

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Metabolismus cytokininů u patogenní houby

Claviceps purpurea

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Veronika Hloušková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.
Rok:	2015

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

V Olomouci dne *podpis bakaláře*

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu doc. Mgr. Petru Galuszkovi, Ph.D. za odbornou pomoc, věnovaný čas a vedení při práci. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Josefu Vrabkovi, Mgr. Tomášovi Hluskovi, Ing. Kristýně Hromadové a ostatním kolegům z Oddělení molekulární biologie za cenné rady a ochotu pomoci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Veronika Hloušková
Název práce	Metabolismus cytokininů u patogenní houby <i>Claviceps purpurea</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Claviceps purpurea neboli paličkovice nachová je biotrofní fytopatogenní houba. Parazituje na jednoděložných rostlinách, kam patří i ekonomicky významné plodiny jako jsou žito, pšenice a ječmen. V poslední fázi infekce tvoří v klasu tzv. sklerocia, což jsou dormantní struktury obsahující množství námelových alkaloidů, které působí na nervovou soustavu savců.

Nedávno bylo prokázáno, že *C. purpurea* je schopna produkce rostlinných hormonů cytokininů. Cytokininy jsou N^6 substituované deriváty adeninu. Houba pro biosyntézu cytokininů využívá podobné dráhy jako rostliny. Obsahuje cytokinin-specifickou cytochrom P450 monooxygenasu, tRNA-isopentenyltransferasu a fosforibohydrolasu zvanou 'Lonely guy'. Zvláštností u této houby je bifunkční enzym CpIPT-LOG, který spojuje aktivity dvou nezávislých rostlinných enzymů.

V této práci byla provedena kvalitativní a kvantitativní analýza obsahu cytokininů v axenické kultuře houby *C. purpurea*. Byl sledován metabolismus a dynamika produkce cytokininů během růstu houby.

Klíčová slova	<i>Claviceps purpurea</i> , cytokininy, kvantifikace, metabolické konverze
Počet stran	57
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Veronika Hloušková
Title	Cytokinin metabolism in pathogenic fungus <i>Claviceps purpurea</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.
The year of presentation	2015

Abstract

Claviceps purpurea is a biotrophic phytopathogenic fungus. It parasitizes on monocotyledonous plants, which includes economically important crop species like rye, wheat and barley. As a last step of fungal parasitic life cycle is a formation of so-called sclerotia. These sclerotia are dormant structures containing lot of ergot alkaloids, which influence the nervous system of the mammals.

Recently was shown that *C. purpurea* is able to produce plants hormones - cytokinins. Cytokinins are derivatives of adenine, substituted on the N^6 position of the purine ring. The fungus has similar cytokinin biosynthetic pathways like plants. It contains cytokinin-specific cytochrome P450 monooxygenase, tRNA-isopentenyltransferase and phosphoribohydrolase called 'Lonely guy'. The unique feature of the fungus is a bi-functional enzyme CpIPT-LOG combining activities of two independent plant enzymes.

In this thesis, there was performed quantitative and qualitative analysis of cytokinins content in axenic cultures of *C. purpurea*. Metabolic conversions and dynamics of cytokinin production during the fungal growth were followed.

Keywords	<i>Claviceps purpurea</i> , cytokinins, quantification, metabolic conversions
Number of pages	57
Number of appendices	-
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	Fytopatogenní houby	10
2.2	<i>Claviceps purpurea</i>	11
2.2.1	Taxonomické zařazení	11
2.2.2	Mechanismus virulence	13
2.2.3	Námelové alkaloidy	15
2.3	Fytohormony	17
2.3.1	Úvod	17
2.3.2	Cytokininy	18
2.3.2.1	Biosyntéza cytokininů	20
2.3.2.2	Metabolismus cytokininů	21
2.3.2.3	Percepce a transdukce cytokininového signálu	22
2.3.3	Fytohormony v houbách	22
2.3.4	Fytohormony v houbě <i>Claviceps purpurea</i>	23
2.3.5	Analýza cytokininů	25
2.3.5.1	Plynová chromatografie	26
2.3.5.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	26
2.3.5.3	Kapilární elektroforesa	27
2.3.5.4	Imunologické metody	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1	Biologický materiál	28
3.2	Chemikálie	28
3.3	Enzymy, příslušné pufrы a komponenty pro molekulární biologii	29
3.4	Použité kity	30
3.5	Přístroje	30

3.6	Roztoky	31
3.7	Postupy	32
3.7.1	Kultivace houby pro izolaci cytokininů	32
3.7.2	Analýza cytokininů	32
3.7.3	Kultivace houby pro izolaci RNA	33
3.7.4	Příprava cDNA	33
3.7.4.1	Izolace RNA	33
3.7.4.2	Reverzní transkripce	34
3.7.4.3	qPCR	34
4	VÝSLEDKY	35
5	DISKUZE	45
5.1	Metoda pro analýzu cytokininů	45
5.2	Konverze cytokininů	45
5.3	Percepce cytokininového signálu v houbě	48
6	ZÁVĚR	50
7	LITERATURA	51
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57

Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na dané téma
2. Metoda stanovení cytokininů v biologickém materiálu
3. Metabolismus exogenně aplikovaného cytokininu do axenické kultury houby
4. Dynamika produkce cytokininů během růstu houby v axenické kultuře

1 ÚVOD

Cytokininy jsou rostlinné rostlinné hormony. Jejich biosyntetické dráhy v rostlinách byly podrobně zkoumány a popsány, stejně tak jejich metabolismus a signální dráhy. Také bylo zjištěno, že některé bakterie, které napadají rostliny, jsou schopny produkce cytokininů a byly popsány jejich biosyntetické dráhy, které se v některých krocích od rostlinných drah biosyntézy liší. I některé houby interagující s rostlinami jsou schopny produkce rostlinných hormonů, o jejich celkovém metabolismu je toho známo však málo. Houba *Claviceps purpurea* je schopna produkovat cytokininy. Nedávno byly objeveny a popsány geny kódující některé enzymy zapojené do biosyntézy cytokininů, konkrétně enzymy cytochrom P450 monooxygenasa, fosforibohydrolasa zvaná ‚Lonely guy‘, tRNA-isopentenyltransferasa a bifunkční enzym Cp-IPT-LOG.

Teoretická část této práce je zaměřena na biotrofní fytopatogenní houbu *Claviceps purpurea*, dále na fytohormony, konkrétně cytokininy, a produkci rostlinných hormonů v houbových organismech. Praktická část této práce se zabývá produkcí cytokininů v houbě *C. purpurea*, konkrétně metabolismem exogenně aplikovaného cytokininu do axenické kultury houby a dynamikou produkce cytokininů v houbě během jejího růstu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Fytopatogenní houby

Houby (*Fungi*) patří mezi eukaryotické organismy. Mohou být jednobuněčné i mnohobuněčné. Živí se heterotrofně, a to buď jako saprofyté, kteří rozkládají odumřelá těla rostlin a živočichů, anebo jako parazité neboli cizopasně houby. Mezi saprofytickými a parazitickými houbami je základní rozdíl. Zatímco spory nebo hyfy parazitických hub mohou napadnout zraněné nebo jinak nechráněné rostliny, saprofytické houby nedokáží kolonizovat rostlinu ani tehdy, když je zraněná. Oportunisticky patogenní houby napadají pouze stresované nebo stárnoucí rostliny, jejichž rezistence je výrazně snížena.

Parazitické houby napadající rostliny používají dva způsoby získávání živin od hostitele. Nekrotrofní houby hostitele nejprve zabijí, a až poté jsou schopny ho kolonizovat. Smrt hostitele je způsobena buď změnami v metabolismu buňky způsobenými infekcí, nebo působením toxinů či enzymů, které jsou produkovány patogenem. Houba se pak živí odumřelou tkání. Naproti tomu biotrofní houby svého hostitele nezabijí, protože jsou závislé na metabolismu hostitelských buněk. Svými hyfami pronikají do periplasmatického prostoru mezi buněčnou stěnou a cytoplasmatickou membránou, odkud získávají živiny. Symptomy infekce se projeví většinou až po nějaké době. Odumření pletiva či hostitele nastává až poté, co patogen ukončí svoji reprodukci, nebo jakmile je hostitelská rostlina zcela vyčerpána neustálým odebíráním živin houbou. Některé houby oba tyto způsoby získávání živin kombinují. Rostlinu kolonizují jako biotrofové, nějakou dobu na ní žijí a získávají živiny z jejího metabolismu, a jakmile rostlina odumře vyčerpáním, začnou se živit na odumírajícím pletivu jako nekrotrofové. (Prell and Day, 2001)

Většina fytopatogenních hub se řadí do oddělení *Ascomycota* a *Basidiomycota*.

Oddělení *Ascomycota* neboli houby vřeckovýtrusné je nejpočetnější skupinou hub. Výtrusy těchto hub vznikají ve vřecku (lat. ascus), což je často jediná diploidní buňka v životním cyklu houby. Diploidní jádra vřecek se dělí meiózou a následně mitózou za vzniku většinou osmi výtrusů, tzv. askospor, které jsou následně uvolněny ven. Vegetativní stélky těchto hub, přehrádkovaná mycelia, jsou haploidní. Při pohlavním rozmnožování tvoří houba gametangia, a to samčí anteridia a samičí askogonia. Gametangia jsou často uzavřena v plodnicích, kde na koncích vláken zvaných

askogenní hyfy dochází ke karyogamii neboli splnutí jader anteridia a askogonia. Takto je vytvořeno diploidní vřecko. Při nepohlavním rozmnožování tvoří houba nepohlavní výtrusy, tzv. konidie. Na rostlinách se většinou vyskytují v nepohlavní fázi.

Z rostlinných patogenů se do oddělení *Ascomycota* řadí třída *Leotiomycetes*, kam patří řády *Erysiphales* (padlí), *Helotiales* (voskovičkotvaré) a *Rhytismatales* (svraštelkotvaré); dále třída *Sordariomycetes* (tvrdohouby), kam patří řády *Ophiostomatales* (ofiostomotvaré), *Diaporthales* (čárovkotvaré) a *Hypocreales* (masenkotvaré). Do řádu *Hypocreales* patří například rod *Hypocrea* (masenka), rod *Nectria* (rážovka), rod *Fusarium* (srpovnička), a v neposlední řadě rod *Claviceps* (paličkovice).

Basidiomycota neboli houby stopkovýtrusné se množí výtrusy, zvanými basidiospory. Vyklíčením basidiospory vzniká primární mycelium, které je haploidní. Sekundární mycelium, které v jejich životním cyklu převažuje, vzniká splnutím dvou primárních mycelií. Buňky splývají plazmogamií, tzn. splývá pouze buněčná plazma, takže buňka obsahuje dvě jádra. Toto dvoujaderné mycelium roste neomezeně dlouho. Při dělení v buňce probíhají dvě konjugované mitózy. Buňky poté vytvářejí přezky (ne vždy, např. u rzi tvorba přezek chybí), které zajišťují rovnoměrné rozdělení obou jader do dceřiných buněk. Při pohlavním rozmnožování, které u *Basidiomycot* převažuje, nejsou morfologicky rozlišené pohlavní orgány. Na koncích sekundárního mycelia se tvoří hyfy, tzv. basidie, ve kterých dochází ke karyogamii a následné meióze, kdy vznikají čtyři haploidní jádra. Z basidií vyrůstají stopky, na nichž se exogenně tvoří basidiospory. Nepohlavně se rozmnožují tvorbou konidií.

Z fytopatogenních hub se do oddělení *Basidiomycota* řadí třída *Pucciniomycetes* (rzi), kam patří řád *Pucciniales* (rzi), např. rez travní (*Puccinia graminis*); dále třída *Ustilaginomycetes* (sněti), kam patří řád *Ustilaginales* (sněti prašné), např. sněť kukuřičná (*Ustilago maydis*); a třída *Exobasidiomycetes*, kam patří řád *Tilletiales* (sněti mazlavé).

2.2 *Claviceps purpurea*

2.2.1 Taxonomické zařazení

Paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*) je obligátně biotrofní parazitická houba napadající rostliny. Její částečná taxonomie byla předeslána již v předchozí kapitole.

Říše:	houby (<i>Fungi</i>)
Oddělení:	houby vřeckovýtrusné (<i>Ascomycota</i>)
Třída:	tvrdohouby (<i>Sordariomycetes</i>)
Řád:	masenkotvaré (<i>Hypocreales</i>)
Čeď:	paličkovcovité (<i>Clavicipitaceae</i>)
Rod:	paličkovice (<i>Claviceps</i>)
Druh:	paličkovice nachová (<i>Claviceps purpurea</i>)

Rod *Claviceps* zahrnuje přes 30 různých druhů (Taber, 1985). Parazituje na více než 600 druzích jednoděložných rostlin, které patří převážně do čeledí lipnicovitých (*Poaceae*), sítinovitých (*Juncaceae*) a šáchorovitých (*Cyperaceae*) (Bové, 1970). *Claviceps purpurea* je nejznámějším a nejvíce studovaným zástupcem tohoto rodu. Sama napadá asi 400 druhů trav (Taber, 1985), kam patří i ekonomicky významné plodiny jako je žito, pšenice a ječmen (Bové, 1970). Ve zralém klasu napadené rostliny se v konečné fázi infekce objeví černo-fialové sklerocium (Obr. 1). I malá kontaminace zrna těmito sklerocii může způsobit, že úroda z napadeného pole je příliš toxická, a proto nevhodná pro další použití (Agrios, 1988). Sklerocia obsahují mnoho fyziologicky aktivních alkaloidů, které působí na centrální nervovou soustavu lidí i zvířat.



Obr. 1 Sklerocium vyčnívající z klasu žita napadeného houbou *Claviceps purpurea* (z <http://botany.cz/cs/claviceps-purpurea/>)

2.2.2 Mechanismus virulence

Životní cyklus *Claviceps purpurea* (Obr. 2) začíná na jaře produkcí askospor, které jsou unášeny větrem k potenciálním hostitelským rostlinám (Luttrell, 1977). Jen ty askospory, které dopadnou na pestík nesprášené rostliny a vyklíčí (1), jsou schopny způsobit onemocnění rostliny, protože askospory nejsou schopny penetrace jiné části rostliny (Swan and Mantle, 1991). Proto je časové období, kdy může houba rostlinu infikovat, omezené pouze na dobu kvetení. Spora prorůstá k semeníku stejnou cestou jako pylová láčka po opylení a snaží se dosáhnout cévního pletiva u báze semeníku, odkud pak čerpá živiny pro svůj vlastní růst (2). Zpočátku je růst mírný a houba prorůstá hlavně mezibuněčnými prostory (Tenberge and Tudzynski, 1994). Pro houbu je důležité, aby počátek infekce zůstal rostlinou nepovšimnut, protože jinak by rostlina mohla cévní pletivo uzavřít a houba by bez přísunu živin vyhladověla a odumřela. Cévního pletiva dosáhne asi 3 dny po inokulaci (dpi) (Luttrell, 1980). Houba neproniká dál do rostliny. Propojení hostitele s patogenem vytvořené na tomto rozhraní je dokončeno asi 6 dpi a zůstává po celou dobu infekce konstantní.

4 dpi hyfy začnou rychle proliferovat, pronikat přes stěnu semeníku a časem nahradí rostlinné pletivo uvnitř. V semeníku se vyvine myceliální stroma, tzv. sfacelium, a začne s produkcí nepohlavních konidiospor (Luttrell, 1980). Konidia přecházejí do husté viskózní kapaliny, která je vylučována v kapičkách na povrchu semeníku. Tato kapička tzv. medovice (3), která je vyloučena na povrch asi 7 dpi, je první makroskopickou známkou úspěšné infekce (Tudzynski *et al.*, 1995). Medovice je tvořena především floémovou šťávou a obsahuje velké množství sacharidů. Rostlinou sacharosu houba převádí na jiné sacharidy; například glukosu, fruktosu a cukerné alkoholy (Mower and Hancock, 1975a). Vysoká koncentrace cukrů v medovici slouží houbě jako zdroj živin, zajišťuje vysoký osmotický tlak, který brání konidiím v klíčení a zvyšuje přísun dalších rostlinných asimilátů (Mower and Hancock, 1975b). Je také klíčová pro šíření sekundární infekce. Ačkoli se konidia obsažená v této lepkavé kapičce mohou šířit přímým kontaktem z klasu na klas, nebo mohou ukápnout na níže položené květy, hlavní způsob šíření sekundární infekce zajišťuje hmyz, který je přilákan sladkou medovicí (4) (Tudzynski *et al.*, 1995; Tenberge, 1999). Toto rychlé šíření sekundární infekce mezi rostlinami je pro *Claviceps* klíčové jako kompenzace krátkého období, kdy může primárně infikovat pouze kvetoucí rostliny.



Obr. 2 Životní cyklus *Claviceps purpurea* (Hulvová *et al.*, 2012)

Tato sfaceliální fáze trvá, dokud není sporulace konidií dokončena, což je asi 11 dní po začátku infekce (Tudzynski *et al.*, 1995). Poté ustává produkce medovice. Hyfy začnou diferencovat z vláknitých sfacelií na pletivo sklerocií. Na rozdíl od buněk sfacelií, jejichž hyfy jsou dlouhé a úzké s tenkými buněčnými stěnami, malými vakuolami a nízkým obsahem tuků, buňky sklerocií jsou menší a tlustší než buňky mycelia, mají silnější buněčnou stěnu, větší vakuoly, obsahují kapičky lipidů

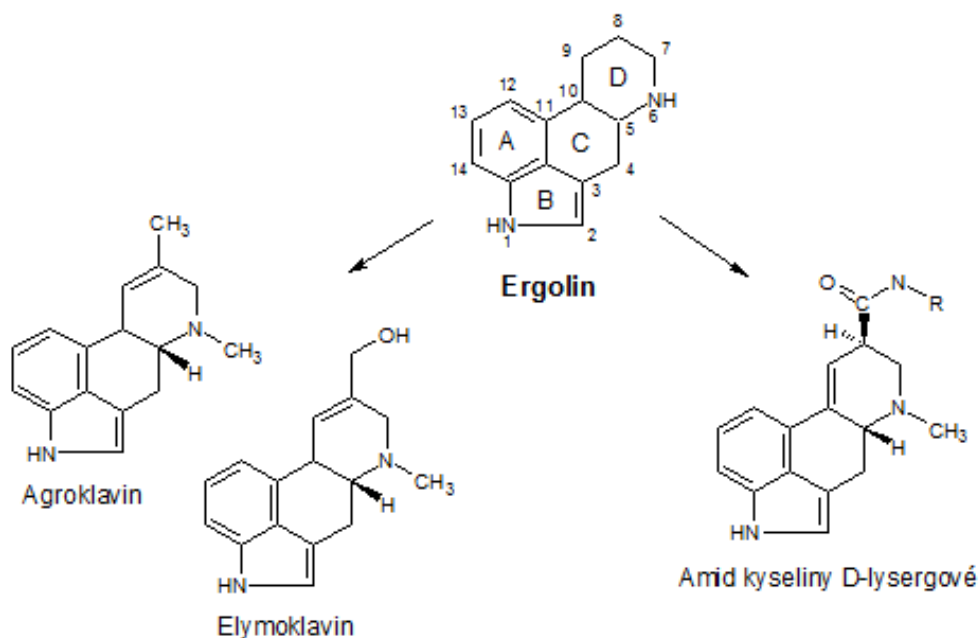
v cytoplasmě a jsou výrazněji pigmentované. Sklerocia jsou viditelná již 13 dpi (Luttrell, 1980). Zrání trvá 4 až 5 týdnů, kdy se sklerocium prodlužuje proliferací buněk, jeho kůra tvrdne a získává fialově černou barvu (Shaw and Mantle, 1980). Zralá sklerocia vyčnívají z klasu (5), jsou široká několik milimetrů a na délku měří několik cm (Tenberge, 1999). Purpurová sklerocia jsou bohatá na lipidy. Také je to jediné období životního cyklu houby, kdy jsou produkovány námelové alkaloidy.

Po dozrání vypadnou sklerocia z klasu na zem, kde přečkají zimu. Dlouhé období chladu, které je následováno výrazným zvýšením teploty na jaře, slouží jako spouštěč pro klíčení. Sklerocia začnou na svém povrchu tvořit oranžová stromata ve tvaru paliček, která se skládají ze stopky zakončené kulovitou hlavičkou (7). Na okraji těchto útvarů jsou perithecia, plodnice lahvovitého tvaru, ve kterých dochází k pohlavní reprodukci - samčí anteridia splývají se samičím askogoniem, poté následuje karyogamie (splynutí jader). Nakonec je meiózou vytvořeno v každém vřecku 8 askospor ve tvaru jehliček, které jsou z perithecia vymrštěny (8), a jsou unášeny větrem k hostitelským rostlinám, čímž se cyklus opakuje (Taber, 1985; Tudzynski *et al.*, 1995; Tenberge, 1999).

2.2.3 Námelové alkaloidy

Claviceps purpurea je známá především díky své schopnosti syntetizovat námelové alkaloidy. Tyto námelové alkaloidy jsou produkty sekundárního metabolismu houby. Jejich užitek pro samotnou houbu však stále není jasný. Nejsou nutné pro její patogenezi, protože vznikají až ve sklerociích, což je závěrečné stadium infekce, které pouze zajišťuje přežití patogenu do dalšího roku přes zimní období. Alkaloidy však zřejmě přinášejí určité výhody hostitelské rostlině. Napadená rostlina je chráněna před hmyzem, a také je odolnější vůči suchu a horku (Bush *et al.*, 1997).

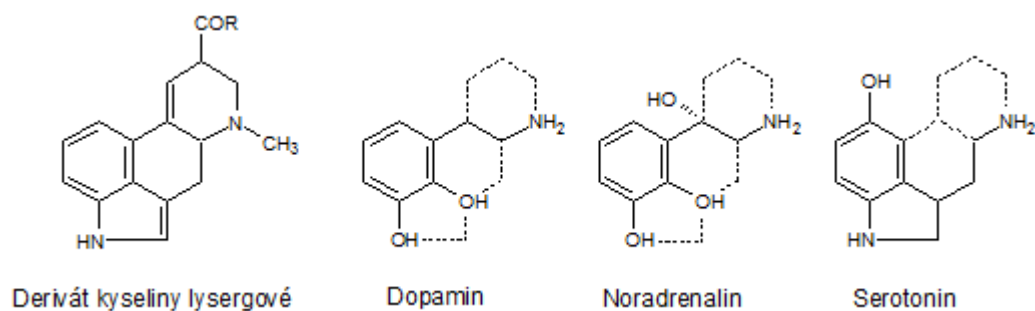
Po chemické stránce jsou námelové alkaloidy deriváty indolu. Základem struktury je ergolin, který je tvořen čtyřmi cykly (Obr. 3). Alkaloidy lze rozdělit na dvě hlavní skupiny. První skupinou jsou klaviny, které většinou nesou jednoduchou skupinu jako methyl- nebo hydroxymethyl- na osmém uhlíku. Druhou, početně větší skupinu, tvoří kyselina lysergová a její deriváty. Deriváty kyseliny lysergové jsou tvořeny adicí jednoduchého aminoalkoholu nebo krátkého peptidového řetězce na karboxylovou skupinu na osmém uhlíku ergolinového jádra (Keller, 1999). Adicí diethylamidu ke kyselině získáme LSD, což je známý halucinogen (Hoffman, 1972). Přírodní



Obr. 3 Struktura ergolinu, dvou zástupců klavinových alkaloidů a amidu kyseliny lysergové
deriváty ergolinu mají většinou v D kruhu dvojnou vazbu, a dusík v D kruhu je vždy methylovaný.

Působení těchto alkaloidů bylo patrné už ve středověku, ačkoli nebyla známá spojitost mezi nimi a houbou *C. purpurea*. Tyto alkaloidy způsobují nemoc zvanou ergotismus. Ta je zapříčiněna požitím např. chleba připraveného z mouky ze žita, které bylo kontaminováno sklerocii. Ergotismus má dvě formy. První formou je konvulsivní ergotismus (křečovitá forma), který se projevuje svalovými záškuby, paralýzou, křečemi, horečkou a halucinacemi. Druhou formou je gangrenózní ergotismus (sněživá forma), kdy se objevují střídavé pocity tepla a chladu, svalové bolesti a pálení končetin. Při vážnějším průběhu nastává nekróza, gangréna a může dojít až ke ztrátě končetin. Gangrenózní forma byla kvůli pálení v končetinách označována jako svatý oheň nebo také oheň sv. Antonína, podle řádu, který se zabýval léčením tohoto onemocnění. (Lee, 2009).

Kromě těchto negativních účinků na lidský organismus však byly známy i pozitivní účinky, a proto byl námel používán například porodními asistentkami. V malých dávkách způsobují alkaloidy kontrakce svalů dělohy a usnadňují porod, na druhou stranu vysoké dávky námele mohou způsobit potrat (Tudzynski *et al.*, 2001). Také se používaly ke snížení poporodního krvácení (Řeháček, 1984). Největším problémem v praxi bylo dávkování alkaloidů, protože jejich obsah a složení se v každém sklerociu



Obr. 4 Strukturní analogie kyseliny lysergové a neurotransmiterů dopaminu, noradrenalinu a serotoninu

liší, v závislosti na infikujícím kmenu houby, počasí, půdě a hostitelské rostlině (Taber, 1985). Většinou se obsah námelových alkaloidů ve sklerociích pohybuje v rozmezí od 0,01 až 0,2% w/v (Tudzynski *et al.*, 1995).

Struktura alkaloidů je podobná struktuře některých neurotransmiterů, jako je dopamin, serotonin a noradrenalin (Obr. 4), a umožňuje jim proto vazbu na receptory centrální nervové soustavy. Interakce s receptory může být jak agonistická tak antagonistická, a proto mají námelové alkaloidy široké spektrum účinků na periferní i centrální nervový systém. Jsou používány při onemocněních souvisejících s mozkem a nervovou soustavou jako je migréna, Parkinsonova či Alzheimerova choroba.

2.3 Fytohormony

2.3.1 Úvod

Fytohormony neboli rostlinné hormony jsou definovány jako nízkomolekulární organické látky přirozeně se vyskytující v rostlinách, schopné vyvolat odpověď organismu i při velmi nízkých koncentracích (10^{-6} až 10^{-9} mol·l⁻¹). Fytohormony jsou syntetizovány jen v některých částech rostliny, a proto musí být transportovány cévním pletivem nebo buněčným transportem z místa vzniku na místo určení. Ke každému hormonu existuje specifický receptor, díky němuž je hormon schopen vyvolat odpověď organismu. Receptory mohou být jak na povrchu, tak i uvnitř buněk. Po vazbě hormonu na receptor se v buňce spustí signální dráha, která má za důsledek příslušnou reakci organismu.

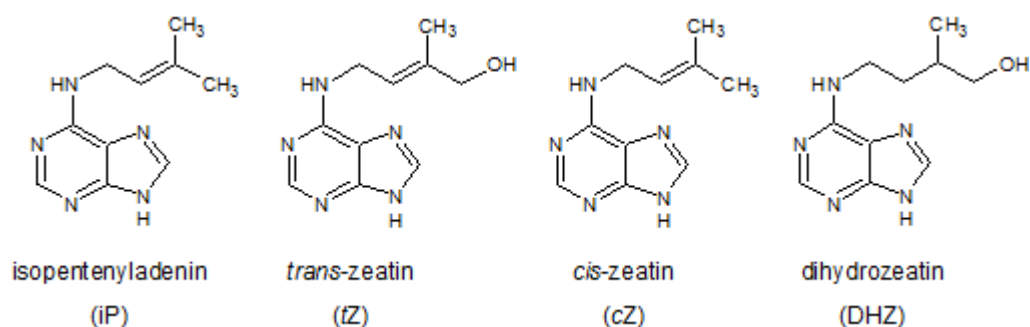
Existují i syntetické látky, které mají strukturu podobnou fytohormonům, váží se na buněčné receptory a jsou schopné vyvolávat reakci rostliny podobně jako fytohormony, ale nevyskytují se v rostlinách přirozeně. Pro tyto látky se nepoužívá označení „fytohormon“, ale nazývají se růstové regulátory rostlin.

Základní skupiny rostlinných hormonů jsou auxiny, cytokininy, gibereliny, ethylen, kyselina abscisová, polyaminy, brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová a strigolaktony.

2.3.2 Cytokininy

V roce 1955 byla objevena sloučenina, která podporuje cytokinezi neboli buněčné dělení. Tato látka dostala název kinetin (Miller *et al.*, 1955). Podle této jeho schopnosti dostala svůj název i celá skupina rostlinných hormonů - cytokininů. Cytokininy byly původně definovány jako látky, které podporují buněčné dělení a vykonávají další funkce regulace růstu stejným způsobem jako kinetin (Skoog and Armstrong, 1970). Prakticky jsou do této skupiny zahrnovány všechny sloučeniny s podobnou strukturou bez ohledu na jejich aktivitu. Po chemické stránce jsou cytokininy deriváty adeninu substituované v poloze N^6 , a také některé deriváty fenylnmočoviny, které taktéž vykazují cytokininovou aktivitu.

Přírodně se vyskytující cytokininy můžeme podle postranního řetězce v N^6 poloze rozdělit na isoprenoidní a aromatické. Obě skupiny se přirozeně v organismech vyskytují, isoprenoidní formy však častěji než aromatické. Základním isoprenoidním cytokininem je isopentenyladenin [iP; N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenin] (Obr 5). Ten může být na konci isoprenoidního řetězce hydroxylován, a to do polohy *cis* nebo *trans* (Obr. 5). Takto hydroxylovaný isopentenyladenin se nazývá zeatin, podle kukuřice (*Zea mays*), kde byl poprvé objeven (Letham, 1963). Původně se předpokládalo, že převládajícími formami cytokininů v rostlinách jsou isopentenyladenin a *trans*-zeatin (*tZ*), zatímco *cis*-zeatin (*cZ*) se vyskytuje jen v malých koncentracích a má jen malou nebo žádnou aktivitu (Schmitz and Skoog, 1972; Mok *et al.*, 1978). To, jaká forma zeatinu bude převládat, však záleží na rostlinném druhu, např. *cis*-zeatin je četnější

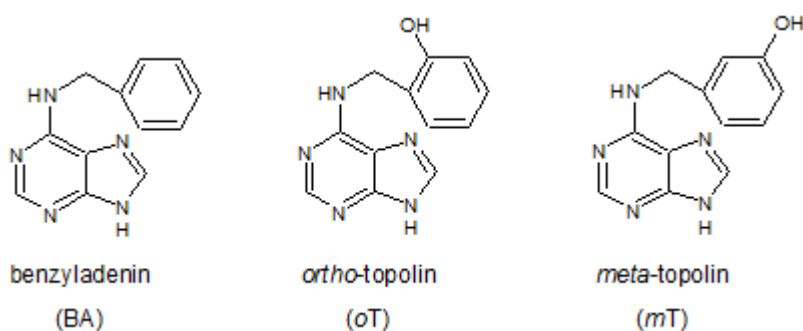


Obr. 5 Strukturální vzorce isoprenoidních cytokininů

v bramborách (Mauk and Langille, 1978; Suttle and Banowetz, 2000), rýži (Takagi *et al.*, 1985), kukuřici (Veach *et al.*, 2003) a v některých druzích luštěnin (Emery *et al.*, 1998, 2000; Quesnelle and Emery, 2007). Redukcí dvojné vazby na zeatinu vzniká dihydrozeatin [DHZ; N^6 -(4-hydroxy-3-methylbutyl)adenin] (Obr. 5). DHZ se vyskytuje především v zásobních orgánech, jako jsou semena v dormanci a apikální pupeny. Je rezistentní vůči degradaci cytokinindehydrogenasou (Galuszka *et al.*, 2007), takže může sloužit jako zdroj aktivních cytokininů při klíčení semene předtím, než rostlina začne s vlastní *de novo* biosyntézou. Mezi aromatické cytokininy patří benzyladenin (Obr. 6), navázáním hydroxylové skupiny na benzenové jádro vzniká *ortho*- nebo *meta*-topolin, z kterých přidáním methylové skupiny na hydroxylovou skupinu vzniknou jejich methoxyderiváty. Vysoký obsah aromatických cytokininů v rostlinách není příliš častý, vyskytuje se pouze u některých druhů (Strnad, 1997).

Cytokininy se mohou v rostlinách vyskytovat buď jako volné báze, nebo vázané jako nukleosidy, nukleotidy a glukosidy. Konjugace s glukosou může proběhnout přes N^3 , N^7 a N^9 adeninového cyklu nebo přes hydroxylovou skupinu postranního řetězce, na kterou může být navázána také xylosa. Na N^9 může být navázán L-alanin (Entsch *et al.*, 1983) a na C^2 methylthiolová skupina (Persson *et al.*, 1994; Pertry *et al.*, 2009).

Jak bylo řečeno výše, cytokininy podporují buněčné dělení. Mají však mnoho dalších funkcí, ve kterých kooperují i s dalšími hormony, jako jsou auxiny (Galuszka *et al.*, 2008; Pernisová *et al.*, 2009) a ethylen (Růžička *et al.*, 2007, 2009). Ve spolupráci s auxiny ovlivňují cytokininy hlavně rostlinnou morfogenezi (Skoog and Miller, 1957). Mezi jejich další funkce patří např. regulace apikální dominance a tvorby a růstu laterálních pupenů, stimulace vegetativního růstu, oddalování reprodukční fáze, zpomalení senescence, podpora proteosyntézy, transdukce nutričních signálů a zvyšování odolnosti rostlin vůči salinitě a vysokým teplotám (Mok and Mok, 2001; Barciszewski *et al.*, 2000).



Obr. 6 Strukturální vzorce aromatických cytokininů

Obsah endogenních cytokininů v rostlině se mění v závislosti na *de novo* biosyntéze, poměru exportu a importu, vzájemných přeměnách mezi jednotlivými formami cytokininů, dočasné inaktivaci konjugací a katabolických reakcích, které vedou k trvalé ztrátě cytokininové aktivity.

2.3.2.1 Biosyntéza cytokininů

Prvním a zároveň rychlost limitujícím krokem biosyntézy isoprenoidních cytokininů je navázání isoprenylové skupiny do polohu N^6 adeninu, který je ve formě nukleotidu (AMP, ADP nebo ATP) nebo vázaný k RNA. Donorem isoprenylové skupiny je buď dimethylallyldifosfát (DMAPP) nebo (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfát (HMBDP) (Krall *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 2005). Tuto reakci katalyzuje enzym isopentenyltransferasa (IPT). Rozlišujeme dva typy isopentenyltransferasy. Adenylátová IPT přenáší isopentenylovou skupinu na N^6 atom AMP (EC 2.5.1.27), ADP nebo ATP (EC 2.5.1.112) (Kakimoto, 2001), zatímco tRNA-IPT (EC 2.5.1.8) (Golovko, 2002) reaguje s adeninem, který je vázaný v RNA. U fytopatogenních bakterií (např. *Agrobacterium tumefaciens*), ale i u jiných organismů, např. u hlenky *Dictyostelium discoideum*, přenáší adenylátová IPT isopentenylovou skupinu z DMAPP na AMP za vzniku isopentenyladenosin-5'-monofosfátu (iPRMP). ATP, ADP ani cAMP jako akceptory isopentenylu neslouží (Taya *et al.*, 1978; Morris *et al.*, 1993). Naproti tomu u vyšších rostlin (např. *Arabidopsis thaliana*) IPT přenáší isopentenylovou skupinu z DMAPP na ATP nebo ADP za vzniku isopentenyladenosintrifosfátu resp. isopentenyladenosindifosfátu (Kakimoto, 2001).

V rostlinách jsou dvě dráhy, pomocí nichž jsou produkovány isoprenylové jednotky. První je mevalonátová dráha, která začíná kondenzací tří acetyl-CoA. Jejím produktem je isopentenylidifosfát, který může být isomerován na DMAPP. Tato dráha je lokalizována v cytosolu a mitochondriích. Druhou dráhou je methylethritolfosfátová dráha, jejímiž prekurzory jsou pyruvát a glyceraldehyd-3-fosfát. Meziproduktem této dráhy je HMBDP, který může být dále redukován na isopentenylidifosfát a v menší míře na DMAPP. Tato dráha probíhá v plastidech.

DMAPP i HMBDP slouží jako prekurzory cytokininů. Je-li donorem isoprenylové skupiny DMAPP, jako primární produkt vzniká iP nukleotid. Pokud je donorem HMBDP, vzniká *tZ*.

Cytokinininy *trans*-zeatinového typu mohou vznikat dvěma cestami, dráhou závislou na iP a dráhou nezávislou na iP. Dráha nezávislá na iP, kdy *tZ* vzniká přímým přenosem

hydroxylovaného řetězce HMBDP na adeninový kruh, byla popsána výše. Druhou možností je dráha závislá na iP, kdy je vzniklý isopentenyl nukleotid hydroxylován enzymem cytochrom P450 monooxygenasou (P450; EC 1.14.13.-) do *trans* polohy (Takei *et al.*, 2004). Zatím však nebyly objeveny dráhy s prekurzory, jejichž hydroxylová skupina by byla v *cis*-poloze, a proto je degradace tRNA obecně uznávána jako jediný zdroj *cis*-zeatinu.

2.3.2.2 Metabolismus cytokininů

Cytokinininy jsou *de novo* syntetizovány jako mono-, di- nebo trifosfáty s nízkou aktivitou; z tRNA jsou uvolňovány ve formě monofosfátů. V minulosti bylo předpokládáno, že vzájemné přeměny mezi nukleotidy, nukleosidy a volnými bázemi jsou katalyzovány enzymy adeninového metabolismu. Později však byl objeven enzym, který štěpí cytokininové nukleotidy na volné báze, protein s cytokinin-specifickou fosforibohydrolasovou aktivitou známý jako ‚Lonely guy‘ (LOG; Kurakawa *et al.*, 2007), což naznačuje, že i ostatní reakce mohou být katalyzovány enzymy specifickými pro cytokinininy, které však ještě nebyly identifikovány.

Degradace cytokininu probíhá štěpením na jeho N^6 postranním řetězci. Produkty této reakce jsou adenin a aldehyd odvozený od postranního řetězce (Brownlee *et al.*, 1975). Reakce je katalyzována enzymem cytokinindehydrogenasou (CKX; EC 1.5.99.12). Je to jediný známý enzym katalyzující ireversibilní inaktivaci cytokininů.

Hladina aktivních cytokininů v organismu je kontrolována dočasnou inaktivací cytokininů reversibilní glykosylací. Glykosylace může probíhat přes atom dusíku nebo kyslíku. *N*-glykosylace probíhá přes atomy N^7 nebo N^9 . Reakce je katalyzována *N*-glykosyltransferasou (EC 2.4.1.118). V některých případech může glykosylace proběhnout i přes atom N^3 . *N*-glukosidy jsou netečné k metabolickým přeměnám, a proto je *N*-glykosylace považována za prakticky ireversibilní deaktivaci (McGaw *et al.*, 1984, 1985). N^7 - a N^9 -glukosidy navíc nejsou štěpeny β -glukosidasou (EC 3.2.1.21), která štěpí *O*-glukosidy (Brzobohatý *et al.*, 1993). *O*-glykosylace probíhá u CK s hydroxylovou skupinou na postranním řetězci. Bylo charakterizováno mnoho glykosyltransferas s různou specifitou. Například enzymy kukuřice glykosylují pouze *cis*-zeatin (Martin *et al.*, 2001; Veach *et al.*, 2003), proto se označují jako *cis*-zeatin-*O*- β -D-glykosyltransferasy (EC 2.4.1.215). Další skupinou jsou *trans*-zeatin-*O*- β -D-glykosyltransferasy (EC 2.4.1.203), které jsou schopny vnášet na cytokinininy i xylosu (Martin *et al.*, 1999a, b). Enzymy *Arabidopsis* nerozlišují mezi isomery a glykosylují

cis i *trans* isomer se stejnou účinností (Hou *et al.*, 2004). *O*-glukosidy zeatinu jsou rezistentní vůči štěpení cytokinindehydrogenasou (Laloue and Pethe, 1982), a proto jsou považovány za zásobní formy, kdy mohou být β -glukosidasou uvolněny jako volné cytokininy (Brzobohatý *et al.*, 1993).

Kromě degradace tRNA může být dalším zdrojem *cis*-zeatinu enzym zeatin-*cis-trans*-isomerasa, který však ještě není zcela charakterizován (Bassil *et al.*, 1993). Nejasný je také vznik dihydrozeatinu, jehož zdrojem je enzym označený jako zeatinreduktasa (EC 1.3.1.69) (Martin *et al.*, 1989).

2.3.2.3 Percepce a transdukce cytokininového signálu

Aktivními formami cytokininů, které reagují s receptory a tím vyvolávají odpověď organismu, jsou volné báze. Cytokininový signál je rozpoznáván specifickými receptory histidin kinasami (HK), které jsou umístěny v membránách. U *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány kinasy CRE1/AHK4, AHK3 a AHK2 (Inoue *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001). Tyto receptory jsou umístěny převážně v membráně endopasmatického retikula (Caesar *et al.*, 2011; Wulfetange *et al.*, 2011).

Po navázání cytokininu na CHASE doménu receptoru (cyclases/histidine kinases-associated sensing extracellular) (Mougel and Zhulin, 2001) proběhne autofosforylace intracelulární transmitterové domény receptoru obsahující histidin, poté je fosfát přenesen na aspartát druhé intracelulární (přijímací) domény receptoru. Následně je v cytoplasmě fosforylován histidin fosfotransfer protein (HP) s funkcí fosfotransmiteru, který putuje do jádra, kde fosforylací aktivuje transkripční faktory. Tyto transkripční faktory známé jako regulátory odpovědi (response regulators, RR) jsou dvojího typu – A a B. Při fosforylaci RR typu B jsou aktivovány cílové geny, mezi něž patří RR typu A (To *et al.*, 2007), jež fungují jako negativní regulátory cytokininové signální dráhy inhibicí fosforylace RR typu B.

2.3.3 Fytohormony v houbách

Fytohormony nejsou syntetizovány pouze rostlinami, ale také některými bakteriemi a houbami, které s rostlinami interagují. Biologická aktivita hormonů pravděpodobně pomáhá patogenu reprogramovat hostitelské buňky ke svému vlastnímu prospěchu. Například *Agrobacterium tumefaciens* způsobuje tvorbu tumorů (tzv. „crown galls“) na rostlinách inkorporací Ti plasmidu do DNA rostlinné buňky. Tento plasmid obsahuje geny pro syntézu auxinů a CK, které jsou během infekce produkovány ve vysoké míře

(Jameson, 2000). Patogenní bakterie *Rhodococcus fascians* je také schopna ovlivnit vývoj rostliny produkcí CK (Petry *et al.*, 2009; Stes *et al.*, 2011). Rhizobakterie, které podporují růst rostlin, produkují auxiny, cytokininy a gibereliny, a tím ovlivňují růst kořenového systému rostlin (Saharan and Nehra, 2011). Nodulující rhizobakterie *Sinorhizobium meliloti* produkuje CK *in vitro* i *in vivo*, ale CK produkované bakterií samy o sobě nevyvolávají nodulaci kořene rostliny (Kisiala *et al.*, 2013).

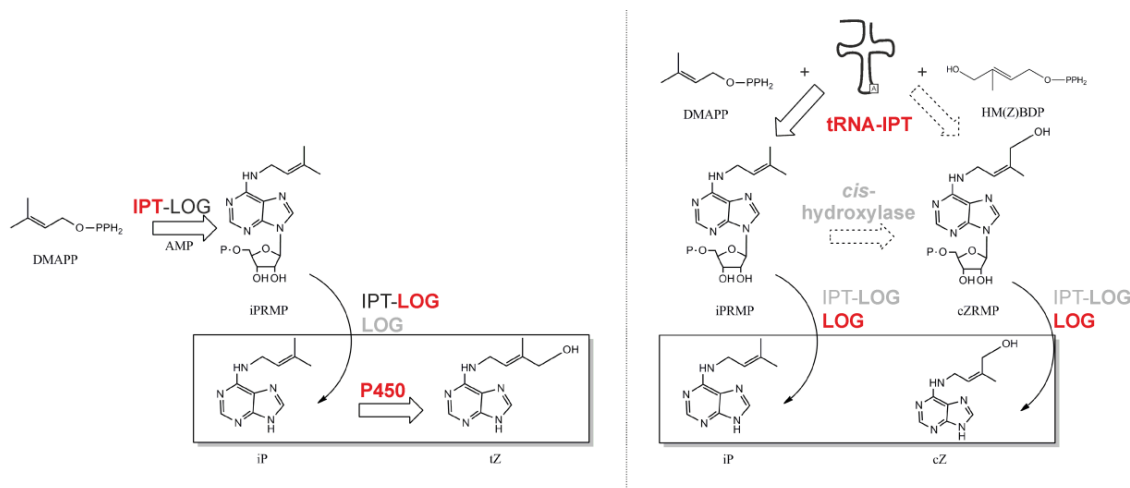
Produkce rostlinných hormonů houbami byla také již mnohokrát popsána. Cytokininy a auxiny jsou např. zapojeny při mykorrhizální symbióze (Barker and Tagu, 2000). Rostlinné hormony gibereliny (GA) byly poprvé objeveny v houbě. Biosyntetické dráhy produkce GA v houbě *Fusarium fujikuroi*, která způsobuje onemocnění rýže zvané „bakanae“, se však od rostlinných drah liší (Hedden *et al.*, 2001). Geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů u hub jsou často blízko sebe, v tzv. klastru. Stejně tak je tomu i v případě genů pro biosyntézu GA u *F. fujikuroi*. Tento klastr není nezbytný pro to, aby houba byla schopna počáteční kolonizace buněk kořene rýže. GA však přispívají ke schopnosti *F. fujikuroi* invazivně prorůst do pletiva rýže (Wiemann *et al.*, 2013).

Produkce isoprenoidních CK byla pozorována v axenických kulturách hemibiotrofních hub *Pyrenopeziza brassicae* a *Mangaporthe oryzae*; také u biotrofních hub *Cladosporium fulvum* a *Ustilago maydis*. *M. oryzae* a *U. maydis* produkují kromě CK i kyselinu abscisovou a auxiny (Bruce *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013; Murphy *et al.*, 1997). Až do nedávné doby však nebyly u hub popsány žádné biosyntetické dráhy CK ani příslušné geny.

2.3.4 Fytohormony v houbě *Claviceps purpurea*

Claviceps purpurea je schopna produkce auxinů a cytokininů. Biosyntetické dráhy, jimiž houba tvoří auxiny, zatím nebyly popsány. Dráhy pro biosyntézu CK však nedávno popsány byly.

Při zkoumání rostlin žita napadených *C. purpurea* bylo zjištěno, že hladiny cytokininů jsou rozdílné u napadené a nenapadené rostliny. V průběhu infekce se výrazně lišilo množství CK, i jejich převládající formy. Nebyla však zjištěna žádná výrazná změna exprese rostlinných genů zapojených do biosyntézy CK, přestože rostlina vnímala cytokininový signál, a to hlavně v počáteční fázi infekce (Hinsch *et al.*, 2015).



Obr. 7 Dráhy biosyntézy cytokininů a příslušné enzymy v houbě *C. purpurea*; IPT-LOG – isopentenyltransferasa-lonely guy, P450 – cytochrom P450 monooxygenasa, tRNA-IPT – tRNA isopentenyltransferasa, LOG – lonely guy; DMAPP – dimethylallyldifosfát, HM(Z)BDP – (Z)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfát; iPRMP – isopentenyladeninmonofosfát, cZMP – cis-zeatinribosidmonofosfát, iP – isopentenyladenin, tZ – trans-zeatin, cZ – cis-zeatin (Hinch *et al.*, 2015)

Při pěstování *C. purpurea* v tekutém mediu bylo zjištěno, že houba je schopna produkce cytokininů. V myceliích bylo detekováno množství iP, cZ, tZ a jejich derivátů. Hormony byly detekovány i v mediích, kam je houba vylučovala. V nutričně bohatém BII mediu houba produkovala větší množství iP-derivátů, obzvláště jeho ribosidu. Naproti tomu v Mantle mediu, které vyvolává sporulaci, byla pozorována zvýšená tvorba cZ. DHZ byl tvořen jen málo (Hinsch *et al.*, 2015).

Byly popsány tři geny kódující enzymy, které se účastní biosyntézy CK v *C. purpurea*. Dva z nich jsou obdobné enzymům známým u rostlin. Enzym cytochrom P450 monooxygenasa, který je kódován genem *cpp450*, katalyzuje přenos hydroxylové skupiny na iP za tvorby trans-zeatinu. Gen *cplog* kóduje enzym s fosforibohydrolasovou aktivitou zvaný ‚Lonely guy‘, který katalyzuje uvolnění volné báze z nukleotidu za vzniku aktivního hormonu. Zvláštností je bifunkční enzym CpIPT-LOG, který je kódován genem *cpiptlog*. Tento gen byl prokázán pouze u čeledi *Clavicipitaceae* a *Nectriaceae* (*Fusarium*). Enzym CpIPT-LOG má dvě domény, z nichž každá katalyzuje samostatnou reakci. Doména IPT přenáší isoprenylovou jednotku z DMAPP na AMP za vzniku iPR5MP. LOG doména následně uvolní z nukleotidu aktivní volnou bázi. Gen *cpipt-log* tvoří společně s *cpp450* malý klastř (Hinsch *et al.*, 2015). Dráhy biosyntézy a enzymy, které je katalyzují, jsou znázorněny na Obr. 7.

U *Arabidopsis thaliana* bylo prokázáno, že většina *cZ* vzniká všudypřítomnou dráhou vzniku CK z tRNA, která je katalyzovaná enzymem tRNA-IPT, a také tato dráha přispívá k tvorbě iP (Miyawaki *et al.*, 2006). I v houbě je kódován enzym tRNA-IPT, který přispívá k produkci CK, protože v mutantovi Δ cipt-log byla produkce CK typu iP jen trochu slabší než v nemutované formě. Enzym tRNA-IPT v houbě s nejvyšší pravděpodobností katalyzuje přenos isoprenylové skupiny z DMAPP resp. HMBDP na adenin v tRNA za vzniku iPRMP resp. *cZRMP*. Nukleotidy jsou pak převedeny na volné báze LOG doménou enzymu CpIPT-LOG nebo CpLOG (Hinsch *et al.*, 2015).

Geny *cipt-log* ani *cpp450* nejsou nezbytné pro virulenci *C. purpurea*, protože oba mutantí (Δ cipt-log a Δ cpp450) byli schopni úspěšné infekce rostliny – byla pozorována tvorba medovice i formování sklerocia. Mutant Δ cpp450 však vykazoval hypersporulující fenotyp, kdy houba produkovala enormní množství konidiospor; *trans*-zeatin, jež je produktem *cpp450* genu, se tudíž jeví jako negativní regulátor sporulace (Hinsch *et al.*, 2015).

2.3.5 Analýza cytokininů

Rostlinné hormony se vykytují v živých organismech ve velmi malých koncentracích, většinou v $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty, zatímco látky, které mohou při jejich analýze interferovat, jsou v biologickém materiálu obsaženy v mnohem větších koncentracích. Aby bylo možno fytohormony zkoumat, musí být dobře vyvinuty analytické postupy zahrnující extrakci, purifikaci, identifikaci a kvantifikaci jednotlivých hormonů.

Prvním krokem při analýze cytokininů v biologickém materiálu je homogenizace vzorku a rozbití buněčných stěn (Harrison, 2011), a tím převedení CK do extrakčního roztoku. Nejvyšší účinnosti extrakce bylo dosaženo použitím modifikovaného Bielského pufru ve složení methanol/voda/kyselina mravenčí v poměru 15/4/1, v/v/v (Hoyerová *et al.*, 2006). Dále je roztok s extrahovanými látkami přečišťován, aby bylo odstraněno co nejvíce interferujících látek se současným zachováním co nejvyšší koncentrace CK. Prvním krokem purifikace je nejčastěji extrakce na pevné fázi (solid-phase extraction, SPE), kdy dojde k zachycení CK a dalších látek podobné povahy na pevné fázi pomocí hydrofobních, polárních či iontových interakcí, vymytí interferujících látek a následné eluci CK roztokem, který naruší vazby vytvořené mezi hormonem a sorbentem SPE kolonky (Tarkovská *et al.*, 2014). Dalším možným krokem purifikace CK je imunoafinitní čištění založené na interakci protilátka-antigen. Tento krok výrazně zvyšuje limity detekce, protože umožňuje zakoncentrování vzorku

CK se současnou minimalizací výskytu interferujících látek. Protože CK silně absorbují UV světlo, může být k jejich detekci použita UV spektrofotometrie. Při imunoafinitním čištění je výskyt látek interferujících absorpcí v UV oblasti minimální.

2.3.5.1 Plynová chromatografie

První metodou, která se pro analýzu CK začala používat, byla plynová chromatografie. Nevýhodou této metody bylo to, že CK nejsou těkavé (Horgan and Scott, 1987), a proto se musel vzorek před analýzou derivatizovat, aby se zvýšila těkavost CK a také zlepšila jejich teplotní stabilita. Přestože derivatizace s sebou nesla určité problémy, byla GC s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) spolehlivou metodou pro separaci a kvantifikaci CK.

2.3.5.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je pro analýzu CK velice výhodná, protože jednotlivé CK mají rozdílnou polaritu, a proto mohou být na koloně separovány. Volné báze CK a jejich ribosidy jsou poměrně hydrofobní, proto jejich separace probíhá na kolonách s reversní fází (RP) v kyselém prostředí (Horgan and Scott, 1987). Nukleotidy cytokininů jsou obvykle nejprve převedeny na ribosidy ošetřením alkalickou fosfátasou (Nordström *et al.*, 2004) nebo derivatizací (Takei *et al.*, 2003), aby se snížila jejich polarita, a až poté jsou aplikovány na kolonu s reversní fází. V současné době se při HPLC nejčastěji používají C₁₈ kolony s reversní fází nebo C₈ kolony, které jsou promývány vodným methanolem nebo acetonitrilem s přísadkou octové nebo mravenčí kyseliny a jejich amonných solí (Ge *et al.*, 2005; Van Rhijn *et al.*, 2001). Pro lepší separaci se používá eluční gradient se vzrůstajícím podílem organické fáze (Fernandez *et al.*, 1995; Ge *et al.*, 2005; Van Rhijn *et al.*, 2001).

Nejpoužívanějšími detektory pro HPLC jsou UV-VIS, a proto se používají i ke kvantifikaci CK. Tato metoda je však poměrně nespecifická, proto musí být dosaženo vyššího stupně přečištění CK, např. pomocí výše zmíněné imunoafinitní purifikace (Nicander *et al.*, 1993).

Další možností detekce je spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) (Imbault *et al.*, 1993). Obě metody jsou neustále zlepšovány, takže může být dosahováno stále nižších detekčních limitů. Mezi ionizační techniky používané v kombinaci s RP-HPLC patří termosprej (TS) (Prinsen *et al.*, 1995a), ionizace rychlými atomy a ionty (FAB, fast atom bombardment) (Astot *et al.*, 1998), chemická

ionizace za atmosférického tlaku (APCI) (Yang *et al.*, 1993) a ionizace elektrosprejem (ESI) (Prinsen *et al.*, 1995b).

Ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC) pracuje s menšími částicemi (< 2 μm) a při vyšších tlacích než HPLC, a tím umožňuje dosažení vyššího rozlišení a rychlejší separace CK (Novák *et al.*, 2008).

2.3.5.3 Kapilární elektroforesa

Kapilární elektroforesa (CE) je vhodnou metodou pro analýzu cytokininů díky své rychlosti, vysokému rozlišení a jednoduchosti se současně zachovanou citlivostí (Ge *et al.*, 2006a; Pacáková *et al.*, 1997). Pro analýzu CK se používají dva typy kapilární elektroforesy. Prvním typem je kapilární zónová elektroforesa (CZE). CZE je vhodná i pro přímou separaci nabitých cytokininových nukleotidů (Ge *et al.*, 2006b), což je výhodné v porovnání s HPLC, kdy jsou nukleotidy před nanesením na kolonu štěpeny alkalickou fosfatasou. Druhým typem je micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Při MEKC se k roztoku přidávají povrchově aktivní látky a tvoří se micely, které jsou potom separovány. Pro detekci a kvantifikaci CK se při CE používá nejčastěji UV detektor, protože je standardním detektorem mnoha CE přístrojů. Další možností je detekce pomocí ESI-MS. V tomto případě musí být k separaci použit těkavý elektrolyt, protože při použití netěkavých pufrů se výrazně snižuje účinnost elektrospreje (Ge *et al.*, 2006b).

2.3.5.4 Imunologické metody

Mezi imunologické metody vhodné pro analýzu CK patří radioimunoanalýza (RIA) a ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). RIA je velmi citlivá metoda, kterou lze detekovat molekuly v nanomolárním nebo pikomolárním měřítku a poskytuje informace o biochemických procesech v systému ligand-receptor (Grayling and Hanke, 1992; Cook *et al.*, 2001). Během RIA však interferují s protilátkou i jiné látky, a proto musí být tyto látky před analýzou odstraněny (Cook *et al.*, 2001). ELISA je v porovnání s RIA levnější a jednodušší. Pro detekci CK byly vypracovány metody s avidin-biotin systémem, imunoafinitní purifikace a imunocytochemické techniky (Maldiney *et al.*, 1986; Székács *et al.*, 2000). Metodou ELISA je možné detekovat CK v femtomolárních množstvích.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Biologický materiál

Claviceps purpurea kmen 20.1 (prof. Tudzynski; Univerzita v Muenstru, Německo)

3.2 Chemikálie

Dihydrogenfosforečnan draselný: AppliChem, Německo

Dihydrozeatin: OlChemIm, Česká republika

Dimethylsulfoxid: Duchefa, Holandsko

Dusičnan vápenatý tetrahydrát: Penta, Česká republika

Ethanol: Lach-Ner, Česká republika

Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát: Lachema, Česká republika

Hydroxid amonný: Penta, Česká republika

Hydroxid draselný: Lach-Ner, Česká republika

Hydroxid sodný: Penta, Česká republika

Chlorid draselný: Lach-Ner, Česká republika

Chlorid sodný: Lach-Ner, Česká republika

Imunoafinitní kolonky se specificitou k isoprenoidním CK: OlChemIm, Česká republika

Isopentenyldenin: OlChemIm, Česká republika

Isopentenyldenoin: OlChemIm, Česká republika

Kvasinkový extrakt: Sigma-Aldrich, USA

Kyselina dusičná: Lachema, Česká republika

Kyselina mravenčí: Sigma-Aldrich, USA

L-aspargin monohydrát: Sigma-Aldrich, USA

L-cystein hydrochlorid: Lachema, Česká republika

Methanol HPLC grade: Fluka, Německo

Oasis MCX Extraction Cartridges: Waters, USA

Pepton: Sigma-Aldrich, USA

Preimunní kolonky: OlChemIm, Česká republika

RNase-free voda: Qiagen, USA

Sacharosa: Lach-Ner, Česká republika

Síran hořečnatý heptahydrát: Penta, Česká republika

Síran zinečnatý monohydrát: Sigma-Aldrich, USA

Spe-ed SPE Cartridges, Octadecyl C18/18%: Applied Separations, USA

Zeatin(cis): OlChemIm, Česká republika

Zeatin(trans): OlChemIm, Česká republika

3.3 Enzymy, příslušné pufrы a komponenty pro molekulární biologii

Alkalická fosfatasa FastAP: Thermo Scientific, USA

10× reakční pufr pro FastAP: Thermo Scientific, USA

DNasa Turbo: Ambion, USA

10× reakční pufr pro Dnasu Turbo: Ambion, USA

RevertAid H Minus reverzní transkriptasa: Thermo Scientific, USA

5× reakční pufr pro reverzní transkriptasu: (Thermo Scientific, USA

dNTP mix 10 mmol·l⁻¹: (Fermentas, Litva)

Oligo(dT) primer: Sigma-Aldrich, USA

Taqman Universal Master Mix PCR: Thermo Scientific, USA

Primery a Taq-man sondy byly syntetizovány v Elisabeth Pharmacon spol. s.r.o. a jejich sekvence jsou následující:

CpCYT450_TAQ_fw	5'-GCGCAATACAGAGATGAGAGGTT
CpCYT450_TAQ_rev	5'-GCACATATATCGAGCTATCCTTGATC
CpCYT450_TAQ_probe	5'-CCCGAGCGATGGACCACGAGAC
CpIPTLOG_TAQ_fw	5'-ATGGCGGGCGAGTTCTG
CpIPTLOG_TAQ_rev	5'-CCACCAAAGACGCAAACCA
CpIPTLOG_TAQ_probe	5'-AGGCACGCGCTTGGATTTTTCCC
CpIPT LOG1exon fw	5'-TACAAACCCGGAGGCATCA
CpIPT LOG1exon rev	5'-TGGCACGTCGTCTGTTTCC
CpIPT LOG1exon probe	5'-ACGGCGAGACCCCTCCCCG
CpIPT LOG2-3exon fw	5'-TGGTTGCGTGTCTTGACCGA
CpIPT LOG2-3exon rev	5'-AAAACATCACGAAGATTACATACGTACA
CpIPT LOG2-3exon probe	5'-ATCACGGTCATGTGCTAA

CpIPT LOG3exon fw	5'-GAGTGATGATGTTGTTGTTGTGAAAGGT
CpIPT LOG3exon rev	5'-AAACGTCACAGTGGCCAACTAA
CpIPT LOG3exon probe	5'-TTGGTTACGTTAATATCCTGCCGTTCTGGG
CpLOG_TAQ_fw	5'-CAGAACGGTCTGCTCCATCA
CpLOG_TAQ_rev	5'-CGAGAGCTTCCGGGATGA
CpLOG_TAQ_probe	5'-CGGCCCCGAATCCGTGCA
CptRNA IPT fw	5'-TCTCGCATCGGCACTTGAG
CptRNA IPT rev	5'-GCATATCTCGCATGTCCTTTTG
CptRNA IPT probe	5'-CCGCCCCAAGCGACCCATG
CpADA fw	5'-CTGCACAATCAACTCGGACAA
CpADA rev	5'-CCTGCCGATCATAACTTGATAGAA
CpADA probe	5'-TGCCTTTTACCGCTCGACGCTCTC
CpAUX_TAQ_fw	5'-GCGAACCTAAATGTTATGCTCTTCA
CpAUX_TAQ_rev	5'-GCTTTTCGGCGTTGAGTTGT
CpAUX_TAQ_probe	5'-ATGCCTCATTTTCACCAAGCTCGCC
>g actin TAQ fw	5'-CGACAATGGTTCGGGTATGTG
>g actin TAQ rev	5'-TGACCCATGCCGATCATG
>g actin TAQ probe	5'-CCAGAGCCGTTTTCCCCTCTATCGTC
>gpd-1 TAQ fw	5'-CCCCGAGATTGAGGTCGTT
>gpd-1 TAQ rev	5'-CGCCGTGGGAAGAGTCATAC
>gpd-1 TAQ probe	5'-ACCCCGAATATGCTGCCTACATGCTCA

3.4 Použité kity

RNAqueous Total RNA Isolation Kit (Ambion, USA)

3.5 Přístroje

Analytické váhy: Nahita, Španělsko

Autokláv: BMT Medical Technology, Česká republika

Centrifuga Rotanta: Hettich, Německo
Centrifuga Scanspeed: LaboGene, Dánsko
Flowbox: Merci, Česká republika
Lyofilizátor: LaboGene ApS, Dánsko
Mlýn kulový vibrační: Retsch, Německo
Pipetovací robotická stanice Bravo: Agilent, USA
Speedvac: Thermo Electron Corporation, USA
Ultrazvuk Elmasinic P: Elma Schmidbauer GmbH, Německo
UPLC systém NEXERA: Shimadzu, Japonsko
UV/VIS Spektrofotometr: Agilent, USA
Velkokapacitní třepačka: Kühner, Švýcarsko
VIA7 Real-Time PCR Systém: Applied Biosystems, USA
Visiprep SPE Vacuum Manifold: Sigma-Aldrich, USA
Vortex Combi-spin: Biosan, Litva
ZORBAX RRHD Eclipse Plus 1,8 μm , 2,1 x 50 mm: Agilent, USA

3.6 Roztoky

BII medium

5 g sacharosy, 5 g peptonu, 5 g L-asparginu, 1 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g síranu hořečnatého heptahydrátu, doplněno destilovanou vodou do 1 l, upraveno na pH 5,2 hydroxidem draselným, autoklávováno

Mantle medium

5 g sacharosy, 10 g L-asparginu, 1,44 g dusičnanu vápenatého tetrahydrátu, 0,25 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,25 g síranu hořečnatého heptahydrátu, 0,125 g chloridu draselného, 0,027 g síranu zinečnatého heptahydrátu, 0,01 g L-cysteinu, 0,1 g kvasničného extraktu, doplněno destilovanou vodou do 1 l, upraveno na pH 5,2 hydroxidem draselným, autoklávováno

Modifikovaný Bielskeho pufr

Methanol, destilovaná voda a kyselina mravenčí, smícháno v poměru 15:4:1.

PBS pufr

8,01 g chloridu sodného, 0,2 g chloridu draselného, 1,78 g hydrngenfosforečnanu sodného dihydrátu, 0,27 g dihydrogenfosforečnanu draselného, doplněno destilovanou

vodou na 1 l, pH upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové popř. hydroxidu sodného na 7,4.

3.7 Postupy

3.7.1 Kultivace houby pro izolaci cytokininů

Medium (BII resp. Mantle) bylo rozlito po 50 ml do Erlenmeyerových baněk o objemu 250 ml, baňky s mediem byly autoklávovány. Media byla inokulována v laminárním boxu kousky *C. purpurea* pěstované na agarové plotně. Do Mantle media byly přidány cytokininy (*tZ*, *cZ*, *DHZ* a *iP*) tak, aby jejich koncentrace v mediu byla $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, jako kontrola byl přidán stejný objem dimethylsulfoxidu (DMSO). Kultivace probíhala na velkokapacitní třepačce (Kühner) při teplotě $26 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 14 dní, během nichž byly odebírány vzorky mycelií (po 3 a 14 dnech) a vzorky medií (po 1, 3, 7 a 14 dnech). Odebrané vzorky byly lyofilizovány.

3.7.2 Analýza cytokininů

Pro analýzu CK byl převzat protokol vyvinutý v Laboratoři růstových regulátorů (Univerzita Palackého v Olomouci). Pro analýzu bylo použito 50 mg DW mycelií, z medií bylo odebráno po 5 ml a lyofilizováno. Vzorky byly homogenizovány s 1 ml modifikovaného Bielskeho pufru v kuličkovém mlýnku při 27 Hz po dobu 3 min a poté 5 min sonifikovány. Dále byly 30 min protřepávány při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a centrifugovány 15 min ($14\,000 \text{ rpm}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Sediment byl znovu extrahován 1 ml modifikovaného Bielskeho pufru, 30 min protřepáván při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a centrifugován 15 min ($14\,000 \text{ rpm}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Oba podíly čistého supernatantu byly aplikovány na aktivované Speed SPE Octadecyl C18 kolonky (Applied Separation) pro zachycení nepolárních látek. Kolonky byly aktivovány 1 ml methanolu a 2 ml modifikovaného Bielskeho pufru. Po projití kolonkou byly vzorky zahuštěny na objem cca $750 \mu\text{l}$ a poté smíseny s 2 ml kyseliny mravenčí o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Bazické látky spolu s CK byly poté zachyceny na aktivovaných Oasis MCX kolonkách (Waters). MCX kolonky byly aktivovány 2 ml methanolu, 2 ml destilované vody, 2 ml 50% kyseliny dusičné, 2 ml destilované vody a 1 ml kyseliny mravenčí o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Bazické látky byly následně vyeluovány 1 ml $0,35 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydroxidu amonného a 2 ml $0,35 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydroxidu amonného v 60% methanolu.

Eluáty byly vysušeny a poté rozpuštěny v $50 \mu\text{l}$ 70% ethanolu, smíchány s $450 \mu\text{l}$ PBS a přečištěny prokapáním přes preimmunní kolonky. Vzorky byly dále naneseny na

imunoafinitní kolony se specificitou k isoprenoidním CK (OIChemIm, Česká republika), zachycené CK byly eluovány 3 ml 100% methanolu a vysušeny. Odparek byl rozpuštěn v 10% methanolu a separován chromatografií na reverzních fázích na C₁₈ koloně (ZORBAX RRHD Eclipse Plus 1,8 μm, 2,1 x 50 mm, Agilent) spojené s ultra účinnou kapalinovou chromatografií (Shimadzu Nexera). Kolona byla promývána lineárním gradientem mravenčanu amonného o koncentraci 15 mmol·l⁻¹, pH 4,5, a methanolem: 0 min, 5% methanol; 2 až 28 min, 50% methanol; průtok 0,40 ml·min⁻¹, teplota kolony 40 °C. Píky byly porovnány se standardy (OIChemIm) a koncentrace byla odečtena z plochy píků za použití LabSolution softwaru (Shimadzu).

Frakce, které se nezachytily na imunoafinitních kolonkách byly odpařeny na vakuové odparce, rozpuštěny ve 200 μl vody a inkubovány s přidavkem 20 μl 10× FastAP pufru a 10 μl FastAP (Thermo Scientific) při 37 °C po dobu 1 hod. Po inkubaci byly přečištěny přes imunoafinitní kolony a aplikovány na UPLC.

3.7.3 Kultivace houby pro izolaci RNA

Mantle medium bylo rozlito po 50 ml do Erlenmeyerových baněk o objemu 250 ml, baňky s mediem byly autoklávovány. Media byla inokulována v laminárním boxu kousky *C. purpurea* pěstované na agarové plotně. Kultivace probíhala na velkokapacitní třepačce (Kühner) při teplotě 26 °C po dobu 5 dní. Poté byly do media přidány cytokininy (*tZ*, *cZ* a *iP*); jejich výsledná koncentrace v mediu byla 10 μmol·l⁻¹ resp. 100 nmol·l⁻¹. Jako kontrola byl přidán stejný objem dimethylsulfoxidu. Vzorky mycelií byly odebírány po 1, 3, 24 a 72 hodinách. Odebrané vzorky byly lyofilizovány.

3.7.4 Příprava cDNA

3.7.4.1 Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena pomocí RNAqueous Total RNA Isolation kitu (Ambion, USA). K nadrcenému vzorku lyofilizovaného mycelia byl přidán 1 ml lyzačního pufru, vzorek byl po 10 min inkubaci centrifugován 2 min (14 000 × g, 4 °C). K čistému supernatantu bylo přidáno stejné množství 64% ethanolu a promícháno; směs byla zfiltrována. RNA, která se zachytila na filtru, byla promyta a následně eluována dvěma podíly elučního roztoku (60 a 34 μl) vytemperovaného na teplotu 80 °C.

K eluátu bylo přidáno 10 μl 10 \times Turbo DNAsového pufru a 2 μl Turbo DNasy, směs byla inkubována při 37 °C 40 min; poté byl přidán 1 μl enzymu a inkubace probíhala dalších 30 min. Reakce byla inaktivována při teplotě 60 °C po dobu 10 min.

Ke vzorku RNA byl přidán poloviční objem roztoku chloridu lithného o koncentraci 7,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; směs byla inkubována 1 hod při teplotě - 20 °C a poté centrifugována (14 000 \times g, laboratorní teplota). Pelet byl promyt 70% ethanolem, vysušen a rozpuštěn v 20 μl elučního pufru.

3.7.4.2 Reverzní transkripce

K 5 μl izolované RNA byl přidán 1 μl Oligo(dT) primeru, směs byla doplněna na objem 13 μl RNase-free vodou a inkubována 5 min při teplotě 65 °C. Po inkubaci byla okamžitě umístěna do ledu. Dále byly přidány 4 μl 5 \times reakčního pufru, 2 μl 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dNTP mixu, 1 μl RevertAid H Minus reverzní transkriptasy; směs byla inkubována 60 min při teplotě 42 °C. Reakce byla ukončena při 70 °C po dobu 10 min.

3.7.4.3 qPCR

K 20 μl připravené cDNA bylo přidáno 40 μl elučního pufru. Dále byla připravena směs primerů a próby pro všechny jednotlivé geny – do 200 μl RNase-free vody byly přidány 2 μl próby, 2,4 μl rev primeru a 2,4 μl fw primeru tak, aby finální koncentrace každého oligonukleotidu byla 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Na PCR bylo použito 1,25 μl zředěného templátu cDNA; k tomu bylo přidáno 2,5 μl PCR mixu (Taqman Universal PCR Master Mix), 1,25 μl směsi próby s primery. Pomocí pipetovací robotické stanice Bravo byly rozpipetovány jednotlivé komponenty do 384-jamkové destičky (celkový objem reakce 5 μl) ve dvou technických replikátech. qPCR reakce proběhla na PCR systému VIIA7 ve standardně nastaveném programu (2' - 50 °C; 8' - 95 °C, 40 cyklů - 30'' - 95 °C a 1' - 60 °C) a výsledné Ct hodnoty byly vyhodnoceny pomocí softwaru DataAssist (Applied Biosystems, USA).

4 VÝSLEDKY

Ke sledování metabolismu cytokininů v *C. purpurea* byly k houbě pěstované v Mantle mediu přidány cytokininy *trans*-zeatin, *cis*-zeatin, dihydrozeatin a isopentenyladenin tak, aby výsledná koncentrace hormonu v mediu byla $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako kontrola byl do Mantle media přidán stejný objem DMSO. Pro porovnání produkce CK v různých mediích byla houba pěstována i v mediu BII se stejným přídatkem DMSO. Byl sledován obsah hormonů v myceliu houby, a také jejich vylučování do media.

Aby bylo možné sledovat dynamiku produkce CK během růstu houby, byly vzorky odebírány v různých časových intervalech; každý vzorek byl analyzován ve dvou replikátech (kromě třídenního mycelia, mycelium nebylo dostatečně rozrostlé, a proto bylo vzorku málo). Vzorky media byly odebírány po 1, 3, 7 a 14 dnech; k analýze bylo odebráno 5 ml media a lyofilizováno. Vzorky mycelia byly odebírány po 3 a 14 dnech, lyofilizovány a k analýze bylo použito 50 mg suchého vzorku.

Výsledky analýzy jsou uvedeny v tabulkách. Tab. 1 uvádí průměrnou koncentraci CK ze dvou biologických replikátů mycelií v $\text{pmol}\cdot\text{g dry weight}^{-1}$ a jejich směrodatnou odchylku. Tab. 2 uvádí koncentrace CK v mediích v $\text{pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ve sloupcích jsou uvedeny jednotlivé cytokininy a jejich ribosidy.

Z obsahu CK ve vzorcích z kontrolních medií BII a Mantle bez přídatku hormonů je vidět, že houba je skutečně sama o sobě schopna produkce CK. Obsah CK v myceliu v čase klesá, zatímco v mediu stoupá, to znamená, že hormony, které houba produkuje, vylučuje v různé míře do media. V případě houby pěstované v mediu s přídatkem CK je obsah tohoto cytokininu v myceliu oproti kontrole značně zvýšený, což značí, že houba cytokinin přijímá (zda aktivně nebo pasivně nelze posoudit) a případně jej metabolizuje na jiné formy CK. V čase se však obsah CK v myceliu snižuje, houba ho zpětně vylučuje do media. V mediu s přídatkem hormonu je také obsah přidaného CK podle očekávání vysoký. Jeho koncentrace v mediu však v následujících dnech stoupá, a to v řádu stovek pmol na 1 ml. To by znamenalo, že exogenní aplikace CK do media vyvolá v houbě reakci, jejímž výsledkem je zvýšení produkce CK houbou a vylučování prakticky veškerého takto vytvořeného CK do media.

Tab. 1 Koncentrace CK v myceliích v pmol·g dry weight⁻¹; ± směrodatná odchylka ze dvou biologických replikátů (Mantle-3, *tZ*-3, *cZ*-3, DHZ-3 a iP-3 – pouze jeden replikát)

BII resp. Mantle – mycelium z media BII resp. Mantle s přidavkem DMSO; *tZ*, *cZ*, DHZ a iP – mycelium z Mantle media s přidavkem CK o výsledné koncentraci 10 μmol·l⁻¹; číslo značí den odběru vzorku

tZ – *trans*-zeatin, *tZR* – *trans*-zeatinribosid, *cZ* – *cis*-zeatin, *cZR* – *cis*-zeatinribosid, DHZ – dihydrozeatin, DHZR – dihydrozeatinribosid, iP – isopentenyladenin, iPR - isopentenyladenosin

Mycelium	Cytokininy															
	<i>tZ</i>		<i>tZR</i>		<i>cZ</i>		<i>cZR</i>		DHZ		DHZR		iP		iPR	
BII-3	0,89	0,08	0,11	0,05	0,11	0,07	1,75	0,14	0	0	0	0	0,85	0,82	0,33	0,06
BII-14	0,55	0	0	0	0,52	0,03	0	0	0,06	0,06	0	0	0,10	0,05	0	0
Mantle-3	0,04		0,10		0,06		1,39		0		0		0		0,05	
Mantle-14	0,13	0,01	0	0	0,31	0,02	0,01	0,01	0	0	0	0	0,05	0,03	0	0
<i>tZ</i> -3	34,26		39,35		0,17		0,62		0,03		0		0		0,04	
<i>tZ</i> -14	46,51	0,16	0,06	0,05	0,31	0,01	0,01	0,01	0,12	0,01	0	0	0	0	0	0
<i>cZ</i> -3	0,33		0,36		25,86		30,51		0		0		0		0,06	
<i>cZ</i> -14	0,28	0,02	0	0	44,26	4,59	0,07	0,02	0	0	0	0	0,04	0,04	0	0
DHZ-3	0,16		0,09		0		0		28,41		13,81		0,27		0,04	
DHZ-14	0,09	0,01	0	0	0	0	0	0	36,86	5,10	0,04	0,02	0,04	0,04	0	0
iP-3	4,08		9,56		0,10		0,68		0,02		0		23,07		16,54	
iP-14	49,41	0,05	0,08	0,06	0,37	0,02	0,03	0,03	0,22	0,07	0,02	0,02	1,03	0,39	0	0

Tab. 2 Koncentrace CK v mediích v pmol·ml⁻¹

Medium	Cytokininy															
	<i>tZ</i>	±	<i>tZR</i>	±	<i>cZ</i>	±	<i>cZR</i>	±	DHZ	±	DHZR	±	iP	±	iPR	±
BII-1	2,76	2,26	0	0	0,48	0,33	0	0	0	0	0	0	2,10	0,84	2,83	0,09
BII-3	6,10	0,96	0,21	0,07	0,80	0,11	0,76	0,12	0	0	0	0	2,49	0,51	7,29	0,41
BII-7	31,61	0,69	0	0	30,93	1,57	1,31	0,26	0	0	0	0	0,81	0,09	0	0
BII-14	44,17	3,89	0	0	38,73	2,41	0,73	0,73	3,93	1,19	0	0	3,23	0,50	0	0
Mantle-1	2,02	0,52	0,07	0,07	0,22	0,05	0	0	0,05	0,05	0	0	0	0	0,04	0,04
Mantle-3	2,76	1,62	0,11	0,11	1,12	0,11	0,20	0,20	0	0	0	0	0	0	0,06	0,06
Mantle-7	19,27	3,10	0,21	0,21	16,67	2,01	5,04	0,38	1,28	1,18	0	0	0,31	0,31	0	0
Mantle-14	9,31	0,01	0	0	23,32	0,74	2,68	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>tZ-1</i>	984,54	83,60	2,25	0,76	1,05	0,50	0	0	0,29	0,29	0	0	0	0	0	0
<i>tZ-3</i>	1262,34	272,49	37,31	4,55	3,53	2,47	0,16	0,16	0,79	0,79	0	0	0	0	0	0
<i>tZ-7</i>	1272,00	232,86	46,35	3,19	8,68	4,31	1,02	0,58	3,22	0,81	0,26	0,26	0	0	0	0
<i>tZ-14</i>	1476,69	114,40	8,90	2,19	3,77	2,55	0,10	0,10	7,90	4,30	0	0	0	0	0	0
<i>cZ-1</i>	8,24	0,05	0	0	753,29	37,92	0,15	0,15	0	0	0	0	1,67	1,67	0	0
<i>cZ-3</i>	4,73	1,52	0	0	897,88	282,20	11,59	3,13	0	0	0	0	0,66	0,28	0	0
<i>cZ-7</i>	13,49	1,25	0,32	0,32	1022,38	213,78	37,23	9,16	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cZ-14</i>	25,76	1,26	0	0	1191,33	209,28	3,82	0,10	0	0	1,12	1,12	0	0	0	0

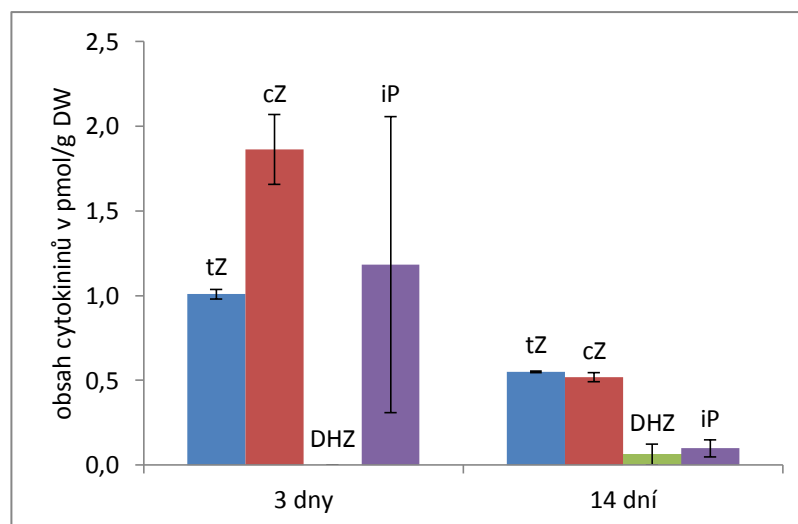
Tab. 2 Koncentrace CK v mediích v pmol·ml⁻¹; (pokračování)

± směrodatná odchylka ze dvou biologických replikátů

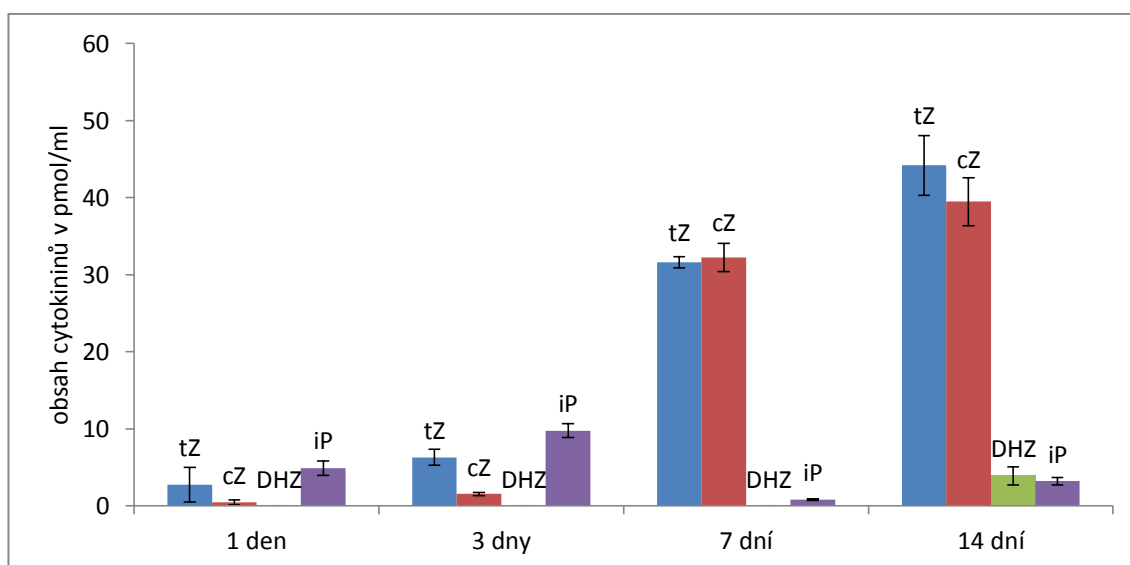
BII resp. Mantle – medium BII resp. Mantle s přidavkem DMSO; *tZ*, *cZ*, DHZ a *iP* –Mantle medium s přidavkem CK o výsledné koncentraci 10 μmol·l⁻¹; číslo značí den odběru vzorku

tZ – *trans*-zeatin, *tZR* – *trans*-zeatinribosid, *cZ* – *cis*-zeatin, *cZR* – *cis*-zeatinribosid, DHZ – dihydrozeatin, DHZR – dihydrozeatinribosid, *iP* – isopentenyladenin, *iPR* - isopentenyladenosin

Medium	Cytokininy															
	<i>tZ</i>	±	<i>tZR</i>	±	<i>cZ</i>	±	<i>cZR</i>	±	DHZ	±	DHZR	±	<i>iP</i>	±	<i>iPR</i>	±
DHZ-1	3,05	1,58	0	0	0	0	0	0	888,16	72,80	0	0	0	0	0	0
DHZ-3	1,83	0,57	0	0	0	0	0	0	857,23	65,26	10,19	0,23	0,38	0,38	0	0
DHZ-7	15,97	2,59	0,35	0,35	0	0	0	0	899,70	31,54	18,59	1,18	0	0	0	0
DHZ-14	12,94	3,95	0	0	0	0	0,56	0,56	982,23	128,93	3,80	0,14	0	0	0	0
<i>iP</i> -1	13,67	0,00	2,30	0,40	0	0	0	0	0	0	0	0	879,26	33,92	1,40	0,60
<i>iP</i> -3	146,15	26,72	15,94	1,56	0,68	0,14	0	0	0	0	0	0	582,11	159,79	11,24	0,80
<i>iP</i> -7	1076,53	503,05	74,11	6,24	6,82	3,02	1,54	0,33	4,93	0,26	0	0	19,58	2,74	0	0
<i>iP</i> -14	1590,67	83,51	7,66	1,59	6,07	0,12	0	0	5,66	0,12	0	0	4,48	0,29	0	0



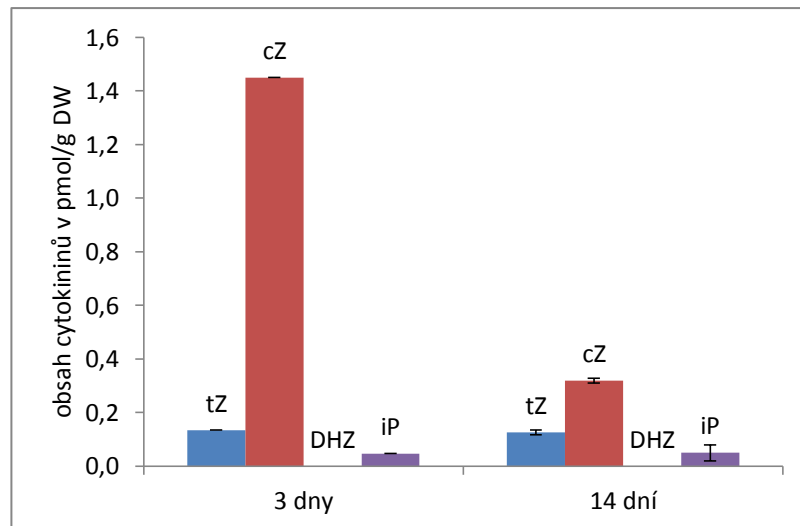
Obr. 8 Mycelium z BII media – koncentrace CK v $\text{pmol} \cdot \text{g DW}^{-1}$



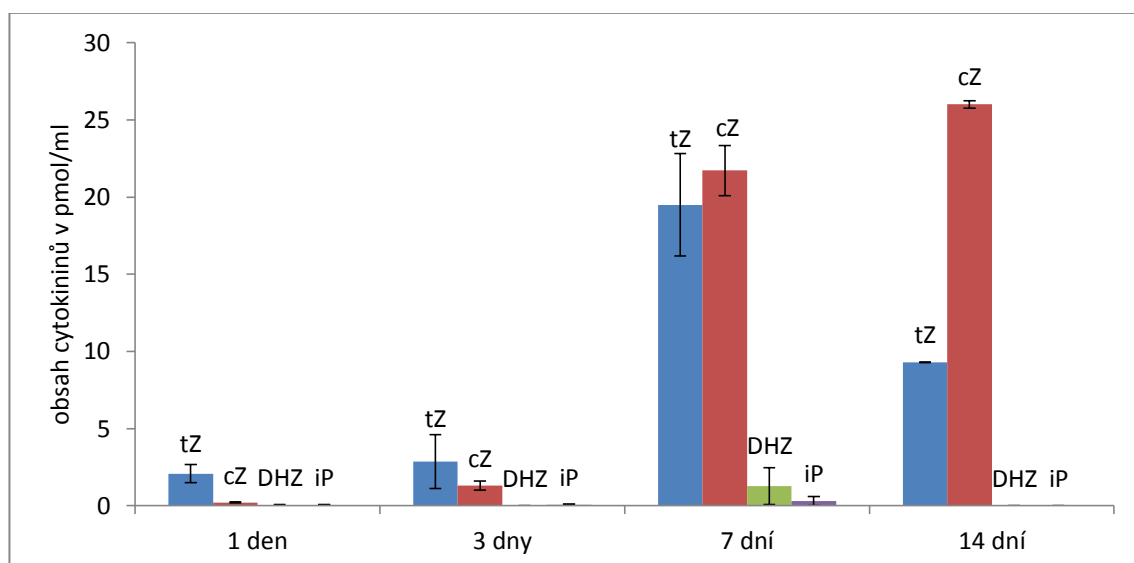
Obr. 9 BII medium – koncentrace CK v $\text{pmol} \cdot \text{ml}^{-1}$

Obsah ribosidů v třídením myceliu je poměrně vysoký (srovnatelný s obsahem volné báze, a v některých případech dokonce vyšší), zatímco ve čtrnáctidenním myceliu je oproti obsahu volných bází zanedbatelný. V mediu, v němž houba rostla jeden den, ribosidy prakticky nebyly nebo se vyskytovaly jen v minimálních koncentracích, po třech a sedmi dnech byl jejich obsah vyšší a po čtrnácti dnech se jejich koncentrace výrazně snížila.

Obsah nukleotidů (*tZRMP*, *cZRMP*, *DHZRMP* a *iPRMP*), které byly analyzovány po ošetření vzorku alkalickou fosfátasou, byl prakticky zanedbatelný, proto v tabulce nejsou uvedeny. V myceliích ani mediích bez přídavků CK nebyly nukleotidy



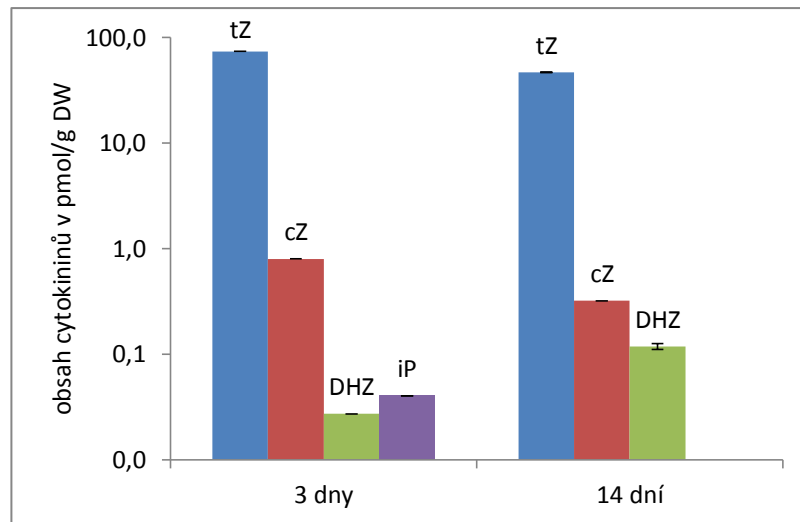
Obr. 10 Mycelium z Mantle media – koncentrace CK v $\text{pmol}\cdot\text{g DW}^{-1}$



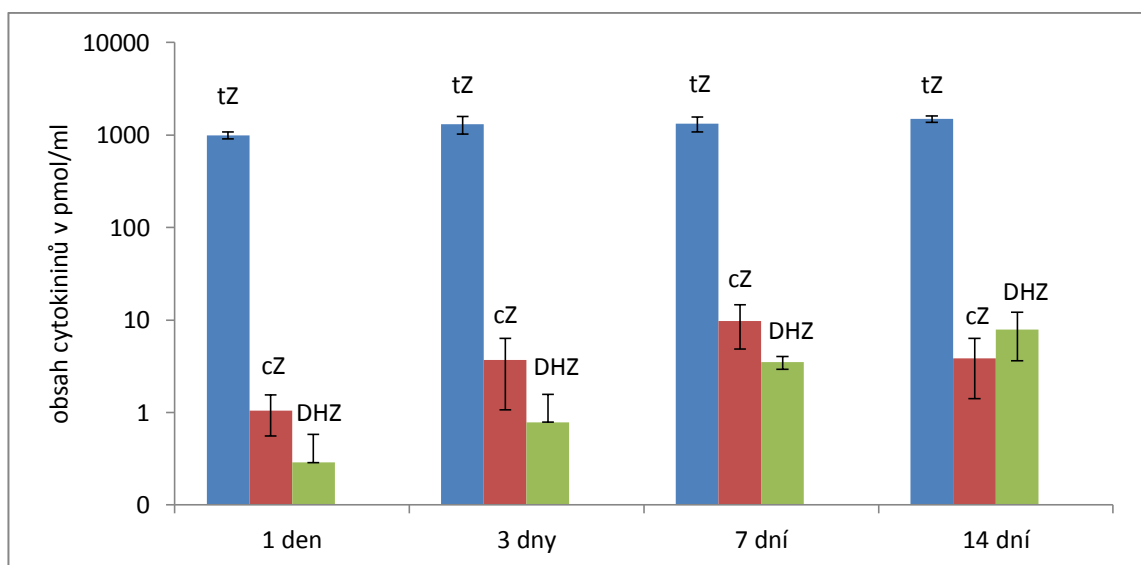
Obr. 11 Mantle medium – koncentrace CK v $\text{pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$

detekovány vůbec; objevovaly se pouze v některých médiích s přidavkem hormonu po 7 a 14 dnech růstu houby. V mediu s přidavkem *cZ* byl malý obsah *cZRMP* ($1,27 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ v sedmidenním mediu a $0,80 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ve čtrnáctidenním mediu). V mediu s přidavkem *DHZ* byl detekován *DHZRMP* ($4,69 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 7 dnech, $0,86 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 14 dnech), ale i *tZRMP* ($0,44 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 7 dnech). V mediu s přidavkem *iP* byl detekován *tZRMP* ($4,11 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 7 dnech) a *DHZRMP* ($0,21 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 7 dnech).

Vzájemné přeměny jednotlivých CK jsou patrné z grafů. Grafy zobrazují, jak se koncentrace jednotlivých CK (v $\text{pmol}\cdot\text{g dry weight}^{-1}$ v případě mycelia, v $\text{pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$



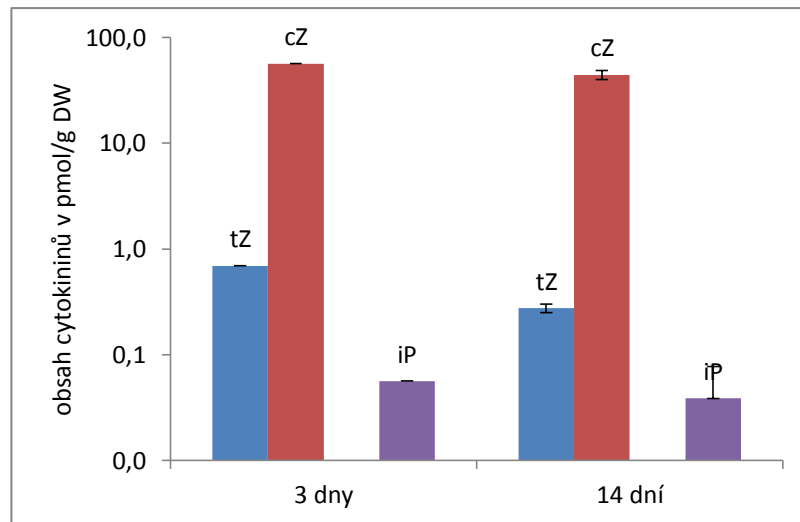
Obr. 12 Mycelium z Mantle media s přidavkem *tZ* – koncentrace CK v pmol·g DW⁻¹



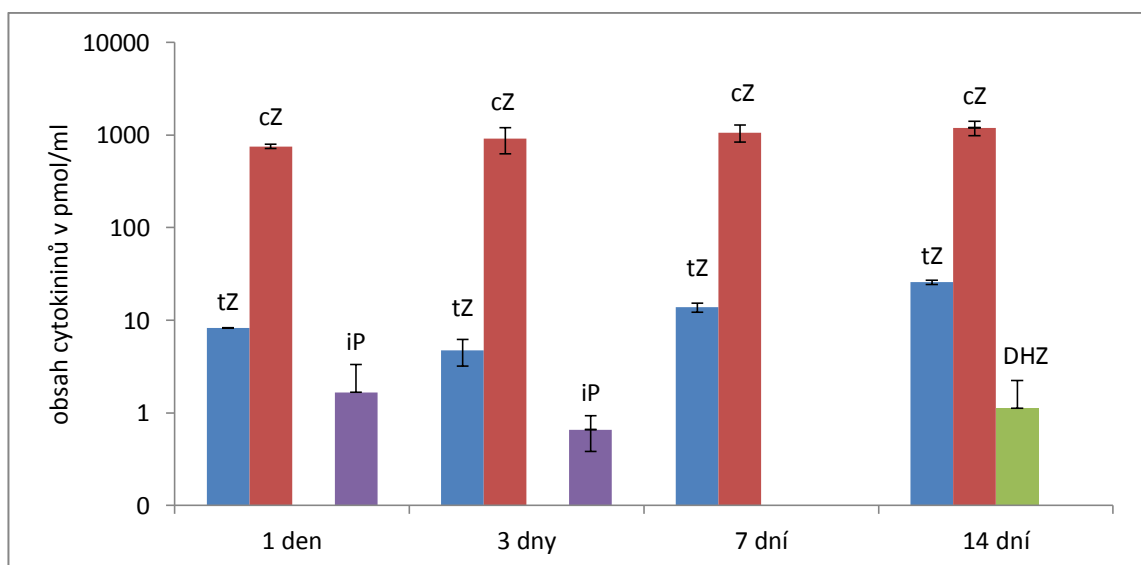
Obr. 13 Mantle medium s přidavkem *tZ* – koncentrace CK v pmol·ml⁻¹

v mediích) mění v čase. Sloupce vždy vyjadřují součet všech forem dané hormonu (volné báze, ribosidu a nukleotidu). Obecně koncentrace CK v myceliu klesá, zatímco v mediu stoupá.

Ze vzorků medií BII a Mantle (Obr. 8 - 11) lze vidět, že častějšími formami cytokininů v houbě jsou *tZ* a *cZ*. Ve vzorcích z BII media (Obr. 8 a 9) můžeme pozorovat vyšší obsah *iP*, jehož tvorbu medium BII podporuje. Ve vzorcích z Mantle media (Obr. 10 a 11) lze naproti tomu pozorovat zvýšenou tvorbu *cZ*. DHZ jako zásobní redukovaná forma se v houbě na počátku jejího růstu příliš netvoří, jeho koncentrace se začala zvyšovat až po 7 resp. 14 dnech. Obecně je však celkový obsah CK vyšší v nutričně bohatém mediu BII než v Mantle mediu, které vyvolává sporulaci.



Obr. 14 Mycelium z Mantle media s přidavkem cZ – koncentrace CK v pmol·g DW⁻¹

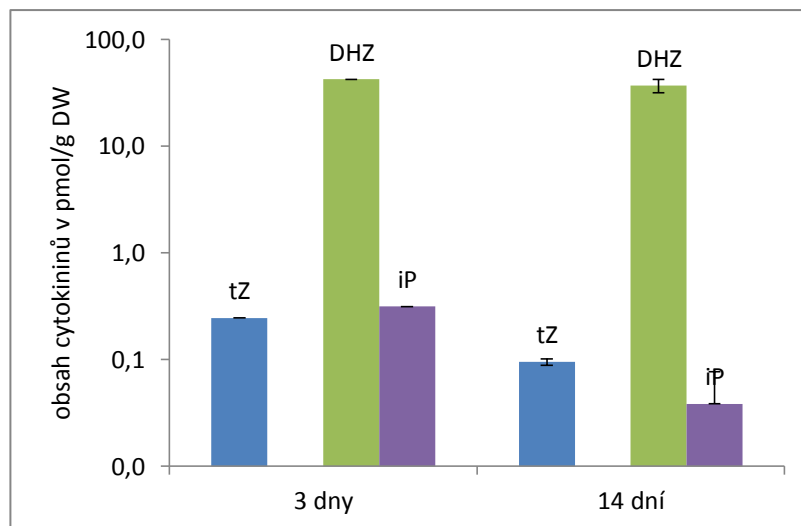


Obr. 15 Mantle medium s přidavkem cZ – koncentrace CK v pmol·ml⁻¹

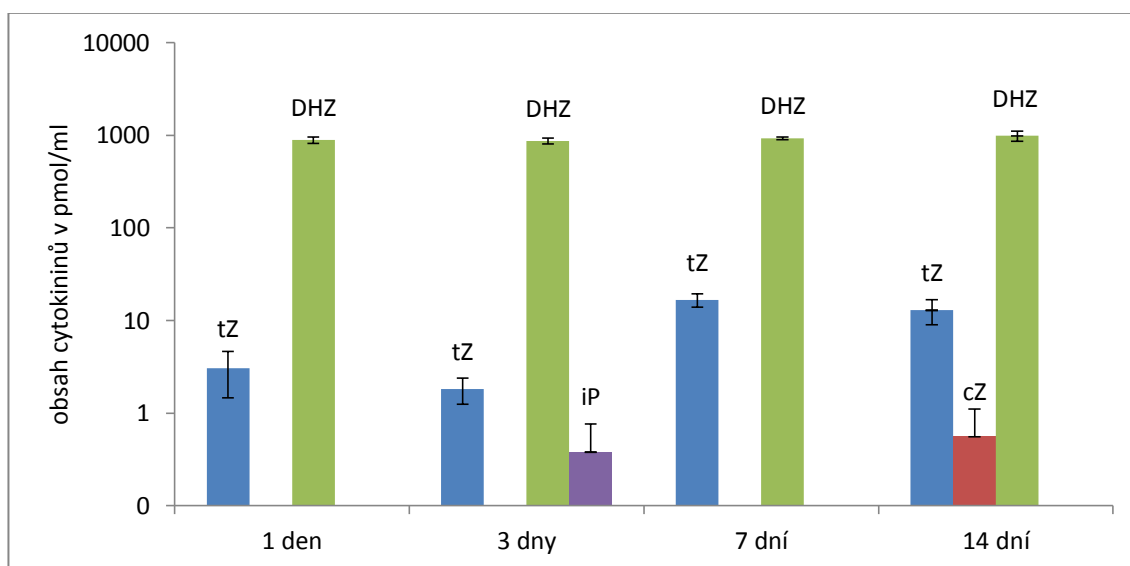
V myceliích a mediích s přidavkem hormonů je koncentrace přidaného hormonu mnohonásobně vyšší než koncentrace ostatních cytokininů. Aby byly koncentrace všech hormonů v grafu dobře viditelné, jsou v následujících grafech hodnoty koncentrace na ose y uvedeny v logaritmickém měřítku.

Ve vzorcích, kam byl přidán *tZ* (Obr. 12 a 13), roste v mediu obsah *cZ*, což znamená, že houba isomeruje přijatý *tZ* na jeho *cis* formu. *tZ* je také v poměrně vysoké míře redukován na DHZ, jehož koncentrace se v průběhu růstu houby zvyšuje.

Ve vzorcích s přidavkem *cZ* (Obr. 14 a 15) stoupá i koncentrace *tZ*, což ukazuje opět na isomeraci mezi těmito dvěma formami. Po 14 dnech, kdy už je koncentrace *tZ* vyšší, lze pozorovat i jeho převedení na DHZ.

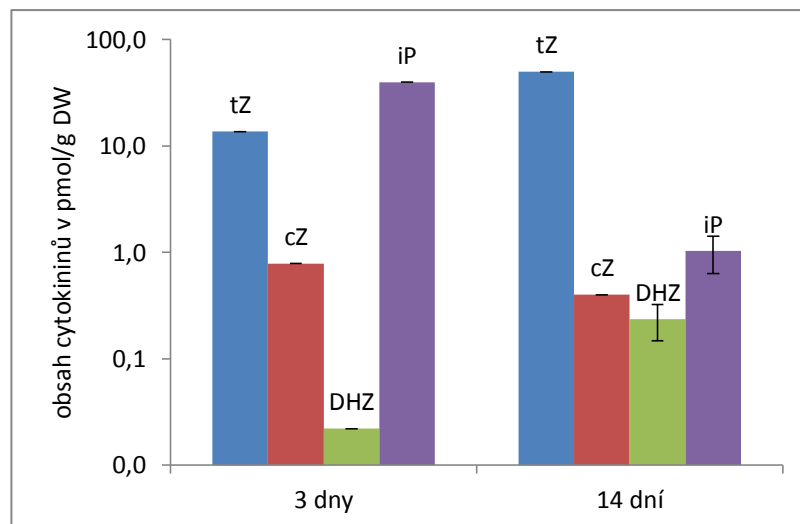


Obr. 16 Mycelium z Mantle media s přidavkem DHZ – koncentrace CK v pmol·g DW⁻¹

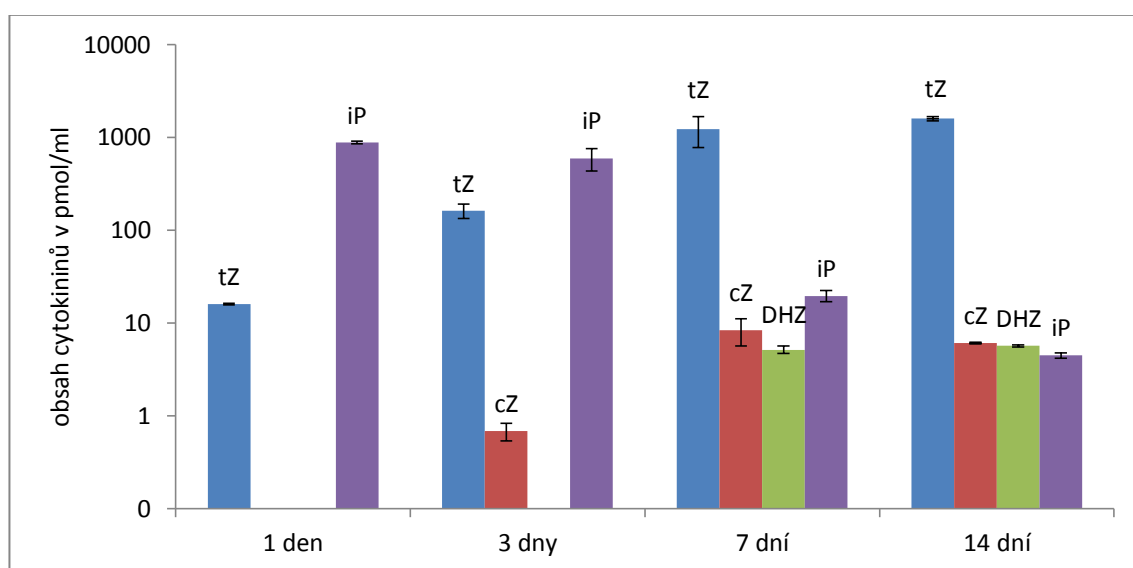


Obr. 17 Mantle medium s přidavkem DHZ – koncentrace CK v pmol·ml⁻¹

V myceliu ani mediu s přidavkem DHZ (Obr. 16 a 17) se koncentrace DHZ v porovnání s přidavky ostatních cytokininů příliš nemění. Houba jej do sebe přijala a jeho koncentrace po 14 dnech růstu klesla jen málo. A zatímco při přidavku *tZ* a *cZ* jejich koncentrace v mediu stoupla o cca 400 pmol·ml⁻¹, v mediu s přidavkem DHZ se koncentrace tohoto cytokininu zvýšila jen o přibližně 100 pmol·ml⁻¹. V průběhu růstu houby se zvyšuje koncentrace *tZ*, který vzniká vytvořením dvojné vazby na DHZ, anebo jeho syntéza probíhá *de novo*. Po 14 dnech růstu je v houbě přítomen i *cZ*, který vznikl isomerací *tZ*.



Obr. 18 Mycelium z Mantle media s přidavkem iP – koncentrace CK v pmol·g DW⁻¹



Obr. 19 Mantle medium s přidavkem iP – koncentrace CK v pmol·ml⁻¹

Ve vzorcích s přidavkem iP (Obr. 18 a 19) koncentrace iP prudce klesá v myceliu i mediu. Zároveň ale stoupá obsah *tZ*, což ukazuje na vysokou aktivitu enzymu cytochrom P450 monooxygenasy, který katalytuje tuto reakci a převádí prakticky veškerý iP na *tZ*. Dále se zvyšuje koncentrace *cZ*, který vzniká isomerací z *tZ*. *tZ* je také redukován na DHZ.

5 DISKUZE

5.1 Metoda pro analýzu cytokininů

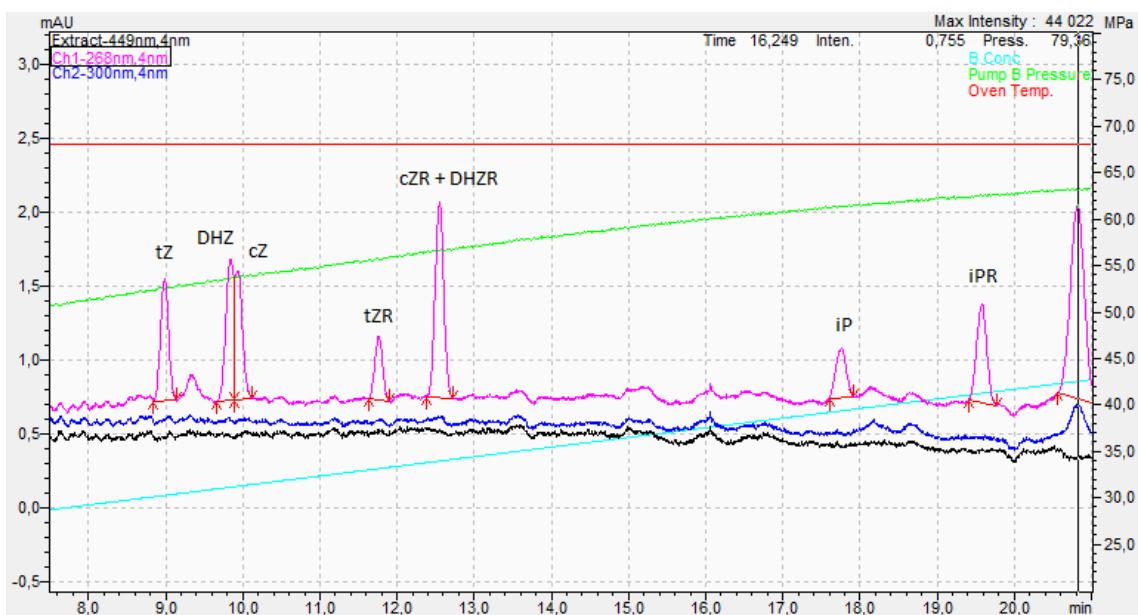
Produkce CK houbami byla dlouhou dobu opomíjena. Jen několik článků se zabývá měřením obsahu CK v houbách interagujících s rostlinami. Crafts and Miller (1974) detekovali a identifikovali *trans*-zeatin a jeho ribosid v houbě *Rhizopogon ochraceorubens* porovnáním retenčního faktoru z papírové chromatografie, teploty tání a absorbance izolovaného hormonu se syntetickým *trans*-zeatinem, a také porovnáním hmotnostních spekter s vypočtenými a publikovanými hodnotami pro *tZ*; CK však nebyly kvantifikovány. Murphy *et al.* (1997) se zaměřili na produkci CK houbou *Pyrenopeziza brassicae*. CK byly identifikovány podle jejich retenčních časů na HPLC, z níž byly odebrány frakce po 1,5 ml a detekovány pomocí kompetitivní ELISY s polyklonálními protilátkami proti *iPR* a *ZR*. ELISA však není příliš přesnou metodou, protože během reakce může interferovat více látek. Jiang *et al.* (2013) zjišťovali obsah mnoha různých forem CK (volné báze, ribosidy, nukleotidy a glykosidy) v *Mangaporthe oryzae* pomocí UPLC-MS. Bruce *et al.* (2011) zkoumali obsah CK metodou HPLC-(ESI)MS/MS, pomocí této metody analyzovaly široké spektrum různých forem cytokininů. Toto spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je velice citlivou metodou jak pro identifikaci tak i kvantifikaci CK. Je vhodné i pro identifikaci CK ve vzorcích, kde není známo, v jakých formách se CK vyskytují, a tedy nevíme, jaké signály očekávat.

Hinsch *et al.* (2015) provedli analýzu všech forem CK v houbě *Claviceps purpurea*. Bylo popsáno, které formy CK se v houbě vyskytují v hojnější míře a které nebyly detekovány prakticky vůbec. S touto znalostí pak mohla být zavedena metoda k identifikaci CK, kdy CK jsou zachyceny na imunoafinitních kolonkách specifických pro isoprenoidní CK, a poté analyzovány na UPLC s UV detekcí. Protože víme, jaké CK můžeme v houbě očekávat, je snadné přiřadit jednotlivé píky v chromatogramu ke konkrétním CK porovnáním jejich retenčních časů a absorpčního maxima se standardy (Obr. 20 a 21).

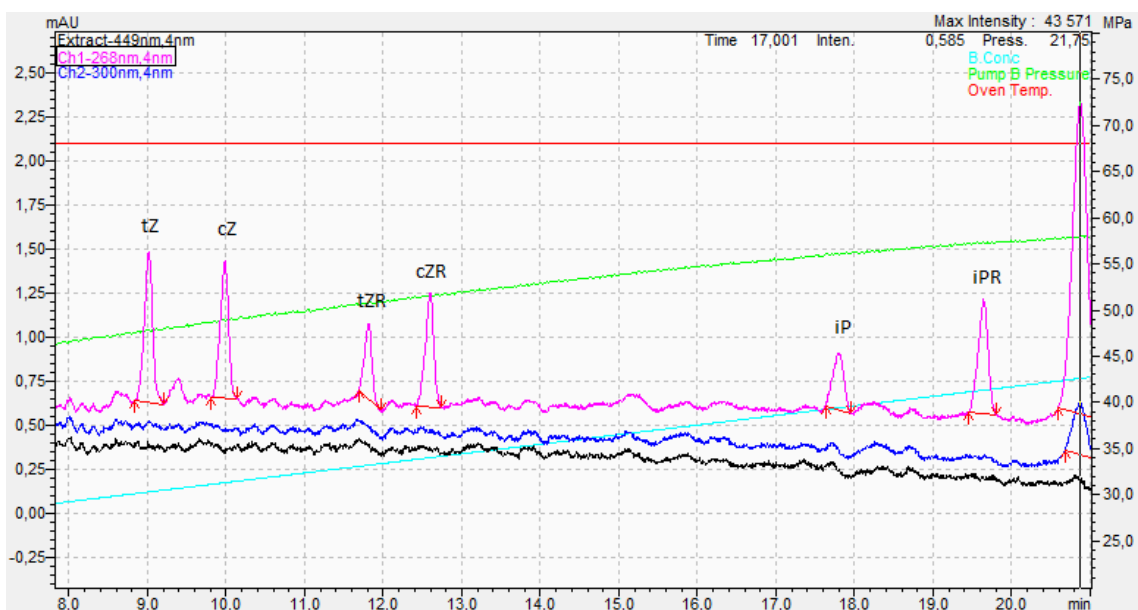
5.2 Konverze cytokininů

Schardl *et al.* (2013) sekvencovali celý genom houby *Claviceps purpurea*. Bylo zjištěno, že má cca 14 000 genů, což je řádově srovnatelné s genomem rostliny *Arabidopsis thaliana* (cca 20 000 genů). *C. purpurea* je eukaryotní organismus, ve

své podstatě plíseň, přesto obsahuje podobné dráhy biosyntézy cytokininů jako rostliny. V houbě byly identifikovány obdobné geny pro biosyntézu CK jako mají rostliny. Tyto geny kódují enzymy cytochrom P450 monoxygenasu, fosforibohydrolasu zvanou „Lonely guy“, adenylátovou isopentenyltransferasu i tRNA-IPT. Zvláštností v houbě je bifunkční enzym spojující domény IPT a LOG, CpIPT-LOG, který se u rostlin nevyskytuje; v rostlinách jsou oba enzymy samostatně.



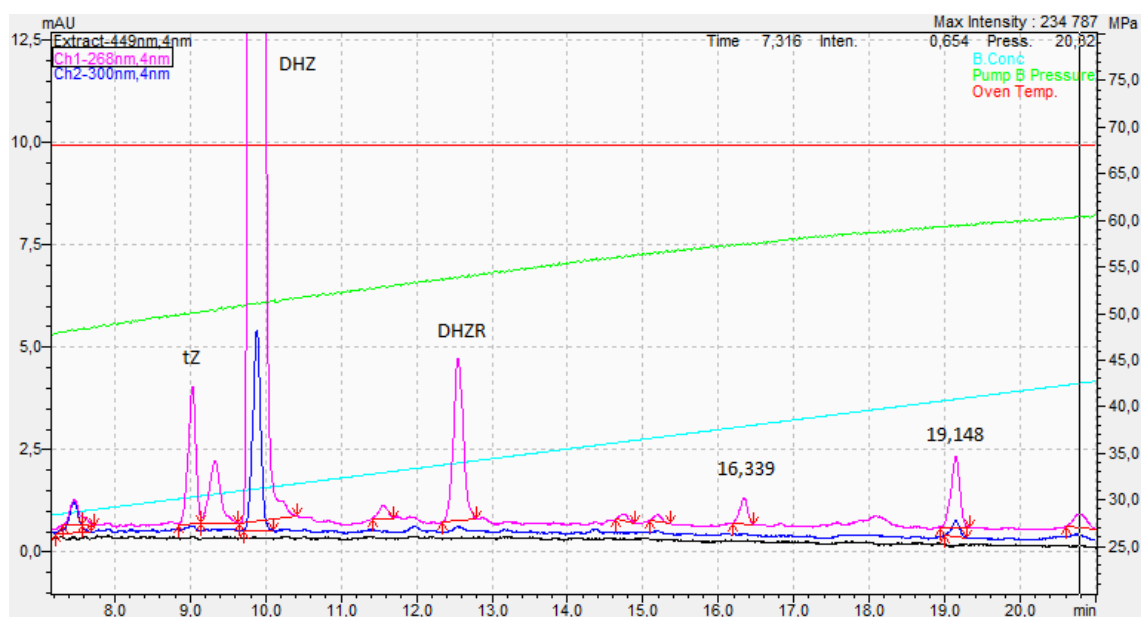
Obr. 20 Chromatogram cytokininových standardů *trans*-zeatinu, *cis*-zeatinu, dihydrozeatinu, isopentenyladeninu a jejich ribosidů



Obr. 21 Chromatogram cytokininových standardů *trans*-zeatinu, *cis*-zeatinu, isopentenyladeninu a jejich ribosidů

Ze získaných výsledků koncentrací a změn v obsahu jednotlivých CK v myceliích i mediích s přidavkem hormonů je vidět, že houba má enzym, který redukuje *trans*-zeatin na dihydrozeatin (zeatinreduktasa), a také má enzym, který převádí jeden isomer zeatinu na druhý (zeatin-*cis-trans*-isomerasa). Oba enzymy jsou předpokládány i v rostlinách (Bassil *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1989), ale zatím nebyly identifikovány geny, které tyto enzymy kódují, takže nemohly být porovnány se sekvencemi v genomu houby, proto nebyly v houbě nalezeny.

Většina CK v rostlinách se vyskytuje ve formě *O*- nebo *N*-glukosidů, což jsou zásobní formy CK. V případě potřeby aktivních forem CK jsou glukosidy štěpeny β -glukosidasou na volné báze (Brzobohatý *et al.*, 1993). Při kompletní analýze CK v houbě *C. purpurea* bylo zjištěno, že houba produkuje v poměrně vysoké míře isoprenoidní cytokininy *tZ*, *cZ*, DHZ a *iP* a jejich ribosidy. Nukleotidy byly v houbě obsaženy málo, zatímco *O*- ani *N*-glukosidy nebyly detekovány prakticky vůbec (Hinsch *et al.*, 2015). I v případě houby pěstované v mediu s přidavkem CK byla naměřena jen malá koncentrace nukleotidů v mediu, zatímco glukosidy byly prakticky nedetekovatelné (nezveřejněná data). Houba tedy pravděpodobně využívá jiné mechanismy konverze CK než rostliny. V některých mediích byly také detekovány látky, které vykazují podobné chování jako CK (zachytávají se na imuno-kolonkách



Obr. 22 Chromatogram cytokininů z media, v němž rostla *C. purpurea* 7 dní po přidavku dihydrozeatinu do media; *trans*-zeatin, dihydrozeatin a dihydrozeatinribosid; 16,339 a 19,148 – neidentifikované látky vykazující podobné chování jako cytokininy

specifických k isoprenoidním CK, absorbují na stejných vlnových délkách jako CK), ale nebyly přiřazeny k žádným použitým standardům (Obr. 22). Je možné, že houba tvoří další konjugáty cytokininů jiným, zatím nepopsaným způsobem.

5.3 Percepce cytokininového signálu v houbě

Bylo zjištěno, že hlenka *Dictyostelium discoideum* potřebuje cytokininy pro zahájení sporulace (Anjard and Loomis, 2008). Klíčení spor je pak inhibováno discadeninem [N³-(3-amino-3-karboxypropyl)-derivát isopentenyladeninu] (Ihara *et al.*, 1980), což ukazuje, že hlenka vnímá CK signál. V rostlinách je percepce CK signálu zprostředkována dvousložkovým signálním systémem; CK jsou vnímány po navázání na CHASE doménou histidinkinasového receptoru (To and Kieber, 2008). V genomu hlenky *Dictyostelium* byla identifikována jedna HK s CHASE doménou, ta však není zapojena do percepce CK signálu; percepce CK závisí na jiné HK a obsahu cAMP v cytosolu (Anjard and Loomis, 2008).

Delece genu *cpp450* v houbě *C. purpurea*, která má za následek radikální snížení obsahu *tZ* a zvýšení obsahu *iP*, vede ke zvýšení sporulace houby (Hinsch *et al.*, 2015). Houba tedy taktéž vnímá CK signál, který se pak podílí na ovlivnění fenotypu houby. V genomu houby *C. purpurea* však nebyl identifikován žádný protein s doménou podobnou CHASE doméně, ale je možné, že budou identifikovány nějaké hybridní HK.

Rostliny reagují na CK signál down-regulací biosyntetických genů pro CK a up-regulací genů pro degradaci CK, jako je například gen kódující CKX (Podlešáková *et al.*, 2012). Jestliže tedy houba vnímá CK signál, je pravděpodobné, že se v houbě mění exprese genů, které nějak souvisejí s CK. Pro potvrzení této hypotézy byla provedena kontrola exprese několika genů zapojených do syntézy CK (CpCYT450, CptRNAIPT, CpLOG, CpIPTLOG) či z blízkosti CK biosyntetického klastru – hypotetický gen pro adenosin deaminasu a gen s výraznou homologií na auxinový přenašeč (CpADA, CpAUX). Jako kontrola exprese byly použity provozní geny pro aktin a glyceraldehydrofosfát dehydrogenasu (CpG_Actin a CpGDP-1). Z časových důvodů však bylo provedeno pouze jedno opakování, pro potvrzení výsledků bude potřeba analyzovat ještě další dva replikáty. Ze získaných výsledků se však zdá, že se exprese se nijak významně nemění v počátku růstu houby v mediu s přidavkem CK. Po třech dnech růstu houby v mediu s přidavkem CK však bylo pozorováno určité zvýšení exprese genů, které kódují enzymy s LOG doménou, která zodpovídá za uvolňování volné báze z nukleotidu.

V této práci byla provedena exprese jen několika málo genů souvisejícími s CK; exogenní aplikace CK do media však může ovlivňovat expresi i jiných genů, které v této práci zkoumány nebyly. Proto je v plánu provést kompletní sekvenaci transkriptomu *C. purpurea* pěstované bez a s přidavkem cytokininů. Srovnání míry exprese všech 14 000 genů pak ukáže možné kandidátní geny, které jsou zapojeny do vnímání cytokininu a jeho regulace.

6 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla vypracována literární rešerše na téma *Claviceps purpurea* a téma fytohormony se zaměřením na cytokininy, dále pak fytohormony v houbách interagujících s rostlinami.

Byla zavedena spolehlivá a poměrně citlivá metoda pro analýzu cytokininů v myceliu houby založená na imunoafinitním přečištění vzorku a následné identifikaci a kvantifikaci cytokininů rozdělením na UPLC s detekcí pomocí UV spektrofotometrie.

Dále byla pomocí této metody provedena analýza produkce cytokininů houbou, jejich metabolismus a dynamika produkce během růstu houby v axenické kultuře. Houba *Claviceps purpurea* je schopná produkovat isoprenoidní cytokininy jako volné báze a ribosidy, které jsou tvořeny hlavně v počáteční fázi růstu houby. Nukleotidy jsou tvořeny jen ve velmi malém množství, zatímco glukosidy nejsou tvořeny prakticky vůbec. Kromě enzymů metabolismu cytokininů, které již byly popsány, má houba pravděpodobně i další enzymy, které katalyzují redukci dvojnás vazby na *trans*-zeatinu za vzniku dihydrozeatinu, a isomeraci mezi *cis*- a *trans*-formou zeatinu. Houba je schopna do sebe přijímat cytokininy z vnějšího prostředí. Exogenní aplikace cytokininu do media houby pěstované v axenické kultuře pak vyvolá zvýšenou produkci cytokininů v houbě. Významná změna exprese několika zkoumaných genů souvisejícími s CK však zatím nebyla potvrzena.

7 LITERATURA

- Anjard C. and Loomis W. F. (2008): Cytokinins induce sporulation in *Dictyostelium*. *Development* **135**, 819–827.
- Astot C., Dolezal K., Moritz T., Sandberg G. (1998): Precolumn derivatization and capillary liquid chromatographic/frit-fast atom bombardment mass spectrometric analysis of cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Mass Spectrometry* **33** (9), 892–902.
- Agrios G. N. (1988): *Plant Pathology*, 3rd ed., Academic Press, San Diego, California, 803 stran.
- Barker S. J., Tagu D. (2000): The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 144–154.
- Bassil N. V., Mok D. W. S., Mok M. C. (1993): Partial purification of a cis-trans- isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* **102**, 867–872.
- Botany.cz: <http://botany.cz/cs/claviceps-purpurea/> (10. 4. 2015)
- Bove F. J. (1970): *The Story of Ergot*. S. Karger, Basel, Švýcarsko, 298 stran.
- Brownlee B. G., Hall R. H., Whitty C. D. (1975): 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin N6-(D2- isopentenyl):adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* **53**, 37–41.
- Bruce S. A., Saville B. J., Emery. R. J. N. (2010): *Ustilago maydis* produces cytokinins and abscisic acid for potential regulation of tumor formation in maize. *Journal of Plant Growth Regulation* **30**, 51–63.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a betaglucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051–1054.
- Bush L. P., Wilkinson H. H., Schardl C. L. (1997): Bioprotective Alkaloids of Grass-Fungal Endophyte Symbioses. *Plant Physiology* **114** (1), 1–7.
- Caesar K., Thamm A. M., Witthöft J., Elgass K., Huppenberger P., Trefen C., Horak J., Harter K. (2011): Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany* **62**, 5571–5580.
- Crafts C. B. and Miller C. O. (1974): Detection and identification of cytokinins produced by mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* **54**, 586–588.
- Cook N. C., Bellstedt D. U., Jacobs G. (2001): Endogenous cytokinin distribution patterns at budburst in Granny Smith and Braeburn apple shoots in relation to bud growth. *Scientia Horticulturae* **87**, 53–63.
- Emery R. J. N., Leport L., Barton J. E., Turner N. C., Atkins C. A. (1998): Cis-isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. *Plant Physiology* **117**, 1515–1523.
- Emery R. J. N., Ma Q., Atkins C. A. (2000): The forms and sources of cytokinins in developing white lupine seeds and fruits. *Plant Physiology* **123**, 1593–1604.
- Entsch B., Parker C. W., Letham D. S. (1983): An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry* **22**, 375–381.
- Fernandez B., Centeno M. L., Feito I., Sanchez-Tames R., Rodriguez A. (1995): Simultaneous analysis of cytokinins, auxins and abscisic acid by combined immunoaffinity chromatography, high performance liquid chromatography and immunoassay. *Phytochemical Analysis* **6** (1), 49–54.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmülling T., Frébort I. (2007): Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 255–267.
- Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortová J., Šebela M., Frébort I. (2008): Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. In: *Studies in natural products chemistry*. Vol. 34 (Atta-ur-Rahman, ed.) Elsevier, Amsterdam, 203–264.

- Ge L., Yong J. W. H., Goh N. K., Chia L. S., Tan S. N., Ong E. S. (2005): Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut water (*Cocos nucifera* L.) using a combined approach of LC-MS and CE. *Journal of Chromatography B* **829**, 26–34.
- Ge L., Yong J. W. H., Tan S. N., Ong E. S. (2006a): Determination of cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* **27** (11), 2171–2181.
- Ge L., Yong J. W. H., Tan S. N., Yang X. H., Ong E. S. (2006b): Analysis of cytokinin nucleotides in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **1133**, 322–331.
- Grayling A., Hanke D. E. (1992): Cytokinins in exudates from leaves and roots of red Perilla. *Phytochemistry* **31**, 1863–1868.
- Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002): Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **49**, 161–169.
- Harrison S. T. L. (2011): Cell disruption. In: *Comprehensive biotechnology*, 2nd edition (Moo-Young M. ed.) Elsevier, Oxford, 619–640.
- Hedden P., Phillips A. L., Rojas M. C., Carrera, E., Tudzynski B. (2001): Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? *Journal of plant growth regulation* **20**, 319–331.
- Hoffman A. (1972): Ergot - a rich source of pharmacologically active substances. In: *Plants in the Development of Modern Medicine* (Swain T., ed.). Harvard University Press, Cambridge, MA, 235–260.
- Horgan R., Scott I. M. (1987): Cytokinins. In: *Principles and practice of plant hormone analysis* (Rivier L., Crozier A. eds.) Academic Press, London, UK, 303–365.
- Hou B., Lim E. K., Higgins G. S., Bowles D. J. (2004): N-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 47822–47832.
- Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P. I., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., M. Kamínek (2006): Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**, 1151–1159.
- Hulvová H., Galuszka P., Frébortová J., Frébort I. (2012): Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnology Advances*, **31**, 79–89.
- Ihara M., Taya Y., Nishimura S. (1980): Developmental regulation of cytokinin, spore germination inhibitor discadenine and related enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *Experimental Cell Research* **126**, 273–278.
- Imbault N., Moritz T., Nilsson O., Chen H-J., Bollmark M., Sandberg G. (1993): Separation and identification of cytokinins using combined capillary liquid-chromatography mass-spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* **22**, 201–210.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. (2001): Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060–1063.
- Jameson P. (2000): Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions - An overview. *Plant Growth Regulation* **32**, 369–380.
- Jiang C. J., Shimono M., Sugano S., Kojima M., Liu X., Inoue H., Sakakibara H., Takatsuji H. (2013): Cytokinins act synergistically with salicylic acid to activate defense gene expression in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 287–296.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677–685.
- Keller U. (1999): Biosynthesis of ergot alkaloids. In: *Ergot - the Genus Claviceps*. (Křen V., Cvak L., eds.) Harwood Academic Publishers, London, 95–163.
- Kisiala A., Laffont C., Emery R. J. N., Frugier F. (2013): Bioactive Cytokinins Are Selectively Secreted by *Sinorhizobium meliloti* Nodulating and Nonnodulating Strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26** (10), 1225–1231.

- Krall L., Raschke M., Zenk M. H., Baron C. (2002): The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Letters* **527**, 315–318.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–655.
- Laloue M., Pethe C. (1982): Dynamics of cytokinin metabolism in tobacco cells. In: *Plant growth substances*. (Wareing P. F., ed.) Academic Press, London, 185–195.
- Lee M. R. (2009): The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: From antiquity to 1900. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh* **39**, 179–184.
- Letham D. S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences* **8**, 569–573.
- Luttrell E. S. (1977): The disease cycle and fungus-host relationship in dallisgrass ergot. *Phytopathology* **67**, 1461–1468.
- Luttrell E. S. (1980): Host-parasite relationships and development of the ergot sclerotium in *Claviceps purpurea*. *Canadian Journal of Botany* **58**, 942–958.
- Maldiney R., Leroux B., Sabbagh I., Sotta B., Sossountzov L., Miginiac E. (1986): A biotin-avidine enzyme immunoassay to quantify three phytohormones: auxin, abscisic acid and zeatin-riboside. *Journal of Immunological Methods* **90**, 151–158.
- Martin R. C., Mok M. C., Shaw G., Mok D. W. S. (1989): An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in *Phaseolus* embryos. *Plant Physiology* **90**, 1630–1635.
- Martin R. C., Mok M. C., Mok D. W. S. (1999a): Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**, 284–289.
- Martin R. C., Mok M. C., Mok D. W. S. (1999b): A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin O-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* **120**, 553–558.
- Martin R. C., Mok M. C., Habben J. E., Mok D. W. S. (2001): A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 5922–5926.
- Mauk C. S., Langille A. R. (1978): Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L: cis-zeatin riboside in the potato plant: its identification and changes in endogenous levels as influenced by temperature and photoperiod. *Plant Physiology* **62**, 438–442.
- McGaw B. A., Heald J. K., Horgan R. (1984) Dihydrozeatin metabolism in radish seedlings. *Phytochemistry* **23**, 1373–1377.
- McGaw B. A., Horgan R., Heald J. K. (1985): Cytokinin metabolism and the modulation of cytokinin activity in radish. *Phytochemistry* **24**, 9–13.
- Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H., Strong F. M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392–1392.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006): Roles of 716 *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 16598–16603.
- Mok D. W. S., Mok M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89–118.
- Mok M. C., Mok D. W. S., Armstrong D. J. (1978): Differential cytokinin structure–activity relationships in *Phaseolus*. *Plant Physiology* **61**, 72–75.
- Morris R. O., Blevins D. G., Dietrich J. T., Durley R. C., Gelvin S. B., Gray J., Hommes N. G., Kaminek M., Mathesius U., Meilan R., Reinbott T. M., Sayavedra-Soto L. (1993): Cytokinins in plant pathogenic bacteria and developing cereal grains. *Australian Journal of Plant Physiology* **20**, 621–637.
- Mougel C., Zhulin I. B. (2001): CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 582–584.
- Mower R. L. and Hancock J. G. (1975a): Sugar composition of ergot honeydew. *Canadian Journal of Botany* **53**, 2813–2825.

- Mower R. L. and Hancock J. G. (1975b): Mechanism of honeydew formation by *Claviceps* species. *Canadian Journal of Botany* **53**, 2826–2834.
- Murphy A. M., Pryce-Jones E., Johnstone K., Ashby A. M. (1996): Comparison of cytokinin production *in vitro* by *Pyrenopeziza brassicae* with other plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**, 53–65.
- Nicander B., Ståhl U., Björkman P. O., Tillberg E. (1993): Immunoaffinity co-purification of cytokinins and analysis by high-performance liquid chromatography with ultraviolet spectrum detection. *Planta* **189**, 312–320.
- Nordström A., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Astot C., Sandberg, G., Moritz, T. (2004): Derivatization for LC-Electrospray Ionization-MS: A Tool for Improving Reversed-Phase Separation and ESI Responses of Bases, Ribosides, and Intact Nucleotides. *Analytical Chemistry* **76** (10), 2869–2877.
- Novák O., Hauserová E., Amaraková P., Doležal K., Strnad M. (2008): Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214–2224.
- Quesnelle P. E., Emery R. J. N. (2007): Cis-cytokinins that predominate in *Pisum sativum* during early embryogenesis will accelerate embryo growth *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* **85**, 91–103.
- Pacáková V., Štulík K., Vlasáková V., Březinová A. (1997): Capillary electrophoresis of cytokinins and cytokinin ribosides. *Journal of Chromatography A* **764**, 331–335.
- Pernisová M., Klíma P., Horák J., Válková M., Malbeck J., Souček P., Reichman P., Hoyerová K., Dubová J., Friml J., Zažímalová E., Hejátko J. (2009): Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**, 3609–3614.
- Persson B. C., Esberg B., Ólafsen Ó., Björk G. R. (1994): Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie* **76**, 1152–1160.
- Pertry I., Vaclavíková K., Depuydt S., Galuszka P., Spíchal L., Temmerman W., Stes E., Schmulling T., Kakimoto T., Van Montagu M. C. E., Strnad M., Holsters M., Tarkowski P., Vereecke D. (2009): Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**, 929–934.
- Podlešáková K., Zalabák D., Čudejková M., Plíhal O., Szüčová L., Doležal K., Spíchal L., Strnad M., Galuszka P. (2012): Novel cytokinin derivatives do not show negative effects on root growth and proliferation in submicromolar range. *PLoS One*. **7**, e39293.
- Prell H. H., Day P. R. (2001): *Plant-Fungal Pathogen Interaction, a classical and molecular view*. Springer-Verlag, Berlin, 214 stran.
- Prinsen E., Redig P., Strnad M., Galis I., Van Dongen W., Van Onckelen H. (1995a): Quantifying phytohormones in transformed plants. In: *Methods in Molecular Biology - Agrobacterium Protocols*. (Gartland K., Davey M. eds.) Humana Press, New Jersey, USA, 245–262.
- Prinsen E., Redig P., Van Dongen W., Esmans E. L., Van Onckelen H. A. (1995b): Quantitative analysis of cytokinins by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **9**, 948–953.
- Růžicka K., Ljung K., Vanneste S., Podhorská R., Beckman T., Friml J., Benková E. (2007): Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell* **7**, 2197–2212.
- Růžicka K., Šimašková M., Duclercq J., Petrášek J., Zažímalová E., Simon S., Friml J., van Montagu M. C. E., Benková E. (2009): Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**, 4284–4289.
- Řeháček Z. (1984): Biotechnology of ergot alkaloids. *Trends in Biotechnology* **2** (6), 166–171.
- Saharan B. S., Nehra V. (2011): Plant growth promoting rhizobacteria: A Critical Review. *Life Science and Medical Research* **21**, 1–30.
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2005): *Agrobacterium tumefaciens* increases

- cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 9972–9977.
- Shaw B. and Mantle P. G. (1980): Parasitic differentiation of *Claviceps purpurea*. *Transactions of the British Mycological Society* **75** (1), 117–121.
- Schardl C. L., Young C. A., Hesse U., Amyotte S. G., Andreeva K., et al. (2013): Plant-Symbiotic Fungi as Chemical Engineers: Multi-Genome Analysis of the *Clavicipitaceae* Reveals Dynamics of Alkaloid Loci. *PLoS Genetics* **9** (2), 1–26.
- Schmitz R. Y., Skoog F. (1972): Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiology* **50**, 702–705.
- Skoog F., Armstrong D.J. (1970): Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* **21**, 359–384.
- Skoog F., Miller C. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **11**, 118–131.
- Stes E., Vandeputte O. M., El Jaziri M., Holsters M., Vereecke D. (2011): A successful bacterial coup d'état: How *Rhodococcus fascians* redirects plant development. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 69–86.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674–88.
- Suttle J. C., Banowitz G. M. (2000): Changes in cis-zeatin and cis-zeatin riboside levels and biological activity during potato tuber dormancy. *Physiologia Plantarum* **109**, 68–74.
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. (2001): The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology* **42**, 107–113.
- Swan D. J. and Mantle P. G. (1991): Parasitic interactions between *Claviceps purpurea* strains in wheat and an acute necrotic host response. *Mycology* **95**, 807–810.
- Székács A., Hegedüs G., Tobiás I., Pogány M., Barna B. (2000): Immunoassays for plant cytokinins as tools for the assessment of environmental stress and disease resistance. *Analytica Chimica Acta* **421**, 135–146.
- Taber W. A. (1985): Biology of *Claviceps*. In: *Biotechnology Series*. Vol. 6, *Biology of Industrial Microorganisms*. (Demain A. L., Nadine A. S., eds.) The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., New York, USA, 449–486.
- Takagi M., Yokota T., Murofushi N., Ota Y., Takahashi N. (1985): Fluctuation of endogenous cytokinin contents in rice during its life cycle—quantification of cytokinins by selected ion monitoring using deuterium-labelled internal standards. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**, 3271–3277.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara, H. (2003): A method for separation and determination of cytokinin nucleotides from plant tissues. *Journal of Plant Research* **116**, 265–269.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866–41872.
- Tarkowská D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., Rolčík J., Strnad M. (2014): Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* **240**, 55–76.
- Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978): 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545–547.
- Tenberge K. B. (1999): Ergot: the genus *Claviceps*. In: *Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*. (Křen V, Cvak L, eds.) Harwood Academic Press, London, UK, 25–56.
- Tenberge K. B. and Tudzynski P. (1994): Early infection of rye ovaries by *Claviceps purpurea* is inter- and intracellular. *Bio Engineering Supplement* **10** (3), 22.
- To J. P., Derue`re J., Maxwell B. B., Morris V. F., Hutchison C. E., Ferreira F. J., Schaller G. E., Kieber J. J. (2007): Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *The Plant Cell* **19**, 3901–3914.
- To J. P. and Kieber J. J. (2008): Cytokinin signaling: Two-components and more. *Trends in Plant Science* **13**, 85–92.
- Tudzynski P., Correia T., Keller U. (2001): Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**, 593–605.
- Tudzynski P., Tenberge K. B., Oeser B. (1995): *Claviceps purpurea*. In: *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular bases*.

- Vol. II, *Eukaryotes* (Kohmoto K, Singh U. S., Singh R. P., eds.) Pergamon, Elsevier Science, Oxford, UK, 161–187.
- Van Rhijn J. A., Heskamp H. H., Davelaar E., Jordi W., Leloux M. S., Brinkman U. A. T. (2001): Quantitative determination of glycosylated and aglycon isoprenoid cytokinins at sub-picomolar levels by microcolumn liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **929**, 31–42.
- Veach Y. K., Martin R. C., Mok D. W. S., Malbeck J., Vaňková R., Mok M. C. (2003): O-Glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes and endogenous cytokinins. *Plant Physiology* **131**, 1374–1380.
- Wiemann P., Sieber C. M. K., von Barga K. W., Studt L., Niehaus E-M., Espino J. J., Huß K., Michielse C. B., Albermann S., Wagner D., Bergner S. V., Connolly L. R., Fischer A., Reuter G., Kleigrew K., Bald T., Wingfield B. D., Ophir R., Freeman S., Hippler M., Smith K. M., Brown D. W., Proctor R. H., Münsterkötter M., Freitag M., Humpf H-U., Güldener U., Tudzynski B. (2013): Deciphering the Cryptic Genome: Genome-wide Analyses of the Rice Pathogen *Fusarium fujikuroi* Reveal Complex Regulation of Secondary Metabolism and Novel Metabolites. *PLoS Pathogens* **9** (6), 1–35.
- Wulfetange K., Lomin S. N., Romanov G. A., Stolz A., Heyl A., Schmulling T. (2011): The cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology* **156** (4), 1808–1818.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001): The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1017–1023.
- Yang Y. Y., Yamaguchi I., Kato Y., Weiler E. W., Murofuchi N., Takahashi N. (1993): Qualitative and semi-quantitative analyses of cytokinins using LC/APCI-MS in combination with ELISA. *Journal of Plant Growth Regulation* **12**, 21–25.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ARR – regulátory odpovědi u *Arabidopsis*
CE – Kapilární elektroforesa
CK – cytokinin
CKX – cytokinindehydrogenasa
cZ – *cis*-zeatin
cZR – *cis*-zeatinribosid
cZRMP – *cis*-zeatinribosidmonofosfát
CZE – kapilární zónová elektroforesa
DHZ – dihydrozeatin
DHZR – dihydrozeatinribosid
DHZRMP – dihydrozeatinribosidmonofosfát
DMAPP – dimethylallyldifosfát
DW – dry weight, hmotnost suchého vzorku
ESI – ionizace elektrosprejem
GA – gibereliny
GC – plynová chromatografie
HK – histidin kinasa
HMBDP – (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfát
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iP – isopentenyladenin
iPR – isopentenyladenosin
iPRMP – isopentenyladenosin-5'-monofosfát
IPT – isopentenyltransferasa
LC – kapalinová chromatografie
LOG – Lonely guy
MEKC – micelární elektrokinetická chromatografie
MS – hmotnostní spektrometrie
P450 – cytochrom P450 monooxygenasa
RIA – radioimunoanalýza
RP – reverzní fáze
SPE – extrakce na pevné fázi
tZ – *trans*-zeatin
tZR – *trans*-zeatinribosid
tZRMP – *trans*-zeatinribosidmonofosfát
UPLC – ultraúčinná kapalinová chromatografie
ZR – zeatinribosid