

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Profilování cytokininů bakterie *Rhodococcus fascians*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Černochová Lucie
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph. D.
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce. Experimentální část práce byla realizována v Centru regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum (Centrální laboratoře a podpora výzkumu).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lucie Černochová
Název práce	Profilování cytokininů bakterie <i>Rhodococcus fascians</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Teoretická část této bakalářské práce se věnuje rostlinným hormonům, zejména cytokininům. Tato skupina fytohormonů ovlivňuje řadu vývojových procesů u rostlin, ale uplatňují se i při interakci rostlina-pathogen. Experimentální část je zaměřena na stanovení profilů klasických cytokininů i jejich 2-methylthio derivátů v kultivačních mediích pěti vybraných kmenů fytopathogenní bakterie *Rhodococcus fascians*. Profily klasických cytokininů byly stanoveny UHPLC-MS/MS. Profily 2-methylthio derivátů cytokininů byly stanoveny pomocí zdokonalené UHPLC-MS/MS metody. Oproti původní metodě, byly zkráceny retenční časy a zvýšeno rozlišení kritických párů. Ačkoli námi stanovené cytokininové profily zcela nekorrespondují s dříve publikovanými výsledky, poměry jednotlivých cytokininů jsou mezi jednotlivými bakteriálními kmeny zachovány.

Klíčová slova	cytokininy, interakce rostlina-pathogen, <i>Rhodococcus fascians</i> , ultra-účinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	69
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Lucie Černochová
Title	Profiling of cytokinins from bacteria <i>Rhodococcus fascians</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2015

Abstract

Theoretic part of this bachelor thesis deals to the plant hormones, particularly cytokinins. This group of phytohormones effects a variety of developmental processes in plants, but they are also included in the interaction plant-pathogen. Experimental part is focused on determination of cytokinins and their 2-methylthio profiles in cultivation medium of five strains of phytopathogenic bacteria *Rhodococcus fascians*. Profiles of cytokinins were determine by UHPLC-MS/MS. Profiles of 2-methylthio derivatives were determine by improved UHPL-MS/MS method. Beside the original method, there were shorten retention times and resolution increased. Although our profiles does not fully correspond with previosly published results, the ratios of cytokinins between individual bacterial strains preserved.

Keywords	cytokinins, interaction plant-pathogen, <i>Rhodococcus fascians</i> , ultra-performance liquid chromatography, mass spectrometry
Number of pages	69
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 ÚVOD.....	8
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1.1 Auxiny.....	9
2.1.2. Cytokininy.....	11
2.1.3. Gibbereliny.....	13
2.1.4. Kyselina abscisová	13
2.1.5. Brassinosteroidy	14
2.1.5. Jasmonáty.....	15
2.1.6. Ethylen	16
2.2 Cytokininy s isoprenoidním postranním řetězcem.....	18
2.2.1 Biosyntéza ve vyšších rostlinách	18
2.2.2 Metabolismus	19
2.2.3 Transport	20
2.3 Analýza cytokininů	23
2.3.1 Metody přípravy vzorku	23
2.3.2 Techniky analýzy cytokininů.....	24
2.4 Pathogenní bakterie rostlin.....	28
2.4.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	29
2.4.2. Fytopathogenní druhy bakterií čeledi <i>Streptomyces</i>	30
2.4.3. <i>Pseudomonas syringae</i>	32
2.5 <i>Rhodococcus fascians</i>	35
2.5.1 <i>Rhodococcus fascians</i> a jeho vliv na produkci okrasných rostlin	35
2.5.2 Molekulární podstata vzniku nádorových buněk	37
2.5.3 Geny <i>fas</i> operonu	37
2.5.3 <i>Fas</i> operon a produkce cytokininů	39
2.6 2-methylthio deriváty cytokininů	42
2.6.1 Biosyntéza 2MeS derivátů cytokininů.....	43
2.6.2 Analýza 2MeS derivátů cytokininů	44
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
3.1 Chemikálie	45
3.2 Použité přístroje a materiály.....	45
3.3 Metody.....	47
3.3.1 Kultivace kmenů <i>Rhodococcus fascians</i>	47
3.3.2 Indukce produkce cytokininů bakteriálními kmeny <i>Rhodococcus fascians</i>	47
3.3.3 SPE purifikace.....	48
3.3.4 Příprava standardů 2-methylthio derivátů cytokininů.....	49
3.5 Příprava kalibrační řady 2Me-S derivátů cytokininů	50
3.6 Kvantitativní UHPLC-MS analýza klasických cytokininů	51
5 ZÁVĚR.....	53
6 LITERATURA	54
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	61

Cíle práce

Vypracování literární rešerše s klíčovými slovy: cytokininy, biosyntéza a metabolismus cytokininů, *Rhodococcus fascians*, interakce rostlina-pathogen.

Pomocí LC-MS/MS zjistit profil klasických cytokininů a jejich 2-methylthio derivátů v pěti vybraných liniích *Rhodococcus fascians*.

1 ÚVOD

Pěstování kulturních plodin a okrasných rostlin je dnes velmi atraktivním, ale i náročným procesem, který pěstitelům přináší mnohá uskalí. Zahradník musí mít kvalitní půdu, zajistit dostatečnou závlahu a mít k dispozici kvalitní rostlinný materiál, který bude moci dále tozmnožovat. Plodiny jsou velmi často vystavovány stresovým faktorům, mezi které můžeme zařadit zasolenou půdu, nedostatek světla nebo působení fytopathogenních bakterií. Jedním z pathogenů je *Rhodococcus fascians*, který způsobuje nádory na listech, tím znehodnocuje rostlinu a je příčinou ekonomických problémů (Pertry *et al.*, 2009b).

Fytopathogen *Rhodococcus fascians* napadá hostitelský rostlinný organismus pomocí produkce cytokininů, kterou umožňuje plasmid jehož součástí je fas operon. V tomto operonu jsou kódovány enzymy nezbytné pro biosyntézu cytokininů. Zároveň je tento bakteriální kmen schopen produkovat 2-methylthio deriváty cytokininů (Pertry *et al.*, 2010). Cytokininy i jejich 2-methylthio deriváty, produkované bakteriálními liniemi *Rhodococcus fascians*, lze analyzovat pomocí ultra-vysoko účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (Tarkowski *et al.*, 2010).

Analýzou cytokininů a jejich 2-methylthio derivátů lze stanovit cytokininové profily, dle kterých je možné do detailu prozkoumat fas operon a přesně specifikovat funkce dosud neobjasněné.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Rostlinné hormony

Fytohormony jsou nedílnou součástí rostlinného vývoje a růstu. Faktory ovlivňující životní pochody rostlinného organismu obecně rozdělujeme na vnější a vnitřní. Mezi vnější faktory ovlivňující růst a vývoj patří světlo, dostupnost CO₂, H₂O a dalších esenciálních minerálních látek. Rostlinné hormony naopak řadíme do vnitřních faktorů, jejichž působení ovlivňuje mnohé růstové a vývojové procesy.

Do těchto procesů patří prodlužování buněk, buněčné dělení, diferenciací tkání a apikální dominance, ovlivňovaná zejména auxiny (Costacurta a Vanderleyden, 1995). Cytokininy, deriváty adeninu, jsou společně s auxiny zahrnuty do procesu senescence a rovnovážného růstu kořenů a prýtů (Sakakibara, 2006). Gibereliny, které obsahují ve své struktuře terpenoidy, jsou nezbytné pro klíčení semen, prodlužování stonku a kvetení (Fleet and Sun, 2005). Kyselina abscisová reguluje opad listů, stárnutí, inhibici růstu a vegetační klid pupenů (Sondheimer *et al.*, 1968). Další skupinou fytohormonů jsou brassinosteroidy, které ovlivňují kvetení, senescenci a zrání. Jasmonáty se naopak vyznačují inhibiční funkcí. Jediným plynným rostlinným hormonem je ethylen podílející se na diferenciaci pohlaví, zrání a stárnutí rostlinného organismu.

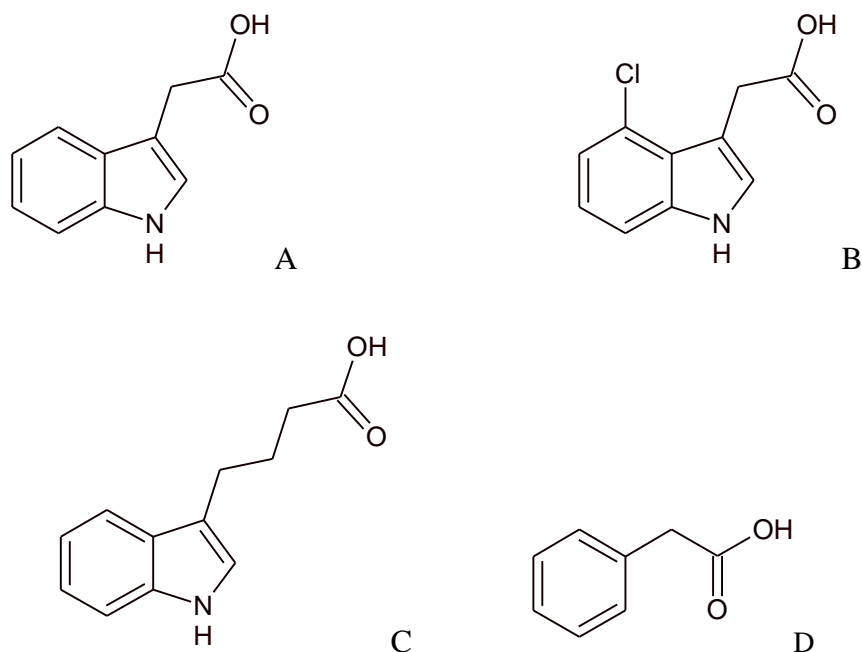
Z historického pohledu byly rostlinné hormony vnímány jako součást signálních drah, které vyvolávají odpověď rostlinného organismu na různé podněty. Dnes se na fytohormony díváme jako na nedílnou součást komplexu signálních drah. Tyto dráhy následně napomáhají expresi odpovědi na stres, který může být způsoben suchem, poraněním, napadením rostliny patogenem nebo hmyzem (Schmelz *et al.*, 2003).

2.1.1 Auxiny

Auxiny se společně s cytokininy uplatňují v mnoha stádiích rostlinného růstu a vývoje, jako je například prodlužování buněk, buněčné dělení, diferenciací tkání a apikální dominance (Costacurta a Vanderleyden, 1995). Kromě těchto účinků auxiny významně ovlivňují fototropismus a gravitropismus, stavbu hlavních a postranních kořenů, organogenezi, vývoj cévních svazků a růst v tkáňové kultuře (Davies P. J., 1995).

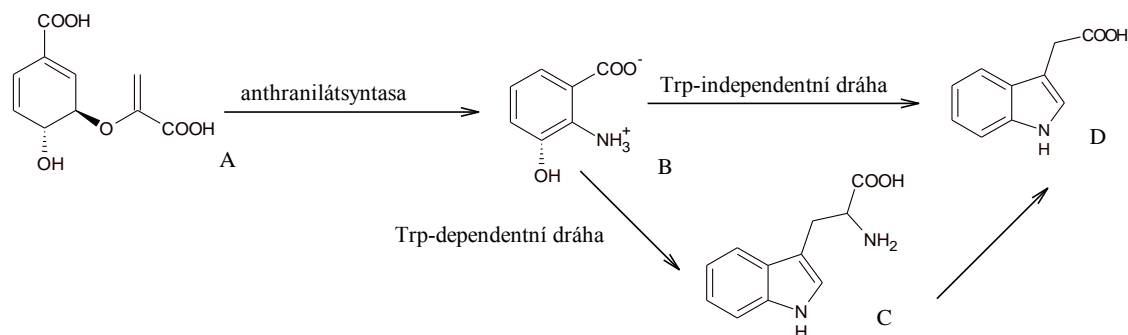
Za nejvýznamnější auxin je považována kyselina indol-3-octová (IAA) (Obr. 1), která bývá označována jako heteroauxin. IAA je v rostlinném organismu biologicky aktivní v nanomolární koncentraci. V několika rostlinných druzích byla objevena 4-

chlor-indol-3-octová kyselina (4-Cl-IAA), která taktéž vykazuje biologickou aktivitu. Do skupiny auxinů dále řadíme kyselinu fenyloctovou (PAA). Biologickou aktivitu vykazují i prekurzory biosyntézy auxinů, kam řadíme indol-3-acetonitril nebo indol-3-pyrohroznovou kyselinu (Woodward a Bartel, 2005).



Obr. 1: Strukturní vzorce auxinů – IAA (A), 4-Cl-IAA (B), IBA (C), PAA (D)

IAA je syntetizována v listech, děložních lístcích a kořenech, ale nejvyšší biosyntetickou kapacitu mají mladé listy (Ljung *et al*, 2001). Rostliny mohou syntetizovat IAA z tryptofanu dvěma biosyntetickými drahami. Jedna z nich se nazývá tryptofan-dependentní a druhá dráha je naopak tryptofan-independentní (Obr. 2). Prekurzorem obou těchto drah je chorismát, který je enzymaticky převáděn na antranilát. Antranilát je pak metabolizován tryptofan-dependentní drahou na tryptofan a pak dále na IAA. Druhou možností je uplatnění enzymů tryptofan-independentní dráhy, při jejichž působení je výsledkem také IAA (Woodward a Bartel, 2005).



Obr. 2: Výňatek z biosyntetických drah kyseliny indol-3-octové. Jednotlivé meziprodukty - chorismát (A), anthranilát (B), tryptofan (C) a IAA (D) (převzato z Ljung, 2005)

Vyšší rostliny mohou IAA skladovat ve formě konjugátů nebo indol-3-máselné kyseliny (IBA), která může být hydrolyzována nebo oxidována pomocí β -oxidace na IAA. IAA může být esterově vázána na sacharidové zbytky nebo amidově vázána na aminokyseliny a peptidy. Mezi funkce těchto konjugátů patří skladování, transport a ochrana proti oxidativní degradaci (Cohen a Bandurski, 1982). Některé rostlinné druhy skladují konjugáty IAA v semenech, kde jsou hydrolyzovány a volná IAA umožňuje klíčení a rozvoj sazenic.

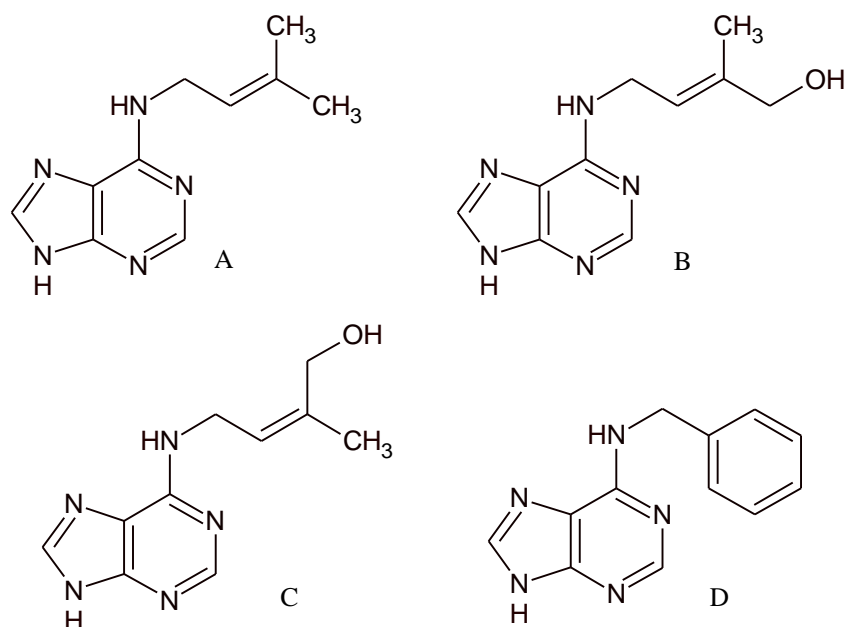
2.1.2. Cytokininy

Termínem cytokininy jsou označovány jak přírodní, tak i syntetické sloučeniny s hormonální aktivitou, které podporují růst rostlinných tkání. První sloučenina, u níž byla objevena cytokininová aktivita, byla nazvána kinetin a izolována ze spermatu sledě. Avšak, prvním přirozeně se vyskytujícím cytokininem byl zeatin, obsažený v nezralé kukuřici. Od tohoto objevu bylo pravděpodobné, že cytokininy se vyskytují ve všech rostlinných tkáních a různých rostlinných druzích (Rijavec a Dermastia, 2010).

Cytokininy hrají rozhodující roli v regulaci proliferace a diferenciaci rostlinných buněk, dále také kontrolují různé procesy rostlinného růstu a vývoje, mezi něž patří senescence, rovnováha růstu kořenů a prýtlů, dále také přenos nutričních signálů a zvýšení produktivity plodů (Sakakibara, 2006).

Cytokininy jsou po chemické stránce N^6 - substituované deriváty adeninu (Obr. 3). V závislosti na substituci postranního řetězce rozdělujeme cytokininy do čtyř skupin: (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008)

- 1) typ isopentenyladenin (iP)
- 2) typ trans-zeatin (tZ)
- 3) typ cis-zeatin (cZ)
- 4) aromatické cytokinininy



Obr. 3: Vzorce zástupců 4 základních skupin cytokininů – iP (A), tZ (B), cZ (C) a benzyladenin (BA) (D)

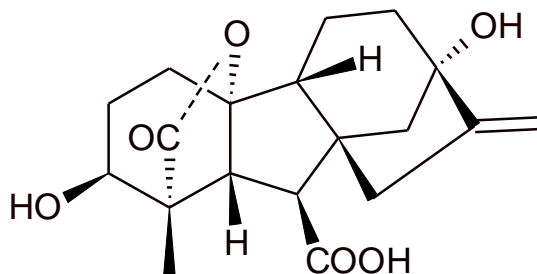
Prvním a zároveň rychlost určujícím krokem biosyntézy cytokininů je připojení isopentenylového řetězce z dimethylallyldifosfátu na adenosin. Isopentenylový řetězec je posléze hydroxylován za vzniku cytokininů zeatinového typu. Další modifikační dráhy zahrnují hydroxylaci N^6 atomu adeninu za vzniku dalších cytokininů (Kakimoto, 2003). Kromě jednotlivých kroků biosyntézy je také důležitá lokalizace, kterou se ve své práci zabýval Miyawaki (2004). Pomocí kontroly hladin mRNA a exprese β -glukoronidasy zjistil, že biosyntetická dráha cytokininových prekurzorů se nenachází pouze v kořenové špičce, ale i v paždí listů nebo v nezralých semenech. Isopentenyltransferasa se nachází i ve flomeové tkáni, kořenovém primordiū, horní části květenství a v zónách abscise ovocných plodů. Biosyntéza cytokininů je situována také v elongační zóně kořenové endodermis a trychomech mladých listů.

V buňkách se cytokininy vyskytují endogenně v podobě volných bází, nukleosidů, nukleotidů, nebo glykosidů. Tyto chemické sloučeniny jsou v rostlinném organismu přítomny v koncentracích pmol.g^{-1} čerstvé hmoty (Doležal *et al.*, 2007).

2.1.3. Gibereliny

Některé terpenoidy hrají důležitou roli v rostlinném vývoji jako růstové regulátory. Gibereliny (Obr. 4) jsou diterpenoidy, jejichž isoprenoidní jednotky jsou odvozeny zejména od methylerythritolfosfátu v plastidové dráze (Yamaguchi, 2006). Gibereliny kontrolují mnoho procesů, jako je klíčení semen, prodlužování stonku, růst květů a listů a v neposlední řadě také vývoj semen (Fleet and Sun, 2005).

V současné době je známa velká skupina giberelinů produkovaná rostlinami, jejichž prekurzorem je geranygeranyldifosfát, ale pouze zlomek těchto derivátů je biologicky aktivní. Kromě toho, aktivní gibereliny mohou být inaktivovány navázáním methylové, hydroxylové nebo jiné funkční skupiny, které jsou příčinou lokální inaktivace a zároveň nedílnou součástí regulačního mechanismu (Hartweck, 2008).



Obr. 4: Strukturální vzorec giberelinu 1 (GA1)

2.1.4. Kyselina abscisová

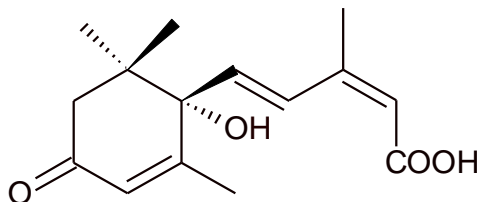
Kyselina abscisová (ABA) (Obr. 5) reguluje opadávání listů, stárnutí, inhibici růstu a vegetační klid pupenů a semen (Sondheimer *et al.*, 1968). Velká část z mnoha fyziologických účinků kyseliny abscisové je v opozici vůči auxinům, giberelinům a cytokininům. ABA se také významně podílí na udržování stabilního vnitřního prostředí rostlinného organismu.

Mezi významné hormonální regulace ABA patří zrychlení abscise plodů a listů, indukce a prodlužování vegetačního klidu ve výhoncích listnatých stromů a hlízách. Mezi další funkce patří i inhibice klíčení prodlužováním období vegetačního klidu

semen a inhibice kvetení rostlin dlouhého dne v období dnů krátkých (Addicott a Lyon, 1969).

Biosyntéza ABA může probíhat dvěma drahami. První z nich je přímá dráha, jejímž výchozím produktem je farnesyldifosfát a uplatňuje se u některých rodů hub. U rostlin se uplatňuje nejvíce dráha nepřímá, která vychází ze strukturálních podobností karotenoidů, které jsou prekurzory ABA. V prvním kroku biosyntézy dochází k oxidativnímu štěpení 9-cis-epoxikarotenoidu, jejímž produktem je xantoxin a další vedlejší produkt (C₂₅). Hydroxylová skupina xantoxinu se oxiduje na keton, v dalším kroku dochází k otevření epoxidového kruhu a vzniku aldehydu ABA, který je dále oxidován na ABA (Schwartz *et al.*, 2003).

Hlavním konjugátem ABA je ABA-glukosid, který nevykazuje téměř žádnou biologickou aktivitu, ale je hlavní transportní formou ABA. Glukosidy ABA mohou sloužit jako skladovatelná forma ABA, protože hydrolýzou snadno dochází k uvolnění volné ABA. Glukosid kyseliny abscisové se může hromadit ve vodné fázi buněčné stěny. Asi 20 % z celkového množství ABA je skladováno ve vakuolách ve formě glukosidu (Piotrowska a Bajguz, 2011).



Obr. 5: Strukturální vzorec biologicky aktivního S enantiomeru kyseliny abscisové S-(+)-ABA

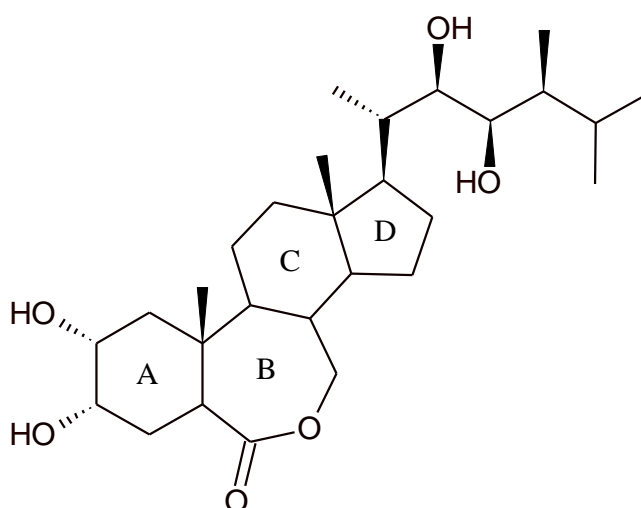
2.1.5. Brassinosteroidy

Brassinosteroidy jsou skupinou fytohormonů s významnou, růst podporující aktivitou. Kromě podpory růstu, tato skupina rostlinných hormonů ovlivňuje další rozličné vývojové procesy jako klíčení semen, rhizogenezi, kvetení, senescenci, zrání a abscisi. Brassinosteroidy jsou látky, které udělují rostlinnému organismu rezistenci vůči abiotickému stresu (Rao *et al.*, 2002).

V roce 1979 byl jako první brassinosteroid objeven brassinolid (Obr. 6). Dále byly brassinosteroidy izolovány z různých rostlinných druhů. Velké množství látek patřících do této skupiny je důsledkem velkého množství chemických modifikací brassinolidu, jako výchozího biosyntetického produktu. Může docházet k substitucím

kruhů A, B a postranního řetězce. Další modifikace jsou způsobeny oxidací a redukcí během biosyntézy (Yokota, 1997).

Teasteron, jeden z meziproduktů biosyntetické dráhy brassinosteroidů, může být převeden na směs tří konjugátů laurátů, myristátu a glykosidu, které jsou snadno hydrolyzovány na volnou formu teasteronu. Esterifikace a glykosylace jsou reverzibilní reakce, díky nimž mohou tyto konjugáty sloužit jako skladovací a transportní forma, která po hydrolýze poskytuje brassinolid. Tyto vzájemné přeměny jsou nedílnou součástí zrání pylových zrn a tak i nezbytným krokem biosyntézy (Piotrowska a Bajguz, 2011).



Obr. 6: Strukturální vzorec brassinolidu

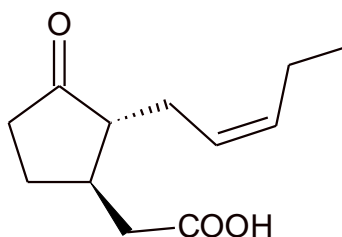
2.1.5. Jasmonáty

Jasmonáty, kyselina jasmonová (Obr. 7) a jim příbuzné sloučeniny jsou široce distribuovány ve vyšších rostlinách. Jasmonáty se vyznačují inhibiční funkcí v rostlinném orgasnu. Mezi inhibiční funkce patří antagonistický účinek prodlužování indukovaný IAA, inhibice růstu kořene a urychlení úbytku chlorofylu z listových částí při senescenci. Jasmonáty se také významně podílí na tuberizaci, přeměně stonku v zásobní hlízu (Toro *et al.*, 2003).

Základní chemickou strukturou jasmonátu je cyklopentanonový kruh, který může být substituován v polohách C₃, C₆ a C₇. Uhlíky C₃ a C₇ jsou zároveň chirálními centry, které umožňují výskyt jasmonátů ve dvou diastereoizomerech a jejich enantiomerních formách. U rostlin a hub jsou syntetizovány a zároveň biologicky

aktivní (-)-jasmonová kyselina a (+)-7-iso-jasmonová kyselina. Biosyntetická dráha začíná kyselinou linoleovou a konečným produktem je (+)-7-iso-jasmonová kyselina, která je však snadno přeměňována na kyselinu jasmonovou izomerací (Vick a Zimmerman, 1984).

Jasmonáty jsou detekovatelné v celém rostlinném organismu, ale v nejvyšší koncentraci se vyskytují v aktivně rostoucích tkáních, jako jsou vzrostný vrchol, kořenové špičky, nezralé plody a mladé listy. Tyto fytohormony jsou přítomny v podobě konjugátů s aminokyselinami, methylovou skupinou nebo sacharidovými zbytky. I když biologicky aktivní jsou především volné formy jasmonátů, konjugáty hrají důležitou roli v udržování hormonální homeostázy. Jasmonáty spojené s Ile, Leu, Val, Tyr a Phe se uplatňují v procesu přenosu signálu (Tamogami *et al.*, 2008).



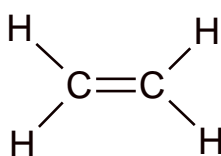
Obr. 7: Strukturální vzorec kyseliny jasmonové

2.1.6. Ethylen

Ethylen (Obr. 8) jako jediný plynný fytohormon reguluje významné vývojové procesy v rostlinném organismu. Malá molekula etylenu ovlivňuje geotropismus, epinastii, kvetení, diferenciaci pohlaví, zrání, stárnutí a defoliaci (Kepczynski, 1988). Produkce etylenu je pevně regulována vnitřními signály během vývoje. Na rostlinný organismus působí také životní prostředí, které ovlivňuje biosyntézu etylenu biotickými podmínkami (např.: patogenní infekce) a abiotickými stresovými podmínkami, jako jsou poranění, nedostatek kyslíku nebo teplotní výkyvy (Wang *et al.*, 2002).

Ethylen je syntetizován z methioninu působením tří po sobě jdoucích enzymatických reakcí. Důležitým meziproduktem biosyntézy je S-adenosil-methionin, který je zároveň základním stavebním kamenem proteosyntézy. Téměř 80% buněčného methioninu je převáděno na S-adenosil-methionin za spotřeby ATP. Takto upravený methionin je hlavním donorem methylové skupiny při úpravě lipidů, proteinů a nukleových kyselin (Ravanel *et al.*, 1998).

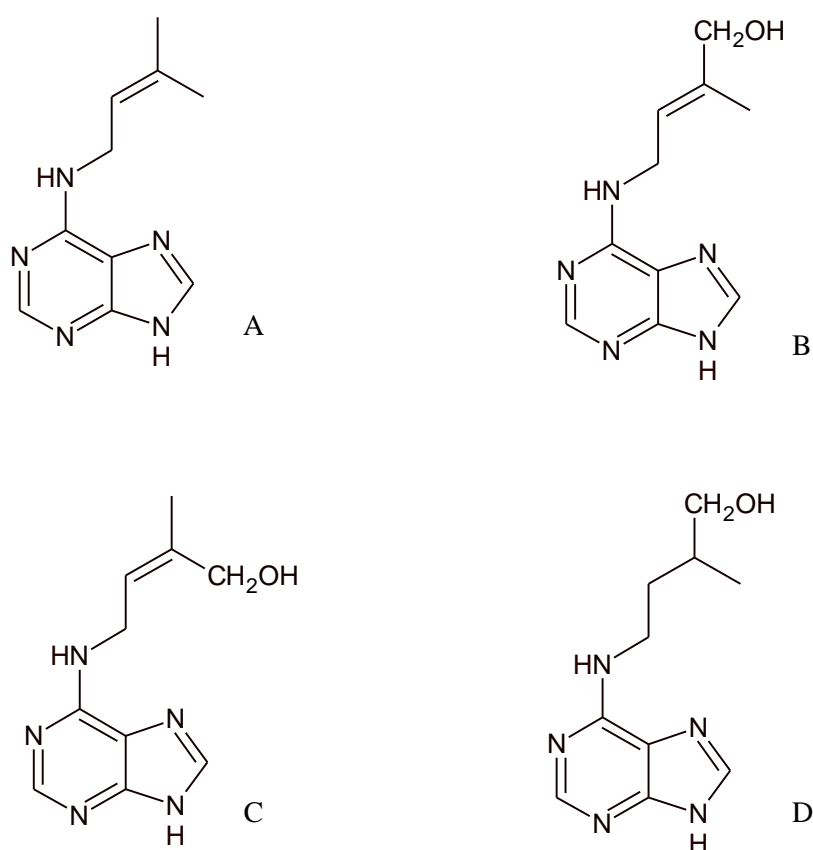
Ethylen je vnímán membránovými receptory, které jsou homologní s dvousložkovými bakteriálními histidin-kinázami. Tyto histidin-kinázy slouží k rozpoznání změn životního prostředí. Systém se skládá obvykle ze dvou proteinů. Úlohou histidin-kinázy je fosforylace vnitřního histidinového residua a aktivace navazujících složek po přijetí fosfátu aspartátovým residuem (Wurgler-Murphy a Saito, 1997). Rostliny si tak během svého vývoje vytvořili důmyslný systém detekce a obrany vůči pathogenní invazi. Avšak role etylenu může být rozdílná v závislosti na druhu pathogenního i rostlinného organismu (Wang *et al.*, 2002).



Obr. 8: Strukturní vzorec ethylenu

2.2 Cytokininy s isoprenoidním postranním řetězcem

Isoprenoidní cytokinininy (Obr. 9) jsou N_6 substituované deriváty adeninu. Mezi nejrozšířenější cytokinininy patří *trans*-zeatin (*tZ*) s nenasyceným postranním řetězcem a jeho deriváty (Letham, 1963). Dihydrozeatin, protějšek zeatinu s plně nasyceným isoprenoidním řetězcem byl nalezen v mnoha rostlinných druzích, zatímco *cis*-zeatin (*cZ*) a isopentenyladenin (*iP*) jsou až na některé výjimky obecně méně zastoupenými složkami (Emery *et al.*, 1998).



Obr. 9: Strukturní vzorce cytokininů - isopentenyladenin (A), *trans*-zeatin (B), *cis*-zeatin (C) a dihydrozeatin (D)

2.2.1 Biosyntéza ve vyšších rostlinách

Enzymatická aktivita převádějící AMP a dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) na biologicky aktivní cytokinin N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenosin-5'-monofosfát (iPMP) byla poprvé objevena u *Dictyostelium discoideum* (Taya *et al.*, 1978). Následně se ukázalo, že *ipt* gen kódující isopentenyltransferasu z *Agrobacterium tumefaciens*, má velmi podobné enzymatické vlastnosti (Akiyoshi *et al.*, 1984). Dále byly *ipt* geny izolovány

z několika druhů bakterií a enzymatická aktivita isopentenyltransferasy byla změřena u extraktů z rostlinných tkání rozličných druhů. (Obr. 10)

Na reakci AMP a DMAPP katalyzovanou isopentenyltransferasou navazují pravděpodobně dvě rozdílné dráhy biosyntézy isoprenoidního postranního řetězce *tZ*. (Obr. 11) V jedné dráze isopentenyltransferasa využívá DMAPP, který je konečným produktem methylethritol-fosfátové dráhy lokalizované v plastidech. V této dráze vzniká 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl difosfát (HMBDP), který je následně redukován na DMAPP a isopentenyl difosfát. Dalším krokem je hydroxylace vzniklého iP, jejímž výsledným produktem je *tZ* (Kasahara *et al.*, 2004). Druhá z cest možné biosyntézy využívá mevalonátové dráhy, která produkuje DMAPP a je inhibována lovastatinem. Syntéze DMAPP předchází kondenzace tří molekul acetylCoA a postupná redukce na mevalonát. Po fosforylaci, dekarboxylaci vzniká izomerací DMAPP, který je využit v dalších krocích biosyntézy (Sakakibara *et al.*, 2005).

Původními produkty rostlinného enzymu jsou isopentenyadenosin-5'-trifosfát (iPRTP) a isopentenyadenosin-5'-difosfát (iPRDP), které mohou být následně převedeny na *tZ*, hydroxylací postranního isoprenoidního řetězce cytochromem P450. Cytochromy jsou schopny hydroxylovat pouze iP nukleotidy, nikoli nukleosidy nebo volné báze. (Takei *et al.*, 2004) Cytokininové ribotidy jsou přímo převáděny na aktivní volné báze pomocí tzv. lonely guy, což je rodina LOG enzymů (Kurakawa *et al.*, 2007).

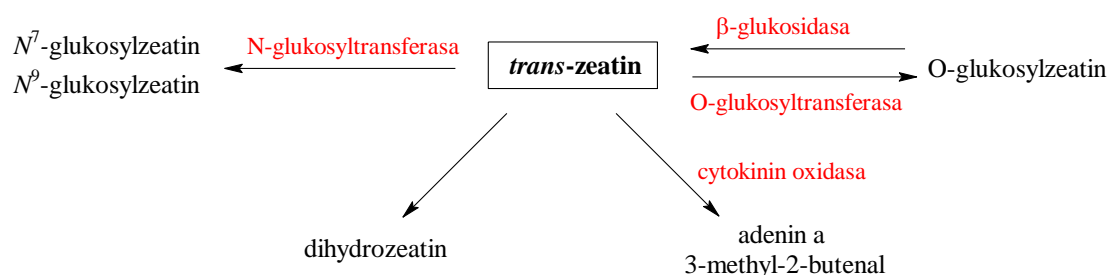
2.2.2 Metabolismus

Hladina aktivních cytokininů může být v buňce snížena prostřednictvím konjugace na glukosu nebo ireverzibilním oxidativním štěpením cytokinin oxidasou. K *N*-glykosylaci cytokininů dochází primárně na dusíku v poloze N^7 a N^9 purinového kruhu a je nevratná. *O*-glykosylace probíhá na kyslíku postranního řetězce *trans*-zeatinu nebo dihydrozeatinu. Tyto *O*-glykosylované formy mohou být převedeny pomocí β -glukosidasy zpět na aktivní volnou formu (Brzobohatý *et al.*, 1993). a zároveň představují stabilní skladovatelnou formu hormonu.

Mnoho rostlinných tkání obsahuje cytokinin dehydrogenasy (EC 1.5.99.12), enzymy které mohou štěpit na místě N^6 postranní řetězec. *Trans*-zeatin a isopentenyadenin mají postranní řetězce nenasycené a tedy i štěpitelné, zatímco dihydrozeatin je rezistentní vůči působení cytokinin dehydrogenasy. Volné báze a jejich ribosidy jsou výhodnými substráty těchto enzymů. Substituce funkčních skupin na

purinovém kruhu, kam řadíme i *O*- a *N*-glykosylaci, také zabraňuje enzymatickému působení cytokinin dehydrogenasy (Schmülling *et al.*, 2003).

Dle Bilyeové (2001) thidiazuron a cytokininy syntetizované na bázi močoviny mohou cytokinin oxidasy/dehydrogenasy nekompetitivně inhibovat, zatímco exogenně aplikovaný auxin jejich aktivitu může zvýšit. Cytokinin dehydrogenasy nevratně inaktivují cytokininy a mohou tak být důležité v procesu regulace nebo omezení účinků cytokininů.



Obr. 10: Metabolické přeměny *trans*-zeatinu. Enzymy katalyzující jednotlivé reakce označeny červeně. (převzato z Kieber a Schaller, 2014)

Dlouhou dobu se vědci domnívali, že pro degradaci cytokininů je nezbytná přítomnost kyslíku. Tato teorii byla však vyvrácena, protože byl objeven dehydrogenační způsob štěpení nenasycených postranních řetězců. Elektronové akceptory přenáší i za anaerobních podmínek. Cytokinin dehydrogenasa obsahuje jako kofaktor flavinadenindinukleotid (FAD) (Galuzska *et al.*, 2001). Akceptorem elektronů je druhé redoxní místo enzymu, které elektrony dopravuje k ubiquinonu (Galuzska *et al.*, 2007).

2.2.3 Transport

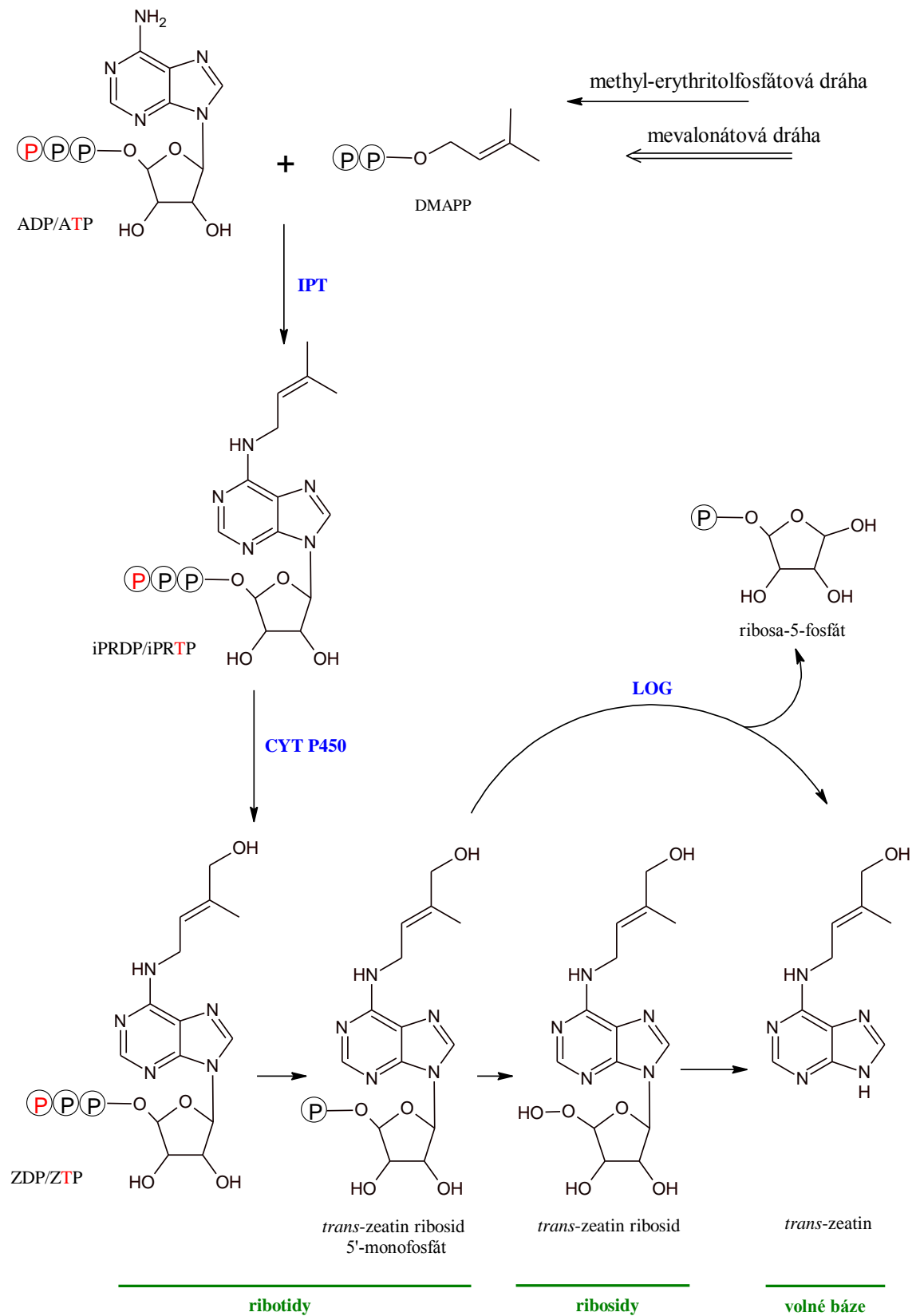
Dříve byli botanici přesvědčeni o tom, že transport na dlouhé vzdálenosti ovlivňuje významné kroky vývoje například apikální dominanci. Tuto hypotézu vyvrátil Nordström (2004a), který tvrdí, že hlavním místem biosyntézy cytokininů jsou postranní kořenové meristémy, ale zdrojem cytokininů jsou i nadzemní části, které syntetizují cytokininy nezávisle na dálkovém transportu z kořenů. Důležitým aspektem transportu je funkce auxinu, který potlačuje biosyntézu cytokininů. Oproti tomu je

ovlivnění produkce auxinů cytokininy pomalejší. Z toho vyplývá, že auxin má vliv na vývojové procesy zprostředkované cytokininy.

Hladina cytokininů se mění vlivem životního prostředí. Ke snížení hladiny v rýži dochází v období sucha, naopak k rychlému a značnému zvýšení napomáhá dostupnost dusičnanů ve slunečnici, ječmeni i v *Arabidopsis thaliana*. Dle Matsumota-Kitana (2008) dochází při snížené hladině cytokininů ke snížené produkci kambia. Z toho lze vyvodit, že cytokininy jsou fyziologickými mediátory kambiální aktivity.

Transport cytokininů na dlouhé vzdálenosti v xylému je zprostředkována zejména *trans*-zeatin ribosidem a ve floému přebírají tuto funkci cytokininy odvozené od iP. Na základě této vaskulární lokalizace Kudo *et al.* (2010) navrhl, že rostliny mohou používat *tZR* jako dálkového posla cytokininového signálu ve směru ke stonku a iP ve směru ke kořeni.

Úloha systémově přepravovaných cytokininů byla sporná. Přítomnost cytokininů v xylémové šťávě a listových výměšcích ukazuje na systémovou roli cytokininů, což se zatím nepodařilo jednoznačně prokázat. Dříve nebylo zřejmé, zda jsou cytokininy syntetizovány v kořeni a pro růst transportovány do stonku nebo naopak. Roubovací experiment provedený Matsumotem-Kitanem (2008) potvrdil, že stonek může růst bez cytokininů produkovaných kořenem a kořen roste bez cytokininů syntetizovaných stonkem.



Obr. 11: Navrhovaná biosyntetická a metabolická dráha cytokininů. Dráha znázorněna pro syntézu *trans*-zeatinu u *Arabidopsis thaliana*. Substrátem rostlinné IPT může být ADP i ATP. (převzato z Kieber a Schaller, 2014)

2.3 Analýza cytokininů

Pro objasnění funkce cytokininů v rostlinném organismu je důležitý vývoj citlivých analytických metod, které budou přesné a zároveň i rychlé. Větší požadavky na přesnost analytické metody jsou kladeny v případě analýzy složitější matrice. Z tohoto důvodu je klíčovým krokem extrakce a přečištění rostlinného vzorku, které předurčují úspěšnost konečné analýzy (Tarkowski *et al.*, 2009).

V historii byly používány metody koncové analýzy založené na interakci protilátky s antigenem. Mezi užívané imunochemické metody patřila radioimunolýza (RIA) (Grayling a Hanke, 1992) nebo enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) (Maldiney *et al.*, 1986). Analýza cytokininů byla podstatně finančně i časově náročnější. Podkapitoly níže se věnují současným trendům analýzy a částečně i metodám budoucím.

2.3.1 Metody přípravy vzorku

Extrakční techniky

Kvalitativní a kvantitativní složení cytokininů extrahovaných z rostlinné tkáně se liší typem extrakčního rozpouštědla (Horgan a Scott, 1987). Aby se předešlo enzymatické degradaci je nutné rostlinný materiál zmrazit nebo extrahovat vhodnými rozpouštědly ihned po sklizni. Izolaci a identifikaci pikomolárního množství cytokininů je často bráněno přítomností jiných látek biologického původu, které jsou přítomny ve vzorku v nadbytku. Nejběžnějším postupem je zmrazení rostlinné tkáně v tekutém dusíku a následná extrakce. K extrakci se dle Hoyerové (2006) používá modifikované Bielskeho rozpouštědlo, které obsahuje methanol, vodu a kyselinu mravenčí v poměrech 15/4/1 a dostatečně potlačuje defosforylaci nukleotidů cytokininů.

Extrakce pevnou fází (SPE)

Metoda extrakce pevnou fází je široce využívána tam, kde je potřeba purifikovat, extrahovat a izolovat velké množství látek (Takei *et al.*, 2003). Jednou ze zřetelných výhod extrakce pevnou fází je vysoká extrakční návratnost, kterou lze docílit vhodným sorbentem a volbou pracovních roztoků. Rychlé a efektivní separace cytokininů lze dosáhnout kombinací SPE na obrácených fázích, tzv.: reversed-phase (RP) s metodou iontové výměny (Dobrev a Kamínek, 2002). Relativně vysoká polarita molekul cytokininových nukleotidů vede ke slabé retenci molekul na kolonách C₁₈ během

extrakce. Použitím sorbentu s povahou aniontového měniče můžeme separovat cytokininové nukleotidy od cytokininových bází a jejich cukerných konjugátů (Takei *et al.*, 2003).

Nejnovější metodou pro purifikaci cytokininů je Stage-tip metoda dle Svačinové (2012). Tato metoda mikroextrakce využívá kombinace tří sorbentů. Jako první byl použit sorbent reverzní fáze C₁₈ zachytávající nepolární analyty ze vzorku. Druhou vrstvu tvořil kopolymer poly(styren-divinylbenzenu), který byl ještě modifikován kyselými sulfonovými skupinami pro zvýšení hydrofilních vlastností. Posledním použitým sorbentem kationový měnič, který byl tvořen zesíťovanými kopolymerními částicemi. Touto metodou byly přečištěny volné báze, ribosidy, *O*- i *N*-glukosidy a nukleotidy.

Imunoafinitní purifikace

Metoda je založena na interakci protilátky s antigenem, která poskytuje selektivní obohacení vzorku a může tak zvýšit limit detekce při stopové analýze (Hauserová *et al.*, 2005). Pro imunoextrakci cytokininů lze použít jak monoklonální, tak polyklonální protilátky. Vhodné nastavení afinitního systému vyžaduje vhodnou protilátku a zároveň musíme vzít v úvahu faktory ovlivňující matici, které mohou působit potíže při konečné analýze fytohormonů. Imunoafinitní kolony purifikují analyty podle strukturních podobností (Nicander *et al.*, 1993). Dle Hauserové (2005) má imunoextrakce vyšší selektivitu než výše zmiňovaná SPE, ale nižší propustnost.

2.3.2 Techniky analýzy cytokininů

Plynová chromatografie (GC)

Metody založené na plynové chromatografii mají sice velké rozlišení a nízké detekční limity, ale jsou velmi pracné a také finančně náročné. Plynová chromatografie byla používána k analýze cytokininů od počátku 70. let 20. století (Horgan a Scott, 1987). Cytokinininy nejsou těkavé a pro zvýšení jejich těkavosti musí být derivatizovány. Dalším důvodem těchto úprav je zvýšení termostability. Derivatizační metody sebou nesou několik technických problémů, které značně komplikují analýzu, např.: hydrolýza, tvorba konjugovaných produktů a omezená těkavost (Trione *et al.*, 1987). Ačkoli spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (MS) umožnilo specifickou identifikaci a kvantifikaci cytokininů, je tato metoda překonána použitím vysoko-účinné

kapalinové chromatografie ve spojení s hmotností spektrometrií (Tarkowski *et al.*, 2009).

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Tato technika je jednou z nejvhodnějších technik pro analýzu cytokininů. Je to dáno zejména tím, že cytokininy vykazují postupně rostoucí polaritu a jsou snadno detekovatelné měřením absorpance v UV oblasti spektra (Chen, 1987). HPLC umožňuje rychlou separaci cytokininů z rostlinných extraktů s vysokým rozlišením předcházející analýze hmotnostní spektrometrií. Detekce měřením absorpance jedné vlnové délky v UV oblasti je nedostatečná. Široce využívanou metodou pro kvantifikaci cytokininů se stala hmotnostní spektrometrie využívající ionizaci elektrosprejem (Novák *et al.*, 2003).

Chromatografické podmínky separace

Volné cytokininové báze a jejich cukerné konjugáty jsou relativně hydrofobní sloučeniny, které se chovají jako slabé báze, proto jsou snadno separovatelné na kolonách s obrácenými fázemi při použití kyselého prostředí (Horgan a Scott, 1987). Nukleotidy, před separací na systému obrácených fází, je nutné předem upravit a snížit jejich náboj. Typicky se nukleotidy převádí na ribosidy pomocí alkalické fosfatasy nebo se derivují za účelem snížení polarity (Nordström *et al.*, 2004).

Separace pomocí HPLC se provádí na RP-C₁₈ nebo C₈ kolonách (Novák *et al.*, 2003). Do těkavé mobilní fáze, složené z octové nebo mravenčí kyseliny a jejich amonných solí, jsou přidávána rozpouštědla obsahující methanol nebo acetonitril. Pro dosažení dobré separace se využívá gradientová eluce (Van Rhijn *et al.*, 2001).

Detekce

Cytokininy vykazují silnou absorpanci mezi 220 nm a 300 nm, proto se dříve využívalo spojení HPLC s UV-VIS detektorem (Horgan a Scott, 1987).

Dnes je nejvíce užívána metoda detekce pomocí hmotnostního spektrometru. LC-MS metoda je poměrně novým nástrojem detekce, kvantifikace a charakterizace cytokininů extrahovaných z rostlinných tkání, kde se vyskytují v biologicky významných hladinách. Pro ionizaci se využívá několik postupů, z nichž nejpoužívanější je ionizace elektrosprejem (ESI-MS), která má vysokou citlivost a zároveň nízké pozadí (Novák *et al.*, 2003). Spojení kapalinové chromatografie s ESI-MS umožnilo v roce 1997 poprvé provést rychlou analýzu a kvantifikaci vzorku, který obsahoval 16 různých cytokininů s limitem detekce 1 pmol (Prinsen *et al.*, 1998).

V současnosti se limity detekce pohybují na hladinách fmol, díky použití gradientové eluce.

Ultra-účinná kapalinová chromatografie (UPLC)

Potřeba kvantifikovat rostlinné hormony sebou přináší mnohá úskalí související s hydrofobními vlastnostmi. HPLC-MS je široce užívanou metodou, která je schopna oddělit a kvantifikovat fytohormony bez derivatizace. Citlivost a míra účinnosti separace musí být však zvýšena novými přístupy (Novák *et al.*, 2008).

Jedním z postupů ke zvýšení citlivosti detekce hmotnostní spektrometrií je dle Nováka (2008) použití imunoafinitní extrakce. Po této extrakci provedl kapalinovou chromatografii, ve které se mu podařilo separovat 32 cytokininových derivátů. Kombinace UPLC s hmotnostní detekcí nabízí přesné a reprodukovatelné kvantifikace většiny cytokininů.

Instrumentace UPLC umožňuje průtok kapaliny při tlacích vyšších než 1000 barů a zároveň kolony naplněné sorbentem o rozměrech 1,7 μm . Tím UPLC překonává dosavadní možnosti HPLC. Ultra-účinná kapalinová chromatografie může dosáhnout vyšších rozlišení, vyšší citlivosti a mnohem rychlejší separace (Doležal *et al.*, 2007.) Nově vyvinutý systém UPLC-(ESI)-MS/MS může být užitečný pro studium fyziologické role cytokininů ve vzorcích konkrétních rostlinných tkání, metabolismu a způsobů působení cytokininů v rostlinném organismu (Novák *et al.*, 2008).

Kapilární elektroforéza (CE)

CE je částečně vhodnou metodou pro studium cytokininů z hlediska rychlosti, vysoké rozlišovací schopnosti a minimálních požadavků na vzorek a pufrý (Ge *et al.*, 2004).

Béres (2012) vyvinul jednoduchou a rychlou metodu umožňující testovat aktivitu isopentenyltransferasy *in vitro*. Materiál a spotřeba jsou minimální, protože je menší spotřeba v předčištění. Jeho práce umožňuje sledovat produkty aktivity isopentenyltransferasy. Kromě toho je schopna odhalit nežádoucí změny v koncentraci substrát/produkt a může tak přinést nový vhled do počátečních kroků biosyntézy cytokininů.

Další slibnou aplikací může být studium biochemických vlastností např.: substráty, produkty, kinetické parametry nebo inhibitory enzymů zapojených do metabolismu cytokininů. Tyto možnosti dosud neposkytovala žádná dříve vyvinutá

metoda, a proto je kapilární elektroforéza příslibem citlivé metody studia nejen cytokininů.

V oblasti studia cytokininů je nejdále metoda cyklodextrinových aditiv vyvinutá Bartákem (1998). Každá část molekuly přispívá k celkové interakci. Složky vzorku neobsahující sacharidový zbytek interagují zejména s α - a γ -cyklodextriny. Substituent amino skupiny v poloze 6 purinového kruhu interaguje s α -cyklodextriny (alifatické substituenty) zatímco aromatické substituenty reagují s γ -cyklodextriny. Z těchto poznatků lze říci, že metoda kapilární elektroforézy je vysoce účinnou metodou a zároveň rychlejší a levnější alternativou běžně používané HPLC. Další z možností využití zónové kapilární elektroforézy ve studiu cytokininů a jejich analogů je měření disociačních konstant, které provedl Barták (2000).

2.4 Pathogenní bakterie rostlin

Činnost mikroorganismů je úzce spojena s rostlinnou produkcí a zemědělskou účinností. Příznivý vliv mikrobů, zejména bakterií a hub, je jedinečný v přímém i nepřímém směru (Khan *et al.*, 2009). Nejobecnější a zároveň nejvíce poznaná výhoda půdních mikrobiálních populací spočívá v rozkladu organické hmoty na uhlík a dusík. Tyto prvky pak značně obohacují půdu a jsou tak rostlinám snadno dostupné (Hättenschwiler *et al.*, 2011).

V rostlinné rhizosféře dochází, jak k volnému, tak i k těsnému mikrobiálnímu spojení, jehož výsledkem je tenká vrstva půdy, která je v kontaktu s rostlinným kořenem a má tak obrovský vliv na zdraví a produkci rostliny. Růst podporující rhizobakterie přímo stimulují rostlinný organismus sekrecí rostlinných růstových regulátorů, jako jsou auxiny, cytokininy a gibereliny (Tsavkelova *et al.*, 2006). Dle Rodriguése (2006) spočívá podpora rostlinného růstu také zvýšením dostupnosti limitujících mikroprvků, kam řadíme např.: fosfor nebo železo. Hayat (2010) dodává, že dalším důležitým krokem je zpřístupnění dusíku procesem fixace. Lugtenberg a Kamilova (2009) zároveň poukazují na budování systematické rostlinné rezistence.

Růst podporující rhizobakterie mohou ovlivňovat prospěšný vývoj rostliny nepřímo, komplexotvornými reakcemi s atomy těžkých kovů nebo toxickými uhlovodíky (Auger *et al.*, 2013). Půdní mikroorganismy jsou také schopny antagonisticky působit vůči rostlinným patogenům produkcí antibiotik nebo interferencí s pathogenními signály a virulencí (Haas a Défago, 2005). Důležitost, těchto později zjištěných prospěšných vlastností, půdních mikrobů je ilustrována na příkladu existence přirozeně tlumivých půd, které jsou nasyceny patogeny, ale i přesto rostliny v těchto půdách vzkvétají a zůstávají zdravé (Mazzola, 2004).

Mnohem více specializované jsou symbiotické interakce vedoucí k tvorbě rhizobií nebo uzlíků s aktinobakteriemi, které fixují atmosferický dusík a distribuují ho jako amonný kationt po rostlinném organismu. Na oplátku rostlina bakteriím poskytuje uhlík získaný fotosyntézou (Seipke *et al.*, 2011). V udržitelném zemědělství se začínají uplatňovat ceněná mikrobiální biohnojiva, která jsou upřednostňována před hnojivy chemicky vyrobenými. Biohnojiva dokážou zlepšit kvalitu půdy a zvýšit její úrodnost a rostlinnou výrobu (Wu *et al.*, 2005).

Kromě pozitivního vztahu mezi mikroby a výkonností zemědělství nesmíme zanedbat také negativní stránku fytopathogenů, které mají často v zemědělství destruktivní dopady. Nelze pochybovat o tom, že bakterie, houby a ostatní

mikroorganismy způsobující rostlinné choroby, měli již v minulosti dramatický dopad v podobě masivních hladomorů (Fisher *et al.*, 2012). Kromě škodlivého efektu mají fytopathogeny i pozitivnější stránku. Bakterie zmíněné v podkapitolách níže mají potenciál být užitečné, jak v oblasti zvýšené ekologické a udržitelné rostlinné produkce, tak i v biotechnologických aplikacích (Tarkowski a Vereecke, 2013).

2.4.1 *Agrobacterium tumefaciens* a *Agrobacterium rhizogenes*

Tyto dva bakteriální kmeny byly na začátku 20. století popsány jako původci způsobující nádorová onemocnění rostlin (Smith a Townsend, 1907). Zástupci stejného rodu Rhizobiaceae (α -Proteobakterie), kteří jsou parazity širokého spektra hostitelů, zahrnující zejména dvouděložné dřeviny a byliny. *Agrobacterium tumefaciens* parazituje na více než 600 rostlinných druzích a 100 různých rodech (De Cleene a De Ley, 1976). Zatímco *A. rhizogenes* dle De Cleenea a De Leye (1981) reaguje na 260 rostlinných druhů, které můžeme zařadit do 60 různých rodů.

U rostlin infikovaných *A. tumefaciens* se v místě poranění vytvoří nádorové výrůstky (Obr. 12), zatímco *A. rhizogenes* způsobuje masivní proliferaci kořenů nesoucích velké množství adventivních kořenů, které připomínají vlásky (Gelvin, 1990). Pathogeny lze charakterizovat dle jejich plasmidů. Charakterizace agrobakterií je však obtížná, protože v jejich buňkách jsou přítomny vzájemně zaměnitelné tumorogenní a rhizogenní plasmidy. Finanční újma způsobená pěstitelům, fytopathogenními kmeny *Agrobacteria*, se objevuje v celosvětovém měřítku a to zejména v oblasti ovocných školek, pěstování ořechů a zeleniny. Hlavní ekonomické ztráty byly zaznamenány ve vinařství a sadařství ovocných stromů (Puławska, 2010). Hlavním důvodem ekonomických ztrát v sadařství je tvorba nádorového opasku, který znemožňuje transport vody a nutrientů, což vede k redukovanému růstu, zhoršení vitality nebo dokonce k předčasnému uhynutí rostlinného organismu. V oblasti květinářství infikované rostliny rostou pomaleji, jsou zakrnělé, mají žluté listy a nejsou schopny produkovat zdravé květy. V případě, že nádor odumře, zůstávají na rostlinách rány. Tato místa se vzápětí mohou stát cílem jiných pathogenních bakterií, které dále ovlivňují zdraví a výnos rostliny (Escobar a Dandekar, 2003).

V současné době neexistuje žádná účinná chemická kontrola. Na základě tohoto faktu Burr a Otten (1999) postulují, že je téměř nemožné *Agrobacterium* ze školek a ovocných školek vymýtit úplně. Velký důraz je kladen na prevenci, která zahrnuje vhodné kultivační metody nebo použití neinfekčních populací rostlin. Slibným

přístupem v biologické kontrole může být aplikace antagonistického kmene *Agrobacterium radiobacter*, který je schopen produkovat antibiotikum agrocin 84 (Kim *et al.*, 2006).

Tyto fytopathogenní kmeny velmi zaujaly přírodovědce několika zvláštními vlastnostmi:

- a) bakterie mají široké spektrum hostitelů
- b) své hostitele nezabíjí, ale pouze spouští buněčné a tkáňové dělení
- c) příznaky infekce jsou zachovány i po odstranění bakterie
- d) zvětšení orgánů v médiu bez hormonů přetrvávalo

Dodnes zůstává *Agrobacterium* přirozeným genetickým inženýrem, který je schopen vpravit určitou část nádor vyvolávajícího tzv. Ti-plasmidu a začlenit jej do genomu hostitelské rostlinné buňky (Chilton, 2001).



Obr. 12: nádorový výrůstek (“crown gall“) indukovaný *Agrobacteriem tumefaciens* (převzato z www.rhs.org.uk)

2.4.2. Fytopathogenní druhy bakterií čeledi *Streptomyces*

Streptomycety jsou Gram-pozitivní bakterie patřící do kmene Actinobakterií. Většina druhů čeledi *Streptomyces* jsou půdní saprofyty rozkládající nerozpustné komponenty ostatních organismů jako je celulóza nebo chitin, které se pak začleňují do koloběhu uhlíku (Loria *et al.*, 2006). Všudypřítomnost *Streptomycet* můžeme snadno rozpoznat na základě zemitého zápachu půdy, který je způsoben vylučováním geosminu (Seipke *et al.*, 2012). Členové rodu *Streptomyces* jsou významní zejména jejich nadprodukcí

sekundárních metabolitů, které jsou velmi užitečné v medicíně. Tyto látky sebou nesou bohaté antimikrobiální, antifungicidní, antinádorové a imunosupresivní vlastnosti. (Bérdy, 2005) Další jejich důležitou vlastností, pro které je uvádíme jako modelové prokaryontní organismy, je složitý životní cyklus. Na počátku životního cyklu se bakterie nachází ve vegetativní vláknité fázi, ze které se dále formuje anténní hyfa a v závěru dochází ke sporulaci (Joshi a Loria, 2007).

Ačkoli se fytopathogenní druhy *Streptomyces* vyskytují v celém rodu poměrně vzácně, jsou schopny indukovat nekrotické strupovitosti (Obr. 13) podobné léze, které vedou ke snížení výtěžku plodin a tím způsobují ztráty v zemědělství. Fytopathogenní *Streptomyces* nejsou specifické z hlediska hostitele ani tkáně, které napadají. Jejich největší dopad je na cibuloviny a hlíznaté rostliny zejména brambory. Mezi dále často napadené druhy patří okopaniny a kořenová zelenina jako řepa (*Beta vulgaris*), mrkev (*Daucus carota*), pastinák (*Pastinaca sativa*), ředkev (*Raphanus sativus*), tuřín (*Brassica napobrassica*) a vodnice (*Brassica rapa*) (Dees a Wanner, 2012).

Primárním zdrojem infekce hlíz jsou spory přítomné v půdě vstupující do hostitelského organismu skrze lenticely. Fytopathogenní *Streptomyces* napadají hlíznaté a kořenové tkáně skrze hyfy, pro které není vyžadováno poranění nebo přirozeně se vyskytující otevřené místo napadeného organismu. Po kolonizaci, rostlinné buňky začínají kolabovat v důsledku působení bakteriálních fyto toxinů, zastaví se elongace a dochází k suberizaci. Poranění se začne hojit abnormální tvorbou korkových buněk. Nově vzniklá korková vrstva však nezabrání bakteriální aktivitě. Předpokládá se, že bakterie rozkládá odumřelou tkáň, z níž získává potřebné živiny. To jí umožňuje napadení další hlízy a rozšiřování lézí (Acuña *et al.*, 2001). Výsledné strupovité léze mohou být povrchové, zvýšené, síťovité, červenohnědé nebo hluboké. Tyto vady znehodnocují vzhled brambor, čímž ovlivňují jejich kvalitu a tím i na trh, kde se umývají a balí bramborové výrobky (Loria *et al.*, 2006).

Snaha o kontrolu strupovitosti brambor je velmi komplikovaná, protože vývoj příznaků ovlivňuje mnoho faktorů, které dosavadní metody nebyly schopny efektivně nebo spolehlivě zachytit (Dees and Wanner, 2012). V současné době není žádná z pěstovaných odrůd brambor plně rezistentní vůči čeledi *Streptomyces*. Nicméně některé odrůdy vykazují zvýšenou toleranci a vůči těmto bakteriím se brání glykosylací bakteriálního fyto toxinu, thaxtominu A (Acuña *et al.*, 2001). Proto jediným od budoucna účinným prostředkem detoxikace je použití takto odolných odrůd

v kombinaci s ostatními doposud používanými metodami obrany (Dees and Wanner, 2012).



Obr. 13: strupovitost brambor způsobená rodem *Streptomyces* (převzato z <http://www.omafra.gov.on.ca/>)

2.4.3. *Pseudomonas syringae*

Rod *Pseudomonas* řadíme do kmene γ -Proteobakterie a zahrnujeme do skupiny rostlinných saprofytů. Saprofyté, zahrnují druhy podporující rostlinný růst, jakož i pathogenní druhy, které kolonizují povrch i vnitřní rostlinné tkáně stejného hostitele. Dnes existuje přes 20 platně popsanych kmenů fytopathogenních *Pseudomonád*, z nichž notoricky známá je *Pseudomonas syringae*. Tento nejznámější zástupce inhibující růst rostliny, vyvolává různé příznaky onemocnění jako je hniloba, nekróza (Obr. 13) a jiné léze až k vývoji dystrofií, jako jsou hálky a nádory (Preston, 2004).

Pseudomonas syringae byla poprvé izolována z šejřiku obecného (*Syringa vulgaris*) v roce 1899 Beijerinckem (Hirano a Upper, 2000). Současný význam *P. syringae* je zejména v oblasti vědecké a hospodářské, kde se tento patogen vyskytuje mezi nejvýznamnějšími rostlinnými patogeny (Mansfield *et al.*, 2012). *P. syringae* je velmi rozmanitý komplexní druh s dalšími více než 50 druhy, které se liší na podbuněčné úrovni a mohou být rozdílní na úrovni pathogenity, nikoli na úrovni taxonomické (Höfte a De Vos, 2007). Tyto druhy způsobují na hostitelských organismech skvrnitost, nekrózy a vznik nádorových útvarů. Nemoci může podlehnout řada hostitelských organismů od dvouděložných přes jednoděložné, traviny až po dřeviny (Kennelly *et al.*, 2007). Nicméně, jednotlivé izoláty kmenů *Pseudomonas*

syringae mají pouze úzké rozmezí hostitelů a u nehostitelských rostlin mohou vyvolat hypersenzitivní odpověď, která se posléze může přeměnit na stálou (Baltrus *et al.*, 2011). *P. syringae* je dobře přizpůsobitelný epifyt. V současnosti se předpokládá, že epifytická populace slouží jako primární inokulum pro obrat bakterií do pathogenního způsobu života. Pathogenita je zahájena vstupem do hostitelského organismu jeho přirozenými otvory, jako jsou průduchy nebo lenticely. V prvních dnech onemocnění se bakterie množí zejména v mezibuněčných prostorech a obývají rostlinné tkáně jako hemibiotrofové a později spouští vznik lézí a plné propuknutí onemocnění, které může u některých hostitelů způsobit i buněčnou smrt (Hirano a Upper, 2000).

Pro získání informací o způsobu determinace virulence a hostitelů se v dnešní době využívá sekvenační přístup, který poskytuje možnost návrhu genomové sekvence různých rodů. Z dosavadních analýz genomů je zřejmé, že je zde velmi úzký nebo žádný vztah mezi pathogenem a hostitelským organismem (Baltrus *et al.*, 2011). Ačkoli bylo jádro genomu identifikováno, za klíčové faktory virulence jsou považovány rozdíly zejména v efektech III. typu a toxinech, které jsou napříč jednotlivými zástupci velmi variabilní. Další znatelný rozdíl, způsobený ztrátou, získáním nebo přerušením získaných genů, je v obsahu plazmidů (O'Brien *et al.*, 2011).

Proteiny efektorového typu III jsou do cytoplasmy hostitele vpraveny sekrečním systémem, který připomíná jehlu a je kódován *hrc/hrp* geny, seskupenými v pathogenním ostrově. V hostiteli dochází k interakcím s mnoha proteiny a cílí na mnoho eukaryotických procesů. Efektory potlačují, modulují obrannou odpověď nebo se podílejí na indukcii symptomů (Deslandes a Rivas, 2012). V případě, že hostitelský organismus rozpozná proteiny efektoru III typu, dojde ke spuštění imunitní odpovědi (McHale *et al.*, 2006). Různé toxiny mohou mít za cíl hostitelskou plazmatickou membránu, ve které indukují vznik pórů. Nově vzniklými póry mohou unikat živiny a způsobovat nekrózu, např.: syringomycin nebo syringopeptin. Tyto látky pak mohou blokovat syntézu aminokyselin a jako antimetabolity mohou způsobit chlorózu a nekrózu, např.: tabtoxin a phaseolotoxin. Koronatin má vliv na otevírání průduchů, čímž vytváří přístupové body pro jiné pathogenní bakterie (Raaijmakers *et al.*, 2006). Dalšími virulentními faktory jsou exopolysacharidy a adhesiny, dále také produkce pektolytických enzymů a auxinu. (O'Brien *et al.*, 2011)

Hodně diskutovanou se v poslední době stala velmi neobvyklá schopnost *P. syringae*. *Pseudomonády* jsou schopny ledové nukleační činnosti. Prostřednictvím tvorby proteinových ledových krystalků, spojených s vnější membránou. Díky těmto

proteinovým agregátům získají bakterie schopnost působit jako jádra schopny katalyzovat tvorbu ledu v rozmezí od 0 do -5°C. Navzdory tomu, že role tvorby ledových krystalků je stále předmětem diskuzí, jejich vliv na dřeviny je nezanedbatelný. Vlivem agregátů dochází k poškození a následné invazi do rostlinné tkáně, která bývá spojena se systémovou infekcí a následným vznikem zánětů (Hirano a Upper, 2000).



Obr. 14: nekróza na listech rajčete způsobená fytopathogenní bakterií *Pseudomonas syringae* (převzato z <http://www.science.oregonstate.edu/>)

2.5 *Rhodococcus fascians*

R. fascians je Gram-pozitivní rostlinný patogen, který řadíme do Aktinomycet, skupiny s velmi všestranným sekundárním metabolismem (Nett *et al.*, 2009).

2.5.1 *Rhodococcus fascians* a jeho vliv na produkci okrasných rostlin

Patologie *R. fascians* má velmi podobné projevy jako infekce způsobená jednotlivými rody *Agrobacteria*. Nejvýraznějším projevem infekce je tvorba nádorů na listech nazývaná "leafy gall" (Obr. 15). Tyto zmnožené buňky představují proliferující se tkáň skládající se z malých výhonků, které jsou posléze inhibovány. Infekce může vést k růstu malých a deformovaných listů, ke ztrátě apikální dominance, srůstání stonků, k redukci kvetení a zakrnělému růstu (Depuydt *et al.*, 2008). První výskyt listového nádoru byl zaznamenán v roce 1927 na hrachoru vonném, protože symptomy onemocnění byly velmi podobné projevům infekce způsobené *Agrobacteriem*. Vědci se domnívali, že jde pouze o jiný specializovaný rod *Agrobacteria* (Brown, 1927). Trvalo téměř 10 let, než bylo zjištěno, že tuto infekci způsobují oranžové bakterie (Tilford, 1936) a až Goodfellow (1984) vyřešil taxonomické postavení. Stejně jako *Agrobacterium* má *R. fascians* široké spektrum hostitelů. Její pole působnosti zahrnuje více než 160 druhů patřících do 40 rodů, z nichž postihuje především dvouděložné, ale napadá i jednoděložné (Depuydt *et al.*, 2008).

Ekonomické dopady způsobené infekcí *R. fascians* se nachází v oblasti pěstování okrasných rostlin. Tyto květiny jsou chorobou zničeny natolik, že jsou neprodejně a tak dochází k obrovským ztrátám (Depuydt *et al.*, 2008). Historicky bylo toto onemocnění zaznamenáno u pěstitelů zástupců okrasných rodů *Tropaeolum*, *Petunia*, *Dahlia*, *Chrysanthemum*, *Pelargonium*, *Lily*, *Fresia*, *Brassica*, *Impatiens*, *Hebe* a *Dianthus* (Miller *et al.*, 1980). Kromě toho, že *R. fascians* škodí pěstitelům okrasných rostlin, jeho onemocnění postihuje i plodiny zahrádkářů jako jsou jahody, hlávkový salát, melouny a špenát (Faivre-Amiot, 1967). Problémem v mapování finančních škoda je neochota pěstitelů sdělovat informace o počtu napadených rostlin, protože by byla ohrožena jejich reputace. Kromě toho, jsou také listové nádory diagnostikovány chybně a jsou přisuzovány zástupcům rodu *Agrobacterium*. Nebo jsou zaměňovány za účinky růstových regulátorů, které také mohou způsobovat dočasnou deformaci. Na základě dat z univerzity v Oregonu víme, že problém s infekcí způsobenou *R. fascians* je poměrně trvalý problém (Serdani *et al.*, 2013).

Bohužel zatím nejsou dostupné žádné prostředky k eliminaci tohoto onemocnění. Poté co je patogen zavlečen do pěstitelské školky, lze se ho jen obtížně zbavit a často je nutné zlikvidovat celou úrodu (Depuydt *et al.*, 2008). Nemoc se šíří zejména skladovanými plodinami a reprodukčním materiálem, zamořenou půdou nebo vodou určenou k zavlažování. Proto, aby se tato infekce nezavlekla, musí pěstitelé dodržovat striktní hygienická pravidla. Jenom tímto způsobem se mohou pěstitelé zatím bránit (Putnam a Miller, 2007).

Podobně jako *Agrobacterium*, *R. fascians* svého hostitele neusmrcuje, ale pouze indukuje proliferaci tkání. Proto se předpokládalo, že *R. fascians* může být Gram-pozitivním protějškem *Agrobacteria*. Nicméně, po působení antibiotické léčby, na listech nezůstávaly nádorové buňky (Vereecke *et al.*, 2000). Goethals (2001) poukazuje na fakt, že nedochází k transferu DNA do genomu hostitelské buňky.



Obr. 15: nádorové buňky (‘‘leafy gall‘‘) indukované bakterií *Rhodococcus fascians* (převzato z <http://www.science.oregonstate.edu>)

2.5.2 Molekulární podstata vzniku nádorových buněk

Francis *et al.* (2012) zjistili, že pathogenní charakter bakterie *Rhodococcus fascians* závisí na přítomnosti lineárního plasmidu, který je u kmene D188 označován jako pFiD188. Iniciační krok interakce je nejasný, protože není zřejmé, jak se nepohybující se bakterie přiblíží k hostitelskému organismu. Po přiblížení dochází k interakci snadněji, když je rostlinný organismus poraněný. *R. fascians* je snadno přizpůsobitelný epifyt, tvořící na povrchu rostlin biofilm, který zpočátku nevyvolává onemocnění (Cornelis *et al.*, 2001).

Dle Depuyda *et al.* (2009) je známo, že rostlina reaguje na epifytní okolí změnou svého primárního metabolismu. Na tuto změnu vzápětí reaguje *R. fascians* přehodem do pathogenní fáze životního cyklu. Cornelis *et al.* (2001) dodávají, že pod epifytními koloniemi se vytvoří přístupová místa, kterými bakterie pronikne do hostitelského organismu. Pro přechod z epifytní fáze do fáze endofytní je zapotřebí funkčního *att* operonu, který kóduje produkci autoregulačních signálů, které řídí expresi penetrace, ale i jiné hlavní virulentní geny (Stes *et al.*, 2013).

Dalším krokem je exprese *fas* operonu, který nese dominantní informace o virulenci. V důsledku exprese bakterie produkuje směs 6 cytokininů (isopentenyladenin, cis-zeatin, trans-zeatin a jejich 2-methylthio deriváty). Dle Pertry *et al.* (2009b, 2010) bylo zjištěno, že směs těchto cytokininů působí na rostlinný organismus synergicky. Sekrece cytokininů v rostlinných tkáních aktivuje komplikovanou signální kaskádu, která vede k aktivaci spících pomocných meristémů. Obnovení funkce má za následek buněčné dělení rostlinného kortexu, jehož dalším důsledkem je tvorba nových prýtů (De O'Manes *et al.*, 2001).

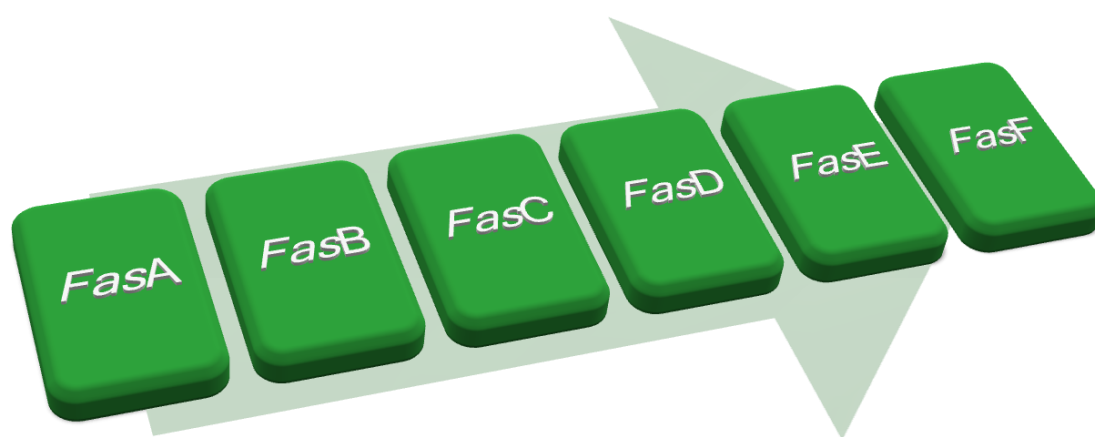
Prostřednictvím cytokininů *R. fascians* přinutí hostitelský rostlinný organismus produkovat auxiny a putrescin. Tyto látky pak podporují účinnost signálů vyvolávající symptomy infekce (Stes *et al.*, 2012). Vzniklé zduřenininy tvoří prostor, ve kterém se *R. fascians* metabolicky přizpůsobí, čímž je velmi zvýhodněna v porovnání s jinými pathogenními bakteriemi. Tento typ interakce můžeme nazvat metabolickou změnou stanoviště (Vereecke *et al.*, 2002).

2.5.3 Geny *fas* operonu

Srovnáním dvou téměř isogenních kmenů, D188 virulentní přirozeně se vyskytující "wild type" a D188-5 bez plasmidu, bylo zjištěno, že základní hladina cytokininů byla syntetizovaná drahou kódovanou chromozomálně. Nicméně, Pertry *et al.* (2009b)

pozorovali u kmene D188 vyšší hladiny cytokininů, a z toho lze usuzovat, že další biosyntetická dráha iP, cZ, tZ, 2MeScZ a 2MeStZ je kódována v lineárním plasmidu. Sekvenční analýzou byl identifikován *fas* operon (Obr. 16), který se skládá z šesti genů a je domněle zahrnut do biosyntézy cytokininů a zároveň je tedy nezbytný pro virulenci (Crespi *et al.*, 1992).

FasA je velmi podobný P450 cytochrom monooxygenase. N-terminální konec FasB koresponduje s 4-Fe-3S ferredoxinu *Aktinomycet*, zatímco C-konec je homologní s α -podjednotkou pyruvátdehydrogenasy. FasC je naopak podobný β -podjednotce. Části B i C *fas* operonu mají vazebné místo pro kofaktor, thiaminpyrofosfát (Crespi *et al.*, 1994). FasD je isopentenyltransferasa, která zprostředkovává první krok biosyntézy cytokininů (Crespi *et al.*, 1992). FasE vykazuje homologii s rostlinou cytokinin oxidasou/dehydrogenasou (Schmülling *et al.*, 2003). Nakonec část FasF, která má nízkou sekvenční podobnost s glutathion S-transferasou (Goethals *et al.*, 2001).



Obr. 16: Schematické znázornění *fas* operonu. (převzato z Pertry *et al.*, 2010)

Funkce jednotlivých genů *fas* operonu:

- FasA – P450 monooxygenasa
- FasB – ferredoxin/pyruvátdekarboxylasa (α)
- FasC – pyruvátdekarboxylasa (β)
- FasD – isopentenyltransferasa
- FasE – cytokininoxidasa/dehydrogenasa
- FasF – lysindekarboxylasa/fosforibohydrolasa

2.5.3 *Fas* operon a produkce cytokininů

Biochemická analýza ukázala, že FasD enzym produkující cytokininy je srovnatelný s rostlinnou Ipt (Abe *et al.*, 2007). Relativně nízké hodnoty katalytické konstanty mají za následek inhibice enzymu svým produktem. Zároveň se lze domnívat, že *in vivo* dochází k tvorbě komplexu s proteinem, který pak může převádět cytokininy produkované FasD. FasD může produkovat iP a tZ *in vitro*, ale pravděpodobně není schopen produkovat hydroxylované cytokininy. V rostlinném organismu tomu však být nemusí, protože jsou zde jiné podmínky a jiná dostupnost prekurzorů. Jiné podmínky mohou stimulovat FasD k produkci cytokininů zeatinového typu (Perty *et al.*, 2010).

Rozsáhlé biochemické studie rostlinných CKX enzymů identifikovaly specifické cytokininy vázající domény, u nichž se předpokládá, že určují substrátovou specifitu pro interakci s molekulami cytokininů (Werner *et al.*, 2006). Pro efektivní degradaci je nutná přítomnost páru Asp-Glu, který se poté nachází v blízkosti N₆ atomu cytokininů (Malito *et al.*, 2004). Pár karboxylát-karboxylát může sdílet proton, který ve vazebném místě stabilizuje amino skupinu substrátu. FasE bakterie *R. fascians* má na rozdíl od rostlin přítomen pár Asp-Gln, který není schopen sdílet proton a teoreticky tím snižuje katalytickou účinnost. CKX enzymy preferující cytokininové báze obvykle obsahují Glu residuum na pozici, kde dochází k reakci s N₉ atomem purinového kruhu, zatímco preference pro N₉ atom glykosidů a cytokininových nukleotidů je typická pro Ala nebo Ser residua (Galuzska *et al.*, 2007). FasE má na této pozici Gln, který je velikostně podobný Glu, ale nese opačný náboj, který odpuzuje atom N₉. Navíc konzervovaný motiv Asn/Tyr-Leu (Phe) v rostlinných CKX, který je součástí substrát vázající kavity, je u FasE nahrazen Ser/Val-Asn, což může mít za následek rozdílnou substrátovou specifitu. Navzdory všem atypickým residuům v cytokinin-vázající doméně, FasE se ukazuje jako fungující CKX enzym se silnou afinitou vůči cytokininům isopentenyladeninového typu a je tak schopen degradovat iP produkované *fas* operonem. Dále se předpokládá, že FasE doladuje složení cytokininového spektra, produkovaného *R. fascians* během infekce, což může být zásadní pro vývoj symptomů. Tento fakt byl dokázán aplikací 6 cytokininů do *in vitro* kultury *R. fascians*, kde došlo k okamžitému vyčerpání cytokininů isopentenylového typu, zatímco cytokininy zeatinového typu a jejich 2-MeS deriváty byly mnohem více rezistentní vůči oxidativnímu štěpení. Alternativně může FasE odstraňovat přebytečné produkty FasD, čímž přispívá ke zpětnovazební inhibici a zároveň zajišťuje kontinuální produkci cytokininů. Nakonec může FasE fungovat také jako detoxikační enzym, který rozkládá

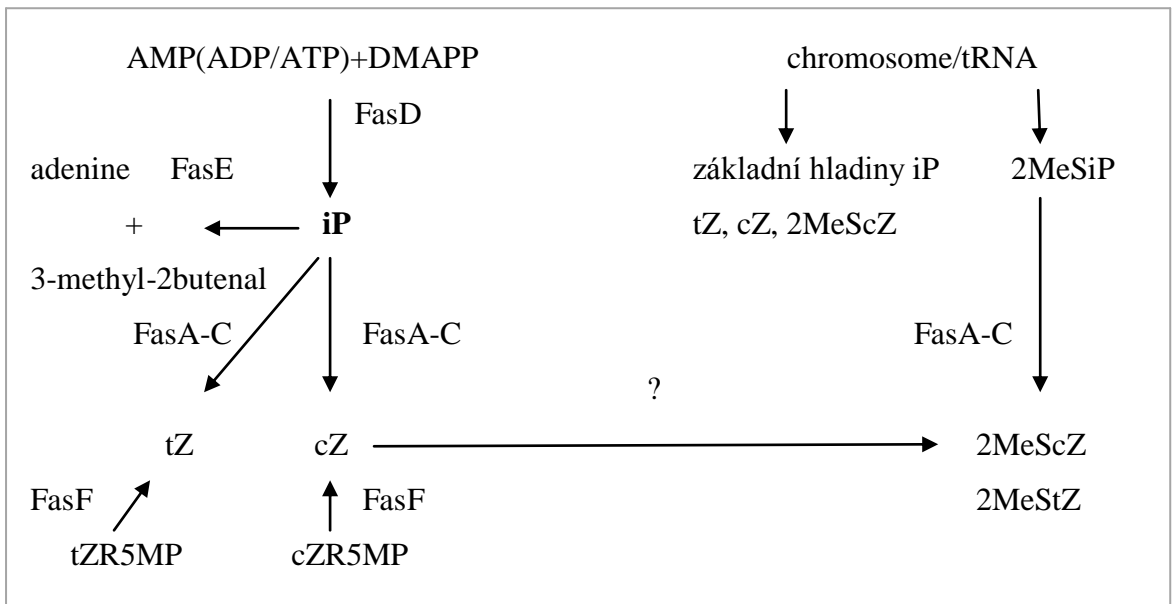
nedekretované cytokinininy v bakteriální cytoplazmě a tím účinně zabraňuje nahromadění cytokininů v toxických koncentracích (Pertry *et al.*, 2010).

Goethals (2001) předpokládá, že FasF se svou fosforibosylhydrolásovou aktivitou není zapojen do dodávání prekurzorů. Přesto se ukázalo, že v *in vivo* podmínkách dochází ke zvýšení aktivity fosforibosylhydrolázy, které je zodpovědné za uvolnění tZ, 2MeStZ, cZ a v menší míře ještě 2MeScZ z jejich nukleotidových prekurzorů. Lze tedy předpokládat, že hladiny cytokininů zeatinového typu jsou určeny aktivitami FasD-FasA a FasF. Srovnáním hladin exprese FasA a FasF v ustáleném stavu bylo dokázáno, že při interakci s rostlinou obě tyto cesty přispívají k udržení symptomů infekce (Pertry *et al.*, 2010).

Na základě biochemických parametrů a cytokininových profilů lze předpokládat, že tRNA slouží jako bazální zdroj, ale nijak nezvyšuje hladinu šesti základních cytokininů zajišťujících patogenitu. Hladiny cZ, tZ a 2MeStZ jsou absolutně závislé na *fas* operonu. FasA a FasD velmi ovlivňují hladinu 2MeScZ, z čehož lze usuzovat, že k biosyntéze všech patogenitu způsobujících cytokininů dochází *de novo*. V modelu Pertry (2010) je FasD klíčovým enzymem syntézy iP (pravděpodobně i tZ) a zároveň slouží jako prekurzor pro jiné *fas* enzymy. U FasA se lze domnívat, že jako P450 monooxygenasa hydroxyluje iP a syntetizuje tZ a cZ. FasA část operonu je schopna hydroxylovat i chromozomálně produkovaný 2MeSiP, čímž dává vzniknout 2MeScZ a pravděpodobně i 2MeStZ. Enzymy, které se podílí na methylthiolaci iP, tZ a cZ a získávání methylthio derivátů, zatím nebyly identifikovány. FasF, jako fosforibohydrolasa představuje alternativní cestu vzniku cytokininů zeatinového typu. CKX aktivita FasE je nezbytná pro správné fungování FasD enzymu. (Pertry *et al.*, 2010) Podobný reakční mechanismus *fas* proteinů vykazuje *Streptomyces turgidiscabies*. Tento patogen způsobující strupovitost je zatím jediným objeveným patogenem nesoucí *fas* operon (Joshi a Loria, 2007).

Otázka rozvoje symptomů úzce souvisí s funkčními moduly a konkrétní směsí cytokininů. FasD je klíčovým krokem virulence a tedy i v produkci cytokininů (Obr. 17) jako počátek iniciace symptomů. Absolutně důležitý požadavek virulence je kladen na FasA část operonu, která zajišťuje brzkou a silnou expresi cytokininů zeatinového typu, jako centrálních molekul v modulaci vývoje rostlin (Pertry *et al.*, 2009b). Produkce zeatinů zprostředkovaná FasF není esenciální pro indukci symptomů, ale pro jejich udržení v pozdějších fázích infekce. Aktivita FasE se zdá být důležitá pro účinnou iniciaci hyperplazie. Na základě těchto poznatků Pertry (2009b) došla k závěru, že

virulence není otázkou specializovaných molekul, ale je dána pouze koncentrací a poměrem.



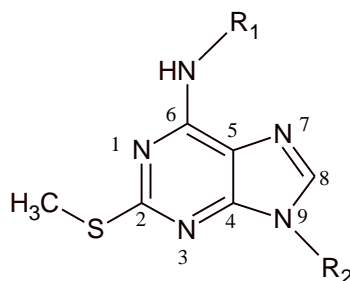
Obr. 17: Návrh modelu produkce cytokininů *fas* operonem. (převzato z Pertry *et al.*, 2010)

2.6 2-methylthio deriváty cytokininů

Cytokinininy se v rostlinném organismu vyskytují především jako volné báze, nukleosidy nebo nukleotidy a dále jako cukerné konjugáty substituované v poloze N₇ nebo N₉ purinového kruhu (N-glukosidy) nebo na hydroxylovaném postranním řetězci (O-glukosidy). Cytokinininy se vyskytují ve volné formě v rostlinách ale i v patogenních bakteriích napadající rostliny. Dále také mohou existovat jako složky některých tRNA téměř všech organismů (Mok a Mok, 2001).

Cytokinininy mají hydrofobní 2-methylthio deriváty (2MeS deriváty) (Tab. 1), které se nachází v přílehlé oblasti antikodonu v tRNA, jehož rozpoznávací kodony začínají uracilem (Björk *et al.*, 1987) a pravděpodobně mají vliv na přesnost translace (Díaz a Ehrenberg, 1991). Vzhledem k jejich nízké koncentraci, ve které se přirozeně vyskytují, je nutné vyvinout účinnou metodu analýzy pro studium jejich biologické funkce (Tarkowski *et al.*, 2010).

Tab. 1: Struktury, obecné názvy a zkratky vybraných 2-MeS cytokininů (převzato z Tarkowski, 2010)



R ₁	R ₂	obecný název	zkratka
	H R	2-Methylthio-isopentenyladenin 2-Methylthio-isopentenyladenosin	2MeSiP 2MeSiPR
	H R	2-Methylthio- <i>trans</i> -zeatin 2-Methylthio- <i>trans</i> -zeatin ribosid	2MeStZ 2MeStZR
	H R	2-Methylthio- <i>cis</i> -zeatin 2-Methylthio- <i>cis</i> -zeatin ribosid	2MeScZ 2MeScZR

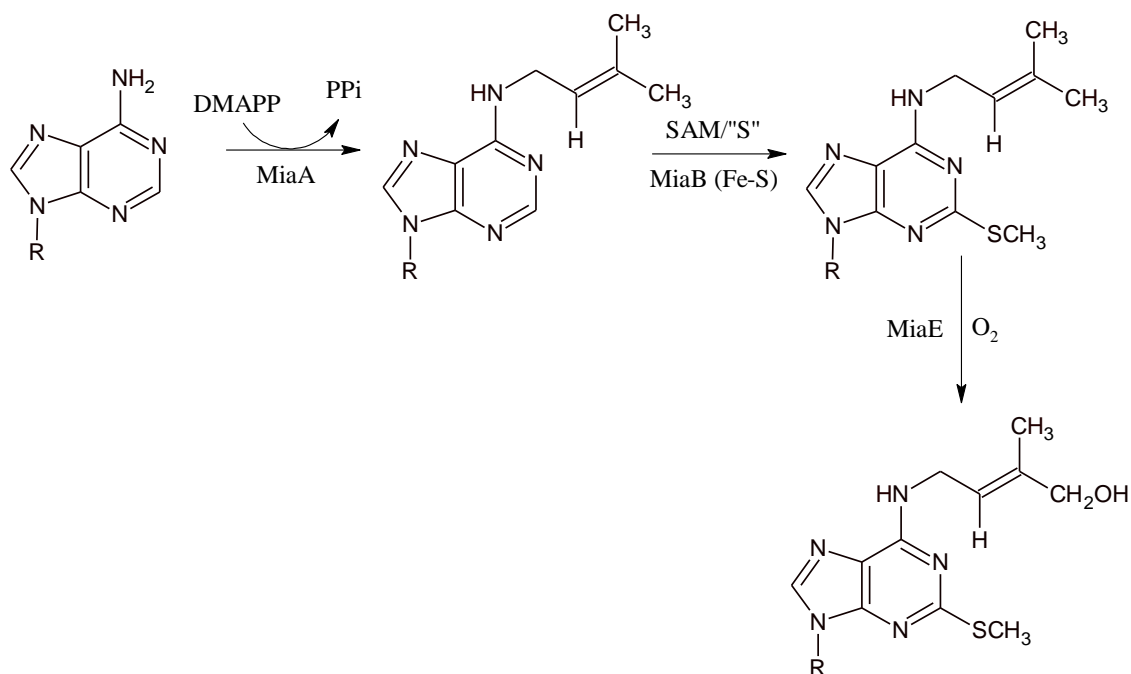
R: β-D-ribosa

2.6.1 Biosyntéza 2MeS derivátů cytokininů

Transferové RNA ze všech organismů obsahují modifikované nukleosidy, které jsou tvořeny ze čtyř běžných nukleosidů adenosinu, guanosinu, uridinu a cytidinu. V současné době bylo objeveno na 100 modifikovaných nukleosidů, které jsou charakteristické pro různé organismy.

Mathevon *et al.* (2007) objevili a charakterizovali první železo-síra obsahující enzym zapojený do modifikace tRNA (Obr. 18). Tento enzym je produktem *miaB* genu a katalyzuje těžkou přeměnu C-H vazby na C-S vazbu během thiomethylace isopentenyladenosinu na 2MeS-isopentenyladenosin. Donorem methylové skupiny v *in vitro* podmínkách je S-adenosylmethionin (SAM) (Geftter, 1969). Dle Grosjeana (1985) se tento nukleosid nachází na pozici 37, vedle antikodonu na pozici 3, téměř ve všech eukaryotických bakteriálních buňkách, které čtou kodony začínající uridinem.

Tento enzym je závislý také na podmínkách, ve kterých katalyzuje tuto reakci. U aerobně kultivovaných bakterií tRNA obsahovala 2MeS-(cis-hydroxy)-iP, zatímco bakterie *Salmonely* kultivované anaerobně obsahovaly pouze 2MeSiP. K hydroxylaci postranního řetězce 2MeSiP dochází tedy pouze v aerobních podmínkách. Když jsou bakterie kultivovány v limitním nedostatku železa nebo cysteinu, jejich tRNA obsahuje převážně iP, spíše než 2MeSiP a 2MeS-(cis-hydroxy)-iP. Bakterie nejsou za těchto podmínek methylthiolace iP. V závislosti na změnách biosyntetických drah aminokyselin, může docházet k modifikaci nukleosidů. Předpokládá se, že tyto změny úzce souvisí s elektronakceptorními drahami aerobního a anaerobního způsobu života (Buck a Ames, 1984).



Obr. 18: Biosyntéza 2-MeSiP (převzato z Mathevon *et al.*, 2007) DMAPP - dimethylallyl difosfát, SAM – S-adenosylmethionin

2.6.2 Analýza 2MeS derivátů cytokininů

Ačkoli je dnes známo více jak 50 cytokininů z různých biologických zdrojů, stále není k dispozici metoda, která by umožňovala spolehlivou kvantifikaci všech známých cytokininů. Tarkowski (2010) se ve své práci zaměřuje na analýzu hydrofobních 2MeS derivátů cytokininů, vzhledem k jejich významu v procesu interakce bakterie s rostlinou.

Vyvinutá metoda LC-MS/MS umožňuje chromatografické rozdělení šesti 2MeS derivátů s citlivou detekcí hmotnostní spektrometrií. Ve srovnání s jinými technikami LC-MS/MS nabízí dobré rozlišení, dostatečnou selektivitu a uspokojivou citlivost. Jedinou nevýhodou je dlouhý čas separace. Tento problém lze vyřešit vývojem UPLC-MS/MS metody, která je příslibem rychlejšího a citlivějšího přístupu s vyšším chromatografickým rozlišením.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

agar (Sigma Aldrich, USA)

amoniak (Merck Millipore, Německo)

citronan sodný (VWR Chemicals, USA)

citronová kyselina (Sigma Aldrich, USA)

histidin (Alfa Aesar, USA)

hovězí extrakt (HiMedia, Indie)

kvasničný extrakt (Becton, Dickinson and Company, USA)

methanol (Biosolve, Francie)

mravenčí kyselina (Fluka, USA)

octová kyselina (Lach:ner, ČR)

pepton (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)

sacharosa (Lach:ner, ČR)

síran amonný (Sigma Aldrich, USA)

síran hořečnatý (Lach:ner, ČR)

standardy 2MeS derivátů cytokininů (OlChemIm, ČR)

-	2MeSfZ	-	² H ₅ 2MeSfZ
-	2MeSiP	-	² H ₆ 2MeSiP
-	2MeSfZR	-	² H ₅ 2MeSfZR
-	2MeScZR	-	² H ₅ 2MeScZR
-	2MeSiPR	-	² H ₆ 2MeSiPR

sukcinát sodný (Sigma Aldrich, USA)

3.2 Použité přístroje a materiály

autokláv (Tuttnauer, Slovenská Republika)

bakteriologická klička (CopanItalia, Itálie)

centrifuga (Thermo Scientific, USA)

hmotnostní spektrometr (Shimadzu, Japonsko)

kolona Hypersil GOLD C₄ 150 x 2,10 mm, 1,9 μm (Thermo Scientific Fisher, USA)

kolona Acquity UPLC BEH C₁₈ 50 x 2,10 mm, 1,7 μm (Waters, Irsko)

laboratorní váhy (OHAUS, Švýcarsko a Radwag, Polsko)

laminární box (Faster S. r. I., Itálie)

magnetická míchačka (Biosan, Lotyšsko)
membránové čerpadlo
orbitální třepačka s inkubací (Biosan, Lotyšsko)
pH metr (Elmetron, Polsko)
pipety (Eppendorf, Německo)
promývačka
serologická pipeta (P-lab, ČR)
SPE kolony Strata-X 33u polymeric reversed phase, 100 mg/3 ml (Phenomenex, USA)
sterilní filtr (Labicom, ČR)
ultra-účinný kapalinový chromatograf (Shimadzu, Japonsko)
vakuová odparka (Eppendorf, Německo)
vakuová komůrka (Supelco, USA)
vortex (Biosan, Lotyšsko)

3.3 Metody

3.3.1 Kultivace kmenů *Rhodococcus fascians*

V prvním kroku bylo připraveno pro jednotlivé kmeny (D188, 21D5, D5, MTR1 a MTR2) 5 Erlenmeyerových baněk o objemu 250 ml, na jejichž hrdlo byla připevněna fólie pro autoklávování. Kromě Erlenmeyerových baněk bylo potřeba vyautoklávovat odměrné válce. V neposlední řadě bylo nutné sterilovat připravené médium (Tab. 2).

Tab. 2 Složení YEB média pro základní kultivaci

složka	koncentrace (g.l ⁻¹)
hovězí extrakt	5
kvasničný extrakt	1
pepton	5
sacharosa	5
síran hořečnatý	0,002
agar	14

Vyautoklávované médium bylo rozlito ve flow boxu do sterilních plastových Petriho misek. Po vychladnutí média bylo na misky pomocí bakteriologické kličky rozetřeno 20 µl zásobních hluboce zamražených glycerolových roztoků jednotlivých kmenů *Rhodococcus fascians*. Misky byly poté kultivovány 2-3 dny ve tmě při teplotě 28°C.

V dalším kroku byla připravována kultura v tekutém médiu. Opět byl vyautoklávován potřebný počet Erlenmeyerových baněk a odměrných válců. Vysterilizováno bylo i YEB médium, do kterého nebyl přidán agar. Po vychladnutí média bylo nalito 100 ml tekutého YEB média do Erlenmeyerovy baňky a pomocí bakteriologické kličky bylo sterilně přeneseno malé množství kultury z tuhého média. Prekultura byla kultivována 2 dny ve tmě při 28°C na třepačce při 150 rpm.

Narostlá prekultura byla 10-krát naředěna do čerstvého tekutého YEB média a kultivována za stejných podmínek přes noc.

3.3.2 Indukce produkce cytokininů bakteriálními kmeny *Rhodococcus fascians*

Po kultivaci byla YEB tekutá kultura přelita do sterilních falkon po 50 ml. Po vyvážení byly falkony centrifugovány při 6 000 rpm po dobu 10 minut. YEB médium bylo odlito a pelet byl rozřepán v 10 ml MinA média (Tab. 3). MinA médium bylo autoklávováno bez sukcinátu sodného a histidinu. Tyto dvě složky byly sterilovány filtrací a přidány až

do vyautoklávovaného média. Roztřepaný pelet v MinA médiu přelijeme do sterilních Erlenmeyerových baněk a doplníme MinA médiem.

Takto připravená tekutá kultura v indukčním médiu byla kultivována přes noc ve tmě při 28°C za třepání při 150 rpm.

Druhý den bylo tekuté médium opět centrifugováno při 6 000 rpm po 10 minut. Supernatant byl přelit do falkon a zamražen pro následnou analýzu.

Tab. 3 Složení MinA média pro indukci produkce cytokininů

složka	koncentrace (g.l⁻¹)
kyselina citronová	0,8616
citronan sodný	1,7352
síran amonný	1
síran hořečnatý	0,25
sukcinát sodný	3,241
histidin	0,776

3.3.3 SPE purifikace

Pro SPE purifikaci byly použity kolony Strata-X od firmy Phenomenex. SPE purifikace byla provedena na 100 mg/3 ml kolonkách v systému obrácených fází. Vakuová komora byla připojena přes promývačku k vakuové pumpě. Jednotlivé SPE kolonky byly umístěny na víko vakuové komůrky při zavřených ventilech.

Jako první byla provedena aktivace sorbentu 3 ml methanolu při mírném průtoku, regulovaným tlakem v komoře. Po aktivaci byla provedena ekvilibrace sorbentu 4 ml vody. Po ekvilibraci byly nanесeny 2 ml vzorku společně s 50 µl interních standardů klasických cytokininů o koncentraci 1.10⁻⁷ mol.l⁻¹. V případě MeS-cytokininů byl použit stejný postup, ale na kolonku bylo nanášeno 10 µl interních deuteriem značených standardů. Po nanесení vzorku bylo nezbytné udržovat průtok přibližně kapka za sekundu, aby bylo možné jednotlivé analyty zachytit.

Nečistoty byly odstraněny promytím kolonek 10 ml vody a zvýšením tlaku v komoře byl sorbent vysušen do sucha. Analyty byly z kolony vymyty 4 ml elučního činidla (Tab. 4) do připravených zkumavek ve vakuové komůrce. Sorbent byl opět vysušen do sucha zvýšením tlaku.

Zkumavky s analyty byly umístěny do vakuové odparky a odpařeny do sucha. Zkumavka s odparkem byla zaparafinována a umístěna do mrazicího boxu, aby nedocházelo k rozkladu analytů před kvantitativní analýzou.

Tab. 4 Složení elučního činidla

složka	hmotnostní podíl složky
methanol	80 %
voda	18 %
kyselina octová	2 %

3.3.4 Příprava standardů 2-methylthio derivátů cytokininů

Pro přípravu standardních roztoků byly použity standardy od firmy OlChemIm. Do vialek bylo naváženo na 6-ti místných analytických vahách přibližně 0,35 mg každé z látek. Takto navážené standardy byly rozpuštěny ve vypočteném množství (Tab. 5) *N,N*-dimethylformamidu (DMF). Tyto objemy byly pipetovány pomocí hamiltonových pipet o objemech 1 000 a 100 μ l.

Tab. 5 Navážená množství jednotlivých standardů a objem DMF pro požadovanou koncentraci $2 \cdot 10^{-3}$ M

standard	navážené množství (mg)	molekulová hmotnost	objem rozpuštědla (μl)
2MeStZ	0,46	265,34	867
2MeSiP	0,33	249,34	662
2MeStZR	0,35	397,46	440
2MeScZR	0,33	397,46	415
2MeSiPR	0,37	381,46	485
$^2\text{H}_5$ 2MeStZ	0,33	270,34	610
$^2\text{H}_6$ 2MeSiP	0,35	255,34	685
$^2\text{H}_5$ 2MeStZR	0,34	404,46	420
$^2\text{H}_5$ 2MeScZR	0,46	404,46	569
$^2\text{H}_6$ 2MeSiPR	0,34	387,46	439

3.5 Příprava kalibrační řady 2Me-S derivátů cytokininů

Ze zásobního roztoku jednotlivých standardů o koncentraci $2 \cdot 10^{-3}$ M byly připraveny zředovací mezikroky. Ze zásobního roztoku každého z nezačených standardů bylo odpipetováno 75 μ l. Dále bylo přidáno 1 050 μ l DMF a byl připraven zásobní roztok nezačených standardů o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M. Z roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ bylo připraveno odpipetováním 2 μ l a přidáním 198 μ l DMF 200 μ l roztoku o výsledné koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ M.

Při přípravě značených standardů bylo z každého zásobního roztoku odpipetováno 10 μ l a ke 40 μ l bylo přidáno 160 μ l DMF. Z této směsi o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M bylo odpipetován 2 μ l a doplněny 198 μ l DMF na roztok o výsledné koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ M.

Z takto připravených zásobních roztoků byla připravena kalibrační řada značených i nezačených 2MeS derivátů cytokininů dle Tab. 6.

Tab. 6 Kalibrační řada standardů 2MeS cytokininů, pipetované objemy zředěných zásobních roztoků, DMF a výsledné koncentrace jednotlivých bodů kalibrační řady

kalibrační bod	koncentrace (mol.l⁻¹)	koncentrace výchozího roztoku (mol.l⁻¹)	objem směsi nezačených 2MeS cytokininů (μl)	objem směsi deuterovaných 2MeS cytokininů (μl)	objem DMF (celkový objem 100 μl)
1	$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-6}$	1	1	98
2	$0,5 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	5	1	94
3	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	10	1	89
4	$0,5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	50	1	49
5	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-4}$	1	1	98
6	$0,5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	5	1	94
7	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	10	1	89
8	$5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-3}$	2,5	1	84
9	$10 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-3}$	5	1	69

3.6 Kvantitativní UHPLC-MS analýza klasických cytokininů

Odparek po SPE purifikaci byl rozpuštěn ve 150 μ l 80% MeOH. Rozpuštěný vzorek byl zvortexován a poté vložen na 5 minut do ultrazvukové lázně. Poté byl vzorek opět zvortexován. Takto rozpuštěný vzorek byl ze zkumavek napipetován do total-recovery vialek pro HPLC analýzu. Vzorky ve vialkách byly odpařeny na vakuové odparce, při laboratorní teplotě do sucha.

Odparek byl opět rozpuštěn ve 20 μ l mobilní fáze, kterou byly opláchnuty stěny vialky. Takto rozpuštěné vzorky byly centrifugovány po dobu 1-2 minut.

Kvantitativní analýza byla provedena na systému UHPLC s hmotnostní detekcí při podmínkách gradientové eluce (Tab. 7). Jako složka A byla zvolena 15 mM kyselina mravenčí, jejíž pH bylo upraveno roztokem NaOH na hodnotu 4. Jako složka B byl použit methanol.

Na kolonu bylo nastříknuto 10 μ l vzorku, který byl analyzován po dobu 5,50 minut při průtoku 0,5 ml/min a

Tab. 7 Procentuelní zastoupení složky A mobilní fáze v průběhu gradientové eluce

čas (min)	zastoupení složky A
0 - 4,0	90 %
4,0 - 4,2	55 %
4,2 - 4,3	100 %
4,3 - 5,5	90 %

Kvantitativní analýza byla zakončena hmotností detekcí v režimu multiple-reaction-monitoring (MRM) (Tab. 8). Detekce proběhla při napětí kapiláry + 3 kV, teplotě zdroje 120°C a odpařovací teplotě 550 °C. Průtok plynu v kuželu byl 70 l/hod, zatímco průtok odpařovacího plynu byl nastaven na hodnotu 600 l/hod. Jako kolizní plyn byl použit argon o průtoku 0,21 ml/min. Metoda byla převzata od Novák *et al.*, 2008 a modifikována dle možností našich analytických přístrojů.

Tab. 8 Přečody a kolizní energie cytokininů při MRM

cytokinin	přechod	kolizní energie (eV)
iP	204,10 > 136,00	16,0
D ₆ - iP	210,10 > 137,00	16,0
iPR	336,15 > 204,05	18,0
D ₆ - iPR	342,15 > 210,05	18,0
tZ + cZ	220,10 > 136,00	18,0
¹³ C ₅ tZ + ¹³ C ₅ cZ	225,10 > 141,00	16,0
cZR	352,15 > 220,05	16,0
tZR	325,15 > 220,05	19,0
D ₅ tZR	357,15 > 225,05	20,0

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce pojednává v teoretické části o rostlinných hormonech, cytokininech, jejich úloze v rostlinném organismu a při interakci s pathogenní bakterií *Rhodococcus fascians*.

Pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie byly stanoveny profily klasických cytokininů v pěti vybraných kmenech bakterie *R. fascians*. Z těchto profilů je zřejmé, že *fas* operon je nezbytný pro virulenci, ale biosyntetická dráha cytokininů je kódována i v genomové DNA a k produkci cytokininů dochází i v nepřítomnosti *fas* operonu.

Pro zjištění profilů 2-methylthio derivátů cytokininů bylo nutné dokončit vývoj UHPLC-MS/MS metody. Proti původní HPLC-MS/MS je nová metoda rychlejší, selektivnější a citlivější.

S využitím nově optimalizované metody byly stanoveny profily 2-methylthio derivátů cytokininů v pěti kmenech *R. fascians*. Ačkoli absolutní hodnoty hladin hormonů nekorrespondují s dříve publikovanými výsledky Pertry *et al.*, 2009b, poměr mezi volnými bázemi a jejich ribosidy zůstal zachován.

6 LITERATURA

- Abe I., Tanaka H., Abe T., Noguchi H. (2007): Enzymatic formativ of unnatural cytokinin analogs by adenylate isopentenyltransferase from mulberry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**, 795-800
- Acuña I. A., Strobel G. A., Jacobsen B. J., Corsini D. L. (2001): Glucosylation as a mechanism of resistance to thaxtomin A in potatoes. *Plant Science* **161**, 77-88
- Addicott F. T., Lyon J. L. (1969): Physiology of Abscisic Acid and Related Substances. *Annual review of Plant Physiology* **20**, 139-&
- Akiyoshi D., Klee H., Amasino R., Nester E., Gordon M. (1984): T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **81**, 5994-5998.
- Auger C. Han S. W., Appanna V. P., Thomas S. C., Ulibarii G., Appanna V. D. (2013): Metabolic reengineering invoked by microbial systems to decontaminate aluminum: implications for bioremediation technologies. *Biotechnology Advances* **31**, 266-273
- Baltrus D. A., Nishimura M. T., Romanchuk A., Chang J. H., Mukhtar M. S., Cherkis K., Roach J., Grant S. R., Jones C. D., Dangl J. L. (2011): Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *Plos Pathogens* **7**
- Barták P., Ševčík J., Adam T., Friedecký D., Lemr K., Stránský Z. (1998): Study of cytokinin separation using capillary electrophoresis with cyclodextrin additives. *Journal of Chromatography A* **818**, 231-238
- Barták P., Bednář P., Stránský Z., Boček P., Vespalec R. (2000): Determination of dissociation constants of cytokinins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **878**, 249-259
- Béres T., Gemrotová M., Tarkowski P., Ganzera M., Maier V., Friedecký D., Dessoy M. A., Wessjohann L. A., Spíchal L., Strnad M., Doležal K. (2012): Analysis of cytokinin nucleotides by capillary zone electrophoresis with diode array and mass spectrometric detection in a recombinant enzyme *in vitro* reaction. *Analytica Chimica Acta* **751**, 176-181
- Bérdy J. (2005): Bioactive microbial metabolites-a personal view. *Journal of Antibiotics* **58**, 1-26
- Bilyeu K. D., Cole J. L., Laskey J. G., Riekhof W. R., Esparza T. J., Kramer M. D., Morris R. O. (2001): Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology* **125**, 378-386
- Björk G. R., Ericson J. U., Gustafsson C. E. D., Hagervall T. G., Jonsson Y. H., Wikstrom P. M. (1987): Transfer RNA modification. *Annual Review of Biochemistry* **56**, 263-28
- Brown N. A. (1927): Sweet pea fasciation, a form of crown gall. *Phytopathology* **17**, 29-30
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051-1054
- Buck M., Ames B. N. (1984): A modified nucleotide in tRNA as a possible regulator of aerobiosis: Synthesis of *cis*-2-methyl-thioribosylzeatin in the tRNA of *Salmonella*. *Cell* **36**, 523-531
- Chen C. (1987). In: *High Performance Liquid Chromatography in Plant Sciences*. (Linskens H. F., Jackson J. F.), Springer, Berlin, Germany, 23
- Chilton M. D. (2001): *Agrobacterium*. A memoir. *Plant Physiology* **125**, 9-14
- Cohen J. D., Bandurski R. S. (1982): Chemistry and Physiology of the bound Auxins. *Annual review of Plant physiology and Plant molecular biology* **33**, 403-430
- Cornelis K., Ritsema T., Nijssse J., Holsters M., Goethals K., Jaziri M. (2001): The plant pathogen *Rhodococcus fascians* colonizes the exterior and interior of the aerial parts of plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 599-608
- Costacurta A., Vanderleyden J. (1995): Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical reviews in Microbiology* **21**, 1-18

- Crespi M., Messens E., Caplan A. B., Van Montagu M., Desomer J. (1992): Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *The EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal* **11**, 795-804
- Crespi M., Vereecke D., Temmerman W., Van Montagu M., Desomer J. (1994): The *fas* operon of *Rhodococcus fascians* encodes new genes required for efficient fasciation of host plants. *Journal of Bacteriology* **176**, 2492-2501
- Davies P. J. (1995): The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. In: *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology*. 2nd edition, (Davies P. J.), Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, USA, 1-12
- De Cleene M., De Ley J. (1976): The host range of crown gall. *Botanical Review* **42**, 389-466
- De Cleene M., De Ley J. (1981): The host range of infectious hairy-root. *Botanical Review* **47**, 147-194
- De O'Manes C. L., Van Montagu M., Prinsen E., Goethals K., Holsters M. (2001): De novo cortical cell division triggered by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 189-195
- Dees M. W., Wanner L. A. (2012): In search of better management of potato common scab. *Potato Research* **55**, 249-268
- Depuydt S., Putman M., Holsters M., Vereecke D. (2008): *Rhodococcus fascians*, an emerging threat for ornamental crops. In: *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*. 1, (Teixeira da Silva J. A.), Global Science Books, Londýn, 480-489
- Deslandes L., Rivas S. (2012): Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science* **17**, 644-655
- Díaz I., Ehrenberg M. (1991): ms²i⁶A deficiency enhances proofreading in translation. *Journal of Molecular Biology* **222**, 1161-1171
- Dobrev P. I., Kamínek M. (2002): Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **950**, 21-29
- Doležal K., Popa I., Hauserova E., Spichal L., Chakrabarty K., Novak O., Krystof V., Voller J., Holub J. Strnad M. (2007): Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N-6-benzyladenosines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**, 3737-3747
- Emery R. J. N., Leport L., Barton J. E., Turner N. C., Atkins C. A. (1998): Cis-isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. *Plant Physiology* **117**, 1515-1523
- Escobar M. A., Dandekar A. M. (2003): *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* **8**, 380-386
- Faivre-Amiot A. (1967): Quelques observations sur la présence de *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson dans les cultures maraichères et florales en France. *Phytiatrie-Phytopharmacie* **16**, 165-176
- Fisher M. C., Henk D. A., Briggs C. J., Brownstein J. S., Madoff L. C., McCraw S. L., Gurr S. J. (2012): Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**, 186-194
- Fleet Ch. M., Sun T. P. (2005): A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current opinion in plant biology* **8**, 77-85
- Francis I., De Keyser A., De Backer P., Simón-Mateo C., Kalkus J., Pertry I., Ardiles-Diaz W., De Rycke R., Vandeputte O. M., Jaziri M. E., Holsters M., Vereecke D. (2012): pFiD188, the linear virulence plasmid of *Rhodococcus fascians* strain D188. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 637-647
- Galuzska P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001): Cytokinin oxygenase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* **268**, 450-461
- Galuzska P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Kollmer I., Schmülling T., Frébort I. (2007): Biochemical characterization of cytokinin

- Oxidase/Dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 255-267
- Ge L. Y., Yong J. W. H., Tan S. N., Yang X. H., Ong E. S. (2004): Analysis of some cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **1048**, 119-126
- Geftter M. L. (1969): The *in vitro* synthesis of 2'-omethylguanosine and 2-methylthio ⁶N (γ,γ dimethylallyl) adenosine in transfer RNA of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **36**, 435-441
- Gelvin S. B. (1990): Crown gall disease and hairy root disease. A sledgehammer and a tackhammer. *Plant Physiology* **92**, 281-285
- Gillissen B., Burkle L., Andre B., Kuhn C., Rentsch D., Brandl B., Frommer W.B. (2000): A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 291-300.
- Goethals K., Vereecke D., Jaziri M., Van Montagu M., Holsters M. (2001): Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. *Annual Review of Phytopathology* **39**, 27-52
- Goodfellow M. (1984): Reclassification of *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson in the genus *Rhodococcus*, as *Rhodococcus fascians* comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **5**, 225-229
- Grayling A., Hanke D. E. (1992): Cytokinins in Exudates from Leaves and Roots of Red Perilla. *Phytochemistry* **31**, 1863-1868
- Green S., Studholme D. J., Laue B. E., Dorati F., Lovell H., Arnold D., Cottrell J. E., Bridgett S., Blaxter M., Huitema E., Thwaites R., Sharp P. M., Jackson R. W., Kamoun S. (2010): Comparative genome analysis provides insights into the evolution and adaptation of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* on *Aesculus hippocastanum*. *Plos One* **5**
- Grosjean H., Nicoghosian K., Haumont E., Soll D., Cedergren R. (1985): Nucleotide-sequences of 2 serine Transfer-RNAs with a GGA anticodon - the structure-function-relationships in the serine family of *Escherichia coli* Transfer-RNAs. *Nucleic Acids Research* **13**, 5697-5706
- Haas D., Defago G. (2005): Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 307-319
- Hartweck L. M. (2008): Giberrellin signaling. *Planta* **229**, 1-13
- Hättenschwiler S., Fromin N., Barantal S. (2011): Functional diversity of terrestrial microbial decomposers and their substrates. *Comptes Rendus Biologies* **334**, 393-402
- Hausarová E., Swaczynová J., Doležal K., Lenobel R., Popa I., Hajdúch M., Vydra D., Fuksová K., Srnad M. (2005): Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins. *Journal of Chromatography A* **1100**, 116-125
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I. (2010): Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion. *Annals of Microbiology* **60**, 579-598
- Hirano S. S., Upper C. D. (2000): Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 624-653
- Höfte M., De Vos P. (2006): Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: *Plant-Associated Bacteria*. (Gnanamanickam S. S.), Springer, Dordrecht, 507-534
- Horgan R., Scott I. M. (1987): Kapitola 5. In: *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*. (Rivier L., Crozier A.), Academic Press, London, UK, 303
- Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P. I., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006): Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**, 1151-1159
- Joshi M. V., Loria R. (2007): *Streptomyces turgidiscabies* possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 751-758
- Kakimoto T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* **116**, 233-239
- Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Sakakibara H. (2004): Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14049-14054.

- Kennelly M. M., Cazorla F. M., de Vicente A., Ramos C., Sundin G. W. (2007): *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. *Plant Disease* **91**, 4-17
- Kepczynski J. (1988): Use of Different Factors and Methods to Study the Role of Ethylene in the Growth and Development of Plants. *Wiadomosci Botaniczne* **32**, 47-60
- Khan M. S., Zaidi A., Wani P. A., Ahemad M., Oves M. (2009): Functional Diversity Among Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Current Status. In: *Microbial Strategies for Crop Improvement*. (Khan M. S., Zaidi A., Musarrat J.), Springer, Berlin, 105-132
- Kieber J., Schaller G. E. (2014): Cytokinins. *The Arabidopsis book* **12**
- Kim J. G., Park Y. K., Kim S. U., Choi D., Nahm B. H., Moon J. S., Reader J. S., Farrand S. K., Hwang I. Y. (2006): Bases of biocontrol: sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan horse antibiotic that controls crown gall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **103**, 8846-8851
- Kořistka J. (2014): *Izolace 2-methylthio-cytokininů mikroextrakcí polymerním monolitem*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého Olomouc, Česká republika
- Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010): Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 53-60
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655
- Letham D. S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences* **8**, 569-573
- Ljung K., Ostin A., Lioussanne L., Sandberg G. (2001): Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. *Plant physiology* **125**, 464-475
- Ljung K., Hulk A. K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Nonmanly J., Sandberg G. (2005): Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant cell* **17**, 1090-1104
- Loria R., Kers J., Joshi M. (2006): Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 469-487
- Lugtenberg B., Kamilova F. (2009): Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* **63**, 541-556
- Maldiney R., Leroux B., Sabbagh I., Sotta B., Sossountzov L., Miginiac E. A. (1986): A Biotin-Avidin-Based Enzyme-Immunoassay to Quantify 3 Phytohormones - Auxin, Abscisic-Acid and Zeatin-Riboside. *Journal of Immunological Methods* **90**, 151-158
- 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**, 1237-1249
- Mansfeld J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S. V. (2012): Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**, 614-629
- Mathevon C., Pierrel F., Oddou J. L., Garcia-Serres R., Blonclin G., Latour J. M., Menage S., Gambarelli S., Fontecave M., Atta M. (2007): tRNA-modifying MiaE protein from *Salmonella typhimurium* is a nonheme diiron monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **104**, 13295-13300
- Matsumoto-Kitano M., Kusumoto T., Tarkowski P., Kinoshita-Tsujimura K., Vaclavikova K., Miyawaki, K., Kakimoto T. (2008): Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **105**, 20027-20031
- Mazzola M. (2004): Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 35-59
- McHale L., Tan X. P., Koehl P., Michelmore R. W. (2006): Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology* **7**, 212-
- Miller H. J., Janse J. D., Kamerman W., Muller P. J. (1980): Recent observations of leafy gall in *Liliaceae* and some other families. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **86**, 55-68

- Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004): Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin and nitrate. *Plant Journal* **37**, 128-138
- Mok D. W. S., Mok M. C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118
- Nett M., Ikeda H., Moore B. S. (2009): Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports* **26**, 1362-1384
- Nordström A., Takrowski P., Tarkowská D., Norbaek R., Åstot C., Doležal K., Sandberg G. (2004a): Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **101**, 8039-8044
- Nordström A., Takrowski P., Tarkowská D., Doležal K., Åstot C., Sandberg G., Moritz T. (2004b): Derivatization for LC electrospray ionization-MS: A tool for improving reversed-phase separation and ESI responses of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Analytical Chemistry* **76**, 2869-2877
- Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M. (2003): Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **480**, 207-218
- Novák O., Hauserová E., Amakorová P., Doležal K., Strnad M. (2008): Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214-2224
- Nicander B., Stahl U., Bjorkman P. O., Tillberg E. (1993): Immunoaffinity Copurification of Cytokinins and Analysis by High-Performance Liquid-Chromatography with Ultraviolet-Spectrum Detection. *Planta* **189**, 312-320
- O'Brien H. E., Thakur S., Guttman D. S. (2011): Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: a genomics perspective. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 269-289
- OSU Plant Clinic: <http://www.science.oregonstate.edu/> (27. 3. 2015)
- Ontario CropIPM: <http://www.omafra.gov.on.ca/> (27. 3. 2015)
- Pertry I. (2009a): *How the fas locus contributes to Rhodococcus fascians cytokinin production: an in-depth molecular and biochemical analysis*. Disertační práce, Ghent University, Belgie
- Pertry I., Václavíková K., Depuydt S., Galuzska P., Spíchal L., Temmerman W., Stes E., Schmulling T., Kakimoto T., Van Montagu M. C. E., Strnad M., Holsters M., Tarkowski P., Vereecke D. (2009b): Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **106**, 929-934
- Pertry I., Václavíková K., Gemrotová M., Spíchal L., Galuzska P., Depuydt S., Temmerman W., Stes E., De Keyser A., Riefler M., Biondi S., Novák O., Schmulling T., Strnad M., Tarkowski P., Holsters M., Vereecke D. (2010): *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic Fas-mediated production of a cytokinin mix. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1164-1174
- Piotrowska A., Bajguz A. (2011): Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* **72**, 2097-2112
- Preston G. M. (2004): Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Philosophical Transactions of The Royal Society B-Biological Sciences* **359**, 907-918
- Prinsen E., Van Dongen W., Esmans E. L., Van Onckelen H. A. (1998): Micro and capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry: a new dimension in phytohormone research. *Journal of Chromatography A* **826**, 25-37
- Puławska J. (2010): Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: tumorigenic *Agrobacterium* spp.. *Journal of Plant Pathology* **92**, S87-S98
- Putnam M. L., Miller M. L. (2007): *Rhodococcus fascians* in herbaceous perennials. *Plant Disease* **91**, 1064-1076

- Raaijmakers J. M., de Bruijn I., de Kock M. J. D. (2006): Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 699-710
- Rao S. S. R., Vardhini B. V., Sujatha E., Anuradha S. (2002): Brassinosteroids – A new class of Phytohormones. *Current Science* **82**, 1239-1245
- Ravanel S., Gakiere B., Job D., Douce R. (1998): The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **95**, 7805-7812
- Rijavec T., Dermastia M. (2010): Cytokinins and their function in developing seeds. *Acta Chimica Slovenica* **57**, 617-629
- Rodríguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. (2006): Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* **287**, 15-21
- Royal Horticultural Society: www.rhs.org.uk (27. 3. 2015)
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2005): *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **102**, 9972-9977
- Seipke R. F., Kaltenpoth M., Hutchings M. I. (2012): Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme?. *Fems Microbiology Reviews* **36**, 862-876
- Serdani M., Curtis M., Miller M. L., Kraus J., Putnam M. L. (2013): Loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction methods for specific and rapid detection of *Rhodococcus fascians*. *Plant Disease* **97**, 517-529
- Science Oregon State: <http://www.science.oregonstate.edu/> (27. 3. 2015)
- Schmelz E. A., Engelberth J., Alborn H. T., O'Donnell P., Sammons M., Toshima H., Tumlinson J. H. (2003): Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **100**, 10552-10557
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Manns, I.B.y. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of Plant Research* **116**, 241-252
- Schwartz S. H., Qin X. Q., Zeevaert J. A. D. (2003): Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes and enzymes. *Plant physiology* **131**, 1591-1601
- Smith E. F., Townsend C. O. (1907): A Plant Tumor of Bacteria Origin. *Science* **25**, 671-673
- Sondheimer E., Tzou D. S., Galson E. C. (1968): Abscisic Acid Levels and Seed Dormancy. *Plant Physiology* **43**, 1443-1447
- Stes E., Prinsen E., Holsters M., Vereecke D. (2012): Plant-derived auxin plays an accessory role in symptom development upon *Rhodococcus fascians* infection. *Plant Journal* **70**, 513-527
- Stes E., Francis I., Pertry I., Dolzblasz A., Depuydt S., Vereecke D. (2013): The leafy gall syndrome induced by *Rhodococcus fascians*. *Fems Microbiology Letters* **342**, 187-195
- Svačinová J., Novák O., Plačková L., Lenobel R., Holík J., Strnad M., Doležal K. (2012): A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* **8**, 17
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866-41872
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2003): A method for separation and determination of cytokinin nucleotides from plant tissues. *Journal of Plant Research* **116**, 265-269
- Tamogami S., Ralkwal R., Agrawal G. K. (2008): Interplant communication: Airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **376**, 723-727
- Tarkowski P., Ge L. Y., Yong J. W. H., Tan S. N. (2009): Analytical methods for cytokinins. *Trends in Analytical Chemistry* **28**, 323-335

- Tarkowski P., Václavíková K., Novák O., Pertry I., Hanuš J., Whenham R., Vereecke D., Šebela M., Strnad M. (2010): Analysis of 2-methylthio-derivatives of isoprenoid cytokinins by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **680**, 86-91
- Tarkowski P., Vereecke D. (2013): Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances* **32**, 215-229
- Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978): 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545-547
- Tilford P. E. (1936): Fasciation of sweet peas caused by *Phytomonas fascians* n. sp.. *The Journal of Agriculture Research* **53**, 383-394
- Toro F. J., Martin-Closas L., Pelacho A. M. (2003): Jasmonates promote cabbage (*Brassica oleracea* L. var *Capitata* L.) root and shoot development. *Plant and Soil* **255**, 77-83
- Trione E. J., Banowitz G. M., Krygier B. B., Kathrein J. M., Sayavedra-Soto L. A. (1987): A Quantitative Fluorescence Enzyme-Immunoassay for Plant Cytokinins. *Analytical Biochemistry* **162**, 301-308
- Tsavkelova E. A., Klimova S. Y., Cherdyntseva T. A., Netrusov A. I. (2006): Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use. *Applied Biochemistry and Microbiology* **42**, 117-126
- Van Rhijn J. A., Heskamp H. H., Davelaar E., Jordi W., Leloux M. S., Brinkman U. A. T. (2001): Quantitative determination of glycosylated and aglycon isoprenoid cytokinins at sub-picomolar levels by microcolumn liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **929**, 31-42
- Vereecke D., Burssens S., Simon-Mateo C., Inze D., Van Montagu M., Goethals K., Jaziri M. (2000): The *Rhodococcus fascians*–plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. *Planta* **210**, 241-251
- Vereecke D., Cornelis K., Temmerman W., Jaziri M., Van Montagu M., Holsters M., Goethals K. (2002): Chromosomal locus that affects the pathogenicity of *Rhodococcus fascians*. *Journal of Bacteriology* **184**, 1112-1120
- Vick B. A., Zimmerman D. C. (1984): Biosynthesis of Jasmonic acid by several Plant-Species. *Plant Physiology* **75**, 458-461
- Wang K. L. C., Li H., Ecker J. R. (2002): Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* **14**, 131-151
- Werner T., Kollmer I., Bartrina I., Holst K., Schmölling T. (2006): New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology* **8**, 371-381
- Woodward A. W., Bartel B. (2005): Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* **95**, 707-735
- Wu S. C., Cao Z. H., Li Z. G., Cheung K. C., Wong M. H. (2005): Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* **125**, 155-166
- Wurgler-Murphy S. M., Saito H. (1997): Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 172-176
- Yamaguchi S. (2006): Gibberellin biosynthesis in Arabidopsis. *Phytochemistry reviews* **5**, 39-47
- Yokota T. (1997): The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends in plant science* **2**, 137-143

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2MeScZ	-	2-Methylthio- <i>cis</i> -zeatin
2MeSiP	-	2-Methylthio-isopentenyladenin
2MeStZ	-	2-Methylthio- <i>trans</i> -zeatin
4-Cl-IAA	-	kyselina 4-chlor-indol-3-octová
ABA	-	kyselina abscisová
ACN	-	acetonitril
ADP	-	adenosindifosfát
AMP	-	adenosinmonofosfát
ATP	-	adenosintrifosfát
BA	-	benzyladenin
CE	-	kapilární elektroforéza
CKX	-	cytokininoxidasa/dehydrogenasa
<i>cZ</i>	-	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZR</i>	-	<i>cis</i> -zeatinribosid
DMAPP	-	dimethylallylpyrofosfát
DMF	-	dimethylformamid
ELISA	-	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	-	ionizace elektrospřejem
FAD	-	flavinadenindinukleotid
GA1	-	giberelin
GC	-	plynová chromatografie
HMBDP	-	4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyldifosfát
HPLC	-	vysoce-účinná kapalinová chromatografie
IAA	-	kyselina indol-3-octová
IBA	-	kyselina indol-3-máselná
iP	-	isopentenyladenin
iPMP	-	N ⁶ -(Δ^2 -isopentenyl)-adenosin-5'-monofosfát
iPR	-	isopentenyladenosin
iPRTP	-	isopentenyladenosin-5'-trifosfát
LC	-	kapalinová chromatografie
MS	-	hmotnostní spektrometrie
PAA	-	kyselina fenyloctová
RP	-	obrácená fáze
SAM	-	S-adenosylmethionin
SPE	-	purifikace na pevné fázi
tRNA	-	transferová ribonukleotidová kyselina
<i>tZ</i>	-	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZR</i>	-	<i>trans</i> -zeatinribosid
UHPLC	-	ultra-účinná kapalinová chromatografie