



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



**Srovnávací analýza exogenního působení cytokininů
s inhibicí degradace jejich endogenních hladin u**

Arabidopsis thaliana

Diplomová práce

Vedoucí práce:
Mgr. Jan Novák, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Vladěna Koukalová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

Srovnávací analýza exogenního působení cytokininů s inhibicí degradace jejich endogenních hladin u *Arabidopsis thaliana*

vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Janu Novákovi, Ph.D., za jeho vstřícné jednání, za připomínky a odborné rady během vypracování této práce. Děkuji také svému konzultantovi Mgr. Martinu Černému, Ph.D., za jeho pomoc při zpracování proteomické části. Mgr. Dušanovi Turkovi děkuji za poskytnutí výsledků bakteriální eseje a Mgr. Jaroslavovi Pavlů děkuji za pomoc při analýze antokyanů. V neposlední řadě děkuji prof. RNDr. Břetislavovi Brzobohatému, CSc. za poskytnutí finanční podpory během studia.

Své rodině a přátelům děkuji za jejich trpělivost a podporu při psaní této práce.

ABSTRAKT

Zemědělskou produkci negativně ovlivňuje především sucho a zvyšující se teplota, což se snaží řešit metody genového inženýrství. Řešení nabízí geneticky modifikované organismy, které jsou však legislativně limitovány. Proto se hledají i alternativní cesty v podobě růstových regulátorů se specifickými účinky, jako je INCYDE. Navzdory tomu, že je INCYDE znám jako inhibitor cytokininové degradace, bylo v této práci zjištěno, že ve vyšších koncentracích může také aktivovat receptor AHK4 a tak aktivovat cytokininovou signalizaci. Srovnávací analýza účinků INCYDE a *trans*-zeatinu ukázala, že se tyto látky liší místem účinku v rostlinných orgánech. Významným rozdílem byl rovněž vliv těchto látek na proteom 7denních klíčících rostlin *Arabidopsis thaliana* a to zejména v působení na dráhy glukoneogeneze, glykolýzy, proteazomu a metabolismu mastných kyselin. Aplikace INCYDE při současné simulaci podmínek sucha vedla ke snížení citlivosti kořene k tomuto stresoru. Tato charakteristika se ukazuje zajímavou pro potenciální využití v zemědělství.

Klíčová slova: cytokininy, INCYDE, morfologie, antokyany, sucho, proteom

ABSTRACT

Agricultural production is negatively affected by stress factors like drought or rising ambient temperature. Genetic engineering and production of specific GMO seems to be very promising in protection of the crop yield however these are strictly limited for the use in the field. For this reason alternative approaches like application of growth regulators are in the focus of recent research. INCYDE is a new potent growth regulator discovered as inhibitor of cytokinin degradation. In this Diploma thesis we show that high levels of INCYDE could also activate AHK4, cytokinin receptor, and act like cytokinins. Comparison of *trans*-zeatin and INCYDE showed that application of these regulators results in spatial-specific pattern in activation of the cytokinin signaling. *trans*-zeatin and INCYDE also induce different changes in proteom mainly in proteasome pathway, gluconeogenesis and fatty acids metabolism. Application of INCYDE simultaneously with inducing drought stress revealed that INCYDE could decrease sensitivity to this stressor. This feature seems to be very perspective for its utilization in the agriculture.

Keywords: cytokinins, INCYDE, morphology, anthocyanins, drought, proteom

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	CÍL PRÁCE	8
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
3.1	<i>Rostlinné hormony</i>	9
3.2	<i>Cytokininy</i>	10
3.2.1	Objev cytokininů.....	10
3.2.2	Chemická struktura cytokininů.....	11
3.2.3	Biosyntéza cytokininů.....	13
3.2.4	Metabolismus cytokininů.....	16
3.2.5	Degradace cytokininů.....	17
3.2.6	Signální dráha cytokininů.....	20
3.2.7	Významné vlastnosti cytokininů.....	22
3.3	<i>INCYDE</i>	24
4	MATERIÁL A METODIKA	26
4.1	<i>Rostlinný materiál a jeho kultivace</i>	26
4.2	<i>Stanovení antokyanů</i>	27
4.3	<i>Histochemické barvení (GUS)</i>	28
4.4	<i>Bakteriální esej</i>	28
4.5	<i>Homogenizace a extrakce proteinů</i>	29
4.6	<i>Digest a odsolení vzorků</i>	30
4.7	<i>Příprava vzorků pro analýzu LC-MS</i>	30
4.8	<i>LC-MS analýza</i>	30
4.8.1	Změření a zpracování MS/MS spekter.....	30
4.9	<i>Vyhodnocení dat</i>	31
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
5.1	<i>INCYDE je inhibitorem CKX ale také agonista cytokininů</i>	32
5.2	<i>tZ a INCYDE působí odlišně v různých částech klíčících rostlin</i>	34
5.3	<i>Porovnání vlivu tZ a INCYDE u mutant v signalizaci cytokininů</i>	37
5.4	<i>KMD2 je regulátorem cytokininy indukované akumulace antokyanů</i>	39
5.5	<i>INCYDE pomáhá rostlinám při ochraně před suchem</i>	40
5.6	<i>Rostlinný materiál pro proteomickou část</i>	44
5.7	<i>Rozdíly na úrovni proteomu</i>	45
5.8	<i>Lokalizace abundantních proteinů</i>	46
5.9	<i>Přiřazení funkcí k nalezeným proteinům</i>	48
5.10	<i>Vliv identifikovaných proteinů na fenotyp rostlin</i>	50
6	ZÁVĚR	53
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	54
8	SEZNAM ZKRATEK	66
9	SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK	68
10	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ	69

1 ÚVOD

Organismy se během svého života musí umět vypořádat s celou řadou nepříznivých vlivů, které ovlivňují jejich růst a vývoj. Jelikož jsou rostliny přisedlými organismy, nemohou v porovnání s živočichy měnit svá stanoviště. V důsledku toho se u nich vyvinula celá řada nejrůznějších mechanismů, které se snaží minimalizovat negativní dopady působení biotických i abiotických stresorů.

Rostliny patří mezi eukaryotní organismy a vynikají mnoha významnými rolemi. Kromě fotosyntézy, která je zdrojem kyslíku na Zemi, jsou rostliny také zdrojem obživy, cenných látek využívaných ve farmacii a bylinkářství, krmivem pro živočichy či plní estetickou funkci. Již před více než 10 000 lety se začalo rozvíjet zemědělství, které představovalo zdroj obživy pro člověka. Nicméně v současné době se zemědělci setkávají se stále většími extrémními životními prostředími, které negativně ovlivňují produkci plodin. Na jedné straně vzrůstá počet obyvatel planety a je nutné navýšit výnosy, na straně druhé se častěji setkávají s extrémními počasími, které mohou snižovat kvalitu i kvantitu očekávané úrody. Mezi největší hrozby současné doby patří především sucha nebo naopak zamokření půdy, nedostatek živin, zvyšující se teploty či působení nejrůznějších patogenů a škůdců. Aby se tyto dopady na produkci co nejvíce redukovaly, hledají se nejrůznější řešení především prostřednictvím šlechtění či novějších metod genetických modifikací. Celosvětovým cílem je snaha vylepšit kulturní plodiny, aby byly odolnější vůči stresorům a zároveň vykazovaly i vyšších a kvalitnějších výnosů.

Šlechtitelství představuje vytváření nových odrůd, které jsou lepší než odrůdy stávající. Tato metoda je ovšem zdoluhavá, drahá a nejistá svým výsledkem. Klasické metody šlechtění navíc již často nestačí, a proto se postupně začalo přecházet k metodám genetického inženýrství, které jsou rychlejší a méně finančně náročné. Pomocí biotechnologických metod je možné podle našich požadavků vytvořit rostlinu s genetickými modifikacemi. Využívá se především modulací hladin významných enzymů regulujících hladiny hormonů, významných metabolitů či reaktivních látek zapojených do odpovědi na stres. Pěstování geneticky modifikovaných plodin ovšem vyvolává řadu kritiky mezi odborníky i širokou veřejností. Proto se začaly hledat nejrůznější alternativní cesty, které by docílily stejných výsledků jako genetické

modifikace. Jednou z možností je ovlivnění biosyntézy či degradace látek zájmu v rostlinném těle, a to prostřednictvím určitého inhibitoru či aktivátoru. Tento inhibitor by pak ovlivňoval biosyntézu či degradaci enzymů zapojených v metabolických dějích a tím by zároveň ovlivnil hladinu látky zájmu. V polních podmínkách by se jednalo o postřik, který by se aplikoval na rostliny a následně by došlo ke snížení či zvýšení hladin příslušných rostlinných hormonů.

Velmi zajímavé vlastnosti vykazují rostlinné hormony cytokininy, které mají v rostlině řadu funkcí – regulují buněčné dělení, řídí dormanci semene, klíčení, senescenci, uvolnění pupenů z apikální dominance. Mají také roli v reakci na biotické a abiotické stresory, čímž se staly významným nástrojem pro řešení problémů v zemědělství. Sledování vlivu jednoho z modulátorů cytokininové hladiny se stalo námětem této práce.

2 CÍL PRÁCE

Tato práce je rozdělena na část teoretickou a část praktickou. Teoretická část se zaměřuje na rostlinné hormony cytokinininy, jejich biosyntézu, degradaci a signalizaci. Praktická část navazuje na mou bakalářskou práci *Vliv modulace hladin cytokininů na fenom a proteom rostlin*, která se zabývala výzkumem vlivu látky INCYDE, jakožto inhibitoru degradace cytokininů. Praktická část je rozdělena na část fyziologickou a část proteomickou. Cílem fyziologické části bylo porovnat účinky exogenní aplikace cytokininu *trans*-zeatinu a INCYDE na morfologické parametry rostlin modelového organismu *Arabidopsis thaliana*. Experimenty byly provedeny jak u rostlin divokého typu, tak i u transgenních linií s modulovanou cytokininovou signalizací. Dále bylo analyzováno, zda INCYDE pomáhá rostlinám vyrovnat se se suchem pomocí simulace sucha přidáním D-manitolu. Proteomická část byla zaměřena na potenciální rozdíly v obsahu proteinů po aplikaci obou růstových regulátorů.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rostlinné hormony

Termín hormon pochází z řeckého slova *hormonau* a znamená „stimuluji“. Byl použit k popisu chemických posílů, kteří stimulují řadu procesů ve vývoji zvířat (Hay et al., 2004). Postupem času bylo zjištěno, že hormony u rostlin a živočichů se významně liší. Za průkopníky poznatků v oblasti rostlinných hormonů jsou považováni především Julius von Sachs a Charles Darwin, kteří již v 19. století prokázali, že různé procesy růstu rostlin jsou regulovány „látkami“, které se pohybují z jedné části rostliny k dalším. O více než sto let později se zjistilo, že tyto látky jsou malé molekuly odvozené z různých metabolických drah. Obecně je nazýváme růstovými regulátory. Mezi přirozené regulátory růstu pak řadíme rostlinné hormony (fytohormony) a další látky s regulační aktivitou (Procházka et al., 1998).

Fytohormony jsou nízkomolekulární látky, které svým působením ovlivňují regulaci růstu a vývoje rostlin. Zprostředkovávají komunikaci mezi jednotlivými buňkami, pletivy a orgány během života rostlin, a rovněž odpovědí na vnější a vnitřní signály (Procházka et al., 1998). Obecně jsou přítomny ve velmi nízkých koncentracích a působí lokálně nebo v blízkosti místa syntézy či jsou transportovány do vzdálenějších pletiv, kde vyvolávají fyziologickou odpověď (Santner et al., 2009). Rostlinné hormony zřídka působí samostatně a pro většinu případů je nutná interakce více hormonů, přičemž mohou působit synergicky či antagonisticky. Vyznačují se pleiotropním účinkem, což znamená, že ovlivňují více aspektů růstu a vývoje rostlin (Gaspar et al., 1996; Hay et al., 2004). Látky s regulační aktivitou se vyskytují v rostlinách ve vyšší koncentraci a mají menší účinky než fytohormony (Podlešáková et al., 2012). Mezi fytohormony v současné době řadíme auxiny, cytokininy, etylén, gibereliny, kyselinu abscisovou, kyselinu salicylovou, brassinosteroidy, strigolaktony, NO, polyaminy, kyselinu jasmonovou a peptidové hormony.

Syntetické regulátory růstu fungují jako přirozené rostlinné hormony. Takových regulátorů s biologickou aktivitou byla objevena celá řada. Jejich aktivita je stejná nebo vyšší než aktivita endogenních hormonů. Kromě nich existuje i celá řada chemických látek, které interferují (obecně inhibují) se syntézou, transportem nebo aktivitou

endogenních hormonů. Takové inhibitory našly především uplatnění při studiu úloh rostlinných hormonů v kulturách *in vitro* (Gaspar et al., 1996).

3.2 Cytokininy

3.2.1 Objev cytokininů

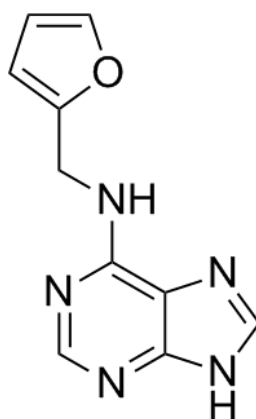
Již na počátku objevu cytokininů bylo zřejmé, že musí existovat faktory, které stimulují buněčné dělení. Již v roce 1913 byla zveřejněna první publikace, která představila hypotézu, že v rostlinách probíhá přenos chemického signálu floémem za účelem vyvolání stimulace buněčného dělení (Galuzska et al., 2008). Rakouský botanik a fyziolog Gottlieb Haberlandt experimentálně dokázal, že buněčné dělení je vyvoláno působením určitých faktorů. U poraněné hlízy brambor pozoroval stimulaci buněčného dělení po aplikaci látek vyloučených floémem různých druhů rostlin (Haberlandt, 1913).

V letech 1940 až 1950 Folke Skoog a jeho spolupracovníci testovali u kultury tabáku (*Nicotiana tabacum*) velké množství látek, které by mohly zahájit buněčné dělení či udržet buňky v tomto stavu. Testovaly se nejrůznější materiály od kvasnicových extraktů až po šťávu z rajčete (Kieber a Schaller, 2014). K největší stimulaci kultury ovšem došlo po přidání kapalného endospermu kokosu, známého jako kokosové mléko. Philip White v tomto případě doplnil své médium o auxin a přidal 10-20 % kokosového mléka. Tento krok vedl ke zjištění, že kokosové mléko obsahuje látku či látky, které stimulují buňky ke vstupu do buněčného cyklu, a tím podporují i jejich dělení (White, 1934).

Přes všechny snahy se ovšem první taková sloučenina podařila získat až v roce 1955 Millerem a Skoogem, kteří tuto látku izolovali z autoklávovaného DNA spermatu sledě a byla pojmenována kinetin. Tento název byl odvozen zejména z jeho schopnosti podporovat buněčné dělení neboli cytokinezi. Z hlediska chemického je kinetin derivátem adeninu. Jedná se o 6-furfurylaminopurin (Miller et al., 1955). Zanedlouho poté byly syntetizovány i jeho analogy a skupina původně pojmenovaná kininy byla přejmenována na cytokininy (Galuzska et al., 2008). Přestože kinetin nebyl přirozeně se vyskytujícím cytokininem, tento objev pomohl při hledání cytokininů v rostlinách se přirozeně vyskytujících. První takovýto cytokinin byl objeven v roce 1963 Lethamem. Ten jej získal izolací z nezralého endospermu obilky kukuřice (*Zea mays*), díky čemuž

také získal název zeatin (Letham, 1963). Jedná se o *trans*-6-(4-hydroxy-3-metylbut-2-enylamino)purin. Následné studie prokázaly, že právě zeatin byl dominujícím cytokininem v již zmíněném kokosovém mléce (Kieber a Schaller, 2014).

V dalších letech bylo objeveno mnoho látek s cytokininovou aktivitou. Bylo prokázáno, že cytokininy jsou přítomny ve všech vyšších rostlinách, byly také nalezeny v houbách, řasách a bakteriích (Galuzska et al., 2008).



Obr. 1: Chemická struktura 6-furfuryladeninu (kinetin).

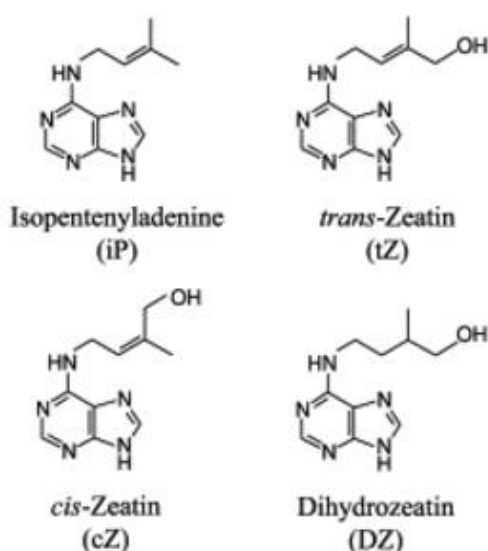
3.2.2 Chemická struktura cytokininů

Původní definice cytokininů byla založená na vlastnosti stimulovat buňky k dělení a regulovat funkce růstu stejným způsobem jako kinetin. Současná definice představuje cytokininy jako molekuly, které jsou si ve své struktuře podobné. Na rozdíl od původní definice není v současné zohledněna jejich aktivita (Frébort et al., 2011).

Cytokininy jsou deriváty adeninu s připojeným postranním řetězcem v poloze N⁶. Na základě charakteru postranního řetězce je dělíme na isoprenoidní a aromatické (Mok a Mok, 2001). Isoprenoidní cytokininy mají nasycený nebo nenasycený alifatický postranní řetězec isoprenoidního původu, zatímco aromatické cytokininy nesou aromatický postranní řetězec, který může být dále substituovaný v různých polohách aromatického kruhu (Spíchal, 2012).

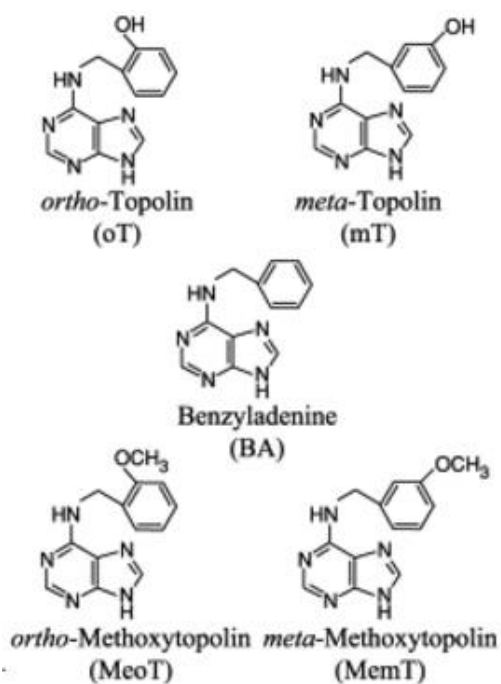
U rostlin patří mezi isoprenoidní cytokininy *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), isopentenyladenin (*iP*) a dihydrozeatin (*DZ*). Tyto cytokininy se liší nejen nasyceností postranního řetězce, ale také hydroxylací na konci postranního řetězce (Sakakibara, 2006). Cytokininy s nenasyceným postranním řetězcem jsou nejrozšířenější, zejména je to zeatin (Mok a Mok, 2001).

Pro zeatin je charakteristická přítomnost dvojné vazby v postranním řetězci, díky čemuž může být přítomen ve dvou konfiguracích – *cis* a *trans*. Za rozšířenější a aktivnější je považován *tZ*, protože *cZ* bývá většinou přítomen v malém množství nebo s minimální aktivitou. Ačkoliv se *trans* forma považuje za dominantnější, existují studie, které prokazují významnější roli *cZ* u některých druhů rostlin. Tato forma je hojnější například u brambor (*Solanum tuberosum*), cizrny (*Cicer arietinum*), hrachu (*Pisum sativum*), kukuřice (*Zea mays*) a rýže (*Oryza sativa*); (Frébort et al., 2011). *cZ* se vyskytuje především ve spojení s vývojovými fázemi omezeného růstu, jako jsou semena či stárnoucí listy, zatímco *tZ* především v aktivních fázích růstu, což bylo prokázáno u *Arabidopsis thaliana* (Gajdošová et al., 2011). *DZ* má oproti zeatinu nasycený postranní řetězec (Mok a Mok, 2001). Vyskytuje se převážně v dormantním osivu, apikálních pupenech a v tekutém endospermu fazolí (*Phaseolus vulgaris*); (Frébort et al., 2011).



Obr.2: Chemická struktura isoprenoidních cytokininů (Sakakibara, 2005).

Mezi aromatické cytokininy pak řadíme *ortho*-topolin (oT), *para*-topolin (pT), *meta*-topolin (mT) a jejich methoxy deriváty (meoT a memT) a benzyladenin (BA); (Ge et al., 2005; Sakakibara, 2006). BA byl izolován z topolu, kornoutkovky, anýzu, rajčete a je považován za nejaktivnější a nejrozšířenější aromatický cytokinin. Topoliny a methoxy deriváty byly také identifikovány u různých druhů rostlin. *Meta*-topolin je v porovnání s *para* a *ortho*-deriváty účinnější (Mok a Mok, 2001; Spíchal, 2012).



Obr. 3: Chemická struktura aromatických cytokininů (Sakakibara, 2005).

Mezi látky s cytokininovou aktivitou řadíme především fenylmočovinné typy. Jako první byla identifikována difenylmočovina (DPU). Její objev byl sice náhodný, nicméně dopomohl k syntéze celé řady analogů, jako jsou 1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-fenylmočovina a thidiazuron. Od zeatinu se liší vyšší aktivitou a stabilitou (Mok a Mok, 2001). Thidiazuron se mimo jiné komerčně používá jako defoliant a herbicid (Taiz a Zeiger, 2010).

Cytokiny mohou být v rostlině přítomny jako volné báze, ribosidy, ribotidy a jejich deriváty nebo také jako konjugáty s glukosou, xylosou či aminokyselinovými zbytky. Za aktivní formu se pak považují volné báze (Spíchal, 2012).

3.2.3 Biosyntéza cytokininů

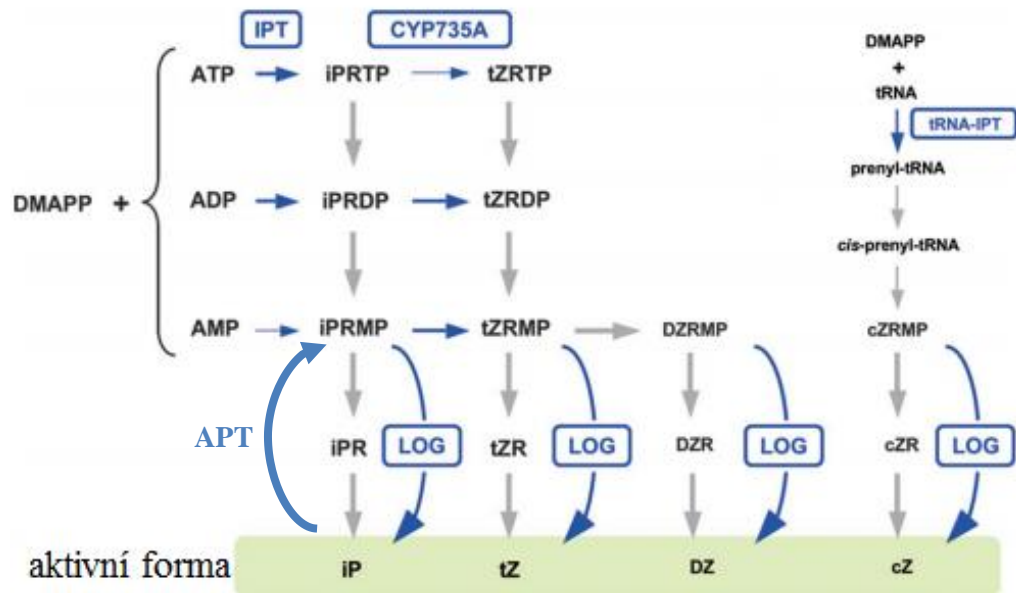
Ačkoliv v posledních letech došlo k velkým pokrokům v molekulární biologii, stále se nedaří objasnit biosyntetické kroky u aromatických cytokininů. Tato část bude tedy věnována biosyntéze cytokininů isoprenoidních.

Biosyntéza isoprenoidních cytokininů u rostlin začíná převodem isoprenoidní skupiny na ADP, ATP nebo nukleotidech vázaných na RNA. Isoprenoidní řetězec pochází z dimethylallyl pyrofosfátu (DMAPP) nebo 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-difosfátu (HMBDP); (Krall et al., 2002; Sakakibara et al., 2005).

Důležitým enzymem v biosyntéze cytokininů je isopentenyltransferáza (IPT). IPT se vyskytuje ve dvou strukturně příbuzných typech. V prvním případě se jedná o adenylát IPT, v případě druhém pak o tRNA-isopentenyltransferázu (tRNA – IPT), která upravuje tRNA přidáním DMAPP ke zbytku adeninu sousedícího s antikodonem (Spíchal, 2012). Enzymová IPT aktivita byla poprvé popsána u hlenky (*Dictyostelium discoideum*); (Taya et al., 1978), zatímco první identifikace genu kódujícího biosyntézu cytokininů byla provedena u patogenní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi et al., 1984). Jedná se o gen *tmr* (tumour morphology root) vyvolávající nádorovitá onemocnění u rostlin (krčkovitý nádor); (Blackwell a Horgan, 1991). IPT byly identifikovány u rostlin hlavně u *Arabidopsis thaliana*, petúnie (*Petunia*) a chmele (*Humulus lupulus*); (Sakakibara, 2006).

Počáteční krok biosyntézy představuje katalýza adenosinfosfátu pomocí IPT, který katalyzuje N-prenylaci adenosin 5' fosfátu (AMP, ADP a ATP) na N⁶ konci s DMAPP nebo HMBDP (Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2005). Rostlinná IPT používá jako prenylové akceptory převážně ADP či ATP. Pokud je použit jako substrát DMAPP, pak jsou primárním produktem iP ribotity (Sakakibara, 2006). U *tZ* jsou známy dvě dráhy vzniku z isoprenoidního řetězce. V jedné dráze IPT využívá DMAPP vzniklé z metylerytritolfosfátové (MEP) dráhy, která se vyskytuje v plastidech. Výsledkem tohoto kroku jsou iP ribotidy, které jsou pak hydroxylovány za vzniku *tZ*. Druhá dráha využívá prekurzoru DMAPP z mevalonátové (MVA) dráhy (Kieber a Schaller, 2014). MVA dráha je lokalizována v cytosolu, mitochondriích a probíhá rovněž u zvířat, hub a některých bakterií (Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2005). Většina *tZ* je u *Arabidopsis thaliana* získávána z MEP dráhy. Výchozími látkami *tZ* jsou isopentenyladenosin-5'-trifosáty (iPRTP) nebo isopentenyladenosin-5'-difosáty (iPRDP); (Frébort et al., 2011). Tyto produkty mohou být následně převedeny na *tZ* prostřednictvím cytochromu P450 monooxygenázou CYP735A1 a CYP735A (Takei et al., 2004). Dále dochází k hydroxylaci isoprenoidního postranního řetězce za vzniku volných bází (Kieber a Schaller, 2014). Oproti tomu *cZ* vzniká odlišnou dráhou. První krok, který vede ke vzniku *cZ*, je katalýza tRNA-IPT. Jelikož prenylová skupina tRNA obsahuje *cis*-hydroxylovou skupinu, dochází po degradaci tRNA k uvolnění *cZ* (Sakakibara, 2006). Posledním krokem v biosyntéze cytokininů je jejich hydrolytická aktivace. V tomto kroku se uplatňuje specifická fosfohydroláza pojmenovaná LONELY GUY (LOG). Poprvé byla objevena u rýže (Kurakawa et al., 2007), později

byla nalezena i u *Arabidopsis thaliana* (Kuroha et al., 2009). LOG enzym v jednom kroku štěpí nukleosid 5' monofosfát z nukleotidů, přičemž vznikne volná báze (Zalabák et al., 2013). V *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno sedm genů, které kódují aktivní LOG enzymy (Kieber a Schaller, 2014).



Obr. 4: Model biosyntézy cytokininů; modifikováno (Hirose et al., 2008).

U rostlin byly *IPT* geny prvně identifikovány u *Arabidopsis thaliana*. Bylo popsáno sedm genů *IPT*, jejichž produkty využívají jako substrát nukleotidy (*AtIPT1* a *AtIPT3-AtIPT8*) a dva *tRNA – IPT* geny (*AtIPT2* a *AtIPT9*); (Spíchal, 2012). *IPT* 1, 5 a 8 se nachází v plastidech, zbývající 4 *IPT* jsou lokalizovány v mitochondriích (Miyakawaki et al., 2004). Na úrovni rostlinných orgánů a pletiv byl *IPT1* nalezen v buňkách xylému kořene, v axilárních pupenech listů a v nezralých semenech. *IPT3* bylo nalezeno u floémových pletiv a *IPT4* spolu s *IPT8* se vyskytují v nezralých semenech s vyšší expresí v chalazálním endospermu. *IPT5* se vyskytuje převážně v postranních kořenových primordiích, v kolumele kořenové čepičky, v horních částech květenství a opadavých částech plodů. *IPT6* bylo objeveno v šesuli a *IPT7* je exprimováno v buňkách floému, v trichomech mladých listů a někdy i v pylových láčkách (Murai, 2014). *IPT* geny byly také popsány i u jiných rostlin jako chmel (*HIPT*), kukuřice (*TMIPT2*) a rýže (*OsIPT1-OsIPT8*); (Spíchal, 2012).

3.2.4 Metabolismus cytokininů

Jak již bylo zmíněno, cytokininy se vyskytují v rostlinách ve formě aktivních bází, nukleosidů či nukleotidů. Dále je možné je rozdělit na formy upřednostňované při transportu či ukládání a na formy aktivní nebo inaktivní (Davies, 2004).

Jelikož hrají cytokininy v rostlinách hlavní roli v hormonální regulaci růstu a vývoje, je jejich hladina přísně regulována. U rostlin se vyvinul účinný systém, pomocí něhož je udržována endogenní hladina biologicky aktivních forem cytokininů. Rovnováha je uchovávána mezi jejich biosyntézou, přeměnami aktivních a rezervních forem a také nevratnými inaktivacemi (Avalbaev et al., 2012). Snížení hladin cytokininů může být dosaženo konjugací s cukrem či degradací prostřednictvím štěpení enzymu cytokininové oxidázy (Kieber a Schaller, 2014). Konjugace může zahrnovat O-xylosylaci, O-glukosylaci a N-glykosylaci (Hou et al., 2004).

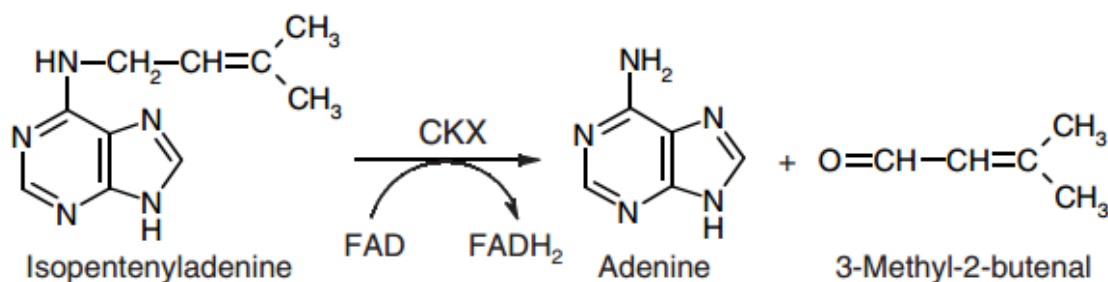
N-glykosylace je ireverzibilní proces a probíhá především na atomu dusíku v poloze N⁷ nebo N⁹ purinového kruhu cytokininů (Kieber a Schaller, 2014). Enzym, který se tohoto procesu účastní se nazývá N-glukosyltransferáza, která ve výsledku produkuje N⁷ a N⁹ glukosidy. Poprvé byla izolována z dělohy ředkvičky (*Raphanus sativus*); (Entch and Letham, 1979; Entch et al., 1979). Tento enzym používá jako substrát deriváty adeninu. U *Arabidopsis thaliana* byly nalezeny dva geny kódující cytokininovou N-glukosyltransferázu (Frébort et al., 2011). Oba enzymy převádějí glukosylový zbytek z uridin 5'-difosfoglukózy na atomu dusíku v poloze 7 a 9 isoprenoidních a aromatických cytokininů (Hou et al., 2004). V biologických testech vykazují N-glykosidy obecně nízkou aktivitu a jsou jen slabě metabolizovány (Frébort et al., 2011). Ačkoliv byly zjištěny i N³ glukosidy v různých rostlinách, jejich enzymatická biosyntéza nebyla zatím identifikována a jejich původ je stále nejasný (Galuzska et al., 2008).

Cytokininy obsahující ve svém postranním řetězci hydroxylovou skupinu se mohou podrobit O-glykosylaci. Takovými cytokininy jsou zeatin či DZ, u nichž se v postranním řetězci nachází kyslík (Frébort et al., 2011). Enzymy, které se tohoto procesu účastní se nazývají O-glykosyltransferázy. Působením tohoto enzymu dochází k tvorbě O-glukosidů a O-xylosidů. Tento děj je na rozdíl od N-glykosylace reverzibilní (Schaller et al., 2015), takže tyto formy mohou být převedeny na formy aktivní prostřednictvím β-glukosidázy (Brzobohatý et al., 1993). O-glykosylové sloučeniny se

považují za zásobní formy, protože nejsou štěpeny enzymem cytokinin oxidáza/dehydrogenáza (CKX); (Kieber a Schaller, 2014).

3.2.5 Degradace cytokininů

Rostlinná pletiva obsahují enzymy CKX, jejichž úkolem je štěpit podskupiny cytokininů na N⁶ postranním řetězci (Kieber a Schaller, 2014). Výslednými produkty jsou alifatické řetězce odvozené od aldehydu a uvolněný adenin (či odpovídající derivát pro N⁹ substituované cytokininy); (Avalbaev et al., 2012). Sekvenční a biochemická analýza ukázala, že CKX je flavoenzym patřící do třídy oxidoreduktáz. Nevratná degradace spočívá v oxidaci sekundární aminové skupiny na postranním řetězci adeninového kruhu. Vzniklý iminový meziprodukt je dehydrolyzován za vzniku adeninu a molekuly aldehydu. CKX byla zpočátku klasifikována jako oxidáza, ale několik studií prokázalo, že daleko účinnějšími akceptory jsou redukované kofaktory a tento enzym byl nadále uváděn jako cytokinin oxidáza/dehydrogenáza (Malito et al., 2004; Frébortová et al., 2010).



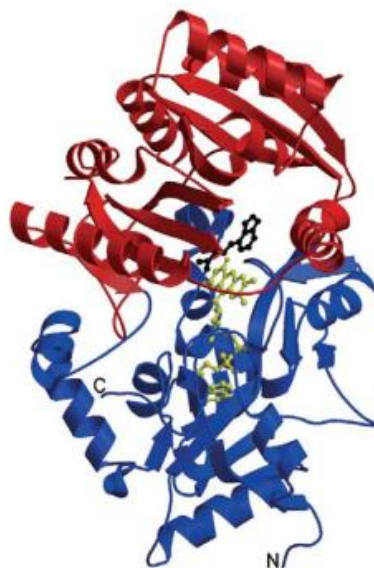
Obr. 5: Reakce katalyzovaná enzymem CKX. CKX jsou zodpovědné za katabolismus a inaktivaci cytokininů v jediném enzymatickém kroku. Na tomto obrázku je zobrazeno štěpení aktivního cytokininu iP na adenin a nenasycený aldehyd 3-metyl-2-butenal (převzato z Avalbaev et al., 2012).

CKX byla poprvé objevena Pačesem, který měřil degradaci značeného N⁶-(D2-isopentenyl)adenosinu v kultuře tabáku (Pačes et al., 1971). Později Whitty a Hall popsali podobnou aktivitu v kukuřici a nazvali ji cytokinin oxidáza (Whitty a Hall, 1974). V následujících letech se tato enzymatická aktivita prokázala i u dalších rostlinných pletiv z kukuřice, pšenice (*Triticum aestivum*), fazolí (*Phaseolus vulgaris*) a sóji (*Glycine max*). Nalezena byla také u nižších organismů, jako je mech (*Funaria*

hygrometrica), hlenka a kvasinka (*Saccharomyces cerevisiae*); (Schmülling et al., 2003).

Aby CKX fungovala, je nutná přítomnost dvojně vazby v postranním řetězci příslušného cytokininu. Z tohoto hlediska jsou tedy štěpeny pouze cytokininy typu *tZ* a *iP*. *DZ* a *BA* jsou tomuto štěpení odolné, jelikož obsahují nasycené vazby ve svém řetězci (Avalbaev et al., 2012). Štěpení zabraňují také i substituce jiných funkčních skupin na purinovém kruhu jako jsou např. O-glykosylované konjugáty s glykosylovými nebo xylosylovými zbytky v postranním řetězci. Štěpení CKX nevratně cytokininy inaktivuje (Werner et al., 2003; Avalbaev et al., 2012). Změny v aktivitě CKX významně ovlivňují koncentrace cytokininů v pletivech, což se může projevit různými fenotypovými projevy. Pro studium CKX v rostlinách se staly cennými nástroji inhibitory tohoto enzymu. Možné kandidáty na inhibitory CKX lze najít mezi strukturními analogy cytokininů (Schmülling et al., 2003). Mezi další známé inhibitory patří také některé syntetické cytokininy, včetně derivátů močoviny (Ashikari et al., 2005).

Bylo prokázáno, že CKX je kódována u různých druhů rostlin odlišným počtem homologních genů. U *Arabidopsis thaliana* je přítomno sedm homologních genů (*AtCKX1-AtCKX7*), které CKX kódují. U rýže je to 11 homologních genů (*OsCKX1-OsCKX11*) a u kukuřice bylo zjištěno 13 těchto genů. U některých CKX byla popsána krystalická struktura, a to zejména u *ZmCKX1* a *AtCKX7*. Sekvence předpokládaných nebo již charakterizovaných genů CKX byly také nalezeny v ječmeni (*Hordeum vulgare*), orchidei (*Dendrobium sonia*), v bavlnovníku, hrachu, tuřínu (*Brassica napobrassica*) a pšenici (Avalbaev et al., 2012).



Obr. 6: Struktura CKX monomeru u kukuřice (Malito et al., 2004).

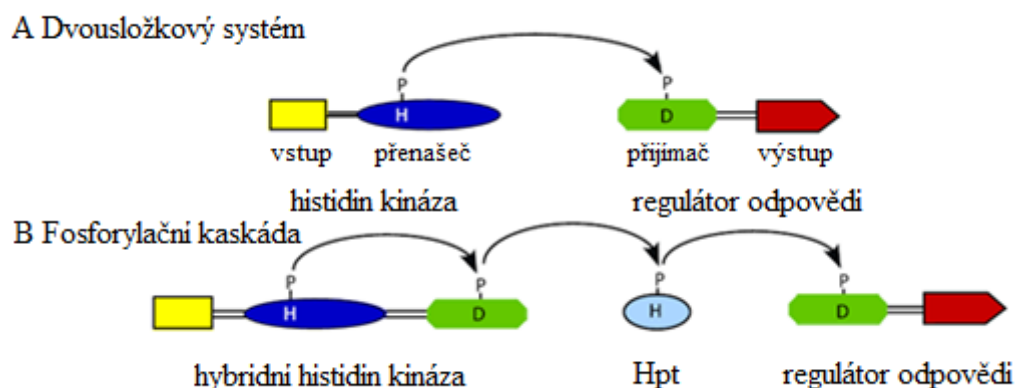
Jak bylo řečeno, u *Arabidopsis thaliana* se vyskytuje sedm homologních genů kódujících CKX. Dva geny jsou umístěny na chromozomu 2 (*AtCKX1* a *AtCKX2*), dva na chromozomu 5 (*AtCKX3* a *AtCKX7*), na chromozomu 4 se nachází *AtCKX4*, na chromozomu 1 *AtCKX5* a na chromozomu 3 *AtCKX6* (Frébort et al., 2011). Jednotlivé *AtCKX* byly lokalizované v cytoplazmě, vakuolách nebo apoplastu a mohou se lišit svými biochemickými vlastnostmi (Werner et al., 2006). *AtCKX1* je exprimován ve stéle postranních kořenů, zatímco *AtCKX2* je především v apikálních částech prýtu. *AtCKX3* byl nalezen v mladých pletivech prýtlů, přičemž *AtCKX4* byl charakterizován výraznou expresí v trichomech, průduchách, palistech a také v kořenové čepičce, která se vyznačuje vysokou mitotickou aktivitou. Genová exprese *AtCKX5* byla patrná ve vyvíjejících se prýtech a kořenech a ve vyvíjejících se tyčinkách a pylu, zatímco *AtCKX6* byl zaznamenán v různých fázích vývoje gynecia (Avalbaev et al., 2012).

Za funkční aktivitu enzymu mohou být také zodpovědné subcelulární lokalizace CKX. Intracelulární CKX mohou být zapojeny do kontroly importu a exportu cytokininů v konkrétním pletivu nebo orgánu. Extracelulární CKX by mohly přispívat k degradaci cytokininů, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu (Avalbaev et al., 2012).

3.2.6 Signální dráha cytokininů

V rostlinách cytokininy působí jako signální molekuly již v nanomolárních koncentracích. Jejich interakce se specifickým receptorem představuje rozhodující krok vedoucí k přeměně signálu na specifickou odezvu (Spíchal, 2012).

Model cytokininové signální transdukce ukázal, že je velmi podobný bakteriálnímu dvousložkovému systému, pomocí kterého bakterie vnímají a reagují na podněty z prostředí (To a Kieber, 2008). U bakterií systém představuje dvě hlavní složky: histidin kinázu (HK) a regulátor odpovědi (RR). HK je lokalizována v membráně a přijímá podněty z životního prostředí. Přijatý signál se dále šíří, aby došlo k regulaci transkripce cílových genů. Jakmile dojde k záznamu signálu vstupní doménou HK, dojde k autofosforylaci histidinového (His) zbytku. Signál v podobě fosfátu je dále přenášen do aspartátového zbytku (Asp) přijímačové domény odpovídajícího RR, který aktivuje následující reakce (To a Kieber, 2008; Kieber a Schaller, 2014). U eukaryot se setkáváme se složitějším systémem, který zahrnuje přenos fosfátu z HK na RR prostřednictvím čtyř fosforylačních kroků. V tomto víceúrovňovém fosforylačním systému se vyskytuje další člen, a sice His fosfo-transferový protein (HPT). Cytokinin se naváže k příslušným doménám CHASE cytokininových receptorů AHK2/AHK3/AHK4, které jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu (ER); (Caesar et al., 2011). Po navázání dojde k aktivaci domény vysílače a k autofosforylaci na His. V doméně přijímače je pak fosfát přenesen zbytkem Asp. Následně je fosfát přenesen do proteinu HPT. HPT přenáší v jádře fosfát na RR typu B, který pak vyvolá expresi různých genů, včetně RR typu A (Kieber a Schaller, 2014).



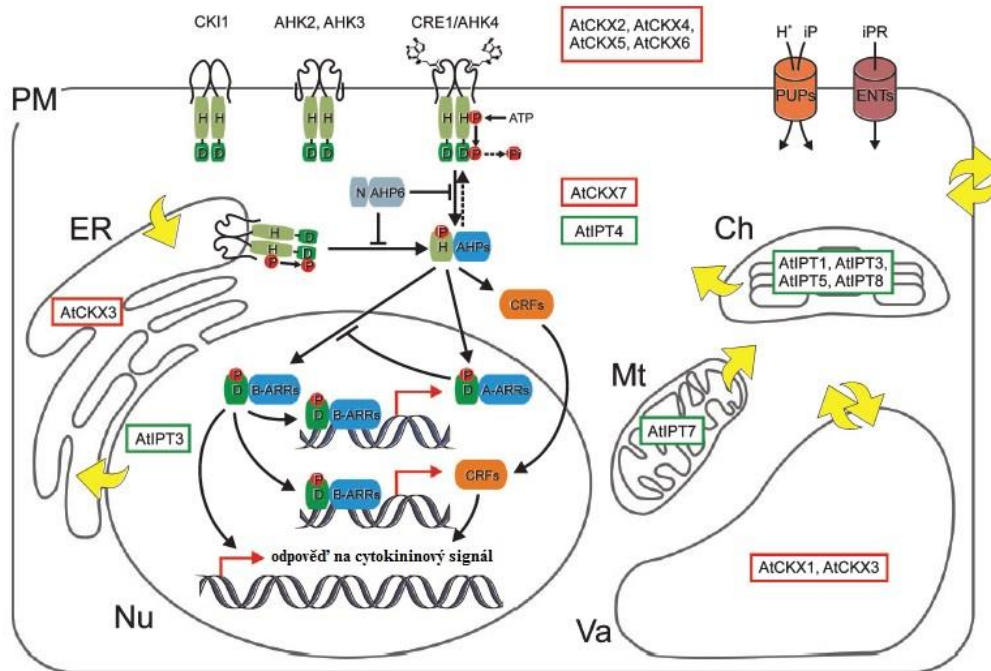
Obr.7: Znárodnění dvousložkového fosfotransferového systému. (A) Základní prokaryotický dvousložkový systém s histidin kinázou a regulátory odpovědi. H a D

představují konzervativní místa histidinových a aspartátových zbytků zapojených do systému fosforylací. (B) Viceskupinový fosforylační systém zahrnující hybridní histidinové kinázy (se vstupní, přenašečovou a přijímací doménou), histidin fosfo-transferový protein a regulátory odpovědi (Kieber a Schaller, 2014).

Prvním vodítkem pro charakterizaci cytokininových receptorů se stal objev genu *CKII*. Buněčná linie, která nadměrně exprimovala *CKII* byla schopná vykazovat růst buněk v kultuře i bez exogenního přídatku cytokininů (Kakimoto, 1996). Na základě toho bylo zjištěno, že *CKII* kóduje protein sekvencí podobný bakteriální dvousložkové histidin kináze. V roce 2001 byla izolována příbuzná histidin protein kináza k *CKII* schopná vyvolat řadu fosforylačních reakcí v odpovědi na cytokininy a byla pojmenována CRE1. Přesvědčivý důkaz, že CRE1 kóduje cytokininové receptory, přinesla analýza exprese proteinů v kvasinkách. (Inoue et. al., 2001). Mimo CRE1/AHK4/WOL byly v genomu *Arabidopsis thaliana* identifikovány ještě další dvě His kinázy inicializující cytokininovou signalizaci. Cytokininový HK receptor se skládá z domény CHASE (cykláza/His kináza-asociující extracelulární podněty) a cytoplazmatické His přenašečové a přijímací domény. V rámci cytokininové signalizace byla dále v *Arabidopsis thaliana* identifikována genová rodina, která kóduje HPt a byla nazvána AHP (Hwang a Sheen, 2001). Pět AHP (AHP1-AHP5) se podílí na přenosu signálu z receptoru AHK na regulátory odpovědi ARR (Heyl a Schmölling, 2003). Mimo těchto pět AHP byl nalezen také pseudo HPt značený jako AHP6 (také nazývaný jako APHP1), který nese substituci v konzervovaném His a nepodílí se na přenosu fosfátové skupiny na ARR (To a Kieber, 2008). Navzdory tomu, že bylo prokázáno, že receptory z *Arabidopsis thaliana* vážou mimo isoprenoidní cytokininy také aromatické cytokininy a thidiazuron, nejcitlivější jsou tyto receptory k isoprenoidním cytokininům (Romanov et al., 2006; Lomin et al., 2011).

U *Arabidopsis thaliana* byla dále identifikována rodina genů ARR, která spadá do čtyř skupin podle sekvenční podobnosti jejich domén a podle struktury C-terminální domény. Rozlišuje se deset ARR typu A (ARR3-ARR9, ARR15-ARR17), 11 ARR typu B (ARR1, ARR2, ARR10-ARR14, ARR18-ARR21), dvě ARR typu C (ARR22 a ARR24) a devět *Arabidopsis thaliana* pseudo regulátorů odpovědi (APRR). Za negativní regulátory cytokininové signalizace se považují ARR typu A, které se vyznačují krátkou C-terminální doménou. Naopak ARR typu B jsou označeny jako pozitivní regulátory odpovědi a jejich C-terminální konce obsahují DNA vázající

doménu a rovněž doménu transaktivační, která reguluje transkripci cílových genů aktivovaných cytokininů (To a Kieber, 2008).



Obr.8: Model cytokininové signalizace a buněčné distribuce biosyntetických a degradujících cytokininů (Spichal, 2012).

Kromě kanonických prvků signalizace cytokininů jsou dnes známy také další komponenty, které přispívají k regulaci této signalizace. Mezi takové elementy patří i proteiny KISS ME DEADLY (KMD). KMD je rodina F-box proteinů, která se zaměřuje na proteiny ARR typu B a směřuje je k degradaci. U *Arabidopsis thaliana* nejsilněji interagují s ARR1 a ARR12. KMD tedy negativně regulují signalizaci cytokininů (Kim et al., 2013). Naopak do nekanonických prvků patří CRF proteiny, které tvoří postranní větev cytokininové signalizace (Rashotte et al., 2006).

3.2.7 Významné vlastnosti cytokininů

Jak bylo řečeno v úvodní části, cytokininy v rostlině plní nejrůznější funkce, které jsou významné nejen pro růst a vývoj rostlin, ale také pomáhají rostlinám při působení různých druhů stresorů. Z praktického hlediska mohou tedy cytokininy najít uplatnění i v zemědělství (Zalabák et al., 2013).

Cytokininy představují důležitý faktor komunikace mezi rostlinou a jejím prostředím. Byla dokázána souvislost mezi hladinou cytokininů a množstvím

dušíkatých látek v okolí kořene. Změny NO^{3-} jsou zaznamenány kořenem, čímž dojde k tvorbě *tZ* nukleotidů (Takei et al., 2004). Dále se cytokininy účastní odezvy na abiotický stres (Tran et al., 2007; Jeon et al., 2010). K modulaci jejich hladin může dojít i v přítomnosti parazitů (De Meutter et al., 2003) či při infekci virem (Pogány et al., 2004). V transgenní linii tabáku se zvýšenou expresí genu *ipt* bylo prokázáno potlačení stárnutí listů. Listy se vyznačovaly prodlouženou vitalitou a delší fotosyntetickou aktivitou (Gan a Amasino, 1995). Vliv cytokininů na oddalování senescence byl prokázán i u hlávek salátu transgenních rostlin PSAG12-IPT (*Lactuca sativa L. cv Evola*). U transgenních rostlin zůstala zachována hladina chlorofylu i u spodních listů, čímž došlo ke zpomalení stárnutí v porovnání s kontrolními rostlinami (McCabe et al., 2001). U rýže bylo dosaženo vyšších výnosů pomocí modulace endogenních hladin cytokininů prostřednictvím snížené aktivity *OsCKX2*, kdy následně docházelo k akumulaci cytokininů v květním meristému a zvýšil se tak počet reprodukčních orgánů (Ashikari et al., 2005).

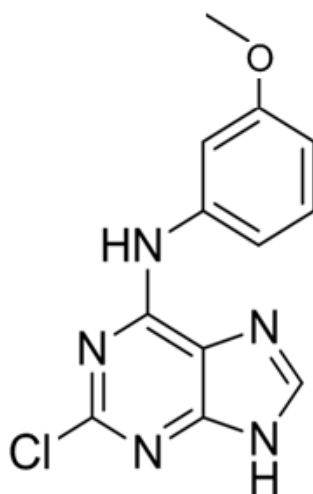
Velmi zajímavé bylo objevení skutečnosti, že cytokininy přispívají k ochraně rostlin před suchem. Byly připraveny transgenní rostliny spojením bakteriálního genu *ipt* s promotorem SARK, který se podílí na regulaci senescence v listech. Takové rostliny udržely vysoký obsah vody a byla u nich v průběhu působení sucha zachována fotosyntetická aktivita. Zatímco kontrolní rostliny období sucha nepřežily, u transgenních rostlin došlo po obnovení zálivky k pokračování v růstu (Rivero et al., 2007). Kromě zvýšení odolnosti rostlin proti suchu bylo prokázáno, že cytokininy jsou zapojeny také v reakci rostlin na teplotu (Černý et al., 2014).

Zajímavé výsledky vykazují i alternativní cesty modulace cytokininové hladiny či signalizace v podobě farmakologických přístupů, které pomocí vhodných inhibitorů mohou ovlivnit biochemické procesy v rostlině. Bylo identifikováno několik inhibitorů cytokininové signalizace jako je 6- (2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin (PI-55). Jedná se o první známou molekulu s antagonistickým účinkem k cytokininům, která snižuje jejich aktivitu. Tato sloučenina kompetitivně inhibuje vazbu ligandu *tZ* na receptory cytokininů u *Arabidopsis thaliana*. Její aplikace na semena urychlila jejich klíčení a podpořila růst a tvorbu postranních kořenů (Spíchal et al., 2009). Další látkou s antagonistickými účinky k receptorům cytokininů je 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin (LGR-991). LGR-991 blokuje receptory cytokininů stejným způsobem jako PI-55 (Nisler et al., 2010). Jako užitečný inhibitor se jeví

i lovastatin, který inhibuje MEP dráhu. Jeho účinky byly prokázány zejména v krátkodobých studiích, kde účinně inhiboval biosyntézu cytokininů (Hartig a Beck, 2005).

3.3 INCYDE

Další možnou látkou inhibičního charakteru je 2-chloro-6-(3-methoxyphenyl)aminopurin (**I**nhibitor **C**ytokininové **D**egradace, INCYDE). Jedná se o látku, která má sníženou schopnost aktivovat receptory cytokininů, a přitom vysoce inhibuje CKX u *Arabidopsis thaliana* (Zatloukal et al., 2008). Inhibice CKX byla úspěšně prokázána jak na úrovni *in vitro* studií, tak *in vivo* studií (Spíchal, 2012). V rostlinných tkáňových kulturách INCYDE zvyšoval u explantátů hladinu aktivních cytokininů, a to především v nadzemních částech (Aremu et al., 2012).



Obr. 9: Strukturální vzorec 2-chloro-6-(3-methoxyphenyl)aminopurin (INCYDE).

Účinnost INCYDE byla prokázána Aremu a kolektivem u *in vitro* banánu. V této studii nebyl prokázán pozitivní vliv INCYDE na fotosyntézu, nicméně došlo k navýšení fotosyntetických pigmentů (Aremu et al., 2012). V podobné studii u rajčat stresovaných zasolením (NaCl) nebyly prokázány pozitivní účinky INCYDE na fotosyntézu, nicméně INCYDE snížil koncentraci malondialdehydu (MDA), který souvisí s oxidačním poškozením listů (Aremu et al., 2014). INCYDE projevil pozitivní účinky i při působení kadmia na léčivé rostliny. Kadmium patří mezi těžké kovy a negativně ovlivňuje růst a výnos plodin. Jedná se o jeden z nejvíce toxických prvků s vysokou schopností inhibovat fyziologické procesy v rostlinách. Rostliny ošetřené INCYDE vykazovaly

pozitivní změny především u kořenů a prýtu v porovnání s kontrolou. Modulace hladin endogenních cytokininů pomocí INCYDE by tedy mohla najít uplatnění i při hledání problematiky spojené s kontaminací životního prostředí kadmíem (Gemrotová et al., 2013).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Rostlinný materiál a jeho kultivace

K testování vlivu *tZ* a INCYDE na morfologické parametry klíčnicích rostlin byl zvolen modelový organismus *Arabidopsis thaliana* (ekotyp *Columbia*, *Col 0*). U semen se nejdříve provedla povrchová sterilizace prostřednictvím 80% ethanolu po dobu 5 minut. Semena byla vyseta na živné $\frac{1}{2}$ Murashige a Skoogovo médium (Duchefa) s 1% agarem (Duchefa) ve sterilních podmínkách flowboxu. Přidáním 1M KOH bylo upraveno pH média na hodnotu v rozmezí 5,7-5,8. Následným autoklávováním byla zajištěna sterilita připravovaného média. Před naléváním média na Petriho misky byla přidána příslušná koncentrace regulátoru růstu – *tZ* nebo INCYDE rozpuštěného v dimethylsulfoxidu (DMSO). Kontrolní rostliny byly ve všech experimentech kultivovány na médiu s přidavkem DMSO (0,1 % v/v). Semena se vysévala do jedné řady v přibližném počtu dvanáct semen na misku. Aby byla zachována sterilita uvnitř misek a byla zároveň umožněna výměna plynů, byly misky oblepeny polopropustnou náplastí Medipor. Takto připravené misky se daly do lednice na 3 dny, aby mohlo dojít k vernalizaci semen. Po 3 dnech se misky vertikálně umístily do kultivačního boxu (Percival Scientific, Inc.). Rostliny byly kultivovány 7 až 14 dní v kultivačním boxu za standardních podmínek intenzity světla $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ v režimu dlouhého dne – 16 hodin na světle při 21 °C a 8 hod ve tmě při 19 °C. Po příslušné 7denní nebo 14denní kultivaci byly jednotlivé misky vyfotografovány a byla u nich stanovena délka kořenů a listová plocha pomocí volně přístupného programu ImageJ. Se získanými hodnotami se dále pracovalo v programu Microsoft Excel.

Experiment testování vlivu *tZ* a INCYDE zahrnoval koncentrační řadu s koncentracemi 10 nM, 100 nM, 1 μM a 10 μM . Pro sledování vlivu sucha byla semena nejdříve kultivována na $\frac{1}{2}$ MS médiu s přidáním 50 mM D-manitolu. D-manitol byl přidán do média před autoklávováním, aby došlo k jeho úplnému rozpuštění. Semena byla kultivována na sterilních síťkách (Uhelon 120T), které byly položeny na médiích o koncentraci 100 nM *tZ* a INCYDE. Kontrolní rostliny byly kultivovány stejným způsobem na $\frac{1}{2}$ MS médiu bez přidavku D-manitolu. Kultivace probíhala 7 a 14 dní za podmínek uvedených výše.

Pro histochemické barvení byly použity transgenní linie *Arabidopsis thaliana* obsahující ARR5::GUS. Experiment testující využití specifických členů fosforylační kaskády zahrnoval transgenní linie KMD a mutantní linie ARR typu B. Linie KMD byla získána od profesora Schallera (Kim et al., 2013). Semínka ARR mutantů byla získána z NASC. Pro experimenty s transgenními liniemi byla zvolena koncentrace 0,5 μ M tZ a INCYDE.

Tabulka1: Seznam vybraných mutantních linií v ARR typu B. Informace doplněny pomocí databáze NASC z www.arabidopsis.info.

NASC ID: N6980 (genetické pozadí Col-0)	<i>arr1-3/arr11-2</i>
NASC ID: N6981 (genetické pozadí Col-0)	<i>arr1-3/arr12-1</i>
NASC ID: N6982 (genetické pozadí Col-0)	<i>arr1-3/arr18-2</i>
NASC ID: N6985 (genetické pozadí Col-0)	<i>arr12-1/arr18-2</i>
NASC ID: N6986 (genetické pozadí Col-0)	<i>arr1-3/arr11-2/arr12-1</i>
NASC ID: N39991 (genetické pozadí Col-0)	<i>arr10-5/arr12-1</i>
NASC ID: N39992 (genetické pozadí Col-0)	<i>arr1-3/arr10-5/arr12-1</i>

Kultivace rostlin pro proteomickou analýzu byla provedena na ½ MS médiu. Semínka byla vyseta na médium, na které byla položena sterilní síťka (Uhelon 120T). Po 7 dnech kultivace byly klíčící rostliny na síťkách ponořeny v roztoku s 0,5 μ M tZ nebo INCYDE a přeneseny na čerstvá média o stejných koncentracích příslušných rostlinných regulátorů. Aktivace probíhala 24 hodin a po ní následoval sběr pro proteomickou analýzu. Jednotlivé vzorky se zmrazily tekutým dusíkem a uchovaly při -80 °C do zahájení analýzy.

4.2 Stanovení antokyanů

Rostlinný materiál pro stanovení antokyanů byl odebírán v rozmezí hmotnosti 60 až 110 mg. Získané vzorky byly zmrazeny v tekutém dusíku do další analýzy. Následně bylo k jednotlivým vzorkům přidáno 0,45 ml extrakčního roztoku 1% HCl v methanolu. Antokyany byly extrahovány přes noc. Následující den bylo ke vzorkům přidáno 0,3 ml destilované vody a vzorky byly zvortexovány. Vzniklé vodno-methanolové fáze

se odebraly do nových a čistých zkumavek. Ke vzorkům se přidalo 150 μ l chloroformu a vzorky byly intenzivně protřepány a zvortexovány. Následně se nechaly vzorky minutu odstát, aby se vytvořila vodno-methanolová a chloroformová fáze. Dále byly vzorky centrifugovány při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Po centrifugaci došlo k oddělení jednotlivých fází. U vodno-methanolové fáze byla spektrofotometricky stanovena absorbance při vlnových délkách 530 a 657 nm. Získané hodnoty absorbancí byly přepočteny na navážky podle vzorce $A_{530} - (0,25 \times A_{657})/FW$ (FW – čerstvá hmotnost). Metodika izolace a stanovení antokyanů byla převzata od Mehrrens (2005).

4.3 Histochemické barvení (GUS)

Kontrolní klíčící rostliny Col-0 a klíčící rostliny nesoucí gen *uidA* pod promotorem genu *ARR5* byly obarveny barvicím roztokem, který obsahoval 0,1 M fosfátový pufr o pH 7; 5 mM EDTA; 0,5 mM červená krevní sůl $K_3[Fe(CN)_6]$; 0,5 mM žlutá krevní sůl $K_4[Fe(CN)_6]$; 1% TRITON-X114 a barvivo 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glukoronidázu (X-glcA); (0,5 mg/ml, rozpuštěno v DMSO). Rostliny byly dány do Eppendorfových zkumavek s 1 ml barvicího roztoku. Vzorky byly 10 minut ponechány za sníženého tlaku v exsikátoru a následně za normálního tlaku barveny 6-8 hodin. Vzorky byly barveny za současného otáčení na rotátoru (Bio RS-24 Mini Rotator). Po 6-8 hodinách byly vzorky odbarveny v odbarvovacím roztoku, který se skládal z ethanolu (70 %), z chloroformu (20 %) a destilované vody. Po úplném odbarvení byly rostliny vyfotografovány.

4.4 Bakteriální esej

V bakteriální esejí byl použit bakteriální kmen *E. coli* KMI001. Aktivace signální dráhy se projevuje v expresi reportérového enzymu (β -galaktosidázy); (Mizuno a Yamashino, 2010), jehož množství se detekuje enzymatickou reakcí s fluorescenčním substrátem 4-MUGal (4-Methylumbelliferyl β -D-galaktopyranosid, Spíchal, 2011). Reakce β -galaktosidázy se substrátem se zatavuje přidáním uhličitanu sodného a následným měřením intenzity fluorescence produktu 4-MU (excitace 365 nm, emise 448 nm). Fluorescence byla měřena na přístroji Infinite M1000 PRO (Tecan). Všechny pipetovací kroky byly provedeny přístrojem Nano Drop II (Bionex). Kultivace bakterií proběhla v mikrotitrační destičce v inkubátoru Themomixer C (Eppendorf)

v minimálním médiu M9 (složení média je popsáno v Studier, 2005). Celý proces detekce se dá shrnout do těchto kroků:

1. Smíchání bakteriálního štoku se 40 ml minimálního média.
2. Rozpipetování *E. coli* KMI001 exprimující AHK4 do mikrotitrační destičky.
3. Rozpipetování koncentrační řady tZ a INCYDE k bakteriím v desce.
4. Kultivace 5 hodin, 25 °C, při 1 400 rpm (exprese β -galaktosidázy).
5. Rozpipetování substrátu 4-MUGal (25 mM v DMSO) do desky.
6. Kultivace 30 minut, 37 °C, při 1 400 rpm (štěpení substrátu β -galaktosidázou).
7. Rozpipetování uhličitanu sodného (1,2 M) do desky.
8. Změření fluorescence v desce.

4.5 Homogenizace a extrakce proteinů

Jednotlivé vzorky se homogenizovaly v tekutém dusíku. Poté se ke vzorkům přidaly 2 ml 10% (v/v) TCA v acetonu. V dalším kroku se udělala centrifugace při 10000 x g a teplotě 4 °C po dobu 5 minut. Následně se odebral supernatant a k peletu se přidal 1 ml 10% (v/v) TCA v destilované vodě. Takto připravené vzorky byly podruhé centrifugovány po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl odpipetován a ke zbylému peletu se přidal 1 ml 80% (v/v) acetonu v destilované vodě. Následně byla provedena třetí centrifugace 10000 x g po dobu 15 minut.

K získanému proteinovému peletu se přidalo 0,8 ml SDS pufru (2% dodecylsírán sodný v/v, 30% sacharóza, 5% β -merkaptoethanol, 5 mM EDTA, 100 mM Tris; pH 8,0). Následně se přidalo 0,4 ml saturovaného Tris o pH 8 k 0,8 ml proteinu rozpuštěného v SDS pufru za důkladného protřepání na třepačce při 850 rpm. Vzorky se poté centrifugovaly při 15000 x g 20 minut. Fenolová frakce obsahující protein se opatrně odebrala pipetou a byla přenesena do nové mikrozkušavky o objemu 2,0 ml. Přenesený objem fenolové frakce byl doplněn do objemu 2,0 ml roztokem 100 mM octanu amonného v methanolu za účelem vysrážení proteinů. Vzorky byly uchovány přes noc při -20°C. Následující den se vzorky stočily při 15000 x g po dobu 5 minut. Vzniklý supernatant byl odstraněn a přidal se 1 ml 80% acetonu. Proběhla další centrifugace, odstranění supernatantu a zbylý pelet se vysušil.

4.6 Digest a odsolení vzorků

Vysušený pelet byl rozpuštěn v 300 μl roztoku 100 mM NH_4HCO_3 a 8 M močoviny po dobu 60 minut při 25 °C na třepačce. Pomocí metody dle Bradforda (Bradford, 1976); (Sigma Aldrich) a destičkového spektrofotometru (Tecan) byla zjištěna koncentrace. Dále bylo nutné vzorky štěpit, takže se k nim přidal trypsin (10 μl na 500 μg proteinu); (Promega). Štěpení probíhalo při teplotě 30 °C přes noc.

Jednotlivé vzorky bylo nutné odsolit. K tomu se použily odsolovací destičky C18 SPEC (Agilent). Destička byla nejdříve promyta 2x 400 μl methanolu a 4x 400 μl ddH₂O. Poté byly vzorky nanесeny a promyty 4x 400 μl ddH₂O. Pomocí 400 μl methanolu se vzorky eluovaly a nechaly odpařit v SpeedVac koncentrátoru (Thermo).

4.7 Příprava vzorků pro analýzu LC-MS

Než se provedla LC-MS analýza, přidala se ke vzorkům 0,1% kyselina mravenčí (FA) a 5% ACN v takovém objemu, aby výsledná koncentrace peptidu byla zhruba 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Vzorky byly stočeny a přeneseny do vialek s insertem o objemu 100 μl a vloženy do autosampléru UltiMate 3000 RSLC (Dionex) spojeného s UHR-TOF hmotnostním spektrometrem maXis Impact (Bruker).

4.8 LC-MS analýza

Vzorky se analyzovaly pomocí C18 reverzní chromatografie (15 cm, 0,1 mm průměr, Ascentis Express Column, Sigma-Aldrich), která byla napojena k nanoESI zdroji CaptiveSpray (Bruker). UltiMate 3000 RSLC pracoval s průtokem 300-500 nl/min, gradient ACN byl 4-35% během 180 minut. UHR-TOF spektrometr měřil v MS/MS módu pro identifikaci proteinů (rozsah 50-2200 m/z, MS sběr 2 Hz, MS/MS 4-20 Hz, max. 20 prekurzorů, funkce aktivní exkluze). Při měření byl použit vnitřní standard 1221,99 m/z (lockmass).

4.8.1 Změření a zpracování MS/MS spekter

Pro identifikaci a kvantifikaci proteinů byl využit software MaxQuant 1.5.8.2 (Cox a Mann, 2008) s databází proteinů *Arabidopsis thaliana* (TAIR 10) a následující parametry: štěpení trypsinem, možnost jednoho vynechaného štěpného místa; přesnost hmoty MS 35 ppm, MS/MS 0,06 Da; možnost až tří variabilních modifikací (oxidace

M; N/Q deamidace; možnost Cys-Cys vazby, N-terminální acetylace). Spolehlivost identifikace byla podmíněna $FDR < 1\%$ a přítomností alespoň jednoho prototypického peptidu. Pro kvantitativní analýzu bylo využito kvantifikace pomocí počítání přiřazených spekter (PSMs) a automatické vyhodnocení plochy píku prekurzoru (MS1 profil). Jako hladina významnosti byla určena absolutní změna 2,0.

4.9 Vyhodnocení dat

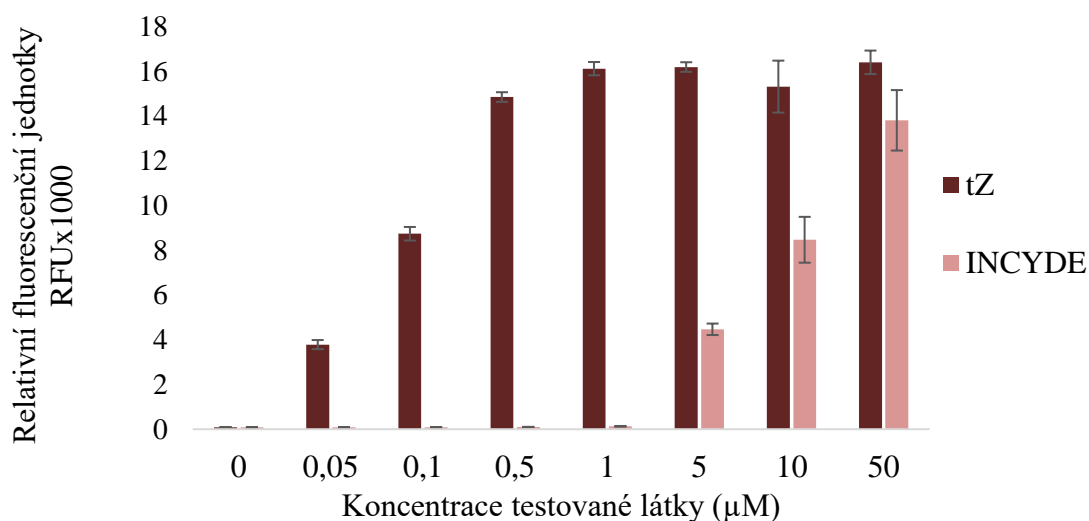
U získaných dat byly vyhodnoceny protein-proteinové interakce pomocí STRING 10.0. (<http://stringdb.org>). Informace o funkcích proteinů byly vyhledány v databázi UniProt (<http://www.uniprot.org>) a TAIR (<https://www.arabidopsis.org>). Lokalizace proteinů byla určena prostřednictvím databáze SUBA (<http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au>).

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato diplomová práce se zabývá působením inhibitoru degradace cytokininů, konkrétně enzymů CKX. Enzym CKX má většinový podíl na katabolismu a inaktivaci cytokininů v rostlinách (Aremu et al., 2014), proto má modulace jeho aktivity významný vliv na hladinu cytokininů. Jedním z inhibitorů je látka INCYDE, která prokázala vysokou účinnost v blokaci CKX u *Arabidopsis thaliana*. Jedná se o poměrně novou sloučeninu, jejíž účinky jsou aktivně studovány (Zatloukal et al., 2008; Aremu et al., 2012). Ačkoliv se INCYDE jeví jako inhibiční látka s vysokým potenciálem, nebylo provedeno porovnání jeho působení s exogenním přídatkem *tZ*.

5.1 INCYDE je inhibitorem CKX ale také agonista cytokininů

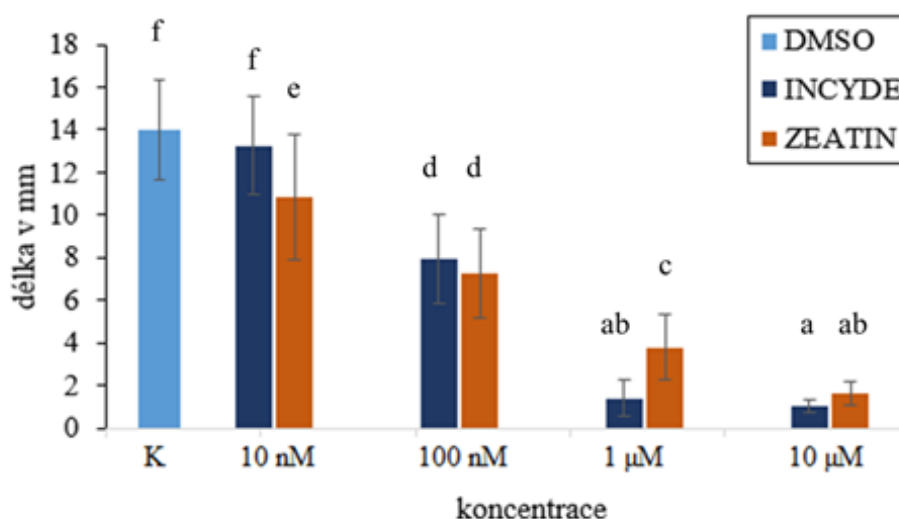
Jelikož má INCYDE podobnou strukturu jako látky aktivující cytokininové receptory, byl první experiment zaměřen na jeho schopnost aktivovat receptor CRE1/AHK4. Provedli jsme srovnání aktivace CRE1/AHK4 receptoru *tZ* a INCYDE, abychom zjistili, jestli se INCYDE váže na receptory cytokininů a chová se sám jako cytokinin. To bylo provedeno užitím bakteriální eseje, ve které se sledovala míra aktivace signální dráhy v závislosti na koncentraci testovaných látek. Bakteriální esej je založena na aktivaci receptorů AHK lokalizovaných v membráně bakteriálních buněk, kdy je po jejich vazbě s ligandem spuštěna signalizační kaskáda vedoucí k expresi reportérového enzymu β -galaktosidázy (Mizuno a Yamashino, 2010). Množství naprodukovaného enzymu se pak detekuje fluorescenčním substrátem (Spíchal, 2011). V experimentu jsme zvolili koncentrační škálu látek zájmu od 50 nM až po 50 μ M (obr. 10). Výsledky prokázaly, že za nízkých koncentrací INCYDE nedochází k aktivaci receptoru CRE1/AHK4. Částečná aktivita receptoru byla zaznamenána až při aplikaci koncentrací vyšších než 1 μ M. Při koncentraci 5 μ M byla aktivita INCYDE srovnatelná s aktivitou odpovídající koncentraci 50 nM *tZ*. Saturující hodnoty bylo pro *tZ* dosaženo při koncentraci 1 μ M. Při aplikaci INCYDE nebylo této saturace dosaženo ani s nejvyšší sledovanou koncentrací 50 μ M. Za zvýšených koncentracích se INCYDE projevuje jako agonista cytokininů a jeho účinek při vyšších koncentracích může být výsledkem součtu jeho inhibičního účinku na CKX a aktivačního účinku na AHK.



Obr. 10: Aktivace receptoru cytokininů CRE1/AHK4 po aplikaci růstových regulátorů.

K porovnání vlivu exogenní aplikace cytokininů a INCYDE byl využit rovněž *tZ*, protože se u *Arabidopsis thaliana* vyznačuje silnými účinky (Spíchal, 2012). Pro porovnání míry účinku růstových regulátorů byl sledován jejich inhibiční vliv na růst hlavního kořene, jelikož je inhibice růstu kořenů nápadným znakem působení cytokininů (Werner et al., 2003). Koncentrační řada zahrnovala koncentrace růstových regulátorů v intervalu od 10 nM až po 10 μM, kdy u 10 nM byly pozorovány první statisticky signifikantní rozdíly ve změně délky hlavního kořene a při koncentraci 10 μM docházelo k úplné inhibici růstu (obr. 11).

Z výsledků je zřejmé, že INCYDE působí jako faktor pro navození silné cytokininové odpovědi porovnatelné s cytokininem *tZ*. Ve vyšších koncentracích způsoboval INCYDE dokonce vyšší inhibici růstu kořene než *tZ*. K saturaci inhibice růstu kořene INCYDE došlo již při koncentraci 1 μM, stejnou inhibici navozoval *tZ* až s koncentrací o 1 řád vyšší. Vyšší účinek INCYDE může být důsledkem významné role CKX v regulaci tohoto procesu, nicméně není možné vyloučit, že již při této koncentraci INCYDE se projevuje agonistický účinek této látky. Navíc afinita INCYDE byla sledována jen pro AHK4, přičemž rozdílné receptory AHK vykazují různou míru aktivace působením odlišných typů cytokininů (Spíchal et al., 2004). Vzhledem k tomu, že cílem bylo srovnávat INCYDE jako inhibitor CKX s exogenním přídatkem *tZ*, byla pro následné porovnávání působení látek zvolena koncentrace menší než 1 μM, aby byl vliv aktivace receptorů INCYDE minimalizován.



Obr. 11: *Délka hlavního kořene po aplikaci tZ a INCYDE v různých koncentracích.* „K“ - představuje kontrolní rostliny kultivované s přidavkem DMSO. Jednotlivé sloupce představují průměrné naměřené hodnoty, chybové úsečky prezentují směrodatné odchylky (n=30). Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí ANOVA s post-hoc analýzou provedenou pomocí Scheffova testu.

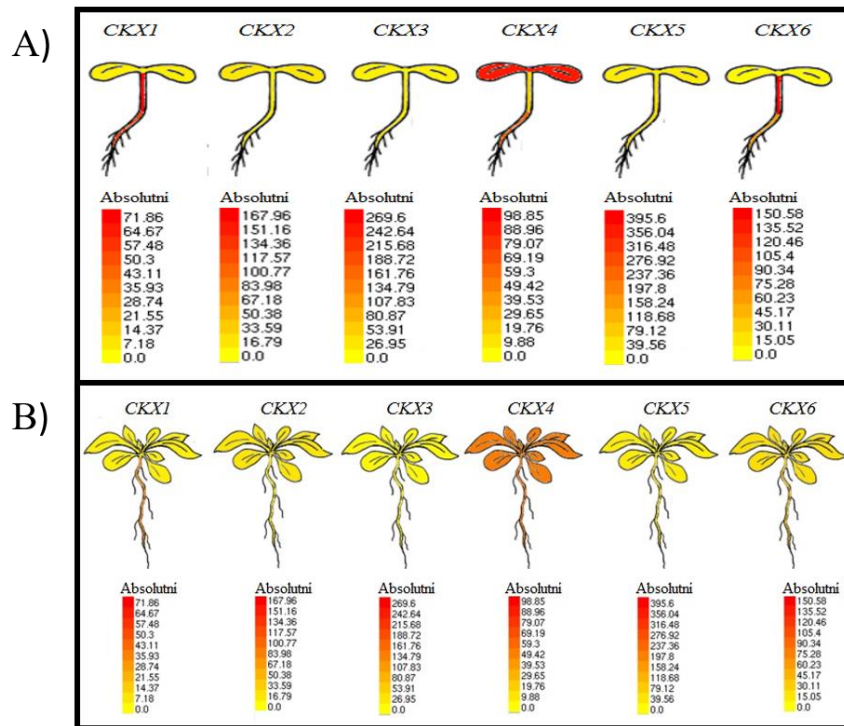
5.2 tZ a INCYDE působí odlišně v různých částech klíčících rostlin

Ačkoliv výsledky vlivu aplikace tZ a INCYDE na délku hlavního kořene prokázaly srovnatelné účinky těchto látek, jejich působení se může v rámci rostlinných pletiv lišit. Rozdíl může být v distribuci těchto látek a v místě jejich působení. Účinek endogenních cytokininů je dán jejich metabolismem, ale také jejich transportem (Zürcher et al., 2016). Stejně tak vliv exogenní aplikace cytokininů silně závisí na transportu a metabolismu těchto látek. Naproti tomu působení INCYDE jako inhibitoru CKX je závislé především na přítomnosti tohoto enzymu. Dá se tedy očekávat silnější účinek tam, kde hraje aktivita CKX významnou roli. Jak bylo zmíněno výše, v tkáňových kulturách byl INCYDE schopen zvyšovat hladiny aktivních cytokininů zejména v nadzemních částech (Aremu et al., 2012), což naznačuje, že by mohl INCYDE působit v závislosti na rostlinných orgánech či pletivech.

Prostřednictvím databáze ARAPORT (ARABIDOPSIS INFORMATION PORTAL; <https://www.araport.org/>) byl vytvořen přehled genové exprese CKX1-CKX6 u 7denních a 14denních rostlin *Arabidopsis thaliana* (obr. 12). Metaanalýza dat

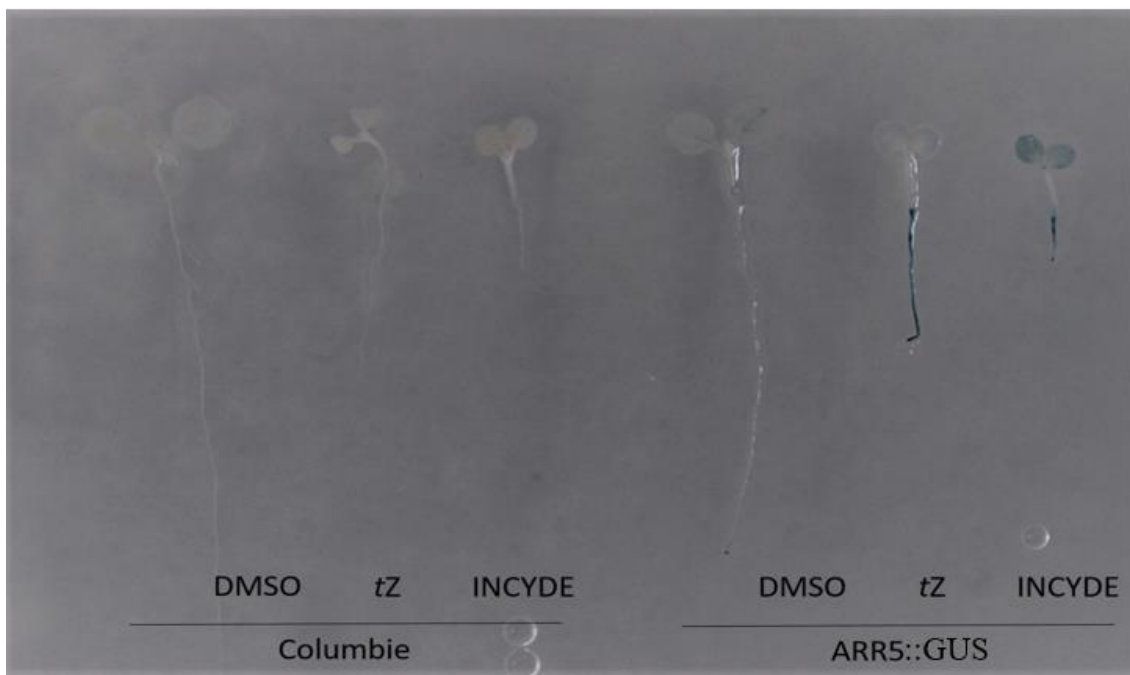
poukázala na poměrně vysokou expresi CKX4, která byla mimo kořen významně exprimována i v kotyledonech klíčnicích rostlin a dále v pravých listech. Vzhledem k tomu, že právě CKX4 vykazovala v dřívějších srovnávacích analýzách vysokou aktivitu (Galuszka et al., 2007) a navíc je lokalizována do apoplastu, kde dochází k významné modulaci cytokininové signalizace (Zürcher et al., 2016), byla předpokládána zvýšená aktivita cytokininové signalizace po aplikaci INCYDE především v prýtové oblasti klíčnicích rostlin.

Tato hypotéza byla testována na základě histochemického barvení rostlin exprimujících gen *uidA* pod promotorem genu *ARR5* (*ARR5::GUS*). Transgenní rostliny a kontrolní rostliny byly kultivovány za přítomnosti 0,5 μM *tZ* a INCYDE po dobu 7 a 14 dní, aby byl zachycen vliv INCYDE na klíčnicí rostlinu a rostlinu s již rostoucími pravými listy.



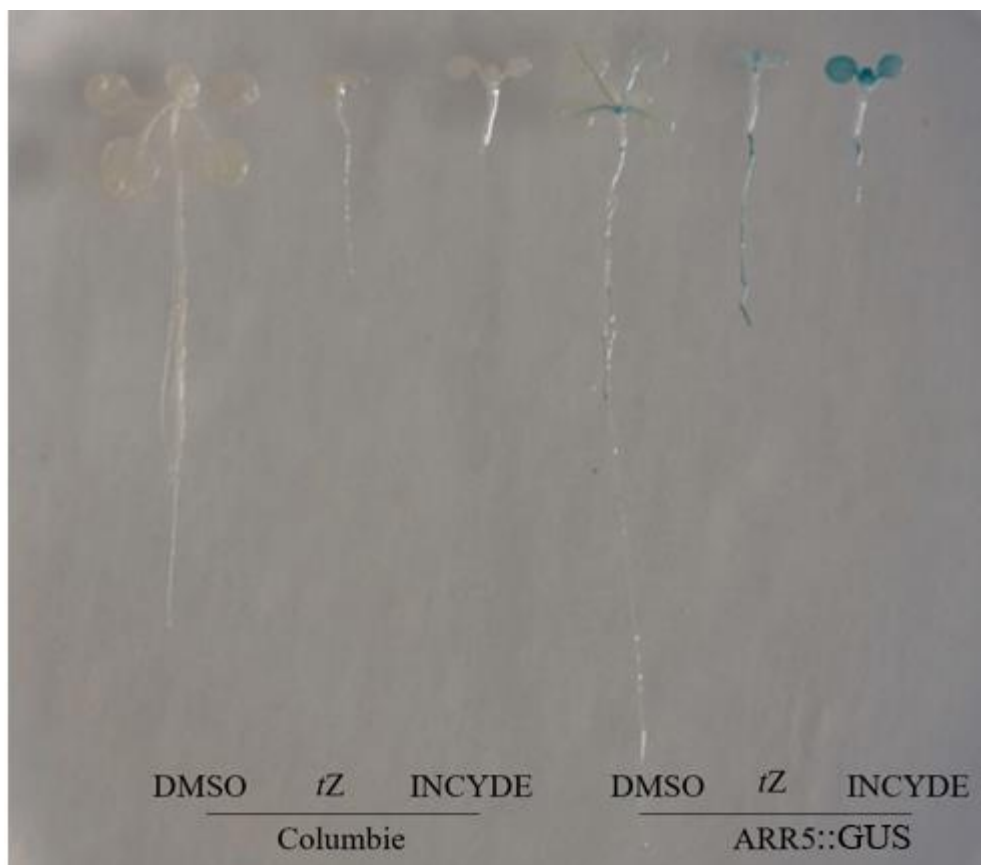
Obr. 12: Genová exprese CKX u klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana*. A) 7denní klíčnicí rostliny. B) 14denní klíčnicí rostliny (převzato a upraveno z databáze ARAPORT).

Analýza hladiny GUS prokázala, že aplikace *tZ* u 7denních klíčnicích rostlin vede ke zvýšené aktivitě promotoru *ARR5* především v kořenové části (obr. 13). INCYDE byl signálem zaznamenán rovněž u kořene, ale výrazně zvýšená aktivita cytokininové signalizace byla nalezena i v kotyledonech.



Obr. 13: Výsledky šestihodinového histochemického barvení 7denních klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana*. Na obrázku jsou kontrolní rostliny Col-0 bez konstruktů *ARR5::GUS* a transgenní rostliny s tímto konstruktem ošetřené 0,5 μ M tZ a INCYDE.

Podobný účinek regulátorů růstu byl pozorován i při analýze 14denních rostlin (obr. 14). V porovnání se 7denními klíčnicími rostlinami byl signál u tZ zaznamenán v slabé míře i v prýtu. Ovšem v porovnání s aplikací INCYDE byl signál vyvolaný tZ méně intenzivní. Významný vliv INCYDE na zvýšení cytokininové signalizace v prýtu byl tedy potvrzen u dvou vývojových stádií. Celkově analýza cytokininové signalizace prokázala rozdíl v místě účinku jednotlivých růstových regulátorů.



*Obr. 14: Výsledky osmihodinového histochemického barvení 14denních klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana*. Na obrázku jsou kontrolní rostliny Col-0 bez genu *ARR5* a transgenní rostliny nesoucí gen *ARR5* ošetřené 0,5 μM *tZ* a *INCYDE* po osmi hodinách histochemického barvení. Modré zbarvení značí aktivitu signálu a intenzita zbarvení odpovídá množství látky.*

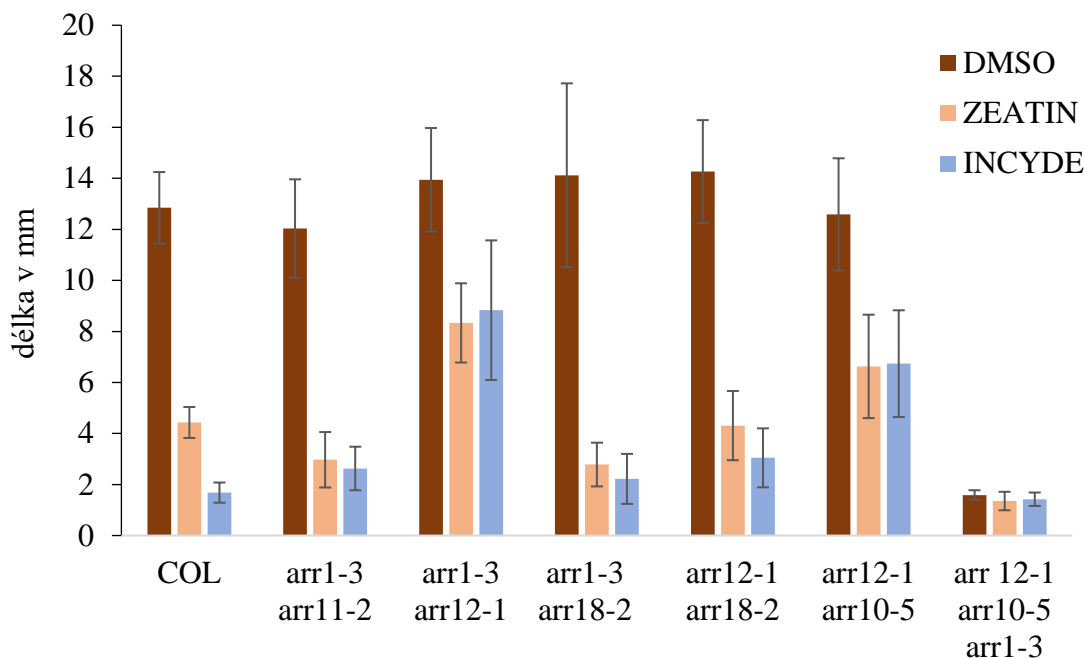
5.3 Porovnání vlivu *tZ* a *INCYDE* u mutant v signalizaci cytokininů

Enzymy CKX nejsou schopny katalyzovat degradaci všech typů cytokininů. Jejich schopnost degradovat je závislá na přítomnosti dvojné vazby postranního řetězce báze, proto CKX nedegradují DZ nebo aromatické cytokininy (Avalbaev et al., 2012). Na základě tohoto faktu se dá předpokládat, že kromě rozdílného místa účinku působení *tZ* a *INCYDE*, může mít ošetření těmito látkami za následek navýšení rozdílné populace jednotlivých typů cytokininů. Různé typy cytokininů mají různou afinitu k receptorům AHK a mohou aktivovat cytokininovou signalizaci různou měrou (Spíchal et al., 2012). Rovněž AHK navzdory překryvu ve svých funkcích vykazují jisté specifické role, jako je například modulace odpovědi ke zvýšené teplotě (Černý et al., 2014). To, zda

ošetření *tZ* a INCYDE povede k využití specifických členů fosforylační kaskády bylo testováno na liniích s vícenásobnými mutacemi v genech ARR typu B.

ARR typu B jsou transkripční faktory v signalizačním systému cytokininů, kde působí jako pozitivní regulátory cytokininové signální dráhy. Vzhledem k funkčnímu překryvu různých ARR typu B (Mason et al., 2005) byly pro experiment použity linie s vícenásobnými mutacemi. V cytokininové signalizaci jsou významní především ARR 1, 10 a 12, přičemž mutantní linie *arr1/arr10/arr12* vykazuje velmi silný fenotyp s výraznou necitlivostí k cytokininům (Yokoyama et al., 2007; Argyros et al., 2008).

Klíční rostliny vícenásobných mutant v ARR typu B byly kultivovány na médiích s 0,5 μM *tZ* a INCYDE po dobu 7 dní. V rámci experimentu byla měřena délka hlavního kořene. Linie *arr1-3/arr11-2*, *arr1-3/arr18-2* a *12-1/arr10-5* nevykazovaly statisticky signifikantní rozdíl v délce kořene oproti kontrolním rostlinám. Aplikace *tZ* a INCYDE u těchto rostlin vedla k podobné odezvě u obou regulátorů. Linie s dvojnásobnou mutací u významných ARR typu B vedly k oslabení odpovědi na aplikaci růstových regulátorů, což bylo nejvíce vidět u linie *arr1-3/arr11-2*. Nicméně nebylo prokázáno, že by aplikace INCYDE na rozdíl od *tZ* byla více či méně účinná v inhibici kořenů v některém z dvojných mutant. U linie *arr1/arr10/arr12* s mutací ve všech významných ARR typu B došlo k významné redukci délky hlavního kořene již u neošetřených rostlin. Tato linie měla již natolik narušenou cytokininovou signalizaci, že u nich aplikace růstových regulátorů nevedla k další změně v délce kořene.



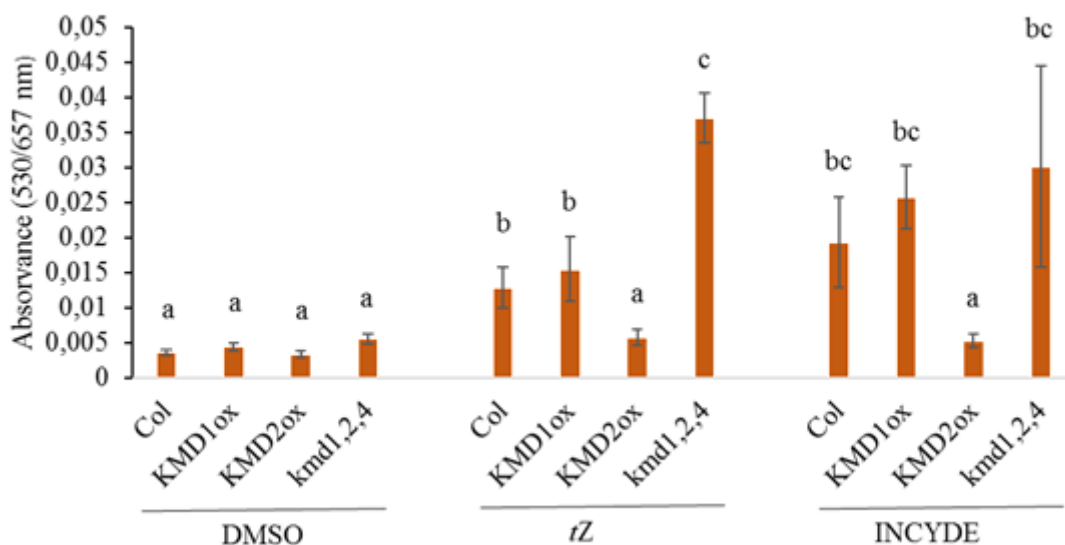
Obr.15: Délka hlavního kořene v transgenní linii vybraných mutantů *ARR* typu *B* u *Arabidopsis thaliana* s pozadím *Columbia*. Jednotlivé sloupce představují průměrné hodnoty naměřených délek klíčnic rostlin ošetřených $0,5 \mu\text{M}$ *tZ* nebo *INCYDE*.

5.4 *KMD2* je regulátorem cytokininu indukované akumulace antokyanů

Exogenní aplikací cytokininů dochází ke zvýšení akumulace antokyanových barviv (Deikman a Hammer, 1995). Stimulační účinek cytokininů na akumulaci antokyanů byl prokázán také u mrkve, růže a ředkve (Nakamura et al., 1980). Modulace biosyntézy cytokininů je dána prostřednictvím regulátorů odpovědi typu B. Jedná se především o *ARR1*, *10* a *12* (Das et al., 2012). Proteiny *KMD* interagují významně s *ARR1* a *ARR12*, a v menší míře s *ARR2* a *ARR10*. Chtěli jsme zjistit, jestli *KMD* regulují akumulaci antokyanů, a to rozdílně při aplikaci *tZ* a *INCYDE*. Pro experimenty byly použity rostliny jak s ektopickou expresí těchto proteinů, tak vícenásobný mutant (Kim et al., 2013).

$0,5 \mu\text{M}$ koncentrace obou růstových regulátorů vyvolala statisticky významné navýšení hladiny antokyanů oproti neošetřené kontrole (obr. 16). Navzdory tomu, že byla naměřena průměrná hodnota u hladiny antokyanů vyšší po aplikaci *INCYDE*, tak tento rozdíl nebyl díky poměrně velkému rozptylu dat statisticky významný. U rostlin

linie *kmd1,2,4* s posílenou cytokininovou signalizací došlo po ošetření regulátory k navýšení hladiny antokyanů oproti kontrole. Toto navýšení však bylo statisticky signifikantní jen při aplikaci *tZ*. Jako nejzajímavějším faktem se však ukázal negativní vliv proteinu KMD2 na akumulaci antokyanů. Navzdory tomu, že ektopická exprese proteinů KMD1 nevedla ke změně hladiny antokyanů v porovnání s kontrolou, tak exprese KMD2 akumulaci naprosto utlumila. Data tedy ukazují, že by protein KMD2 mohl hrát specifickou roli pro regulaci těchto rostlinných barviv.



Obr. 16: Hladina antokyanů u rostlin s modifikovanou cytokininovou signalizací u transgenní linie *KMD*. Jednotlivé sloupce představují průměrné naměřené hodnoty, chybové úsečky prezentují směrodatné odchylky ($n=30$). Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí ANOVA s post-hoc analýzou provedenou pomocí Scheffova testu.

5.5 INCYDE pomáhá rostlinám při ochraně před suchem

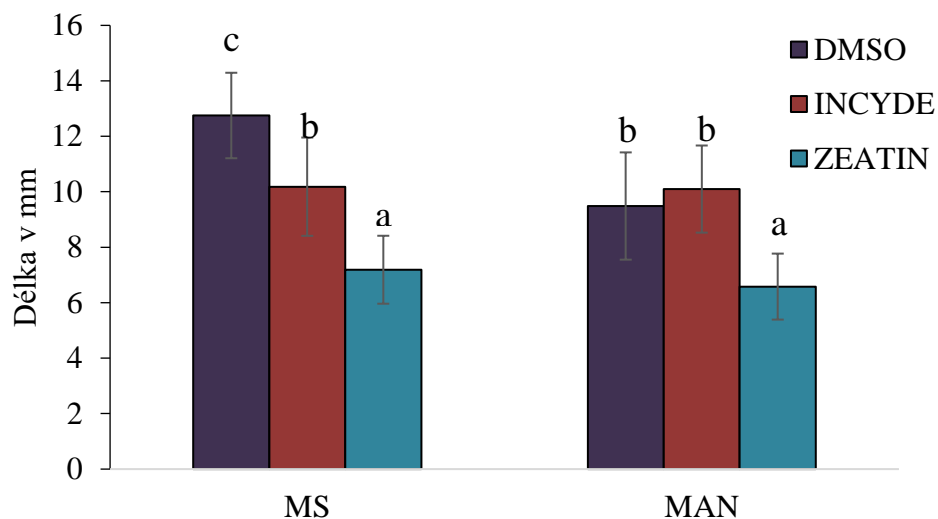
INCYDE byl již v předešlých studiích testován při různých stresových situacích jako je zasolení či přítomnost těžkých kovů. Bylo zjištěno, že jeho aplikace zmírňuje negativní dopady těchto stresorů a mohl by najít významné uplatnění v zemědělství (Gemrotová et al., 2013; Aremu et al., 2014).

Rivero a kolegové (Rivero et al., 2007) pomocí metod genového inženýrství vytvořili transgenní linii tabáku, která při zvýšené hladině endogenních cytokininů vykazovala značnou odolnost vůči suchu. Jelikož INCYDE inhibuje degradaci

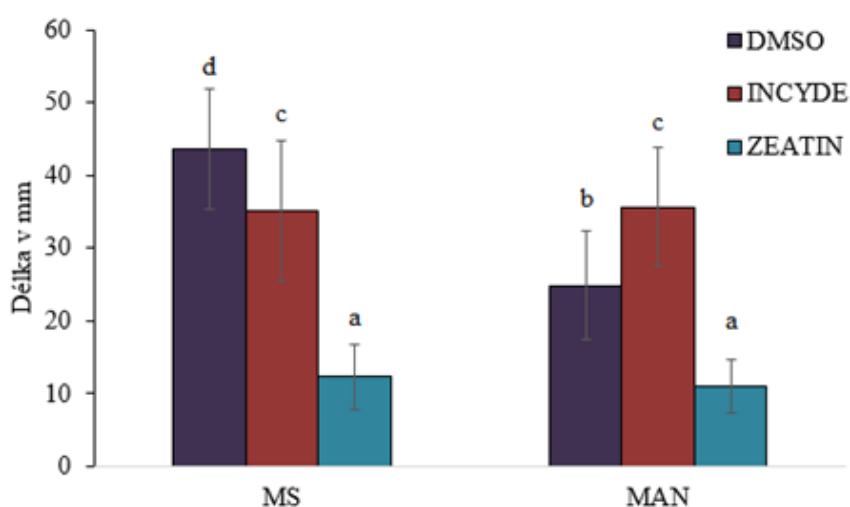
cytokininů a tím navyšuje jejich endogenní hladiny, chtěli jsme otestovat jeho vliv při působení tohoto stresoru. K simulaci podmínek navozujících stres ze sucha byl použit osmolyt D-manitol o koncentraci 50 mM. Klíčící rostliny byly ošetřené 100 nM *tZ* a INCYDE. Jako markery míry stresu byly použity morfometrické parametry – délka hlavního kořene, která odráží vliv stresu v podzemní části rostliny, a obsah listové plochy jako marker stresu nadzemní části. Morfometrické parametry byly stanoveny pro dva časové body 7 a 14 dní.

Rostliny kultivované 7 dní za podmínek simulujících sucha vykazovaly v porovnání s kontrolou inhibici růstu kořene o 25 %, zatímco u 14denních rostlin byl tento jev ještě zesílen (změna o 43 %; obr. 17). Aplikace 100 nM *tZ* vedla k ještě silnější inhibici, ve které se však neprojevil další aditivní účinek stresu. Naopak aplikace 100 nM INCYDE společně s D-manitolem nevedla k inhibici růstu hlavního kořene po 7 dnech růstu a 14denní rostliny vykazovaly na médiu s D-manitolem dokonce delší rostliny. Aplikace INCYDE tedy snížila dopad ošetření suchem v podzemní části rostliny.

A)



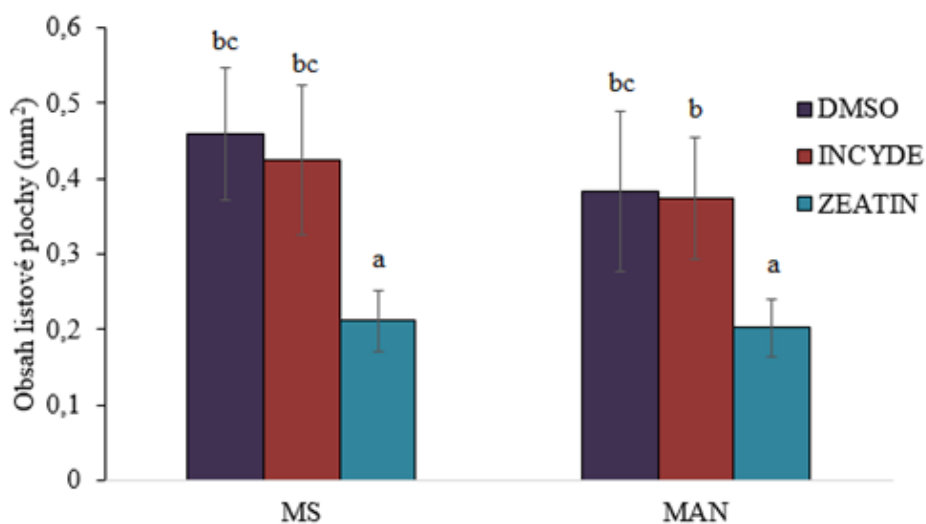
B)



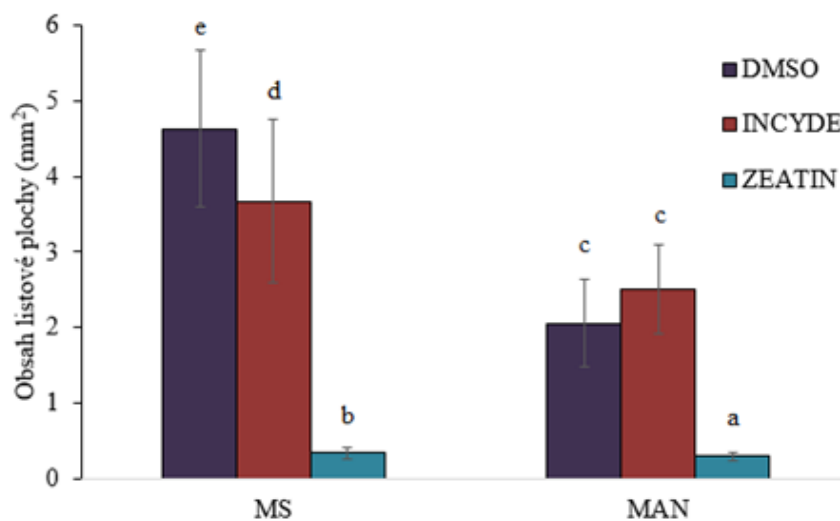
Obr. 17: Vliv tZ a INCYDEu na délku hlavního kořene 7 a 14denních rostlin při simulaci sucha. Ke simulaci sucha došlo přidáním D-manitolu (50 nM) a klíčící rostliny byly kultivovány při použité koncentraci 100 nM tZ a INCYDE. Jednotlivé sloupěčky představují průměrné hodnoty měřených rostlin, zhruba 30 rostlin na jednu variantu. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky z naměřených hodnot. A) Rostliny kultivovány 7 dní. B) Rostliny kultivovány 14 dní. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí ANOVA s post-hoc analýzou provedenou pomocí Scheffova testu.

Kromě délky hlavního kořene byl měřen i obsah listové plochy. Při aplikaci 100 nM tZ byla zaznamenána významná redukce listové plochy u 7 i 14denních rostlin, jak při působení stresu, tak i bez něj. Aplikace INCYDE nezpůsobovala oproti kontrole statisticky signifikantní změny (obr. 18).

A)



B)



Obr. 18: Vliv tZ a INCYDEu na obsah listové plochy 7 a 14denních rostlin při simulaci sucha. Ke simulaci sucha došlo přidáním D-manitolu (50 nM) a klíčící rostliny byly kultivovány při použité koncentraci 100 nM tZ a INCYDE. Jednotlivé sloupčky představují průměrné hodnoty měřených rostlin, zhruba 30 rostlin na jednu variantu. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky z naměřených hodnot. A) Rostliny

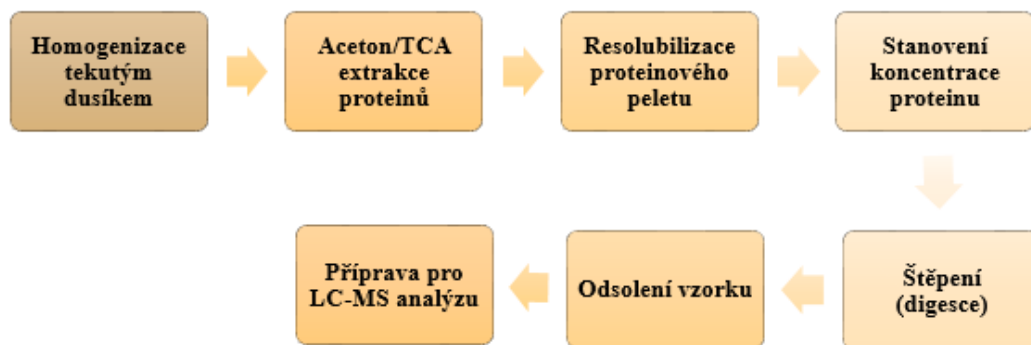
kultivovány 7 dní. B) Rostliny kultivovány 14 dní. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí ANOVA s post-hoc analýzou provedenou pomocí Scheffova testu.

Stres z nedostatku vody ovlivňuje zejména funkci fotosyntetického aparátu a dochází také ke žloutnutí listů. Cytokininy jsou důležité pro fotosyntézu. U ječmene bylo prokázáno, že cytokininy řídí tetrapyrrolový metabolismus, čímž podporují fungování a shromažďování fotosyntetických komplexů ve vyvíjejících se chloroplastech (Yaronskaya et al., 2006). U listů jabloně bylo prokázáno, že druh a koncentrace cytokininů ovlivňují obsah chlorofylu v listech (Dobrąnszki et al., 2014). Pozitivní účinek na fotosyntézu nebyl u INCYDE prokázán, nicméně bylo prokázáno, že tato látka může rostlinám pomoci vypořádat se s různými stresy. U rajčat stresovaných zasolením NaCl neměla aplikace INCYDE sice pozitivní vliv na maximální kvantovou účinnost fotosystému II., ale pomohla snížit koncentraci malondialdehydu (MDA), který způsobuje oxidační poškození pletiv (Aremu et al., 2014). Pozitivní vliv měla i aplikace INCYDE na léčivé rostliny *Bulbine natalensis Baker* a kovu tolerantní *Rumex crispus L.*, které byly kultivovány v prostředí s kadmíem. Kadmium je známo svou toxicitou pro rostliny i člověka. V případě aplikace INCYDE byl zaznamenán pozitivní účinek u sazenic jak v oblasti růstu kořene, tak prýtu (Gemrotová et al., 2013). Na základě našich výsledků můžeme říci, že INCYDE je kandidátem, který by mohl najít uplatnění i při hledání řešení v problematice spojené se suchem.

5.6 Rostlinný materiál pro proteomickou část

Proteomická analýza diplomové práce navazuje na bakalářskou práci, která se zabývala srovnáním účinku exogenně aplikovaného cytokininu *tZ* a inhibitoru jejich degradace INCYDE na klíčnou rostlinu *Arabidopsis thaliana*. V diplomové práci je dokončena kvantitativní analýza, která přináší bližší náhled a objasnění rozdílnosti účinku INCYDE.

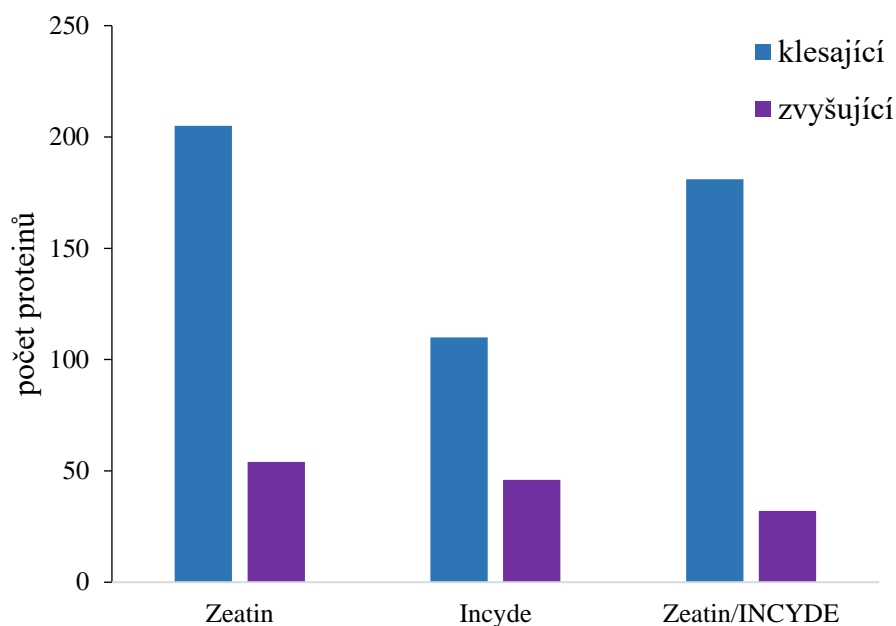
Jako rostlinný materiál jsme zvolili klíčnou rostlinu ekotyp Col-0. Rostliny byly kultivovány 7 dní na síťkách a následně 24 hodin aktivovány 0,5 μM INCYDE nebo *tZ*. Sběr a materiál proběhl postupem popsaným v kapitole 4 Materiál a metodika. Jednotlivé vzorky byly připraveny k analýze hmotnostní spektrometrií dle schématu zobrazeného na obr. 19.



Obr. 19: Jednotlivé kroky přípravy vzorků pro LC-MS analýzu

5.7 Rozdíly na úrovni proteomu

Cílem proteomické části bylo porovnat rozdílné účinky *tZ* a INCYDE na úrovni proteomu. Prostřednictvím programu MaxQuant 1.5.8.2 s databází proteinů *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) byl získán soubor, který byl převeden do programu Microsoft Excel. Pro určení ovlivněných proteinů *tZ* a INCYDE jsme vycházeli ze dvou metod měření: metody intenzity a metody MS/MS. Pracovali jsme pouze s proteiny, které vykazovaly absolutní změnu alespoň v jedné kategorii vyšší než dvě. Stanovili jsme proteiny s významně změněnou abundancí v porovnání s kontrolou. Celkem bylo identifikováno 1310 proteinů. Pro následující analýzy byly vybrány pouze ty proteiny, které v porovnání s kontrolou vykazovaly signifikantní změny v abundanci v odpovědi na *tZ* či INCYDE a ty, které se významně lišily mezi ošetřením *tZ* a INCYDE (obr. 20).



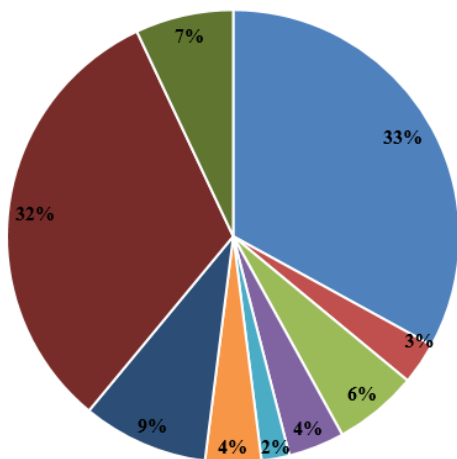
Obr. 20: Účinek INCYDE a tZ na proteom Arabidopsis thaliana. Jednotlivé sloupce znázorňují počet ovlivněných proteinů u rostlin vystavených působení 0,5 μ M INCYDE a tZ po dobu 24 hodin. Sloupce Zeatin/INCYDE představují proteiny s rozdílnou odpovědí mezi tZ a INCYDE. Zvolená hladina absolutní změny byla dvě.

V dalším kroku jsme provedli porovnání našich identifikovaných proteinů ovlivněných tZ s databází proteinů rezponzivních na cytokininy (Černý et al., 2016). Z celkových 259 ovlivněných tZ bylo nalezeno celkem 54 proteinů rezponzivních na cytokininy, 63 proteinů bylo nalezeno v odpovědi na jiné rostlinné hormony a 142 proteinů nebylo nalezeno v žádné předchozí proteomické analýze na rostlinné hormony. Srovnání ukazuje poměrně rozumný překryv s předchozími analýzami a nově identifikované cytokinin-rezponzivní proteiny mohou souviset s podmínkami experimentu, které se odlišují od předchozích prací.

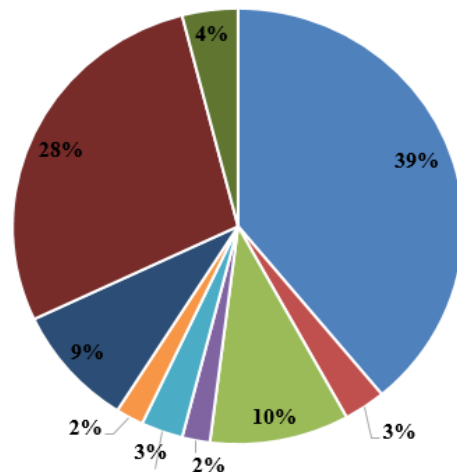
5.8 Lokalizace abundantních proteinů

V následné analýze byly dohledány informace o lokalizaci proteinů ve variantách ošetřených tZ a INCYDE (obr. 21A a 21B). V posledním případě se jedná o lokalizaci proteinů, které jsou rozdílné po aplikaci tZ a INCYDE (obr. 21C).

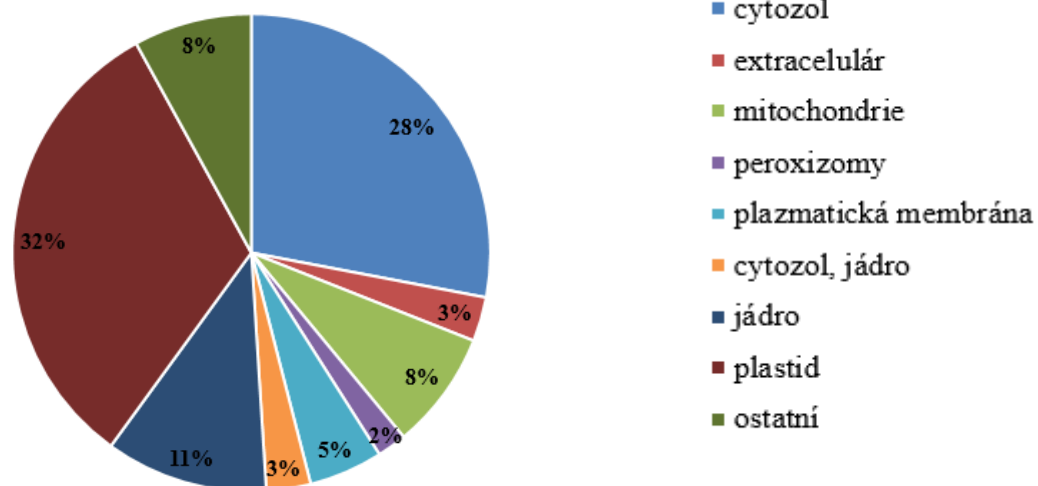
A) *trans*-zeatin



B) INCYDE



C) *trans*-zeatin/INCYDE



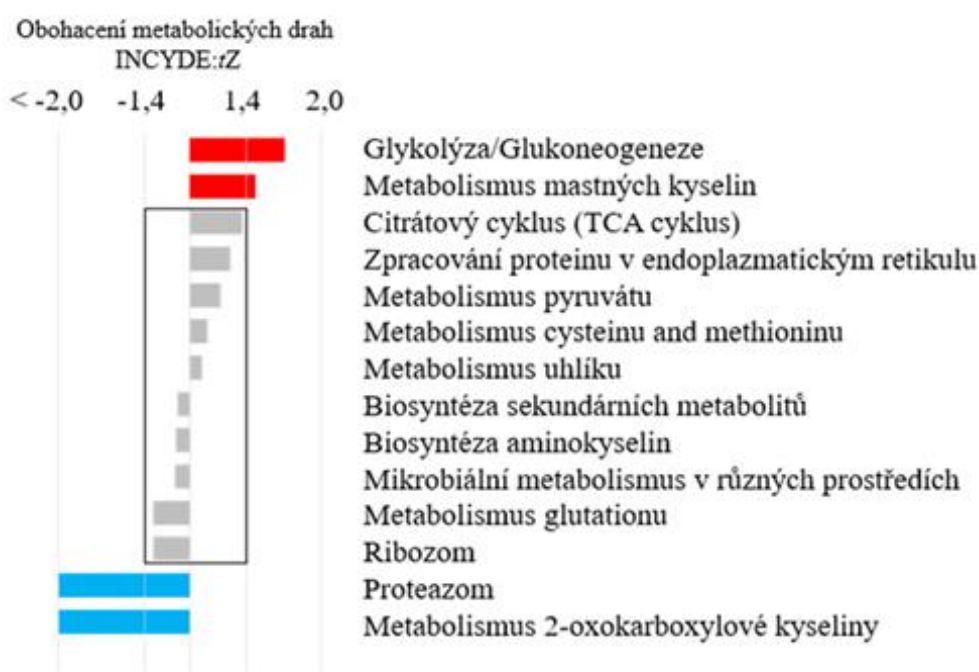
Obr. 21: **Lokalizace identifikovaných proteinů.** A) Abundantní proteiny ošetřené exogenním přidáním tZ. B) Abundantní proteiny ošetřené exogenním přidavkem INCYDE. C) Abundantní proteiny s rozdílnou odpovědí mezi tZ a INCYDE. Lokalizace proteinů byla určena pomocí volně dostupné databáze SUBA (Hooper et al. 2014).

Mezi jednotlivými variantami není významný rozdíl, pouze u proteinů pozměněných v reakci na ošetření INCYDE lze pozorovat dvojnásobné navýšení lokalizací do mitochondrie. Většina proteinů je dle dostupných anotací lokalizována do chloroplastů a na membránu. Toto rozdělení odpovídá odpovědi na ošetření rostlinným hormonem, kdy chloroplasty patří mezi ústřední molekulu v proteomických studiích (Černý et al., 2016).

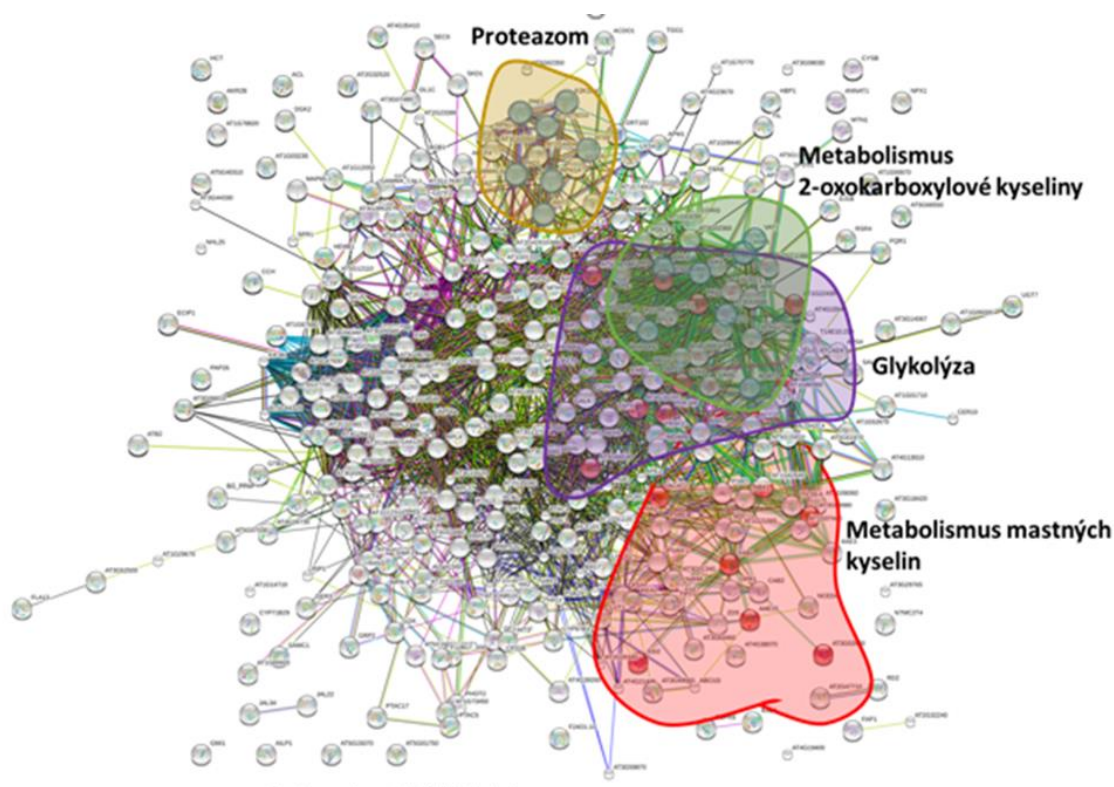
5.9 Přiřazení funkcí k nalezeným proteinům

K určení funkce nalezených proteinů jsme použili znázornění jejich protein-proteinových interakcí v programu STRING 10. Pomocí KEGG drah jsme zjistili jednotlivé metabolické dráhy ovlivněné *tZ* a INCYDE. Celkem bylo identifikováno 42 metabolických drah významně obohacených buď *tZ* nebo INCYDE. Z nich bylo 14 nalezeno alespoň na základě šesti přiřazených proteinů. Jednotlivé kategorie jsou vyznačené na obr. 22A. INCYDE a *tZ* ovlivnily stejným způsobem deset drah, zatímco čtyři dráhy byly INCYDE a *tZ* ovlivněny rozdílně. Zaměřili jsme se především na čtyři dráhy rozdílně ovlivněné *tZ* a INCYDE a ty jsme znázornili pomocí protein-proteinových interakcí do mapy s vyznačenými klastry, do kterých identifikované proteiny spadají (obr. 22B).

A)



B)



Obr. 22: *Porovnání ovlivněných metabolických drah tZ a INCYDE. A) Přehled obohacených metabolických drah tZ a INCYDE. B) Znárodnění protein-proteinových interakcí čtyř metabolických drah, které vykazovaly rozdílné ovlivnění tZ a INCYDE.*

Mechanismus signalizace hormonů je založen na vnímání signálu, jeho indukci a následné reakci. Proteiny hrají v těchto mechanismech klíčovou roli. Jejich činnost je regulována jak reverzibilními vazbami molekul na klíčové enzymy, tak post-translačními modifikacemi (Černý et al., 2016). Histochemické barvení prýtu a kořene ukázalo, že účinek INCYDE a tZ se u kořene a nadzemních částí liší. Lze tedy předpokládat, že v rostlině účinkují odlišně.

Výsledky této analýzy odhalily čtyři oblasti, které jsou ovlivněny těmito látkami odlišně. Glykolýza a metabolismus mastných kyselin byl více ovlivněn tZ, zatímco proteazom a metabolismus 2-oxokarboxylové kyseliny INCYDE.

Jedna z identifikovaných metabolických drah je dráha proteazomu. Bylo prokázáno, že rostliny využívají ubikvitin-proteazomový systém (UPS) pro modulaci téměř všech aspektů vývoje. UPS hraje regulační roli v hormonální oblasti, zejména se aktivně účastní vnímání hormonů, degradaci hormonálně specifických transkripčních faktorů

a regulací biosyntetických hormonů (Santner a Estelle, 2010). V mé bakalářské práci *Vliv modulace hladin cytokininů na fenom a proteom rostlin* jsme testovali u transgenních linií KMD morfometrický parametr délku hlavního kořene (Koukalová, 2015). Proteiny KMD jsou tvořeny komplexem E3 ubikvitin ligázou s komplexem podjednotky ligázy (SKP1)/F-box (SCF). UPC dráha nebyla u INCYDE tak silná v porovnání s *tZ*. Mohlo by to souviset s nižším zastoupením této kategorie při porovnání funkcí proteinů v odpovědi na INCYDE s proteiny nalezenými v reakci na *tZ*. Další oblastí je metabolismus mastných kyselin. Mastné kyseliny hrají zásadní roli v membránové struktuře lipidů všech živých buněk. Navíc mohou také hrát specifické role v metabolických procesech a signalizačních dějích (Graham a Eastmond, 2002).

5.10 Vliv identifikovaných proteinů na fenotyp rostlin

V případě funkčního vyřazení proteinů může dojít k fenotypovému projevu. V této analýze jsme vyhledali proteiny, u kterých byl takový fenotyp nalezen. Vycházeli jsme z proteinů unikátních na *tZ*, INCYDE a proteinů chovajících se na *tZ* a INCYDE opačně (tabulka 2).

Tabulka 2: Přehled identifikovaných proteinů, které po vyřazení z jejich funkce mají vliv na fenotypový projev rostlin. Proteiny byly rozděleny do čtyř oblastí jako je vývoj, fotosyntéza, metabolismus a stres. CK=cytokinin, IN=INCYDE

	unikátní na CK	unikátní na IN	CK a IN opačně
VÝVOJ	AT1G11870 AT1G62640 AT2G20580 AT3G16640 AT3G62910 AT4G25050 AT5G18660 AT5G37510 AT5G39740 AT5G66190	AT1G74960 AT2G01140 AT2G21870 AT3G55360	AT5G19820 AT5G48230
FOTOSYNTÉZA	AT1G15980 AT3G53130 AT4G37925 AT5G53460 AT5G58140		AT2G39470

METABOLISMUS	AT1G62180 AT4G14070 AT5G48300		
STRES		AT5G58070 AT2G43710	

Z hlediska vývoje rostlin je známo, že cytokininy regulují celou řadu růstových a vývojových procesů u rostlin. V případě změny endogenních hladin cytokininů dochází k fenotypovým projevům, kdy snížení hladin endogenních cytokininů způsobuje zpomalení růstu, téměř nedochází k prodlužování hypokotylu, rozměry listů jsou malé a netypických tvarů (Miyawaki et al., 2006; Werner et al., 2001). Naopak zvýšená hladina cytokininů vede k projevu nejrůznějších chloróz, což bylo prokázáno u transgenní linie tabáku (Novák et al., 2013). Proto se hledalo, zda mutace v genu pro identifikované proteiny se projevují něčím, co by pomohlo najít rozdíl v účinku *tZ* a INCYDE. U rostlin, které mají vyřazeny geny kódující proteiny nalezené v odpovědi na *tZ* byly nalezeny především defekty na embryu či samčího/samičího gametofytu (AT2G20580, AT1G11870, AT3G16640, AT3G62910, AT5G37510). Dále fenotypové projevy jako světle zelené listy (AT1G62640, AT4G25050, AT5G18660), krátký hypokotyl (AT5G39740), změna velikosti růžice (AT5G66190). Proteiny unikátní na INCYDE vykazovaly mutantní fenotyp především v defektech embrya a samičím gametofytu (AT1G74960, AT2G01140, AT2G21870) a trpasličím vzrůstu (AT3G55360). Proteiny s opačným chováním na *tZ* a INCYDE vykazovaly defekty ve vývoji embryí (AT5G19820, AT5G48230). U proteinů všech variant byl zaznamenán především defekt embrya, což znamená, že *tZ* i INCYDE ovlivňují proteiny, které jsou důležité pro počáteční vývoj rostlin.

Cytokininy jsou také spojené s rolí ve fotosyntéze. Účastní se procesů správné diferenciaci a vývoje chloroplastů, ovlivňují množství fotosyntetických pigmentů a jejich hromadění, a příznivě ovlivňují fotosyntetické procesy. Kromě toho cytokininy za stresových podmínek udržují strukturu a funkci fotosyntetického aparátu (Cherniad'ev, 2009; Cortleven, et al., 2011; Dobránszki et al., 2014). Proteiny unikátní na *tZ* vykazovaly sníženou či žádnou postiluminizační fluorescenci chlorofylu (AT1G15980, AT4G37925), nízkou hladinu chlorofylu (AT5G53460), nízké hladiny luteinu (AT3G53130) a úplnou ztrátu pohybu chloroplastů v závislosti na světle (AT5G58140). V případě proteinů s opačným chováním na *tZ* a INCYDE byly nalezeny

proteiny způsobující mutantní fenotyp jako je snížení postiluminizační fluorescence chlorofylu (AT2G39470).

Nezastupitelnou roli hrají cytokininy i v metabolických procesech. Cytokininy reagují například na nedostatek síry změnou své genové exprese (Štuříková, 2016). Nízká dostupnost fosfátu vede k zahájení řady reakcí, kdy cytokininy v kořenech tyto reakce potlačují (Franco-Zorrilla et al., 2002). U proteinů unikátních na *tZ* byly identifikovány mutantní fenotypové projevy jako zvýšené hladiny síranů (AT1G62180), redukované ¹⁴C prodloužení mastných kyselin (AT4G14070) s nízká hladina škrobu v listech (AT5G48300).

Jak bylo popsáno v kapitole 3.2.7 *Významné vlastnosti cytokininů*, hrají cytokininy významnou roli při působení biotických a abiotických stresorů. U proteinů unikátních na INCYDE byly nalezeny mutace ve fenotypu jako jsou nekrotické změny a odolnost vůči *Phytophthora parasitica* či citlivost k vysokým teplotám.

Závěrem lze shrnout, že mezi cytokininy a INCYDE není zřetelný rozdíl. Proteom se trochu liší, ale dokumentovaní mutanti nemají projevy, které by od sebe cytokininy s INCYDE rozlišily.

6 ZÁVĚR

Zemědělská produkce se v současné době potýká s celou řadou nepříznivých vlivů, mezi které patří i extrémy počasí. Růst rostlin negativně ovlivňují především sucho a zvyšující se teploty, nedostatek živin či kontaminace půdy. Kromě šlechtění a genetických modifikací se rozvíjí i farmakologické přístupy, které jsou založeny na inhibitoru či aktivátoru biochemických procesů v rostlině. Velmi zajímavých výsledků je dosahováno modulací endogenních hladin rostlinných hormonů cytokininů. Cytokinin v rostlině regulují celou řadu růstových a vývojových procesů od klíčení, vývoje kořene a prýtu, kvetení až po odpovědi na různé biotické a abiotické stresory.

V diplomové práci jsme se zabývali výzkumem farmakologické látky INCYDE, která inhibuje enzym cytokinin oxidáza/dehydrogenáza zapojený v degradaci cytokininů. INCYDE zvyšuje množství endogenních cytokininů a tím vyvolává příčinnou fyziologickou odpověď. V této práci byl srovnán exogenní účinek INCYDE s nejrozšířenějším cytokininem *trans*-zeatinem. Bakteriální a rostlinná esej prokázaly, že je INCYDE silným rostlinným regulátorem, který však může ve vyšších koncentracích aktivovat cytokininové receptory. Významný rozdíl v působení těchto regulátorů je místo účinku. Esej založená na sledování aktivity promotoru genu *ARR5* pomocí exprese genu *uidA* ukázala, že zatímco *trans*-zeatin působí zejména v kořenové části, INCYDE navozoval vysokou aktivitu cytokininové signalizace v oblasti prýtové. Význam INCYDE se ukázal zejména v navození vyšší odolnosti kořene proti působení osmotického stresu vyvolaného osmolytem D-manitolem. Proteomickou analýzou bylo zjištěno, že aplikace *trans*-zeatinu a INCYDE vede k rozdílným změnám v proteomu *Arabidopsis thaliana*, a to zejména v drahách glukoneogeneze, metabolismu mastných kyselin či proteazomu.

Tato práce vznikla s podporou grantu TE02000177 (TAČR) a podpoře MŠMT v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601). Výstupy a výsledky (publikace, BcP, DP, Ph.D., projektu apod.) byly zpracovány na přístrojovém vybavení financovaném z projektu OP VaVpI CZ.1.05/4.1.00/04.0135 Výukové a výzkumné kapacity pro biotechnologické obory a rozšíření infrastruktury.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- 1) AKIYOSHI, D. E., KLEE, H., AMASINO, R. M., NESTER, E. W., GORDON, M. P., 1984: T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(19): 5994-8. ISSN 1091-6490.
- 2) AREMU, A. O., BAIRU, M. W., NOVÁK, O., PLAČKOVÁ, L., ZATLOUKAL, M., DOLEŽAL, K., FINNIE J. F., STRNAD, M., VAN STADEN, J., 2012: Physiological responses and endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured 'Williams' bananas in relation to roscovitine and an inhibitor of cytokinin oxidase/dehydrogenase (INCYDE) treatments. *Planta*, 236(6): 1775-90. ISSN 1432-2048.
- 3) AREMU, A. O., MASONDO, N. A., SUNMONU, T. O., KULKARNI, M. G., ZATLOUKAL, M., SPICHAL, L., DOLEŽAL, K., VAN STADEN, J., 2014: A novel inhibitor of cytokinin degradation (INCYDE) influences the biochemical parameters and photosynthetic apparatus in NaCl-stressed tomato plants. *Planta*, 240(4): 877-889. ISSN 1432-2048.
- 4) ARGYROS, R. D., MATHEWS, D. E., CHIANG, Y. H., PALMER, C. M., THIBAUT, D. M., ETHERIDGE, N., ARGYROS, D. A., MASON, M., G., KIEBER, J. J., SCHALLER, G. E., 2008: Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *The plant cell*, 20(8): 2102-16. ISSN 1532-298X.
- 5) ASHIKARI, M., SAKAKIBARA, H., LIN, S., YAMAMOTO, T., TAKASHI, T., NISHIMURA, A., ANGELES, E. R., QIAN, Q., KITANO, H., MATSUOKA, M., 2005: Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 209(5735): 741-5. ISSN 1095-9203.
- 6) AVALBAEV, A. M., SOMOV, K. A., YULDASHEV, R. A., SHAKIROVA, F. M., 2012: Cytokinin oxidase is key enzyme of cytokinin degradation. *Biochemistry (Moscow)*, 77(12): 1354–1361. ISSN 1608-3040.
- 7) BLACKWELL, J. R., HORGAN, R., 1991: A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS letter*, 295(1-3): 10-2. ISSN 1873-3468.

- 8) BRADFORD, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254. ISSN 1096-0309.
- 9) 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. ISSN 1095-9203.
- 10) CAESAR, K., THAMM, A. M. K., WITTHÖFT, J., ELGASS, K., HUPPENBERGER, P., GREFEN, C., HORAK, J., HARTER, K., 2011: Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, 62(15): 5571–5580. ISSN 1460-2431.
- 11) CORTLEVEN, A., NOBEN, J. P., VALCKE, R., 2011: Analysis of the photosynthetic apparatus in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: a proteomic study. *Proteome Science*, 9(1): 33. ISSN 1477-5956.
- 12) COX, J. and MANN, M., 2008: MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12): 1367-72. ISSN 1546-1696.
- 13) ČERNÝ, M., JEDELSKÝ, P. L., NOVÁK, J., SCHLOSSER, A., BRZOBOHATÝ, B., 2014: Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*, 37(7): 1641-1655. ISSN 1365-3040.
- 14) ČERNÝ, M., NOVÁK, J., HABÁNOVÁ, H., ČERNÁ, H., BRZOBOHATÝ, B., 2016: Role of the proteome in phytohormonal signaling. *Biochimica et biophysica acta*, 1864(8): 1003-15. ISSN 0925-4439.
- 15) DAS, P. K., SHIN, D. H., CHOI, S. B., YOO, S. D., CHOI, G., PARK, Y. I., 2012: Cytokinins enhance sugar-induced anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Molecules and cells*, 34(1): 93-101. ISSN 0219-1032.
- 16) DAVIES, P. J., 2004: Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action! Dordrecht: Springer. ISBN 978-1402026850.
- 17) DE MEUTTER, J., TYTGAT, T., WITTERS, E., GHEYSEN, G., VAN ONCKELEN, H., GHEYSEN, G., 2003: Identification of cytokinins produced

- by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Molecular plant pathology*, 4(4): 271-7. ISSN 1364-3703.
- 18) DEIKMAN, J., HAMMER, P. E., 1995: Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 108(1): 47-57. ISSN 1532-2548.
- 19) DOBRÁNSZKI, J., MENDLER-DRIENYOVSZKI, N., 2014: Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. *Journal of Plant Physiology*, 171(16): 1472–1478. ISSN 0176-1617.
- 20) ENTSCH, B., LETHAM, D. S., 1979: Enzymic glycosylation of the cytokinin 6-benzylaminopurine. *Plant Science Letters*, 14: 205–212. ISSN 0304-4211.
- 21) 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: 124-139. ISSN 1365-3040.
- 22) FRANCO-ZORRILLA, J. M., MARTIN, A. C., SOLANO, R., RUBIO, V., LEYVA, A., PAZ-ARES, J., 2002: Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *The plant journal*, 32(3): 353-60. ISSN 1365-313X.
- 23) 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. ISSN 1460-2431.
- 24) FRÉBORTOVÁ, J., NOVÁK, O., FRÉBORT, I., JORDA, R., 2010: Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *The Plant journal*, 61(3): 467-81. ISSN 1365-313X.
- 25) GAJDOŠOVÁ, S., SPÍCHAL, L., KAMÍNEK, M., HOYEROVÁ, K., NOVÁK, O., DOBREV, P. I., GALUSZKA, P., KLÍMA, P., GAUDINOVÁ, A., ZIZKOVÁ, E., HANUS, J., DANCÁK, M., TRÁVNÍČEK, B., PESEK, B., KRUPICKA, M., VANKOVA, 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): 2827-40. ISSN 1460-2431.

- 26) GALUSZKA, P., POPELKOVÁ, H., WERNER, T., FRÉBORTOVÁ, J., POSPÍŠILOVÁ, H., MIK, V., KÖLLMER, I., SCHMÜLLING, T., FRÉBORT, I., 2007: Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* xpressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regular*, 26:255-267. ISSN 1435-8107.
- 27) GALUSZKA, P., SPÍCHAL, L., KOPEČNÝ, D., TARKOWSKI, P., FRÉBORTOVÁ, J., ŠEBELA, M., FRÉBORT, I., 2008: Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. *Natural Products Chemistry*, 34: 203-264. ISSN 2329-6836.
- 28) GAN, S., AMASINO, R. M., 1995: Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Sciense*, 270(5244): 1986-8. ISSN 1095-9203.
- 29) GASPAR, T., KEVERS, C., PENEL, C., CREPPIN, H., REID, D. M., THORPE, T. A., 1996: Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 32: 272-289. ISSN 1475-2689.
- 30) GE, L., YONG, J. W. H., TAN, S. N., YANG, X. H., ONG, E. S., 2005: Analysis of positional isomers of hydroxylated aromatic cytokinins by micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 26(9): 1768-77. ISSN 1522-2683.
- 31) GEMROTOVÁ, M., KULKARNI, M. G., STIRK, W. A., STRNAD, M., VAN STADEN, J., SPÍCHAL, L., 2013: Seedlings of medicinal plants treated with either a cytokinin antagonist (PI-55) or an inhibitor of cytokinin degradation (INCYDE) are protected against the negative effects of cadmium. *Plant Growth Regulation*, 71(2): 137-145. ISSN 1573-5087.
- 32) GRAHAM, I. A., EASTMOND, P. J., 2002: Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Progress in lipid research*, 41(2): 156-81. ISSN 0163-7827.
- 33) HABERLANDT, G., 1913: Zur physiologie der zellteilung. *Sitzungsber Akad Wiss Berlin Phys Math*: 318-345. ISSN 0233-0954.
- 34) HARTIG, K., BECK, E., 2005: Assessment of lovastatin application as tool in probing cytokinin-mediated cell cycle regulation. *Physiologia Plantarum*, 125: 260-267. ISSN 1399-3054.

- 35) HAY, A., CRAFT, J., TSIANTIS, M., 2004: Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? *BioEssays*, 26(4): 395-404. ISSN 1521-1878.
- 36) HEYL, A., SCHMÜLLING, T., 2003: Cytokinin signal perception and transduction. *Current opinion in plant biology*, 6(5): 480-8. ISSN 1369-5266.
- 37) HIROSE, N., TAKEI, K., KUROHA, T., KAMADA-NOBUSADA, T., HAYASHI, H., SAKAKIBARA, H., 2008: Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 59(1): 75–83. ISSN 1460-2431.
- 38) HOOPER, C. M., TANZ, S. K., CASTLEDEN, I., VACHER, M., SMALL, I., MILLAR, A. H., 2014: SUBAcon: a consensus algorithm for unifying the subcellular localization data of the *Arabidopsis* proteome. *Bioinformatics*, 30(23): 3356-64. ISSN 1367-4811.
- 39) HOU, B., LIM, E. K., HIGGINS, G. S., BOWLES, D. J., 2004: N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry*, 279(46): 47822-32. ISSN 1083-351X.
- 40) HWANG, I., SHEEN, J., 2001: Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, 413(6854): 383-9. ISSN 1476-4687.
- 41) CHERNIAD'EV, I. I., 2009: The protective action of cytokinins on the photosynthetic apparatus and productivity of plants under stress (review). *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 45(4):389-402. ISSN 0555-1099.
- 42) INOUE, T., HIQUCHI, M., HASHIMOTO, Y., SEKI, M., KOBAYASHI, M., KATO, T., TABATA, S., SHINOZAKI, K., KAKIMOTO, T., 2001: Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, 409(6823): 1060-3. ISSN 1476-4687.
- 43) JEON, J., KIM, N. Y., KIM, S., KANG, N. Y., NOVÁK, O., KU, S. J., CHO, C., LEE, D. J., LEE, E. J., STRNAD, M., KIM, J., 2010: A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry*, 285(30): 23371-86. ISSN 1083-351X.
- 44) KAKIMOTO, T., 1996: CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 274(5289): 982-5. ISSN 1095-9203.
- 45) KAMADA-NOBUSADA, T., SAKAKIBARA, H., 2009: Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 70(4): 444-9. ISSN 0031-9422.

- 46) KIEBER, J. J., SCHALLER, G. E., 2014: Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, 12, <http://doi.org/10.1199/tab.0168>. ISSN: 1543-8120.
- 47) KIM, H. J., CHIANG, Y-H., KIEBER, J. J., SCHALLER, G. E., 2013: SCF^{KMD} controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24): 100028-33. ISSN 1091-6490.
- 48) KOUKALOVÁ, V., 2015: Vliv modulace cytokininů na fenom a proteom rostlin. Brno, Bakalářská práce (nepubl., dep. knihovna Mendelovy univerzity v Brně). Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav molekulární biologie a radiobiologie. Vedoucí práce Mgr. Jan Novák, Ph.D.
- 49) KRALL, L., RASCHKE, M., ZENK, M. H., BARON, C., 2002: The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS letters*, 527(1-3): 315-8. ISSN 1873-3468.
- 50) KURAKAWA, T., UEDA, N., MAEKAWA, M., KOBAYASHI, K., KOJIMA, M., NAGATO, Y., SAKAKIBARA, H., KYOZUKA, J., 2007: Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 445(7128): 652-5. ISSN 1476-4687.
- 51) KUROHA, T., TOKUNAGA, H., KOJIMA, M., UEDA, N., ISHIDA, T., NAGAWA, S., FUKUDA, H., SUQIMOTO, K., SAKAKIBARA, H., 2009: Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 21(10): 3152-69. ISSN 1532-298X.
- 52) LETHAM, D.S., 1963: Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life sciences*, 2(8): 569-573. ISSN 0024-3205.
- 53) LOMIN, S. N., YONEKURA-SAKAKIBARA, K., ROMANOV, G. A., SAKAKIBARA, H., 2011: Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *Journal of Experimental Botany*, 62(14): 5149-59. ISSN 1460-2431.
- 54) MALITO, E., CODA, A., BILYEU, K. D., FRAAIJE, M. W., MATTEVI, A., 2004: Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *Journal of molecular biology*, 341(5): 1237-49. ISSN 0022-2836.

- 55) MASON, M. G., MATHEWS, D. E., ARGYROS, D. A., MAXWELL, B. B., KIEBER, J. J., ALONSO, J. M., ECKER, J. R., SCHALLER, G. E., 2005: Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *The plant cell*, 17(11): 3007-3018. ISSN 1532-298X.
- 56) MCCABE, M. S., GARRATT, L. C., SCHEPERS, F., JORDI, W. J. R. M., STOOPEN, G. M., DAVELAAR, E., RHIJN, J. H. A. V. R., POWER, J. B., DAVEY, M. R., 2001: Effects of PSAG12-IPT Gene Expression on Development and Senescence in Transgenic Lettuce. *Plant Physiology*, 127(2): 505-516. ISSN 1532-2548.
- 57) MEHRTENS, F., KRANZ, H., BEDNAREK, P., WEISSHAAR, B., 2005: The *Arabidopsis* Transcription Factor MYB12 Is a Flavonol-Specific Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 138(2): 1083-1096. ISSN 1532-2548.
- 58) MILLER, C. O., SKOOG, F., OKUMURA, F. S., VON SALTRA, M. H., STRONG, F. M., 1955: Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society*, 77(9): 2662-2663. ISSN 1520-5126.
- 59) 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. *The plant journal*, 37(1): 128-38. ISSN: 1365-313X.
- 60) 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 of Sciences*, 103(44): 16598-16603. ISSN 1091-6490.
- 61) MIZUNO, T., YAMASHINO, T., 2010: Biochemical characterization of plant hormone cytokinin-receptor histidine kinases using microorganisms. *Methods in enzymology*, 471: 335-56. ISSN 0076-6879.
- 62) MOK, D. W. S., MOK, M. C., 2001: Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 52: 89-118. ISSN 1040-2519.
- 63) MURAI, N., 2014: Review: Plant growth hormone cytokinins control the crop seed yield. *American Journal of Plant Sciences*, 5(14): 2178-2187. ISSN 1091-6490.

- 64) NAKAMURA, N., NAKAMAE, H., MAEKAWA, S., 1980: Effects of Light and Kinetin on Anthocyanin Accumulation in the Petals of *Rosa hybrida*, Hort cv. Ehigasa. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 98(3): 263-270. ISSN 0044-328X.
- 65) NISLER, J., ZATLOUKAL, M., POPA, I., DOLEZAL, K., STRNAD, M., SPÍČHAL, L., 2010: Cytokinin receptor antagonists derived from 6-benzylaminopurine. *Phytochemistry*, 71(7): 823-30. ISSN 0031-9422.
- 66) NOVÁK, J., PAVLŮ, J., NOVÁK, O., NOŽKOVÁ-HLAVÁČKOVÁ, V., ŠPUNDOVÁ, M., HLAVINKA, J., KOUKALOVÁ, Š., SKALÁK, J., ČERNÝ, M., BRZOBOHATÝ B., 2013: High cytokinin levels induce a hypersensitive-like response in tobacco. *Annals of Botany*, 112: 41-55. ISSN 1095-8290.
- 67) PAČES, V., WERSTIUK, E., HALL R. H., 1971: Conversion of N6-(Δ^2 -isopentenyl) adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology*, 48: 775–778. ISSN 1532-2548.
- 68) PODLEŠÁKOVÁ, K., TARKOWSKÁ, D., PĚNČÍK, A., OKLEŠŤKOVÁ, J., TUREČKOVÁ, V., FLOKOVÁ, K., TARKOWSKI, P., 2012: Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chemické listy*, 106: 373-379. ISSN 1213-7103.
- 69) POGÁNY, M., KOEHL, J., HEISER, I., ELSTNER, E. F., BARNA, B., 2004: Juvenility of tobacco induced by cytokinin gene introduction decreases susceptibility to Tobacco necrosis virus and confers tolerance to oxidative stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(1): 39-47. ISSN 0885-5765.
- 70) PROCHÁZKA, S. a kol., 1998: Fyziologie rostlin. Praha: Academia, 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
- 71) RASHOTTE, A. M., MASON, M. G., HUTCHISON, C. E., FERREIRA, J. F., SCHALLER, G. E., KIEBER, J. J., 2006: A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29): 11081-11085. ISSN 1091-6490.
- 72) RIVERO, R. M., KOJIMA, M., GEPSTEIN, A., SAKAKIBARA, H., MITTLER, R., GEPSTEIN, S., BLUMWALD, E., 2007: Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49): 19631–19636. ISSN 1091-6490.

- 73) ROMANOV, G.A., LOMIN, S. N., SCHMÜLLING, T., 2006: Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany*, 57(15): 4051-8. ISSN 1460-2431.
- 74) SAKAKIBARA, H., 2005: Cytokinin biosynthesis and regulation. *Vitamins & Hormones*, 72: 271-87. ISSN 0083-6729.
- 75) SAKAKIBARA, H., 2006: Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 431–449. ISSN 1543-5008.
- 76) SAKAKIBARA, H., KASAHARA, H., UEDA, N., KOJIMA, M., TAKEI, K., HISHIYAMA, S., ASAMI, T., OKADA, K., KAMIYA, Y., YAMAYA, T., YAMAQUCHI, S., 2005: *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28): 9972-7. ISSN 1091-6490.
- 77) SANTNER, A., CALDERON-VILLALOBOS, L. I. A., ESTELLE, M., 2009: Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology*. ISSN 1552-4469.
- 78) SANTNER, A., ESTELLE, M., 2010: The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *The plant journal*, 61(6): 1029-40. ISSN 1365-313X.
- 79) SCHALLER, G. E., BISHOPP, A., KIEBER, J. J., 2015: The Yin-Yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell*, 27(1): 44-63. ISSN 1532-298X.
- 80) SCHMÜLLING, T., WERNER, T., RIEFLER, M., KRUPKOVÁ, E., BARTRINA Y MANNIS, I., 2003: Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of plant research*, 116(3): 241-52. ISSN 1618-0860.
- 81) SPÍČHAL, L., 2011: Bacterial assay to study plant sensor histidine kinases. *Methods in molecular biology*, 779: 139-47. ISSN 1064-3745.
- 82) SPÍČHAL, L., 2012: Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*, 39(4): 267–284. ISSN 1445-4416.
- 83) SPÍČHAL, L., RAKOVA, N. Y., RIEFLER, M., MIZUNO, T., ROMANOV, G. A., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T., 2004: Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity

- in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology*, 45(9): 1299-1305. ISSN 1471-9053.
- 84) SPÍČHAL, L., WERNER, T., POPA, I., RIEFLER, M., SCHMÜLLING, T., STRNAD, M., 2009: The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition. *The FEBS journal*, 276(1): 244-53. ISSN 1742-4658.
- 85) STUDIER, F. W., 2005: Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification*, 41(1): 207-34. ISSN 1096-0279.
- 86) ŠTUŘÍKOVÁ, H., 2016: *Role cytokininů v regulaci odpovědi na nedostatek síry u Arabidopsis thaliana*. Brno, Diplomová práce (nepubl., dep. knihovna Mendelovy univerzity v Brně). Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav molekulární biologie a radiobiologie. Vedoucí práce Mgr. Jaroslav Pavlů.
- 87) TAIZ, L., ZEIGER, E., 2010: *Plant physiology*. 5. vyd. Sunderland: Sinauer Associated, str.782. ISBN 978-0-87893-565-9.
- 88) TAKEI, K., UEDA, N., AOKI, K., KUROMORI, T., HIRAYAMA, T., SHINOZAKI, K., YAMAYA, T., SAKAKIBARA, H., 2004: AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 45(8): 1053-62. ISSN 1471-9053.
- 89) TAKEI, K., YAMAYA, T., SAKAKIBARA, H., 2004: *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-Zeatin. *The Journal of biological chemistry*, 279(40): 41866-72. ISSN 1083-351X.
- 90) TAYA, Y., TANAKA, Y., NISHIMURA, S., 1978: 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 271(5645): 545-7. ISSN 1476-4687.
- 91) TO, J. P. C., KIEBER, J. J., 2008: Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science*, 13(2): 85–92. ISSN 1360-1385.
- 92) TRAN, L. S., URAO, T., QIN, F., MARUYAMA, K., KAKIMOTO, T., SHINOZAKI, K., YAMAQUCHI-SHINOZAKI, K., 2007: Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51): 20623-8. ISSN 1091-6490.

- 93) WERNER, T., KÖLLMER, I., BARTRINA, I., HOLST, K., SCHMÜLLING, T., 2006: New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant biology*, 8(3): 381-81. ISSN 1438-8677.
- 94) WERNER, T., MOTYKA, V., LAUCOU, V., SMETS, R., VAN ONCKELEN, H., SCHMULLING, T. 2003: Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15(11): 2532-50. ISSN 1532-298X.
- 95) WERNER, T., MOTYKA, V., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T., 2001: Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18): 10487-10492. ISSN 1091-6490.
- 96) WHITE, P. R., 1934: Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology*, 9(3): 585-600. ISSN 1532-2548.
- 97) WHITTY, C. D., HALL, R. H., 1974: A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian journal of biochemistry*, 52(9): 789-99. ISSN 0008-4018.
- 98) YARONSKAYA, E., VERSHILOVSKAYA, I., POERS, Y., ALAWADY, A. E., AVERINA, N., GRIMM, B., 2006: Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. *Planta*, 224(3): 700-9. ISSN 1432-2048.
- 99) YOKOYAMA, A., YAMASHINO, T., AMANO, Y., TAJIMA, Y., IMAMURA, A., SAKAKIBARA, H., MIZUNO, T., 2007: Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology*, 48(1): 84-96. ISSN 1471-9053.
- 100) ZALABÁK, D., POSPÍŠILOVÁ, H., ŠMEHILOVÁ, M., MRÍZOVÁ, K., FRÉBORT, I., GALUSZKA, P., 2013: Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnology Advances*, 31: 97-117. ISSN 0734-9750.
- 101) ZATLOUKAL, M., GEMROTOVÁ, M., DOLEŽAL, K., HAVLÍČEK, L., SPÍCHAL, L., A STRNAD, M., 2008: Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(20): 9268–9275. ISSN 0960-894X.

- 102) ZÜRCHER, E., LIU, J., DI DONATO, M., GEISLER, M., MÜLLER, B.
2016: Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science*, 353(6303):1027-1030. ISSN 1095-9203.

8 SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
ADP	adenosindifosfát
AHP	<i>Arabidopsis</i> histidin fosfo-transferový protein
AMP	adenosinmonofosfát
APT	adenin fosforibosyltransferáza
ARR	regulátor odpovědi u <i>Arabidopsis</i>
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosintrifosfát
BA	benzyladenin
CKX	cytokinin oxidáza/dehydrogenáza
CRF	tTranskripční faktor
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
ddH ₂ O	deionizovaná voda
DMAPP	dimethylallyl pyrofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DPU	difenylmočovina
DZ	dihydrozeatin
ER	endoplazmatické retikulum
ESI	electrospray ionization (ionizace elektrosprejem)
FA	kyselina mravenčí
F-BOX	podjednotka ligázy 3
His	histidin
HKADK	histidin kinázaadenosin kináza
HMBDP	1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-difosfát
HPt	histidin fosfo-transferový protein
INCYDE	2-chloro-6-(3-methoxyphenyl)aminopurin
iP	isopentenyladenin
iPRDP	isopentenyladenosine-5'-difosfát
iPRTP	isopentenyladenosine-5'-trifosfát
IPT	isopentenyltransferáza
KMD	KISS ME DEADLY

LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou chromatografií
LOG	enzym fosfohydorrriboláza (LONELY GUY)
m/z	poměr hmotnosti a náboje
memT	methoxy deriváty meta-topolinu
meoT	methoxy deriváty ortho-topolinu
MEP	metylerytritolfosfátová dráha
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
mT	meta-topolin
MVA	mevalonátová dráha
NO	oxid dusnatý
oT	ortho-topolin
RR	regulátor odpovědi
SDS	dodecylsírán sodný
TCA	kyselina trichloroctová
tRNA-IPT	tRNA-isopentenyltransferáza
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
UPS	ubikvitin-proteazomový systém

9 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tab. 1: Chemická struktura 6-furfuryladeninu (kinetin)

Tab. 2: Chemická struktura isoprenoidních cytokininů

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Chemická struktura 6-furfuryladeninu (kinetin)
- Obr. 2: Chemická struktura isoprenoidních cytokininů
- Obr. 3: Chemická struktura aromatických cytokininů
- Obr. 4: Model biosyntézy cytokininů
- Obr. 5: Reakce katalyzovaná enzymem CKX.
- Obr. 6: Struktura CKX monomeru u kukuřice
- Obr. 7: Znázornění dvousložkového fosfotransferového systému.
- Obr. 8: Model cytokininové signalizace a buněčné distribuce biosyntetických a degradujících cytokininů
- Obr. 9: Strukturní vzorec 2-chloro-6-(3-methoxyphenyl)aminopurin (INCYDE)
- Obr. 10: Aktivace receptoru cytokininů CRE1/AHK4 po aplikaci růstových regulátorů.
- Obr. 11: Délka hlavního kořene po aplikaci *tZ* a INCYDE v různých koncentracích.
- Obr. 12: Genová exprese CKX u klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana*
- Obr. 13: Výsledky šestihodinového histochemického barvení 7denních klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana*
- Obr. 14: Výsledky osmihodinového histochemického barvení 14denních klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana*
- Obr. 15: Délka hlavního kořene v transgenní linii vybraných mutantů ARR typu B u *Arabidopsis thaliana* s pozadím Columbia
- Obr. 16: Hladina antokyanů u rostlin s modifikovanou cytokininovou signalizací u transgenní linie KMD
- Obr. 17: Vliv *tZ* a INCYDEu na délku hlavního kořene 7 a 14denních rostlin při simulaci sucha.
- Obr. 18: Vliv *tZ* a INCYDEu na obsah listové plochy 7 a 14denních rostlin při simulaci sucha.
- Obr. 19: Jednotlivé kroky přípravy vzorků pro LC-MS analýzu
- Obr. 20: Účinek INCYDE a *tZ* na proteom *Arabidopsis thaliana*
- Obr. 21: Lokalizace identifikovaných proteinů.
- Obr. 22: Porovnání ovlivněných metabolických drah *tZ* a INCYDE