.

Schmitz R. Y., Skoog F. (1972). Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiology* **50(6)**, 702–705.

Simon S., Petrášek J. (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science* **180**, 454–460.

Sivasubramanian R., Mukhi N., Kaur J. (2015). *Arabidopsis thaliana*: A Model for Plant Research. *Plant Biology and Biotechnology* **2**, 1–26.

Skalický, V., Kubeš, M., Napier, R., Novák, O. (2018). Auxin and Cytokinins – The Role of Subcellular Organization on Homeostasis. *International Journal of Molecular Science* **19(10)**, 3115.

Skoog F., Miller C. O. (1965). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In: *Molecular and Cellular Aspects of Development* (Bell E., ed.). Harper and Row, New York, USA, pp. 481–494.

Skoog F., Miller C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **11**, 118–130.

Spíchal L. (2012). Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules, *Functional Plant Biology* **39(4)**, 267–284.

Staswick P. E., Serban B., Rowe M., Tiryaki I., Maldonado M. T., Maldonado M. C. a Suza W. (2005) Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17(2)**, 616–627.

Strader L., Bartel B. (2011). Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-butyric acid. *Molecular Plant* **4(3)**, 477–486.

Strnad M. (1997) The Aromatic Cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101(4)**, 674–688.

Svačinová J., Novák O., Plačková L., Lenobel R., Holík J., Strnad M., Doležal K. (2012). A new approach for cytokinin isolation from *Arabidopsis* tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* **8**, 17.

Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G., Palme K., Bennett M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes & Development* **15(20)**, 2648–2653.

Šebánek J. a kol. (1983). *Fyziologie rostlin*. 1. vyd. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, ČR.

Šimášková, M., O'Brien, J. A., Khan, M., Van Noorden, G., Ötvös, K., Vieten, A., De Clercq, I., Van Haperen, J., Cuesta, C., Hoyerová, K., Vanneste, S., Marhavý, P., Wabnik, K., Van Breusegem, F., Nowack, M., Murphy, A., Friml, J., Weijers, D., Beeckman, T., & Benková, E.

(2015). Cytokinin response factors regulate PIN-FORMED auxin transporters. *Nature Communications* **6**, 8717.

Šimura J., Antoniadis I., Široká J., Tarkowská D., Strnad M., Ljung K., Novák O. (2018). Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. *Plant Physiology* **177**, 476–489.

Štěpánová A. N., Robertson-Hoyt J., Yun J., Benavente L. M., Xie D. Y., Doležal K., Schlereth A., Jurgens G., a Alonso J.M. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133(1)**, 177–191.

Taiz L., Zeiger E. (2002). *Plant Physiology*. 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, USA.

Taiz L., Zeiger E. (2014). *Plant physiology and development*, 6 th edition, Signals and signal transduction, Sinauer Associates, Sunderland, USA, pp. 414–417.

Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001). Identification of genes encoding adenylate isontenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276(28)**, 26405–26410.

Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 Encode Cytokinin Hydroxylases That Catalyze the Biosynthesis of *trans*-Zeatin. *Journal of Biological Chemistry* **279(40)**, 41866–41872.

Taller B. J. (1994): Distribution, Biosynthesis, and Function of Cytokinins in tRNA. In: *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. (Mok D. W. S., Mok M. C., eds.), CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 101–108.

Tam Y. Y., Epstein E., Normanly J. (2000). Characterization of Auxin Conjugates in *Arabidopsis*. Low Steady-State Levels of Indole-3-Acetyl-Aspartate, Indole-3-Acetyl-Glutamate, and Indole-3-Acetyl-Glucose. *Plant Physiology* **123**, 589–596.

Tanaka M., Takei K., Kojima M., Sakakibara H., Mori H. (2006). Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant Journal* **45(6)**, 1028–1036.

Tao Y., Ferrer J.L., Ljung K., Pojer F., Hong F., Long J.A., Li L., Moreno J.E., Bowman M.E., Ivans L.J., Cheng Y., Lim J., Zhao Y., Ballare C.L., Sandberg G., Noel J.P., Chory J. (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133(1)**, 164–176.

Tarkowská D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., Rolčík J., Strnad M. (2014). Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* **240**, 55–76.

Tarkowski P., Ge L., Yong J., Tan S. (2009). Analytical methods for cytokinins. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28(3)**, 323–335.

- Thimann K. V. (1935). On the plant growth hormone produced by *Rhizopus suinus*. *Journal of Biological Chemistry* **109**, 279–291.
- Tsugafune S., Mashiguchi K., Fukui K., Takebayashi Y., Nishimura T., Sakai T., Shimada Y., Kasahara H., Koshiba T., Hayashi, K. (2017). Yucasin DF, a potent and persistent inhibitor of auxin biosynthesis in plants. *Scientific Reports* **7(1)**, 13992.
- Ueda M., Zhang Z., Laux T. (2011). Transcriptional Activation of Arabidopsis Axis Patterning Genes WOX8/9 Links Zygote Polarity to Embryo Development. *Developmental Cell* **20(2)**, 264–270.
- Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., Benková E., Benjamins R., Beeckman T., Luschnig C., Friml J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132(20)**, 4521–4531.
- Wisniewska J., Xu J., Seifertová D., Brewer P. B., Růžička K., Blilou I., Rouquié D., Benková E., Scheres B., Friml J. (2006). Polar PIN Localization Directs Auxin Flow in Plants. *Science* **312(5775)**, 883–883.
- Woodward A. W., Bartel B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany* **95(5)**, 707–735.
- Wright A. D., Sampson M. B., Neuffer M. G., Michalczuk L., Slovin J.P., Cohen J.D. (1991). Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. *Science* **254(5034)**, 998–1000.
- Wu X., McSteen P. (2007). The role of auxin transport during inflorescence development in maize (*Zea mays*, Poaceae). *American Journal of Botany* **94(11)**, 1745–1755.
- Yang Y, Hammes U. Z, Taylor C. G, Schachtman D. P, Nielsen E. (2006). High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology* **16(11)**, 1123–1127.
- Yu Q., Tang C., Chen Z., Kuo J. (1999). Extraction of apoplastic sap from plants roots by centrifugation. *New Phytologist* **143**, 299–304.
- Zalabák D., Galuszka P., Mrízová K., Podlešáková K., Gu R., Frébortová, J. (2014). Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiology and Biochemistry* **74**, 283–293.
- Zažímalová E., Křeček P., Skůpa P., Hoyerová K., Petrášek J. (2007). Polar transport of the plant hormone auxin – the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and Molecular Life Science* **64(13)**, 1621–1637.
- Zažímalová E., Murphy A.S., Yang H., Hoyerova K., Hosek P. (2010). Auxin Transporters- Why So Many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2(3)**, a001552.

- Zhan X., Zhu M., Shen Y., Yue L., Li J., Gardea- orresdey J. L., Xu G. (2017) Apoplastic and symplastic uptake of phenanthrene in wheat roots. *Environmental Pollution* **233**, 331–339.
- Zhang J., Peer W. A. (2017.) Auxin homeostasis: the DAO of catabolism. *Journal of Experimental Botany* **68(12)**, 3145–3154.
- Zhao Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 49–64.
- Zhao Y. (2012). Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular Plant* **5(2)**, 334–338.
- Zhao Y. (2014.) Auxin biosynthesis. *Arabidopsis Book* **12**, e0173.
- Zhu L., Zhang Y. H., Su F., Chen L., Huang T., Cai Y. D. (2016). A Shortest-Path-Based Method for the Analysis and Prediction of Fruit-Related Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, **11(7)**, e0159519.
- Zürcher E., Liu J., di Donato M., Geisler M., Müller, B. (2016). Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science* **353(6303)**, 1027–1030.

8 PŘÍLOHY

Příloha A

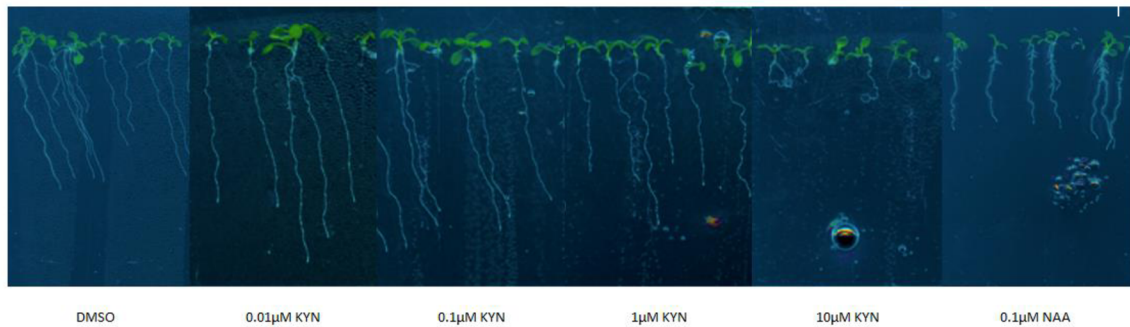
Koncentrační hladiny metabolitů ve vzorcích s přidavkem směsi IS v různých fázích sběru frakcí symplastu a apoplastu izolovaných z kořenů a nadzemních částí (prýtu) rostlin *Ath-Ler*. Směs IS byla přidána do okyseleného MeOH a ACN před a po sběru frakcí a poté byl vypočten poměr průměrných hladin fytohormonů vypočtených pro vzorky „před PP“/„po PP“. Stanovené koncentrace fytohormonů jsou uvedeny v pmol/g č.h. (n=4).

Analyt		IAA			CK báze			CK ribosidy			CK O-glukosidy			CK N-glukosidy		
Materiál	Přídavek IS	Průměr ± SD	RSD	Průměr ± SD	RSD	Průměr ± SD	RSD	Průměr ± SD	RSD	Průměr ± SD	RSD	Průměr ± SD	RSD	Průměr ± SD	RSD	
A) Okyselený MeOH (symplast)																
Kořen	n.d.	67,2 ± 7,5	11%	1,8	1,1 ± 0,5	45%	23,5	12,0 ± 6,9	58%	5,2	3,8 ± 1,7	44%	63,0	42,7 ± 18,6	44%	
	po PP	68,3		0,41			7,7			1,2			13,2			
		75,7		1,4			11,2			5,5			53,1			
		57,4		0,94			5,5			3,5			41,7			
	před PP	n.d.	483,7 ± 657,1	136%	4,1	3,8 ± 0,2	7%	56,3	52,1 ± 5,3	10%	11,6	6,1 ± 4,8	77%	130,9	70,9 ± 56,6	80%
		1412,9			3,5			54,8			10,2			124,0		
		6,7			3,8			54,3			1,3			15,3		
		31,5			3,5			43,0			1,5			13,4		
	Poměr "před PP"/"po PP"		7,2			3,3			4,4			1,6			1,7	
	Prýt	33,4	76,3 ± 68,4	90%	0,10	0,11 ± 0,02	23%	1,03	0,97 ± 0,04	5%	2,3	3,01 ± 1,13	38%	21,2	23,63 ± 5,41	23%
po PP		32,3		0,08			0,94			2,1			18,5			
		44,9		0,14			0,93			4,6			31,1			
		194,4		n.q.			n.q.			n.q.			n.q.			
před PP		119,9	181,9 ± 60,3	33%	0,77	0,74 ± 0,17	23%	3,6	5,40 ± 2,02	37%	17,4	8,97 ± 8,11	90%	117,9	67,43 ± 58,97	87%
		190,3			0,93			8,5			16,7			134,3		
		140,8			0,47			3,7			1,1			6,7		
		276,5			0,78			5,8			0,66			10,8		
Poměr "před PP"/"po PP"		2,4			6,9			5,6			3,0			2,9		
B) Okyselený MeOH (apoplast)																
Kořen	22,5	10,7 ± 7,1	67%	2,2	1,5 ± 0,5	31%	24,7	17,7 ± 5,1	29%	0,33	0,29 ± 0,06	20%	5,7	4,6 ± 1,1	24%	
	po PP	5,4		1,14			13,0			0,21			3,1			
		10,2		n.q.			n.q.			n.q.			n.q.			
		4,6		1,24			15,4			0,34			5,0			
	před PP	14,0	297,9 ± 402,4	135%	3,7	4,6 ± 2,9	63%	33,4	39,7 ± 28,2	71%	0,48	6,3 ± 6,2	98%	7,6	67,5 ± 69,2	102%
		99,0			9,6			87,0			1,7			20,0		
		992,6			3,0			24,6			16,3			182,6		
		86,1			2,2			13,7			6,8			59,9		
	Poměr "před PP"/"po PP"		27,9			3,0			2,2			21,5			14,7	
	Prýt	45,4	45,3 ± 14,5	32%	0,18	0,21 ± 0,09	43%	1,1	1,83 ± 0,98	54%	0,49	0,47 ± 0,12	26%	5,3	4,94 ± 1,46	30%
po PP		24,3		0,08			0,65			0,30			2,8			
		65,4		0,26			2,8			0,63			6,9			
		46,1		0,32			2,8			0,44			4,8			
před PP		114,4	210,4 ± 251,9	120%	0,42	0,60 ± 0,36	60%	2,3	3,69 ± 2,20	60%	1,1	11,85 ± 11,42	96%	7,6	82,75 ± 79,08	96%
		16,5			0,10			1,0			0,31			3,8		
		68,0			1,00			6,6			26,4			184,9		
		642,5			0,89			4,9			19,6			134,7		
Poměr "před PP"/"po PP"		4,6			2,9			2,0			25,5			16,7		
C) Okyselený ACN (apoplast)																
Kořen	1,1	1,2 ± 0,8	67%	1,2	0,59 ± 0,43	72%	10,9	4,9 ± 3,8	78%	0,22	0,11 ± 0,08	67%	3,8	2,2 ± 1,4	65%	
	po PP	0,90		0,80			5,5			0,15			3,3			
		0,28		0,18			1,0			0,04			0,57			
		2,5		0,19			2,3			0,05			1,0			
	před PP	3,5	4,3 ± 2,9	68%	0,68	0,66 ± 0,04	6%	6,3	5,8 ± 1,6	28%	0,23	0,21 ± 0,04	20%	1,9	1,9 ± 0,4	23%
		9,3			0,72			8,1			0,27			2,6		
		1,7			0,62			5,2			0,17			1,5		
		2,7			0,63			3,7			0,17			1,6		
	Poměr "před PP"/"po PP"		3,6			1,1			1,2			1,8			0,9	
	Prýt	2,9	4,9 ± 2,8	58%	0,31	0,19 ± 0,11	57%	0,20	0,21 ± 0,07	33%	0,05	0,06 ± 0,01	9%	1,0	1,1 ± 0,2	15%
po PP		3,3		0,28			0,31			0,06			1,3			
		9,7		0,09			0,19			0,05			1,1			
		3,6		0,08			0,13			0,06			0,87			
před PP		37,0	40,8 ± 3,0	7%	0,55	0,41 ± 0,10	24%	0,55	0,59 ± 0,08	14%	0,18	0,21 ± 0,03	12%	1,6	2,1 ± 0,5	22%
		44,3			0,44			0,63			0,21			2,8		
		38,8			0,29			0,69			0,20			1,9		
		42,9			0,35			0,48			0,26			2,0		
Poměr "před PP"/"po PP"		8,3			2,2			2,8			3,8			2,0		

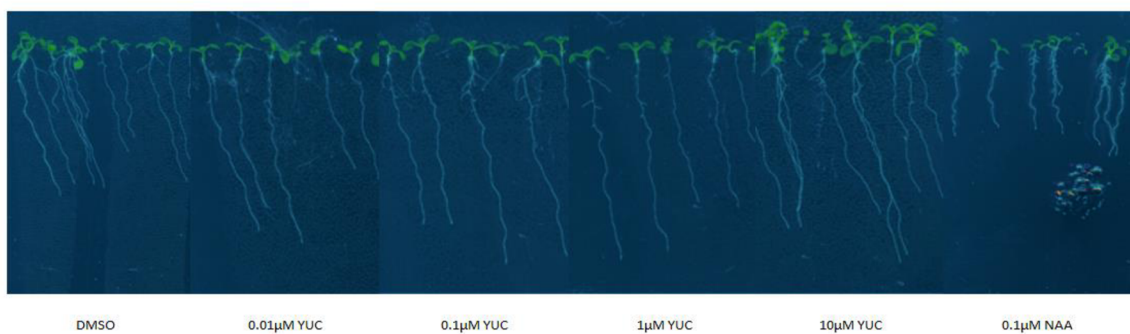
Příloha B

Fenotypizace osmidenních rostlin *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia-0 pěstovaných na ½ MS médiu obsahujícím danou koncentraci inhibitorů (A) KYN, (B) YUC a (C) NPA (0,01 μM; 0,1 μM; 1 μM ; 10 μM) ve srovnání s 0,1% DMSO (negativní kontrola) a 0,1 μM NAA (pozitivní kontrola).

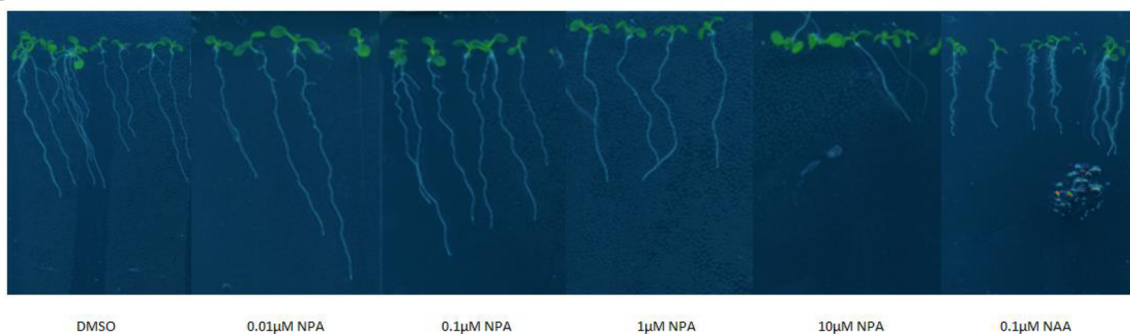
A



B



C



Příloha C

Celkový auxinový profil u osmidenních rostlin *A. thaliana* ošetřených různými koncentracemi (0,01 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M a 10 μ M) inhibitorů auxinové biosyntézy (KYN, YUC) a inhibitoru polárního transportu (NPA). Výsledky byly statisticky zpracovány a porovnány s negativní kontrolou (0,1% DMSO), vyhodnoceny v Excelu (t-test) se signifikantním výsledkem (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Stanovené koncentrace fytohormonů jsou uvedeny v pmol/g č.h. jako průměr \pm směrodatná odchylka (n=4).

Aplikovaná látka	Koncentrační hladiny auxinových prekurzorů (pmol/g č.h.)				
	ANT	TRP	IPyA	IAN	IAM
DMSO	437,4 \pm 125,0	14452,7 \pm 3660,8	325,2 \pm 52,8	61907,7 \pm 6509,1	12,1 \pm 1,6
0.1 μ M NAA	166,9 \pm 77,2 *	12487,2 \pm 5812,8	163,5 \pm 45,7 *	55725,9 \pm 11498,1	12,1 \pm 4,6
0.01 μ M KYN	301,2 \pm 48,8	11971,6 \pm 426,9	168,8 \pm 33,6 **	35087,3 \pm 3746,2 ***	7,7 \pm 1,3 **
0.1 μ M KYN	281,0 \pm 46,2	15620,3 \pm 3460,1	261,3 \pm 63,6	56551,5 \pm 7623,6	9,1 \pm 0,7 *
1 μ M KYN	303,6 \pm 38,7	15310,2 \pm 3232,4	173,5 \pm 33,5 **	54687,5 \pm 9285,2	10,4 \pm 1,8
10 μ M KYN	154,0 \pm 25,3 **	23772,6 \pm 4409,4 *	158,6 \pm 75,7 *	67617,2 \pm 6078,9	14,7 \pm 2,8
0.01 μ M YUC	238,9 \pm 86,5 *	22583,7 \pm 2828,6 *	316,2 \pm 50,0	63588,1 \pm 7328,9	10,9 \pm 1,4
0.1 μ M YUC	210,1 \pm 63,1 *	16052,6 \pm 1266,2	383,0 \pm 74,2	80351,4 \pm 16297,1	9,4 \pm 2,3
1 μ M YUC	316,7 \pm 70,5	14001,7 \pm 1187,7	221,4 \pm 31,6 *	87266,5 \pm 28121,9	9,3 \pm 1,9
10 μ M YUC	415,4 \pm 107,4	20513,0 \pm 1596,4 *	393,2 \pm 122,5	83889,2 \pm 15814,0 *	13,4 \pm 2,3
0.01 μ M NPA	359,9 \pm 38,5	15325,7 \pm 1693,2	355,6 \pm 119,1	67290,2 \pm 8674,0	13,9 \pm 2,9
0.1 μ M NPA	239,4 \pm 73,7	16358,8 \pm 5398,7	256,0 \pm 10,0	57932,5 \pm 3631,9	13,9 \pm 2,1
1 μ M NPA	255,9 \pm 44,7	16027,1 \pm 3042,9	314,1 \pm 124,1	55236,9 \pm 2574,6	11,5 \pm 1,6
10 μ M NPA	123,0 \pm 58,8 *	17108,7 \pm 4368,2	267,7 \pm 117,7	50943,4 \pm 6177,0	11,1 \pm 2,1

Aplikovaná látka	Koncentrační hladiny auxinových metabolitů (pmol/g č.h.)				
	IAA	oxIAA	oxIAA-glc	IAA-Asp	IAA-Glu
DMSO	98,7 \pm 7,5	480,7 \pm 90,5	1995,3 \pm 200,5	13,0 \pm 2,7	46,5 \pm 12,9
0.1 μ M NAA	50,8 \pm 15,2 **	289,3 \pm 64,5 *	2251,2 \pm 345,1	14,0 \pm 7,1	32,9 \pm 6,9
0.01 μ M KYN	102,3 \pm 11,3	295,0 \pm 45,3 *	2124,1 \pm 104,5	15,5 \pm 2,0	83,6 \pm 6,4 **
0.1 μ M KYN	94,1 \pm 5,3	419,6 \pm 36,6	2086,3 \pm 188,2	13,1 \pm 0,9	56,1 \pm 5,5
1 μ M KYN	88,3 \pm 3,8 *	370,3 \pm 15,0	2079,5 \pm 191,6	13,3 \pm 1,1	69,4 \pm 6,1 *
10 μ M KYN	45,7 \pm 4,6 ***	185,1 \pm 22,7 ***	1150,4 \pm 114,6 ***	3,7 \pm 0,4 **	19,1 \pm 2,3 **
0.01 μ M YUC	109,7 \pm 9,1	656,7 \pm 60,3 *	2333,3 \pm 78,4 *	12,0 \pm 2,0	33,3 \pm 3,5
0.1 μ M YUC	103,2 \pm 12,5	632,9 \pm 70,4 *	1951,0 \pm 72,8	10,4 \pm 2,5	27,9 \pm 7,1 *
1 μ M YUC	137,5 \pm 30,9	545,4 \pm 76,5	2210,7 \pm 317,7	13,8 \pm 3,8	53,5 \pm 5,4
10 μ M YUC	107,7 \pm 34,8	521,1 \pm 29,8	1519,0 \pm 275,3 *	11,2 \pm 1,4	50,9 \pm 11,9
0.01 μ M NPA	98,0 \pm 8,0	427,4 \pm 55,5	2667,1 \pm 177,7 **	13,5 \pm 0,8	56,2 \pm 10,2
0.1 μ M NPA	85,9 \pm 18,4	404,1 \pm 108,7	2302,4 \pm 217,5	11,3 \pm 1,2	40,2 \pm 1,2
1 μ M NPA	101,3 \pm 20,8	419,3 \pm 118,0	2436,4 \pm 152,5 *	18,3 \pm 4,7	41,9 \pm 3,1
10 μ M NPA	92,8 \pm 7,6	397,1 \pm 43,9	3127,8 \pm 246,6 **	44,1 \pm 3,3 ***	35,9 \pm 5,4