

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE  
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ  
KATEDRA GENETIKY A FYZIOLOGIE LESNÍCH DŘEVIN

CYTOKININY VE VZTAHU K ROSTLINNÝM  
PATOGENŮM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: doc. Ing. Ivana Tomášková, Ph.D.

Bakalant: Žaneta Valdecká

2018

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Žaneta Valdecká

Aplikovaná ekologie

Název práce

Cytokinininy ve vztahu k rostlinným patogenům

Název anglicky

Cytokinins and plant pathogens interactions

---

### Cíle práce

Cílem práce bude rešerše literatury, která se věnuje využívání rostlinného hormonu cytokininu patogeny jako jsou hmyz, hlístice a bakterie.

### Metodika

Práce se zaměří na poslední poznatky týkající se biosyntézy a metabolismu cytokininů a fyziologické procesy, které v rostlině ovlivňují, včetně analytických metod, které se používají pro stanovení obsahu fytohormonů (Li a kol., 2000; Walters a McRoberts, 2006). Obecná část se také bude věnovat rozboru méně známé schopnosti cytokininů naopak urychlit senescenci v souvislosti se změnou vnějších podmínek, zejména prudkého navýšení světelného záření a také jejich roli při ochraně napadené rostliny nebo stresu (Vomáčka a Pospíšilová, 2003). Podstatnou část práce bude tvořit analýza vztahu rostlina x patogen v souvislosti s produkcí sledovaného fytohormonu, identifikace hmyzích patogenů a hlístic a míru jejich metabolického zapojení do produkce cytokininu (Siddique a kol., 2015). Pozornost bude věnována rovněž mutualistickým vztahům mezi hmyzími škůdci a bakteriemi, neboť právě přítomnost bakterií je v některých případech zodpovědná za produkci cytokininu (Erb a kol., 2012). Závěr bude věnován praktickému využití cytokininů v boji proti rostlinným patogenům (Giron a kol., 2013).

**Doporučený rozsah práce**

40-50 stran

**Klíčová slova**

bakterie, fytohormony, hlístice, senescence

---

**Doporučené zdroje informací**

- Erb, M., Meldau, S., & Howe, G. A. (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science*, 17(5), 250–259.
- Giron, D., Frago, E., Glevarec, G., Pieterse, C. M. J., & Dicke, M. (2013). Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: connecting plant growth and defence. *Functional Ecology*, 27(3), 599–609.
- Li, R., Sosa, J. L., & Zavala, M. E. (2000). Accumulation of zeatin O-glycosyltransferase in *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays* following cold stress. *Plant Growth Regulation*, 32(2–3), 295–305.
- Siddique, S., Radakovic, Z. S., Carola, M., Chronis, D., Novák, O., Ramireddy, E., ... Gutbrod, P. (2015). A parasitic nematode releases cytokinin that controls cell division and orchestrates feeding site formation in host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(41), 12669–12674.
- Vomáčka, L., & Pospíšilová, J. (2003). Rehydration of sugar beet plants after water stress: effect of cytokinins. *Biologia Plantarum*, 46(1), 57–62.
- Walters, D. R., & McRoberts, N. (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science*, 11(12), 581–586.
- 

**Předběžný termín obhajoby**

2017/18 LS – FŽP

**Vedoucí práce**

doc. Ing. Ivana Tomášková, Ph.D.

**Garantující pracoviště**

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 6. 1. 2017

prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 9. 3. 2017

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 16. 04. 2018

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Ivany Tomáškové, Ph.D., a že jsem uvedla všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala.

Prohlašuji, že tištěná verze se shoduje s verzí odevzdanou přes Univerzitní informační systém.

V Praze 19.4.2018

.....

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce paní doc. Ing. Tomášková, Ph.D. za odbornou pomoc, trpělivé vedení a rady. Také bych ráda poděkovala své rodině, kolegům a přátelům za trpělivost.

V Praze 19.4.2018

.....

## Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá jednotlivými fytohormony, jejich působením na rostlinná pletiva, jejich interakcím a vztahem vybraných fytohormonů, v tomto případě cytokininů, k patogenům.

První část bakalářské práce je věnována jednotlivým fytohormonům. Je zde shrnut jejich význam v rostlinách, v některých případech i jejich historie. Krátce je pozornost věnována také způsobu stanovení cytokininů analytickými metodami.

Další část je věnována pouze cytokininům, jejich syntéze i degradaci. Zvláštní pozornost je věnována senescenci rostliny, a zvláště pak úlohy, jakou v tomto procesu cytokininy mají.

Důraz je ovšem kladen na úlohu těchto fytohormonů v interakci mezi rostlinnými škůdci a rostlinami. Práce se zabývá nejen možností, že jsou rostlinní škůdci schopni cytokininy syntetizovat, ale také se zabývá, jakými způsoby a s jakým záměrem jsou použity.

Práce se také zabývá možným využitím cytokininů v jednotlivých oblastech lidských činností, jako je zemědělství či zdravotnictví.

Závěr je pak věnován shrnutí všech získaných poznatků z jednotlivých studií.

## Klíčová slova:

Fytohormony, cytokininy, senescence, rostlinní škůdci.

## Abstract

Bachelor thesis deals with individual phytohormones, their effects on plant tissues, their interactions and relation of selected phytohormones, in this case cytokinins, to pathogens.

The first part of the bachelor thesis is devoted to individual phytohormones. Their significance in plants, in some cases their history, is summarized. There is a summary of the method for the determination of cytokinins using analytical methods.

The cytokinins issue their synthesis and degradation is deeply discussed. Particular attention is paid to senescence of the plants and the role of cytokinins in this process. However, the main attention is focused on the role of these phytohormones in the interaction between phytopathogens and plants and which part of the relationship is responsible for cytokinin production.

In conclusion the main remarks from literature search are highlighted as well as possible use of cytokinins in agriculture or health care.

## Keywords:

Phytohormones, cytokinins, senescence, phytopathogens

## Seznam použitých zkratk

AMK	aminokyselina
ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
ATP	adenosintrifosfát
BA	6-benzyladenin
BAP	6-benzylaminopurin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CE	kapilární elektroforéza
DHZ	dihydrozeatin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GC	plynová chromatografie
GMO	geneticky modifikovaný organismus
UHPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	kyselina indolyl-3-octová
IBA	indol-3-máselná kyselina
iP	N <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -izopentyl)adenin
iPA	izopentenyladenosin
MS	hmotnostní spektrometr
LC	kapalinová chromatografie
LHK	histidin kináza
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
MtCREI	cytokininová odezva
<i>oT</i>	<i>orto</i> -topolin
PAA	kyselina fenylactová
PGP	fosfoglykoproteiny
PIN	PIN-FORMED proteiny
<i>pT</i>	<i>para</i> -topolin
pyratin	6-(furfurylamino)-9-(tetrahydropyran-2-yl)-purin
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SPE	extrakce tuhou fází
STH	růstový hormon
T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina
t-RNA	transferová ribonukleová kyselina
tRNA-IPT	tRNA-izopentyltransferáza



## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce .....	1
3. Fytohormony.....	1
3.1 Historie .....	1
3.2 Základní pojmy.....	2
3.3 Cytokininy .....	4
3.3.1 Historie .....	4
3.3.2 Druhy.....	6
3.3.3 Význam .....	7
3.3.4 Stanovení cytokininů.....	8
3.4 Auxiny .....	10
3.4.1 Druhy.....	10
3.4.2 Historie .....	11
3.4.3 Význam .....	12
3.4.4 Polární transport .....	12
3.5 Etylen.....	14
3.5.1 Historie .....	14
3.5.2 Struktura .....	14
3.5.3 Fyziologické účinky .....	14
3.6 Ostatní látky s regulační funkcí .....	15
3.6.1 Brassinosteroidy .....	15
3.6.2 Kyselina abscisová .....	15
3.6.3 Kyselina jasmonová .....	16
3.6.4 Kyselina salycilová .....	16
3.6.5 Strigolaktony .....	17
4. Cytokininy.....	17
4.1 Biosyntéza a metabolismus cytokininů .....	17
4.1.1 Konjugace a oxidační degradace cytokininů.....	18
4.2 Transport cytokininů.....	19
4.3 Mechanismus účinku .....	19
5. Vliv cytokininů na rostlinu .....	19
5.1 Buněčné dělení .....	20

5.2	Regenerace orgánů .....	20
5.3	Senescence.....	20
6.	Produkce cytokininu při napadení patogenem.....	23
6.1	Napadení hlísticí.....	25
6.2	Napadení houbou.....	26
6.3	Napadení bakterií.....	28
6.4	Napadení hmyzem.....	31
6.5	Mutualistické soužití hmyzu a bakterie.....	32
7.	Praktické využití.....	33
8.	Výsledné zhodnocení.....	35
9.	Diskuze.....	35
10.	Závěr.....	37
11.	Přínos práce.....	38
	Použitá literatura.....	39
	Seznam obrázků.....	43

## 1. Úvod

Hormony jsou nesmírně důležité chemické sloučeniny pro každý mnohobuněčný organismus. Slouží k přenosu informací mezi jednotlivými buňkami. Stejně tomu je i u fytohormonů rostliny. Ty hrají v životě rostliny zásadní význam nejen v komunikaci, ale také v mnoha dalších aspektech, jako je například ochrana, výživa a mnoho dalších.

Těchto fytohormonů se však naučila využívat celá řada patogenů. Škůdci skrze fytohormony nutí rostlinu k jejich výživě, a dokonce se jimi ochraňují před obranou rostliny. Jakými způsoby tak činí, nebylo dosud zcela objasněno.

Další záhadou je soužití rostlinných škůdců bakterie/hmyz. Jak jsou v tomto vztahu cytokinininy vytvářeny, zda se na syntéze podílí i hmyz a do jaké míry tak činí, je stále předmětem studie.

## 2. Cíle práce

Bakalářská práce se zabývá shrnutím informací získané z jednotlivých výzkumů cytokininů. Jejich využitím nejen rostlinami, ale převážně jejich patogeny. Cílem tedy je:

- Popis jednotlivých fytohormonů rostliny a jejich funkcí.
- Popis úlohy cytokininů v procesu senescence.
- Detailní analýza využívání cytokininů rostlinnými škůdci.
- Využití poznatků v praxi.

## 3. Fytohormony

### 3.1 Historie

Počátek zemědělství zcela změnil ráz lidského společenství. Začaly se vytvářet zemědělské plochy, které ukotvily naše předky na jednom místě. Jak se zemědělství postupně rozvíjelo, vytvářely se nové odrůdy plodin, lidé účelně přinášeli exotické druhy do nových oblastí a tím utvářeli zcela nový ráz krajiny. S přibývajícím počtem lidí, se zemědělci snažili o zvýšení výnosů plodin. A tak vzrostl zájem o vytvoření dokonalejších, zdravějších a odolnějších odrůd.

Zpočátku se věřilo, že růst rostlin je ovlivněn výživou rostliny. J. von Sachs (1832-1897) ovšem vyslovil domněnku, že rostliny, ač u nich samozřejmě výživa hraje klíčovou roli, jsou řízeny a

ovlivňovány chemickými signály a že za pomoci těchto chemických signálů mohou jednotlivé orgány rostliny mezi sebou komunikovat.

Tato myšlenka však byla rozvinuta až profesorem R. Dostálem (1885-1973) a to za pomoci řady morfologických pokusů (Procházka et al. 1998). Jedním z pokusů byla i metoda, kdy se klíčící rostlině hrachu odřízl kus vrchní části lodyhy a jedné z děloh. Vzniknuvší pupen následně rostl pouze v úžlabí chybějící dělohy, protože měl zredukovanou výživu. Díky těmto pokusům, se v následujících několika letech nahromadilo mnoho informací o látkách, které získali obecný název; růstové regulátory. To byl významný objev z hlediska hormonů, protože převážná část těchto růstových regulátorů tvoří fytohormony (Procházka et al. 1998). Jak postupně výzkum pokračoval, získávali se další informace a byla zkoumána i historie těchto pro rostlinu nezbytných chemických látek. Z výzkumů se usuzuje, že se rostlinné hormony objevily kdysi dávno u menších forem života. Předpokládá se, že tyto primitivní organismy neměly pro fytohormony žádné využití. Zřejmě tyto látky vylučovaly do svého prostředí, jako nepotřebný odpad. S nástupem složitějších mnohobuněčných rostlin se také objevila potřeba po vzájemné komunikaci jednotlivých částí těchto složitějších, ale na dnešní poměry stále primitivních, rostlin. A tak došlo k evolučnímu vzniku mechanismů pro přenos potřebných informací a složitější systém reakcí na vnější podněty. Evoluce pak nesáhla po ničem jiném, než po nepotřebných a doposud nevyužívaných fytohormonech (Psota et Šebánek, 1999).

S nástupem dokonalejší ochrany rostliny, opět se opírající o fytohormony, se vyvíjely i složitější mechanismy parazitických forem jednotlivých organismů (Yurkov et al, 2017). Proto dnes primitivní organismy, na rozdíl od těch pradávných, našly využití fytohormonů, a to právě k vytvoření parazitického vztahu s vyššími rostlinami (Psota et Šebánek, 1999).

### 3.2 Základní pojmy

Protože se jedná o velmi staré chemické sloučeniny, jsou fytohormony nízkomolekulární látky, které slouží hlavně ke komunikaci. Tato komunikace probíhá po celou dobu života rostliny. Fytohormony se v rostlinných pletivech nacházejí v koncentracích mikromolech až femtomolech na gram čerstvého rostlinného materiálu.

Není to však jen komunikace. Podílejí se také na celé řadě pro rostlinu důležitých činností. Regulují růst v jednotlivých částech rostliny, a to od kořenů po terminální vrchol. Rovněž se podílejí na samotném vývoji rostliny (Podlešáková et al., 2012).

Je mylné se domnívat, že rostlinné hormonální chemické sloučeniny se funkcí a syntézou nikterak neliší od živočišných. Živočišné hormony jsou velmi specifické, a i jejich tvorba probíhá na určených místech. Příkladem takového místa je kupříkladu adenohipofýza, žláza s vnitřní sekrecí, která je schopná syntetizovat, mimo jiné, i růstový hormon (STH). Naproti tomu rostlina syntetizuje fytohormony na vícero místech. Jeden druh fytohormonu tak není odkázaný jen na jeden daný orgán a v případě odstranění určité části rostliny tak nedochází k nedostatku těchto chemických látek. Cytokininy jsou na příklad převážně syntetizovány v kořenech, ale také mohou být syntetizovány v menší míře i v ostatních částech rostliny (Psota et Šebánek, 1999). Důvodem je možná potřeba ochrany před ztrátou tak životně důležitých fytohormonů, ostatně senescence rostlin by se v takovém případě stala zřejmě nesmírně problematickým procesem (Procházka et al. 1998). Takto je syntéza fytohormonů odkázána pouze na specializované buňky, které se nacházejí všude v rostlině (Psota et Šebánek, 1999).

Dalším zajímavým rozdílem mezi fytohormony a živočišnými hormony je ve funkcích. Živočišné hormony jsou výrazně specifické a jen určité procesy jsou ovlivněny vícero možnými způsoby. Nicméně hormony jako takové řídí vždy jen jednu činnost, ač mnohdy závislou na jiné činnosti. Fytohormony tuto specifickou nemají (Procházka et al. 1998). Příkladem by opět mohl být STH, který ovlivňuje růst živočichů. Jiné využití tento hormon nemá. Oproti tomu cytokinin zeatin má hned několik funkcí, jako je například senescence, kontrola buněčného dělení a další.

Fytohormony jsou schopny ovlivnit vícero často velmi odlišných biochemických a morfologických procesů (Psota et Šebánek, 1999). Jeden konkrétní fytohormon se může podílet na řízení i třeba pěti činností. Také nepůsobí samostatně. Jeden proces může ovlivňovat několik druhů fytohormonů, čímž se opět sníží nebezpečí zastavení procesu vlivem nedostatku jednoho konkrétního fytohormonu (Podlešáková et al., 2012). O výsledném efektu tedy nakonec rozhodne vzájemná koncentrace dvou či více fytohormonů nežli koncentrace jednoho samotného hormonu. Příkladem může být dormance semen, která je ovlivněna vzájemným poměrem gibberelinů a kyseliny abscisové.

Nepříjemnou vlastností pro výzkum je, že mechanismus účinku rostlinných fytohormonů může na různé typy buněk reagovat zcela odlišně. Právě rozmanitost fungování fytohormonů a jejich zcela odlišné reakce na různé typy buněk velmi znesnadňuje jejich celkové pochopení. I přes

to všechno je ovšem mechanismus účinku velmi blízký působení živočišných hormonů (Procházka et al. 1998).

Fytohormonů je celá řada. Samotné endogenní fytohormony s regulační aktivitou rozdělujeme na pět základních skupin.:

- Cytokininy
- Auxiny
- Gibereliny
- Kyselina abscisová
- Ethylen

Rostliny jsou také ovlivněny látkami, které mají regulační funkce. Příkladem je například kyselina salicylová, kyselina jasmonová a další.

(Dvořáková, 2015; Creelman et Muller, 1997; Procházka et al. 1998).

### 3.3 Cytokininy

Zájem o tento druh fytohormonů v posledních letech značně narostl, obzvláště v kosmetickém průmyslu. V rostlinných pletivech se tento druh fytohormonů vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích (až femtomolech), což je jeden z důvodů, proč objev cytokininů trval tak dlouho. Rovněž tato míra koncentrace způsobuje nemalé problémy při zkoumání cytokininů v rostlinách (Doležal et Strnad, 2017). I přes nesnáze, byl tento druh fytohormonů identifikován v téměř všech známých organismech (Spíchal, 2012).

#### 3.3.1 Historie

Objevení cytokininu bylo poměrně náročné.

První teorie vedoucí k objevu cytokininu, vznikla roku 1882. Jednalo se o teorii buněčného dělení, kdy by měl být tento proces vyvolán jakýmsi vnitřním činitelem. Co je však tímto činitelem a jak tato stimulace probíhá, zůstalo záhadou. Další posun nastal v roce 1913 (Psota et Šebánek, 1999), ale chemická struktura spouštěcí látky, nebo vůbec způsob, jak probíhá

komunikace, byla stále neobjasněna a čekala na své objevení. Roku 1913 se povedlo izolovat látky z lýkového pletiva. Když poté byly tyto látky zkoumány, zjistilo se, že vyvolávají buněčné dělení v parenchymatických pletivech. To však bylo vše, co za tehdejších podmínek mohli vědci zjistit. Byl to až rok 1955, kdy byl objeven první cytokinin (Psota et Šebánek, 1999). Tento objev byl nesmírně klíčový pro vědeckou biologickou obec. Důvodem nebyla záhada buněčného dělení, důvodem byla potřeba výzkumu tkáňových kultur (metoda zkoumající buněčné kultury na mikrobiální úrovni v prostředí *in vitro*). Tkáňové kultury byly totiž na objevu cytokininu nesmírně závislé, protože buňky jednotlivých částí rostlin se mohou dělit jen za přítomnosti cytokininu. Proto byl objev cytokininů tak převratný.

Je zajímavé, že prvně objevený cytokinin, nebyl izolován z rostlinného pletiva. Tento objev pocházel z živočišného vzorku, konkrétně ze spermií sledě. Tímto cytokininem se stal kinetin. Jeho přesný chemický název zní: 6-furfurylaminopurin, nebo také 6-furfuryladenin.

Kinetin se povedlo získat z nejbohatšího zdroje na cytokininy, a to z autoklávované deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (Procházka et al. 1998). Ovšem to, zda se tento cytokinin přirozeně vyskytuje v rostlinách, nedokázal určit žádný vysoce důmyslný analytický přístroj či metoda té doby. A z tohoto důvodu je za první objevený endogenní cytokinin považován zeatin. Ten byl objeven v nezralém endospermu kukuřice až v roce 1973 (Procházka et al. 1998). Jedná se o aromatický cytokinin. Tento druh cytokininů byl dlouhý čas mylně považován za sporadické sloučeniny, které se vyskytují jen v některých rostlinných druzích (Doležal et Strnad, 2017).

Jak docházelo k dalším výzkumům, objevovaly se další a další cytokininy, které vzbuzovaly zájem vědců. Kupříkladu v kulturách *in vitro* byly spolu s kinetinem využívány i další později objevené cytokininy. Buď se v kulturách využíval 6-benzyladenin (BA) nebo 6-benzylaminopurin (BAP). BA a BAP byly po dlouhé roky považovány za syntetické cytokininy. To platilo až do roku 1972. V tomto roce totiž došlo k objevu *o*-hydroxybenzyladenin v listech topolu (Doležal et Strnad, 2017). Tento nově objevený cytokinin neměl nijak vysokou aktivitu, proto tomuto objevu nebyla věnována velká pozornost, ale povedlo se díky němu prokázat, že aromatické cytokininy se v rostlinách přirozeně vyskytují (Procházka et al. 1998). Tím se zcela změnil pohled na tyto fytohormony. Objev BAP v rostlinách jasně naznačil, a později také prokázal, že aromatické cytokininy jsou daleko významnější a mezi rostlinami rozšířenější, než se do té doby věřilo. Další analogické struktury BAP prokázaly vysokou biologickou aktivitu, ale naneštěstí to již byly látky pouze syntetické (Doležal et

Strnad, 2017). Právě potvrzení o důležitosti aromatických cytokininů přinesl rok 1973, kdy R. Horgan poprvé získal z listů topolu kanadského (*Populus x robusta*, dnes pojmenován jako *Populus x canadensis*) aromatický cytokinin. Ten byl identifikován jako 6-(2-hydroxybenzylamino)-9-β-D-ribofuranosylpurin. Spolu s tímto cytokininem byl objeven i druhý, jenž byl identifikován jako 2-methylthioglukosuranosylvový derivát. Ten byl objeven v plodech kornoutice africké (*Zantedeschia aethiopica*) (Doležal et Strnad, 2017).

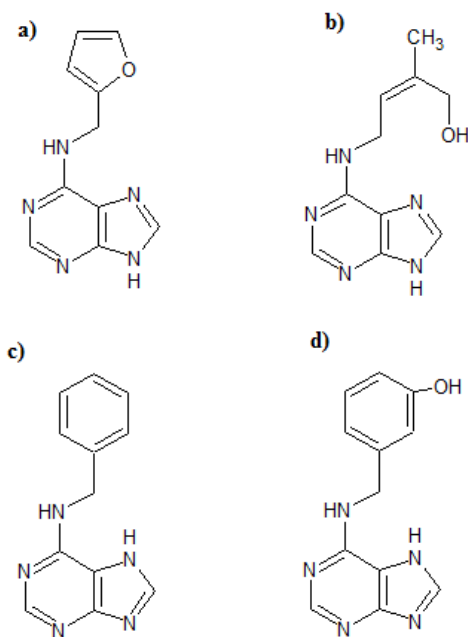
### 3.3.2 Druhy

Cytokininy jsou druhem fytohormonů, které jsou odvozené od chemické sloučeniny purinu. Není to však pravidlem. Mezi cytokininy jsou také řazeny chemické látky, které nemají purinový základ ve své chemické struktuře, přesto mají podobné vlastnosti jako cytokininy (Psota et Šebánek, 1999). Do dnešních dnů bylo objeveno více než 30 druhů endogenních cytokininů. Všechny tyto endogenní cytokininy rostlin, vychází strukturně z adeninu, který je substituován na aminokyselinách (AMK) v poloze 6. Právě tato chemická konfigurace je podmínkou pro buněčnou aktivitu, která je pro rostlinu nezbytná. Nejvyšší aktivita však byla zaznamenána u cytokininů, které mají izoprenoidní řetězec a dvojnou vazbu (Procházka et al. 1998). N<sup>6</sup> substituované deriváty adeninu, tedy přirozeně se vyskytující cytokininy, můžeme podle substituentu R<sup>2</sup> rozdělit na izoprenoidní cytokininy a aromatické cytokininy (Podlešáková et al., 2012).

Mezi izoprenoidní cytokininy řadíme N<sup>6</sup>-(Δ<sup>2</sup>-izopentyl)adenin (iP), dihydrozeatin (DHZ) a zeatin. Přičemž zeatin je ve své chemické struktuře hydroxylovaný iP, a to buď v pozici *cis* nebo *trans* (Podlešáková et al., 2012). Mezi aromatické cytokininy následně řadíme BA, BAP, *orto*-topolin (*oT*), *meta*-topolin (*mT*) a *para*-topolin (*pT*) a jejich metabolity (Doležal et Strnad, 2017).

Cytokininy, které mají ribózu v poloze N-9 jsou nazývány ribozidy a vazba kyseliny fosforečné v poloze 5 na ribózu vytváří ribotidy (Procházka et al. 1998).





**Obrázek 1: Chemický vzorec cytokininů navázaných v poloze N6 na adeninu (ChemSketch, 2017): a) kinetin; b) zeatin; c) 6-benzyladenin (BA), d) *m*-topolin.**

Nezanedbatelné jsou také látky nazývané anticytokinininy. Ty jsou, jak je již patrné z jejich názvu, látky, které fungují jako blokátory funkcí cytokininů. Anticytokinininy jsou využívány hlavně k porozumění mechanismu účinku jednotlivých již zmíněných fytohormonů. Řadí se sem mnoho látek, nejčastěji se však jedná o pyrolové a pyrazolové deriváty s modifikovaným postranním řetězcem (Procházka et al. 1998).

### 3.3.3 Význam

V rostlinách plní jednotlivé cytokinininy celou řadu funkcí. Jak bylo již zmíněno dříve, nelze tyto funkce přičíst jen jim samotným, ale na jednotlivých procesech se podílí více fytohormonů, které pomáhají udržovat tyto funkce ve (pro rostliny) správné činnosti.

Konkrétně se cytokinininy podílejí na:

- Iniciaci buněčného dělení
- Kontrolu buněčného dělení
- Přenos živin
- Stárnutí rostlinných pletiv

- Apikální dormance
- Koordinace vývoje kořenů
- Klíčení semen
- Tvorba laterálních pupenů
- Determinace kvetení
- Tvorba plodů
- Expanze děložního listu

(Taiz et Zeiger, 2010; Prášilová, 2016; Street et al. 2016; Doležal et Strnad, 2017).

Zvláště při buněčném dělení a diferenciaci buněk je rostlina odkázána na interakci mezi cytokininy a auxiny (Doležal et Strnad, 2017). Auxin se také podílí na koordinaci vývoje kořenů (Street et al. 2016). Takovéto interakce jsou ovšem mezi fytohormony zcela běžné.

#### 3.3.4 Stanovení cytokininů

Aby bylo možno cytokininy stanovit, je třeba tyto chemické látky nejprve extrahovat, k čemuž se využívají rostlinná pletiva. Přesto se nejedná o nijak vysoké koncentrace. I ta nejdokonalejší extrakce pomůže získat cytokininy o koncentracích v pikomolech až femtomolech na jeden gram živé hmoty rostliny (Doležal et Strnad, 2017). Tyto velmi nízké koncentrace dělají z cytokininů velmi špatně stanovitelné chemické látky. Dalším důvodem této nesnadnosti je, že v rostlině se nacházejí chemické sloučeniny, které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako cytokininy (Podlešáková et al., 2012).

Při prvních pokusech stanovovat cytokininy v takto malých koncentracích se využívalo imunochemických metod. Od druhé poloviny 90. let se pokrok ve stanovení posunul s využitím hmotnostních spektrometrů (MS). Tyto MS byly objeveny již dříve, bohužel neměly potřebnou citlivost pro stanovení takto nízkých koncentrací. Teprve se zlepšením citlivosti mohly být v tomto směru použity. Díky tomu začaly vznikat první citlivé instrumentální metody ke stanovení nízko-koncentračních (až femtomol) rostlinných cytokininů, ale ani tato citlivost nebyla dostatečná. Ke stanovení v těchto starších typech MS bylo potřeba využít až 10 g čerstvého rostlinného materiálu. Postupně docházelo ke zlepšování technologií a tím i zvýšení citlivosti analytických metod. To snížilo spotřebu rostlinného materiálu, ze kterého byly cytokininy extrahovány. Dnes je koncentrace strojů sloužící k analytickým metodám posunuta

až na buněčnou úroveň (za příznivých podmínek jsou některé stroje schopny analyzovat látky o látkovém množství  $10^{-21}$  mol nebo hmotnosti  $10^{-15}$  g) (Doležal et Strnad, 2017), což pochopitelně velmi zlepšilo možnosti stanovení takových látek s nízkou koncentrací, jako jsou rostlinné fytohormony.

Jak však bylo zmíněno na začátku, jakkoli citlivá analytická metoda začíná nezbytnou extrakcí. I tato metoda měla jistý vývoj. Nejčastěji se používala extrakční směs podle Bieleského. Ta je vytvořena z methanolu, chloroformu, kyseliny mravenčí a samozřejmě vody. Tyto substance se mísili v poměru 15:5:1:2. Je zřejmé, že nevýhodnou složkou této extrakční směsi, je chloroform. Ten mimo jiné zvyšuje extrakci lipofilních molekul a ty mohou pak následně zkomplikovat celý proces čištění. Samozřejmě má chloroform další nepříznivé vlastnosti, kvůli kterým se začala hledat nová extrakční směs. Z těchto důvodů se postupně začíná přecházet na novou extrakční směs, která obsahuje methanol, kyselinu mravenčí a vodu, a to v poměru 15:1:4. Jak je patrné, tato směs obsahuje stejné chemické látky jako směs podle Bieleského, jen neobsahuje chloroform a chemické sloučeniny jsou v jiném poměru (Podlešáková et al., 2012). Extrakcí však celý proces teprve začíná. Získaná směs totiž neobsahuje jen cytokininy, ale i množství dalších nežádoucích látek. Bylo tedy třeba vymyslet metodu, kterou by bylo možné separovat cytokininy od ostatních látek. Tou se stala extrakce tuhou fází (SPE). Metoda SPE využívá nepolární sorbenty, iontoměničce nebo směsné sorbenty, které mají vlastnosti jak nepolárních sorbentů, tak iontoměničů. Je proto třeba znát chemické vlastnosti látky, která má být konečným produktem. Metoda SPE je totiž založena na selektivní absorpci nežádoucích látek a následné eluci požadovaného analytu.

Jakmile jsou cytokininy pročištěny, může se přejít na koncovou analýzu. Tato chemická analýza byla prováděna za pomoci plynového chromatografu (GC) spojeného s MS. Po nějaké době však byla tato kombinace nahrazena přesnějším kapalinovým chromatografem (LC). Ten byl opět zakončen MS. Tyto metody byly sice účinné, ale poměrně pomalé a zdoluhavé. Urychlení tak přinesla až vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), kterou opět doplnil nezbytný MS. Ale i UHPLC začala v poslední době nahrazovat kapilární elektroforéza (CE). CE (Metoda založená na separaci látek za pomoci elektrického pole) opět doplňuje MS. Tato analytická metoda slouží nejen ke stanovení fyzikálně-chemických konstant cytokininů, ale také k jejich koncentraci v biologickém materiálu (Podlešáková et al., 2012).

Chromatografie je analytická metoda, pro niž je typické dělení složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Směs, jež je určena ke stanovení, je rozpuštěna v mobilní fázi. Tou je buď

kapalina, nebo plyn. Odtud rozlišení typu chromatografie – LC, GC. Mobilní fáze nese rozpuštěnou směs přes stacionární fázi. Rychlost, jakou jednotlivé složky stanovené směsi kolonou procházejí, je různá. Právě ona rychlost pomáhá určit, jaké látky jsou ve směsi obsaženy. Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které jednotlivé ionty rozlišuje za pomoci poměru hmotnost/náboj. Výše popsané metody jsou vhodné ke stanovení koncentrací, ovšem nelze jimi rozpoznat cytokininy.

K rozpoznávání jednotlivých skupin cytokininů byl dlouhou dobu využíván postup, který vytvořil na Československé akademii věd M. Strnad. Ten vytvořil originální imunodetekční postup. Jak název napovídá je tato metoda založena na interakci antigen/protilátka (dnes je tato metoda používána třeba v těhotenských testech). Každá z těchto protilátek byla vysoce specifická pro jednotlivé deriváty BAP. Proto byl tento analytický postup vysoce citlivý a bylo díky němu možné detekovat jednotlivé aromatické cytokininy. A to i přesto, že se i tyto cytokininy nacházeli v koncentracích na femtomolární úrovni (Doležal et Strnad, 2017). Později se však přešlo na jednodušší, rychlejší a neméně přesnou analytickou imunodetekční metodu nesoucí název enzyme-linked immunosorbent assay. Tato metoda je spíše známá pod svou zkratkou ELISA.

Postupem času se vytvořila rychlejší a daleko citlivější metoda pro stanovení a detekci celého spektra aromatických cytokininů. Tato metoda sestává z kombinace ELISA a UHPLC. Právě tato jedinečná kombinace dvou vysoce citlivých metod dopomohla k objevu hydroxyderivátů BAP, které byly pojmenovány jako topoliny (Doležal et Strnad, 2017).

## 3.4 Auxiny

### 3.4.1 Druhy

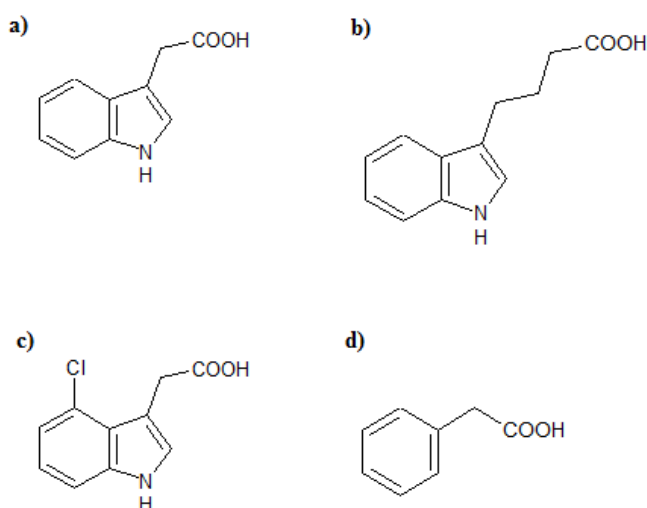
Tyto fytohormony jsou rozdělovány jako přirozené a syntetické. Stejně jako cytokininy, nebyly auxiny objeveny, jen rostlinách. Vykytují se také v bakteriích a řasách (Procházka et al. 1998). Mezi přírodní auxiny patří kyselina fenylactová (PAA) a kyselina indolyl-3-acetová (IAA) (Erb et al., 2012). PAA má ovšem daleko nižší účinky než IAA, přestože se v rostlinách vyskytuje v daleko vyšších koncentracích. Nejvíce PAA lze nalézt v plodech ovocných stromů (Procházka et al. 1998).

Syntetických auxinů je celá řada, a tak bylo nutné je dále rozdělit do několika skupin. Syntetické auxiny proto dělíme na:

- Naftalenové kyseliny
- Chlorfenolové kyseliny
- Benzoové kyseliny
- Deriváty kyseliny pikolové

(Procházka et al. 1998).

Stejně jako tomu bylo u aromatických cytokininů, i zde následný výzkum syntetických auxinů odhalil, že některé se v rostlinách přirozeně vyskytují a hrají svou roli v chemicko-fyziologických procesech, které jsou pro rostlinu nezbytné. Mezi takové auxiny patří indol-3-máselná kyselina (IBA) a 4-chlor-IAA (Procházka et al. 1998).



**Obrázek 2: Chemický vzorec auxinů (ChemSketch, 2017): a) kyselina indolyl-3-octová (IAA); b) indol-3-máselná kyselina (IBA); c) 4-chlor-IAA; d) kyselina fenylacetic (PAA)**

### 3.4.2 Historie

Auxiny jsou nejstaršími objevenými fytohormony vůbec. První nepřímá zmínka pochází již od Ch. Darwina z roku 1880. Ten ve svých studiích popsal jev, kdy poševnatý lístek jednoděložní rostliny, chránící prvotní vzrostlý vrchol nazývaný koleoptile, se po odříznutí nebo zakrytí vrcholu přestal ohýbat za světlem. Darwin tento pokus provedl na trávě rodu chřastice (*Phalaris*) (Psota et Šebánek, 1999). Ovšem co jev způsobuje a jak, Darwin neobjevil.

Funkci auxinů objevil až mezi lety 1926-1928 F. W. Weston (Procházka et al. 1998). Ten k tomu opět použil koleoptile, tentokrát její vrchol, a agar (Psota et Šebánek, 1999). Právě z tohoto pokusu Weston prokázal, že nějaká chemická látka v rostlině dokáže prodloužit růst rostliny. Právě odtud později získali auxiny svůj název. Auxin totiž řecky znamená prodlužovat se. Ale stejně jako v případě Darwina, ani Weston nebyl schopen nalézt strukturu ani jediného auxinu.

Je zajímavé, že první auxin byl vyzískán z lidské moči. Jednalo se o auxin IAA a stalo se tak roku 1931 (Psota et Šebánek, 1999). Je uváděn také rok 1933 (Procházka et al. 1998). Ale teprve roku 1946 byl IAA objeven v nezralé obilce kukuřice. Tím se později došlo k pravé povaze auxinů a jejich vlastností v rostlině. Následující výzkumy a pokusy prokázaly, že se auxiny vyskytují i v dalších vyšších rostlinách a rovněž byly objeveny v bakteriích a řasách. Jednalo se však pouze o IAA. Trvalo totiž velmi dlouho, než vědci objevili i jiný auxin. Další a další auxiny byly postupně objevovány se zlepšující se technologií analytických metod. A tak následně vědci objevili IBA, 4-chlor-IAA a PAA.

### 3.4.3 Význam

Auxiny mají celou řadu vlastností. Zde jsou některé z nich:

- Stimulace prodlužovacího růstu
- Buněčné dělení
- Diferenciace buněk
- Apikální dominance
- Zakořeňování
- Morfologie nadzemní i podzemní části – růst jednotlivých částí rostliny v určitém tvaru.

(Procházka et al. 1998; Erb et al., 2012).

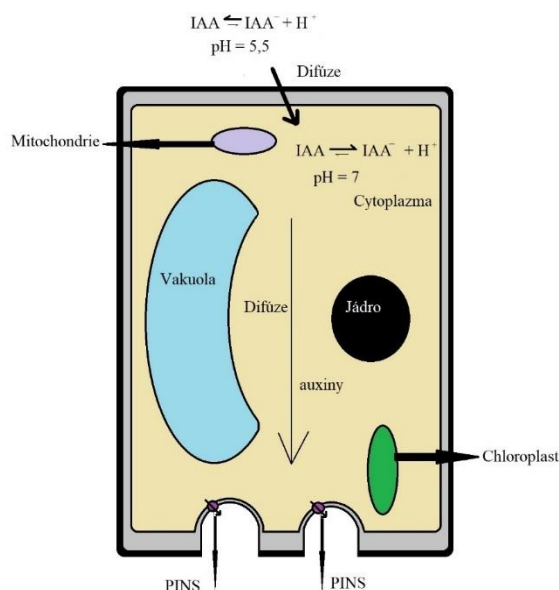
### 3.4.4 Polární transport

Auxiny jsou slabé organické kyseliny, které jsou částečně disociovány na buněčné stěně a v extracelulárním prostoru. Jejich transport probíhá dvěma zcela odlišnými mechanismy. Nedisociované formy auxinů jsou schopny využít mechanismu samostatného transportu do plasmatické membrány. Tento transport probíhá na dlouhé vzdálenosti a zajišťují jej vodivá

pletiva. Druhý mechanismus je určen pro anionty a probíhá za pomoci aktivních nosičů PIN-FORMED (PIN). Jejich asymetrická lokalizace určuje směr toku auxinů z buňky do buňky, čímž vytváří flexibilní síť (Zažímalová et al., 2007).

Pin proteiny jsou odpovědné za polární transport, kdy pomáhají usměrnit tok auxinů ze vzrostlého vrcholu ke špičce kořene. Tam dochází k obracení směru zpět nahoru. Za pomoci tohoto toku pak rostlina získává časové i prostorové informace, které jí pomáhají s řízením dalšího vývoje (Adamowski M., 2015).

Rovněž jsou odpovědné za spád auxinů v rostlině, čímž dochází k intenzivnějšímu růstu kořenů na místě, kde se nachází nižší koncentrace tohoto druhu fytohormonů. U stonků je tento efekt obrácený. Z čehož vyplývá, že auxiny mají na růst kořenů inhibiční efekt, kdyžto na nadzemní části mají naopak stimulační efekt. Přesto v obou případech dochází k ohybu rostliny, z čehož vyplývá, že kořen je fototropicky negativní (stáčení od světelného zdroje), nadzemní části jsou pak fototropicky pozitivní (stáčení ke zdroji světla) (Swarup et al, 2005).



**Obrázek 3: Schéma transportu částice disociovaných auxinů. Obrázek vytvořen v programu malování podle předlohy z (Zažímalová et al., 2007).**

## 3.5 Ethylen

### 3.5.1 Historie

Ethylen byl objeven již roku 1901. Objevitelem se stal D. N. Neljubov a tento fytohormon se povedlo izolovat ze svítiplynu. Teprve však ve třicátých letech byla tato chemická sloučenina objevena v rostlině a byla přiřazena k fytohormonům.

Když však došlo k objevu v rostlinách, znali vědci již spoustu vlastností této chemické sloučeniny. Průlom ve zkoumání ethylenu v rostlinách a vůbec nahlížení na jeho funkce coby fytohormonu, se stalo až s nástupem analytické metody GC. Ten umožnil studium ethylenu v oblasti regulace růstu a vývoje rostliny (Procházka et al. 1998).

### 3.5.2 Struktura

Ethylen má celou řadu chemických vlastností. Jedná se o nejjednodušší uhlovodík s dvojnou vazbou, který je zapisován jako  $C_2H_4$ . Je to nepolární rozpouštědlo. Nositelem chemické aktivity je dvojná vazba. Právě díky tomu snadno ethylen oxiduje na ethylenoxid  $C_2H_4O$ , ten je znám také jako oxiran, na ethylenglykol  $C_2H_6O_2$  až na metanal  $CH_2O$ , známější jako formaldehyd. Ethylen je také schopen tvořit komplexy s těžkými kovy. Obdobné vlastnosti má také propylen, ale je to méně účinná chemická sloučenina (Procházka et al. 1998).

### 3.5.3 Fyziologické účinky

Ethylen je jediným fytohormonem, který se nachází v rostlinách v plynné formě. V rostlině je transportován za pomoci prekurzoru 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACC). Z této látky se ethylen může uvolňovat a opět se na něj navázat, a to dle potřeby rostliny. Biologicky aktivní je ovšem ethylen pouze ve vazbě s receptorem, jinak uniká do mezibuněčných prostor jako plyn a odtud průduchy opouští rostliny (Van de Poel et Van der Straeten, 2014).

Ethylen je pro rostlinu nejdůležitější při stimulaci některých plodů. Při zrání plodu, rostlina vytváří daleko vyšší koncentrace ethylenu. Ten následně indikuje procesy zrání, také je důležitý při degradaci nejen škrobu, ale také celulózy a i pektinů. Též hraje určitou roli při senescenci (Procházka et al. 1998). Má však také vlastnost stresového hormonu. V okamžiku jakékoli stresové situace, rostlina navyšuje tvorbu tohoto fytohormonu. Jedná se univerzální reakci, kterou spouští nadbytek vody, teplotní výkyvy, poranění a celá další řada dalších situací. Tvorba



ethylenu v takovém případě z pravidla stoupá 20-60 minut od započetí jedné ze stresových situací. Nadměrná produkce ethylenu však přetrvává různě dlouho, maximálně v řádu hodin (Procházka et al. 1998). Etylen je syntetizován v celé rostlině a transportován vodivými pletivy (xylémem).

### 3.6 Ostatní látky s regulační funkcí

Fytohormonů je samozřejmě daleko více. Náleží sem také brassinosteroidy (Clouse et Sasse, 1998), polyaminy, oligosacharidy, kyselina abscisová (Morrison et al., 2015), strigolaktony (Dvořáková et Vaněk, 2015) dále kyselina jasmonová (Creelman et Muller, 1997), kyselina salicylová (An et Mou, 2011) a další fenolické látky (Procházka et al. 1998).

Všechny tyto hormony mají nezanedbatelnou funkci v rostlině, podílející se na vývoji, růstu či obraně (Procházka et al. 1998).

#### 3.6.1 Brassinosteroidy

Brassinosteroidy jsou fytohormony, které lze nalézt v pylu, semenech a mladých vegetativních orgánech rostliny.

Tento druh fytohormonů se podílí na růstu a vývoji rostliny, buněčném dělení, etiolaci (vývoj rostliny bez přístupu světla. Rostlina je odkázána na zásobní látky) a dalších nezbytných procesech (Clouse et Sasse, 1998). Tento druh fytohormonů také pomáhá rostlině přežít stresové situace, způsobené jak abiotickými, tak biotickými činiteli. Například se podílejí na syntéze stresových proteinů nebo na syntéze superoxidodismutázy, která pomáhá odstraňovat nebezpečné kyslíkové radikály (ROS) (Lv, B. a kol., 2018).

#### 3.6.2 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová, která je považována za stresový hormon rostliny, a je tedy zapojena do jejího obranného systému. Tento fytohormon je také zodpovědný za schopnost rostliny umět se přizpůsobit různým environmentálním biotickým a abiotickým stresorům (Morrison et al., 2015).

Tento druh kyseliny patří do třídy izoprenoidů, které se podílí na růstu, vývoji a přizpůsobení rostliny. Nachází se ve všech organismech, kromě třídy *Archaea*. Jsou zapojeny do procesů klíčení, tvorbě bočních kořenů, uzavírání průduchů a dalších. Syntéza tohoto fytohormonu probíhá v plastidech buňky (Danquah et al., 2013).

### 3.6.3 Kyselina jasmonová

Kyselina jasmonová a její deriváty jsou schopny modulovat aspekty dozrávání, podílejí se na tvorbě životaschopného pylu, růstu kořenů, uchycení úponků, senescenci (Vylíčilová et al., 2015) a podílejí se také na obraně rostliny proti nebezpečným rostlinným škůdcům (Creelman et Muller, 1997) a chorobám, které způsobují (Chanclud et al., 2016).

Jasmonáty aktivují geny, které se podílejí na obraně a kódují geny zachovávající proteiny v rostlině. Současně však potlačují tvorbu genů podílejících se na tvorbě proteinů, které jsou zapojené do procesu fotosyntézy (Creelman et Muller, 1997). Methyljasmonát se dokonce podílí na systémové získané obraně (RAS) (Profotová, 2006). RAS je obrana rostliny proti širokému spektru mikroorganismů a je srovnatelná s imunitním systémem savců, i když se jejich základní mechanismy značně liší (Ganbari, 2005). Kyselina jasmonová se v největších koncentracích nachází mimo jiné v květech, rozvíjejících se reprodukčních orgánech, ve zralejší oblasti stonku, starších listech, kořenech a dalších (Creelman et Muller, 1997).

### 3.6.4 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová je rovněž fytohormon podílející se na celé řadě významných procesů v rostlině. Její, v posledních pár letech nejvíce zkoumaný přínos, spočívá v obraně rostliny. Jedná se o sekundární metabolit, který je produkován jak eukaryotickými, tak prokaryotickými organismy. Tato chemická sloučenina se řadí mezi fenolické látky, které mají aromatické jádro, na níž je navázána hydroxylová skupina nebo její funkční derivát. Léčivé účinky kyseliny salicylové byly známy již v 5. století před n.l., kdy byla předepisována Hippokratem, jako lék od bolesti při porodu. Roku 1885, německý vědec J. A. Buschner, izoloval z vrbové kůry žlutou látku, která získala název salicin. Kyselinu salicylovou se však povedlo vytvořit až později R. Piriem.

Kyselina salicylová se v rostlině podílí na procesech buněčného dělení, termogenezi, klíčení semen, buněčného růstu, obraně a jiných. Rovněž se podílí na SAR. Její zapojení bylo objeveno v rostlině tabáku, kde působí jako obrana proti tabákové mozaice (Schreiber, 1994). Ovšem některé zapojení do procesů tohoto fytohormonu může být nepřímé, protože kyselina salicylová je výrazně propojena se signálními drahami ostatních fytohormonů. Bylo prokázáno, že při infekci dochází k navýšení koncentraci kyseliny salicylové, a to nejen v oblasti napadení. Jak ovšem rostlina syntetizuje tento hormon, nebylo doposud zcela jasně vysvětleno (An et Mou, 2011).

### 3.6.5 Strigolaktony

Strigolaktony jsou velmi složité molekuly a patří mezi nejmladší objevenou skupinu fytohormonů. Jejich význam spočívá v regulaci výhonků a jejich větvení. Rovněž se podílejí na růstu kořenů, hrají roli při klíčení semen a dalších procesech. Strigolaktony jsou také potřebné při symbiotické interakci rostlina/parazitický plevel, či rostlina/patogenní mykorhizní houba (Dvořáková et Vaněk, 2015). Tyto fytohormony jsou syntetizovány převážně v kořenech rostliny, a to ve velmi nízkých koncentracích (Dvořáková et Vaněk, 2015).

## 4. Cytokininy

### 4.1 Biosyntéza a metabolismus cytokininů

Koncentrace cytokininů je ovlivněna koncentrací dalších fytohormonů. Zvláště auxinu a ethylenu (Procházka et al. 1998). Nejvíce cytokininů se nachází v dělicích se a rostoucích pletivech rostliny (Procházka et al. 1998). Hlavní syntéza cytokininů probíhá v kořenech (Psota et Šebánek, 1999). Z nich jsou cytokininy rozváděny xylémem do všech částí rostliny. Přesto některé orgány rostliny mohou v menší míře cytokininy také syntetizovat (Procházka et al. 1998). V těchto místech probíhá v rostlinách biosyntéza izoprenoidních cytokininů hlavní cestou. V této cestě hraje klíčovou roli enzym, který nese název izopentenyltransferáza. Cytokininy jsou rovněž součástí transferové ribonukleové kyseliny (tRNA). Nalézají se na 3'-konci antikodonu.

Odtud vyplývá další biosyntéza, která zahrnuje modifikaci tRNA. Tuto dráhu se povedlo popsat v kvasinkách a poté v rostlinách. Tato biosyntéza vyžaduje enzym tRNA-izopentyl transferázu (tRNA-IPT). Tento enzym provádí degradaci tRNA, která vede k produkci cytokininu (Chanclud et al., 2016). Následná oxidace dává vzniknout *cis*-zeatinu. Endogenní volné cytokininy se výhradně vyskytují v *trans*-formě. Kvůli nízké koncentraci tRNA v buňkách a kvůli aktivní změně konfigurace cytokininů se tento druh ribonukleové kyseliny (RNA) pokládá za důležitý zdroj aktivních cytokininů. Přímá biosyntéza cytokininů je u určitých rostlin rovněž známá. Ovšem takovéto rostliny obsahují transformované půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, které obsahují gen pro izopentenyltransferázu. Takto vznikají cytokininy reakcí  $\Delta^2$ -izopentenylpyrofosfátu a 5'-AMP. Tím je syntetizován cytokinin N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -izopentenyl)-adenozin-5'-fosfát (Procházka et al. 1998). Cytokininy metabolizují v živých

systémech pomocí modifikace jejich purinové skupiny, N6-postranního řetězce nebo dochází k úplnému odštěpení. Tyto změny způsobují nezvratnou ztrátu cytokininové aktivity. Enzymů podílejících se na metabolismu cytokininů, bylo objeveno několik: 50-nukleotidáza, adenosin nukleosidáza, adenin fosforibosyltransferáza a adenosinkynáza. Tyto enzymy byly postupně objeveny v různých druzích rostlin.

Roku 2007 byl objeven další enzym modifikující cytokininové adeninové části – fosforibohydroláza. Tento enzym přeměňuje cytokininové nukleotidy na jejich volné formy. Úloha tohoto enzymu v metabolismu byla potvrzena v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*).

Vedle ribosylace a fosforibosylace je možnost modifikovat purinové části za pomoci glukosylace. Na tomto procesu se podílí enzym glukosyltransferáza. Vzniklé N-glukosidy nejsou obecně aktivní a tento krok způsobí nevratnou inaktivaci cytokininů. Jiné typy glykosylace ovlivňují N6-postranní řetězce, kdy dochází k modifikaci postranního řetězce za pomoci O-glukosyltransferázy a O-xylosyltransferázy (Spíchal, 2012).

#### 4.1.1 Konjugace a oxidační degradace cytokininů

Nezvratná inaktivaci pomocí konjugace těchto fytohormonů nastává vazbou glukózy na purin v poloze 7 a 9. Zřejmě se tak děje u cytokininů, které nemůže rostlina odbourat za pomoci oxidace. Takovým příkladem jsou aromatické cytokininy nebo deriváty DHZ (Procházka et al. 1998). Inaktivace může proběhnout také za pomoci monosacharidu xylózy (Vyličilová et al., 2015). O-glukozidy jsou biologicky aktivnější, než N-glukozidy. O-glukozidy byly považovány za transportní a zásobní formu, ale zřejmě mohou působit přímo, i bez hydrolyzy (Procházka et al. 1998). Oxidace cytokininů je hlavní způsob, jakým rostlina cytokininy inaktivuje. Oxidace cytokininů probíhá za pomoci enzymu cytokinioxidázou. Díky tomuto enzymu dojde k odštěpení postranního izopentenylového řetězce. Tím dojde ke vzniku adeninu. Substrátem cytokinioxidázy jsou volné cytokininy jako je zeatin, izopentenyladenin a jejich N-glukozidy. Cytokinioxidáza nedokáže štěpit O-glukozidy, cytokininy s nasyceným postranním řetězcem a aromatické cytokininy. Tyto cytokininy jsou inaktivovány za pomoci konjugace (Procházka et al. 1998).

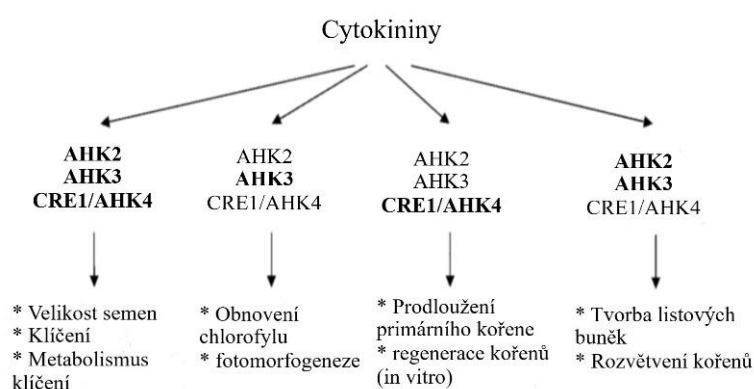
## 4.2 Transport cytokininů

Syntéza cytokininů probíhá převážně v kořenech, hlavně ve vrcholné části. Tam jsou transportovány nepolárně xylémem do dalších částí rostliny, převážně do listů. V listech se cytokininy přesouvají do floému, odkud mohou být transformovány až do buněk parenchymu (Taiz et Zeiger, 2010). Transport je ve floému a xylému regulován fotoperiodicky. Zřejmě je tento transport také propojen s polárním transportem IAA (Procházka et al. 1998).

## 4.3 Mechanismus účinku

Cytokininy využívají vazebných proteinů, kterých byla izolována celá řada. Mezi ně patří rozpustné i membránově vázané proteiny. Žádný však není receptorem. Nejlépe byly charakterizovány vazebné bílkoviny v obilovinách. V pšenici (*Triticum*) se nachází značné množství vazebného proteinu s vysokou afinitou k aromatickým cytokininům. Nízkou afinitu však mají k zeatinu. Účelem je zřejmě ochrana embrya. V dalších obilovinách vykazují receptory charakteristické vlastnosti, mezi něž patří reverzní specifická vazba a její korelace s biologickou aktivitou. Velmi málo známý je přenos od receptorů cytokininů do buňky. Působí-li cytokininy na chloroplasty, je zřejmě jako signální molekula využívána cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) (Procházka et al. 1998).

## 5. Vliv cytokininů na rostlinu



**Obrázek 4:** Vliv cytokininových receptorů (zvýrazněné jsou ty, které mají na daný proces výraznější vliv) na jednotlivé vybrané procesy v rostlině huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) (obrázek tvořen v programu malování 3D dle předlohy (Riefler et al., 2006).

## 5.1 Buněčné dělení

Cytokininy ovlivňují kontrolní přechody mezi jednotlivými cykly dělení buněk. Bylo objeveno, že hladina zeatinu je nejvyšší na konci S fáze, mitózy a G1 fáze (Taiz et Zeiger, 2010). Také mají významný vliv na replikaci DNA, probíhající ve fázi S mitózy, kdy zvyšují množství počátků replikace. Přepis DNA je urychlen a buněčné dělení v pletivech je tak více synchronní (Procházka et al. 1998). Cytokininy nejsou jediné fytohormony, které se podílejí na buněčném dělení. Spolu s cytokininy zde působí také auxiny a další fytohormony (Taiz et Zeiger, 2010).

## 5.2 Regenerace orgánů

Jedná se o základní regenerační proces *in vitro* a pochopitelně také *in vivo*. Cytokininy tento proces neovlivňují sami. Zde je zapotřebí spojení cytokininů a auxinů. Jejich poměr následně rozhoduje, jak bude regenerace probíhat. Vyrovnaný poměr mezi cytokininy a auxiny vytváří nediferencovaná pletiva, kalus. Nadbytek cytokininů vyvolá regeneraci prýtů. Opačný případ, nadbytek auxinů, ovlivňuje regeneraci kořenů (Procházka et al. 1998).

## 5.3 Senescence

Senescence je pro rostlinu nesmírně důležitý proces. Tento proces je velmi dobře naprogramovaný, koordinovaný, a dokonce nezbytný. Při senescenci dochází k degradaci makromolekul a také k nezbytnému přemístění jejich složek do určitých částí rostliny (Psota et Šebánek, 1999). Jednou takovou složkou je i dusík, který je obsažen ze 75 % v buňkách chloroplastů. Do značné míry se senescence podílí na proteolýze a degradaci lipidů, buněčných stěn a AMK (Avila-Ospina et al., 2014). Z těchto degradací pak rostlina získává mastné kyseliny a cukry (Vylíčilová et al., 2015).

Stárnutí listů je okamžitě viditelné. Tento proces totiž doprovází změna barvy. Při senescenci totiž dochází k degradaci zeleného chlorofylu. Právě tato degradace způsobuje žloutnutí listu. Mitochondrie buňky je ovšem funkční až do buněčné smrti (Avila-Ospina et al., 2014). Zajímavým fenoménem při senescenci listu je ovšem barvený přechod ze zelené na červenou barvu listu. Červený efekt nastává v raném stádiu senescence. V tomto okamžiku totiž dochází k syntéze antokyaninů, která je závislá na světle. Tento chemický proces společně s degradací chlorofylu následně vytváří červenou barvu (Vylíčilová et al., 2015). Červené zabarvení listů za pomoci antokyaninů se však vyskytuje jen u některých druhů rostlin, protože antokyaniny

jsou rozpustné ve vodě a nejsou proto ve všech rostlinách. V ostatních rostlinách má tedy červené zbarvení listů na svědomí  $\beta$ -karoten (žluté až oranžové), který je rozpustný v lipidech a je tedy běžnější (Kubásek, 2010).

Senescence listu nemusí nutně znamenat zhoršení stavu buněk. Také se potvrdilo, že degradace listu neznamena nezbytně stav vedoucí pouze ke smrti, ale jedná se o velice zvláštní a specifický vývojový proces, který je doprovázen syntézou metabolitů a dalších potřebných molekul. Překvapivě tyto nově vzniklé chemické sloučeniny fungují dokonce jako ochrana listů podléhajících senescenci. Ochrana degradujících listů funguje proti slunečnímu záření a hmyzu. Senescence listů je regulována za pomoci hormonálních drah, které buď podporují, nebo naopak pozastavují stárnutí buněk. Tato regulace pochopitelně neprobíhá za přispění jednoho fytohormonu, ale jedná se o kombinaci působení několika naprosto odlišných fytohormonů, které opět mohou působit synergicky nebo antagonicky.

Skutečně se na tomto procesu podílejí snad všechny druhy fytohormonů, které se v rostlinách nacházejí. Fytohormony, které proces senescence urychlují, jsou plynny ethylen a kyselina jasmonová. Na urychlení procesu se také podílejí kyselina abscisová a kyselina salicylová (důležitý je také úbytek koncentrace auxinů a cytokininů). Některé z těchto hormonů se podílejí i na obraně listů (Psota et Šebánek, 1999). Ke spuštění senescence také přispívají negativní vlivy, jako jsou například ROS (Vylíčilová et al., 2015). Naopak zpomalení senescence listů náleží fytohormonům z druhu cytokininů, auxinů a gibberelinů. Auxin se na senescenci podílí spíše nepřímo. Tento fytohormon totiž zabraňuje předčasnému odloučení senescentního listu (Psota et Šebánek, 1999). Což jen dokládá, že senescence je pro rostlinu nesmírně důležitý proces a rostlina si tímto procesem uchovává odumírající list. V okamžiku, kdy je auxinu v daném listu méně, dojde k opadu.

Způsob, jakým cytokininy zabraňují v senescenci, spočívá v tom, že udržují neporušenost tonoplastu, což je cytoplazmatická membrána, která ohraničuje vakuolu v rostlinné buňce. V okamžiku, kdy má buňka nedostatek cytokininů, dojde k porušení tonoplastu a tím dochází k vyplavení proteáz a enzymů, které se podílejí na štěpení bílkovin, z vakuoly do cytoplazmy buňky (Psota et Šebánek, 1999).

Nejlépe tento stav charakterizují rostliny, které nadměrně syntetizují bakteriální gen, který kóduje izopentenyltransferázu. Tento enzym je nesmírně důležitý, protože se podílí na biosyntéze cytokininů, pod kontrolou regulované senescence. Transgenní rostliny obsahovaly daleko vyšší koncentrace cytokininů, a právě kvůli tomu vykazovaly výrazné zpomalení listů.

Je překvapené, že v těchto starších udržovaných listech určených k odumření, byla fotosyntéza srovnatelná, jako fotosyntéza v mladých listech, které doposud senescenci nepodléhaly.

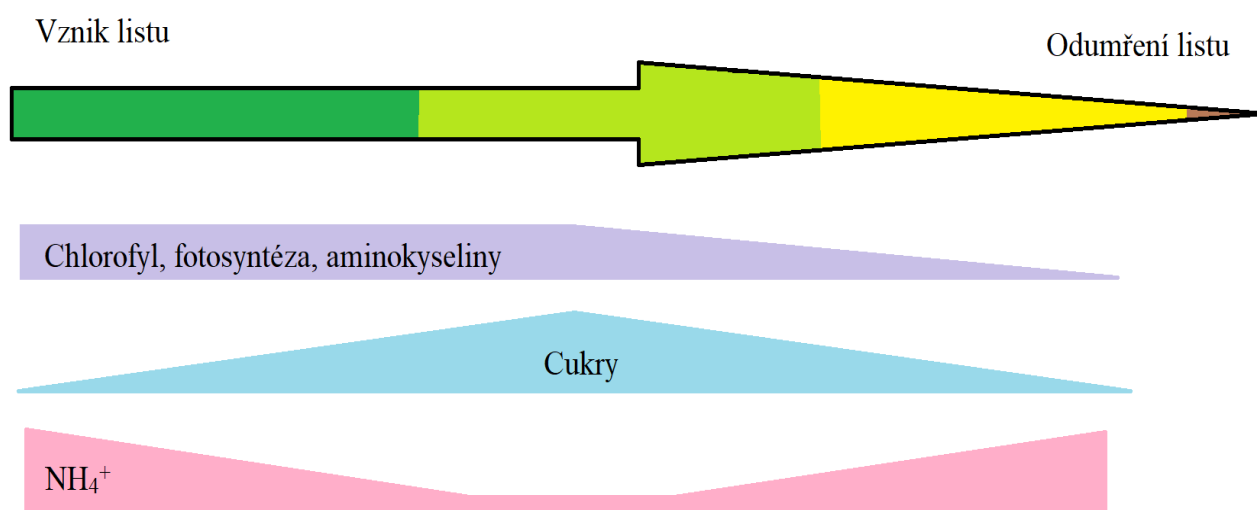
Obdobnou strategii mají i rostliny tabáku. Tento druh rostliny exprimuje gen kukuřičného homeoboxu, který je provázaný s promotorem, který je specifický pro senescenci. Rostliny tabáku vykazovaly výrazné zpomalení senescence listů oproti běžným rostlinám. Rovněž i v tomto případě byla v rostlině tabáku obsažena vyšší koncentrace cytokininů, než je u ostatních rostlin běžné (Lara et al., 2004). Právě vysoké koncentrace cytokininů mohou na listech způsobovat efekt, připomínající ‚zelený ostrov‘. Jedná se o jev, kdy list postupně mění barvu ze zelené na žlutou, popřípadě ze zelené na červenou, ale malá část na listu si uchovává zelené zabarvení. Právě v těchto zelených místech se kumulují vyšší koncentrace cytokininů, které v tomto daném místě oddalují senescenci, tedy oddalují degradaci chlorofylu. Není proto překvapením, že v těchto místech nadále probíhá fotosyntéza bez jakéhokoli omezení. Tento jev ‚zelených ostrovů‘ je možné pozorovat u listů napadených rostlinným škůdcem.

Obdobný účinek na listy mají také fytohormony gibereliny. Mají obdobný účinek jako cytokininy, tedy zpomalují stárnutí listů. Na rozdíl od cytokininů, gibereliny zpomalují senescenci i v okamžiku, kdy je proces již v polovině své cesty. Tedy, že je polovina chlorofylu a bílkovin degradována. Tato možnost gibrelinů jen dokazuje, že buňky v prvních stádiích senescence, ještě nelze považovat za určené k neodvratné smrti, ale že jejich proces odumírání lze nejen oddálit, ale lze jej dokonce zastavit. Pozdější výzkumy tuto teorii prokázaly. Dokonce tyto pokusy poukázaly na to, že nelze na senescenci pohlížet jako na konečný proces, ale spíše na jakousi přechodnou fázi, která nejen že jde pozastavit či zastavit, ale lze jí dokonce obrátit. Obrátit až do té míry, že dojde k úplnému navrácení listu do původního stavu, který byl před zahájením senescence (Rapp et al., 2015). Při jednom z pokusů byly odstraněny mladé listy rostliny na vrcholu výhonku. Právě to vedlo k tomu, že žluté listy rostliny znovu ve velmi krátkém čase zregenerovaly, získaly potřebnou zelenou barvu a staly se tak fotosynteticky aktivními. Obdobně funguje, pokud do senescentního listu je aplikována dostatečná koncentrace cytokininů.

Existuje také senescence, která je způsobena nedostatkem světla. Bez světla nemůže probíhat potřebná fotosyntéza a listy tak při dlouhodobému nepřístupu světla začnou odumírat. I tento druh senescence je možné pozastavit, zastavit, ale také obrátit. Ovšem možnost obnovy je v tomto případě časově omezena. Pokud je rostlina, jejíž listy podléhají senescenci, vystavena světlu, může být opět zregenerována, ale jen za podmínky, že taková rostlina byla vystavena



temnotě jen krátkou dobu (např.: dva dny). Pokud rostlina pobývala v temnotě déle jak čtyři dny, nelze proces senescence za pomoci osvětlení odvrátit (Rapp et al., 2015). Toto zjištění jen prokázalo, že tento druh senescence je složitější a skládá se z reverzibilní fáze, kterou brzy následuje nezvratná, a tedy konečná fáze. Obdobně lze zastavit i senescenci kotyledony (děložní listy). Toto zjištění vyvstalo z pokusu na kotyledonu lnu, kdy byl odstraněn vrchol rostoucího výhonku, a kotyledona se začala opět obnovovat. Následným šetřením bylo zjištěno, že proces následné obnovy kotyledony nebyl závislý na syntéze či degradaci chloroplastů, ale na plastidech kotyledony, které se po odříznutí výhonku, začaly obnovovat (Rapp et al., 2015).



**Obrázek 5: Schématické znázornění metabolických procesů senescence. Znázornění postupné degradace chlorofylu. Koncentrace cukrů, aminokyselin aj. během procesu senescence (obrázek tvořen v programu malování dle předlohy z (Avila-Ospina et al., 2014).**

## 6. Produkce cytokininu při napadení patogenem

Na rozdíl od živočichů, jsou rostliny odkázány pouze a jenom na své okolí. Nemohou se útočníkovi bránit zuby, drápy a nemohou před ním utéci. Vytvořily si tedy hned několik strategií obrany.

Prvním krokem obrany, je rozpoznání ohrožení. Rostlina je schopná na základě patogenních či molekulárních vzorů rozpoznat o jaký druh ohrožení se jedná a reagovat na něj. U bakterií rozpoznává rostlina flagelin, u hub chitin. Po tomto prvním kroku rostlina začíná s obranou. Má hned několik možností. Jednou z nich je včasná akumulace ROS (Chanclud et al., 2016). Mezi ROS patří všechny druhy radikálních forem kyslíku, ale také chemické sloučeniny jako

je například singletový kyslík, nebo peroxid vodíku. ROS jsou velmi toxické chemické sloučeniny a způsobují rozpad buněk (kvůli této vlastnosti jsou považovány jako jeden z možných druhů léčby rakoviny). ROS jsou kupodivu nebezpečné i samotné rostlině, mohou urychlit nástup senescence. Ovšem předpokládá se, že cytokininy jsou mimo jiné schopny nějakým způsobem interferovat s ROS. Dokonce byl proveden pokus s BAP a peroxidem vodíku. Ukázalo se, že BAP je schopen do určité míry ochránit fotosyntetický systém, a dokonce podporoval tvorbu sacharidů (Vyličilová et al., 2015).

Rostlina je také schopna po rozpoznání larev hmyzího rostlinného škůdce dokonce přivolat predátora, který se těmito larvami živí. Tuto schopnost má například kukuřice, která je schopna rozpoznat housenky za pomoci volicitinu, který se nachází ve slinách škůdců. Kukuřice po rozpoznání navyšuje obsah kyseliny jasmonové v listech, čímž vyvolává zvýšenou syntézu volatilních terpenoidů (látky na bázi indolu). Tyto chemické sloučeniny vábí vosy rodu lumčíkovitých (*Cotesia*), které housenky, ohrožujících rostlinu, následně zneškodní (Van Poecke et al., 2001).

Další možnost obrany představuje posílení buněčné stěny ohrožených buněk rostliny. To zamezí přístupu patogenu k buňce. Poslední, neméně účinnou obranou, je tvorba metabolitů nebo enzymů s antimikrobiálními schopnostmi (Chanclud et al., 2016). Ve všech těchto případech je ovšem rostlina zcela odkázána na fytohormony, které obranu řídí. Mezi tyto obrané fytohormony patří kyseliny abscisová, kyselina jasmonová, gibereliny, auxiny, ale také cytokininy (Giron et Glevarec, 2014). Protože obrana rostliny je poměrně účinná, byli predátoři, ale hlavně parazité, donuceni vytvořit strategie, které tyto obranné mechanismy překonají.

K překonání obrany rostlin se rostlinní škůdci naučili zasahovat do signálních cest fytohormonů za pomoci bílkovin, fytohormonů nebo jejich analogů (Zhang et al., 2016). Mezi takto využívanými fytohormony jsou i cytokininy (Erb et al., 2012).

Rostlinní škůdci nejsou odkázáni jen na fytohormony. Jsou také schopni interferovat se signalizačními kaskádami rostliny. Jsou schopni ovlivnit rozpoznání a transkripční regulátory rostlinné obrany. Ovšem fytohormony hrají klíčovou roli nejen v překonání obrany, ale hlavně ve výživě a tak, ať už využívají jakoukoli cestu ke zmatení hostitele, vždy ve většině případů ke své výživě využijí některý z fytohormonů, obzvláště cytokininů (Giron et Glevarec, 2014). Klíčovou strategií pro úspěšné využití hostitele, spočívá ve využití již existujících hormonálních cest. Tato manipulace je možná jen v případě, že rostlinný škůdce produkuje fytohormony, nebo donutí k jejich produkci hostitele (Morrison et al., 2015). Rostlinných

škůdců využívajících strategii cytokininů je celá řada. Jedná se o druhy hmyzu, hub, hlístic, protistů, bakterií i virů. Anatomické i fyziologické procesy spojené s cytokininy byly v průběhu let poměrně dobře vysvětleny a objasněny. Ovšem jakým konkrétně způsobem jsou cytokininy v těchto parazitických interakcích používány, se povedlo vysvětlit jen ve velmi málo systémech (Giron et Glevarec, 2014).

## 6.1 Napadení hlísticí

Hlístice (*Nematoda*) způsobují v zemědělství zřejmě největší ztráty ze všech rostlinných škůdců. Průměrně způsobí více než 10 % z celkových ročních ztrát. U některých plodin, jako jsou například banány, způsobují hlístice ztráty až 20 %. Největší podíl na ztrátách mají hlístice napadající kořenový systém rostliny. Mezi takovéto druhy parazitů patří hlístice *Meloidogyne spp.* či hlístice *Globodera spp.* a *Heterodera spp.* (Siddique et al., 2015). Tyto druhy rostlinných škůdců pronikají do kořenových buněk a v daném místě napadení vytváří hyperbolické místo - ohnisko.

Cyklus hostitelské buňky je aktivován právě v počáteční buňce napadení hlísticí. Postupně od první buňky dochází k aktivaci sousedních buněk a dalších, až dojde k aktivaci více než stovek buněk. Tato aktivace spočívá v nabuzení buněk a ty pak vytvářejí pro rostlinného škůdce živiny.

Předpokládá se, že této manipulace s hostitelskou rostlinou dosahují hlístice za pomoci fytohormonů, a to konkrétně za pomoci cytokininů. Tím hlístice nejenom aktivují buněčné dělení a donutí rostlinu přivádět živiny do místa napadení, ale také oddalují senescenci v listech rostliny a tím prodlužují délku parazitického soužití. Schopnost produkovat cytokininy, byla u hlístic zatím prokázána pouze *in vitro*. Zda však tento rostlinný škůdce uvolňuje cytokininy i do hostitelské buňky a zda cytokininy opravdu hrají významnou roli v tomto parazitickém spojení, nebyla mimo laboratoře prokázána. Proběhlo však již několik výzkumů na toto téma s prokázaným účinkem cytokininu. Konkrétně byla zkoumána parazitická hlístice háďátka řepné (*Heterodera schachtii*) v interakci s huseníčkem za pomoci cytokinin-citlivého promotoru (Siddique et al., 2015). Tento konkrétní pokus prokázal, že v oblasti napadení dochází k tvorbě syncytia (také nazývané soubuní). Právě v tomto místě dochází k aktivaci cytokininů. Aktivace se však přenáší do sousedních buněk. Právě tyto buňky jsou postupně do syncytia začleňovány. Jakmile se tak stane, jsou aktivovány sousední buňky a tak dále po celou dobu napadení. Při infekci kořenů pronikají hlístice do kořenů v blízkosti špičky. Odkud se hlístice pohybují směrem k cévním svazkům. Jakmile dosáhnou cévního svazku, donutí rostlinu

v kořenech vytvářet obří buňky a podněcuje tvorbu syncytia. Toto místo slouží hlístici jako jediný zdroj živin po celý její životní cyklus, který trvá několik týdnů. Není zcela zřejmé, jak konkrétně dochází k aktivaci kořenových buněk do vysoce aktivních míst a na živiny nesmírně bohatého místa. Ve všech případech však dochází nejprve k aktivaci buněčného dělení za pomoci cytokininů.

V pletivech napadených hlísticemi dochází k hypertrofii buněk, které obsahují zvětšená jádra. Mitóza tedy hraje významnou roli pro rozvoj syncytia a pro rozvoj samotné choroby. Rozbor genového klíče buněčného cyklu a jejích inhibitorů ukázal, že mitóza je také nesmírně důležitá pro rozvoj tohoto místa (Siddique et al., 2015).

## 6.2 Napadení houbou

Hlístice způsobují velké ztráty, ale houby, napadající rostliny, jsou rovněž velkým problémem mnoha zemědělských oblastí.

Jednou z hub, která napadá rostliny, spoléhající se na fytohormony je *Magnaporthe oryzae*, která napadá ržičku. Využívá k tomu právě cytokininy, a to díky genu CKS1, který houba obsahuje. Tento gen je nesmírně důležitý pro biosyntézu cytokininů. Právě objev tohoto genu potvrdil, že cytokininy se podílejí na parazitní interakci mezi *Magnaporthe oryzae* a ržičkou. V okamžiku, kdy *Magnaporthe oryzae* napadne ržičku, začne s biosyntézou cytokininů, který houba předává hostitelské rostlině. Ten houbě zajistí sníženou obranyschopnost rostlinného hostitele a zajistí tak snadnější proniknutí do systému rostliny. Také však navýší produkci živin, jako jsou cukry a AMK v oblasti napadeného místa. To zapříčiní nadměrnou výživu infikovaného místa rostliny a dojde k výživě samotné houby (Chanclud et al., 2016).

Rostlinné patogeny vytvořily hned několik strategií, kterými mohou manipulovat s hostitelskými biologickými procesy během infekce. Kupříkladu (hemi)biotrofní patogeny produkují a vylučují efektorové proteiny a metabolity, které zcela ucpávají a zahlcují metabolismus infikované části rostliny. Pochopitelně tak činí čistě ve svůj prospěch. Mezi tyto (hemi)biotrofní patogeny patří například houba *Xanthomonas oryzae*. I tato houba je ovšem závislá na výrobě a tvorbě fytohormonů, které k ní do infikované části „stahují“ živiny rostliny (Chanclud et al., 2016). Aby ovšem bylo možné infikovat jakoukoli část rostliny, musí být nejprve překonána ochrana rostliny. Rostlina si dokázala postupem času vytvořit mechanismy, kterými dokáže rozpoznat molekulární struktury chitinu, který houby obsahují. Houby se této obraně evolučně nakonec dokázaly přizpůsobit a vytvořily si látky, které chitinové receptory

rostliny omezují. Tím rostlina není schopna včas rozpoznat nebezpečí a zahájit obrannou strategii. Příkladem takové houby je i již zmíněná *Magnaporthe oryzae*, která vylučuje chitin-vazebné receptory, kterým jakoby receptory ‚zaměstná‘ a rostlina tak nezíská žádné varování. Jakmile houba, napadající rostliny, překoná obrannou strategii svého vybraného hostitele, začíná parazit manipulovat se složkami hormonálních cest rostliny. Nejprve začne ovlivňovat fytohormony, které zamezují tvorbě chorob. Mezi tyto látky patří kyselina jasmonová, ethylen, ale také kyselina salicylová. Pak začne rostlinný škůdce produkovat a ovlivňovat fytohormony, které ovlivňují vývoj a výživu hostitele. Mezi tyto fytohormony se řadí cytokininy, auxiny a gibbereliny. Těmito způsoby fyto-genní houba ovlivňuje homeostázu enzymů podílející se na hormonálním metabolismu nebo produkci hormonálních sloučenin s podobnými vlastnosti jako mají fytohormony. Tím zcela překonají obranu hostitele a ovlivní nutriční toky ve svůj prospěch (Chanclud et al., 2016).

Mezi houby, napadající rostliny, využívající kyselinu salicylovou a homeostázu kyseliny jasmonové patří sněť kukuřičná (*Ustilago maydis*) a *Magnaporthe oryzae*. Tímto si parazit pouze usnadňuje virulenci svého hostitele (Chanclud et al., 2016). Rostlina má několik vazebných míst pro cytokininy. Slouží k přenosu signálu, a právě tyto cesty jsou základem cytokininové cesty. Právě těchto signálních drah se naučili rostlinní škůdci využívat ve svůj prospěch. Těmito cestami nejen nutí hostitele ke své výživě, ale také udržují buňky v infikovaném místě při životě. Toto místo vytváří na rostlině fotosyntetizující místo se stálou zelenou barvou. Pokud je infikován list, který podléhá senescenci, je toto infikované místo před senescencí ochráněno. Vzniká něco, co se podobá ‚zelenému ostrovu‘.

I houba *Magnaporthe oryzae* používá tyto strategie v napadeném hostiteli. Tyto strategie byly u *Magnaporthe* prokázány *in vitro*, ale dráha, kterou rostlinný škůdce biosyntetizuje cytokinin, nebyla prozatím nalezena. Pokusy z roku 2016 s *Magnaporthe oryzae* nakonec prokázaly, že degradační cesta tRNA se podílí na produkci houbových cytokininů (Chanclud et al., 2016).

Houba sněť kukuřičná také stimuluje za pomoci fytohormonů nekoordinované buněčného dělení. To způsobuje tvorbu nádorů. V rámci těchto nádorů jsou ovšem černé výtrusy houby (Morrison et al., 2015).

Virulentní jsou rovněž vláknité houby, také nazývané jako mikromycety. Tento druh hub způsobuje nádorová onemocnění rostlin. Je podezření, že využívají cytokininy, ale jejich role v této invazi nebyla zatím objevena.

Ne každý rostlinný škůdce je ovšem pro rostlinu jen škodlivým. Některé rostliny se svými parazitujícími houbami začaly vytvářet symbiotické interakce. Jednou z takových hub je i *Glomeromycota phylum*. Mezi těmito organismy dochází k přenosu živin, kdy houba poskytuje minerální látky jako je například fosfor a rostlina organické látky, zvláště sacharidy. Houby mohou při této symbiotické interakci od svého hostitele spotřebovat až 20 % fotosyntézou vytvořených živin. Výzkumy zabývající se touto symbiotickou interakcí mezi rostlinou a parazitující houbou prokázaly, že houby způsobují vyšší koncentraci cytokininů v kořenech rostliny. Tento nadbytek způsobuje u rostliny zesílenou fotosyntézu a růst rostliny. Takovýto pozitivní účinek však rozhodně nelze očekávat od všech rostlinných škůdců (Yurkov et al, 2017).

### 6.3 Napadení bakterií

Dalšími nebezpečnými patogeny jsou bakterie. I tyto parazité využívají fytohormony, a činí tak přímo či nepřímo.

Bakteriální patogen *Pseudomonas syringae* produkuje látku zvanou koronatin. Tato chemická látka má naprosto stejné vlastnosti, jako má fytohormon kyselina jasmonová. Koronatin způsobuje otevření průduchů rostliny, čímž je zajištěn průchod rostlinného škůdce do rostliny. Další strategie, kterou bakterie využívají, nespočívá v uvolňování jednoho konkrétního cytokininu, ale směsi složenou hned z několika cytokininů. Tuto strategii si osvojily také aktinomycety nesoucí název *Rhodococcus fascians* (gram-pozitivní bakterie). Tato bakterie vytváří hálky hned u několika druhů rostlin (Giron et Glevarec, 2014). V tomto případě se směs cytokininů využívá k tvorbě hálky, navozují opožděnou senescenci a zvyšují obsah AMK v postižené oblasti. Také zvyšují uvolňování živin, potlačují obranu rostliny a podporují vznik onemocnění (Chanclud et al., 2016). Ve směsi, kterou *Rhodococcus fascians* produkuje, jsou obsaženy cytokininy – 2-iP, *cis*-zeatin, *trans*-zeatin, DHZ, jejich methylthio deriváty a jejich příslušné ribosidy (Pertry et al., 2009). Tato směs cytokininů působí synergicky, nikoli antagonisticky, a z toho důvodu toto množství cytokininů předčí produkci ostatních rostlinou produkovaných fytohormonů. Důvodů proč tato bakterie produkuje takovou směs cytokininů, je několik. Prvním důvodem je, že *Rhodococcus fascians* touto směsí ovlivní degradaci cytokininů. Tím způsobí v postižené oblasti akumulaci tohoto druhu fytohormonů. Navíc, aby se spustil požadovaný účinek, musí být sníženy procesy, které potlačují funkci cytokininů. A to tak, aby nedošlo k fatálnímu postižení hostitele. Posledním důvodem využití cytokininové

směsi je ten, že tato směs aktivuje cytokininové receptory rostliny v různém měřítku. To vede ke společnému účinku všech cytokininů na vývoj rostliny (Chanclud et al., 2016). Tyto receptory byly lokalizovány hlavně v endoplasmatickém retikulu. Způsob, jakým jsou cytokininy přenášeny přes membránu, je doposud neznámý (Daudu et al., 2017). Je ovšem nutné zmínit, že poměr cytokininů v uvolňované směsi bakterií *Rhodococcus fascians* není po celou dobu choroby stejný, protože bakterie vytváří cytokininy velmi různým a dynamickým způsobem. Ať už je jakýkoli poměr, výsledkem cytokininů je ovlivnění signalizačních cest, které ovlivní transkripční regulaci klíčových genů v hostitelské rostlině. Tato transkripce je závislá na buněčném dělení, který rostlina běžně cytokininy ovlivňuje. Nicméně zda jsou za nádory či za deformace orgánů rostliny odpovědné cytokininy, nebylo zcela prokázáno (Chanclud et al., 2016). Co ovšem jisté je, že v místě napadení dochází k vysoké akumulaci cytokininů (důsledkem je přítomnost bakterie), které by mohly být nakonec velmi škodlivé. Tato akumulace je s největší pravděpodobností vyvážena produkcí méně aktivních, a také méně toxických látek, kterými jsou 2-methylthio deriváty. Deriváty jsou nejen méně toxické, ale jsou také hůře odbouratelné ze systému rostliny (i když se v rostlině přirozeně vyskytují), než je tomu u cytokininů. 2-methylthio deriváty produkované rostlinou jsou považovány za produkty degradace tRNA bez reálného fyziologického významu. Je však zajímavé, že tyto chemické sloučeniny jsou produkovány hned několika patogeny a tyto deriváty jsou dokonce zahrnuty do příznaků rozvoje onemocnění. Ač tyto látky nemají v rostlině žádný fyziologický účinek (alespoň nebyl žádný objeven), patogenním bakteriím pomáhají s ovlivněním mechanismů rostliny, kdy zabraňují škodlivým až fatálním dopadům na hostitele (Giron et Glevarec, 2014).

Bakterie nezpůsobují rostlině za pomoci cytokininů jen hálky. Některé druhy bakterií způsobují specifické struktury, které se nazývají kořenové hlízky. Výzkumy prokázaly, že se cytokininy podílejí na samotné organogenezi těchto kořenových nádorů. Příkladem bakterie, která způsobuje rostlinám toto onemocnění, jsou bakterie z rodu *Rhizobium*. Jak se však prokázalo, bakterie se neopírá jen o působení cytokininů, ale také využívá ke své parazitické činnosti i další druh fytohormonů a těmi jsou auxiny (Psota et Šebánek, 1999). Že jsou cytokininy odpovědné za tvorbu tohoto rostlinného onemocnění, prokázal až objev cytokininových receptorů. Cytokininové odezva 1 (MtCREI) a Histidin kináza 1 (LHK1). Tyto receptory byly objeveny hned ve dvou rostlinách, a to v *Medicago truncatula* a v leknínu japonském (*Lotus japonicus*) (Giron et Glevarec, 2014). Tento druh onemocnění způsobuje mimo jiné i devět kmenů rodu *Rhizobium* (Psota et Šebánek, 1999) Tyto kmeny se rozdělují na čtyři odlišné skupiny – *Sinorhizobium meliloti* (gram-negativní bakterie), *Sinorhizobium fredii* (gram-

negativní bakterie), *Sinorhizobium medicae* (gram-negativní bakterie) a poslední *Mesorhizobium loti* (gram-negativní bakterie) (Giron et Glevarec, 2014). Bylo prokázáno, že všechny bakteriální kmeny *Rhizobium* jsou schopny syntetizovat a vylučovat směs cytokininů, včetně bioaktivních forem, jakou jsou iP a *trans*-zeatin. Cytokiny (*trans*-zeatin a iP) produkované bakteriemi a zvláště 2-methylthio deriváty, jsou produkovány přes gen *miaA* a tRNA izopentenyltransferázu (Giron et Glevarec, 2014). Nejsou to však jen směsi cytokininů, které patogeny využívají. Existují bakterie, které produkují jen určitý specifický cytokinin, který je zásadní pro mechanismus úspěšné invaze do rostlinného pletiva. Zdá se, že geny, které jsou odpovědné za syntézu cytokininů, si patogenní bakterie nesou ve svých plazmidech. Mezi takovéto bakterie patří například *Agrobacterium tumefaciens* (gram-negativní bakterie). Tyto bakterie se však neopírají jen o cytokiny, ale také o auxiny (Psota et Šebánek, 1999) a nejsou závislé jen na jedné specifické rostlině. Naopak jsou schopny napadat více druhů rostlin (Giron et Glevarec, 2014). Enzymy důležité pro biosyntézu cytokininu jsou kódovány na transferové deoxyribonukleové kyselině (T-DNA) a v plazmidu v napadených místech v rostlině. Právě díky T-DNA je cytokinin u *Agrobacterium tumefaciens* přenesen do genomu rostliny. Přenos cytokininů do rostliny opět způsobuje akumulaci. I zde dochází k tvorbě abnormálních buněk, anebo zde dochází ke zpomalení stárnutí napadených oblastí bakterií. Stejná strategie byla objevena i u jiných bakterií ze stejného rodu, mezi něž patří *Agrobacterium vitis* (gram-negativní bakterie) a *Agrobacterium rhizogenes* (gram-negativní bakterie).

*Agrobacterium tumefaciens* produkuje *trans*-zeatin, a to za pomoci genu, který není přenesen do genomu rostliny. Produkce cytokininů byla také prokázána u *Pseudomonas syringae* (gram-negativní bakterie), *Ralstonia solanacearum* (gram-negativní bakterie) a *Erwinia herbicola* (gram-negativní bakterie). Tyto bakterie vytvářejí na rostlině hálky (Giron et Glevarec, 2014). Další bakterií produkující cytokiny je *Corynebacterium fascians* (gram-pozitivní bakterie). Ta způsobuje na rostlině srůst několika lodyh (Psota et Šebánek, 1999). Dalšími mikroorganismy, které jsou schopny napadat rostliny za pomoci cytokininů, jsou také protista. Příkladem takového organismu je například nádorovka brukvovitá (*Plasmodiophora brassicae*).



## 6.4 Napadení hmyzem

Ani hmyzí rostlinní škůdci se nespolehají pouze na jeden způsob napadení. Dva nejvýraznější způsoby, jakým hmyzí druhy napadají a parazitují na rostlině, rozdělují hmyz na dva typy. Na minující hmyz a na hmyz tvořící háčky.

Parazitující hmyz vytvářející na hostiteli háčky, zřejmě uvolňuje fytohormon auxin. Tato teorie však není zcela jednoznačně prokázána (Nabity, 2016).



**Obrázek 6: Minující hmyz v listu *Fagus sylvatica* (buk lesní); foto: doc. Ing. I. Tomášková, Ph.D.**

Minující hmyz se ovšem také opírá o fytohormony, k výživě pak o cytokininy (Erb et al., 2012). V tomto případě rostlinný škůdce oddaluje senescenci v místě napadení a kvůli akumulaci cytokininu v místě napadení vytváří zelený úsek na listu, který je stále schopen fotosyntézy, i když okolní buňky postupně odumírají. Právě do tohoto místa je rostlina škůdcem přinucena přesouvat živiny. Rovněž, jako už několikrát bylo zmíněno, i v tomto případě cytokininy snižují obranu rostliny (Nabity, 2016). Mezi minující druhy hmyzu patří zástupci řádu vzpřímenkovitých (*Gracillariidae*). Mezi tento rod patří vzpřímenka jírovcová (*Cameraria ohridella*) a vzpřímenka šejřiková (*Caloptilia syringella*) (Křístek et Urban, 2004). Minujícími v tomto řádu jsou ovšem larvy v počátečním vývoji.

Dalším zástupcem řádu vzpřímenkovitých je také klíněnka jabloňová (*Phyllonorycter blancardella*). Tento zástupce napadá pouze jablň domáci (*Malus domestica*). I v tomto případě jsou parazitem housenky klíněnek, které minují na listech jabloně. Ve slinných žlázách

tohoto škodného hmyzu byla objevena směs cytokininů o vysoké koncentraci. Při analýze směsi bylo zjištěno, že se jedná o zeatin, iP a izopentenyladenosin (iPA). Tato směs pochopitelně slouží hmyzu k usnadnění napadení hostitele a jako v ostatních případech vytváří specifické zelené místo na jinak odumírajícím listu (Giron et Glevarec, 2014). Kromě cytokininové směsi produkuje klíněnka jabloňová také prekurzory kyseliny jasmonové. Je také schopna změnit dráhy kyseliny salicylové a inhibovat cesty kyseliny abscisové (Zhang et al., 2016). U hmyzího škůdce drobníčka (*Stigmella*) byla také nalezena směs cytokininů. Stejně jako u předchozích škůdců i v tomto případě je minujícím larva. Tato směs cytokininů, byla objevena v gastrointestinálním traktu; a v labiálních (pyskových) žlázách larvy. Analýza směsi odhalila iP, iPA, zeatin a zeatin-ribosidu (Giron et Glevarec, 2014). Teorií o tom, proč si minující hmyz osvojil endofágní chování, je celá řada. Prostor obývaný škůdcem slouží nejen k výživě, ale zřejmě také jako ochrana proti útoku nepřátel, a navíc by mohl umožnit rychlejší vývoj larvy. Důvodem této hypotézy jsou vyšší teploty uvnitř listu a dostatečný a rychlejší přísun živin (Giron et al., 2007) Směs cytokininů není jen dominantou minujícího hmyzu. I hmyz tvořící háčky využívá cytokininy. Typickými zástupci takového hmyzího škůdce jsou *Eurosta solidaginis*, který parazituje na *Solidago altissima*. I v tomto případě využívají rostlinní škůdci směs cytokininů. Jak se vyvíjejí vytvořené háčky, mění se také poměr cytokininů v produkované cytokininové směsi. Přesto nejvíce v této směsi převládá u *Eurosta solidaginis* cytokinin iPA. Dalším háčko-tvorným zástupcem je pilatka hálčivá (*Pontania proxima*). I u ní byla objevena cytokininová směs, která obsahuje cytokininy typu ribosidu, konkrétně pak *trans*-zeatinrybosid a iPA (Giron et Glevarec, 2014).

Jak je patrné, hmyzí rostlinní škůdci i patogenní bakterie vyžívají stejnou strategii – cytokininové směsi. Jak výzkum postupuje, začínají být zpochybňovány vlastnosti parazitujícího hmyzu a stále více a více vyplývá, že některé z těchto funkcí mají na svědomí bakterie. Například se ukázalo, že klíněnka jabloňová vytváří symbiotické spojení s rostlinným škůdcem – bakterií rodu *Wolbachia* (gram-negativní bakterie). Právě bakterie je odpovědná za tvorbu cytokininové směsi. Vystala proto otázka, jak moc jsou hmyzí škůdci odkázáni na bakterie (Giron et Glevarec, 2014; Zhang et al., 2017).

## 6.5 Mutualistické soužití hmyzu a bakterie

Překvapivým objevem byla symbiotická interakce mezi rostlinnými škůdci, a to konkrétně mezi bakterií a hmyzem. Toto soužití způsobuje snadnější průnik do hostitele a snadnější narušení

fytohormonální rovnováhy napadené rostliny. To vede až k narušení morfologického a/nebo biochemického uspořádání hostitele. Evolučním důvodem spojení bakterie/hmyz je zřejmě biosyntéza cytokininů. Cytokininy v tomto směru způsobí snížení obrany, snadnější získávání živin z hostitele i ochranu před senescencí. Jak hmyzí rostlinní škůdci, tak bakterie, napadající rostliny, mají společné strategie. Oba jsou závislí na využití cytokininu při invazi rostliny. Není ovšem zcela jasné, odkud jsou cytokininy syntetizovány. Zda tento druh fytohormonů produkují jen bakterie či hmyz, nebo je produkují oba dva najednou je v tento okamžik předmětem dohadů. Také není známa přesná funkce jednoho z partnerů. Kdo odpovídá za produkci, transport a dalších procesy, které jsou s cytokininy spojeny, je také stále nejasné (Giron & Glevarec, 2014). Je známo mnoho druhů bezobratlých živočichů, kteří mají z toho či onoho důvodu symbiotický vztah s bakterií. Jsou známy nejedny ekologické či evoluční účinky a důvody, které z takového vztahu vyplývají. Jak se zdokonalují možnosti výzkumu, začínají být některé tradiční fenotypy, které byly do té doby spojovány s hmyzem, postupně připisovány jejich symbiontům, v našem případě bakteriím. Ukázalo se, že bakterie, které tvoří symbiotické uspořádání s hmyzem, poskytují v tomto vztahu nové metabolické vlastnosti, které hmyzu chybí. Většinou do této kategorie spadají látky, které zajišťují lepší příjem stravy z hostitelské rostliny, lepší využití nutričních zdrojů, mohou poskytnout lepší obranné mechanismy, proti ohrožujícím faktorům jako je třeba obranný mechanismus hostitele, nebo mohou zásadně ovlivnit reprodukční strategii hmyzu. Bakterie mohou také umožnit hmyzu se rozvíjet na místech, kde je omezený zdroj živin potřebných k životu. Takovým místem je například dřevo. Bakterie také mohou dopomoci k získání živin z rostlinných šťáv. Hmyz si ze symbiomy s bakterií může rovněž navýšit rozsah hostitelských rostlin a nebýt tak odkázaný na jeden druh (Giron & Glevarec, 2014).

## 7. Praktické využití

Cytokininy nacházejí praktické využití hned v několika oblastech. Jedno takové využití spočívá v rostlinných biotechnologiích, jako kultivační média. Díky cytokininům lze získat viruprostý materiál, využití somaklonální variability a odvození rostlin z transformovaných a haploidních buněk. Cytokininy také stimulují větvení, čehož se využívá u okrasných rostlin. V kombinaci s gibbereliny lze dokonce tvarovat plody, zvláště u některých druhů jabloní. U obilovin, pokud se cytokininy aplikují v době kvetení, navyšují cytokininy počet zrn v klasech. Rovněž mají pozitivní vliv na velkou produkci biomasy a je také prodloužena fotosyntetická produktivita

rostlin. Dalším podstatným vlivem je zvýšení odolnosti rostliny proti stresu (Procházka et al. 1998). V 90. letech proběhla studie, která dokázala, že změna ve struktuře N6-substituovaném adeninu může výrazně pozměnit jeho biologickou aktivitu v živočišných buňkách. Některé endogenní cytokininy jsou slabými a nespecifickými inhibitory některých cyklin-dependentních kináz. Právě tyto kinázy jsou nesmírně důležité při buněčném cyklu. N9-disubstituované deriváty jsou schopny blokovat buněčný cyklus v přesně daných bodech buněčného dělení, tedy fáze mezi C<sub>1</sub>/S a G<sub>2</sub>/M. Cytokininové ribosidy, mají navíc cytotoxické účinky. Jsou schopny zpomalit buněčný růst a jejich dělení. Mohou rovněž dopomoci rozpadu nádorových buněk (Doležal et Strnad, 2017).

Roku 1998 bylo povoleno používat chemikálie k regulaci rostlinného růstu. Tyto přípravky se používají dodnes k přesazování i transportu sazenic, způsobují omezení ztrát při sklizni, prodlužují skladovatelnost, stimulují výnos plodin, usnadňují mechanickou sklizeň, stimulují tvorbu květních pupenů a další. Tyto chemické přípravky, které se smějí používat, jsou uvedeny v *Seznamu registrovaných prostředků na ochranu rostlin*. Tento seznam probíhá každoroční novelizací. Novelizaci provádí *Státní rostlinolékařská správa*, dříve uváděna pod zkratkou ÚKZÚZ. Některé tyto přípravky mají chemickou strukturu totožnou s endogenními cytokininy. Díky tomu jsou rostlinami dobře odbouratelné a nezanechávají po sobě škodliviny, které by škodili životnímu prostředí (Psota et Šebánek, 1999).

Ukázalo se, že zeatin a kinetin mají schopnost oddálit stárnutí lidských kožních fibroblastů. Toto bylo také testováno u 9-tetrahydropyranových, a 9-tetrahydrofuranových derivátů cytokininů. Jak přesně kinetin na živočišnou buňku působí, nebylo zcela objasněno, jedná se ovšem o velmi silný přírodní antioxidant, který má schopnost chránit DNA a proteiny před ROS, které jsou jedním z několika faktorů stárnutí a jedná se tak o velmi nebezpečné látky. Ukázalo se, že navázáním vhodného substituentu do polohy N9, lze zvýšit schopnost kinetinu a navýšit tak účinnost proti stárnutí. Dnes jsou tyto vlastnosti využívány v kosmetickém průmyslu v boji proti vráskám. Příkladem je 6-(furfurylamino)-9-(tetrahydropyran-2-yl)-purin (pyratin). Pyratin nejen že bojuje proti vráskám, ale také snižuje hrubost pokožky, zabraňuje vysychání, a dokonce působí proti akné a růži (Doležal et Strnad, 2017).

Dalším zajímavým zjištěním, byl vliv cytokininů na rakovinné buňky (Doležal et Strnad, 2017). Zda však budou v tomto směru přínosné či nikoli, je zatím nejasné.

## 8. Výsledné zhodnocení

Senescence listu je pro rostlinu nesmírně důležitý proces, při kterém dochází k degradaci makromolekul a vzniku pro rostlinu potřebných složek (AMK, cukry aj.). Škůdci ovšem senescenci narušují, za pomoci jimi produkoványými fytohormony. To ohrožuje celou rostlinu a dochází tak ke zvýšenému stresu, případě k odumření celé rostliny.

## 9. Diskuze

Studium škůdců v přírodě je poměrně obtížné. Sběr vzorků listů napadených hmyzími škůdci, vzhledem k době výskytu larev, je časově omezen na podzimní období. Nepříznivé podmínky (déšť, mráz, neschůdný terén aj.) jsou rovněž nepříjemné. Identifikace samotných škůdců (o čemž jsem se mohla sama přesvědčit) je nesnadné. Je třeba znát druh stromu (a to jen za předpokladu, že je strom napadán pouze jedním druhem škůdce) nebo vyčkat, až se z larvy stane dospělec. Aby se z larvy stal dospělec, je třeba mu vytvořit ideální podmínky (napodobit podmínky v přírodě – nejprve chladnější teploty nad bodem mrazu, později teploty pod bodem mrazu a následně postupný přechod na teplejší klima). Pokud se tyto podmínky nedodrží, larva umírá. Je rovněž zajímavé sledovat, že ne všechny stromy jsou stejnoměrně napadeny. Příkladem jsou v tomto případě dva stromy v naší zahradě. Dvě třešně, vzdáleny od sebe dvacet kroků. Přestože jsou stejně staré a mají stejně mohutné koruny, je pouze jedna každoročně napadána hned třemi druhy neidentifikovaných rostlinných škůdců. Rovněž i jabloně v naší zahradě trpí každoročně rží. Nicméně ani zde se nedá mluvit o souměrnosti. Opět jsou jabloně ve stejném stáří, nicméně jabloně vysazené na západě jsou napadeny více, oproti stromům rostoucím na východě. Je tedy zřejmé, že škůdci si stromy vybírají dle některých předpokladů, které by měly být předmětem zkoumání. Toto porozumění by mohlo napovědět, jak se účinněji proti rostlinným škůdcům bránit.

Ač analytické metody a schopnost izolovat cytokininy značně od prvních let výzkumů pokročily, jsou fytohormony stále velkou neznámou. Všichni autoři jednotlivých článků se shodují, že rostlinní škůdci využívají jednotlivé fytohormony ve svůj prospěch. Jak jsou však a zda vůbec (viz kapitola 6.5 mutualistické soužití hmyzu a bakterie) hmyzí škůdci schopni cytokininy syntetizovat, nebylo v těchto článcích objasněno. Rovněž nebylo nikde zmíněno, jak rostlina reaguje na nečekaně vysoké koncentrace cytokininů. Zda je poměr koncentrací jednotlivých fytohormonů natolik ovlivněn, že rostlina tyto vysoké koncentrace považuje za

samozřejmě, či zda jsou pro rostlinu běžné, nebo je odbourávání cytokininů příliš pomalé, nebylo uvedeno.

Je zřejmé, že všichni rostlinní škůdci využívají fytohormony stejným způsobem i za stejným účelem. Konkrétně cytokininy těmto škůdcům převážně slouží k nabuzení buněčného dělení a k udržení fotosyntézy v napadeném místě. Vždy dochází k pozastavení senescence a tím prodloužení infekce. Je také patrné, že rostlinní škůdci využívají celou škálu fytohormonů a neopírají se pouze o jeden druh či o jeden konkrétní fytohormon jednoho konkrétního druhu. Příkladem jsou v tomto případě hálkotvorní hmyzí škůdci, kteří, jak se zdá, jsou schopni produkovat jak cytokininy, tak auxiny. Nejedná se však jen o auxiny, které rostlinní škůdci spolu s cytokininy používají, ale také o gibereliny, kyselinu abscisovou, kyselinu jasmonovou či kyselinu salicylovou. Protože tyto interakce mají za následek velké ztráty v zemědělské výrobě, je nesmírně důležité jednotlivé mechanismy pochopit a za jejich pomoci vytvořit obranné prostředky, které nebudou narušovat životní prostředí či zdraví lidí, zvířat i rostlin.

Cytokininy by také měli mít schopnost navýšit výnosy v zemědělské výrobě. Ač se geneticky modifikované organismy (GMO) jeví jako naděje před celosvětovým hladomorem (hrozící kvůli nebezpečnému přelidňování), spojení s cytokininy by mohlo dopomoci k lepšímu výsledku hrozící krize (ani vliv těchto fytohormonů na květenství či plody nelze v tomto případě opomenout). Rovněž je otázkou, zda by cytokininy nemohli GMO zcela nahradit. Mnoho lidí se ostatně GMO obává. Ať už je napadají z pozice zdraví či nebezpečí mutace, cytokininy by nemuseli představovat žádnou hrozbu a mohli by tak být společností lépe přijímáni.

Není to však jen zemědělství, které se se zdá být pro využití cytokininů klíčové. Jejich využití v kosmetice je rovněž velmi zajímavé a nutí k myšlence, že pokud jsou cytokininy schopné prodlužovat životnost fibroblastů v lidských buňkách jaký dopad na organismus jako takový, by ještě mohli mít. A nejen cytokininy, ale fytohormony obecně. Zmínky, že by cytokininy mohli být další možností léčby rakoviny, se ostatně ozývá stále častěji a některé prameny dokonce uvádějí, že tento výzkum již probíhá.

Některé druhy fytohormonů jsou navíc schopné pomoci rostlině přizpůsobit se okolí (brassinosteroidy). Pochopení těchto fytohormonů a jejich možné využití by mohlo přinést řešení pro ohrožené druhy rostlin. Také by mohly sehrát úlohu u potenciaálně ohrožených druhů, které nebudou schopny se změnám v přírodě přirozeně přizpůsobit.

## 10. Závěr

Výzkum fytohormonů se ukazuje jako klíčový. Jejich využití v oblasti zemědělství není nikterak zanedbatelné a mohou se stát řešením v nejednom krizovém okamžiku. Ať už jako ochrana pro ohrožené, či kriticky ohrožené druhy rostlin, či možné rozšíření plodin na extrémní stanoviště, nebo navýšení produkce mohu fytohormony sehrát svou úlohu jen za předpokladu, že jim zcela porozumíme. Rostlinní škůdci by nám v tomto případě mohli být velmi nápomocní. Jejich schopnost ovlivnit rostliny by se mohla stát šablonou pro naše budoucí činy. Ochrana rostlin bude v budoucnu čím dál více potřebná, kvůli změnám klimatu. Ač je v tento čas velmi upozaděna (ochrana zvířat je společností více a ochotněji přijímána) je nezbytná pro mnoho dalších druhů. Vždyť příroda jako taková, je komplexní a ztráta určitého druhu může zpustit nebezpečný dominový efekt, mající vliv na celý ekosystém, a tedy i na lidi.

Zajímavým efektem fytohormonů je vliv na živočišné buňky. Jejich přínos v kosmetice je zatím jen počátek jejich případného využívání v tak důležitém oboru, jako je medicína. Vliv cytokininů na rakovinotvorné buňky, by mohl pomoci nejednomu nemocnému člověku, ale rovněž by mohlo být řešením pro takový ohrožený druh, jakým je ďábel medvědovitý (*Sarcophilus harrisii*), jehož ohrožuje přenosná forma rakoviny. Právě příklad s ďáblem je varováním, že rakovina se může stát přenosnou. Ač lidé tímto typem rakoviny trpět nemohou, nikdo nemůže vyloučit možnost, že se v budoucnosti objeví. Mít lék, by mohlo být pro lidstvo (i další tvory) rozhodující.

Pochopení fytohormonů, je v současnosti však důležité hlavně pro zemědělce. Roční úbytek plodin je vlivem škůdců vysoký (v některých případech je úbytek úrody až 70 %). Zda za ohrožením stojí hmyz či případně bakterie (nebo oba dva), je podstatné vyzkoumat, neboť boj s těmito škůdci, jak je patrné z každoročního úbytku plodin, není v dnešní době efektivní. Ekonomické ztráty a nedostatek potravin se lidé snaží ovlivnit za pomoci hnojiv a pesticidů. Narušení přírody a další ekonomické náklady jsou toho sekundární reakcí. Efektivnější ochrana rostlin, případně nárůst úrody, za pomoci fytohormonů by mohl zlepšit ekonomiku a přispět nejen ke zdravější přírodě, ale také k lepším sociálním podmínkám některých lokalit.

Ať už ovšem využijeme fytohormony jakkoli, zájem o ně v posledních letech stoupá. Je jen otázkou času, než budou jejich tajemství zcela objevena a stanou se nedílnou součástí našich činností.

## 11. Přínos práce

V této práci jsem měla možnost shrnout některé poznatky z interakce mezi rostlinnými škůdci a hostitelskou rostlinou. Pochopit, jak reaguje rostlina na napadení i to, jak je škůdce schopen rostlinu ovlivnit. Uvést jednotlivé vlastnosti fytohormonů, jejich využití škůdci a možnosti, které nám mohou poskytnout. V práci jsou rovněž zahrnuty možnosti a názory, které vyplývají z jednotlivých článků, například využití cytokininů v léčbě rakoviny, či využití hormonů k ochraně ohrožených druhů rostliny.

Pochopení jednotlivých procesů, kterých se cytokininy účastní, bylo rovněž důležité. Shrnutí procesu senescence, buněčného dělení, ale také obrany rostliny, jsou podstatným vodítkem k pochopení, jakými mechanismy, jsou rostliny škůdcem napadeny a jak (proč) jsou ohroženy.



## Použitá literatura

- An, C. et Mou, Z., 2011: Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of integrative plant biology* 53(6): 412-428.
- Avila-Ospina, L. et Moison, M. et Yoshimoto, K. et Masclaux-Daubresse, C., 2014: Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *Experimental Botany*: 3799-3811.
- Clouse, D. S. et Sasse, M. J., 1998: Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Plant physiology*: 427-451.
- Creelman, R. A. et Mullet J. E., 1997: Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Plant physiology*: 355-381.
- Danquah, A. et De Zelicourt, A. et Colcombet, J. et Hirt, H., 2013: The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Elsevier*: 1-13.
- Daudu, D. et Allion, E. et Liesecke, F. et Papon, N. et Courdavault, V. et De Bernoville, T. D. et Mélin, C. et Oudin, A. et Clastre, M. et Lanoue, A. et Courtois, M. et Pichon, O. et Giron, D. et Carpin, S. et Giglioli-Guivarch, N. et Créche, J. et Besseau, S. et Glévarec, G., 2017: CHASE-containing histidine kinase receptors in apple tree: From a common receptor structure to divergent cytokinin binding properties and specific functions. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-15.
- De Vries, J. et Fischer, A. M. et Roettger, M. et Rommel, S. et Schluemann, H. et Bräutigam, A. et Carlsbecker, A. et Gould, S. B., 2016: Cytokinin-induced promotion of root meristem size in the fern *Azolla* supports a shoot-like origin of euphyllophyte roots. *New Phytologist* 209: 705-720.
- Doležal, K. et Strnad, M., 2017: Cytokiny - regulátory růstu rostlin, které dokážou mnohem více než jen regulovat dělení buněk. *Živa* 4: 149-152.
- Dvořáková, M. et Vaněk T., 2015: Strigolaktony - struktura a funkce v rostlinách. *Chemické listy* 109. 762-769.
- Giron, D. et Kaiser, W. et Imbault, N. et Casas, J., 2007: Cytokinin-mediated leaf manipulation by a leafminer caterpillar. *Biology letters* 3: 340-343.
- Giron, D. et Frago, E. et Glévarec, G. et Pieterse, C. M. J. et Dicke, M., 2013. Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: connecting plant growth and defence. *Functional ecology* 27: 599-609.

- Giron, D. et Glevarec, G., 2014: Cytokinin-induced phenotypes in plant-insect interactions: learning from the bacterial world. *Chem Ecol*: 826-835.
- Chanclud, E. et Kisiala, A. et Emery, N. R. J., Chalvon, V. et Ducasse, A. et Romiti-Michel, C. et Gravot, A. et Kroj, T. et M. J.-B., 2016: Cytokinin Production by the Rice Blast Fungus. *PLOS pathogens*: 1-25.
- Křístek, J. et Urban, J. (2004). *Lesnická entomologie*. Academia, Praha: 445 s.
- Lara, M. E. B. et Garcia, M.-C. G. et Fatima, T. et Ehneß, R. et Lee, T. K. et Proels, R. et Tanner, W. et Roitsch, T., 2004: Extracellular Invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The plant cell* 16: 1276-1287.
- Erb, M. et Meldau, S. et Howe, G. A., 2012: Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci.* 17(5): 250-259.
- Morrison, E. N. et Emery, R. J. N. et Saville, B. J., 2015: Phytohormone involvement in the *ustilago maydis*– *zea mays* pathosystem: relationships between abscisic acid and cytokinin levels and strain virulence in infected cob tissue. *PLOS ONE*: 1-23
- Nabity, D. P., 2016: Insect-induced plant phenotypes: Revealing mechanisms through comparative genomics of galling insects and their hosts. *Botanical Society of America* 103(6): 979-981.
- Pertry, I. et Václavíková, K. et Depuydt, S. et Galuszka, P. et Spíchal, L. et Temmerman, W. et Stes, E. et Schmülling, T. et Kakimoto, T. et Van Montagu, M. C. E. et Strnad, M. et Holsters, M. et Tarkowski, P. et Vereecke, D., 2009: Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *PNAS* 3: 929-934.
- Podlešáková, K. et Tarkowská, D. et Pěničik, A. et Oklešťková, J. et Turešková, V. et Floková, K. et Tarkowski, P., 2012: Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chem.Listy* 106: 373-379.
- Procházka, S. et Macháčková, I. et Krekule, J. et Šebánek, J., 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha: 484 s.
- Psota, V. et Šebánek, J., 1999: *Za tajemstvím růstu rostlin*. Scientia, Praha: 180 s.+
- Rapp, Y. G. et Ransbotyn, V. et Grafi, G., 2015: Senescence meets dedifferentiation. *Plants* 4: 356-368.

- Riefler, M. et Novak, O. et Strnad, M. et Schmülling, T., 2006: Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination root development, and cytokinin metabolism. *The plant cell* 18: 40-54.
- Siddique, S. et Radakovic, Z. S. et De La torre, C. M. et Chronis, D. et Novák, O. et Ramireddy, E. et Holbein, J. et Matera, Ch. et Hütter, M. et Gutbrod, P. et Anjam, M. S. et Rozanska, E. et Habash, S. et Elashry, A. et Sobczak, M. et Kakimoto, T. et Strnad, M. et Schmülling, T. et Mitchum, M. G. et Grudler, F. M. W., 2015: A parasitic nematode releases cytokinin that controls cell division and orchestrates feeding site formation in host plants. *PNAS* 41: 12669-12674
- Spíchal, L., 2012: Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology* 39: 267-284.
- Street, I. H. et Mathews, D. E. et Yamburkenko, M. V. et Sorooshzadeh, A. et John, T. R. et Swarup, R. et Bennett, M. J. et Kieber, J. J. et Schaller, G. E., 2016: Cytokinin acts through the auxin influx carrier AUX1 to regulate cell elongation in the root. *The Company of Biologists*: 3982-3993.
- Swarup, R. et Kramer, E. M. et Perry, P. et Knox, K. et Leyser, H. M. et Haseloff, J. et Beemster, G. T. et Bhalerao, R. et Bennett, M. J., 2005: Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nat. Cell Biol.* 7: 1057-1065.
- Taiz, L. et Zeiger, E., 2010: *Plant physiology* (5). Sinauer Associates: p. 782
- Van de Poel, B. et Van der Straeten, D., 2014: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Front. Plant Sci.* 5: 640-651
- Van Poecke, R M. P. et Posthumus, M. A. et Dicke, M., 2001: Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. *J. Chem. Ecol.* 27: 1911–1928.
- Vylíčilová, H. et Husičková, A. et Spíchal, L. et Srovnal, J. et Doležal, K. et Plíhal, O. et Plíhalová, L., 2015: C2-substituted aromatic cytokinin sugar conjugates delay the onset of senescence by maintaining the activity of the photosynthetic apparatus. *Elvesier*: 1-12.
- Wang, J. et Chung, S. H. et Peiffer, M. et Rosa, C. et Hoover, K. et Zeng, R. et Felton, G. W., 2016: Herbivore oral secreted bacteria trigger distinct defense responses in preferred and non-preferred host plants. *Chem Ecol*:1-12.

Yurkov, A. et Veselova, S. et Jacobi, L. et Stepanova, G. et Yemelyanov, V. et Kudoyarova, G. et Shishova, M., 2017: The effect of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* on cytokinin content in a highly mycotrophic *Medicago lupulina* line under low phosphorus level in the soil. *Plant soil environ.* 63: 519-524.

Zažímalová, E. et Křeček, P. et Skůpa, P. et Hoyerová, K. et Petrášek, J., 2007: Polar transport of the plant hormone auxin - the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 1621-1637.

Zhang, H. et Dugé de Bernoville, T., Body, M. et Glevares, G. et Reichelt, M. et Unsicker, S. et Bruneae, M. et Renau, J.-P. et Huguet, E. et Dubreuil, G. et Giron, D., 2016: Leaf-mining by *Phyllonorycter blancardella* reprograms the host-leaf transcriptome to modulate phytohormones associated with nutrient mobilization and plant defense. *Elsevier* 84: 1-14.

Zhang, H. et Guiguet, A. et Dubreuil, G. et Kisiala, A. et Andreas, P. et Emery, E. J. N. et Huguet, E. et Body, M. et Giron, D., 2017: Dynamics and origin of cytokinins involved in plant manipulation by a leaf-mining insect. *Insect Science* 24: 1065-1078.

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Chemický vzorec cytokininů navázaných v poloze N6 na adeninu .....	7
Obrázek 2: Chemický vzorec auxinů .....	11
Obrázek 3: Schéma transportu částečně disociovaných auxinů .....	13
Obrázek 4: Vliv cytokininových receptorů na jednotlivé vybrané procesy v rostlině huseníčku rolním ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) .....	19
Obrázek 5: Schématické znázornění metabolických procesů senescence.....	23
Obrázek 6: Minující hmyz v listu <i>Fagus sylvatica</i> (buk lesní) .....	31