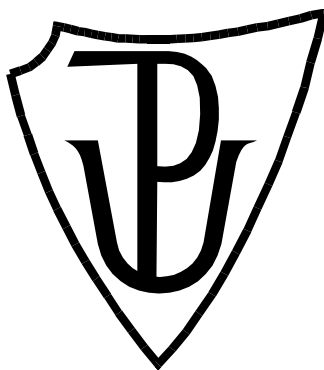


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Vliv intenzity světla na množství cytokininů v intaktních
rostlinách *Arabidopsis thaliana*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Petra Kocmánková**

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.**

Termín odevzdání práce: 2020

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Petra Kocmánková
Název práce:	Vliv intenzity světla na množství cytokininů v intaktních rostlinách <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Abstrakt:	Bakalářská práce se zabývá stanovením endogenních hladin cytokininů v intaktní rostlině <i>Arabidopsis thaliana</i> , u které byl ovlivněn její růst různou intenzitou světla. K purifikaci byla použita miniaturizační metoda Stagetip, umožňující stanovení koncentračních hladin v minimálním množství rostlinného materiálu. Ke stanovení hladin cytokininů byla jako analytická koncovka použita vysoce-účinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.
Klíčová slova:	Cytokinininy, <i>Arabidopsis thaliana</i> , Stagetip purifikace, SPE-purifikace, UHPLC-MS/MS
Počet stran:	46
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Petra Kocmánková

Title of thesis: Influence of light intensity on cytokinins content in intact plant *Arabidopsis thaliana*

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of Growth regulators

Supervisor: Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract: Thesis is focused on determination of endogenous levels of cytokinins content in intact plant *Arabidopsis thaliana*, whilst its growth was influenced by different light intensity. A miniaturized StageTips purification method was used, which allows us to determine endogenous levels in minute amounts of plant material. CKs were determined by ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

Keywords: cytokinin, *Arabidopsis thaliana*, Stagetips, SPE-purification, UHPLC-MS/MS

Number of pages: 46

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne.....

.....

Petra Kocmánková

Poděkování

Tato bakalářská práce byla realizována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2020_010). Tímto bych chtěla poděkovat zejména vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Lence Plačkové, Ph.D. za její ochotu a pomoc při vypracování jak teoretické, tak praktické části.

Obsah

Seznam zkratek	7
1 Úvod a cíle práce	9
2 Teoretická část	10
2.1 Cytokininy	10
2.2 Chemická struktura	10
2.3 Biosyntéza	13
2.4 Metabolismus cytokininů	14
2.5 Funkce cytokininů	16
2.5.1 Dělení buněk	16
2.5.2 Apikální dominance	17
2.5.3 Senescence	17
2.5.4 Regenerace orgánů	18
2.6 Cytokininy a abiotický stres	18
2.6.1 Světlo jako abiotický faktor	19
2.6.2 Reakce cytokininů na světelný stres	19
2.7 Metody analýzy cytokininů	20
3 Experimentální část	23
3.1 Chemikálie	23
3.2 Přístroje	24
3.3 Rostlinný materiál	25
3.4 Výsev, kultivace a sběr	25
3.5 Mikroextrakce a Purifikace	26
3.6 Identifikace a stanovení	27
4 Výsledky	28
5 Diskuse	40
6 Závěr	41
7 Literatura	42

Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
B	cytokininové báze
BA	benzyladenin
C18	oktadecylová fáze vázaná na nosiči
CDK	cyklin-dependentní kináza
CK	cytokininy
CKX	cytokininoxidáza/dehydrogenáza
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZ7G</i>	<i>cis</i> -zeatin-7-glukosid
<i>cZ9G</i>	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid
<i>cZOG</i>	<i>cis</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid
<i>cZR5'MP</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
<i>cZROG</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
DHZ	dihydrozeatin
DHZ7G	dihydrozeatin-7-glukosid
DHZOG	dihydrozeatin <i>O</i> -glukosid
DHZR5'MP	dihydrozeatin ribosid-5'-monofosfát
DMAPP	dimethylalylidifosfát
ESI	ionizace elektrospřejem
FW	hmotnost čerstvé hmoty
GC-MS	plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
HPLC	vysoce-účinná kapalinová chromatografie
IAC	imunoafinitní chromatografie
iP	isopentenyladenin
iP7G	isopentenyladenin-7-glukosid
iP9G	isopentenyladenin-9-glukosid
iPR	isopentenyladin ribosid
iPR5'MP	isopentenyladenin ribosid-5'-monofosfát
IPT	isopentenyltransferáza

IS	interní standard
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
LOG	lonely guy
MCX	směsná fáze kombinující kationtově-výměnný nosič s reverzní fází
MEP	methylerythritolfosfátová dráha
MRM	selektivní záznam více iontových reakcí
mT	<i>meta</i> -topolin
MVA	mevalonová dráha
NG	cytokininové <i>N</i> -glukosidy
NT	cytokininové nukleotidy
OG	cytokininové <i>O</i> -glukosidy
oT	<i>ortho</i> -topolin
R	cytokininové ribosidy
SDB-RPS	styren-divinylbenzenový kopolymer
SPE	extrakce tuhou fází
tRNA	transportní ribonukleová kyselina
tRNA-IPT	tRNA-isopentenyltransferáza
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZ7G</i>	<i>trans</i> -zeatin-7-glukosid
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid
<i>tZOG</i>	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid
<i>tZR5'MP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
<i>tZROG</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
UDPG	uridindifosfátglukóza
UDPX	uridindifosfát xylóza
UHPLC	ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie
UHPLC-MS/MS	ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
WT	wild-type

1 Úvod a cíle práce

Rostlinné hormony jsou organické látky, podílející se na množství fyziologických procesů, které probíhají v rostlinném organismu.

Nejprve byly definovány jako sloučeniny, které jsou transportovány z jedné části organismu do druhé (Went & Thimann, 1937). Tento popis vychází z konceptu savčích hormonů, ovšem po dalším zkoumání není přesně platný pro rostlinné hormony, jelikož ty mohou být jak transportovány do různých rostlinných tkání, tak mohou působit ve tkáni, ve které byly syntetizovány (Davies, 2010). Nyní jsou rostlinné hormony definovány jako skupina přirozeně se vyskytujících sloučenin ovlivňující fyziologické procesy při nízkých koncentracích (Davies, 2010).

Rostlinné hormony jsou již téměř celé staletí značně zkoumány a díky těmto výzkumům došlo k objevení množství nových informací o jejich funkci a struktuře. Pomocí neustále se vyvíjejících nových analytických metod jsme schopni lépe zkoumat rostlinné hormony do hloubky a tyto získané informace o jejich účincích poté využít v dalších vědních oborech.

Cílem této bakalářské práce je seznámit se s rostlinnými hormony se zaměřením na cytokinininy. Součástí práce je také aplikace purifikačních a analytických metod pro stanovení endogenních hladin daných cytokininů u 10-ti denních rostlin *Arabidopsis thaliana*, pěstovaných za upravené intenzity světla - normální intenzity (kontrola), 10krát snížené intenzity a ve tmě. *Arabidopsis thaliana* je významným modelovým organismem ve výzkumu. Pro stanovení a kvantifikaci endogenních hladin cytokininů byla využita metoda tzv. Stagetip purifikace, která byla doplněna o citlivou analytickou techniku UHPLC-MS/MS.

2 Teoretická část

2.1 Cytokininy

Cytokininy (CK) jsou významná skupina rostlinných hormonů, které zastávají mnoho funkcí v rostlinách. Jsou hlavními regulátory dělení buněk, ovlivňují senescenci listů, apikální dominanci, vývoj květu nebo klíčení semen (Procházka et al., 1998).

V roce 1913 přišel Gottlieb Haberlandt jako první s myšlenkou, že existuje specifický faktor, který pozitivně reguluje dělení buněk (Miller et al., 1955). Při svém pokusu si povšiml, že rozpuštěné látky putující floémem vyvolávají dělení buněk u nedělícího se parenchymatického pletiva bramboru (Kamínek, 2015). V 50. letech minulého století Folke Skoog a jeho spolupracovníci testovali látky, které měly schopnost dělit tkáň u tabáku. Při svém výzkumu zjistili, že jedna z bází nukleových kyselin, adenin, má podporující efekt na dělení buněk. Jako první CK byl objeven derivát adeninu, 6-furfurylaminopurin, který pojmenovali kinetin. Kinetin ovšem není přirozeně se vyskytující rostlinný regulátor, ale je produktem oxidace DNA (Kamínek, 2015; Miller et al., 1956).

V roce 1955 Skoog se svými kolegy navrhl obecný pojem kininy pro látky, které vykazovaly stejný typ biologické aktivity jako kinetin. Posléze ale název změnili na cytokininy, protože často docházelo k záměně s živočišnými kininy (Skoog et al., 1965).

První přirozeně se vyskytující cytokinin byl objeven Lethamem, který dokázal z endospermu mladé kukuřice získat látku v krystalické formě, která má aktivitu podobnou kinetinu. Jednalo se o *trans*-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin a pojmenoval ji zeatin (Letham, 1973).

Od doby jejich objevu jsou CK intenzivně studovány, kdy bylo objeveno množství nových látek patřících do této skupiny a v současnosti probíhá množství výzkumů zabývajících se funkcí těchto fytohormonů. (Spíchal, 2012).

2.2 Chemická struktura

Přírodní CK jsou deriváty purinové báze - adeninu, kde na dusíku N⁶ mají substituovaný postranní řetězec, který může být isoprenoidní nebo aromatický. Isoprenoidní řetězec může být nasycený nebo nenasycený (Spíchal, 2012). Mezi těmito CK převažují CK s nenasyceným vedlejším řetězcem (Mok & Mok, 2001). Podmínkou biologické aktivity CK

je jejich konfigurace. Je prokázáno, že CK s nenasyceným isoprenoidním řetězcem jsou aktivnější než ty s nasyceným řetězcem (Procházka et al., 1998). Téměř všechny organismy jsou schopné CK tvořit, ovšem pouze u rostlin je známo, že mají přímý vliv na signalizaci a růst buněk (Kieber & Schaller, 2018).

CK jsou v rostlinách obsaženy při velmi nízkých koncentracích, v rozsahu fmol – pmol na gram čerstvé hmoty (FW). Mohou se vyskytovat ve více formách, a to jako volné báze, nukleosidy, nukleotidy, *N*-glukosidy nebo *O*-glukosidy. CK podle svých metabolitů mohou být rozděleny do tří hlavních kategorií: aktivní formy, translokační formy a zásobní a inaktivované formy (Davies, 2010).

Za aktivní formy jsou považovány volné báze. K tomuto závěru se došlo po provedení biotestu za použití *Funaria Hygrometrica*, kdy volné báze jako *tZ* a *iP* byly aktivnější oproti jejich ribosidům (Sakakibara, 2010; Spiess, 1975). Nukleosidy jsou díky jejich množství v xylému a floému brány jako translokační formy. Sacharidové konjugáty (*O*-glukosidy, *N*-glukosidy) jsou považovány za zásobní a inaktivované formy CK (Sakakibara, 2010).

Nejběžnějšími isoprenoidními CK u rostlin jsou *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenin (*iP*) a dihydrozeatin (DHZ) (Sakakibara, 2006). Isoprenoidní CK mají navázaný postranní isopentenylový řetězec (Feng et al., 2017). Nejhojněji se vyskytujícím CK je zeatin, který má hydroxylovaný postranní řetězec a díky přítomnosti dvojně vazby se může vyskytovat ve dvou isomerních formách, *cis* a *trans*. Ve vyšších rostlinách se vyskytují obě tyto formy, které jsou schopné měnit svou konfiguraci na základě enzymu zeatin isomerázy. *Trans*-zeatin má vyšší biologickou aktivitu, ovšem i *cis*-zeatin zastává v rostlinách významnou roli (Taiz & Zeiger, 2006).

Aromatické CK mají na N^6 - pozici navázanou benzylovou nebo hydroxybenzylovou skupinu. Do této skupiny se řadí benzyladenin (BA), topoliny a kinetin. Topoliny jsou hydroxy-deriváty benzyladeninu (Spíchal, 2012), z nichž mezi nejvíce aktivní patří *meta*-topolin (*mT*), *ortho*-topolin (*oT*), a methoxy-deriváty BA (Feng et al., 2017; Strnad, 1997; Tarkovská et al., 2003). Aromatické deriváty se v rostlinách vyskytují jen omezeně.

Kromě přirozeně se vyskytujících CK existují také synteticky připravené CK. Do této skupiny se řadí zejména deriváty odvozené od fenyločoviny. Tyto sloučeniny mají aktivitu srovnatelnou se zeatinem a jsou stabilnější (Mok & Mok, 2001). Nejaktivnější jsou *N,N'*-difenyločovina, *N*-fenyl-*N'*-pyridyločovina a tidiaruzon (Procházka et al., 1998).

General structure of CKs	R ₁	R ₂	R ₃	Compound	Abbreviation
	H	H	-	<i>N</i> -isopentenyladenine	iP
	N ₀ -R	H	-	<i>N</i> ^δ -isopentenyladenosine	iPR
	N ₇ -G	H	-	<i>N</i> ^δ -isopentenyladenine-7-glucoside	iP7G
	N ₉ -G	H	-	<i>N</i> ^δ -isopentenyladenine-9-glucoside	iP9G
	N ₉ -RP	H	-	<i>N</i> ^δ -isopentenyladenosine-5'-monophosphate	iPMP
	H	H	H	<i>trans</i> -zeatin	tZ
	N ₀ -R	H	H	<i>trans</i> -zeatin riboside	tZR
	N ₇ -G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-7-glucoside	tZ7G
	N ₉ -G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-9-glucoside	tZ9G
	H	G	G	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glucoside	tZOG
	N ₀ -R	G	G	<i>trans</i> -zeatin riboside <i>O</i> -glucoside	tZROG
	N ₉ -RP	H	H	<i>trans</i> -zeatin riboside-5'-monophosphate	tZMP
	H	H	H	<i>cis</i> -zeatin	cZ
	R	H	H	<i>cis</i> -zeatin riboside	cZR
	N ₉ -G	H	H	<i>cis</i> -zeatin-9-glucoside	cZ9G
	H	G	G	<i>cis</i> -zeatin <i>O</i> -glucoside	cZOG
	N ₉ -R	G	G	<i>cis</i> -zeatin riboside <i>O</i> -glucoside	cZROG
	N ₉ -RP	H	H	<i>cis</i> -zeatin riboside-5'-monophosphate	cZMP
	H	H	H	dihydrozeatin	DHZ
	N ₀ -R	H	H	dihydrozeatin riboside	DHZR
	N ₉ -G	H	H	dihydrozeatin-9-glucoside	DHZ9G
	H	G	G	dihydrozeatin <i>O</i> -glucoside	DHZOG
	N ₀ -R	C	C	dihydrozeatin riboside <i>O</i> -glucoside	DHZROC
	N ₉ -RP	H	H	dihydrozeatin riboside-5'-monophosphate	DH7MP
	H	-	-	<i>N</i> ^δ -benzyladenine	BA
	N ₀ -R	-	-	<i>N</i> ^δ -benzyladenosine	BAR
	N ₃ -G	-	-	<i>N</i> ^δ -benzyladenine-3-glucoside	BA3G
	N ₇ -G	-	-	<i>N</i> ^δ -benzyladenine-7-glucoside	BA7G
	N ₉ -G	-	-	<i>N</i> ^δ -benzyladenine-9-glucoside	BA9G
	N ₉ -C	-	-	<i>N</i> ^δ -benzyladenine-9-glucoside	BA9C
	N ₉ -RP	-	-	<i>N</i> ^δ -benzyladenosine-5'-monophosphate	BAMP
	H	-	-	<i>ortho</i> -topolin	oT
	N ₀ -R	-	-	<i>ortho</i> -topolin riboside	oTR
	N ₉ -G	-	-	<i>ortho</i> -topolin-9-glucoside	oT9G
	H	-	-	<i>meta</i> -topolin	mT
	N ₀ -R	-	-	<i>meta</i> -topolin riboside	mTR
	N ₉ -G	-	-	<i>meta</i> -topolin-9-glucoside	mT9G
	H	-	-	<i>para</i> -topolin	pT
	N ₀ -R	-	-	<i>para</i> -topolin riboside	pTR
	H	-	-	kinetin	K
	N ₀ -R	-	-	kinetin riboside	KR
	N ₉ -G	-	-	kinetin-9-glucoside	K9G

Obr. 1: Struktura isoprenoidních a aromatických cytokininů. Převzato z: Svačinová *et al.*, 2012

H = vodík, R = β -D-ribofuranosyl, G = β -D-glukopyranosyl, RP = β -D-ribofuranosyl-5-monofosfát.

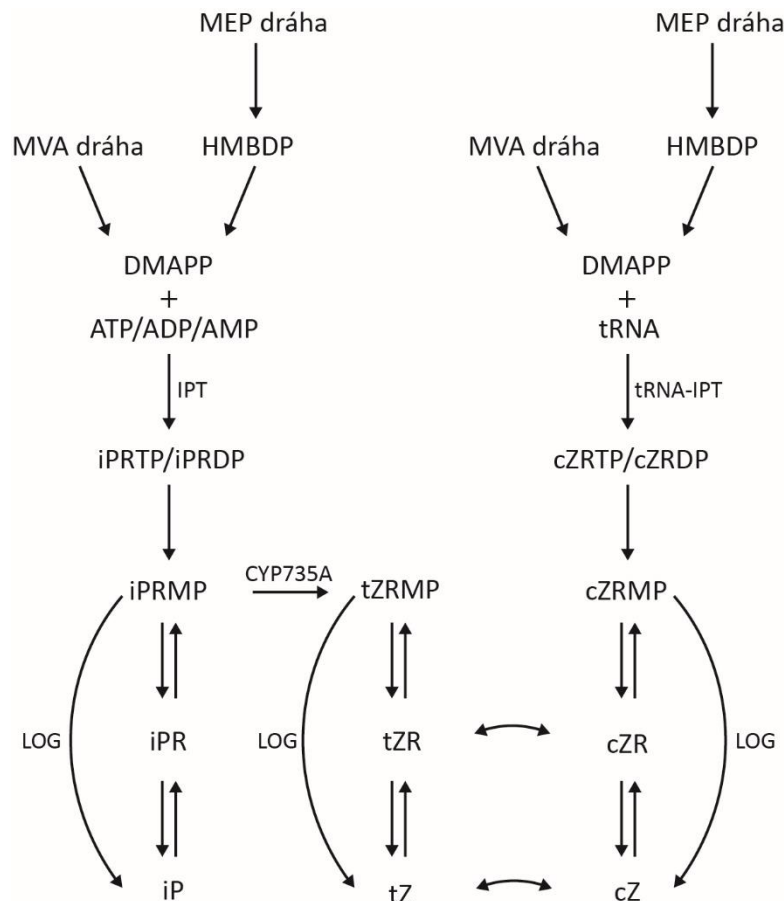
2.3 Biosyntéza

CK vznikají zejména v kořenové špičce, ovšem poslední studie naznačují, že k syntéze může docházet v různých částech rostliny (Smith et al., 2017). Biosyntéza CK je možná dvěma různými drahami, kdy jedna dráha syntetizuje CK *de novo* (tzv. přímá dráha), za to druhá dráha vytváří CK degradací tRNA (Feng et al., 2017; Haberer & Kieber, 2002). Zjednodušené schéma biosyntézy CK je zobrazeno na obr. 2.

V přímé dráze je prvním krokem isopentenylace adenosinu přenosem isopentenylového úseku z dimethylallyldifosfátu (DMAPP) na ATP, ADP nebo AMP (Taiz et al., 2006, Sakakibara, 2006). Enzymem katalyzujícím tento přenos je isopentenyltransferáza (IPT) (Kakimoto, 2003). IPT využívá DMAPP vznikající ze dvou alternativních drah. První je methylethylerythritolfosfátová dráha (MEP), která probíhá v plastidech, druhá je mevalonová dráha (MVA), probíhající v cytosolu (Kasahara et al., 2004). U *Arabidopsis* podle studií vzniká většina CK *tZ*-typu pomocí MEP dráhy (Kasahara et al. 2004; Kieber & Schaller, 2014). Po navázání isopentenylového úseku na ATP, ADP nebo AMP vznikají isopentenylfosfáty (iPRTP, iPRDP, iPRMP), které mohou být pomocí enzymu cytochromu P450 CYP735A přeměněny na *tZ* hydroxylací vedlejšího řetězce (Kieber & Schaller, 2014). Přeměna cytokininových ribotidů do jejich volné aktivní formy je zprostředkována dvěma drahami, kdy první využívá jedноступňové reakce pomocí enzymů patřících do rodiny LONELY GUY (LOG). Druhá dvoustupňová dráha je založena na hydrolýze nukleotidů, kdy se nejprve odštěpí fosfátová skupina a v druhém kroku dochází k odštěpení sacharidové jednotky (Feng et al., 2017).

Dráha, při které CK vznikají pomocí tRNA, je nejprve katalyzována tRNA isopentenyltransferázou (tRNA-IPT), která naváže isopentenylový řetězec z DMAPP na N⁶- pozici nukleotidu napojeného na 3'-konec antikodon tRNA (Feng et al., 2017). Vznik aktivních forem je poté stejný jako u přímé dráhy. Produktem dráhy využívající tRNA jsou zejména *cis* formy cytokininů.

O biosyntéze aromatických cytokininů toho prozatím není mnoho známo, ale přítomnost jak volných forem, tak nukleosidů, nukleotidů a glukosidů naznačuje, že alespoň část jejich metabolické dráhy je podobná jako u isoprenoidních CK. Ovšem katalytické enzymy, které by ovlivňovaly syntézu aromatických CK, zatím nebyly objeveny (Feng et al., 2017).



Obr. 2: Schéma biosyntézy cytokininů (upraveno dle Spíchal, 2012): Přímá dráha – přenos isopentenylového řetězce z DMAPP na ATP/ADP/AMP katalyzován isopentenyl transferázou (IPT) za vzniku isopentenylribosidů. Následuje odštěpení fosfátové skupiny za vzniku iPRMP, který se dále přeměňuje přes iPR na iP, nebo se může přeměnit přímo na iP za pomoci enzymu LONELY GUY (LOG). iPRMP se za pomoci enzymu P450 cytochromoxidázy (CYPP'735A) přeměňuje na tZRMP, který se dále přeměňuje analogicky. Nepřímá dráha – reakce DMAPP s tRNA katalyzována enzymem tRNA-isopentenyltransferázou (tRNA-IPT). Dále analogicky s přímou dráhou. Může být také zapojen enzym zeatinizomeráza, který zajišťuje přeměnu mezi tZ a cZ.

2.4 Metabolismus cytokininů

CK jsou metabolizovány v rostlinách pomocí různých modifikací, které se dějí na molekule adeninu nebo na postranním řetězci. Modifikace jsou strukturní změny, které vedou ke snížení nebo zvýšení jejich aktivity a tím k jejich regulaci (Spíchal, 2012). K modifikaci na adeninu patří fosforylace, defosforylace, *N*-glykosylace a *N*-alanylace. Na postranním řetězci dochází k *O*-glykosylaci (Feng et al., 2017).

Přeměnu mezi bází, nukleosidem a nukleotidem zajišťují enzymy purinového metabolismu, i když obvykle mají vyšší afinitu vůči adeninu, adenosinu a AMP, než vůči cytokininům (Mok & Mok, 2001). Mezi tyto enzymy patří 5'-nukleotidáza,

adenosinnukleosidáza, adenosinfosforyláza, adeninfosforibosyltransferáza a adenosinkináza (Spíchal, 2012). 5' nukleotidáza přeměňuje CK z nukleotidů na volné báze. Adenosinfosforyláza formuje nukleosidy z volných bází CK. Nukleotidy mohou být vytvořeny z nukleosidů pomocí adenosinkinázy, nebo přímo z volných bází adeninfosforibosyltransferázou (Mok & Mok, 2001).

U *N*-glykosylace se na N^3 -, N^7 - nebo N^9 - pozici adeninu připojuje sacharidová část pomocí enzymu *N*-glukosyltransferázy (Feng et al., 2017). K navázání dochází prioritně v poloze N^7 -, ale poměr relativních množství N^7 - a N^9 -glukosidů se liší u různých typů cytokininů (Mok & Mok, 2001). *N*-glykosylací dochází k inaktivaci cytokininu, kdy v biotestech *N*-glukosidy, kromě N^3 -glukosidů, nevykazují žádnou aktivitu (Taiz et al., 2006), ovšem N^3 -glukosidy mohou být přeměněny na volné báze pomocí β -glukosidázy (Brzobohatý et al., 1993; Spíchal, 2012). Tato modifikace se považuje za nevratnou, protože prozatím nebyly v rostlinách objeveny *N*-glukosylhydrolázy (Feng et al., 2017). Jedná se o inaktivační cestu zejména pro CK, které nejsou oxidačně odbourávány, jako jsou aromatické CK a CK s nasyceným vedlejším řetězcem (DHZ) (Procházka et al., 1998).

N-alanylace je proces, při kterém se na N^9 - pozici adeninu váže alanylový řetězec za pomoci transferázy, čímž dochází k inaktivaci molekuly. Donorem je *O*-acetyl-L-serin (Mok & Mok, 2001). Fyziologický význam této modifikace zatím není zcela znám (Sakakibara, 2010).

O-glykosylace hraje velkou roli v regulaci hladiny aktivních cytokininů. Dochází k navázání sacharidové části na hydroxylovou skupinu zeatinového a dihydrozeatinového postranního řetězce. Prozatím jsou známy dvě *O*-glukosyltransferázy, a to *O*-glukosyltransferáza, která jako donor sacharidové části využívá UDPG (uridindifosfátglukóza) a UDPX (uridindifosfátxyulóza), a *O*-xylosyltransferáza, která jako donor využívá pouze UDPX. Tyto enzymy jsou vysoce specifické, rozpoznávají jen zeatin a dihydrozeatin. Vysoká specifita enzymů naznačuje, že *O*-glykosylace je přesně regulovaný proces (Mok & Mok, 2001; Spíchal, 2012). Takto vznikají inaktivní zásobní formy CK, které mohou být zpětně aktivovány enzymem β -glukosidázou (Taiz & Zeiger, 2006).

Mezi další modifikace postranního řetězce zeatinu patří jeho nasycení a izomerace. Při nasycení dochází ke vzniku dihydrozeatinu za pomoci enzymu reduktázy. Tento enzym je schopný redukovat dvojnou vazbu postranního řetězce zeatinu (Spíchal, 2012) a je vysoce specifický k volné formě *trans*-zeatinu. Isomerací dochází k přeměně *cis*-formy na *trans*-formu zprostředkovanou isomerázou (Mok & Mok, 2001).

V průběhu metabolismu CK může docházet také k jejich degradaci. Ta je zprostředkována převážně oxidací cytokininoxidázou/dehydrogenázou (CKX), která katalyzuje odštěpení N^6 -isoprenoidního postranního řetězce a vzniká adenin. Substráty CKX jsou volné formy zeatinu, iP a jejich ribosidy, nukleosidy a *N*-glukosidy (Mok & Mok, 2001; Procházka et al., 1998). Také aromatické cytokinininy jsou oxidovány, ovšem s nižší reakční rychlostí (Frébertová et al., 2004; Galuszka et al., 2007; Spíchal, 2012). *O*-glukosidy a CK s nasyceným postranním řetězcem (DHZ) jsou vůči CKX rezistentní (Procházka et al., 1998; Sakakibara, 2010).

2.5 Funkce cytokininů

I když se za hlavní účinek CK považuje jejich vliv na buněčné dělení, tak dále mohou ovlivňovat, ať už stimulovat nebo inhibovat, velké množství fyziologických, metabolických, biochemických a vývojových procesů v rostlinném organismu (Taiz & Zeiger, 2006). Mezi procesy regulované CK patří zejména dělení buněk, apikální dominance, senescence listů, vývoj květů a klíčení semen.

2.5.1 Dělení buněk

Stimulace buněčného dělení je jedním z hlavních účinků CK. Jejich vyšší hladiny je možné najít ve všech meristematických tkáních, které obsahují rychle se dělící buňky. Oproti tomu se nízké hladiny vyskytují v tkáních, kde je buněčný cyklus zastavený (Kieber & Schaller, 2014; Mok & Mok, 2001). CK jsou schopné stimulovat cyklin-dependentní kinázy (CDK), a kromě toho mají také významný vliv na replikaci DNA v S-fázi buněčného cyklu, kdy zvyšují množství počátků replikace, čímž dochází k urychlení přepisu DNA (Procházka et al., 1998).

Stejně jako ostatní eukaryotní organismy, i rostliny obsahují enzymy CDK a jejich regulační podjednotky, cykliny, které jsou důležité pro regulaci buněčného cyklu. Gen *Cdc2*, který kóduje hlavní CDK, je regulován auxinem. Takto indukovaný enzym je ovšem inaktivován a k jeho aktivaci je potřeba odstranit fosfátovou skupinu z jeho molekuly za pomoci enzymu fosfatázy *Cdc25*, která je aktivována za pomoci CK. Zde můžeme vidět potenciální propojení mezi auxiny a CK, které takto regulují přechod z G2-fáze do M-fáze buněčného cyklu (Taiz & Zeiger, 2006).

CK také zvyšují expresi genu *CYCD3*, který kóduje cykliny typu D (Soni et al., 1995, Taiz & Zeiger, 2006). To představuje důležitý mechanismus schopnosti CK stimulovat dělení buněk právě přes navýšení exprese daného genu (Taiz & Zeiger, 2006).

2.5.2 Apikální dominance

Apikální dominance je jev definován jako nadvláda vrcholu lodyhy nad postranními pupeny. Tento proces je řízený auxiny, které inhibují růst laterálních pupenů. Naproti tomu CK působí jako antagonisté auxinů, kdy potlačují apikální dominanci a stimulují větvení stonku (Procházka et al., 1998). Tato hypotéza byla ověřena u rostlinných mutantů, u kterých docházelo k nadprodukcí CK, kdy tyto mutanti byli více rozvětvení. (Taiz & Zeiger, 2006).

U rostlin se vyskytují 2 apikální meristémy: apikální meristém stonku (SAM - shoot apical meristem) a apikální meristém kořene (RAM - root apical meristem). Tyto vrcholy obsahují meristématické buňky schopné se dělit. CK zastávají v těchto meristémech různou funkci, kdy v případě stonkového meristému stimulují proliferaci buněk, u kořenového meristému stimulují jejich diferenciaci (Kieber & Schaller, 2014).

2.5.3 Senescence

Senescence je proces, při kterém dochází k odumírání listů, kdy listy postupně ztrácí chlorofyl, RNA, lipidy a proteiny. CK jsou schopny senescenci oddalovat, což můžeme nejlépe demonstrovat na segmentech listů, kdy listy ošetřeny CK zůstávají stále zelené, přestože ostatní listy žloutnou a odumírají (Procházka et al., 1998). Mladé listy jsou schopné si vytvářet vlastní CK, ovšem dospělé listy netvoří téměř žádné, čili potřebují CK transportované z kořenů, aby mohli oddálit senescenci (Taiz & Zeiger, 2006).

Vliv CK na senescenci byl sledován na experimentu s transgenními rostlinami tabáku. Tyto rostliny měly *ipt* gen, který je zodpovědný za produkci enzymu IPT, modifikovaný specifickým promotorem (P_{SAG1}). Tímto spojením došlo k vytvoření autoregulačního systému. Ten zajišťoval, že v rostlinách byla dostačující hladina CK pro inhibici senescence, ale přitom nedocházelo k nadprodukcí CK (Gan & Amasino, 1995).

2.5.4 Regenerace orgánů

CK mají vliv na morfogenezi rostliny a na regenerační procesy po poranění. Tyto procesy zajišťuje souhra CK s auxiny, kdy v závislosti na poměru těchto dvou skupin fytohormonů rostou různá pletiva a části rostliny. V případě vyrovnaného poměru vzniká nediferencované pletivo, takzvaný kalus. Pokud je více CK než auxinu, dochází k regeneraci a růstu prýtlů, v případě vyšší koncentrace auxinů než CK dochází k regeneraci a růstu kořenů (Procházka et al. 1998; Taiz & Zeiger, 2006).

Tento efekt různých poměrů byl pozorován například u nádorů vyvolaných bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, kdy způsobil mutaci její T-DNA v Ti-plazmidu. Pokud dochází k mutaci genu pro syntézu CK, dochází ke zvýšení koncentrace auxinů vůči CK a k růstu kořenů. Pokud dojde k mutaci v genu pro syntézu auxinů, dochází ke zvýšení koncentrace CK vůči auxinům a k růstu stonku (Taiz & Zeiger, 2006).

2.6 Cytokininy a abiotický stres

Jelikož jsou rostliny přisedlé organismy, musely si vytvořit množství ochranných mechanismů, díky kterým jsou schopny rozpoznat a chránit se před změnami prostředí, jako je sucho, změny teplot nebo salinita (Pavlů et al., 2018). Mezi tyto mechanismy patří i signalizace pomocí hormonů, jako např. kyselinou abscisovou (ABA), která bývá označována jako primární stresový hormon, a reguluje velké množství mechanismů vedoucích k vyšší toleranci vůči stresu. Vliv na odpověď rostliny mají i další hormony, jako ethylen, gibbereliny, auxiny, ale i cytokininy (Zwack & Rashotte, 2015).

Funkce CK je spojována s množstvím abiotických stresů (Bielach et al., 2017). U CK je obecně považováno, že hrají negativní roli při zvládnání stresu, ale existují náznaky, že CK mohou hrát jak negativní, tak i pozitivní roli. Díky analýzám endogenních hladin CK u rostlin pod určitým stresem jsme schopni vyvodit, že hladiny CK po vystavení stresu nejprve narůstají a následně dochází k jejich poklesu nebo se může stále držet vyšší hladina v závislosti na druhu stresu. Vyšší hladiny CK se drží v případě vystavení rostlin vážnějším podmínkám (Zwack & Rashotte, 2015).

2.6.1 Světlo jako abiotický faktor

Světlo je pro rostliny důležité nejenom jako nositel energie pro fotosyntézu, ale také může nést informaci o ročním období, části dne a ovlivňovat směr růstu rostliny. Zároveň se může chovat i jako stresový faktor, a to v případě, že je světla velké nebo malé množství, nebo je upraven denní cyklus (Cortleven et al., 2019)

V případě, že je vliv velkého množství světla, dochází k poškození fotosyntetického aparátu a dalších buněčných komponent. Rostliny mají vyvinuté určité ochranné mechanismy proti tomuto druhu stresu, jako je rozptýlení přebytečného množství světla v podobě tepla, pohyb listů mimo působící světlo či existence cyklického elektronového transportního řetězce (Cortleven et al., 2019; Takahashi & Badger, 2011). I přes tyto mechanismy ale dochází vlivem světla k fotopoškození, kdy jedním z hlavních cílů tohoto poškození je protein D1, který je součástí reakčního centra fotosystému II (Edelman & Mattoo, 2008).

Naproti tomu nízké množství světla zase indukuje takovou odpověď, kdy se rostlina snaží vyhýbat stínu (Shade avoidance syndrome). V tomto případě dochází k růstu hypokotylu na úkor listů (Yang & Li, 2017).

Funkcí světla je také dávat rostlině informaci o části dne a regulovat periodické hodiny. V případě, že dojde k prodloužení světelné periody, začínají se objevovat stresové symptomy následující noc. Tomuto se říká fotoperiodický stres (Nitschke et al., 2017; Cortleven, 2019).

2.6.2 Reakce cytokininů na světelný stres

Díky množství výzkumů, zabývajících se vlivem světla na rostlinu a na obsažené hladiny CK můžeme říct, že CK jsou podstatným faktorem v ochraně rostliny proti světelnému stresu. Ve studii, která využila rostlinné mutanty s vyřazenými CK receptory *ahk2* a *ahk3*, a také CK-deficientní *35S:CKX4* transgenní rostliny, bylo zjištěno, že tyto mutanti mají oproti volně žijícím (wild type - WT) rostlinám vyšší senzitivitu na světlo, nižší fotosyntetickou aktivitu a dochází u nich ke zvýšenému fotopoškození po expozici vysoké intenzitě světla (Cortleven et al., 2014).

CK jsou důležité pro ochranu rostlin proti vysoké intenzitě světla. U mutantních rostlin s nedostatkem CK pozorujeme sníženou fotoochranu, naopak zvýšenou fotoinhibici. Také došlo ke snížení antioxidantní kapacity a poškození určitých fotoprotektivních

mechanismů (Cortleven et al., 2014, 2019). CK podporují antioxidantní ochranu v chloroplastech, a tím zajišťuje jejich delší životnost. To bylo pozorováno u listů transgenních rostlin tabáku, které měly zvýšené hladiny CK (Procházková, Haisel & Wilhelmová, 2008).

Pokud je rostlina vystavena nízké intenzitě světla, dochází k poklesu hladin CK, a to následně způsobí inhibici růstu pupenů. V případě dodání exogenních CK dochází k jejich růstu a zvýšení jejich počtu (Corot et al., 2017). Při nízké intenzitě jsou CK také jedním z mechanismů pro přizpůsobení fotosyntetické aktivity (Boonman et al., 2009).

V případě pozměněné fotoperiody bylo pozorováno, že rostliny s nedostatkem CK vykazují silnou reakci na prodloužení světelné periody dne. V rostlinách došlo k aktivaci několika stresových genů, snížení účinnosti fotosystému II a v listech začal proces programované buněčné smrti. Díky těmto zjištěním je možné usoudit, že CK jsou důležitým faktorem při ochraně rostliny proti fotoperiodickému stresu (Nitschke et al., 2017).

2.7 Metody analýzy cytokininů

Pro studium CK a jejich biochemických procesů je důležité jejich stanovení a kvantifikace v rostlinách. CK se vyskytují ve stopových koncentracích, v rozsahu od fmol/g do pmol/g čerstvé hmoty (FW), zatímco látky v matrici interferující s CK se vyskytují v mnohem vyšších koncentracích. Tento poměr CK a interferujících látek představuje největší překážku v jejich analýze, a proto je důležité zvolit vhodné analytické a chemické principy extrakce a purifikace pro provedení správné a přesné analýzy (Tarkowska et al., 2014)

Pro správnou purifikaci CK je nutné znát jejich chemické vlastnosti. Všechny CK jsou schopné se ionizovat při změně pH. V případě, že $\text{pH} < 3$, mají CK kladný náboj, díky aminoskupině vyskytující se na pozici N^6 . Oproti tomu NH-skupina na imidazolovém kruhu zajišťuje CK záporný náboj při $\text{pH} > 11$. N^6 -vedlejší řetězec CK zase zajišťuje jejich hydrofobní charakter (Dobrev & Kamínek, 2002). U CK je důležité brát také ohled na jejich metabolity, které mají různé vlastnosti. Například nukleotidy jsou více polární a méně hydrofobní než glukosidy, které jsou zase více polární a méně hydrofobní než báze a ribosidy. (Tarkovská et al., 2014).

Před samotnou extrakcí a purifikací CK je nutné materiál zhomogenizovat. V případě analýzy rostlinných pletiv se nejčastěji používá homogenizace roztřením v třecí misce za přítomnosti kapalného dusíku (Procházka et al., 1998), kdy nízká teplota ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) zabráňuje dalším enzymatickým a chemickým procesům (Ljung et al., 2010).

Pro účinnou extrakci CK je nutné použít vhodné činidlo vzhledem k jejich chemickým vlastnostem. Jako extrakční činidla se používají například 80% metanol, 70% etanol nebo Bieleski pufr, který je nejpoužívanější (Novák et al., 2008). Bieleski pufr je směsné extrakční činidlo složené z metanolu, chloroformu, kyseliny mravenčí a vody v poměru 12:5:1:2. Nevýhodu přináší přítomnost chloroformu, který zvyšuje extrakci lipofilních látek komplikující purifikaci. Po srovnání činidel (80% metanol, Bieleski pufr, modifikovaný Bieleski pufr: metanol:voda:kys. mravenčí 15:4:1) se nejvýhodnějším činidlem pro extrakci CK jeví modifikovaný Bieleski pufr bez obsahu chloroformu (Hoyerová et al., 2006). Ke vzorku se přidávají interní standardy (IS), díky kterým lze pozorovat případné ztráty v průběhu extrakce a purifikace a zároveň umožňují kvantitativní stanovení endogenních hladin cytokininů (Ljung et al., 2010).

Po extrakci následuje přečištění vzorku, kdy ze vzorku potřebujeme odstranit interferující látky a zároveň mít co největší zisk daného typu fytohormonu (Ljung et al., 2010). Pro purifikaci se nejčastěji využívá SPE extrakce, kdy jsou SPE kolonky naplněné sorbentem, který zachytává látky na základě hydrofobních, polárních nebo iontových interakcí. V poslední době jsou stále více populární SPE kolonky obsahující tzv. směsné fáze, které obsahují ve vodě smáčitelný polymer s obrácenou fází a příslušný iontoměnič, čímž dochází k snížení počtu potřebných purifikačních kroků (Tarkowská et al., 2014). Pro purifikaci CK se využívají MCX kolonky, které jako stacionární fázi obsahují silný kationtově-výměnný nosič a oddělují cytokininy od auxinů a kyseliny abscisové (ABA) (Dobrev & Kamínek, 2002). Vzorek může být dále purifikován pomocí imunoafinitní chromatografie (IAC) za využití imobilizovaných monoklonálních či polyklonálních protilátek pro získání analytu nejvyšší čistoty (Hauserová et al., 2005).

Vyvinutí vysoce selektivních a citlivých analytických metod, jako je plynová nebo kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, umožnilo stanovovat a kvantifikovat rostlinné hormony v miligramových množstvích rostlinných pletiv (Ljung et al., 2010). Díky tomu mohlo dojít k vyvinutí miniaturizovaných purifikačních metod, mezi které patří metoda StageTip (Stop and go extraction Tip) (Svačinová et al., 2012). Tato metoda byla nejdříve používána v proteomice pro zakoncentrování, purifikaci a prefrakcionaci proteinů a peptidů před jejich vlastní analýzou (Rappsilber et al., 2003). U rostlinných vzorků jsme díky této miniaturizované metodě schopni analyzovat rostlinné hormony z navážek 1 – 5 mg FW. StageTip metoda je založena na vlastním naplňování běžné 200µl pipetovací špičky vhodným sorbentem vykrojeného z SPE extrakčního disku.

StageTip metoda představuje rychlou, efektivní a levnou metodu purifikace fytohormonů (Svačinová et al., 2012).

V neposlední řadě je důležitou složkou analýzy CK správně zvolená separační a detekční metoda. Mezi nejvíce používané metody se řadí separační techniky plynové a kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS a LC-MS). Od 70. let 20. století se jako první separační technika pro stanovení CK využívala plynová chromatografie (GC), která ve spojení s hmotnostní spektrometrií dodává spolehlivé a přesné výsledky. Ovšem velkou nevýhodou této techniky, i na úkor její robustnosti, je komplikovanější příprava vzorku, neboť CK nejsou těkavé látky, a proto musí být nejdříve derivatizovány před jejich vlastní analýzou (Tarkowski et al., 2009). Proto plynovou chromatografii nahrazuje stále populárnější vysoce-účinná kapalinová chromatografie (HPLC) (Ljung et al., 2010). Při této metodě dochází k separaci CK na reverzní stacionární fázi, kterou bývá nejčastěji C18 (Novák et al., 2003). V posledních letech došlo také k vývoji ultra-vysoce účinné kapalinové chromatografie (UHPLC), která významně zkracuje dobu analýzy při zachování či zvýšení separační účinnosti (Novák et al., 2008). Mezi další používané techniky pro stanovení CK patří také imunoanalytické metody RIA a ELISA, které představují citlivou a levnou alternativu (Strnad et al., 1992).

Jak už bylo řečeno výše, separační techniky se nejčastěji zapojují s hmotnostní spektrometrií. V hmotnostním spektrometru jsou molekuly ionizovány v iontovém zdroji, kde vznikají ionty, které jsou analyzovány a následně detekovány (Ljung et al., 2010). Mezi ionizační techniky pro CK patří termosprej (TSI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), bombardování urychlenými atomy (FAB) a elektrosprej (ESI), který je v případě analýzy CK nejpoužívanější (Novák et al., 2003). V posledních letech se využívá pro zvýšení citlivosti detekce tandemové uspořádání (MS-MS) (Ljung et al., 2010), které jako analyzátor využívá trojitý kvadrupól (QqQ) a pracuje v módu záznamu více iontových reakcí (MRM – multiple reaction monitoring) (Tarkowski et al., 2009).

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- Redestilovaná voda z Millipore Simplicity™
- Sacharóza p.a., Penta (Praha, Česká Republika)
- Murashige & Skoog médium, Duchefa Biochemie (Haarlem, Nizozemí)
- Plant agar, Duchefa Biochemie (Haarlem, Nizozemí)
- Kyselina dusičná (68 %), VWR Chemicals S. A. S. (Fontenay-sous-Bois, Francie)
- Aceton p.a., Lachner (Neratovice, Česká Republika)
- Ethylalkohol pro UV spektroskopii (99,8%), Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- Tween® 20, Sigma Aldrich (Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí p.a., Honeywell (Seetze, Německo)
- Kyselina mravenčí 98% - 100% pro LC-MS, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Hydroxid amonný 25% pro LC-MS, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Metanol (≥99,9%) gradient grade for liquid chromatography, LiChrosoly, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Metanol hypergrade pro LC-MS, LiChrosoly, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Izotopicky značené cytokininové standardy, Laboratoř růstových regulátorů Univerzity Palackého (Olomouc, Česká republika)

báze (B): [¹³C₅]cZ, [¹³C₅]tZ, [²H₅]tZR, [²H₅]tZ9G, [²H₃]DHZ, [²H₃]DHZR, [²H₃]DHZ9G, [²H₆]iP, [²H₆]iPR, [²H₆]iP9G, [²H₇]BAP, [²H₇]BAPR, [²H₇]BAP9G, [¹⁵N₄]mT, [¹⁵N₄]oT, [¹⁵N₄]pT, [¹⁵N₄]mTR, [¹⁵N₄]oTR, [¹⁵N₄]pTR, [¹⁵N₄]mT9G, [¹⁵N₄]oT9G, [¹⁵N₄]pT9G, [¹⁵N₄]K
O-glukosidy (OG): [²H₅]tZOG, [²H₅]tZROG, [²H₇]DHZOG
nukleotidy (NT): [²H₅]tZRMP, [²H₃]DHZRMP, [²H₆]iPRMP, [²H₇]BAPRMP

.Roztoky

- Modifikovaný Bielecki pufr (75 % metanol + 5 % kyselina mravenčí + 20 % redestilovaná voda – 750 ml/l metanolu + 50 ml/l kyselina mravenčí + 200 ml redestilované vody)

- Sterilizační roztok (70% etanol + 0,1% Tween20 – 9,99 ml/10 ml 70% etanolu + 0,01 ml/10 ml Tween20)
- 50% kyselina dusičná (735 ml/l kyseliny dusičné + 265 ml/l redestilované vody)
- 0,5M roztok hydroxidu amonného v 60% metanolu – eluční roztok CKs (0,775 ml/10 ml hydroxidu amonného + 6 ml/10 ml metanolu + 3,225 ml/l redestilované vody)
- 15 mM mravenčan amonný (pH 3,95) (0,566 ml/l kyseliny mravenčí, pH upraveno 25% roztokem hydroxidu amonného)
- 10% metanol (1 ml/10 ml metanolu + 9 ml/10 ml redestilované vody)

Stacionární fáze pro SPE purifikaci a kolona pro kapalinovou chromatografii:

- EmporeTM Styren divinyl benzen (SDB-RPS), 47mm Extrakční disky, Supelco, Bellefonte, PA, USA
- EmporeTM Cation, 47mm Extrakční disky, Supelco, Bellefonte, PA, USA
- Pro UHPLC separaci použita kolona s reverzní fází Waters UPLC[®] BEH C18 (1,7 µm: 2,1 × 150 mm), Waters (Milford, MA, USA)

3.2 Přístroje

- Autokláv Sanyo MLS-378 1L, Sanyo (Japonsko)
- Stolní laboratorní rotátor Stuart SB3-BB Scientific, Keison Products (Chelmsford, Velká Británie)
- Kulový mlýnek MM301, Retsch[®] & Co. KG (Hann, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Transsonic T310, ELMA[®] Schmidbauer GmbH (Singen, Německo)
- Centrifuga AvantiTM 30, Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
- Centrifuga Hettlich Micro 220R, Hettlich GmbH (Tuttingen, Německo)
- Vakuová rotační odparka Trigon-plus[®] RCT1010, Thermo Electron Corporation – k 2006 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Millipore SimplicityTM water purification system, Milipore Corp (Billerica, MA, USA)
- Analytické váhy, Sartorius Weighing Technology GmbH (Goettingen, Německo)

- pH metr CyberScan 500, Oakton® (Vernon Hills, IL, USA)
Inkubátor IN 30, Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, Německo)
- Acquity UPLC® I-class systém (Waters, Milford, MA, USA) v zapojení s Xevo™ TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) vybavený ionizací elektrosprejem ESI. Data zpracována MassLynx™ software s TargetLynx™ programem (verze 4.2, Waters, Milford, MA, USA)
- Flowbox laminární Heraguard ECO 1.2, Thermo Electron LED GmbH (Langensfeld, Německo)
- Fytokomora Percival AR-100L3, Percival Scientific (Perry, IA, USA)
- Mixer Vortex typ Wizard, Velp Scientifica (Usmate, MB, Itálie)

3.3 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byly použity desetidenní semenáčky intaktní *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Columbia, wild type). Semenáčky byly kultivované za různých světelných podmínek, kdy byly umístěné pod fotosynteticky aktivní záření (PAR) o různé intenzitě ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, tma), další podmínky kultivace viz. níže.

3.4 Výsev, kultivace a sběr

Na výsev 10denních semenáčků *A. thaliana* bylo připraveno MS (Murashige a Skoog) médium obsahující 10 g sacharózy ($c_m = 29,214 \text{ mmol/l}$), 2,2 g MS médium s vitamíny (0,22 % m/v) a 1 l destilované vody. Roztok byl poté upraven na pH 5,6. K tomuto roztoku se přidalo 7 g Agarů (0,7 % m/v) (Murashige & Skoog, 1962). Semena byla vysterilizována sterilizačním roztokem a vyseta na MS médium do kultivačních desek, které byly dva dny uskladněny v lednici při 4 °C. Vyseté desky byly poté kultivovány ve fotokomoře při 21 °C při fotoperiodě 16 h světlo/8 h tma a vlhkosti 50 %. Po deseti dnech došlo ke změně kultivačních podmínek, kdy u jedné sady desek byly ponechány původní podmínky intenzity světla ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$), druhá sada byla překryta 4 vrstvami filtračního papíru, čímž byla intenzita dopadajícího světla snížena na $10 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ a poslední sada desek byla ponechána ve tmě. Tma byla zajištěna obalením desek v černé folii a uzavřením v krabici. Sklizeň rostlinného materiálu pro experiment probíhala sklizením vždy 1 kultivační desky pro dané podmínky (kontrola, nízká intenzita světla, tma). Vzorby byly sbírány 1. až 4. den.,

vždy uprostřed světelné fáze, tj v 14 hodin. Rostlinný materiál byl sesbírán, omyt, vysušen a okamžitě zmrazen v kapalném dusíku. Takto sesbíraný rostlinný materiál byl uskladněn při -70 °C v hlubokomrazícím boxu.

3.5 Mikroextrakce a Purifikace

Zmrazený rostlinný materiál byl homogenizován ve třecí misce kapalným dusíkem, rozvážen na tři technické replikáty do 2 ml mikrozkušavek, po 1 – 2 mg FW. K naváženému vzorku byly přidány 3 homogenizační kuličky, 0,5 ml modifikovaného Bieleškiho pufru jako extrakčního činidla a 20 µl směsi interních standardů (0,25 pmol bází (B), ribosidů (R), 7- a 9-glukosidů (7G, 9G), a 0,5 pmol *O*-glukosidů (OG) a nukleotidů (NT)). Vzorky byly promíchány a 3 minuty homogenizovány na kulovém mlýnku při 27 Hz. Poté byly na 3 minuty vloženy do ultrazvukové lázně a následovala extrakce na laboratorním rotátoru po dobu 30 minut při teplotě 4 °C. Po extrakci byly vzorky centrifugovány (15 000 rpm, 15 min, 4 °C) a supernatant byl poté sesbírán do nových 1,5ml mikrozkušavek.

Před samotnou purifikací byly připraveny Stagetip kolonky. Do běžných 200µl pipetovacích špiček byly vloženy 4 vrstvy kationtově-výměnného sorbentu a 4 vrstvy SDB-RPS sorbentu (styren-divinylbenzenový kopolymer). Pro purifikaci vzorků byl použit modifikovaný purifikační protokol pro Stagetipy popsáný ve Svačinová *et al.* (2012). Pro aktivaci sorbentů bylo do Stagetipových špiček nanášeno 50 µl acetonu a centrifugováno (2 200 rpm, 10 min, 8 °C). Za stejných centrifugačních podmínek byl proveden i další krok aktivace pomocí 50 µl metanolu. Následovalo promytí 50 µl redestilované vody (2 300 rpm, 15 min., 8 °C), kondicionace sorbentů byla provedena 50 µl 50% kyseliny dusičné (2 500 rpm, 20 min., 8 °C) a opětovné promytí 50 µl redestilované vody (2 500 rpm, 20 min., 8 °C). Před nanášením vzorku bylo ještě nanášeno 50 µl modifikovaného Bieleškiho pufru (2 600 rpm, 20 min., 8 °C). Na takto připravené Stagetipy byly opakovaně nanášeny vzorky a centrifugovány (4 500 rpm, 30 min., 8 °C). Po nanášení byly kolonky promyty 50 µl redestilované vody (3 500 rpm, 20 min, 4 °C) a 50 µl metanolu (3 500 rpm, 20 min, 4 °C). Po dokončení těchto kroků byly vyměněny spodní části mikrozkušavek, do kterých byly poté eluovány CK pomocí 50 µl 0,5M roztoku hydroxidu amonného v 60% metanolu. Vyeluované vzorky CK byly převedeny do 2ml vialek se 100µl inzertem, odpařeny pomocí vakuové odparky do sucha a rozpuštěny ve 30 µl 10% metanolu pro UHPLC-MS/MS měření.

3.6 Identifikace a stanovení

Pro identifikaci a stanovení CK hladin byla použita ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem vybavený elektrosprejem. Separace probíhala za upravených podmínek dle Svačinová *et al.* (2012). Vzorky o objemu 10 μ l byly nastříknuty a separovány na koloně s reverzní fází (kolona ACQUITY UPLC BEH Shield, RP 18, 1,7 μ m, 2.1 x 150 mm). CK byly separovány následujícím lineárním gradientem: 0 min, 5:95 (A:B) – 4 min isokratická eluce, 5:95 (A:B) – 10 min lineární gradient, 20:80 (A:B) – 15 min lineární gradient, 50:50 (A:B) – 15.50 min, 99:1 (A:B) – 16.00 min 99:1 (A:B) – 16.50 min, 5:95 (A:B) – 17.00 min, 5:95 (A:B) s použitím 100% metanolu (A) a 15mM mravenčanu amonného (pH 3,95; B) jako mobilní fáze při rychlosti průtoku 0,400 ml/min a teplotě kolony 55 °C. Na konci gradientu byla kolona promyta 100% metanolem a znovu uvedena do původních podmínek (Svačinová *et al.*, 2012).

Separované CK byly následně analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). CK byly elektrosprejem ionizovány v režimu ESI+ a analyzovány trojitým kvadrupólem. Retenční časy separovaných CK byly sledovány v MRM oknech: 6.00 – 10.30 minut, 10.30 – 12.60 minut, 12.60 – 13.80 minut, 13.80 – 15.20 minut. Parametry pro MRM byly nastaveny následovně: teplota zdroje 150 °C; teplota desolvatačního plynu 600 °C; průtok desolvatačního plynu 600 l/h; napětí v kapiláře 0,75 kV (Novák *et al.*, 2008). Výsledky byly vyhodnocovány pomocí software MassLynx za použití metody standardního isotopového ředění. Byl stanoven poměr endogenních CK a značených standardů, který byl posléze použit pro kvantifikaci endogenních hladin CK, založené na známé koncentraci značených interních standardů (Plačková *et al.*, 2015).

4 Výsledky

Výstupem bakalářské práce bylo srovnání endogenních hladin CK u rostlin *Arabidopsis thaliana* pěstovaných pod odlišnými světelnými podmínkami – tma, nízká intenzita, kontrola. Vzorky CK byly měřeny pomocí UHPLC-MS/MS, kde byly detekovány metabolity CK *trans*-zeatinového, *cis*-zeatinového, dihydrozeatinového a isopentenyladeninového typu. Aromatické CK ve vzorcích detekovány nebyly.

Z detekovaných metabolitů se jednalo konkrétně *tZ*-typ: *tZ*, *tZOG*, *tZR*, *tZROG*, *tZ7G*, *tZ9G* a *tZR5'*MP, *cZ*-typ: *cZ*, *cZOG*, *cZR*, *cZROG*, *cZ7G*, *cZ9G* A *cZR5'*MP, *DHZ*-typ: *DHZOG*, *DHZ7G*, *DHZR5'*MP a *iP*-typ: *iP*, *iPR*, *iP7G*, *iP9G* a *iPR5'*MP. Stanovené hladiny CK jsou uvedeny v tabulce 1, 2 a 3.

Tab. 1 : Naměřené endogenní hladiny detekovaných cytokininů v rostlinách *Arabidopsis thaliana* pěstovaných ve tmě. Výsledky jsou psány ve tvaru: průměrná hodnota±směrodatná odchylka, <LOD = pod limitem detekce

DEN SBĚRU TYP	1. den	2. den	3. den	4. den
CYTOKININU				
<i>tZ</i>	<LOD	0.45 ± 0.24	0.38 ± 0.14	0.35 ± 0.01
<i>tZOG</i>	3.37 ± 0.15	2.67 ± 0.01	4.08 ± 1.00	3.59 ± 0.22
<i>tZR</i>	1.45 ± 0.38	0.71 ± 0.09	2.32 ± 0.28	3.97 ± 0.04
<i>tZROG</i>	<LOD	<LOD	4.25 ± 0.93	2.08 ± 0.03
<i>tZ7G</i>	19.06 ± 0.79	13.65 ± 1.80	13.20 ± 2.54	17.17 ± 1.14
<i>tZ9G</i>	8.35 ± 0.61	5.48 ± 0.50	5.21 ± 0.66	6.56 ± 0.35
<i>tZR5'MP</i>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<i>cZ</i>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<i>cZOG</i>	0.57 ± 0.11	0.45 ± 0.01	0.76 ± 0.05	0.99 ± 0.02
<i>cZR</i>	2.96 ± 0.57	1.61 ± 0.45	1.82 ± 0.30	1.43 ± 0.10
<i>cZROG</i>	<LOD	1.75 ± 0.23	3.67 ± 0.06	5.48 ± 0.71
<i>cZ7G</i>	10.44 ± 2.13	8.65 ± 1.43	14.65 ± 0.17	19.74 ± 2.70
<i>cZ9G</i>	3.62 ± 0.27	2.55 ± 0.22	4.22 ± 0.09	2.11 ± 0.02
<i>cZR5'MP</i>	17.21 ± 1.06	<LOD	<LOD	<LOD
DHZOG	0.18 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.32 ± 0.07	0.21 ± 0.02
DHZ7G	4.13 ± 0.58	3.06 ± 0.35	2.87 ± 0.15	3.77 ± 0.25
DHZR5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
iP	1.10 ± 0.17	0.91 ± 0.18	0.78 ± 0.15	0.48 ± 0.04
iPR	0.92 ± 0.10	1.61 ± 0.20	0.71 ± 0.06	0.72 ± 0.05
iP7G	18.48 ± 1.02	11.93 ± 0.78	12.72 ± 0.67	15.22 ± 1.36
iP9G	1.70 ± 0.12	1.10 ± 0.07	1.02 ± 0.09	1.14 ± 0.09
iPR5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tab. 2: Naměřené endogenní hladiny detekovaných cytokininů u rostlin *Arabidopsis thaliana* pěstovaných za nízké intenzity světla ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) Výsledky jsou psány ve tvaru: průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka, <LOD = pod limitem detekce

DEN SBĚRU	1. den	2. den	3. den	4. den
TYP				
CYTOKININU				
<i>tZ</i>	0.34 \pm 0.02	<LOD	<LOD	0.23 \pm 0.02
<i>tZOG</i>	4.44 \pm 0.81	1.75 \pm 0.14	3.28 \pm 0.65	2.48 \pm 0.17
<i>tZR</i>	3.43 \pm 0.48	0.80 \pm 0.06	3.18 \pm 0.50	1.25 \pm 0.09
<i>tZROG</i>	2.50 \pm 0.33	<LOD	<LOD	<LOD
<i>tZ7G</i>	19.15 \pm 1.77	7.37 \pm 0.48	8.00 \pm 0.42	14.25 \pm 0.90
<i>tZ9G</i>	9.91 \pm 0.12	3.47 \pm 0.34	4.42 \pm 0.75	5.88 \pm 0.37
<i>tZR5'MP</i>	9.36 \pm 0.33	<LOD	4.17 \pm 0.12	<LOD
<i>cZ</i>	0.65 \pm 0.08	0.63 \pm 0.13	0.43 \pm 0.04	0.63 \pm 0.01
<i>cZOG</i>	0.75 \pm 0.06	0.52 \pm 0.06	0.52 \pm 0.03	0.69 \pm 0.02
<i>cZR</i>	2.55 \pm 0.27	4.95 \pm 0.80	1.77 \pm 0.26	2.22 \pm 0.61
<i>cZROG</i>	<LOD	<LOD	1.25 \pm 0.01	3.19 \pm 0.51
<i>cZ7G</i>	14.34 \pm 2.27	10.47 \pm 0.35	9.66 \pm 0.73	14.85 \pm 0.68
<i>cZ9G</i>	3.14 \pm 0.69	1.23 \pm 0.01	2.76 \pm 0.35	2.75 \pm 0.38
<i>cZR5'MP</i>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
DHZOG	0.27 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.37 \pm 0.00
DHZ7G	4.04 \pm 0.43	1.92 \pm 0.06	1.82 \pm 0.09	2.83 \pm 0.32
DHZR5'MP	<LOD	<LOD	2.40 \pm 0.32	<LOD
iP	0.96 \pm 0.13	1.07 \pm 0.00	0.70 \pm 0.07	1.22 \pm 0.01
iPR	6.12 \pm 0.71	2.20 \pm 0.35	2.88 \pm 0.60	2.71 \pm 0.19
iP7G	18.79 \pm 1.63	10.09 \pm 0.01	13.76 \pm 1.59	25.31 \pm 1.03
iP9G	2.30 \pm 0.25	1.70 \pm 0.35	1.26 \pm 0.10	2.68 \pm 0.25
iPR5'MP	23.08 \pm 0.14	5.58 \pm 0.72	8.77 \pm 0.07	9.01 \pm 0.61

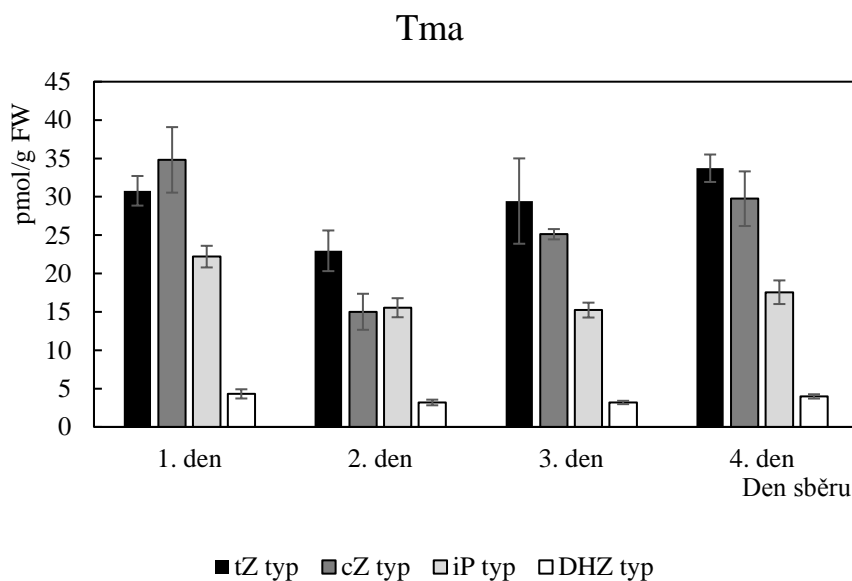
Tab. 3: Naměřené endogenní hladiny detekovaných cytokininů v rostlinách *Arabidopsis thaliana* pěstovaných za intenzity světla 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (kontrola) Výsledky jsou psány ve tvaru: průměrná hodnota±směrodatná odchylka, <LOD = pod limitem detekce

DEN SBĚRU	1. den	2. den	3. den	4. den
CYTOKININU				
<i>tZ</i>	0.33 ± 0.01	0.40 ± 0.03	<LOD	<LOD
<i>tZOG</i>	3.05 ± 0.13	4.36 ± 0.08	1.84 ± 0.09	3.04 ± 0.15
<i>tZR</i>	3.43 ± 0.11	3.75 ± 0.40	2.65 ± 0.11	1.76 ± 0.08
<i>tZROG</i>	2.16 ± 0.29	3.01 ± 0.00	1.41 ± 0.06	2.19 ± 0.23
<i>tZ7G</i>	13.19 ± 0.93	17.02 ± 1.62	8.01 ± 0.56	14.78 ± 1.17
<i>tZ9G</i>	5.99 ± 0.57	6.95 ± 0.97	3.80 ± 0.75	6.39 ± 1.01
<i>tZR5'MP</i>	6.07 ± 0.52	<LOD	<LOD	<LOD
<i>cZ</i>	<LOD	<LOD	0.61 ± 0.15	0.80 ± 0.06
<i>cZOG</i>	0.63 ± 0.04	0.77 ± 0.06	0.47 ± 0.06	0.96 ± 0.03
<i>cZR</i>	1.97 ± 0.20	3.91 ± 0.28	4.21 ± 0.24	12.32 ± 0.65
<i>cZROG</i>	<LOD	<LOD	<LOD	3.76 ± 0.63
<i>cZ7G</i>	9.34 ± 0.22	11.44 ± 0.66	7.76 ± 1.26	14.15 ± 0.85
<i>cZ9G</i>	2.49 ± 0.26	3.48 ± 0.65	1.72 ± 0.05	3.05 ± 0.05
<i>cZR5'MP</i>	<LOD	14.26 ± 2.26	13.42 ± 0.16	10.58 ± 0.26
DHZOG	0.22 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.22 ± 0.02
DHZ7G	2.69 ± 0.26	3.27 ± 0.15	2.19 ± 0.25	3.33 ± 0.38
DHZR5'MP	2.46 ± 0.31	<LOD	<LOD	<LOD
iP	1.83 ± 0.08	0.90 ± 0.14	0.76 ± 0.02	1.56 ± 0.28
iPR	4.41 ± 0.20	5.11 ± 0.55	4.35 ± 0.72	8.55 ± 1.18
iP7G	15.62 ± 0.57	22.74 ± 2.25	18.98 ± 2.99	22.65 ± 2.74
iP9G	1.98 ± 0.29	2.36 ± 0.18	2.01 ± 0.43	2.31 ± 0.47
iPR5'MP	13.92 ± 1.55	13.46 ± 1.77	14.62 ± 4.15	14.29 ± 2.38

Při porovnání hladin *cZ*-, *tZ*-, DHZ- a *iP*-typu v semenáčcích pěstovaných za tmy (Obr. 3) a nízké intenzity (Obr. 4) s kontrolními hladinami (Obr. 5) byly v případě tmy i nízké intenzity detekovány nižší koncentrační hladiny CK než v případě kontroly.

I když u tmy i nízké intenzity byly první den naměřeny vyšší hladiny, posléze ovšem došlo k jejich výraznému poklesu u všech sledovaných CK typů, kromě typu dihydrozeatinového. Tento průběh mohou vysvětlovat dvě možné hypotézy. V případě první hypotézy došlo k nárůstu hladin z důvodu krátkodobého stresu, kdy poté při setrvání stresu došlo k jejich následnému poklesu (Zwack & Rashotte, 2015). Druhou hypotézou je možnost, že rostlina v prvním dni ještě nebyla zcela zadaptována na změnu nových světelných podmínek, kdy první den byl sbírán již po 8 hodinách od změny. Tuto hypotézu nám mohou potvrdit zejména hladiny nukleotidů u semenáčků pěstovaných ve tmě (Obr. 6), kdy došlo k jejich detekci pouze v 1. den sběru.

U všech pozorovaných podmínek se hladina DHZ-typu pohybovala kolem 5 pmol/g FW a v průběhu měření se významně neměnila, z čehož se dá usuzovat, že DHZ-typ nemá zásadní vliv na zvládnání stresu.

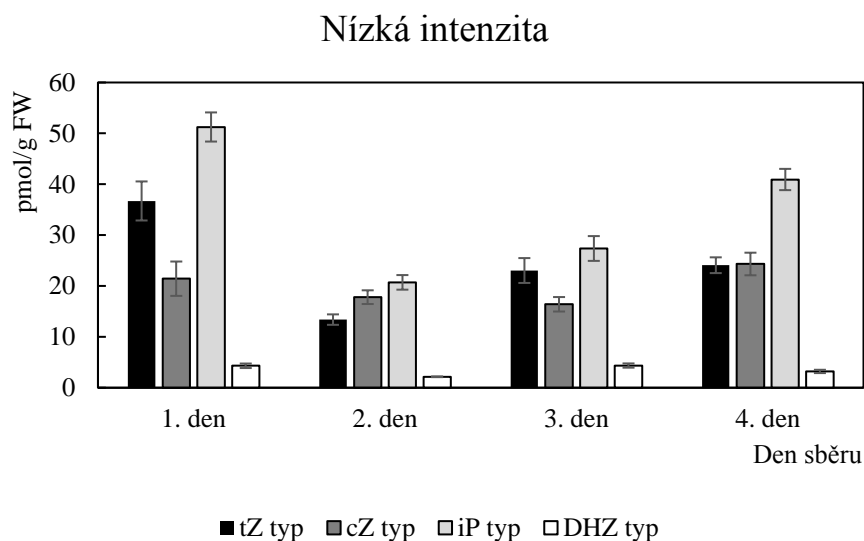


Obr. 3: Hladiny *tZ*-, *cZ*-, DHZ- a *iP*-typů CK detekovaných v průběhu 4 dnů u semenáčku *A. thaliana* pěstovaných ve tmě

Hladiny *cZ*-typu ve tmě byly první den na hodnotě 34,81 pmol/g FW, druhý den došlo k významnému poklesu téměř na poloviční hodnotu (15,01 pmol/g FW) a v následujících dnech hladina vystoupala opět na téměř stejnou hladinu jako v prvním dni. U *tZ*-typu se hladiny pohybovaly v rozmezí od 22,96 – 33,72 pmol/g FW. *cZ*-typ i přesto, že nevykazuje

až tak výraznou biologickou aktivitu, tvořil společně s *tZ*-typem nejvyšší podíl CK v rostlinách pěstovaných za tmy. Důvodem těchto vysokých hladin může být hypotéza vyslovená Gajdošovou et al. (2011). Ta říká, že CK *cZ*-typu mohou hrát významnou roli při udržování bazální aktivity potřebné pro přežití rostliny. Tuto hypotézu dále rozšiřuje Janečková et al. (2018) která navrhuje, že při nedostatku energie v podobě ATP/ADP/AMP se rostlina uchyluje k použití MVA biosyntetické dráhy, kterou se vytváří CK *cZ*-typu. MVA dráha, na rozdíl od MEP dráhy, využívá jiné prekursory než ATP/ADP/AMP. Tuto hypotézu podporují také výsledky od Cermanové (2020).

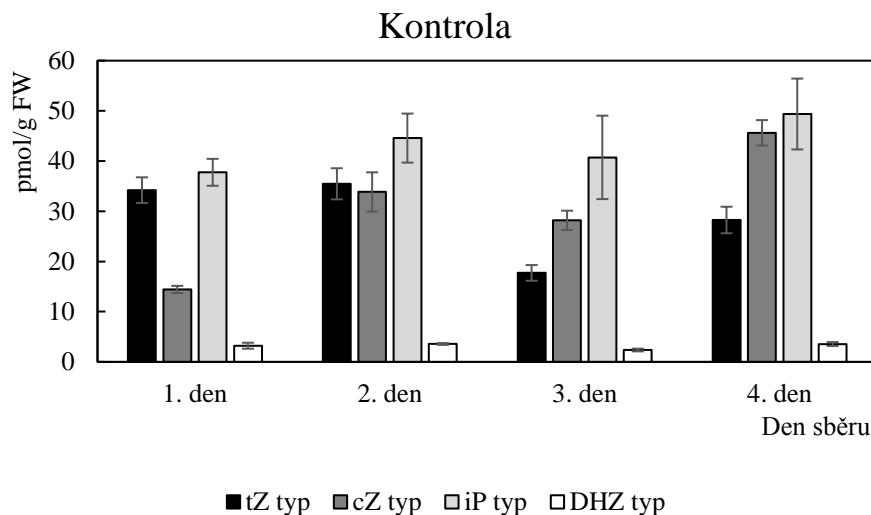
Hladiny *iP*-typu se pohybovaly v průměru kolem 17,63 pmol/g FW a byly výrazně nižší než v případě kontroly, kdy se jejich průměrná hodnota pohybovala kolem 43,1 pmol/g FW. Nízké hladiny *iP*-typu mohly být opět způsobené nedostatkem energie pro MEP biosyntetickou dráhu a preferováním biosyntézy *cZ*-typu oproti *tZ*- a *iP*-typům, jak je popsáno výše.



Obr. 4: Hladiny *tZ*-, *cZ*-, DHZ- a *iP*-typů CK detekovaných v průběhu 4 dnů u semenáčků *A. thaliana* pěstovaných za nízké intenzity světla ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)

U rostlin pěstovaných za nízké intenzity světla (Obr. 4) byly nejvyšší hladiny detekovány u *iP*-typu. Stejně jako v případě tmy došlo po prvním dnu k výraznému poklesu a následně k postupnému nárůstu hladin všech CK. Kromě prvního dne byly detekovány přibližně stejné hladiny *tZ*- i *cZ*-typu. K významným trendům došlo ale u hladin *iP*-typu, které se pohybovaly v rozmezí od 20,71 – 51,25 pmol/g FW, kdy nejvyšší hladina byla detekována opět v první den sběru, tedy jen 8 hodin po adaptaci na nové podmínky. Koncentrační

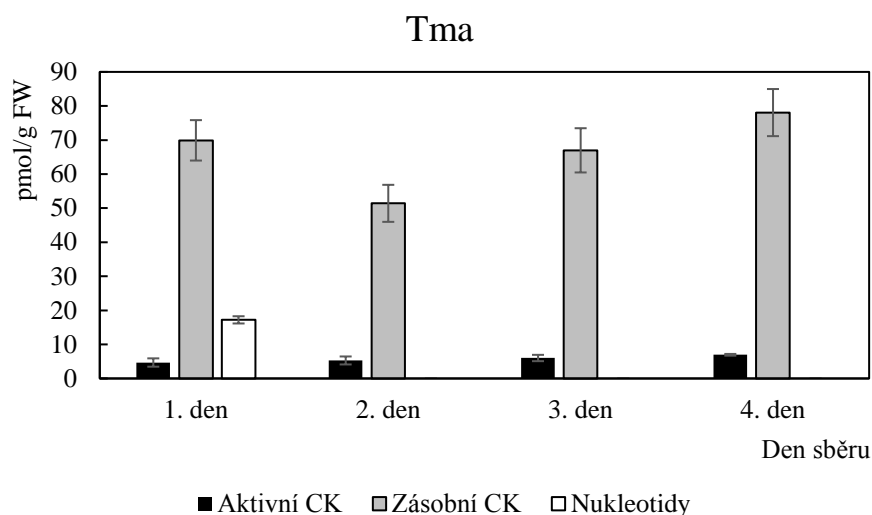
hladiny iP-typu byly sice nižší než u kontroly, ale naopak vyšší než u tmy, což naznačuje, že i když rostlina přijímá světlo o nižší intenzitě, přesto získává dostatek energie pro biosyntézu CK.



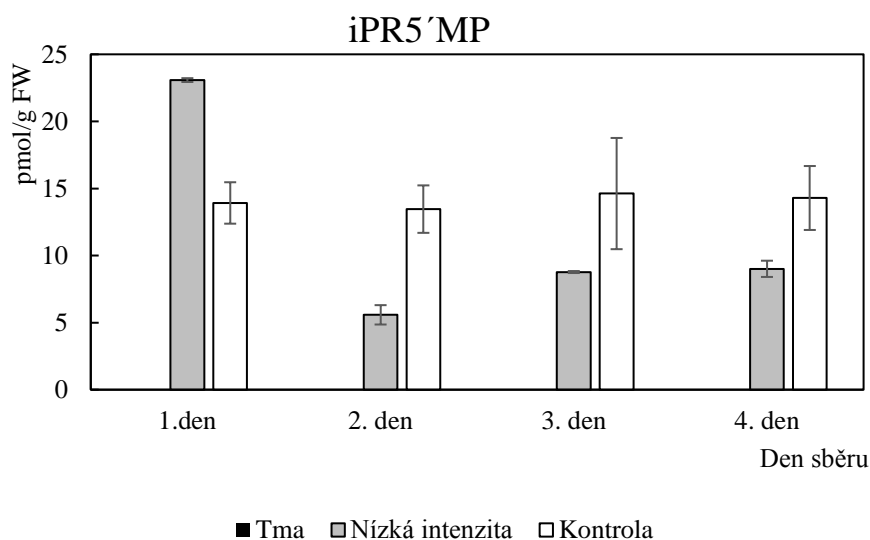
Obr. 5: Hladiny *tZ*-, *cZ*-, DHZ- a *iP*-typů CK detekovaných v průběhu 4 dnů u kontrolních semenáčků *A. thaliana* (intenzita světla $100 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)

Kontrolní semenáčky měly nejvyšší hladiny detekovány u *iP*-typu, které se pohybovaly v průměru kolem 43,1 pmol/g FW. V průběhu třetího a čtvrtého dne došlo ke změně poměru mezi *tZ*- a *cZ*-typem, kdy začala narůstat hladina *cZ*-typu až na hodnotu 45,62 pmol/g FW, a naopak hodnota *tZ*-typu klesla. Tato změna poměru jednotlivých izomerů mohla být způsobena aktivitou enzymu zeatin-isomerázy (Spíchal, 2012).

Hladiny CK typů jsou tvořeny výskytem různých metabolitů, kde jejich porovnání je zobrazeno na obr. 6, 8 a 9. Metabolity jsou rozděleny na skupiny aktivní CK (báze (B) a ribosidy (R)), zásobní CK (*O*-glukosidy (OG), ribosid-*O*-glukosidy (ROG), *N*-glukosidy (NG)) a poslední skupinu tvoří nukleotidy (NT).



Obr. 6: Hladiny CK aktivních (B, R), zásobních (OG, ROG, NG) forem a nukleotidů v semenáčcích *A. thaliana* pěstovaných ve tmě

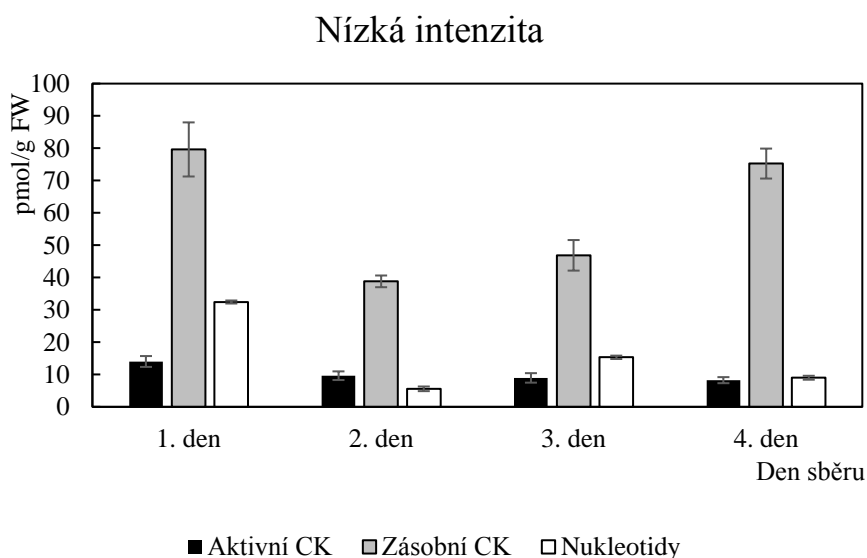


Obr. 7: Hladiny iPR5'MP detekované u semenáčků *A. thaliana* pěstovaných za různých světelných podmínek

Nukleotidy, kam se řadí monofosfáty, jsou považovány za biosyntetické CK (Spíchal, 2012). U rostlin pěstovaných za tmy byla pouze první den detekována hladina *cZR5'MP*, která dosahovala hodnoty 17,21 pmol/g FW. Oproti tomu iPR5'MP (Obr. 7) se v rostlinách nevyskytoval vůbec, což znamená, že rostlina nezačala novou biosyntetickou dráhu. Hodnoty těchto nukleotidů podporují hypotézu popsanou dříve, že rostliny nebyly první den

sběru adaptovány na změnu světelných podmínek. Podobných výsledků, které podporují tuto hypotézu o adaptaci, bylo dosaženo i u Cermanové (2020).

U semenáčků pěstovaných ve tmě se vyskytovaly zejména zásobní CK, které se pohybovaly v rozmezí 51,71 – 78,06 pmol/g FW. Zásobní CK zde představují *O*-glukosidy (Obr. 10) a *N*-glukosidy (Obr. 11), s výraznou převahou *N*-glukosidů. Oproti tomu aktivní CK se u tmy vyskytovaly s konstantní, ale nízkou koncentrační hladinou, v průměru jen 5,73 pmol/g FW. Tyto hodnoty naznačují vliv světla na biosyntézu CK. Rostlina pěstovaná ve tmě nezískává energii a nesyntetizuje nové CK, místo toho tvoří převážně zásobní formy CK (Janečková et al., 2018).

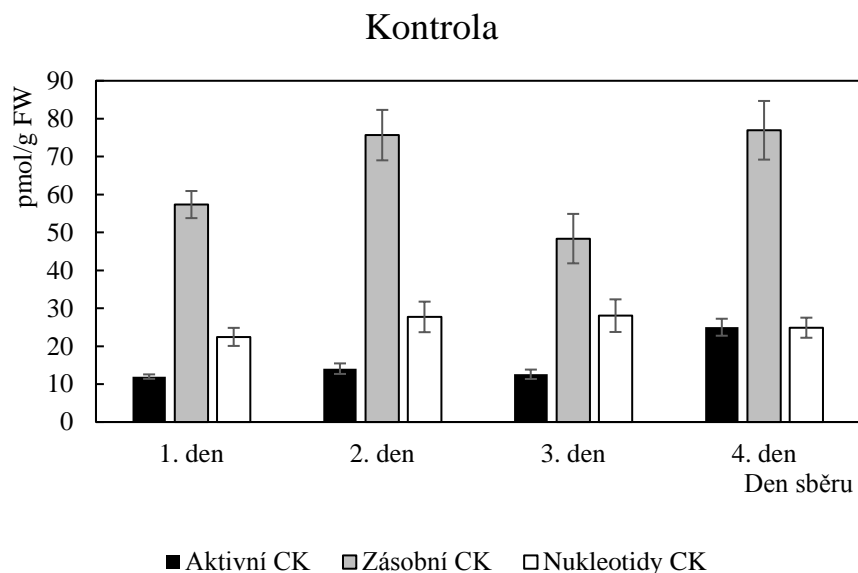


Obr. 8: Hladiny CK aktivních (B, R), zásobních (OG, ROG, NG) forem a nukleotidů v semenáčcích *A. thaliana* pěstovaných za nízké intenzity ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)

V případě nízké intenzity světla (obr. 8) byly již detekovány vyšší hodnoty aktivních CK než u tmy. Tyto hladiny se pohybovaly v průměru kolem 10,22 pmol/g FW. Také byly naměřeny hladiny nukleotidů, které se pohybovaly v rozmezí od 5,58 – 32,44 pmol/g FW, kdy nejvyšší hodnoty byla opět naměřena první den sběru. Stanovené hodnoty jsou nižší než hodnoty u kontrolních semenáčků (Obr. 9). Na základě těchto hladin je možné usoudit, že rostlina má za nízké intenzity světla sice sníženou aktivitu, ale přesto je schopná syntetizovat nové CK.

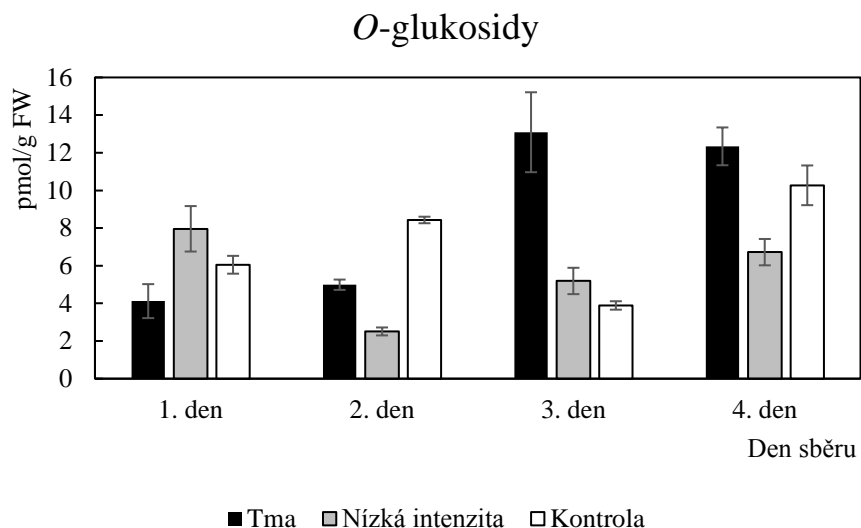
Nejvyšších koncentračních hladin bylo opět dosaženo u zásobních CK, u nichž první den sběru byla naměřena hodnota 79,63 pmol/g FW. Druhý den došlo k výraznému poklesu jejich hladin téměř na polovinu, 38,83 pmol/g FW, a od třetího dne docházelo opět

k následnému zpětnému nárůstu. Podobný průběh byl detekován jak u *O*-glukosidů (Obr. 10), tak i u *N*-glukosidů (Obr. 11).

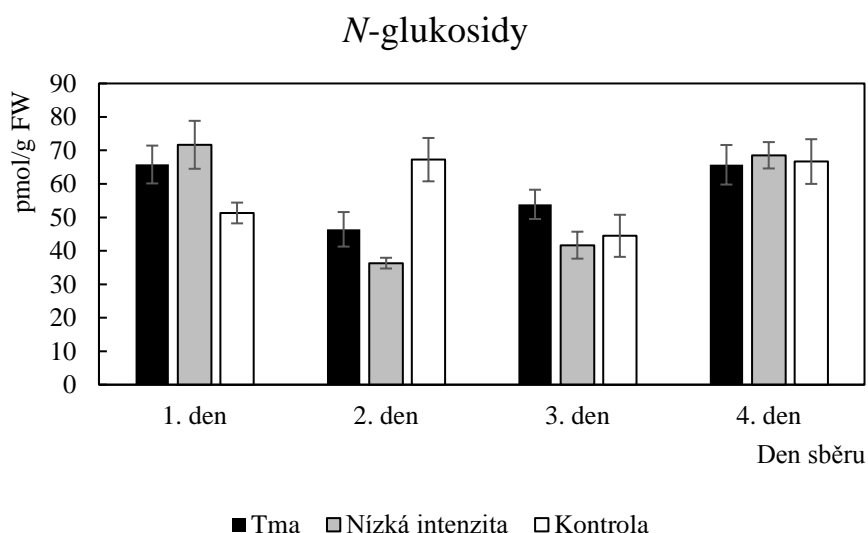


Obr. 9: Hladiny CK aktivních (B, R), zásobních (OG, ROG, NG) forem a nukleotidů v kontrolních semenáčcích *A. thaliana*

U kontrolních semenáčků se hladiny aktivních CK pohybovaly v rozmezí od 11,97 – 25 pmol/g FW. CK nukleotidy se vykytovaly téměř na stálé koncentrační hladině s průměrnou hodnotou kolem 25,77 pmol/g FW a zásobní CK se pohybovaly od 48,37 – 76,94 pmol/g FW. Porovnání hladiny *O*-glukosidů a *N*-glukosidů je znázorněno v obr. 10 a 11.



Obr. 10: Hladiny *O*-glukosidů (OG, ROG) detekované u semenáčků *A. thaliana* pěstovaných za různých světelných podmínek



Obr. 11: Hladiny *N*-glukosidů (N7G, N9G) detekované u semenáčků *A. thaliana* pěstovaných za různých světelných podmínek

Mezi zásobní CK patří reverzibilní *O*-glukosidy, které mohou být pomocí β -glukosidázy přeměněny zpět na aktivní formy, a *N*-glukosidy, které jsou ireverzibilní formou (Spíchal, 2012). U semenáčků pěstovaných za tmy došlo k výraznému nárůstu hladin *O*-glukosidů během třetího dne z hladiny kolem 5 pmol/g FW na hladinu \pm 13 pmol/g FW. Oproti tomu hladiny *N*-glukosidů se pohybovaly průměrně kolem 57,95 pmol/g FW a nevykazovaly až tak výrazný nárůst.

U všech tří podmínek se hladiny *O*-glukosidů pohybovaly v hodnotách do 13 pmol/g FW, oproti tomu hodnoty *N*-glukosidů byly výrazně vyšší. Největší podíl u *N*-glukosidů tvořily *N*⁷-glukosidy, které se pohybovaly v desítkách pmol/g FW, neboť pozice *N*⁷ je prioritní pozice v procesu glykosylace (Hou et al., 2004; Mok & Mok, 2001). Na druhou stranu, *N*⁹-glukosidy se pohybovaly pouze v jednotkách pmol/g FW.

5 Diskuse

Ve výše uvedených výsledcích jsou zobrazeny rozdíly v endogenních hladinách CK u rostlin pěstovaných za různých světelných podmínek. U kontrolních semenáčků a u semenáčků pěstovaných při nízké intenzitě světla se nejvíce vyskytují CK iP-typu, díky čemuž je možné usuzovat, že je zde funkční biosyntéza (Janečková, 2017). Oproti tomu u semenáčků pěstovaných za tmy došlo k nárůstu cZ-typu. Tento typ CK nejspíše hraje významnou roli při udržení bazální aktivity rostliny (Gajdošová et al., 2011).

U tmy a nízké intenzity světla došlo k poklesu aktivních CK a nukleotidů oproti kontrole. Ve tmě se nukleotidy kromě prvního dne nevyskytovaly. Oproti tomu jsou zvýšené hladiny zásobních CK, z čehož lze vyvodit, že za sníženého nebo žádného světla převládá inaktivace a degradace nad biosyntézou (Janečková et al., 2018).

Při měření v průběhu dnů byly u tmy i nízké intenzity první den detekovány zvýšené hladiny CK a druhý den došlo k jejich výraznému poklesu. Tento průběh dává podnět k hypotéze, že rostliny první den nebyly zcela zadaptovány na změnu světelných podmínek a metabolizovaly se ještě podle podmínek původních.

6 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo stanovení endogenních hladin cytokininů v semenáčcích *A. thaliana* pěstovaných za různých podmínek intenzity světla. Pro jejich purifikaci byla použita miniaturizační metoda Stagetip, která je levnou a účinnou metodou zajišťující analýzu z miligramového množství rostlinného materiálu. Cytokinininy byly poté detekovány pomocí metody UHPLC-MS/MS.

Rostliny se setkávají se změnami intenzity světla běžně v průběhu celého života. Světlo je podstatným faktorem pro jejich růst a vývoj. Při sledování vlivu světla na hladiny cytokininů je patrné, že při jeho snížení nebo úplné absenci dochází také ke snížení cytokininových hladin a ke změně poměrů mezi metabolity. Významný nárůst cZ-typu u rostlin pěstovaných ve tmě ukazuje, že tento typ cytokininů je důležitým typem pro udržování životaschopnosti rostliny během poklesu intenzity světla. Zároveň bylo zjištěno, že cytokininová biosyntéza a metabolismus jsou významně ovlivňovány světelnými podmínkami, ve kterých rostlina roste.

Cytokinininy jsou významnou skupinou rostlinných hormonů, které zajišťují v rostlině množství procesů a mají nezastupitelný význam. V současnosti probíhá množství výzkumů objasňujících jejich strukturu, metabolismus, funkce, interakce s dalšími látkami a reakce na vnější vlivy. Tyto informace je možné dále využít v řadě vědních oborů. I přes veškerý výzkum je stále řada poznatků, které nebyly ještě zcela prozkoumány. Tato bakalářská práce by tak mohla být nápomocna k dalšímu studování interakcí mezi světlem a cytokinininy.

7 Literatura

- Bielach, A., Hrtyan, M., & Tognetti, V. B. (2017). Plants under stress: Involvement of auxin and cytokinin. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7).
<https://doi.org/10.3390/ijms18071427>
- Boonman, A., Prinsen, E., Voesenek, L. A. C. J., & Pons, T. L. (2009). Redundant roles of photoreceptors and cytokinins in regulating photosynthetic acclimation to canopy density. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1179–1190.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern364>
- 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*. <https://doi.org/10.1126/science.8235622>
- Cermanová, Kateřina. Sledování změn obsahu cytokininů v průběhu dne v semenáčcích *Arabidopsis thaliana*. Olomouc, 2020. Bakalářská práce. Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Laboratoř růstových regulátorů.
- Corot, A., Roman, H., Douillet, O., Autret, H., Perez-Garcia, M. D., Citerne, S., Bertheloot, J., Sakr, S., Leduc, N., & Demotes-Mainard, S. (2017). Cytokinins and abscisic acid act antagonistically in the regulation of the bud outgrowth pattern by light intensity. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01724>
- Cortleven, A., Leuendorf, J. E., Frank, M., Pezzetta, D., Bolt, S., & Schmölling, T. (2019). Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants. *Plant Cell and Environment*, 42(3), 998–1018. <https://doi.org/10.1111/pce.13494>
- Cortleven, A., Nitschke, S., Klaumünzer, M., AbdElgawad, H., Asard, H., Grimm, B., Riefler, M., & Schmölling, T. (2014). A novel protective function for cytokinin in the light stress response is mediated by the ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE3 receptors. *Plant Physiology*, 164(3), 1470–1483. <https://doi.org/10.1104/pp.113.224667>
- Davies, P. J. (2010). The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_1
- 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(1–2), 21–29.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00024-9)
- Edelman, M., & Mattoo, A. K. (2008). D1-protein dynamics in photosystem II: The lingering enigma. In *Photosynthesis Research*. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9342-x>
- Feng, J., Shi, Y., Yang, S., & Zuo, J. (2017). Cytokinins. In *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00003-7>
- Frébortová, J., Fraaije, M. W., Galuszka, P., Šebela, M., Peč, P., Hrbáč, J., Novák, O.,

- Bilyeu, K. D., English, J. T., & Frébort, I. (2004). Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: Preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20031813>
- Gajdošová, S., Spíchal, L., Kamínek, M., Hoyerová, K., Novák, O., Dobrev, P. I., Galuszka, P., Klíma, P., Gaudinová, A., Žižková, E., Hanuš, J., Dančák, M., Trávníček, B., Pešek, B., Krupička, M., Vaňková, R., Strnad, M., & Motyka, V. (2011). Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2827–2840. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq457>
- Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Köllmer, I., Schmülling, T., & Frébort, I. (2007). Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9008-5>
- Gan, S., & Amasino, R. M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. In *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.270.5244.1986>
- Haberer, G., & Kieber, J. J. (2002). Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. In *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.010773>
- Hausarová, E., Swaczynová, J., Doležal, K., Lenobel, R., Popa, I., Hajdúch, M., Vydra, D., Fuksová, K., & Strnad, M. (2005). Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins. *Journal of Chromatography A*, 1100(1), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.020>
- Hou, B., Lim, E. K., Higgins, G. S., & Bowles, D. J. (2004). N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47822–47832. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409569200>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.03.010>
- Janečková, H., Husičková, A., Ferretti, U., Prčina, M., Pilařová, E., Plačková, L., Pospíšil, P., Doležal, K., & Špundová, M. (2018). The interplay between cytokinins and light during senescence in detached *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell and Environment*, 41(8), 1870–1885. <https://doi.org/10.1111/pce.13329>
- Kakimoto, T. (2003). Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research*, 116(3), 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0095-5>
- Kamínek, M. (2015). Tracking the Story of Cytokinin Research. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 723–739. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9543-4>
- 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(14), 14049–14054. <https://doi.org/10.1074/JBC.M314195200>
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, 12, e0168. <https://doi.org/10.1199/tab.0168>

- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development (Cambridge, England)*, 145(4), 1–7. <https://doi.org/10.1242/dev.149344>
- Letham, D. S. (1973). Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry*, 12(10), 2445–2455. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80453-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80453-4)
- Ljung, K., Sandberg, G., & Moritz, T. (2010). Methods of plant hormone analysis. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_31
- Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1956). Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja01588a032>
- Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1955). Kinetin, a Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja01610a105>
- Mok, D. W. S., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(39), 89–118. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.89>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nitschke, S., Cortleven, A., & Schmülling, T. (2017). Novel Stress in Plants by Altering the Photoperiod. *Trends in Plant Science*, 22(11), 913–916. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.005>
- Novák, O., Hauserová, E., Amakorová, P., Doležal, K., & Strnad, M. (2008). Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 69(11), 2214–2224. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.022>
- 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(2), 207–218. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00025-4)
- Pavlů, J., Novák, J., Koukalová, V., Luklová, M., Brzobohatý, B., & Černý, M. (2018). Cytokinin at the crossroads of abiotic stress signalling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 1–36. <https://doi.org/10.3390/ijms19082450>
- Plačková, L., Hrdlička, J., Smýkalová, I., Cvečková, M., Novák, O., Griga, M., & Doležal, K. (2015). Cytokinin profiling of long-term in vitro pea (*Pisum sativum* L.) shoot cultures. *Plant Growth Regulation*, 77(2), 125–132. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0044-z>
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., Gloser J., Havel L., Nátr L. Prášil I., Sladký Z. Šantrůček J., Tesařová M., Vyskot B. (1998). *Fyziologie rostlin*, Academia Praha, Praha, Česká republika

- Procházková D., Haisel, D., & Wilhelmová, N. (2008). Antioxidant protection during ageing and senescence in chloroplasts of tobacco with modulated life span. *Cell Biochemistry and Function*, 26, 582-590. <https://doi.org/10.1002/cbf.1481>
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., & Mann, M. (2003). Stop And Go Extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac026117i>
- Sakakibara, H. (2006). CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 431–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>
- Sakakibara, H. (2010). Cytokinin biosynthesis and metabolism. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_5
- Skoog, F., Strong, F. M., & Miller, C. O. (1965). Cytokinins. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.148.3669.532-a>
- Smith, S. M., Li, C., & Li, J. (2017). Hormone function in plants. In *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00001-3>
- Soni, R., Carmichael, J. P., Shah, Z. H., & Murray, J. A. H. (1995). A Family of Cyclin D Homologs from Plants Differentially Controlled by Growth Regulators and Containing the Conserved Retinoblastoma Protein Interaction Motif. *The Plant Cell*. <https://doi.org/10.2307/3869840>
- Spíchal, L. (2012). Cytokinins - Recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*, 39(4), 267–284. <https://doi.org/10.1071/FP11276>
- Spiess, L. D. (1975). Comparative Activity of Isomers of Zeatin and Ribosyl-Zeatin on *Funaria hygrometrica*. *Plant Physiology*, 55(3), 583–585. <https://doi.org/10.1104/pp.55.3.583>
- Strnad, M. (1997). The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01052.x>
- Strnad, M., Peters, W., Beck, E., & Kamínek, M. (1992). Immunodetection and identification of N⁶-(o-Hydroxybenzylamino)purine as a naturally occurring cytokinin in populus × canadensis moench cv robusta leaves. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.99.1.74>
- 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(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-17>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2015). *Plant Physiology (Sixth Edition)*. Sinauer Associates. Sunderland, U.S.A
- Takahashi, S., & Badger, M. R. (2011). Photoprotection in plants: A new light on photosystem II damage. In *Trends in Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.10.001>

- Tarkowská, D., Doležal, K., Tarkowski, P., Āstot, C., Holub, J., Fuksová, K., Schmülling, T., Sandberg, G., & Strnad, M. (2003). Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00071.x>
- Tarkowská, D., Novák, O., Floková, K., Tarkowski, P., Turečková, V., Grúz, J., Rolčik, J., & Strnad, M. (2014). Quo vadis plant hormone analysis? *Planta*.240:55-76, <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2063-9>
- Tarkowski, P., Ge, L., Yong, J. W. H., & Tan, S. N. (2009). Analytical methods for cytokinins. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(3), 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.11.010>
- Went, F. W., Thimann, K. V. (1937). *Phytohormones*. The Macmillan Company, New York, U.S.A
- Yang, C., & Li, L. (2017). Hormonal regulation in shade avoidance. *Frontiers in Plant Science*, 8(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01527>
- Zwack, P. J., & Rashotte, A. M. (2015). Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 66(16), 4863–4871. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv172>