

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Stanovení koncentrace fytohormonů v kořenové špičce
*Arabidopsis thaliana***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Lucie Herichová
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Pavel Hladík
Konzultant:	prof. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Datum odevzdání:	2024

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora

Bc. Lucie Herichová

Název práce

Stanovení koncentrace fytohormonů
v kořenové špičce *Arabidopsis thaliana*

Typ práce

Diplomová

Pracoviště

Laboratoř růstových regulátorů

Vedoucí práce

Mgr. Pavel Hladík

Konzultant

prof. Mgr. Ondřej Novák, PhD.

Rok obhajoby práce

2024

Abstrakt

Auxiny a cytokininy jsou rostlinné hormony, které se podílí na vývoji a růstu rostliny. Přestože jejich metabolismus a biosyntéza jsou již důkladně prozkoumány, doposud nebyly objasněny jednotlivé detaily na buněčné úrovni. Tato diplomová práce byla zaměřena na porozumění metabolismu auxinů a cytokininů v kořenové špičce *Arabidopsis thaliana*. A proto cílem práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu pro izolaci protoplastů a jejich třídění pomocí průtokové cytometrie. A s následnou purifikací fytohormonů a jejich měření pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Tato metoda byla déle testována na mutantních liniích *A. thaliana* s fluorescenčně značenými buněčnými typy v kořenové špičce.

Klíčová slova

Auxin, cytokinin, protoplast, FACS, purifikace, kořenová špička, *Arabidopsis thaliana*

Počet stran

66

Počet příloh

5

Jazyk

Český

Bibliographical identification

Author`s first name and surname	Bc. Lucie Herichová
Title of thesis	Determination of phytohormones in the root tip of <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Pavel Hladík
Consultant	prof. Mgr. Ondřej Novák, PhD.
The year of presentation	2024
Abstract	<p>Auxins and cytokinins are plant hormones involved in plant development and growth. Although their metabolism and biosynthesis have been extensively studied, the details at the cellular level have not yet been elucidated. This thesis was focused on understanding the metabolism of auxins and cytokinins in the root tip of <i>Arabidopsis thaliana</i>. Therefore, the goal of this thesis was to develop and optimize a method for isolating protoplasts and sorting them using flow cytometry. And with subsequent purification of phytohormones and their measurement by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. This method was further tested on mutant <i>A. thaliana</i> lines with fluorescently labelled cell types in the root tip.</p>
Keywords	Auxin, cytokinin, protoplast, FACS, purification, root tip, <i>Arabidopsis thaliana</i>
Number of pages	66
Number of appendices	5
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením
Mgr. Pavla Hladíka za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

podpis

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce Mgr. Pavlu Hladíkovi a stejně tak konzultantovi prof. Mgr. Ondřeji Novákovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady, ochotu kdykoli pomoci a trpělivost. Dále pak Mgr. Kristýně Bielešové Ph.D. za pomoc s konfokálním mikroskopem, Mgr. Ivanu Petříkovi se statistickým zpracováním výsledků a také Ing. Petře Amakorové s analýzou cytokininů.

Tato práce byla realizována za podpory Interní grantové agentury Univerzity Palackého (projekt IGA_PrF_2024_013).

Obsah

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	10
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 ROSTLINNÉ HORMONY.....	11
2.2 AUXINY	11
2.2.1 Biosyntéza.....	12
2.2.2 Metabolismus.....	14
2.2.3 Transport	16
2.2.4 Signalizace	17
2.3 CYTOKININY	19
2.3.1 Biosyntéza.....	20
2.3.2 Metabolismus.....	21
2.3.3 Transport	22
2.3.4 Signalizace	23
2.4 KOŘENOVÁ ŠPIČKA	24
2.4.1 Rostlinné hormony v kořenové špičce <i>A. thaliana</i>	25
2.5 ANALÝZA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU.....	26
2.5.1 Fluorescenční průtoková cytometrie.....	26
2.5.2 Sortování protoplastů.....	29
2.5.3 Purifikace rostlinných hormonů	30
2.5.4 LC-MS/MS ve stanovení rostlinných hormonů	31
3 MATERIÁL A METODY	34
3.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	34
3.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE	34
3.3 CHEMIKÁLIE.....	35
3.4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	36
3.5 PRACOVNÍ POSTUPY A METODY	37
3.5.1 Příprava biologického materiálu.....	37
3.5.2 Izolace protoplastů	38
3.5.3 Sortování protoplastů.....	38
3.5.4 Konfokální mikroskopie	39
3.5.5 Purifikace auxinů a cytokininů.....	39
4 VÝSLEDKY.....	42
4.1 IZOLACE PROTOPLASTŮ	42
4.1.1 Optimalizace izolace protoplastů	43
4.3 SORTOVÁNÍ PROTOPLASTŮ.....	44
4.4 PURIFIKACE IZOLOVANÝCH PROTOPLASTŮ METODOU M-SPE-PT	45
4.5 OPTIMALIZACE PURIFIKAČNÍHO PROTOKOLU DSPE	47
4.6 APLIKACE OPTIMALIZOVANÉ METODY NA DALŠÍ BUNĚČNÉ LINIE	48
5 DISKUZE	51
6 ZÁVĚR	56
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	57
8 PŘÍLOHY.....	67

Seznam zkratek

ABC	ATP-vazebný transportér
ABCB	ATP-BINDING CASSETTE podskupiny B
ABP1	AUXIN BINDING PROTEIN 1
AC	adenylátcyklasa
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
AGZ	AZA-GUANIN RESISTANT
AMI1	amidasa 1
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
ARR	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR
ATP	adenosintrifosfát
Aux/IAA	transkripční represory auxin/indol-3-acetic acid
AUX1	auxin transportérový protein 1
AUX1/LAX	proteinový nosič AUXIN RESISTANT 1/LIKE-AUX1
B	báze
BAP	6-benzylaminopurin
BAPR	6-benzylaminopurin ribosid
BAPRMP	6-benzylaminopurin ribosid-5'-monofosfát
BAP9G	N ⁶ -benzyladenin-9-glukosid
cAMP	3', 5'-cyklický adenosinmonofosfát
CKX	cytokinin oxidasa/dehydrogenasa
CYP	monooxygenasa cytochromu P450
cZ	cis-zeatin
cZOG	cis-zeatin O-glukosid
cZRMP	cis-zeatin-5'-monofosfát
cZ7G	cis-zeatin-7-glukosid
cZ9G	cis-zeatin-9-glukosid
DAO1	DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DHZ	dihydrozeatin
DHZOG	dihydrozeatin O-glukosid
DHZR	dihydrozeatin ribosid
DHZRMP	dihydrozeatin ribosid-5'-monofosfát
DHZ9G	dihydrozeatin-9-glukosid
Dicamba	3,6-dichlor-2-methoxybenzoová kyselina
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DSPE	extrakce na tuhé fázi s disperzní matricí
ESI	ionizace elektrospřejem
FACS	fluorescenčně aktivované třídění buněk (<i>fluorescent-activated cell sorting</i>)
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FSC	přímý rozptyl (<i>forward scatter</i>)
GH3	GRETCHEN HAGEN 3
GFP	zelený fluorescenční protein (<i>green fluorescent protein</i>)
HK	histidin kinasa
HMBDP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát

HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IAA	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)octová kyselina
IAA-AA	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetyl)-aminokyselina
IAA-Asp	(2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetyl)aspartát
IAA-Glc	1- <i>O</i> -(2-indol-3-yl)acetyl)- β-D-glukopyranosa
IAA-Glu	(2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetyl)glutamát
IAM	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetamid
IAMT1	karboxymethyltransferasa 1
IAN	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetonitril
IAOx	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetaldoxim
ILR1	IAA-leucin resistant 1
ILL	IAA-leucin resistant-like
iP	<i>N</i> ⁶ -izopentenyladenin
IPT	isopentynyltransferasa
iPR	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenosin
iPRMP	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenosin-5'-monofosfát
iP7G	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin-7-glukosid
iP9G	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin-9-glukosid
IPyA	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)pyruát
K	kinetin
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LOG	enzym LONELY GUY
MeIAA	methylester kyseliny 2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)octové
MES17	methyltransferasa 17
MEP	mevalonátová dráha
MF	mobilní fáze
MRM	multiple reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
MS médium	Murashige & Skoog médium
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
<i>m</i> T	<i>meta</i> -topolin
<i>m</i> TR	<i>meta</i> -topolin ribosid
<i>m</i> T9G	<i>meta</i> -topolin-9-glukosid
NAA	(naftalen-1-yl)octová kyselina
NIT	nitrilasa
NT	nukleotidy
OG	<i>O</i> -glukosidy
<i>o</i> T	<i>orto</i> -topolin
<i>o</i> TR	<i>orto</i> -topolin ribosid
<i>o</i> T9G	<i>orto</i> -topolin-9-glukosid
oxIAA	(2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)octová kyselina
oxIAA-AA	((2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetyl)-aminokyselina
oxIAA-Asp	((2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetyl)aspartát
oxIAA-Glc	1- <i>O</i> -(2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetyl)-β-D-glukopyranosa
oxIAA-Glu	((2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetyl)glutamát
PAA	kyselina fenylactová
PI	propidium jodid

PIN	proteinová rodina auxinových transportérů
PUP	purinové permeasy
<i>p</i> T	<i>para</i> -topolin
<i>p</i> TR	<i>para</i> -topolin ribosid
QC	klidové centrum
RP	reverzní fáze
rpm	jednotka úhlové rychlosti (otáčky/min)
RR	regulátory odpovědi
SCF ^{TIR1}	Skp1-Cullin-F-box
SF	stacionární fáze
SKP2A	S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A
SPE	extrakce na pevné fázi
SSC	boční rozptyl (<i>side scatter</i>)
TAA1	tryptofan aminotransferasa Arabidopsis 1
TIR1/AFB	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-box
tRNA	transferová RNA
tRNA-IPT	tRNA-isopentyl transferasa
Trp	L-tryptofan
<i>t</i> Z	<i>trans</i> -zeatin
<i>t</i> ZOG	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid
<i>t</i> ZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
<i>t</i> ZRMP	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
<i>t</i> ZROG	<i>trans</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
zZ7G	<i>trans</i> -zeatin-7-glukosid
<i>t</i> Z9G	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid
UGT	uridindifosfát glykosyltransferasa
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
μ-SPE-PT	mikroextrakce na pevné fázi pomocí plněných špiček
YUCCA	flavin monooxygenasa
ZOG	zeatintransferasa
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
4-Cl-IAA	4-chlor-indol-3-ylactová kyselina

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Fytohormony, neboli rostlinné hormony, jsou přirozenými metabolity rostlin regulující jejich růst a vývoj. Hrají nezastupitelnou roli v komunikaci mezi buňkami, pletivou a orgány v průběhu celého životního cyklu. Prvními objevenými fytohormony byly auxiny, které mají nepostradatelnou roli v růstu a vývoji rostlin, ale zastávají také důležitou úlohu v pohybových reakcích na vnější podněty (fototropismus, gravitropismus) a stimulují tvorbu laterálních a adventivních kořenů. Cytokininové tvoří další významnou skupinu fytohormonů, jež hrají klíčovou roli v mnoha fyziologických a vývojových procesech na úrovni jednotlivých rostlinných složek (buňky, tkáně a orgány). Spolu s auxiny jsou zodpovědné za regulaci růstu a vývoje rostlin, buněčného dělení, diferenciaci, stárnutí a odolnost vůči stresu.

Teoretická část této práce byla orientovaná na důkladnou charakteristiku homeostázy auxinů a cytokininů popisující zejména jejich biosyntézu, metabolismus, transport a signální dráhy, a to zejména v kořenové špičce. Další částí byl popis technik používaných pro analýzu fytohormonů se zaměřením na metody dále aplikované v experimentální části.

Hlavním cílem této práce byla optimalizace metody pro izolaci a třídění protoplastů z kořenové špičky mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana*, jež mají pomocí fluorescenční látky („*green fluorescent protein*“; GFP) značené rozdílné typy buněk. V těchto protoplastech bylo následně provedeno metabolické profilování auxinů a cytokininů.

Přestože byly již v minulosti publikovány práce zaměřené na podobnou problematiku, tato metoda by měla umožnit detailnější a podrobnější analýzu rostlinných hormonů v kořenové špičce z důvodu velkého rozvoje purifikačních a analytických metod v posledních letech, které umožňují analýzu metabolitů o stále nižších koncentracích a v menším množství vzorku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

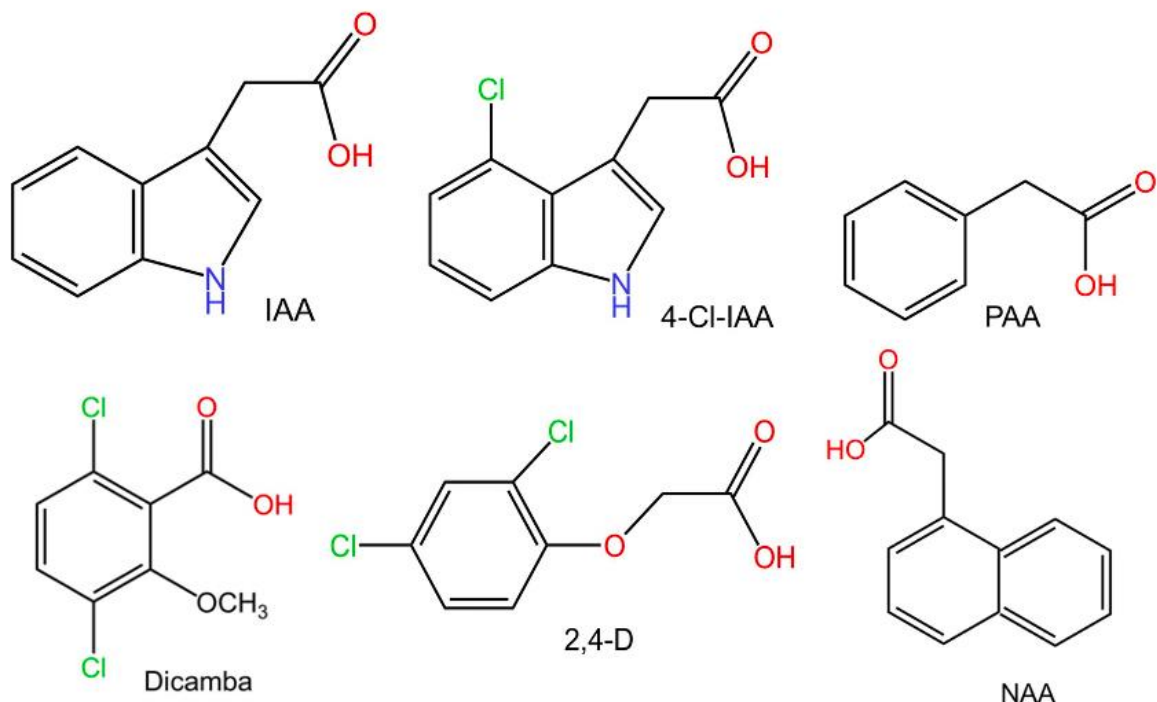
2.1 Rostlinné hormony

Rostlinné hormony, neboli fytohormony, jsou skupinou přirozeně se vyskytujících organických látek ovlivňující celou škálu fyziologických procesů probíhajících v rostlinách. Tyto metabolity se v rostlinách vyskytují ve velmi malých koncentracích (<1 μM), kde jejich funkce spočívá především v regulaci růstu a vývoje, ale také zprostředkovávají reakce na vnější stimuly a přenáší informaci mezi pletivy a orgány (Davies, 2010). Z místa jejich biosyntézy jsou transportovány jednak na krátké vzdálenosti buněčným transportem, anebo do rozlehlejších částí vodivými pletivy, kde v závislosti na jejich přítomnosti dochází ke specifickým biochemickým, fyziologickým a morfologickým reakcím (Davies, 2010; Procházka *et al.*, 1998). Obecně se rozlišují dvě hlavní skupiny fytohormonů. První skupinu tvoří tzv. stresové hormony, mezi které patří kyselina salicylová, kyselina jasmonová, ethylen a kyselina abscisová. Na podpoře růstu, vývoje a buněčného dělení se podílí druhá skupina rostlinných hormonů, a to tzv. pozitivní růstové regulátory, do kterých spadají cytokininy, auxiny, gibbereliny a brassinosteroidy (Vaňková a Pessaraki, 2010). Mezi rostlinné signální molekuly dále řadíme strigolaktony, polyaminy a signální peptidy (Davies, 2010).

2.2 Auxiny

Auxiny byly objeveny ve třicátých letech 20. století a jsou tak první objevenou skupinou rostlinných hormonů (Went a Thimann, 1937). Transport auxinů je společně s homeostází a interakcemi s jinými hormony zodpovědný za jeho nejdůležitější funkce, mezi které patří zejména regulace apikální dominance, stimulace růstu a vývoje rostliny, inhibice prodlužování kořenů, regulace gravitropismu a fototropismu a také stimulace tvorby laterálních kořenů (Davies, 2010).

Nejznámějším auxinem je kyselina indol-3-ylactová (IAA), která řídí množství vývojových reakcí. Dalšími přirozeně vyskytujícími se auxiny jsou kyselina fenylactová (PAA) a kyselina 4-chlor-indol-3-ylactová (4-Cl-IAA) (Obr. 1). Během růstu rostliny je IAA regulována v závislosti na vnějších a vnitřních podnětech, a to prostřednictvím polárního transportu, biosyntézou *de novo* a metabolismem (Casanova-Sáez *et al.*, 2021).



Obr. 1: Struktury auxinů. První řádek znázorňuje struktury vybraných přirozeně se vyskytujících auxinů: kyselina indol-3-ylactová (IAA), kyselina 4-chlor-indol-3-ylactová (4-Cl-IAA) a kyselina fenylactová (PAA). Druhý řádek znázorňuje struktury vybraných syntetických auxinů: kyselina 3,6-dichlor-2-methoxybenzoová (dicamba), kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina 1-naftylactová (NAA).

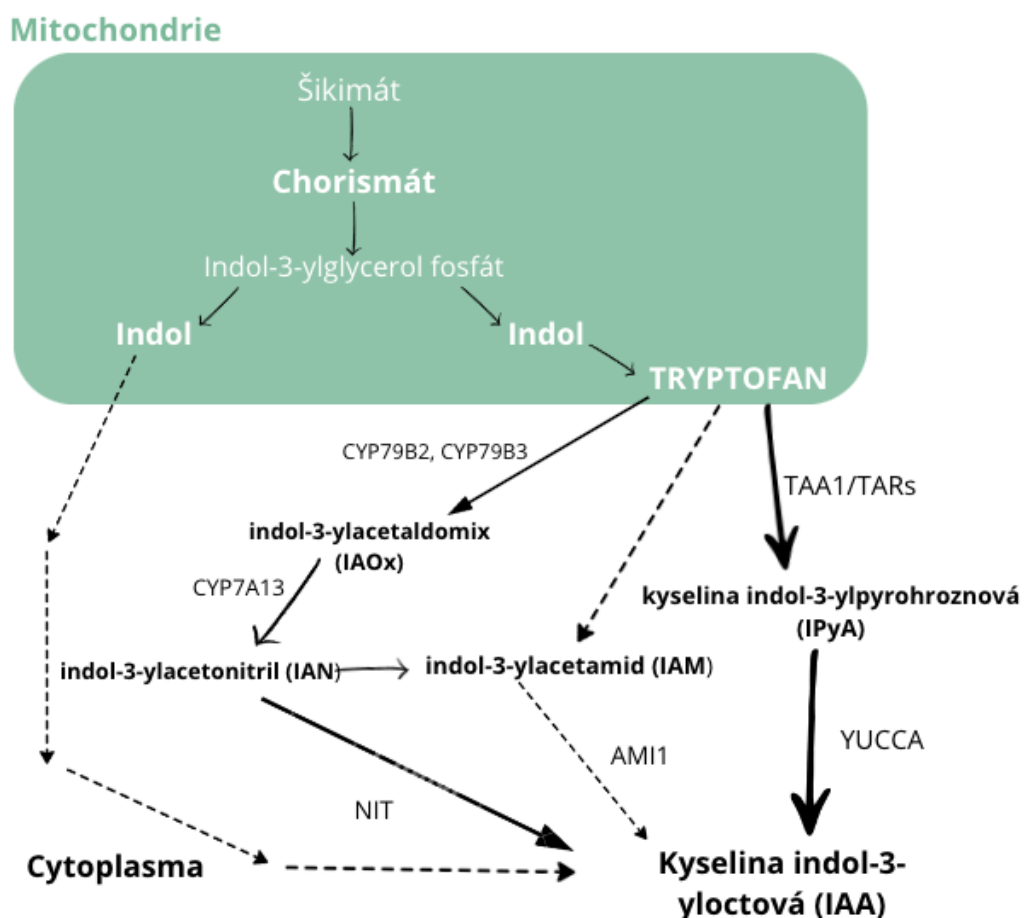
2.2.1 Biosyntéza

Za biosyntézu auxinu jsou zodpovědné dvě základní dráhy. První z nich vychází z aromatické kyseliny L-tryptofanu (Trp), podle které je známá také jako cesta závislá na tryptofanu (Obr. 2). Syntéza Trp probíhá v chloroplastech cestou šikimátu, skrze kterou produkuje většina živých organismů aromatické aminokyseliny (Maeda a Dudareva, 2012). Druhou méně známou a minoritní cestou vedoucí ke vzniku IAA je dráha nezávislá na tryptofanu, při které zprostředkovává cytosolická indolsyntasa přeměnu indol-3-ylglycerolfosfátu na indol, jehož konverze na IAA však stále není objasněna (Casanova-Sáez *et al.*, 2021).

V současnosti jsou známy čtyři základní metabolické dráhy závislé na tryptofanu, které jsou rozlišovány na základě svých meziproductů. Množství dosavadních poznatků o jednotlivých cestách se však liší. Jediná plně objasněná dráha je vedena přes meziproduct kyselinu indol-3-ylpyrohroznovou (IPyA) (Di *et al.*, 2015). Tato dráha se skládá z dvoustupňové reakce, při které je Trp nejprve deaminován prostřednictvím tryptofan aminotransferasy Arabidopsis 1 (TAA1) a proteinů TAA1 příbuzným na meziproduct reakce IPyA, která je následně dekarboxylována na IAA prostřednictvím monooxygenas obsahující flavin z rodiny YUCCA (Stepanova *et al.*, 2008; Zhao *et al.*,

2001). Zmíněná dráha je považována za univerzální cestu pro syntézu IAA v suchozemských rostlinách (Casanova-Sáez *et al.*, 2021).

Méně objasněná dráha, vedoucí přes meziprodukt indol-3-ylacetaldomix (IAOx), je zprostředkována dvěma isozymy z rodiny monooxygenas cytochromu P450 (CYP), CYP79B2 a CYP79B3 katalyzující přeměnu Trp na IAOx. Tato cesta je však omezená pouze na čeleď *Brassicaceae* (do které spadá i *A. thaliana*), jelikož IAOx a geny *cyp79b2/3* byly nalezeny pouze u této čeledi (Sugawara *et al.*, 2009). Molekula IAOx může být dále metabolizována na indol-3-ylacetonitril (IAN) pomocí enzymu CYP7A13 (Nafisi *et al.*, 2007) nebo se účastní syntézy indolglukosynolátů a kamalexinu, jež jsou u rostlin významné obranné metabolity (Hull *et al.*, 2000)



Obr. 2: Schéma biosyntézy IAA. Zelené pozadí znázorňuje dráhu probíhající v mitochondriích, bílé pozadí popisuje dráhu probíhající v cytoplasmě. Jednotlivé šipky označují příslušnou metabolickou dráhu. Přerušované šipky označují enzymatické dráhy, které doposud nebyly ještě prokázány (převzato a upraveno podle Casanova-Sáez *et al.*, 2021).

Dalšími meziprodukty syntetické dráhy IAA vedoucí přes Trp je, kromě již zmíněného IAOx, indol-3-ylacetamid (IAM) a IAN, jehož přeměna na IAA je zprostředkována rostlinnými nitrilasami (NIT) (Lehmann *et al.*, 2017). Dráha vedoucí přes IAM je známá především u bakterií syntetizujících IAA (např. *Agrobacterium*, *Rhizobium*) (Sekine *et al.*, 1989; Clark *et al.*, 1993). Její princip však není

zatím zcela známý, ač se předpokládá, že k přeměně IAM na IAA dochází pomocí amidasy 1 (AMI1) (Pollmann *et al.*, 2003; Neu *et al.*, 2007). A přestože IAM může být produkován skrze IAOx a IAN, IAM byl detekován i u jiných druhů než *Brassica*, které IAOx postrádají (Sugawara *et al.*, 2009; Olatunji *et al.*, 2017). Přestože nejsou prozatím všechny dráhy zcela objasněné, každá z nich působí vlastním způsobem paralelně a redundatně, jelikož blokáce jedné z nich nevede ke snížení hladin IAA (Woodward *et al.*, 2005; Olatunji *et al.*, 2017).

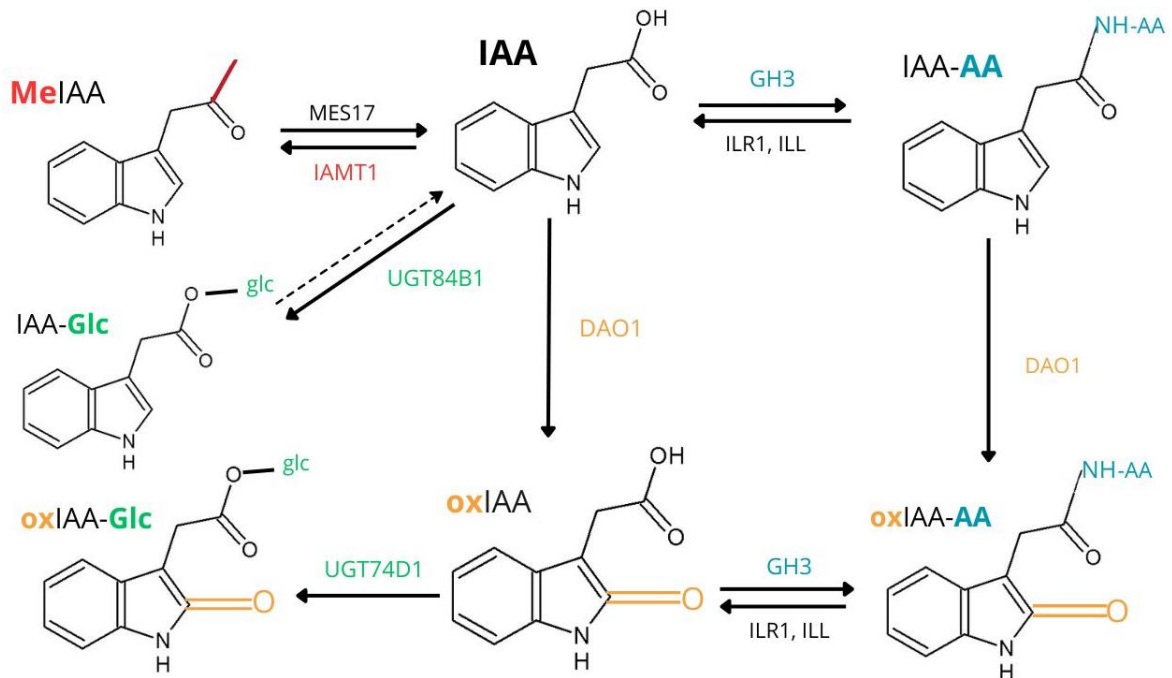
2.2.2 Metabolismus

Většina IAA se v rostlinách nachází ve formě neaktivních konjugátů, které mohou být reverzibilně přeměněny na IAA (zásobní forma) sloužící k vyrovnání hladin auxinu bez nutnosti jejich syntézy *de novo* nebo jako ireverzibilní metabolity, které jsou výsledkem eliminace nadbytku IAA (Casanova-Sáez *et al.*, 2021).

Zásobní formy auxinu v rostlinách lze klasifikovat do čtyř hlavních skupin: esterově vázané, amidově vázané, oxidované IAA konjugáty a methylester IAA (MeIAA) (Casanova-Sáez *et al.*, 2021), obdobně jak je znázorněno na Obr. 3. Estery IAA vznikají navázáním cukerné složky na karboxylovou skupinu prostřednictvím esterové vazby (Ludwig-Müller *et al.*, 2005). V reversibilní konverzi IAA na IAA-glukosu (IAA-Glc) hraje ústřední roli UGT (uridindifosfát glykosyltransferasa). Glykosylace IAA v *A. thaliana* je zprostředkována UDP-glykosyltransferasou 84B1 (UGT84B1), zatímco UGT74D1 se podílí na glykosylaci ireverzibilně vytvořeného oxidativního katabolitu kyselině 2-oxo-indol-3-ylactové (oxIAA) za vzniku oxIAA-glukosy (oxIAA-Glc) (Mateo-Bonmatí *et al.*, 2021), který je nejvíce zastoupeným esterem u modelové rostliny *A. thaliana* (Casanova-Sáez *et al.*, 2021).

Amidy auxinů jsou skupinou sloučenin, ve kterých je IAA konjugována s aminokyselinami, malými peptidy a proteiny, přičemž nejlépe jsou charakterizovány nízkomolekulární konjugáty IAA-aminokyselina (IAA-AA), které slouží jako zásobní forma IAA. IAA-amidová vazba je syntetizována skupinou IAA acyl amidosyntetas z rodiny GRETCHEN HAGEN 3 (GH3), které v rostlinách zprostředkovávají reakci na biotický a abiotický stres (Staswick *et al.*, 2005). Zvýšené koncentrace auxinu vedou k silné indukci GH3 enzymů. U *A. thaliana* se vyskytuje 19 různých proteinů GH3, které jsou na základě substrátové specifity a sekvenční homologie klasifikovány do tří skupin (I až III) (Staswick *et al.*, 2005). Zatímco první skupina GH3 proteinů konjuguje kyselinu jasmonovou s isoleucinem (Staswick a Tiryaki, 2004), třetí skupina, specifická především pro čeleď *Brassicaceae*, obsahuje proteiny, které jsou pravděpodobně aktivní při metabolismu benzoátů (Okrent *et al.*, 2009). Druhá skupina obsahuje enzymy (AtGH3.1, AtGH3.2, AtGH3.3, AtGH3.5, AtGH3.6 a AtGH3.17) konjugující auxiny a její členové jsou jako jediní zapojení do konjugace oxIAA s aminokyselinami (Brunoni *et al.*, 2023). Nejhojněji zastoupené aminokyselinové konjugáty IAA v rostlinné říši tvoří IAA s aspartátem (IAA-Asp) a glutamátem (IAA-Glu) (Östin *et al.*, 1998; Novák *et al.*, 2012). Kromě

těchto aminokyselin se mohou v určitých rostlinách tvořit konjugáty IAA s alaninem, leucinem, tryptofanem, glycinem, valinem či fenylalaninem (Pěňčík *et al.*, 2009). Kromě enzymů GH3 se na metabolismu auxinu podílí také skupina aminohydrolas: IAA-LEUCINE RESISTANT 1 (ILR1) a ILR1-like (ILL), které hydrolyzují IAA-konjugáty aminokyselin zpět na volnou IAA, přestože se dříve předpokládalo, že tato hydrolýza u IAA-Asp a IAA-Glu neprobíhá (Brunoni *et al.*, 2023; Hayashi *et al.*, 2021).



Obr. 3: Schéma hlavních metabolických drah IAA v rostlinách. Jednotlivé šipky označují příslušnou metabolickou dráhu. Přerušované šipky označují enzymatické dráhy, které doposud nebyly ještě plně objasněny. Modrou barvou jsou znázorněny amidové konjugáty (IAA-AA, oxIAA-AA) syntetizované GH3 enzymem, žlutá barva znázorňuje jednotlivé oxidační konjugáty (oxIAA, oxIAA-AA, oxIAA-Glc) oxidované DAO1 proteinem, zelená barva označuje glykosylované konjugáty (IAA-Glc, oxIAA-Glc) katalyzované UGT74D1 a UGT84B1 a červená barva značí methylovaný ester (MeIAA) syntetizovaný IAMT1 (převzato a upraveno podle Zhang a Peer, 2017 a Casanova-Sáez *et al.*, 2022).

Volná, aktivní IAA nebo vzniklé konjugáty mohou být v rostlinách dále inaktivovány oxidací katalyzovanou proteinem DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION (DAO) za vzniku oxIAA, oxIAA-glukosy (oxIAA-Glc) či oxIAA-aminokyselin (oxIAA-AA) (Porco *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Konjugát oxIAA-aspartát (oxIAA-Asp) dále metabolizuje na odpovídající vysokomolekulární oxIAA-peptidy (Riov a Bangerth, 1992) nebo může být zpětně hydrolyzován na oxIAA a následně oxidován na 3-hydroxy-oxIAA (Tsurumi a Wada, 1986; Hayashi *et al.*, 2021). Po oxidaci aminokyselinových konjugátů dochází k jejich hydrolýze prostřednictvím ILR1/ILL za vzniku neaktivních oxIAA (Brunoni *et al.*, 2023), která si však pravděpodobně zachovává určitou míru aktivity při stresu (Casanova-Saéz *et al.*, 2022). Kromě nejrozšířenějších a nejvíce zastoupených konjugátů oxIAA-glutamátu (oxIAA-

Glu) a oxIAA-Asp, byly v poslední době identifikovány dva nové metabolity, a to oxIAA-leucin a oxIAA-fenylalanin (Hladík *et al.*, 2023; Brunoni *et al.*, 2023).

Dalším z reversibilních konjugátů IAA je MeIAA, jenž slouží jako zásobní forma auxinu v rostlinách (Zubieta *et al.*, 2003). Jedná se o nepolární sloučeninu, která je v rostlinách transportována jednak pasivním influxem, tak i efluxem a přímo ovlivňuje gradient IAA (Li *et al.*, 2008). Zatímco methylace IAA na karboxylové skupině je zprostředkována IAA karboxymethyltransferasou 1 (IAMT1) (Zubieta *et al.*, 2003), hydrolýza MeIAA na IAA je umožněna působením methylesterasy 17 (MES17) (Yang *et al.*, 2008).

2.2.3 Transport

Nesčetné spektrum vývojových procesů je u rostlin řízeno rozdílnou distribucí auxinu. Nerovnoměrné koncentrace auxinu v rostlinných tkáních nebo orgánech jsou tvořeny na základě aktuálních exogenních podnětů či vnitřních procesech a vytváří tak pomyslné rozhraní mezi enviromentálními a endogenními signály (Zažímalová *et al.*, 2010).

Distribuce auxinu je v rostlinách realizována jednak na krátké, tak také na dlouhé vzdálenosti. Při transportu auxinu na dlouhé vzdálenosti se molekuly pasivně transportují prostřednictvím cévního systému floému z místa jejich syntézy (mladé listy a květy) do kořenů (Petrášek a Friml, 2009; Kochhar a Gujral, 2020). Transport auxinu na krátké i dlouhé vzdálenosti může taktéž probíhat i aktivním způsobem. Tento přenos, jenž je unikátní pro IAA, je zprostředkován volným přechodem přes plazmatickou membránu a jedná se o tzv. polární transport. Jelikož jsou auxiny slabé kyseliny a jejich schopnost pronikat přes plazmatickou membránu závisí na pH, jsou schopné volného průchodu do buňky pouze nedisociované molekuly IAA. Zatímco v apoplastu o pH 5,5 si auxin zachovává svoji nedisociovanou formu (IAAH), v prostředí cytoplazmy při pH 7,0 je ionizován a nachází se tak v disociované formě ($\text{IAA}^- + \text{H}^+$), která však již vyžaduje ke svému transportu pomoc membránových nosičů usnadňující příjem nebo export auxinu (Li *et al.*, 2006). Mezi tyto transportéry patří např. rodina proteinů PIN, ATP-binding cassette (ABC) podskupiny B (ABCB), AUX1/LAX proteiny nebo fosfoglykoproteiny (Petrášek a Friml, 2009; Kramer a Bennett, 2006; Zhou a Luo, 2018).

Arabidopsis obsahuje 8 druhů proteinů PIN běžné označované PIN1 až PIN8, které jsou děleny do dvou základních kategorií lišících se délkou hydrofilní smyčky uprostřed jejich polypeptidového řetězce (Zažímalová *et al.*, 2010; Petrášek a Friml, 2009). „Dlouhé“ tzv. kanonické PIN (PIN 1-4 a 7) vykazují převážně polární lokalizaci plazmatické membrány, kde určují směr toku auxinu a transportují auxin ven z buňky. Zatímco „krátké“ PIN (PIN5, PIN6 a PIN8) regulují výměnu auxinu mezi endoplazmatickým retikulem a cytolem, kde se rovněž také podílí na intracelulární distribuci auxinu a regulují buněčnou homeostázu auxinu (Zwiewka *et al.*, 2019).

Nejlépe reprezentovanou podskupinou ABC přenašečů je ABCB1 a ABCB19, které se vyznačují vysokou substrátovou specifitou a s vazebnou afinitou k inhibitoru transportu auxinu, kyseliny 1-naftylyftalamové (Zažímalová *et al.*, 2010; Petrášek a Friml, 2009). Dalším významným členem této skupiny je přenašeč ABCB4 transportující auxin při jeho nízkých koncentracích. Společně s ABCB1 a 19 se vyskytují převážně na plazmatické membráně. Jejich spolupůsobení s proteiny PIN zvyšuje substrátovou specifitu celkového transportu. Vstup do buňky zprostředkovává protein AUX1 a tři LAX (LAX1, LAX2 a LAX3) proteiny, které vychytávají auxiny v místech jejich vysoké koncentrace, např. v laterální kořenové špičce (Kramer a Bennett, 2006).

Auxiny se v kořenech podílejí na prodlužování délky kořenových vlásků pocházejících z epidermis, na počtu primordií laterálních kořenů nebo na délce primárního kořene (Péret *et al.*, 2009; Overvoorde *et al.*, 2010). Primárním mediátorem pohybu IAA v kořenové špičce je protein PIN1, který zajišťuje jeho přenos přes vaskulární tkáň ke špičce kořene, kde je následně prostřednictvím PIN2 redistribuován bazipetálně skrz kortikální a epidermální buňky do elongační zóny kořene, kde se podílí zejména na regulaci rychlosti prodlužování buněk. Za laterální přesměrování auxinů v elongační zóně jsou pak zodpovědné proteiny PIN2, PIN3 a PIN7 (Blilou *et al.*, 2005). Na přenosu auxinů do epidermálních buněk, kde posléze dochází k řízenému prodlužování buněk kořenových vlásků, se rovněž podílí i AUX1, jenž je bazálně lokalizován v buňkách kořenového protofloému (Jones *et al.*, 2009; Blakeslee *et al.*, 2005). Transportu auxinů v kořenové špičce je také ovlivněn sedimentací škrobových zrn (statolitů) pod vlivem gravitační síly, na základě, které dochází k redistribuci auxinu ve spodní straně kořene. Nadměrná akumulace auxinu na spodní straně vede nejen k inhibici prodlužování kořene, ale také k jeho ohýbání směrem dolů (Leyser, 1999).

2.2.4 Signalizace

Receptory fytohormonů jsou lokalizovány buďto na plazmatické membráně, endoplazmatickém retikulu nebo endozomech. Mohou se zároveň vyskytovat jak v nerozpustné, tak v rozpustné formě, a to buď v jádře nebo cytoplasmě. Zatímco receptory cytokininů a brassinosteroidů po vhodném podnětu spouštějí fosforylační kaskádu, receptory auxinu zprostředkovávají své reakce prostřednictvím řízené degradace proteinů mechanismem tzv. „molekulárního lepidla“. Signální dráha těchto receptorů je řízena SCF (Skp-Cullin-Fbox) komplexem, který je zodpovědný za polyubikvitinaci proteinů v eukaryotických buňkách (Larrieu a Vernoux, 2015).

Ubiquitin je polypeptid složený ze 76 aminokyselin, který je k proteinům přidáván posttranslačně. Jeho funkce spočívá v roli markeru degradace proteinů a translokace. Samotný SCF komplex je složen ze čtyř základních podjednotek: SKP1, CULLIN1, RBXX1 a variabilních proteinů FBoxu, které jsou třídou E3 ubikvitinových ligas. Substrát, který je komplexem přenesen k enzymu

konjugující ubikvitin E2, je následně polyubikvitinován a degradován proteazomem (Larrieu a Vernoux, 2015).

Na auxinové signalizační kaskádě se podílí zejména tři proteinové rodiny, do kterých patří koreceptory auxinů TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN (TIR1/AFB), transkripční represory Auxin/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA) a transkripční faktory AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) (Tomas *et al.*, 2013). Auxiny jsou v rostlinách nejprve rozpoznány a navázány na TIR1 receptor. Tato vazba má za následek zesílení interakce mezi proteiny F-boxu TIR1/AFB a Aux/IAA specifickou doménou. Toto vzájemné působení způsobuje ubikvitinaci Aux/IAA a její následnou degradaci proteasomem 26S vedoucí k uvolnění transkripčních faktorů ARF, jež jsou zodpovědné za zesílení transkripce mRNA reagující s auxiny (Allen a Ptashnyk, 2020; Larrieu a Vernoux, 2015; Dhasmasiri *et al.*, 2005). Proteiny Aux/IAA, jejichž lokalizace se nachází v jádře, obsahují čtyři konzervované domény (I až IV). Za samotnou degradaci proteinů je zodpovědná doména II, která se mimo jiné také podílí na regulaci vývoje a růstu rostlin (Dhasmasiri *et al.*, 2005). Při nízkých koncentracích auxinu dochází k navázání Aux/IAA na ARF, čímž je potlačena nejenom jeho aktivita, ale také transkripční schopnost (Allen a Ptashnyk, 2020). Zatímco vysoké koncentrace auxinu se podílejí na degradaci Aux/IAA proteinů, konkrétně jejich II. domény (Tiwari *et al.*, 2001).

V roce 2023 byla formulována hypotéza o roli cAMP (3',5'-cyklický adenosinmonofosfát) jakožto sekundárního posla v auxinové signalizaci (Qi a Friml, 2023). Zmíněný cAMP vzniká činností adenylátcyklasy (AC) z adenosintrifosfátu (ATP) a může být pak dále hydrolyzován cNMP fosfodiesterasami. Aktivita AC byla však také objevena v krátké C-koncové oblasti TIR1/AFB (Qi *et al.*, 2022). Zdá se tedy, že na signálním výstupu auxinových receptorů se kromě degradace Aux/IAA podílí také produkce cAMP. V současnosti však není AC aktivita TIR1/AFB spojená s degradací Aux/IAA plně potvrzena a stejně tak není zcela jisté, zda-li je cAMP dostačující k vyvolání následné transkripční odpovědi (Qi a Friml, 2023).

Předpokládalo se, že na auxinové signalizaci se také podílí AUXIN-BINDING PROTEIN 1 (ABP1), pozdější nálezy však ukázaly, že letalita embrya nebyla způsobena porušením genu *abp1*, ale jeho sousedního genu *bsm* (Michalko *et al.*, 2015). Signální dráha ABP1 tak zůstává nadále předmětem zkoumání, jelikož se ukázalo, že tyto dráhy jsou zprostředkovány TIR/AFB dráhou (Li *et al.*, 2021). Jelikož je však pH v endoplazmatickém retikulu příliš vysoké pro účinnou vazbu auxinu (optimální pH je mezi 5,0-6,0), k jeho navázání s ABP1 zde nedochází (Paciorek a Friml, 2006). Pro výstup molekul auxinu z vazebného místa ABP1 byly identifikovány tři hlavní cesty. Kromě cesty směřující k membráně rostlinných buněk, vedou zbylé dvě do vodného prostředí (Bertoša *et al.*, 2008). Tvar ABP1 je determinován β -barelovou strukturou, do které se váže auxin. Ve vazebném místě se mohou vyskytovat kovové ionty (zinek nebo měďnatý kationt), s kterými auxin interaguje prostřednictvím své karboxylové kyseliny a jeho aromatická část je zachycena hydrofobními zbytky

uvnitř β -barelu (Hayashi, 2012). Mechanismus rozpoznání ABP1 auxiny je zcela odlišný od mechanismu receptorů TIR1/AFB, je proto zcela možné, že některé umělé auxiny mohou mít selektivní aktivitu pro TIR1/AFB nebo ABP1. Deaktivace ABP1 způsobila narušení regulace prodlužování buněk a taktéž buněčného dělení. Kromě toho také vykazovali změnu v genové expresi citlivou na auxiny (Braun *et al.*, 2008; Tromas *et al.*, 2009). Studium heterozygotního *abp1/ABP1* mutanta vykazovala defekty v některých odpovědích souvisejících s auxinem, včetně vyššího úhlu sklonu kořenů, kořenů a hypokotylů. ABP1 se tedy jednak podílí na regulaci exprese některých sad genů reagujících na auxiny, ale také na regulaci polárního transportu auxinu, který řídí místní koncentraci auxinu (Effendi *et al.*, 2011).

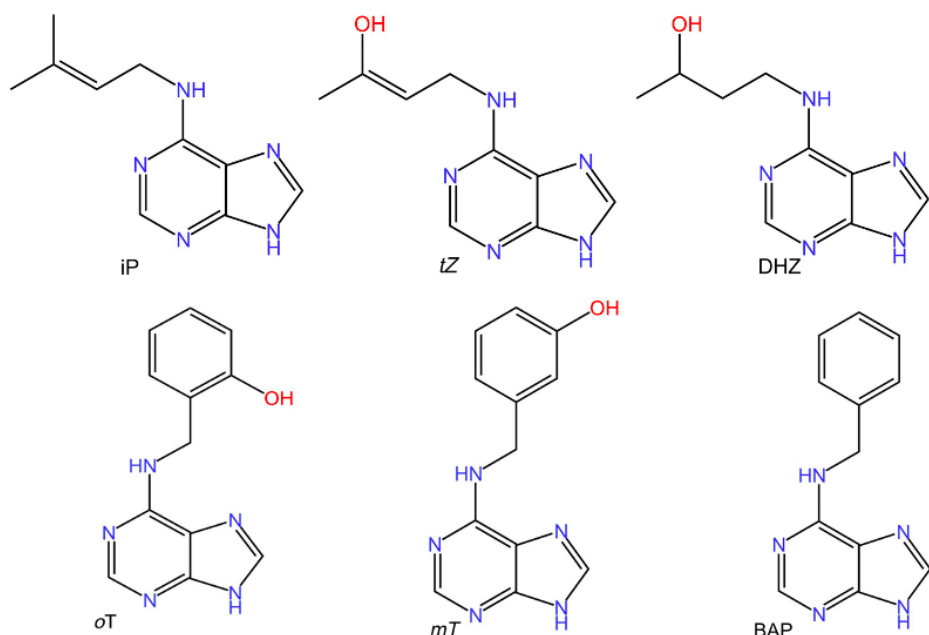
Kromě výše uvedených proteinů se auxiny mohou také vázat na F-box S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A (SKP2A), proteinu schopného spojovat signalizaci auxinu s buněčným dělením. V *A. thaliana* se vyskytuje kromě SKP2A, který je zodpovědný za řízení stability nejméně dvou transkripčních faktorů buněčného dělení (E2FC a DPB), také SKP2B, jenž je zodpovědný naopak za degradaci inhibitoru cyklin-dependentní kinasy KRP1 (Del Pozo *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 2010). Je tedy zřejmé, že navzdory své vysoké podobnosti jsou tyto dva proteiny vzájemnými antagonisty. Mutace v SKP2A vedou nejenom ke snížené schopnosti vázat auxiny, ale také k neschopnosti indukovat buněčné dělení v kořenovém meristému (Jurado *et al.*, 2010).

2.3 Cytokininy

Cytokininy jsou důležitou skupinou rostlinných hormonů, jenž hrají klíčovou roli v mnoha fyziologických a vývojových procesech. Prostřednictvím morfogeneze, růstu postranních pupenů, expanzí a zpomalením stárnutí listů jsou zodpovědné za regulaci růstu a vývoje rostlin. Taktéž se podílejí na buněčném dělení, diferenciaci a stárnutí včetně odolnosti vůči stresu (Davies, 2010). Kromě toho byla také prokázána schopnost těchto látek ovlivňovat růst a vývoj lidských nádorových buněk nebo kožních fibroblastů (Rattan a Sodagam, 2005; Berge *et al.*, 2006; Ischii *et al.*, 2003). Na rozdíl od auxinu jsou cytokininy primárně syntetizovány v kořenech, ze kterých jsou postupně transportovány do míst jejich působení (Davies, 2010).

Cytokininy jsou N^6 -substituované deriváty adeninu nesoucí alifatický postranní řetězec isoprenoidního (isoprenoidní cytokininy) nebo aromatického původu (aromatické cytokininy) (Obr. 3). Variace v postranním řetězci cytokininů a stereoizomerní konfiguraci rozdělují isoprenoidní cytokininy na typy isopentenyladeninu (iP), *trans*-zeatinu (tZ) dihydrozeatinu (DHZ) a *cis*-zeatinu (cZ). Zatímco *trans* forma tvoří aktivní cytokininy u všech rostlinných druhů, *cis* forma je aktivní pouze u určitých druhů a u *A. thaliana* vykazuje tato forma pouze omezenou cytokininovou aktivitu (Mok a Mok, 2001; Kieber a Schaller, 2014). Hlavními zástupci isoprenoidních cytokininů

u *A. thaliana* jsou tZ a iP, zatímco v jednoděložných rostlinách je hojně zastoupen zejména cZ (Hu a Shani, 2023). Do skupiny aromatických cytokininů patří kinetiny a deriváty s benzylovým zbytkem. Jedná se zejména o 6-benzylaminopurin (BAP) a *orto*-, *meta*- a *para*-topoliny (*o*M, *m*T a *p*T) a jejich metabolity (Mok a Mok, 2001).



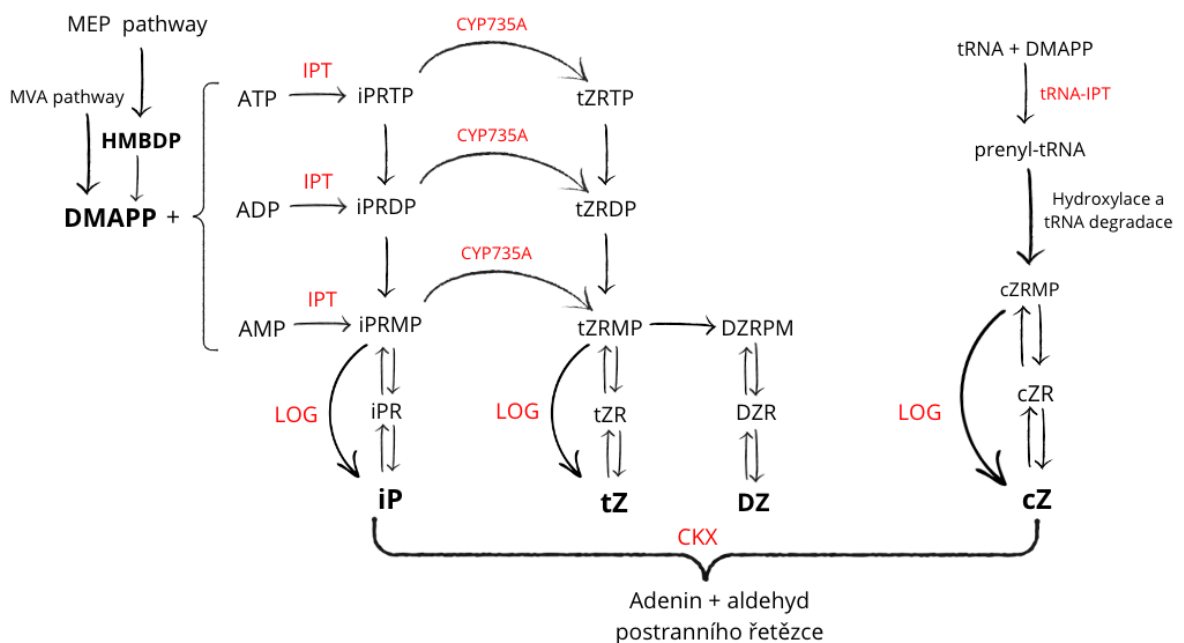
Obr. 3: Struktury základních isoprenoidních (horní řada) a aromatických (spodní řada) cytokininů: isopentyladenin (iP), *trans*-zeatin (tZ), dihydrozeatin (DHZ), *orto*-topolin (oT), *meta*-topolin (mT), 6-benzylaminopurin (BAP).

2.3.1 Biosyntéza

Jednou z přímé *de novo* dráhy pro biosyntézu cytokininů je považovaná isopentylace volných nukleotidů adeninu (Davies, 2010), v rámci které jsou adenosinové fosfáty enzymaticky přeměňovány na aktivní formy cytokininů prostřednictvím isopentyltransferasy (IPT) (Obr. 4), jejíž jednotlivé isoformy jsou exprimovány v závislosti na lokalizaci v rostlině (Takei *et al.*, 2001). V *A. thaliana* bylo identifikováno a popsáno celkem devět genů této rodiny (*Atipt1* – *Atipt9*) (Kakimoto, 2001, Takei *et al.*, 2001; El-Showk *et al.*, 2013). Výše uvedený enzym využívá produktu mevalonátové dráhy (MEP), dimethylallyldifosfátu (DMAPP), nebo metabolitu bakteriální MEP dráhy, hydroxymethylbutenyldifosfátu (HMBDP), k alkylaci AMP, ADP nebo ATP za vzniku isopentyladenosin-5'-trifosfát a isopentyladenosin-5'-difosfát (prekurzorů iP) (Hwang a Sakakibara, 2006). Dalším klíčovým enzymem jsou CYP735A1 a CYP735A2, pomocí kterých jsou prekurzory iP přeměněny hydroxylací isoprenodiniho postranního řetězce na *trans*-zeatin-difosfát či *trans*-zeatin-trifosfát až na výsledný tZ (Takei *et al.*, 2004, Frébort *et al.*, 2011). Kromě této, iP závislé dráhy, může být tZ tvořen přeměnou hydroxylovaného postranního řetězce odvozeného

z prekursoru HMBDP na adeninový kruh (Sakakibara *et al.*, 2005). Biosyntéza cytokininů může probíhat i jejich přímým uvolněním z nukleotidu v jednom enzymatickém kroku a to prostřednictvím monofosfátu fosforibohydrolasy (Longly Guy, LOG), jehož substrátem je ribosa-5'-monofosfát (Kurawa *et al.*, 2007). Kromě tohoto typu přeměny se předpokládá také interkonverze *cis*- a *trans*-zeatinu *cis-trans*-isomerasou, která však doposud nebyla prokázána (Trdá *et al.*, 2017).

Kromě adenylátové IPT existuje také tRNA-isopentyltransferasa (tRNA-IPT), která má ústřední roli v tzv. nepřímé dráze biosyntézy cytokininů (Mok a Mok, 1994). Tento enzym je zodpovědný za adici DMAPP na adenin vázaný v molekule tRNA, která je následně degradována na *cZ* a konjugáty cytokininů (Mok a Mok, 1994; Miyawaki *et al.*, 2006).



Obr. 4: Schéma biosyntézy cytokininů znázorňující jak přímou (levá strana), tak i nepřímou dráhu (pravá strana), včetně jejich degradace prostřednictvím cytokinin oxidasou/dehydrogenasou (CKX) (převzato a upraveno podle Sakakibara 2006).

2.3.2 Metabolismus

Koncentrace aktivních cytokininů v buňkách mohou být regulovány jednak konjugací s glukosou, anebo ireversibilním štěpením cytokinin oxidasami. *N*-glykosylace cytokininů za účasti glykosyltransferas (UGTs) probíhá primárně na dusíku v pozicích *N7* nebo *N9* purinového kruhu. Kdežto *O*-glykosylace probíhá na kyslíku v postranních řetězcích zeatinu nebo DHZ, např. pomocí zeatin-*O*-glucosyltransferasy (ZOG). Předpokládá se, že tyto glykosylované formy cytokininů působí jako stabilní zásobní formy hormonu, jelikož mohou být posléze přeměněny na aktivní cytokininy prostřednictvím β -glukosidas (Brzobohatý *et al.*, 1993). Glykosylované konjugáty tvoří neaktivní

formu cytokininů, které tak nejsou schopny se vázat na cytokininové receptory AHK (Spíchal *et al.*, 2004).

U *A. thaliana* bylo identifikováno celkem pět genů kódujících cytokininovou UGT, z čehož dva (*ugt76c1* a *ugt76c2*) konjugují většinu druhů cytokininů na pozici *N7* a *N9* adeninové skupiny, a tři další, jež kódují proteiny *O*-glykosylující *tZ* a *DHZ* (Hou *et al.*, 2004). Na rozdíl od *UGT76C2*, jehož narušení vede k poklesu cytokininových *N*-glykosidů a způsobuje nadměrnou přecitlivělost na exogenní cytokinin (Wang *et al.*, 2011), se změna ve funkci *UGT76C1* neprojevuje žádnými podstatnými účinky na růst a vývoj *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2013).

Hladiny biologicky aktivních cytokininů musí být striktně regulovány. Kromě výše zmíněné glykosylace mohou být taktéž degradovány oxidativním štěpením *N*⁶ postranního řetězce prostřednictvím cytokinin oxidasy/dehydrogenasy (CKX) vedoucí k tvorbě adeninu a aldehydu odvozeného od postranního řetězce (Galuszka *et al.*, 2001; Frébortová *et al.*, 2004). Tomuto štěpení podléhá zejména *tZ* a *iP* nesoucí nenasycené *N*⁶ na svém postranním řetězci, zatímco dihydrozeatin a *BAP* jsou vůči štěpení těmito enzymy odolné (Schmülling *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2006). Aktivitu CKX můžou negativně ovlivňovat, kromě *O*- a *N*-glykosylace, také některé syntetické cytokininy na bázi močoviny (Bilyeu *et al.*, 2001). V genomu *A. thaliana* bylo identifikováno sedm genů kódujících CKX, přičemž každý z nich vykazuje odlišnou expresi, intracelulární lokalizaci a enzymatické vlastnosti (Schmulling *et al.*, 2003). Nadměrná exprese některých z genů má za následek snížení koncentrace endogenního cytokininu a vede k řadě vývojových poruch (Bhargava *et al.*, 2013).

2.3.3 Transport

Cytokininy cestují napříč buňkami a jsou transportovány na dlouhé vzdálenosti do místa jejich cílového působení. Transport cytokininů na dlouhé vzdálenosti má za následek nerovnoměrnou distribuci jednotlivých typů v xylému a floému. V xylému tedy dochází k transportu přednostně *tZ* z kořene do prýtu, zatímco ve floému se nachází převážně *iP*, který je přenášen z prýtu do kořene (Hu a Shani, 2023; Takei *et al.*, 2001; Corbesier *et al.*, 2003).

Pohyb cytokininů přes membrány zprostředkovávají nukleosidové transportéry (ENT) a purinové permeasy (PUP), které umožňují přenos nejenom nukleotidů, ale také i jiných necytokininových purinových molekul (Bürkle *et al.*, 2003). Na transportu ribosidů *iP* a *tZ* se podílí tři ENT proteiny (ENT3, ENT6 a ENT7) (Kudo *et al.*, 2010; Hirose, 2008). Schopnost transportu adeninu a taktéž i cytokinových molekul (zejména *trans*-zeatinu) vykazují proteiny PUP rodiny a lze je tak označovat jednak jako cytokininové, ale rovněž také jako purinové transportéry. Za přenos bioaktivních cytokininů je zodpovědný PUP14, jež je lokalizován na plazmatické membráně (Zürcher *et al.*, 2016). Mezi další transportéry se řadí PUP7 a PUP21 nacházející se v tonoplastu, a společně s PUP8, jež se vyskytuje na plazmatické membráně, spolupracují na tvorbě modelu

signalizace cytokininů v apikálním meristému výhonku, čímž kontrolují nejenom velikost meristému ale také fyloxi a růst rostlin (Hu *et al.*, 2023). Kromě toho tyto dva přenašeče usnadňují pohyb cytokininů přes tonoplast a vyvažují tak jejich dostupnost v cytoplazmě (Hu a Shani, 2023).

Transport zeatinových cytokininů je zprostředkován ATP-vazebným transportérem (ABC) skupiny G14, který umožňuje přenos z kořenů do prýtu (Ko *et al.*, 2014). Jedná se o prvně popsany přenašeč, který je lokalizovaný v plazmatické membráně a exprimovaný v pericyklu a doprovodných buňkách floému kořene *A. thaliana* (Zhang *et al.*, 2014).

AZA-GUANINE RESISTANT (AGZ) patří mezi další membránové transportéry cytokininů. Zatímco se AGZ1 společně s PIN1 nachází v kořenových buňkách, AGZ2 převažuje v kořenových primordiích a je lokalizován v endoplazmatickém retikulu a plazmatické membráně, kde modifikuje distribuci cytokininů k zabránění vzniku laterálního kořene (Hu a Shani, 2023).

2.3.4 Signalizace

Rostliny vnímají a reagují na cytokininy prostřednictvím vícestupňové fosforylační dráhy srovnatelné s bakteriálním dvoukomponentním systémem, který se typicky skládá z receptorové histidinové kinasy (HK) a regulátorů odpovědi (RR) (Hwang *et al.*, 2001). U rostlin je však tento proces podstatně komplikovanější v důsledku většího počtu přenašečů fosfátových skupin. Signál je zde veden vícestupňovou His-Asp fosforylací (Horák a Lexa, 2003).

U *A. thaliana* se nacházejí tři transmembránové histidinkinasy (AHKs) fungující jako cytokininové receptory: AHK2, AHK3 a AHK4/CRE1/WOL1, které jsou lokalizované především na endoplazmatickém retikulu a také na plazmatické membráně (Inoue *et al.*, 2001; Hwang a Sheen, 2001). Zatímco AHK2 a AHK3 hrají klíčovou roli v růstu a vývoji výhonku, AHK4 je nezbytný pro normální růst a vývoj kořene, kde je také vysoce exprimován (Higuchi *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2001).

Všechny tři AHKs mají podobnou strukturu, která se skládá z extracelulární a intracelulární oblasti, která obsahuje histidinkinasové a C-terminální domény podílející se na přenosu signálu. Kromě této domény se zde nachází také doména k ní homologní, jež postrádá některé vysoce konzervované zbytky (Higuchi *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2004). V extracelulární části se nachází CHASE vazebná doména, která obsahuje cca 200-230 aminokyselinových zbytků schopné vázat cytokininy (Anantharman a Aravind, 2001). Při zaznamenání signálu vstupní doménou sensorové kinasy dochází k autofosforylaci histidinkinasové domény na jejím histidinovém zbytku. Informace je dále přenášena na histidinové fosfotransmitterové proteiny (Kakimoto, 2003), které v jádře fosforylací aktivují ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) typu B, na základě kterých pak dochází k iniciaci transkripce cílových genů. Existují dvě třídy ARR lišící se vzájemně svými strukturálními rysy, a to typ A a typ B (Imamura

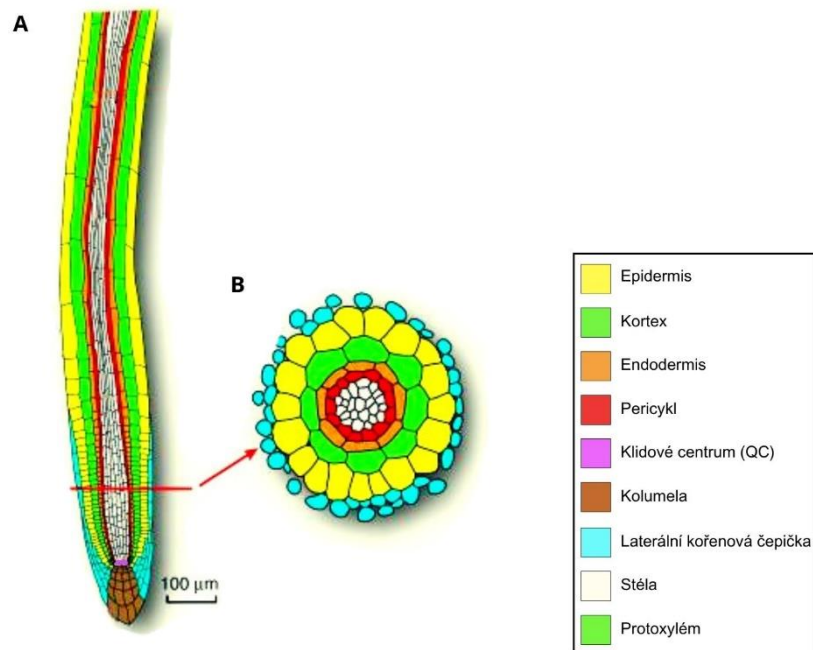
et al., 1999; Mizuno, 2004), jejichž mechanismus účinku je na principu negativní zpětné vazby (Hwang a Sheen, 2001; To *et al.*, 2004). Důležitou roli v *A. thaliana* zastávají ARR1, ARR10 a ARR12 typu B, jež mají klíčovou roli v AHK4-dependentní signální odpovědi na cytokininy v kořenech a jsou tak nezbytné pro správný vývoj kořenů (Ishida *et al.*, 2008; Yokoyama *et al.*, 2007).

2.4 Kořenová špička

Kořen a stonek tvoří osu rostlinného těla. Jeho stavba se však v mnohých ohledech liší od stavby stonku a to například tím, že není podélně členěn, je bezlistý a nevznikají na něm laterální orgány, v důsledku čehož má i jednodušší vnitřní strukturu (Evert *et al.*, 2006). Jeho hlavní funkce spočívá v příjmu vody a živin z půdy, a také se také podílí na gravitopickém růstu a stabilitě rostliny.

Špička kořene je podél proximálně-distální osy složena z několika odlišných vzájemně překrývajících se vývojových zón (Obr. 5). Na špičce kořene se nachází kořenová špička, kterou tvoří buňky zvané jako statocyty obsahující přesýpavá škrobová zrna statolity, které prostřednictvím sedimentace pomáhají rostlině růst ve směru gravitace (Evert *et al.*, 2006). Na špičku navazuje klidové centrum („*Quiescent Centrum*“ = QC), které podporuje buňky k nepřetržitému dělení a tím i produkci nových buněk. Buňky v blízkosti QC se prostřednictvím opakujícího se dělení vytěsňují z kořenové meristemické zóny, ve které dochází ke zpomalení rychlosti buněčného dělení a je místem buněčné expanze. Na tuto zónu navazuje zóna prodloužení (elongační), ve které se jednotlivé buňky prodlužují. V poslední zóně, diferenciací, postupně dozrávají buňky z předchozí zóny do plně diferenciovaných buněk. Konec této zóny je ohraničen epidermálními buňkami, které posléze dozrávají v kořenové vlásky (Dolan *et al.*, 1993; Overvoorde *et al.*, 2010).

V rámci příčného řezu apikálního meristému je kořen tvořen několika na sebe navazujícími vrstvami obklopující vaskulární pletivo, které je tvořeno protodermem a prokambiem (Scheres *et al.*, 2002). Základ středního válce u třídních *A. thaliana* tvoří vrstva pericyklu složeného v průměru ze dvanácti buněk, ke kterým přiléhají buňky protoxylému a protofloému obklopující vždy alespoň jednu pericyklickou buňku. Na tuto vrstvu plynule navazuje endodermis, jež je složena z osmi buněk, jejichž počet se může měnit v závislosti na stáří rostliny. Kůra (kortex), která na vnější straně přiléhá k epidermis, je stejně jako endodermis tvořena prstencem osmi buněk. Tyto buňky tvoří dva rozdílné typy, jejichž identita závisí na jejich poloze vzhledem ke kortikálním buňkám (Dolan *et al.*, 1993). Mezi buňky, které se jako první přestávají dělit, řadíme buňky vodivých pletiv (floému a xylému), zatímco buňky pericyklu se přestávají dělit jako poslední (Evert *et al.*, 2006).



Obr. 5: Proximálně-distální organizace kořene vznikající procesem buněčného dělení a expanzí čtyř typů iniciálních kmenových buněk sousedící s mitoticky neaktivními klidovými středovými buňkami (A). Řadíme mezi ně iniciály epidermální/laterální kořenové čepičky (vznik epidermis a laterálního kořenového uzávěru), iniciály kolumely (vznik centrální části kořenového uzávěru, iniciály kortexu a endodermu (tvorba základní tkáně) a iniciály vaskulární (vznik vaskulární tkáně a pericyklu). Znázornění radiální organizace buněk v průřezu nezralého kořenu (B) (převzato a upraveno podle Overvoorde *et al.*, 2010).

2.4.1 Rostlinné hormony v kořenové špičce *A. thaliana*

Vývojová adaptace rostlin je založena jednak na aktivitě jednotlivých meristémů, tak také na nepřetržité obnově kmenových buněk. Laterální kořenová špička je nejvzdálenější tkání kořenového meristému a zastává důležitou roli při vývoje kořene. Velikost kořenového meristému a následně i růst kořene závisí na poloze přechodové zóny, která odděluje diferencující se buňky. Pro kontrolu polohy přechodové zóny je rovněž důležitá i vzájemná interakce dvou fytohormonů – cytokininu a auxinu. Laterální kořenová špička slouží jako zásobárna auxinů, které v závislosti na cytokininech ovlivňují velikost meristému a růst kořenů (Di Mambro *et al.*, 2019).

Pokus o zjištění hladiny cytokininů a auxinů v kořenové špičce byl proveden v několika publikacích (Pettersson *et al.*, 2009; Pěnčík *et al.*, 2013; Antoniadi *et al.*, 2015). Antoniadi *et al.*, 2015 izolovala protoplasty kořínek mutantních rostlin *A. thaliana* exprimující zelený fluorescenční protein (GFP) ve specifických typech buněk. Předmětem studia byly buňky epidermis a kůry (linie *J2812:GFP*), dále pak stély (*pWOODEN LEG:GFP*), QC a endodermis (*pSCARECROW:GFP*) a kolumely s QC buňkami (*M0028:GFP*). Izolované protoplasty, které představovaly specifickou referenční populaci pro každý vzorek, byly rozříděny prostřednictvím fluorescenčně asistovaného buněčného sorteru (FACS) na protoplasty exprimující GFP (GFP+) a ty, jenž GFP neexprimují (GFP-). Podobně

i v práci Petersson *et al.* (2009) byla prostřednictvím FACS a hmotnostní spektrometrie vytvořena mapa distribuce IAA v kořenové špičce *A. thaliana* pro jednotlivé typy buněk v celkem 14 různých mutantních liniích. Měření IAA bylo provedeno v epidermálních, kortikálních, endodermálních a pericyklických buněčných vrstvách. Z výsledků analýz byla naměřena pětinasobná koncentrace IAA v buňkách QC proti negativní populaci. Stejně tak v kůře, endodermis a v apikální části stély byl naměřeno dvojnásobek IAA oproti okolním protoplastům. Nižší hladiny IAA byly zaznamenány jen u kolumely a epidermis. Z výsledku bylo taktéž patrné, že linie s obsahem QC buněk (např. *DR5:GFP*, *M0028*, *Q0990*) měli vyšší koncentrace IAA, než linie, které QC buňky neobsahovali (např. *PET111:GFP*, *pWOL:GFP*, *J2501*). Zvýšené koncentrace IAA však byly taktéž naměřeny u liniích exprimující GFP směrem ke kořenovému vrcholu, které QC buňky neobsahovaly (např. *J2501* nebo *pWOL:GFP*).

2.5 Analýza biologického materiálu

Všechny vývojové procesy rostlin jsou regulovány nízkými koncentracemi rostlinných hormonů. Jejich kvantitativní analýza je stále důležitější pro studium jejich biosyntézy, transportu, metabolismu a molekulárních regulačních mechanismů. Stopové koncentrace rostlinných hormonů jsou přítomné ve vysoce komplexních maticích s obsahem interferujících látek a jejich analýzu tak činí podstatně komplikovanější a složitější. Pro jejich přesné stanovení je tak nezbytná znalost analytických i chemických principů, které jsou základem extrakčních a purifikačních metod, včetně použití metodologie poskytující nízké detekční limity a vysokou selektivitu (Fu *et al.*, 2011). V důsledku významného rozvoje analytických technik v posledních letech, které splňují tyto vysoce kladené nároky na analýzu, došlo k výraznému vzestupu a pokroku v oblasti rostlinných hormonů s možností zaměřením se na jednotlivé metabolické či signální dráhy (Novák *et al.*, 2017; Isoda *et al.*, 2021). Jedna z novějších metod vyvinutá pro specifickou buněčnou analýzu auxinů a rovněž i cytokininů využívá fluorescenčně aktivovaného třídění buněk (Petersson *et al.*, 2009; Pěničák *et al.*, 2013; Antoniadis *et al.*, 2015).

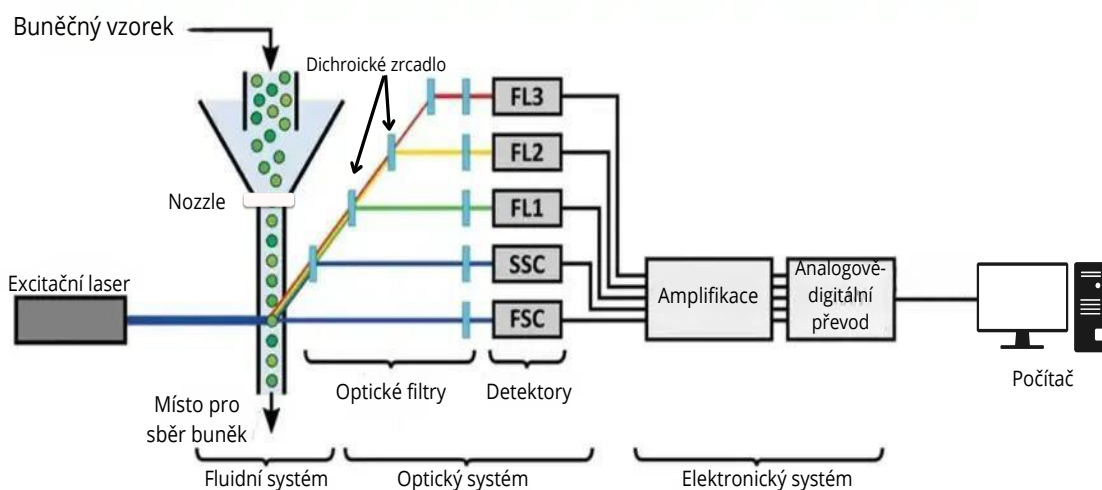
2.5.1 Fluorescenční průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (*flow cytometry*) je separační technika, která je schopna buněčné separace na základě určitých kritérií. Anglická zkratka „FACS“ („*Fluorescence-Activated Cell Sorting*“) pak vyjadřuje samotné průtokové třídění buněk poskytujících fluorescenční signál. Pomocí průtokového cytometru lze měřit odlišné fyzikální, biologické a chemické vlastnosti, a to až z 10^6 částic za minutu (Wulff, 2006). Jednotlivé buňky jsou detekovány ve velmi krátkém čase (několik milisekund), během kterého jsou zaznamenávány četné signály, jako je rozptyl světla nebo světla

emitované při fluorescenci ve viditelném spektru. Rozvojem elektroniky a informatiky tak mohou průtokové cytometry analyzovat a zaznamenávat cca 20 různých parametrů z každé částice rychlostí až 100 000 za sekundu. Průtoková cytometrie má tak dvě hlavní klíčové výhody. Tou první je tedy rozlišení velkého množství částic ve velmi krátkém čase a tou druhou je schopnost oddělení jednotlivých částic ze smíšených populací při rychlosti až 70 000 buněk za sekundu procesem zvaným jako třídění buněk (BD FACSCanto™ Clinical Flow Cytometry System).

K tomu, aby mohl průtokový cytometr zajišťovat své základní funkce, jsou nezbytné jeho tři základní části. Tu první tvoří fluidní systém, skrz který dochází prostřednictvím průtokové cely (tzv. *flow cell*) k oddělení a uspořádání částic vzorku do proudu jednotlivých částic, které mohou být poté zachyceny světelným zdrojem (Obr. 6). Tento jev se označuje jako hydrodynamická fokusace, pro jejíž vznik je nezbytné laminární proudění v průtokové komoře (Doležel *et al.*, 2007; Shapiro, 2003).

Sjednocení a rozdělení rozptýlených paprsků na základě jejich vlnové délky prostřednictvím filtrů a zrcadel na příslušné detektory zajišťuje optická část průtokového cytometru. Podle polohy umístění detektoru se rozlišuje tzv. přímý rozptyl (*forward scatter*; FSC), kde je detektor umístěn v ose dopadajícího paprsku a intenzita rozptýleného paprsku je přímo úměrná velikosti buňky. Zato u tzv. bočního rozptylu (*side scatter*; SSC) je detektor umístěn v úhlu 90° na dopadající paprsek a intenzita rozptýleného paprsku je zde přímo úměrná komplexitě buňky (Shapiro, 2003; Marinov, 2008).



Obr. 6: Schéma průtokového cytometru složeného z jeho třech základních částí. Fluidický systém obsahující tekutinu (pufr na bázi fyziologického roztoku nebo vodu) k nasměrování vzorku kolem laseru. Optický systém skládající se z laserů a fotonásobičů ke shromáždění signálu rozptýleného vzorkem. A elektrický systém převádějící signály z detektorů na signál digitální, jenž je zpracován a analyzován počítačem (převzato a upraveno podle https://microbiologynote.com/cs/flow-cytometry/#google_vignette).

Hlavním kritériem pro výběr laseru je dostupná excitační vlnová délka, která musí odpovídat absorpčnímu spektru fluorochromů a fluoroforů, neboli fluorescenčních barviv. Jedná se o chemické sloučeniny, které jsou schopné svými elektrony absorbovat fotony ze zdroje laserového světla a při jejich přechodu do základního stavu vyzařují energii ve formě fluorescence. Jelikož je velmi málo buněčných složek přirozeně fluorescenčních, jsou buňky obvykle barveny fluorescenčními sondami, které jsou schopné odhalit přítomnost částí, jež by za normálních okolností vidět nebyly. Například antigeny uvnitř nebo na povrchu buněk lze identifikovat pomocí protilátek značených fluorochromem, zatímco koncentrace DNA lze kvantifikovat pomocí fluorochromů, které mění své fluorescenční vlastnosti, jakmile jsou navázány na konkrétní buněčné složky. Mezi běžně používané DNA fluorochromy v rostlinných buňkách patří propidium jodid (PI) (Laimbeer *et al.*, 2017), ethidium bromid, 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) nebo Hoechst 33258 (Puite a Broeke, 1983; Doležel *et al.*, 2007). Zatímco prvně dva zmíněné fluorochromy se váží do DNA bez závislosti na typu bázi, DAPI se přednostně váže do oblasti DNA bohaté na AT a GC báze. Problémy může činit nízká permeabilita plazmatické membrány neporušených buněk a protoplastů pro většinu DNA fluorochromů, čemuž se dá částečně předejít ošetřením protoplastů fixačním činidlem (např. methanolem), které taktéž napomáhá odstranit autofluorescenční sloučeniny, jako je chlorofyl (Doležel *et al.*, 2007). První a některé dodnes používané fluorochromy jsou sloučeniny s relativně nízkou molekulovou hmotností. Jedním z jejich příkladů je fluoresceinisothiokyanát (FITC), který snadno fluoresceinuje proteiny za vzniku středně stabilních konjugátů s absorpčním píkem blížící se 488 nm, jenž je vhodný pro jednobarevné barvení. Za zmínku stojí také dva přírodní fluorofory, a to fykoerythrin, jehož molekulová hmotnost se ohybuje okolo 240 kDa nebo GFP. Posléze bylo vyvinuto mnoho dalších barviv s odlišnými spektrálními vlastnostmi, disponující vyššími kvantovými výtěžky a větší stabilitou. V diagnostických imunohematologických laboratořích se běžně vzorky barví dvěma, třemi nebo více fluorochromy. Poté jsou obvykle analyzovány v komerčních průtokových cytometrech vybavených jedním, dvěma nebo třemi zdroji laserového světla, které mohou detekovat signály FSC a SSC a tří až osm fluorescenčních signálů. Například FACS Aria III (BD Biosciences) může získávat data až v 16 kanálech (12 různých fluorescenčních barev). Kromě exogenních fluorochromů existují také endogenní fluorochromy. Jedná se o schopnost autofluorescence některých buněčných komponent, do kterých patří např. deriváty pyridinu (nikotinamidadenindinukleotid, nikotinamidadenindinkleotid fosfát), flaviny (flavinadenindinukleotid, flavinmonokleotid) či porfyriny (protoporfyrin), které fluoreskují v zelené, zeleno-oranžové a žluto-červené oblasti (McCarthy a Macey, 2007).

Jak již bylo uvedeno výše, k rozdělení rozptýleného světla a fluorescence emitované částicemi na základě rozsahu vlnových délek se používají dvě hlavní skupiny filtrů: barevné skleněné filtry a interferenční filtry. Barevné skleněné filtry dokáží absorbovat nežádoucí oblast vlnových

délek, a naopak propouštějí světlo v požadované oblasti, zatímco interferenční filtry sice propouští méně světla, ale umožňují větší selektivitu a disponují tak ostřejšími přechody mezi nežádoucí a požadovanou oblastí (Doležel *et al.*, 2007). K selekci světla a fluorescence na základě své vlnové délky na příslušné detektory se používají „*long pass*“ filtry, „*short pass*“ filtry, pásmové a dichroické filtry. Zatímco „*short pass*“ filtry propouští ty vlnové délky, které jsou kratší než daná vlnová délka, „*long pass*“ filtry propouští všechny vlnové délky, jež jsou delší než určitá vlnová délka. Pásmové filtry propouští jen vybrané pásmo vlnových délek a blokují ty nežádoucí. Určitou část světla propouštějí i dichroické filtry, které jsou umístěné pod úhlem 45° (Wulff, 2006; Marinov, 2008). Rozdělené světlo a fluorescence příslušnými filtry je pak následně zachycena a shromážděna příslušnými fotodetektory (fotodiody a fotonásobiče), které je převádí na elektrony. Vzniklý proud je pak prostřednictvím elektronické části převeden na digitální podobu zaznamenanou v počítači (Doležel *et al.*, 2007).

Třídícím kritériem může být kterýkoliv znak měřitelný průtokovým cytometrem. Podle principu fungování se dají třídíče rozdělit na elektrostatický kapénkový třídíč a fluidní *switch sorter*. Prvně zmíněný třídíč využívá elektrostatické síly, prostřednictvím kterých vychyluje nabitě kapky z hlavního proudu směrem k jedné z nabitých desek. Fluidní *switch sorter* využívá buďto piezoelektrický ventil, pomocí kterého dochází k vybočení proudu s částicí splňující stanovené kritéria mimo hlavní proud, anebo sběrnou trubicí, která se v případě identifikace stanovované částice vysouvá a zasouvá do středu toku proudu. Jeho výhodou je oproti kapénkovému třídíči, který pro změnu disponuje vysokou rychlostí separace a schopností třídít i velké částice (Macey, 2007; Robinson a Grégori, 2007; Ormerod, 2008).

2.5.2 Sortování protoplastů

Protoplasty jsou produkovány trávením polysacharidů rostlinné buněčné stěny prostřednictvím lytických enzymů produkovaných z hub a bakterií, které v přírodě způsobují uhnívání stromů (Doležel *et al.*, 2007). Vyznačují se dvěma základními znaky, které jsou využívány v případě průtokového třídění. V první řadě jsou větší než savčí buňky a jejich velikost je tak nepatrně menší než velikost standardních průtokových trysek (70 μm). V praxi se však pro třídění protoplastů nejčastěji využívá velikost trysek o průměru 100 až 200 μm . Druhým typickým znakem je, že jsou velmi křehké (Doležel *et al.*, 2007).

Samotné analýze a třídění předchází izolace protoplastů, jejíž stěžejním krokem je degradace buněčné stěny prostřednictvím enzymů. Jednou z možností, jež ve své práci použila Peterson *et al.* (2009), je kombinace dvou enzymů, a to pektolasy a celulyasinu rozpuštěné v izolačním pufru, ve kterém byly odříznuté kořeny inkubovány po dobu 2 hodin. Zbylá tkáň byla následně odstraněna filtrací přes buněčné síto a vyzolované protoplasty resuspendovány v PBS pufru (Peterson *et al.*,

2009; Jones *et al.*, 2010). Kromě výše zmíněných enzymů byla k izolaci protoplastů použita také celulasa, hemicelulosa nebo pektinasa (Avila-Peltroche *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021).

Samotná průtoková analýza fluorescenčních signálů produkovaných protoplasty může být provedena na základě přítomnosti endogenních fluoroforů představující přirozeně fluoreskující sloučeniny nacházející se v rostlinných buňkách nebo exogenních fluoroforů, v případě kterých jde o molekuly, které vznikly přidáním fluorescenční organické molekuly nebo transgenní exprese (třída proteinů označovaných jako fluorescenční proteiny). Průtokovou analýzu však lze provést také po barvení protoplastů pomocí specifických fluorochromů (Doležel *et al.*, 2007).

2.5.3 Purifikace rostlinných hormonů

Kromě velmi nízkých koncentracích se u analýzy rostlinných hormonů potýkáme také s koexistencí jiných endogenních organických sloučenin, které mohou se stanovovanými látkami interferovat. Z toho důvodu je velmi důležité vybrat vhodnou extrakční a purifikační metodu, která dokáže nejen odstranit rušivé látky, ale také obohatit cílové sloučeniny z komplexních rostlinných extraktů (Fu *et al.*, 2011).

Vhodný výběr purifikace závisí na chemické povaze cílových hormonů, typu analýzy a taktéž na výběru analytického přístroje. Mezi nejvíce rozšířené techniky se řadí extrakce kapalina-kapalina (LLE) nebo extrakce na pevné fázi (SPE). Při LLE dochází k separaci sloučenin na základě jejich rozpustnosti ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách (Fu *et al.*, 2011). Jedná se obvykle o systém vody a organických rozpouštědel s vodou nemísitelných, mezi které patří např. methanol, hexan, ether nebo chloroform (Kowalczyk a Sandberg, 2001; Novák *et al.*, 2008; Kojima *et al.*, 2009). Zatímco extrakce na pevné fázi využívá k separaci SPE kolonu, na které jsou zachyceny stanovované sloučeniny na základě svých fyzikálně-chemických vlastností. Tyto kolony jsou plněny pevnými sorbenty, které vážou rostlinné hormony prostřednictvím hydrofobních, polárních nebo iontových interakcí. Rušivé nebo interferující látky jsou odstraněny promytím vhodným rozpouštědlem a stanovované látky jsou následně eluovány pomocí rozpouštědla, které naruší vzniklé vazby mezi hormony a sorbentem v koloně (Tarkovská *et al.*, 2014). Vzhledem ke komplexním interferenčním sloučeninám, které mohou být přítomny v rostlinných extraktech, se používá kombinace více druhů sorbentu (Fu *et al.*, 2011).

Pro extrakci fytohormonů existuje široká škála vysoce kvalitních SPE kolon, které disponují řadou separačních režimů. Mezi ty nejčastěji využívané se řadí extrakce na reverzní fázi (C18) (Novák *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2017), iontová výměna (Cao *et al.*, 2016), polymerní reverzní fáze (např. Oasis HLB) či polymerní sorbenty se smíšeným principem záchytu (Oasis MAX nebo Oasis MCX) (Balcke *et al.*, 2012, Jikumaru *et al.*, 2013). Smíšený režim s reverzní fází a iontoměničovou extrakcí je jednou z možných kombinací pro účinnou separaci a purifikaci cytokininů (Fu *et al.*, 2011).

Purifikaci auxinu lze provést například pomocí SPE s reverzní fází, se smíšeným režimem nebo imunoafinitní extrakcí (Tarkowská *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2017).

U vzorků o velmi nízkých koncentracích lze zvýšit citlivost analytické metody miniaturizovanými technikami, které umožňují rychlejší analýzu, disponují nižší finanční náročností a nevyžadují velké objemy vzorku a rozpouštědel. Kromě toho napomáhají minimalizovat ztráty analytu, čímž zvyšují výtěžnost stanovované látky (Svačinová *et al.*, 2012; Pěničik *et al.*, 2018). Mezi techniky, které se dříve používaly pro izolaci auxinu, patří mikroextrakce na pevné fázi (μ SPE) (Liu *et al.*, 2007), mikroextrakce na pevné fázi pomocí plněných špiček (μ -SPE-PT) (Liu *et al.*, 2012) a magnetická SPE (Zhang *et al.*, 2010). Pěničik *et al.* (2018) ve své práci vyvinuli metodu pro purifikaci auxinu pomocí μ -SPE-PT, v rámci které byly jednotlivé kolony, v podobě pipetovacích špiček, plněny sorbenty několika typů (C18, C8, SDB-RPS, Oasis HLB). Obdobně ve své práci Svačinová *et al.* (2012) purifikovala cytokininy pomocí StageTips, kde byly jednotlivé špičky naplněny třemi typy sorbentů: C18, SDB-RPS a Cation-SR. Pro purifikaci a kvantifikaci šesti endogenních brassinosteroidů byla vyvinuta matricová disperze na pevné fázi (MSPD) s tandemovou anexovou výměnou a smíšenou kationtovou výměnou (MCX), pomocí které byly eliminovány polární a ionizované sloučeniny a ty nepolární byly účinně odstraněny dispergačním činidlem používaným v MSPD (Wang *et al.*, 2014).

2.5.4 LC-MS/MS ve stanovení rostlinných hormonů

Pokrok v identifikaci a kvantifikaci rostlinných hormonů je úzce spjat se zdokonalením technologie hmotnostní spektrometrie (MS) za poslední desetiletí. Pro separaci rostlinných hormonů jsou hojně využívány tandemové hmotnostní spektrometry (MS/MS), které jsou nejčastěji v kombinaci s plynovou chromatografií či kapalinovou chromatografií (LC). Tyto přístroje zajišťují vysokou citlivost a selektivitu, čímž umožňují analýzu stopových koncentrací analytů v komplexních biologických matricích. Kvantifikace rostlinných hormonů (jako např. IAA, kyselina abscisová, gibbereliny) se nejčastěji provádí purifikací pomocí vhodných adsorbentů, kterými mohou být oxid křemičitý nebo polymerní sorbenty, a následnou analýzou pomocí LC-MS/MS (Balcke *et al.*, 2012; Novák *et al.*, 2017). Pro analýzu auxinů nebo cytokininů se kromě klasické LC kombinuje tandemová hmotnostní spektrometrie s ultra-vysokouúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC), která je schopná vlivem vysokého tlaku velmi rychlé separace s vysokou účinností (Nguyen *et al.*, 2006; Novák *et al.*, 2008; Novák *et al.*, 2012; Svačinová *et al.*, 2012).

2.5.4.1 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je typ separační metody, v rámci které je analyt separován v prostředí dvou vzájemně nemísitelných fází; mobilní (MF) a stacionární fází (SF). V případě kapalinové chromatografie je MF kapalina a SF může být buďto pevný absorbent nebo imobilizovaná kapalina.

Samotná separace probíhá v chromatografické koloně, ve které je analyt určitou dobu zadržován SF na základě svých vlastností. K separaci fytohormonů se velmi často používá separace na reverzní fázi (reverse phase; RP), při které má SF nepolární (např. silikagel s navázaným C18 řetězcem) a MF polární povahu (nejčastěji směs vody s acetonitrilem nebo methanolem) (Balcke et al., 2012; Floková et al., 2014). Analyt je pak separován na základě své polaritě, kdy nepolární látky jsou RP zadržovány více než ty polární (Fu et al., 2011; Nguyen et al., 2006;).

2.5.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda založena na separaci jednotlivých molekul daného analytu podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) fragmentu. Princip této metody je založen na ionizaci sloučenin analytu s následnou tvorbou nabitých molekul, které interagují s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Jeho využití lze nalézt při identifikaci neznámých látek, určení izotopového složení prvků anebo při stanovení struktury analytu. Z hlediska kvantitativního využití můžeme pomocí MS stanovit jednotlivé prvky ve směsích. Hmotnostní spektrometr je složen ze tří základních částí: iontový zdroj, analyzátor a detektor (Tarkowski et al., 2009; Fu et al., 2011).

Iontový zdroj je nezbytnou součástí hmotnostního spektrometru a jeho hlavním úkolem je ionizovat molekuly plynu na ionty. Při tomto procesu pak mohou vznikat kladně nebo záporně nabitě ionty (M^+ , M^-). Na základě dodané energie při ionizaci lze iontové techniky dělit na tzv. „tvrdé“ a „měkké“. Hlavním zástupcem „tvrdé“ ionizace je elektronová ionizace, v rámci které je plynný analyt ionizován proudem dopadajících elektronů. Nevýhodou tohoto typu ionizace je vícenásobná fragmentace molekuly v iontovém zdroji, která ztěžuje jejich identifikaci. Tento nedostatek byl odstraněn rozvojem dalších ionizačních technik, mezi které patří chemická ionizace, při které je dochází k ionizaci nejprve reakčního plynu (např. methan) a až poté je ionizován samotný analyt. Molekuly analytu lze ionizovat také pomocí vysokého napětí (elektrosprej, ESI), elektrického výboje, nebo prostřednictvím laseru za současného využití vhodné matrice. Z důvodu vysoké citlivosti a nízké interference pozadí se stal zástupce měkkých ionizačních technik, ESI, nejpoužívanějším iontovým zdrojem používaným v LC-MS (Fu et al., 2011).

Ionizované molekuly vstupují do hmotnostního analyzátoru, ve kterém dochází k separaci nabitých iontů na základě m/z . Celý tento děj probíhá ve vakuu. V současnosti je k dispozici mnoho různých typů analyzátorů, které separují molekuly analytu na základě odlišných parametrů a různé propustnosti iontů na detektor za využití statického, elektrického nebo magnetického pole. Mezi ty nejběžnější patří kvadrupólový analyzátor, analyzátor doby letu, iontové pasti, iontové cyklotronové rezonance nebo orbitrap (Friedecký a Lemr, 2012).

Poslední část MS tvoří detektor, který zaznamenává průchody jednotlivých iontů vybrané příslušným analyzátozem a převádí je do digitální podoby. Podle schopnosti detekce iontů se

detektory dělí do dvou skupin. První skupina detektorů je schopna zaznamenat všechny ionty bez ohledu na velikosti m/z . Jejich princip spočívá v přímém měření elektrického proudu, jenž je generovaný srážkou iontů s dynodou a následně zesílen prostřednictvím násobičů (nejčastěji elektronové násobiče). Druhá skupina detektorů zaznamenává ionty v závislosti na velikosti m/z , kdy jsou ionty snímány jako komplexní „proudový obraz“ všech vyskytujících se iontů s různými hodnotami m/z a signál je pak zpracován Fourierovou transformací (Friedecký a Lemr, 2012).

Pro identifikaci a kvantifikaci složitějších maticí se stopovými koncentracemi se v současnosti používá technika tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), a to převážně trojitý kvadrupól (Novák et al., 2017). Tato technika spočívá v selekci prekurzorového iontu na základě svých vlastností prostřednictvím prvního analyzátoru, následné fragmentaci v kolizní cele pomocí kolizního plynu, což vede k získání specifických iontových fragmentů. Tyto produktové ionty poté vstupují do druhého kvadrupólu, kterým mohou procházet na detektor, nebo bývá selektován pouze jeden fragment, který je detekován (v tzv. *multiple reaction monitoring* mód, MRM). Tento mód spojuje vysokou citlivost s velkým dynamickým rozsahem a nabízí proto optimální řešení pro analýzu rostlinných hormonů (Fu et al., 2011; Pan a Wang, 2009).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Biologický materiál

Arabidopsis thaliana (huseníček rolní), ekotyp Columbie 0 (Col-0)

Arabidopsis thaliana, mutantní linie J2812 (Petersson *et al.*, 2009)

Arabidopsis thaliana, mutantní linie J0571 (Birnbaum *et al.*, 2003)

Arabidopsis thaliana, mutantní linie pWOL:GFP (Birnbaum *et al.*, 2003)

Arabidopsis thaliana, mutantní linie J2501 (Petersson *et al.*, 2009)

Arabidopsis thaliana, mutantní linie M0028 (Swarup *et al.*, 2005)

Mutantní linie byly poskytnuty od prof. Karin Ljung – Umeå Plant Science Centre, Umeå (Švédsko)

3.2 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy – Satorius Weighing Technology GmbH (Německo)

Autokláv Labo MLS-3781L – Sanyo (Japonsko)

BD FACSAria™ III Cell Sorter – BD Biosciences (USA)

Buněčné sítko (40 µm) – VWR (USA)

Centrifuga Biofuge stratos – Thermo Scientific (USA)

Centrifuga MIKRO 220R – Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Německo)

Centrifugační zkumavky s kónickým dnem (15 a 50 ml) – VWR (USA)

Čtvercové Petriho misky pro výsev *A. thaliana* – Greiner bio-one (Rakousko)

Extrakční disky:

Cation-SR – Affinisep (Francie)

SDB-XC Empore™ – Merck KGaA (USA)

C18 Empore™ – Merck KGaA (USA)

Konfokální mikroskop Zeiss LSM 800 – Zeiss (Německo)

Laminární box Heraguard™ ECO – Thermo Fisher Scientific (USA)

Chromatografická kolona – Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (150 x 2,1 mm; 1,7 µm) – Waters (USA)

Chromatografická kolona – Kinetex C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm) – Phenomenex (USA)

Magnetická míchačka AREX 6 Digital – VELP Scientifica (USA)

MicroSpin filtr (Nylon; 0,2 µm) – Chromservis s.r.o (Česká republika)

Oasis HLB kolony (30 mg/1 ml) – Waters (USA)

Oasis MCX kolony (30 mg/1 ml) – Waters (USA)

pH metr Eutech Instruments pH 700 MM 2a – Thermo Scientific (USA)
Sada automatických pipet – Eppendorf (Německo); Thermo Scientific (USA)
Systém HPLC-MS/MS – Agilent LC 1260 Infinity II systém s hmotnostním detektorem Agilent 6495B (Agilent Technologies, USA)
Systém UPLC-MS/MS – Acquity UPLC® I-class systém (Waters, USA) v zapojení s Xevo™ TQ-S MS (Waters MS Technologies, UK)
Vakuová rotační odparka Trigon-plus® RCT1010, Thermo Electron Corporation – Thermo Fisher Scientific (USA)
Vodní lázeň Büchi B-490 – BÜCHI Labortechnik (Švýcarsko)
Zařízení na úpravu vody Direct-Q® 3 UV – Milipore Corp. (Billerica, USA)

3.3 Chemikálie

Agar – Duchefa Biochemie B. V. (Nizozemsko)
Aceton – Lach-Ner s. r. o (Česká republika)
Amoniak (25%) – Merck KGaA (Německo)
BD FACS sheath fluid – BD Biosciences (USA)
Bovine Serum Albumin (BSA) – Sigma-Aldrich (USA)
Cellulase Onozuka R-10 – Duchefa Biochemie B. V (Nizozemsko)
Chlorid sodný – VWR Chemicals (Francie)
Chlorid vápenatý – Lach-Ner s. r. o (Česká republika)
Chlorid draselný – Lach-Ner s. r. o (Česká republika)
Deionizovaná voda – připravená v Direct-Q® 3 UV
Ethanol (96%) – VWR Chemicals (Francie)
Hydroxid draselný – Lach-Ner s. r. o (Česká republika)
Kyselina dusičná (65%) – Lach-Ner s.r.o (Česká republika)
Kyselina mravenčí (98%) – Merck KGaA (Německo)
MES (kyselina 2-(*N-morpholino*)ethansulfonová) – Carl Roth GmbH (Německo)
Macerozyme R-10 – Dufecha Biochemie B. V (Nizozemsko)
Mannitol – Lach-Ner s. r. o (Česká republika)
Methanol (> 99,9%) – Merck KGaB (Německo)
Murashige-Skoog médium – Duchefa Biochemie B. V (Nizozemsko)

Interní Standardy:

Auxiny: [¹³C₆]IAA – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo); [¹³C₆]IAA-Asp, [¹³C₆]IAA-Glu, [¹³C₆]oxIAA, – OlchemIm (Olomouc, ČR); [¹³C₆]IAA-Glc, [¹³C₄,¹⁵N]oxIAA-Asp, [¹³C₅,¹⁵N]oxIAA-Glu, [¹³C₆]oxIAA-Glc – Laboratoř růstových regulátorů (Olomouc, ČR)

Cytokininové báze (B): [¹³C₅]cZ, [¹³C₅]tZ, [²H₅]tZR, [²H₅]tZ9G, [²H₃]DHZ, [²H₃]DHZR, [²H₃]DHZ9G, [²H₆]iP, [²H₆]iPR, [²H₆]iP9G, [²H₇]BAP, [²H₇]BAPR, [²H₇]BAP9G, [¹⁵N₄]mT, [¹⁵N₄]oT, [¹⁵N₄]pT, [¹⁵N₄]mTR, [¹⁵N₄]oTR, [¹⁵N₄]pTR, [¹⁵N₄]mT9G, [¹⁵N₄]oT9G, [¹⁵N₄]pT9G, [¹⁵N₄]K; Cytokininové O-glukosidy (OG): [²H₅]tZOG, [²H₅]tZROG, [²H₇]DHZOG; Cytokininové nukleotidy (NT): [²H₅]tZRMP, [²H₃]DHZRMP, [²H₆]iPRMP, [²H₇]BAPRMP; Cytokininové N7-glukosidy: [²H₅]tZ7G, [²H₆]iP7G (vše Olchemim, Česká republika)

Propidium jodid – Thermo Fischer Scientificis (USA)

Sacharosa – Lach-Ner s.r.o (Česká republika)

Tween – Lach-Ner s.r.o (Česká republika)

3.4 Příprava roztoků

½ MS médium: Pro 1 l kultivačního média bylo naváženo 10 g sacharosu, 0,5 g MES a 2,2 g MS média, které byly rozpuštěny v 500 ml deionizované vody. Pomocí pH metru bylo prostřednictvím 0,1M roztoku hydroxidu sodného upraveno pH na 5,7. Roztok kultivačního média byl poté doplněn deionizovanou vodou do 1 l v odměrném válci a vzniklý roztok byl přelit do láhve s předváženými 10 g agaru. Médium bylo poté vysterilizováno v autoklávu a po vychladnutí rozlito do Petriho misek.

PB pufr: Pro přípravu 30 ml PB pufru bylo nejprve v odměrné zkumavce naváženo 2,187 g mannitolu, ke kterému bylo následně přidáno 600 µl připraveného roztoku 1M chloridu draselného, 1,2 ml 0,5M MES a 300 µl 1M chloridu vápenatého. Směs byla deionizovanou vodou doplněna na objem cca 25 ml a prostřednictvím 0,1M hydroxidu draselného bylo upraveno pH na 5,7. Poté byl objem doplněn na konečný objem 30 ml a do výsledného roztoku bylo přidáno 30 mg BSA. Část roztoku byla použita pro oplach odříznutých kořínků a do druhé části roztoku, jenž byl nejprve vyhřát ve vodní lázni při 42 °C, bylo přidáno cca 0,4 mg/ml Macerozymu a cca 1,5 mg/ml Cellulasy.

W5 pufr: Pro přípravu 20 ml pufru bylo přidáno a smícháno 100 µl chloridu draselného, 80 µl 0,5M MES, 2,5 ml chloridu vápenatého a 3,1 ml chloridu sodného. Vzniklý roztok byl poté doplněn deionizovanou vodou na objem 20 ml a prostřednictvím 0,1M hydroxidu draselného bylo pH upraveno na hodnotu 5,7.

70% FACS pufr: Pro přípravu 5 l roztoku bylo smícháno 3,5 l FACS „*Sheath fluid*“s 1,5 l deionizované vody.

50% kyselina dusičná: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 7,35 ml 68% kyseliny dusičné s 2,65 ml vody.

10% methanol: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 1 ml methanolu s 9 ml vody.

60% methanol: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 6 ml methanolu s 4 ml vody.

0,5M 25% hydroxid amonný v 60% methanolu: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 0,776 ml amoniaku, 5,534 ml 100% methanolu a 3,69 ml vody.

0,5M kyselina mravenčí: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 0,193 ml FA s 9,807 ml vody.

1M kyselina mravenčí: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 0,385 ml FA s 9,615 ml vody.

1,25M kyselina mravenčí: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 0,480 ml FA s 9,52 ml vody.

2M kyselina mravenčí: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 0,77 ml FA s 9,23 ml vody.

1M kyselina mravenčí v methanolu: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 0,385 ml FA s 9,615 ml methanolu.

0,35M hydroxid amonný: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 0,25 ml amoniaku s 9,75 ml vody.

0,35M hydroxid amonný v 60% methanolu: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 0,25 ml amoniaku s 5,85 ml methanolu a 3,9 ml vody.

5% kyselina mravenčí v 10% methanolu: Pro přípravu 10 ml roztoku bylo smícháno 0,5 ml FA s 0,95 ml methanolu a 8,55 ml vody.

Sterilizační roztok: 0,01% roztoku TWEEN v 70% ethanolu

3.5 Pracovní postupy a metody

3.5.1 Příprava biologického materiálu

Semena *A. thaliana* (Col-0, mutantní linie *J2812*, *J2501*, *pWOL:GFP*, *J0571*) byla prostřednictvím sterilizačního roztoku sterilizována ve 2 ml mikrozkuhavce po dobu 10 minut. Roztok byl následně odpipetován a semena byla opakovaně promyta sterilní vodou. K semínkům bylo nakonec přidáno cca 600 μ l sterilní destilované vody a pomocí pipety se zastříženou špičkou byla semínka nanášena ve dvou řadách na kultivační desku.

K synchronizaci klíčení rostlin byla semena po dobu 2 dnů stratifikována ve tmě při 4 °C. Následně byly desky umístěny do fytotronu ve vertikální poloze, kde byly kultivovány po dobu 8 dní při 23 °C, při fotoperiodě 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

3.5.2 Izolace protoplastů

Osmidenním rostlinám *A. thaliana* bylo nejprve skalpelem uříznutá spodní část kořínků (cca 2 cm), které byly pinzetou přeneseny do filtrů (40 μ m) umístěných v šesti jamkové destičce s obsahem 6 ml PB pufru bez obsahu enzymů a zbytky MS média opláchnuty. Filtr s kořenovými špičkami byl poté přenesen do 6 ml PB pufru s přidanými enzymy. Destička byla poté ponechána inkubaci ve tmě po dobu 3 hodin.

Po proběhlé inkubaci bylo do obou jamek s filtry přidáno 6 ml W5 pufru k zastavení enzymatické reakce. Filtry byly přeneseny do centrifugační zkumavky s kónickým dnem (50 ml), do kterých byl postupně a opatrně přefiltrován celý objem obou pufrů, tak aby nedošlo k rozbití vyizolovaných protoplastů. Odměrné zkumavky s obsahem vzorku byly poté centrifugovány (zrychlení 6, zpomalení 4, 200 g, 5 minut, 22 °C) a vzniklý supernatant byl odebrán. K peletu byl přidán cca 1 ml W5 pufru a po jedné minutě inkubace byl vzorek jemně promíchán s pufrém. Veškerý obsah byl následně přenesen do zkumavek určených k měření na FASC přístroji.

Optimalizace centrifugace za účelem získání co největšího počtu neporušených protoplastů byla provedena po rozdělení vzorku s protoplasty z mutantní linie *pWOL:GFP* na čtyři stejné objemy. Každý ze vzorků byl centrifugován různě dlouhou dobu (2, 5, 7 a 10 minut) při nastavení centrifugy zrychlení 6, zpomalení 4, 22 °C, 200 g. Vzniklá suspenze byla rozdělena na pelet a supernatant. Každý pelet byl rozpuštěn v 1 ml W5 pufru a počet částic a protoplastů sledován po dobu 1 min při stejné rychlosti nasávání vzorku do přístroje FACS. Obdobně bylo provedeno vyhodnocení pro supernatant.

3.5.3 Sortování protoplastů

Sortování GFP pozitivních a GFP negativních protoplastů bylo provedeno pomocí průtokového cytometru BD FACS Aria™ III Cell Sorter, vybaveného tryskou o průměru 100 μ m, obdobně jak je popsáno dříve (Antoniadi *et al.*, 2015; Peterson *et al.*, 2009). Resuspendované izolované protoplasty byly vloženy do FACS vybaveného 100 μ m tryskou s nastavenou teplotou na 4 °C, použitým 1.5 „neutral density“ filtrem pro FSC. Protoplasty od ostatní buněčné populace byly poté identifikovány na základě jejich velikosti pomocí FSC, zatímco GFP pozitivní a GFP negativní protoplasty byly separovány na základě jejich emise po excitaci modrým laserem s vlnovou délkou 488 nm a autofluorescence. K detekci GFP fluorescence byl použit „bandpass filtr“ o vlnové délce 530/30 nm, a „longpass filtr“ 502 nm. Pro excitaci PI fluorescence byl použit žluto-zelený laser s vlnovou délkou 561 nm, a pro detekci „bandpass filtr“ o vlnové délce 670/14 nm, a „longpass filtr“ 630 nm.

Vyizolované protoplasty, byly po jednotlivých replikátech (cca 50 000 izolovaných protoplastů), ihned zmrazeny v kapalném dusíku a skladovány při -80 °C. Pro zpracování dat byl použitý software FACSDiva verze 9.4.

3.5.4 Konfokální mikroskopie

Osmidenní mutantní rostliny *A. thaliana* (*J2812*, *J2501*, *pWOL:GFP*, *J0571*) byly přeneseny na podložní sklíčko s kapkou deionizované vody. Obrázky fluorescence GFP byly snímány konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 900 (Carl Zeiss, Německo) s 20x zvětšením a rozlišením 512x512. Pro excitaci GFP byl použit laser s vlnovou délkou 488 nm. Obrázky byly vybrány ze tří biologických replikátů.

3.5.5 Purifikace auxinů a cytokininů

3.5.5.1 μ -SPE-PT purifikace

K purifikaci auxinů a cytokininů pomocí μ -SPE-PT byly špičky naplněny třemi vrstvami třemi typy sorbentů: Cation-SR, SDB a C18 (Svačinová *et al.*, 2012; Antoniadi *et al.*, 2015). Připravené špičky byly následně aktivovány a kondicionovány 50 μ l acetonu (centrifugace 10 minut, 2 200 rpm, 4 °C), 50 μ l methanolu (centrifugace 10 minut, 2 200 rpm, 4 °C), 50 μ l deionizované vody (centrifugace 15 minut, 2 500 rpm, 4 °C), 50 μ l 50% kyseliny dusičné (centrifugace 20 minut, 2 800 rpm, 4 °C) a 50 μ l deionizované vody (centrifugace 20 minut, 2 800 rpm, 4 °C).

Na takto připravené špičky bylo nanášeno vzorek obsahující 10, 20, 50 nebo 100 tisíc protoplastů s přidáním interními standardy (5 pmol [$^{13}\text{C}_6$]IAA, [$^{13}\text{C}_6$]IAA-Asp, [$^{13}\text{C}_6$]IAA-Glu, [$^{13}\text{C}_6$]IAA-Glc, [$^{13}\text{C}_6$]oxIAA, [$^{13}\text{C}_6$]oxIAA-Glc, [$^{13}\text{C}_6$]oxIAA-Asp a [$^{13}\text{C}_6$]oxIAA-Glu; 0,2 pmol B a 7G, 0,5 pmol OG a NT) (centrifugace 30 minut, 4 500 rpm, 4 °C) s následným promytím pomocí 50 μ l deionizované vody (centrifugace 20 minut, 4 200 rpm, 4 °C). V rámci optimalizace purifikačního protokolu byly vzorky ředěny v poměru 1:2 s 5% kyselinou mravenčí v 10% methanolu.

Eluce auxinů byla provedena prostřednictvím 50 μ l 80% methanolu (centrifugace 20 minut, 4 200 rpm, 4 °C) do čistých 1,5 ml mikrozkuvek. Pro eluci cytokininů bylo poté ještě přidáno 50 μ l 0,5M hydroxidu amonného v 60% methanolu (centrifugace 20 minut, 4 500 rpm, 4 °C). Vyeluovaný vzorek byl převeden do vialek s vloženým inzertem, odpařen dosucha na rotační vakuové odparce, rozpuštěn v 30 μ l 10% metanolu a následně analyzován pomocí LC-MS/MS, přičemž odpaření a měření auxinů a cytokininů bylo provedeno zvlášť.

3.5.5.2 Extrakce na tuhé fázi s disperzní maticí pomocí Oasis MCX a Oasis HLB

Purifikace cytokininových a auxinových metabolitů ve frakcích protoplastů z přístroje FACS byla použita metoda extrakce na tuhé fázi s disperzní maticí (DSPE) s využitím sorbentů Oasis MCX a Oasis HLB (1:1), která je rutinně používána v Laboratoři růstových regulátorů (Petřík *et al.*, nepublikováno). Vzhledem k tomu, že se jedná o nový typ izolačního protokolu, na který nebyla metoda zatím optimalizována, byla provedena přehledová studie vlivu faktorů DSPE metody na MS/MS odezvu cílených metabolitů. Za tímto účelem bylo vybráno pět faktorů, které jsou

uvedeny v Tab. 1. Jejich vliv byl studován pomocí faktoriálního návrhu experimentu (Design of Experiment; Ferreira *et al.*, 2017.). Z plně faktoriálního návrhu byla vybrána čtvrtinová frakce vzorků, která tvořila frakcionální návrh experimentu o rozlišení III (Příloha A). Jako hodnotící kritérium byla pro každý metabolit stanovena plocha chromatografického píku. Metabolity byly samostatně vyhodnoceny pomocí mnohonásobné lineární regrese za použití skriptu v programovacím jazyku R, který byl poskytnut Mgr. Ivanem Petříkem (Laboratoř růstových regulátorů). Pro znázornění spolehlivosti optimalizace parametrů pro každý analyzovaný metabolit byla použita křížová validace (Příloha B).

Tab. 1: Optimalizované parametry DSPE metody na třech různých hladinách pomocí faktoriálního návrhu experimentu.

Písmeno	Faktor	Jednotka	Hladina		
			-1	0	1
A	množství sorbentu	mg	5	15	25
B	ředění vzorku	poměr	2:1	1:1	1:2
C	počet protoplastů	10 ⁴	1	5	10
D	počet promývacích cyklů	ml	1	2	3
E	koncentrace kys. mravenčí	mol/l	0.5	1.25	2

Na základě optimalizace byla poté pro purifikaci protoplastů použita DSPE s těmito parametry. Jako první byla provedena aktivace a kondicionace sorbentů, v rámci které byl k naváženému sorbentu (100 mg Oasis HLB a Oasis MCX) přidán 1 ml methanolu (vortex, centrifugace 14 000 rpm, 2 minuty, 4 °C), následně 1 ml vody (vortex, centrifugace 14 000 rpm, 2 minuty, 4 °C) a nakonec 1 ml 1M kyseliny mravenčí (vortex, centrifugace 14 000 rpm, 2 minuty, 4 °C). Poté bylo na MicroSpin filtry přeneseno 25 mg Oasis HLB a 25 mg Oasis MCX (100 mg/1ml).

Na aktivované sorbenty byl následně přidán vzorek s přidávanými interními standardy (5 pmol auxiny, 0,2 pmol B a 7G, 0,5 pmol OG a NT) o objemu odpovídající 50 000 protoplastů (cca 300 µl), jenž byl naředěný 5% kyselinou mravenčí v 10% methanolu v poměru 2:1 (vortex 30 sekund, centrifugace 8 000 rpm, 5 minut). Vzorky byly následně promyty 0,5M kyselinou mravenčí (vortex, centrifugace 8 000 rpm, 5 minut).

Pro eluci auxinů bylo přidáno 0,4 ml 1M kyseliny mravenčí v methanolu (vortex, centrifugace 8 000 rpm, 5 minut). Pro eluci cytokininů bylo přidáno 0,4 ml 0,35M hydroxidu amonného (vortex, centrifugace 8 000 rpm, 5 minut) a poté 0,4 ml 0,35M hydroxidu amonného v 60% methanolu (vortex, centrifugace 8 000 rpm, 5 minut). Vyeluovaný vzorek byl odpařen do sucha na rotační vakuové odparce, rozpuštěn v 30 µl 10% metanolu, promíchán vortexem a přenesen do vialek s vloženým inzertem s následnou analýzou pomocí HPLC-MS/MS.

3.6.6 LC-MS/MS analýza

3.6.6.1 Auxiny

Ke stanovení hladin auxinů byla použita metoda publikována v Hladík *et al.* (2023), ve které byl využit systém HPLC-MS/MS s ionizací elektrosprejem s přepínáním mezi pozitivním a negativním módem. K separaci analytů byla použita chromatografická kolona s RP (Kinetex C18 100 Å, 50 x 2.1 mm, 1.7 µm; Phenomenex, USA). Mobilní fázi představovala deionizovaná voda (A) a methanol (B), u obou s přidávkou 0,1% kyseliny octové. Doba analýzy činila 18 minut za současného průtoku 0,3 ml/min a teplotou kolony 40 °C. Eluce probíhala pomocí lineárního gradientu následovně: 0 min – 10 % B, 11,5 min 60 % B, 11,75 min – 100 % B, 14,75 min – 100 % B, 15 min – 10 % B. Teplota autosampleru, ve kterém byly vzorky uloženy, byla nastavena na 4 °C a celkový nástřik jednoho vzorku byl 10 µl.

Analyty byly detekovány prostřednictvím hmotnostního spektrometru v pozitivním i negativním módu ESI (+/-). Stanovení auxinů bylo provedeno za užití MRM módu při optimalizovaných kolizních energiích pro každý analyt (Hladík *et al.*, 2023). Nastavení parametrů pro analýzu bylo následující: tlak zmlžovacího plynu, 25 psi; průtok a teplota přehřátého pomocného plynu 12 l/min a 400 °C; průtok a teplota protiproudového vyhřátého sušícího plynu 14 l/min a 130 °C; napětí na výstupním šroubení plynu 0 V; napětí na vstupní kapiláře 2,8 kV v pozitivním a 3,0 kV v negativním módu.

3.6.6.2 Cytokininy

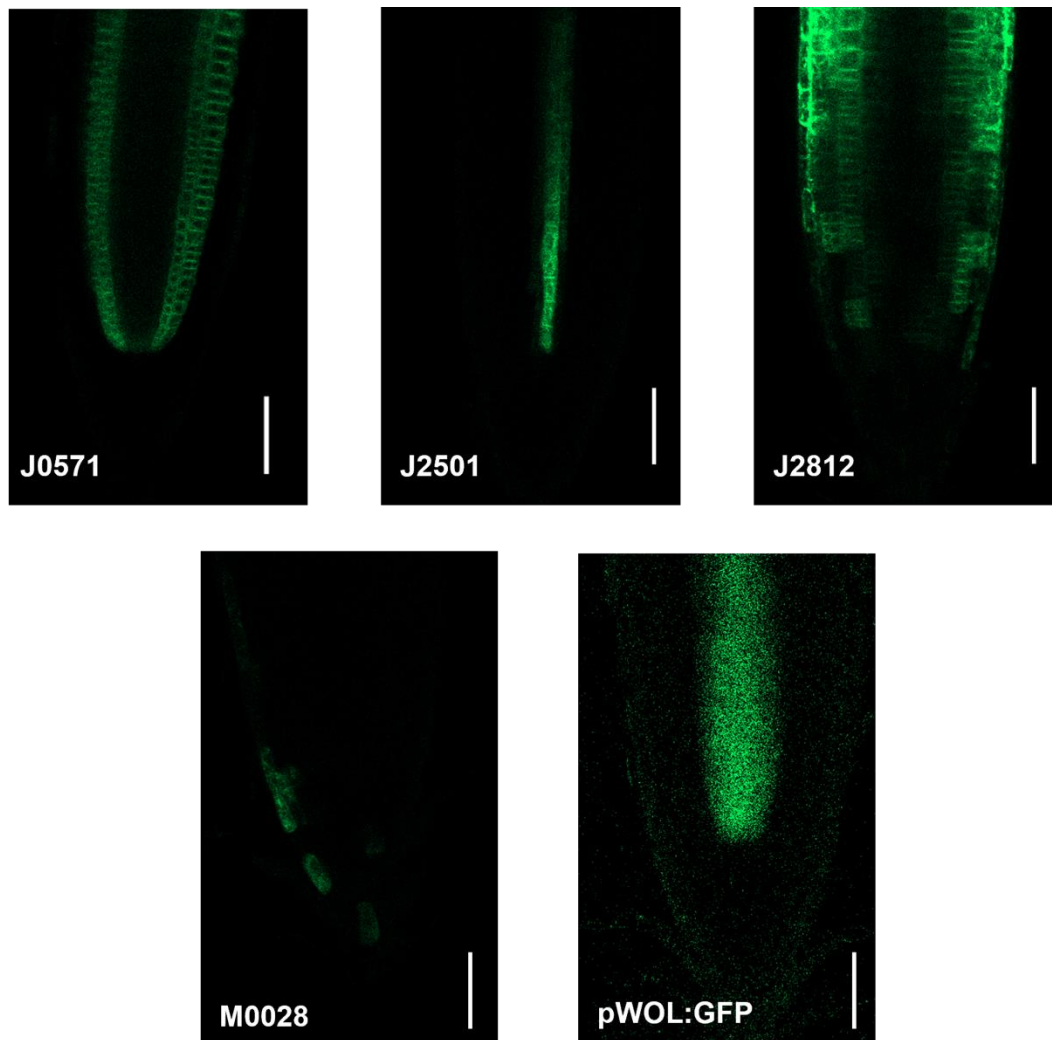
Analýza cytokininů probíhala podle podmínek Svačinová *et al.* (2012) s uvedenými modifikacemi. Ke stanovení hladin CK bylo využito systému UHPLC-MS/MS s trojitým kvadrupólem a ESI. K separaci analytů byla použita chromatografická kolona s reverzní fází Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (150 x 2,1 mm, 1,7 µm, Waters). Mobilní fázi představoval methanol (A) a mravenčan amonný (pH 3,95; B) při průtoku 0,4 ml/min a teplotě kolony 55 °C. Gradient byl vytvořen následovně: 0 min, 5:95 (A:B) – 4 min isokratická eluce, 5:95 (A:B) – 10 min lineární gradient, 20:80 (A:B) – 15 min lineární gradient, 50:50 (A:B) – 15.50 min, 99:1 (A:B) – 16.00 min 99:1 (A:B) – 16.50 min, 5:95 (A:B) – 17.00 min, 5:95 (A:B) (Cermanová, 2020). Teplota autosampleru, ve kterém byly vzorky uloženy, byla nastavena na 4 °C a celkový nástřik jednoho vzorku byl 10 µl.

Analyty byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem v pozitivním módu ESI(+). Stanovení CK bylo provedeno pomocí MRM módu. Nastavení parametrů pro analýzu bylo následující: teplota zdroje 150 °C; teplota desolvatačního plynu 600 °C; průtok desolvatačního plynu 600 l/h; napětí v kapiláře 0,75 kV (Novák *et al.*, 2008). Vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí softwarů MassLynx a TargetLynx.

4 VÝSLEDKY

4.1 Izolace protoplastů

Cílem této diplomové práce bylo změření profilu jednotlivých metabolitů fytohormonů v kořenové špičce, na základě čehož byly předmětem zájmu čtyři mutantní linie použité v pracích Antoniadi *et al.* (2015) a Pěnčík *et al.* (2013). Ale jelikož použitou mutantní linií *pSCR:GFP* se nepodařilo vypěstovat z důvodu špatné klíčivosti a mutantní linie *M0028* a *pWOL:GFP* poskytovaly nízkou intenzitu fluorescence (Obr. 7), jež na přístroji FACS nebylo možné odlišit od pozadí, byly pro tuto práci použity náhradní linie. Výjimkou byla *M0028*, která nebyla nahrazena žádnou linií.



Obr. 7: Fotografie jednotlivých mutantních linií *J0571*, *J2501*, *J2812*, *M0028* a *pWOL:GFP* pořízené konfokálním mikroskopem. Zvětšení 20x. Měřítko znázorňuje 50 μm .

Fotografie, pořízené konfokálním mikroskopem, jednotlivých linií jsou uvedeny na Obr. 7. Mutantní linii *J2812* exprimovala GFP v oblasti epidermis a kortexu, *J2501* exprimovala GFP v oblasti stély a *J0571* exprimovala GFP v oblastech pericyklu, endodermis a kortexu. Zatímco nejintenzivnější fluorescence byla zaznamenána u mutantní linie *J0571*, u mutantní linie *pWOL:GFP* a *M0028* byla intenzita fluorescence nejmenší. Z fotografií je zřejmé, že linie exprimují GFP v předpokládaných místech kořenové špičky, která jsou uvedena v příloze C. U všech zvolených mutantních linií bylo poté provedeno třídění protoplastů fluorescenčním průtokovým cytometrem a měření metabolických profilů auxinů a cytokininů pomocí HPLC-MS/MS.

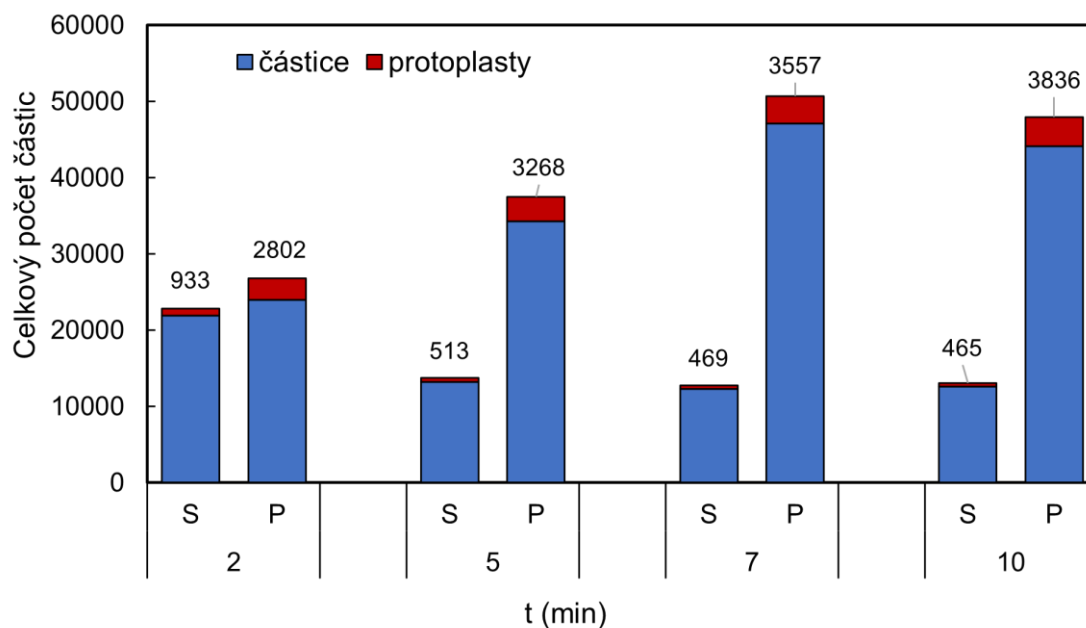
4.1.1 Optimalizace izolace protoplastů

Z kořenové špičky mutantní linie *pWOL:GFP* byly izolovány protoplasty podle protokolu uvedeného v kapitole 3.5.2. Před tříděním protoplastů v průtokovém cytometru bylo nutné izolovanou buněčnou suspenzi velmi opatrně centrifugovat. Vzniklý supernatant byl odebrán a pelet rozpuštěn s přidáním W5 pufrem a přenesen do zkumavky pro třídění protoplastů ve FACS.

Jelikož bylo pro izolaci a také i následnou analýzu zásadní získat co největší množství neporušených protoplastů, byla provedena optimalizace centrifugace způsobem popsáním v kapitole 3.5.2. Pro zjištění vlivu tohoto kroku byl každý ze čtyř vzorků, pocházejících ze stejného objemu, centrifugován různou dobu, a to po 2, 5, 7 a 10 minutách s přetížením 200 g. Vzorky pak byly následně rozděleny na supernatant a pelet a jejich buněčný obsah byl změřen pomocí přístroje FASC, kterým byl sledován celkový počet eventů ve stejném čase a při stejné rychlosti nasávání vzorku do přístroje.

Jak naznačuje Obr. 8, počet částic a protoplastů, které byly vybrány na základě velikosti, se v závislosti na době centrifugace měnil. Zatímco po 2 minutách byl počet částic v supernatantu a peletu velmi podobný, po 5 minutách se počet částic v peletu téměř zdvojnásobil, obdobně jako počet protoplastů, který se z 2802 zvýšil na 3268. Po 7 a 10 minutách se celkový počet částic v supernatantu stabilizoval na podobných hodnotách jako po 5 minutách centrifugace, zatímco došlo ke zvýšení počtu částic v peletu. Přestože se po 10 minutách v peletu počet celkových částic lehce snížil, počet protoplastů zde dosáhl nejvyšší hodnoty 3836.

Z výsledků optimalizace izolace byla zjištěna závislosti doby centrifugace na celkovém počtu částic a protoplastů. Jelikož rozdíl v množství získaných protoplastů se po 5 minutách centrifugace v peletu již téměř nezvyšoval, zatímco stoupalo množství menších částic, byla vybrána právě tato doba centrifugace. Delší doba centrifugace by navíc mohla vést k poničení protoplastů.

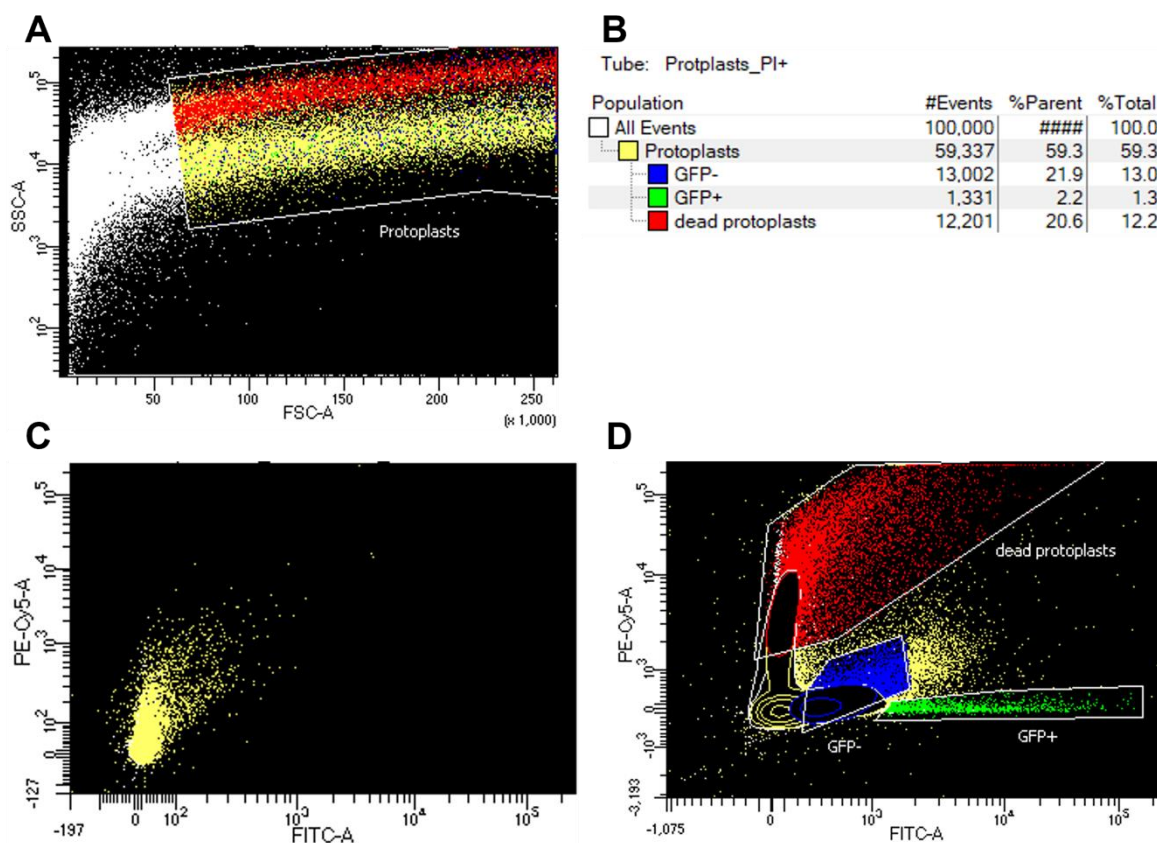


Obr. 8: Optimalizace izolace protoplastů znázorňující závislost celkového počtu částic po 2, 5, 7 a 10 minutách centrifugace. Analyzován byl obsah supernatantu (S) a peletu (P). Čísla nad sloupci znázorňují jednotlivé počty protoplastů ve vzorku. Oddělení celkového počtu částic od protoplastů bylo provedeno na základě jejich velikosti (pomocí kanálu FSC v přístroji FACS).

4.3 Sortování protoplastů

Izolované protoplasty z mutantní linie *J2501* byly v průtokovém cytometru, vybaveného tryskou o průměru 100 μm , roztříděny na populaci protoplastů exprimující GFP a populaci zbývajících protoplastů z celé kořenové špičky. Identifikace protoplastů od ostatní buněčné populace na základě jejich velikosti byla zprostředkována pomocí FSC a SSC, zatímco GFP+ protoplasty byly identifikovány na základě jejich emise po excitaci 488 nm laserem za použití FITC kanálu a „bandpass“ a „longpass“ filtrů umístěné před detektory. Před samotnou analýzou byl ke vzorkům přidán také PI, který není schopen pronikat do živých a neporušených protoplastů v důsledku nízké permeability plazmatické membrány, a tak sloužil jako ukazatel mrtvých protoplastů.

Výše uvedené parametry byly použity pro rozdělení jednotlivých buněčných populací, které jsou znázorněny pomocí grafů na Obr. 9. Výběr jednotlivých populací, znázorněný na Obr. 9B, počínal výběrem protoplastů od zbylých buněk na základě jejich velikosti za použití FSC (Obr. 9A). K rozdělení fluorescenční populace pomocí FITC kanálu od té nefluoreskující byla použita kontrolní linie Col-0 (Obr. 9C). Na základě těchto poznatků byla u mutantní linie *J2501* vybrána GFP+ a GFP- populace včetně mrtvých protoplastů (Obr. 9D). Pomocí SSC byly odlišeny dvě populace buněk. Vrchní populace kolokalizovala s populací nabarvenou pomocí PI, a pravděpodobně se tedy jednalo o odumřelé protoplasty s větší granulocytou (Obr. 9A)



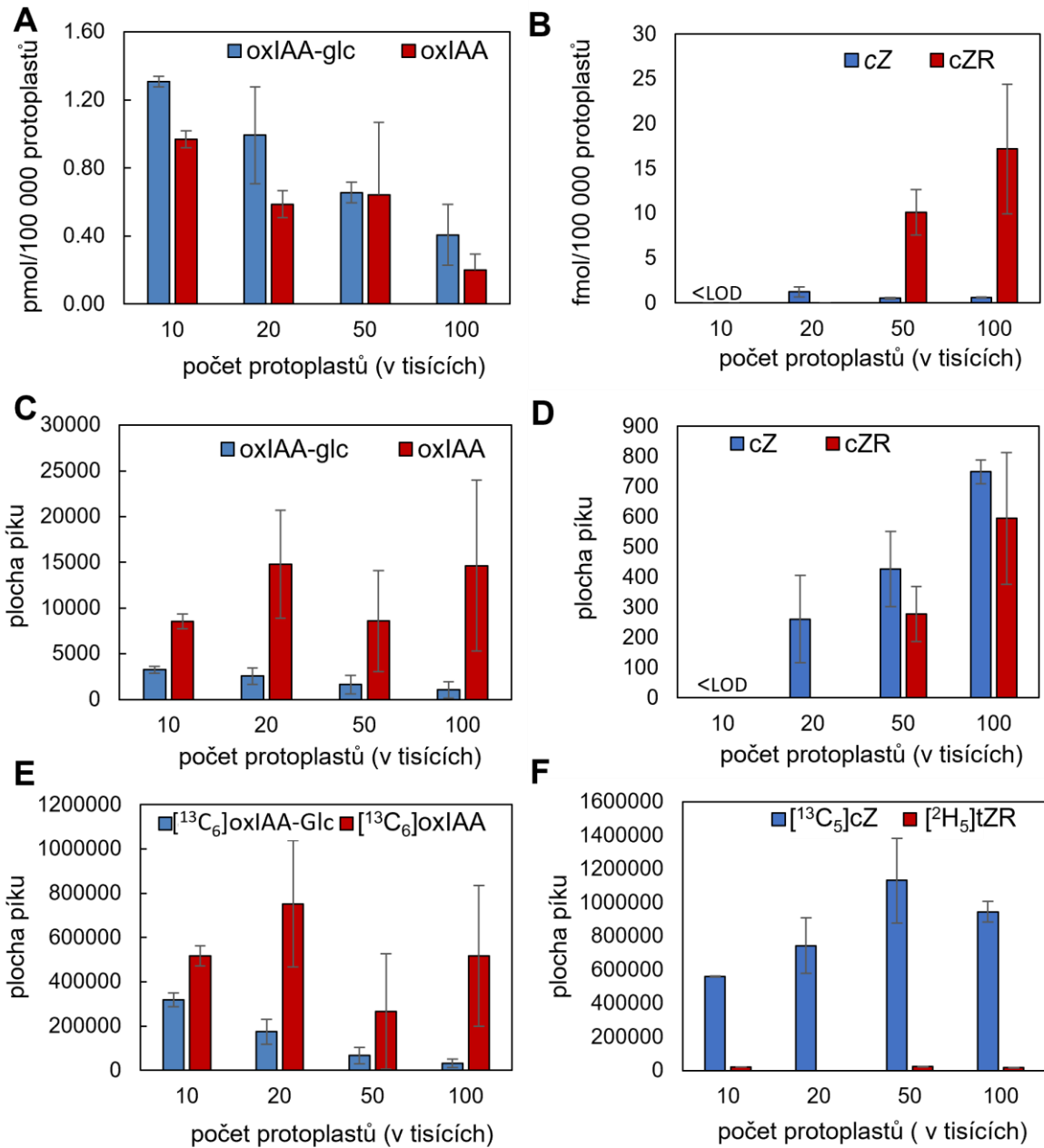
Obr. 9: Postup třídění protoplastů na průtokovém cytometru. Analýza mutantní linie *J2501* dělicí protoplasty na základě jejich velikosti a granularity pomocí FSC a SSC (A v popisku značí plochu „Area“ dané částice) (A). Hierarchie tvorby populací pro třídění a podíl těchto populací na celkovém počtu detekovaných částic (B). Analýza protoplastů kontrolní linie (*Col-0*) pomocí kanálu FITC a PE-Cy5 (C). Analýza protoplastů mutantní linie *J2501*, pomocí kanálu FITC a PE-Cy5 (D). Červená populace znázorňuje mrtvé protoplasty, modrá populace tvoří GFP-, zelená populace GFP+ a žlutá populace představuje zbylé buňky.

4.4 Purifikace izolovaných protoplastů metodou μ -SPE-PT

Izolované protoplasty z linie *J2812* (GFP+) byly rozříděny pomocí FACS na základě svého počtu (10 000, 20 000, 50 000, 100 000). Tyto vzorky byly poté purifikovány pomocí publikovaných μ -SPE-PT protokolů (Pěňčík *et al.*, 2013; Antoniadis *et al.*, 2015), jak je uvedeno v kapitole 3.5.5.1, za použití tří typů sorbentů: SDB-XC Empore™, C18 Empore™ a Cation-SR Empore™. Koncentrace jednotlivých metabolitů auxinů a cytokininů byly změřeny pomocí LC-MS/MS (kapitola 3.6.6).

Metabolický profil auxinů byl měřen podle metody Hladík *et al.* (2023) a z této skupiny byly identifikovány: IAA, IAA-Asp, oxIAA a oxIAA-Glc. V rámci analýzy cytokininů (Svačinová *et al.*, 2012) bylo proměřeno 27 isoprenoidních a 20 aromatických cytokininů, přičemž detekovány byly: tZ, cZ, cZR, iP a iPR. Cílem této analýzy bylo zjistit, jaké množství protoplastů je limitní pro zvýšení hladin fytohormonů nad limit detekce. Kromě toho měl tento experiment prokázat, zda-li různé množství protoplastů neovlivní jejich koncentrace po normalizaci dat (Obr. 10). Auxiny se celkově nacházely v nejvyšších koncentracích, oxIAA a oxIAA-Glc byly detekovány již při 10 000 protoplastech, a proto byly vybrány jako reprezentativní zástupci (Obr. 10A). U cytokininů, které jsou v rostlinách obecně

nižších hladinách, byl v nejvyšším množství detekován cZ a cZR, a proto bylo tyto zástupci vybráni jako reprezentativní (Obr. 10B).



Obr. 10: Měření protoplastů po purifikaci pomocí μ -SPE-PT. Jednotlivé počty protoplastů po přepočtu na 100 tisíc protoplastů pro auxiny oxIAA a oxIAA-Glc (A), a pro cytokininy cZ a cZR (B). Plochy píků auxinů (C) a cytokininů (D) naměřených v různém počtu protoplastů. Plochy píků interních standardů auxinů (E) a cytokininů (F) naměřených v různém počtu protoplastů. Průměr \pm SD, n = 4.

Z obou výsledků na Obr. 10A a B je patrné, že ani jeden z nich nevykazuje závislost koncentrace jednotlivých metabolitů na zvyšujícím se počtu protoplastů. Překvapivě, při vyšším množství protoplastů po normalizaci dat docházelo ke snižování koncentrace fytohormonů. Pouze u cZR byl tento trend opačný (Obr. 10B). U grafů znázorňující jednotlivé plochy píků vzorku (Obr. 10C a D) by měl být pozorován stoupající trend v závislosti na zvyšujícím se počtu protoplastů, což v jisté

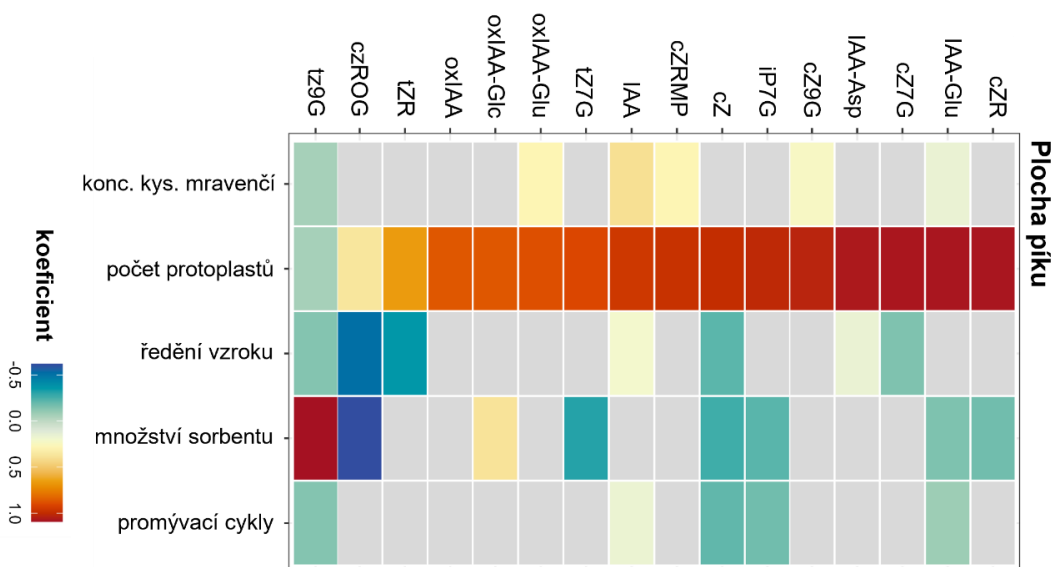
míře vykazuje graf s cytokininovými metabolity cZ a cZR. Tento trend však u auxinů pozorován nebyl. U posledních dvou grafů (Obr. 10E a F) byly porovnávány plochy píků interních standardů, které by měly udržovat stálou hladinu s minimálním rozptylem směrodatných odchylek. Ani tento trend nebyl potvrzen. Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že purifikace izolovaných protoplastů metodou μ -SPE-PT nebyla robustní a při nanášení většího objemu vzorku docházelo k vymývání analytů z SPE sorbentu.

4.5 Optimalizace purifikačního protokolu DSPE

Z důvodu nízké výtěžnosti jednotlivých metabolitů auxinů a cytokininů metodou μ -SPE-PT, byla pro extrakci auxinů a cytokininů provedena optimalizace purifikačního protokolu využívajícího extrakci na tuhé fázi s disperzní maticí, v rámci které byly optimalizovány jednotlivé parametry izolace k dosažení co největší návratnosti stanovovaných látek.

Optimalizace DSPE metody byla provedena na protoplastech z mutantní linie *J2812* za využití faktoriálního návrhu experimentu. Optimalizovány byly následující parametry: množství sorbentu Oasis MCX a Oasis HLB, poměr ředění vzorku 5% kyselinou mravenčí v 10% methanolu, počet protoplastů, počet promývacích cyklů a koncentrace kyseliny mravenčí (Tab. 1).

Pro znázornění výsledku této analýzy byla vypracována heatmapa (Obr. 11), která byla sestrojena na základě výsledku screeningu vlivu pěti parametrů DSPE v závislosti na velikosti plochy fytohormonů. Spolehlivost jednotlivých výsledků znázorňuje křížová validace (Příloha B).

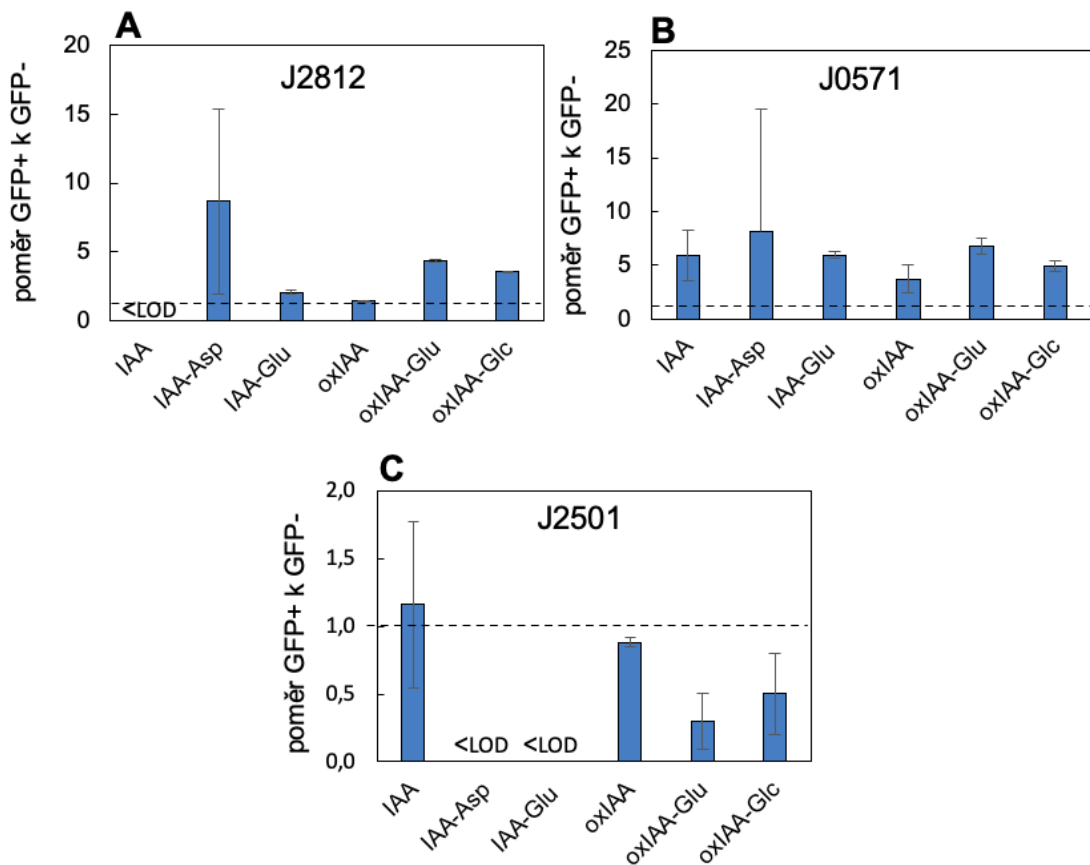


Obr. 11: Screening vlivu pěti parametrů DSPE na velikost píku metabolitů auxinů a cytokininů v podobě heatmapy. Barva a její intenzita ukazuje velikost koeficientu lineárního modelu, na základě kterého byla predikována plocha píku. Červená barva značí přímou úměru, modrá barva nepřímou úměru a šedá barva znázorňuje parametr, který byl z modelu vyloučen, jelikož nevykazoval signifikantní efekt. Parametry byly testovány v rozmezí uvedeném v Tab 1.

Výsledky analýzy prokázaly, že největší vliv na výtěžnosti jednotlivých metabolitů mělo množství protoplastů. Navíc s jejich narůstajícím množstvím bylo dosaženo i vyšší výtěžnosti látek. Ostatní analyzované parametry neměly téměř žádný vliv na výtěžnost analyzovaných látek, což ukázalo velkou robustnost metody. Z tohoto důvodu byla metoda DSPE pro následující experimenty co nejvíce zjednodušena, bylo provedeno co nejmenší ředění vzorku (2:1), a použit pouze jeden promývací cyklus pomocí 0,5M kyseliny mravenčí.

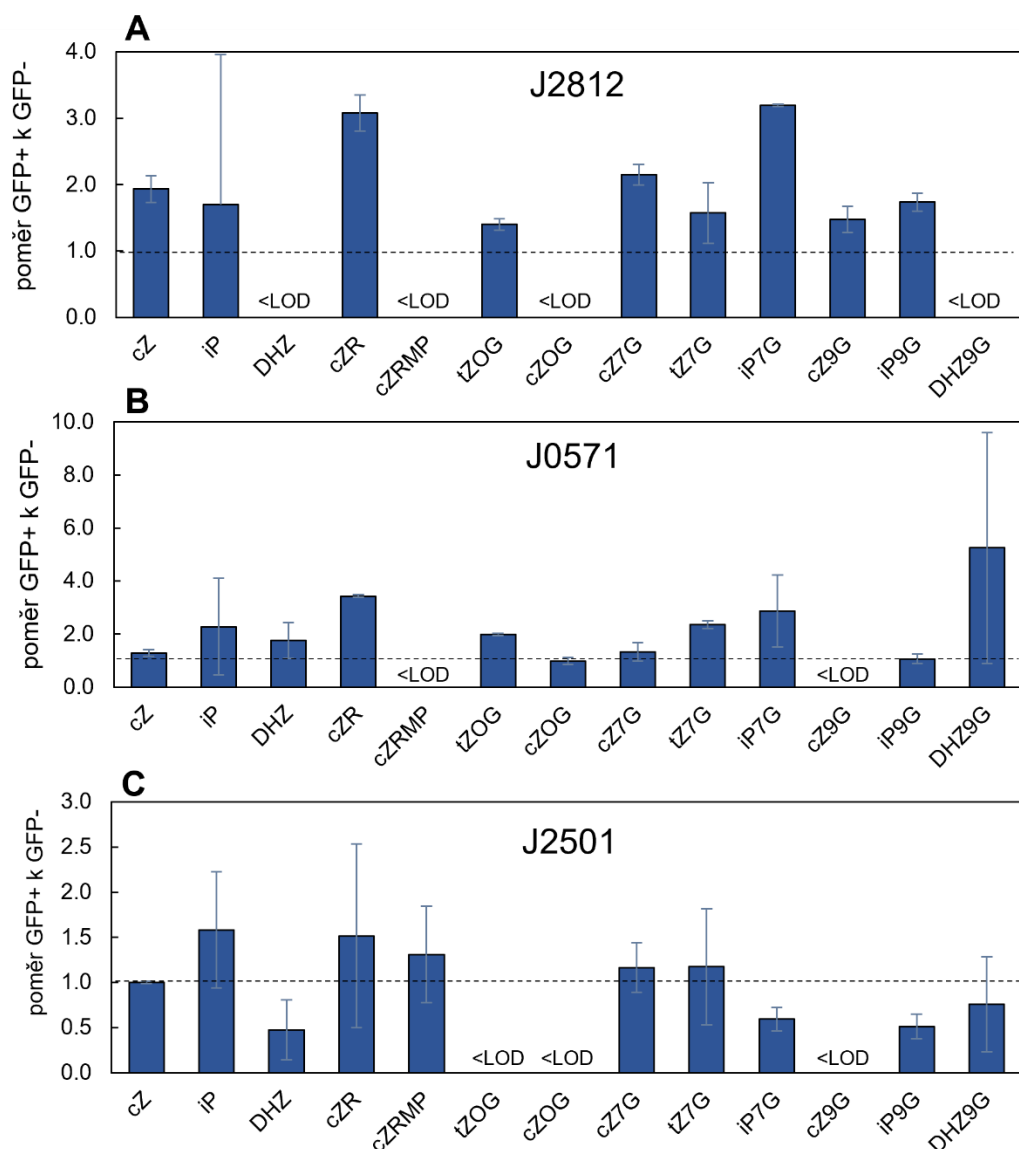
4.6 Aplikace optimalizované metody na další buněčné linie

Vyvinutá a optimalizovaná metodika kombinující třídění protoplastů pomocí FACS s izolací fytohormonů protokolem DSPE byla aplikována na tři mutantní linie *A. thaliana*: *J2812*, *J2501* a *J0571*. U všech byly následně měřeny koncentrace jednotlivých metabolitů auxinů a cytokininů pomocí LC-MS/MS. Jelikož každá linie exprimuje GFP v rozdílných typech buněk, záměrem této části bylo sledovat poměr metabolických profilů mezi buněčnými typy značenými GFP a zbytkem kořenů (protoplasty GFP-) (Obr. 12 a 13).



Obr. 12: Poměr auxinových metabolitů v GFP+ populaci při porovnání s GFP- populací u mutantních linií *J2812* (epidermis) (A), *J0571* (pericykl a kortex) (B) a *J2501* (stéla) (C). Průměr ± SD, n = 3.

Nejvyšší hladiny auxinů byly naměřeny v GFP+ populaci mutantní linie *J0571* (pericykl a kortex), kdy nejvyšších hladin dosahovaly oxIAA-Glc ($6,27 \pm 0,65$ pmol/50 000 protoplastů), oxIAA-Glu ($3,70 \pm 0,42$ pmol/50 000 protoplastů) a oxIAA ($2,47 \pm 0,84$ pmol/50 000 protoplastů) (Příloha D). Zároveň i poměr GFP+/GFP- populaci dosahoval 4-8x vyšších hladin (Obr. 12B). Kdežto nejnižší hladiny auxinů byly naměřeny v GFP+ u mutantní linie *J2501* (stéla), u které nebyl detekován IAA-Asp a IAA-Glu (Příloha D). Hladiny metabolitů byly u této linie nižší v pozitivní populaci ve srovnání se zbytkem kořene s výjimkou IAA (Obr. 12C). U poslední linie *J2812* (epidermis) byly oproti dvěma zmíněným liniím naměřeny obdobné hodnoty pro obě populace (Obr. 12A). Zajímavostí je, že byla u této linie v případě GFP+ naměřena nejvyšší koncentrace IAA-Asp (Příloha D).



Obr. 13: Poměr cytokininových metabolitů v GFP+ populaci při porovnání s GFP- populací u mutantních linií *J2812* (epidermis) (A), *J0571* (pericykl a kortex) (B) a *J2501* (stéla) (C). Průměr \pm SD, n = 3.

Podobně jako v případě auxinů, byly nejvyšší hladiny cytokininů naměřeny právě v mutantní linii *J0571* (pericykl a kortex), kde nejvyšší hladiny byly naměřeny u *cZRMP* ($13,33 \pm 0,72$ fmol/50 000 protoplastů), *iP7G* ($8,798 \pm 0,14$ fmol/50 000 protoplastů) a *cZOG* ($4,352 \pm 0,60$ fmol/50 000 protoplastů), který byl detekován pouze u této linie (Příloha E). Kromě toho se podařilo právě u této linie detekovat nejvyšší počet metabolitů (celkem 13) a poměr GFP+/GFP- dosahoval až 6x vyšších hladin (Obr. 13B). Stejně tak jako u auxinů byly u mutantní linie *J2501* (stéla) naměřeny nejnižší hladiny v GFP+ populaci, ve které nebyl detekován *cZOG*, *tZOG* a *cZ9G* (Příloha E) a poměr GFP+/GFP- zde dosahoval nejnižších hladin (Obr. 13C). U mutantní linie *J2812* (epidermis) sice byly v rámci poměru GFP+/GFP- naměřeny průměrné hladiny pro obě populace (Obr. 13A), avšak v případě GFP+ bylo u této linie naměřeno poměrně větší množství metabolitů vykazující nejvyšší koncentrace. Patří mezi ně *iP* ($0,637 \pm 0,85$ fmol/50 000 protoplastů), *cZ* ($0,470 \pm 0,05$ fmol/50 000 protoplastů), *DHZ* ($0,141 \pm 0$ fmol/50 000 protoplastů), *iP9G* ($0,0552 \pm 0,04$ fmol/50 000 protoplastů) a *DHZ9G* ($0,141 \pm 0$ fmol/50 000 protoplastů) (Příloha E).

5 DISKUZE

Auxiny a cytokininy významně ovlivňují růst a vývoj rostliny a patří tak mezi jedny z nejdůležitějších rostlinných hormonů. Cílem této diplomové práce byla optimalizace metod pro izolaci protoplastů s následnou izolací auxinů a cytokininů a měřením jejich metabolických profilů v kořenové špičce mutantních linií *A. thaliana*.

V experimentální části byla provedena izolace protoplastů z osmidenních rostlin několika mutantních linií *A. thaliana* podle publikovaných protokolů využívajících fluorescenčně aktivované třídění buněk (Petersson *et al.*, 2009; Antoniadou *et al.*, 2015). Předmětem zájmu byly mutantní linie *J2812*, *pWOL:GFP*, *M0028* a *pSCR:GFP*, které byly použity i ve výše zmíněných pracích. Ale jelikož mutantní linie *pSCR:GFP* vykazovala malou míru klíčivosti, pravděpodobně v důsledku stáří semínek, a další dvě linie *pWOL:GFP* a *M0028* vykazovaly nízkou intenzitu fluorescence (Obr. 7), kterou nebylo schopné odlišit od pozadí při třídění protoplastů, musely být použity náhradní linie. Podle práce Petersson *et al.* (2009) byly na základě kolokalizace signálu GFP ve stejné kořenové vrstvě vybrány *J2501* (místo *pWOL:GFP*) a *J0571* (místo *pSCR:GFP*). A jelikož za mutantní linii *M0028* nebylo možné použít náhradní linii, která by exprimovala GFP ve stejném místě, byla tato část kořene vynechána.

V prvním kroku byla optimalizována doba centrifugace za účelem získání co největšího počtu izolovaných protoplastů. Byly použity čtyři různé časy centrifugace (2, 5, 7 a 10 minut) a porovnána výtěžnost protoplastů v peletu (Obr. 8). Na základě výsledků byla ideální doba centrifugace zvolena 5 minut, při kterých již byl naměřen dostatečný počet protoplastů v peletu v poměru k celkovému počtu částic. Vyšší doba centrifugace nebyla vybrána v důsledku možného poškození protoplastů.

Izolované protoplasty byly poté podrobeny třídění pomocí metody FACS, kdy byly protoplasty nejprve rozděleny na základě své velikosti (parametr FSC) a granulocytů (SSC) (Obr. 9A). Na základě tohoto rozdělení byla buněčná populace dále roztříděna na GFP+ a GFP- populaci pomocí emise jejich fluorescence po excitaci modrým laserem (488 nm) (Obr. 9D). K odlišení mrtvých protoplastů od živých byl ke vzorkům přidán propidium jodid, který není schopen pronikat do živých a neporušených protoplastů, v důsledku nízké permeability plazmatické membrány (Doležel, 2007). Jeho emise byla sledována po excitaci žluto-zeleným laserem (561 nm). Po zobrazení populace mrtvých protoplastů do grafu FSC vs. SSC (Obr. 9A) se prokázalo, že mrtvé protoplasty vykazují vyšší granulocytů a nejsou tedy tříděny společně GFP populacemi.

Pro následnou fytohormonální analýzu byl použit již vyvinutý přístup kombinující FACS s LC-MS/MS, který byl se stejným záměrem použit i v předešlých pracích (Petersson *et al.*, 2009; Pěnčík *et al.*, 2013; Antoniadou *et al.*, 2015). Avšak velmi nízké koncentrace auxinů a ještě nižší koncentrace cytokininů činí jejich kvantifikaci na buněčné úrovni velice náročnou (Novák *et al.*, 2017). V důsledku

toho je nezbytné použít vysoce účinnou purifikační metodu zajišťující odsolení, přečištění a obohacení před samotnou LC-MS/MS analýzou (Rappsilber *et al.*, 2003; Ishihama *et al.*, 2006). K izolaci auxinů a jejich metabolitů se běžně používají polymerní reverzní fáze (např. Oasis HLB; Novák *et al.*, 2012), polymerní fáze se smíšeným principem zachytu (Oasis MAX a Oasis MCX) (Backle *et al.*, 2012, Jikumaru *et al.*, 2013). Pro účinnou separaci cytokininů je možné využít smíšený režim s reverzní fází a iontoměničovou extrakcí (Fu *et al.*, 2011; Tarkovská *et al.*, 2014).

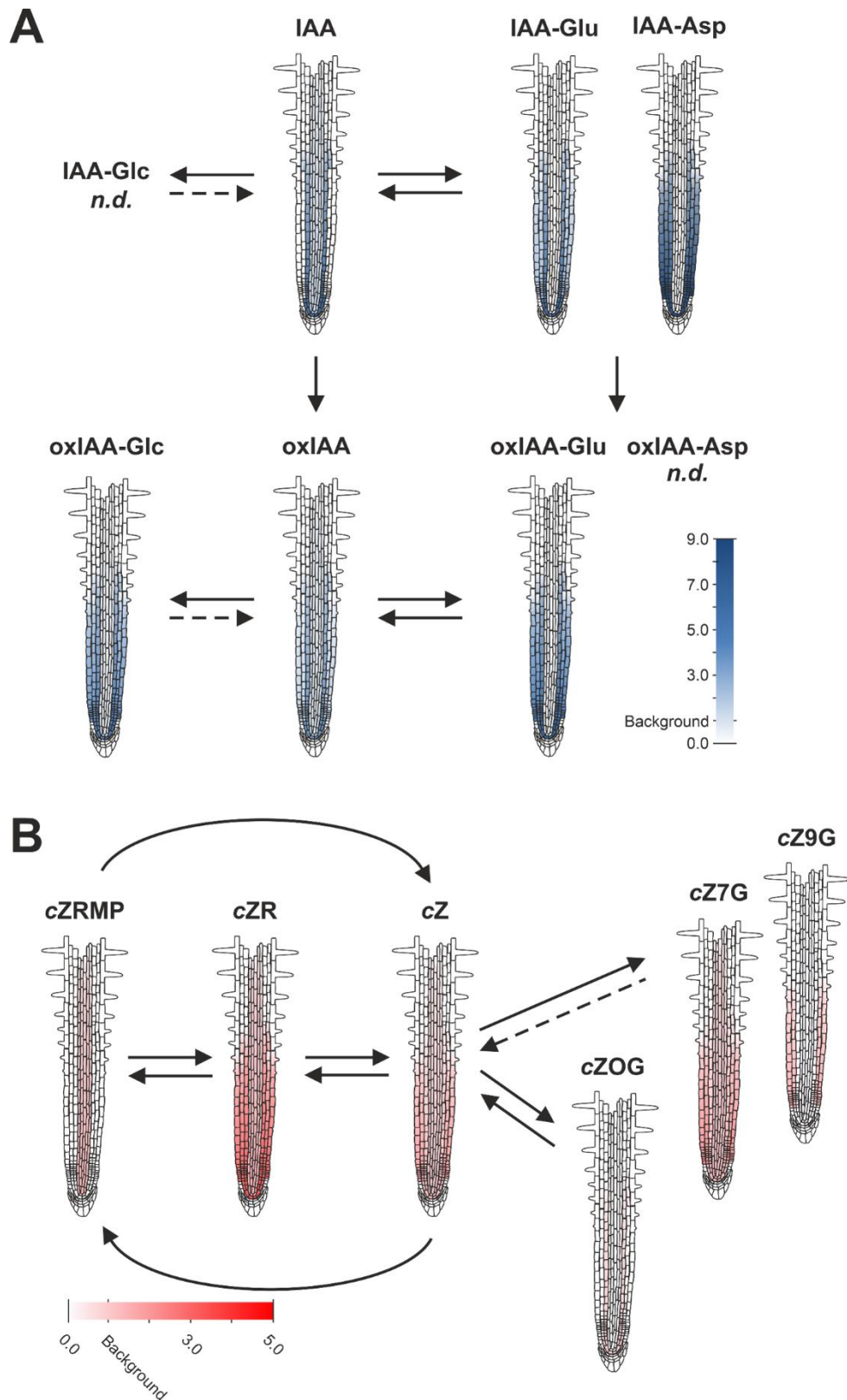
Pro purifikaci auxinů a cytokininů z protoplastů kořenové špičky *A. thaliana* byla dříve využita metoda μ -SPE-PT za použití tří typů sorbentů: Cation-SR Empore™, SDB-XC Empore™ a C18 Empore™ (Pěňčík *et al.*, 2013, Antoniadou *et al.*, 2015). Z toho důvodu byla tato purifikační metoda testována a validována na různém množství protoplastů (10 000, 20 000, 50 000 a 100 000). V shodě s předchozími publikovanými výsledky patřil mezi hlavní metabolity vyskytující se v kořenové špičce oxIAA (Pěňčík *et al.*, 2013). Nově byl kvantifikován ve vysokých hladinách i oxIAA-Glc (Obr. 10), zatímco ostatní konjugáty IAA byly detekovány v menší míře (Pěňčík *et al.*, 2013). Podobně jako u Antoniadou *et al.* (2015) byl z cytokininových metabolitů nalezen v kořenové špičce nejvyšší obsah iP a cZ. Nicméně koncentrace auxinů a cytokininů normalizované na 100 000 protoplastů se měnily na základě množství aplikovaných protoplastů, kdy s jejich vyšším počtem klesalo detekováno množství fytohormonů (Obr. 10A, B). Vzestupný trend měl být rovněž zaznamenán po přepočtu plochy píku analytů v závislosti na množství protoplastů (Obr. 10C, D), což se částečně prokázáno u cytokininových metabolitů, ale u auxinových metabolitů nikoliv. K validaci μ -SPE-PT metody byly rovněž porovnávány plochy píků interních standardů (Obr. 10E, F), které měly vykazovat podobné hladiny s nízkým rozptylem směrodatných odchylek. Tento výsledek nebyl prokázán ani u jednoho sledovaného interního standardu. Na základě výše uvedených výsledků bylo prokázáno, že tato metoda μ -SPE-PT není v kombinaci s FACS robustní. Pravděpodobně dochází k vymývání analytů z SPE sorbentu, což může být způsobeno vysokým obsahem solí pocházejících z FACS pufru či malou kapacitou StageTips sorbentu zapříčiněnou velkým objemem vzorku.

Z toho důvodu byla pro purifikaci vzorků tříděných buněk vybrána metoda DSPE (Petřík *et al.*, nepublikováno), která byla optimalizována pomocí faktoriálního návrhu experimentu (Ferreira *et al.*, 2017). Bylo optimalizováno pět různých parametrů a testován jejich vliv na velikost chromatografického píku jednotlivých metabolitů (Obr. 11). Zásadní vliv na výslednou analýzu mělo množství protoplastů, kdy se stoupajícím množstvím se zvyšovala plocha píku, což je v souladu s očekáváním na rozdíl od purifikace metodu μ -SPE-PT (Obr. 10). Ostatní parametry měly na výsledky optimalizace metody DSPE minimální vliv, a proto byly použity nejjednodušší a nejrychlejší varianta purifikace (ředění vzorku 5% kyselinou mravenčí v 10% methanolu v poměru 2:1 a jeden promývací cyklus 0,5M kyselinou mravenčí). Tyto optimalizované parametry DSPE protokolu prokazují dobrou robustnost metody i pro větší množství protoplastů nebo různé podmínky (množství solí

pocházejících z FACS pufru, velký objem vzorků apod.). Kombinace FACS, DSPE a LC-MS/MS společně s mutantními liniemi, které obsahují rozdílně značené typy buněk pomocí GFP v rámci kořenové špičky (např. v této práci použité *J2812* - epidermis, *J0571* - pericykl a kortex a *J2501* - stéla), by měla umožnit vytvoření podrobné mapy distribuce nejen auxinů a cytokininů a jejich specifických metabolitů.

Přestože většina rostlinných pletiv vykazuje určitou schopnost biosyntézy IAA, syntéza auxinu se odehrává převážně v mladých, vyvíjejících se tkáních, jako jsou apikální části kořenů a báze vyvíjejících se listů (Ljung et al., 2001). Mapu distribuce IAA v kořenové špičce *A. thaliana*, jež publikovala ve své práci Petersson et al. (2009), byla vytvořena pomocí 14 různých linií exprimujících GFP v odlišných buněčných typech. Výsledky ukázaly místa s vysokou mírou syntézy v kořenové špičce a prokázaly přítomnost koncentračního gradientu IAA s výrazným maximem v QC kořenové špičky. Zatímco kůra, endodermis a apikální část stély obsahovala dvakrát více IAA než okolní tkáň, v kolumele a epidermis byly naměřeny koncentrace IAA nižší. Pozdější práce (Pěňčík et al., 2013) se zabývala analýzou katabolických změn IAA za pomoci pěti mutantních linií, kdy byl stanoven poměr koncentrace IAA a oxIAA. Výsledky této analýzy prokázaly, že mutantní linie *pSCR:GFP* a *M0028:GFP* vykazují v porovnání s mutantními liniemi *J2812* a *pWOL:GFP* vyšší rychlost katabolismu IAA a nejvyšší poměr GFP+/GFP- byl naměřen u linie *M0028:GFP*. Stejně mutantní linie byly využity i v publikaci Antoniadou et al. (2015) pro analýzu cytokininových metabolitů. A stejně jako v případě auxinů ve výše uvedených pracích byly nejvyšší hladiny cytokininů naměřeny u mutantních liniích *M0028* a *pSCR:GFP*.

Poslední část této práce byla věnována aplikaci optimalizované metody pro izolaci a třídění protoplastů na mutantní linie *J2501*, *J2812* a *J0571*. Výsledky analýzy auxinů prokázaly nejvyšší výtěžnost metabolitů v GFP+ u linie *J0571*, u které byly naměřeny nejvyšší hladiny oxIAA-Glc, oxIAA-Glu a ox-IAA (Příloha D). Naopak nejnižší hladiny auxinů byly naměřeny v populaci GFP+ u linie *J2501*. Ve srovnání s prací Pěňčík et al. (2013) bylo v této analýze dosaženo v rámci poměru GFP+/GFP- u IAA a oxIAA velmi podobných nebo vyšších hodnot. Zatímco hodnoty u linií *J2812* a *J2501* (v publikaci použita *J2812* a *pWOL:GFP*) vykazovaly téměř stejné hladiny, s výjimkou linie *J2812*, u které nebylo IAA detekováno, linie *J0571* dosahovaly téměř až 6x vyšších hladin (v publikaci *pSCR:GFP*), přestože byly naměřeny z polovičního množství protoplastů (50 000) ve srovnání s výše uvedenou prací (100 000). Přestože v publikaci Petersson et al., 2009 byla analyzována pouze IAA, která byla použita k sestavení distribuční mapy v kořenové špičce u 14 různých mutantních linií, výsledky obou analýz prokázaly, že vysoké koncentrace IAA se vyskytují v oblasti kortexu a endodermis (*J0571*) a naopak nejnižší v oblasti epidermis (*J2812*) (Obr. 12A, C).



Obr. 14: Gradientová mapa auxinových (A) a cytokininových (B) metabolitů v kořenové špičce *A. thaliana*, které byly měřeny ve třech mutantních liniích *J2812* (epidermis), *J0571* (pericykl a kortex) a *J2501* (stéla). Barevná škála ukazuje poměr GFP+/GFP- populace, kde hodnota 1.0 je rovna pozadí; *n.d.*- nedetekováno.

Na základě zjištěných výsledků (Obr. 12) byla konstruována distribuční mapa auxinových metabolitů (Obr. 14A), která potvrzuje dříve nalezený gradient IAA a oxIAA v kořenové špičce (Petersson *et al.*, 2009; Pěnčík *et al.*, 2013). Navíc byly sestrojeny mapy pro aminokyselinové konjugáty IAA a oxIAA, které ukazují maxima v kortex a epidermis, zatímco nebyly detekovány ve stéle. Podobný gradient byl pozorován také u oxIAA-Glc.

Analýza cytokininů prokázala ve srovnání s auxiny velmi podobné výsledky. U mutantní linie *J0571* bylo naměřeno nejvíce metabolitů (13) (Obr. 13B) s nejvyšší koncentrační úrovní u *cZRMP*, *cZOG*, *iP7G* (Příloha E). Ve srovnání s ostatními liniemi dosahoval také poměr GFP+/GFP- až 6x vyšších hladin. Oproti uvedeným liniím bylo u *J2812* naměřeno pět metabolitů vykazující nejvyšší koncentrace. V rámci srovnání naměřených hladin s výsledky uvedenými v publikaci Antoniadi *et al.* (2015), ve které bylo naměřeno celkem 15 cytokininových metabolitů ze 100 000 protoplastů, sice bylo dosaženo menšího počtu detekovaných metabolitů, avšak hladiny poměru GFP+/GFP- byly ve většině případech až několika násobně větší ve všech typech mutantních linií za použití polovičního množství protoplastů. Hladiny cytokininových metabolitů se zde pohybovaly v celkovém rozmezí 0,3-10 fmol/100 000 protoplastů, zatímco u nově optimalizované metody se jednotlivé metabolity pohybovaly v koncentračním rozmezí 0,02-13,3 fmol/50 000 protoplastů. Přestože se touto metodou ve srovnání s uvedenou publikací nepovedl detekovat *tZ*, *iPRMP*, *iPR*, *iP7G* a *tZ9G*, byl namísto toho detekován *DHZ*, *DHZ9G* a *tZ7G*. Naopak obě práce potvrdily, že v oblasti stély (*pWOL:GFP* a *J2501*) je koncentrace *O*-glukosidů (*tZOG* a *cZOG*) nulová. Překvapivé je, že linie *pSCR:GFP* použitá ve zmiňované práci, jejíž buněčné typy v kořenové špičce by měly kolokalizovat s mutantní linií *J0571*, vykazovala ve srovnání s mutantními liniemi *pWOL:GFP* a *J2812* menší hladiny v poměru GFP+/GFP-.

Gradientová mapa kořenové špičky byla sestrojena také pro *cZ* a jeho metabolity (Obr. 14B). Nicméně, jelikož se nepodařilo detekovat kompletní metabolické profily pro ostatní cytokininy, nebyla pro ně tato mapa vytvořena (Obr. 13; Příloha E). Zatímco *cZ*, *cZR* a *cZ7G* byly detekovány ve všech třech kořenových vrstvách, *cZRMP* byl detekován pouze ve stéle, *cZ9G* v epidermis a *cZOG* v kortexu.

Uvedená srovnání dokazují, že optimalizovaná metoda je dostatečně robustní. Do budoucna by měla být schopna poskytnout podrobnější informace o jednotlivých metabolitech v kořenové špičce, které mohou být nápomocné k hlubšímu pochopení metabolických drah fytohormonů.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla věnována optimalizaci metod pro izolaci jednotlivých protoplastů a následnou purifikaci fytohormonů z kořenové špičky mutantních linií *A. thaliana* s rozdílně fluorescenčně značenými typy buněk.

Prvotní cíl se týkal ověření jednotlivých mutantních linií *A. thaliana* (*J2812*, *pWOL:GFP*, *M0028*, *J2501* a *J0571*) pod konfokálním mikroskopem. Byla kontrolována intenzita a předpokládané místo exprese GFP, na základě čehož byly pro další experimenty spojené s analýzou fytohormonů vybrány mutantní linie *J2812*, *J2501* a *J0571*.

V dalším kroku byla optimalizována metoda pro izolaci protoplastů, v rámci které byla na mutantní linii *pWOL:GFP* testována doba centrifugace. Jako ideální doba centrifugace se ukázalo pět minut, které byly používány v dalších experimentech. Tato optimalizovaná metoda byla použita pro třídění protoplastů z kořenové špičky *A. thaliana* pomocí přístroje FACS.

Z důvodu nízké návratnosti jednotlivých auxinových a cytokininových metabolitů zavedenou purifikační metodou μ -SPE-PT, byla provedena optimalizace purifikačního protokolu metodou DSPE, v rámci které bylo testováno pět parametrů. Na základě toho bylo prokázáno, že největší vliv na výtěžnost metabolitů má počet protoplastů a ostatní parametry potvrdily vysokou robustnost metody.

Optimalizovaná metoda pro izolaci protoplastů a purifikaci fytohormonů pak byla použita na mutantní linie *J2501*, *J2812* a *J0571*, jejichž rozdílně značené typy buněk pomocí GFP by mohly vést k lepšímu porozumění jednotlivých metabolických drah auxinů a cytokininů.

Na tuto problematiku bylo vypracováno již několik publikací, avšak tato práce v důsledku současného velkého rozvoje purifikačních a analytických metod disponuje detailnějšími informacemi o jednotlivých metabolitech v kořenové špičce. V této diplomové práci bylo také dosaženo i nových poznatků týkající se izolace protoplastů a také následné purifikace fytohormonů, které mohou být využity pro další experimenty. K hlubšímu pochopení metabolických drah fytohormonů a získání kompletní mapy distribuce auxinových a cytokininových metabolitů navrhuje analýzu dalších mutantních linií, než které byly použity v této práci.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ALLEN H. R. a M. PTASHNYK, 2020. Mathematical Modelling of Auxin Transport in Plant Tissues: Flux Meets Signalling and Growth. *B Math Biol.* **82**(17). Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11538-019-00685-y>
- ANANTHARAMAN V. a L. ARAVIND, 2001. The CHASE domain: a predict ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trend Biochem Sci.* **26**(10), 579-582. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01968-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01968-5)
- ANTONIADI I., L. PLAČKOVÁ, B. SIMONOVIK *et al.*, 2015. Cell-Type-Specific Cytokinin Distribution within the Arabidopsis Primary Root Apex. *Plant Cell.* **27**(7), 1955-1967. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00176>
- AVILA-PELTROCHE J., B. Y. WON a T. O. CHO, 2021. Protoplast isolation from *Dictyopteris pacifica* and *Scytosiphon lomentaria*, using a simple commercial enzyme preparation. *J Genet Eng Biotechnol.* **19**(1), 135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00226-y>
- BALCKE G. U., V. HANDRICK, N. BERGAU *et al.*, 2012. An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. *Plant Methods.* **8**(1), 47. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-47>
- BD FACSCanto™ Clinical Flow Cytometry System. *BD Biosciences.* [cit. 2024-02-14]. Dostupné z: <https://www.bdbiosciences.com/en-us/products/instruments/flow-cytometers/clinical-cell-analyzers/facs canto>
- BERGE U., P. KRISTENSEN a S. I. S. RATTAN, 2006. Kinetin-induced differentiation of normal human keratinocytes undergoing aging in vitro. *Ann NY Acad Sci.* **1067**, 332-336. Dostupné z: <https://doi.org/10.1196/annals.1354.045>
- BERTOŠA B., B. KOJIC-PRODIC, R. C. WADE *et al.*, 2008. Mechanism of Auxin Interaction with Auxin Binding Protein (ABP1): A Molecular Dynamics Simulation Study. *Biophys J.* **94**(1), 27-37. Dostupné z: <https://doi.org/10.1529%2Fbiophysj.107.109025>
- BHARGAVA A., I. CLABAUGH, J. P. TO *et al.*, 2013. Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **162**(1), 272-294. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.113.217026>
- BILYEU K. D., J. L. COLE, J. G. LASKEY *et al.*, 2001. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* **125**(1), 378-386. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.378>
- BIRNBAUM K., D.E. SHASHA, J.Y. WANG, *et al.*, 2003. A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science.* **302**, 1956-1960. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1090022>
- BLAKESLEE J. J., W. A. PEER a A. S. MURPHY, 2005. Auxin transport. *Curr Opin Plant Biol.* **8**(5), 494-500. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.07.014>
- BLILOU I., J. XU, M. WILDWATER *et al.*, 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature.* **433**(7021), 39-44. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature03184>
- BRAUN N., J. WYRZYKOWSKA, P. MULLER *et al.*, 2008. Conditional repression od AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell.* **20**(10), 2746-2762. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059048>
- BRUNONI F., A. PĚNČÍK, A. ŽUKAUSKAITĚ *et al.*, 2023. Amino acid conjugation of oxIAA is a secondary metabolic regulation involved in auxin homeostasis. *New Phytol.* **238**(6), 2264-2270. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.18887>
- BRZOBOHATÝ B., I. MOORE, P. KRISTOFFERSEN *et al.*, 1993. Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science.* **262**(5136), 1051-1054. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.8235622>

- BÜRKLE L., A. CEDZICH, C. DÖPKE *et al.*, 2003. Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**(1), 13-26. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01700.x>
- CAO ZY., LH. SUN, RX., MOU *et al.*, 2016. Profiling of phytohormones and their major metabolites in rice using Binary solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A.* **1451**, 67-74. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.011>
- CASANOVA-SÁEZ R., E. MATEO-BONMATÍ a K. LJUNG, 2021. Auxin Metabolism in Plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **13**(3), a039867. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/2Fcshperspect.a039867>
- CASANOVA-SÁEZ R., E. MATEO-BONMATÍ, J. ŠIMURA *et al.*, 2022. Inactivation of the entire *Arabidopsis* group II GH3s confers tolerance to salinity and water deficit. *New Phytol.* **235**(1), 263-275. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.18114>
- CERMANOVÁ K., 2020. *Vliv intenzity světla na množství cytokininů v intaktních rostlinách Arabidopsis thaliana*. Olomouc [cit. 2024-04-30]. Bakalářská práce. Univerzita Palackého V Olomouci.
- CORBESIER L., E. PRINSEN, A. JACQMARD *et al.*, 2003. Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *J Exp Bot.* **54**(392), 2511-2517. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jxb/erg276>
- CLARK E., S. MANULIS, Y. OPHIR *et al.*, 1993. Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola* pathover *gypsophila*e. *Mol Plant Pathol.* **83**(2), 234-240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-234>
- DAVIES P.J., 2010. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. 3rd ed. Netherlands: Springer. ISBN 9781402026850.
- DEL POZO J. C., S. DIAZ-TRIVINO, N. CISNEROS *et al.*, 2006. The Balance between Cell Division and Endoreplication Depends on E2FC-DPB, Transcription Factors Regulated by the Ubiquitin-SCF^{SKP2A} Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **18**(9), 2224-2235. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039651>
- DHARMASIRI N., S. DHARMASIRI, D. WEIJERS *et al.*, 2005. Plant Development Is Regulated by a Family of Auxin Receptor F Box Proteins. *Dev Cell.* **9**(1), 109-119. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.05.014>
- DI D. W., C. ZHANG, P. LUO *et al.*, 2015. The Biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? *Plant Growth Regul.* **78**, 275-285. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0103-5>
- DI MAMBRO R., N. SVOLACCHIA, R.D. IOIO *et al.*, 2019. The Lateral Root Cap Acts as an Auxin Sink that Controls Meristem Size. *Curr Biol.* **29**, 1199-1205. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.022>
- DOLEŽEL J., J. GREILHUBER a J. SUDA, 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc.* **2**(9), 2233-2244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>
- DOLEŽEL J., J. GREILHUBER a J. SUDA, 2007. *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 9783527314874
- DOLAN L., K. JANMAAT, V. WILLEMSSEN *et al.*, 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development.* **119**(1), 71-84. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dev.119.1.71>
- EFFENDI Y., S. RIETZ, U. FISHER *et al.*, 2011. The heterozygous *abp1/ABP1* inserional mutant has defects in functions requiring polar transport and in regulation of early auxin-regulated genes. *Plant J.* **65**(2), 282-294. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04420.x>
- EL-SHOWK S., R. RUANALA a Y. HELARIUTTA, 2013. Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development.* **140**(7), 1373-1283. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dev.086371>
- ENDERS T. A. a L. C. STRADER, 2015. Auxin aktivita: Past, present, and future. *Am J Bot.* **102**(2), 108-196. Dostupné z: <https://doi.org/10.3732/ajb.1400285>
- EVERT R.F., S.E. EICHHORN, K. ESAU, 2006. *Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. 3rd ed. N.J: Wiley-Interscience. ISBN 0-471-73843-3.
- FERREIRA S. L. C., A. O. CAIRES, T. D. D. BORGES *et al.*, 2017. Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. *Microchem J.* **131**, 163-169. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.004>

- FLOKOVÁ K., D. TARKOWSKÁ, O. MIERSCH *et al.*, 2014. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry*. **105**, 147-157. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.05.015>
- FRÉBORT I., M. KOWALSKA, T. HLUSKA *et al.*, 2011. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J Exp Bot*. **62**(8), 2431-2452. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jxb/err004>
- FRÉBORTOVÁ J., M. W. FRAAIJE, P. GALUSZKA *et al.*, 2004. Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochem J*. **380**(1), 121-130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042%2FBJ20031813>
- FRIEDECKÝ D. a K. LEMR, 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. **20**(41), 152-157. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>
- FU J., X. SUN, J. WANG *et al.*, 2011. Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chin Sci Bull*. **56**, 355-366. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s11434-010-4243-8>
- GALUSZKA P., I. FRÉBORT, M. SEBELA *et al.*, 2001. Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur J Biochem*. **268**(2), 450-461. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.01910.x>
- HAO G.-F., G.-F. YANG, 2010. The Role of Phe82 and Phe351 in Auxin-Induced Substrate Perception TOR1 Ubiquitin Ligase: A Novel Insight from Molecular Dynamics Simulations. *PLoS One*. **5**(5), e10742. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0010742>
- HAYASHI K., 2012. The Interaction and Integration of Auxin Signaling Components. *Plant Cell Physiol*. **53**(6), 965-975. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs035>
- HAYASHI K., K. ARAI, Y. AOI *et al.*, 2021. The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nat Commun*. **12**(1), 6752. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27020-1>
- HIGUCHI M., M. S. PISCHKE *et al.*, 2004. In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**(23), 8821-8826. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0402887101>
- HIROSE N., K. TAKEI, T. KUROHA *et al.*, 2008. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot*. **59**(1), 75-83. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jxb/erm157>
- HLADÍK P., I. PETŘÍK, A. ŽUKAUSKAITĚ *et al.*, 2023. Metabolic profiles of oxindole-3-acetyl-amino acid conjugates differ in various plant species. *Front Plant Sci*. **14**, 1217421. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1217421>
- HORÁK J. a M. LEXA, 2003. Dvoukomponentní systémy: regulátory odpovědi a přenos signálu u *Arabidopsis thaliana*. *Biologické listy*. **67**(4), 297-317.
- HOU B., E. K. LIM, G. HIGGINS *et al.*, 2004. N-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. **279**(46), 47822-47832. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.m409569200>
- HU Y., P. PATRA, O. PISANTY *et al.*, 2023. Multi-knock – a multi-targeted genome-scale CRISPR toolbox to overcome functional redundancy in plants. *Nat Plants*. **9**(4), 572-587. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01374-4>
- HU Y. a E. SHANI, 2023. Cytokinin aktivita – transport a homeostasis na úrovni celé rostliny, buňky a subcelulární úrovně. *New Phytol*. **239**(5), 1603-1608. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.19001>
- HULL A., R. VIJ a J. L. CELENZA, 2000. Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**(5), 2379-2384. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.040569997>
- HWANG I. a J. SHEEN, 2001. Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature*. **413**(6854), 383-389. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/35096500>
- HWANG I. a H. SAKAKIBARA, 2006. Cytokinin biosynthesis and perception. *Physiol Plant*. **126**(4), 528-538. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00665.x>

- IMAMURA A., N. HANAKI, A. NAKAMURA *et al.*, 1999. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulator implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol.* **40**(7), 733-742. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029600>
- INOUE T., M. HIGUCHI, Y. HASHIMOTO *et al.*, 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature.* **409**(6823), 1060-1063. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/35059117>
- ISHIDA K., T. YAMASHINO, A. YIKOYAMA *et al.*, 2008. Three Type-B Response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **49**(1), 47-57. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm165>
- ISHIHAMA Y., RAPPASILBER J. a M. MANN, 2006. Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional peptide fractionation in proteomics. *J Proteome Res.* **5**(4), 988-994. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/pr050385q>
- ISCHII Y., S. SAKAI a Y. HONMA, 2003. Cytokinin-induced differentiation of human myeloid HL-60 cells is associated with the formation of nucleotides, but not with incorporation into DNA or RNA. *Biochim Biophys Acta.* **1643**(1-3), 11-24. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.004>
- ISODA R., A. YOSHINARI, Y. ISHIKAWA *et al.*, 2021. Sensors for the quantification, localization and analysis of the dynamics of plant hormones. *Plant J.* **105**(2), 542-557. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111%2Ftpj.15096>
- JIKUMARU Y., M. SEO, H. MATSUURA *et al.*, 2013. Profiling of jasmonic acid-related metabolites and hormones on wounded leaves. *Methods Mol Biol.* **1011**, 113-122. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-414-2_9
- JONES B., S. A. GUNNERAS, S. V. PETERSSON *et al.*, 2010. Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell.* **22**(9), 2956-2969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074856>
- JONES A. R., E. M. KRAMER, K. KNOX *et al.*, 2009. Auxin transport through non-hair cells sustains root-hair development. *Nat Cell Biol.* **11**(1), 78-84. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ncb1815>
- JURADO S., Z. ABRAHAM., C. MANZANO *et al.*, 2010. The *Arabidopsis* Cell Cycle F-box Protein SKP2A Binds to Auxin. *Plant Cell.* **22**(12), 3891-3904. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105%2Ftpc.110.078972>
- KAKIMOTO T., 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferase. *Plant Cell Physiol.* **42**(7), 677-685. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/pcp/pce112>
- KAKIMOTO T., 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol.* **54**, 605-627. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134802>
- KIEBER J. a G. E. SCHALLER, 2014. Cytokinins. *Arabidopsis Book.* **12**, e0168. Dostupné z: <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
- KO D., J. KANG, T. KIBA *et al.*, 2014. *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **111**(19), 7150-7155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1321519111>
- KOCHHAR S.L. a S.K. GUJRAL, 2020. *Plant Physiology: Theory and Applications*. 2nd ed. Cambridge: University Press. ISBN 978-1-108-48639-2.
- KOJIMA M., T. KAMADA-NOBUSADA, H. KOMATSU *et al.*, 2009. Highly Sensitive and High-Throughput Analysis of Plant Hormones Using MS-Probe Modification and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: An Application for Hormone Profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* **50**(7), 1201-1214. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp057>
- KOWALCZYK M a G. SANDBERG, 2001. Quantitative Analysis of Indole-3-Acetic Acid Metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**(4), 1845-1853. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.010525>
- KRAMER E.M. a M.J. BENNETT, 2006. Auxin transport: a field in flux. *Trends Plant Sci.* **11**(8), 382-386. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.06.002>
- KUDO T., T. KIBA a H. SAKAKIBARA, 2010. Metabolism and Long-distance Translocation of Cytokinins. *J Integr Plant Biol.* **52**(1), 53-60. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00898.x>

- KURAWA T., N. UEDA, M. MAEKAWA *et al.*, 2007. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*. **445**(7128), 652-655. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature05504>
- LAIMBEER F. P. E., S. H. HOLT, M. MAKRIS *et al.*, 2017. Protoplast isolation prior to flow cytometry reveals clear patterns of endoreduplication in potato tubers, related species and some starchy root crops. *Plant Methods*. **13**(27). Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0177-3>
- LARRIEU A. a T. VERNOUX, 2015. Comparison of plant hormone signalling systems. *Essays Biochem*. **58**, 165-181. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/bse0580165>
- LEHMANN T., T. JANOWITZ, B. SÁNCHEZ-PARRA *et al.*, 2017. *Arabidopsis* NITRILASE 1 contributes to the regulation of root growth and development through modulation of auxin biosynthesis in seedlings. *Front Plant Sci* **8**(36). Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00036>
- LEYSER O., 1999. Plant hormones: Ins and outs of auxin transport. *Curr Biol*. **9**(1), R8-R10. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80033-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80033-5)
- LI J., H. YANG, W. A. PEER *et al.*, 2005. Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*. **310**(5745), 121-125. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1115711>
- LI J., X. DAI a Y. ZHAO, 2006. A Role for Auxin Response Factor 19 in Auxin and Ethylene Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol*. **140**(3), 899-908. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104%2Fpp.105.070987>
- LI L., I. VERSTRAETEN, M. ROOSJEN *et al.*, 2021. Cell surface and intracellular auxin signaling for H⁺ fluxes in root growth. *Nature*. **599**(7884), 273-277. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04037-6>
- LIU HT., YF. LI, TG. LUAN *et al.*, 2007. Simultaneous Determination of Phytohormones in Plant Extracts using SPME and HPLC. *Chroma*. **66**(7), 515-520. Dostupné z: <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0350-3>
- LIU X., AD. HEGEMAN, G. GARDNER *et al.*, 2012. Protocol: high-throughput and quantitative assays of auxin and auxin precursors from minute tissue samples. *Plant Methods*. **8**(1), 31. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-31>
- LJUNG K., R. P. BHALERAO a G. SANDBERG, 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J*. **28**(4), 465-474. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01173.x>
- LUDWIG-MÜLLER J., A. WALZ, J. P. SLOVIN *et al.*, 2005. Overexpression of maize IAGLU in Arabidopsis thaliana alters plant growth and sensitivity to IAA but not IBA and 2, 4-D. *J Plant Growth Regul*. **24**(2), 127-141. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-004-0006-6>
- MACEY M. G., 2007. *Flow Cytometry*. Totowa, New Jersey: Humana Press [cit. 2024-03-05].
- MAEDA H. a N. DUDAREVA, 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol*. **63**, 73-105. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>
- MARINOV I., 2008. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii. 2., přeprac. a rozš. vyd.* Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-143-7
- MATEO-BONMATÍ E., R. CASANOVA-SÁEZ, J. ŠIMURA *et al.*, 2021. Broadening the roles of UDP-glycosyltransferases in auxin homeostasis and plant development. *New Phytol*. **232**(2), 642-654. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.17633>
- MCCARTHY D.M. a M. G. MACEY, 2007. Fluorochromes and Fluorescence. In: *Flow cytometry*. Totowa, New Jersey: Humana Press, s. 59-113 [cit. 2024-03-11].
- MICHALKO J., M. DRAVECKÁ, T. BOLLENBACH *et al.*, 2015. Embryo-lethal phenotypes in early *abp1* mutants are due to disruption of the neighboring *BSM* gene. *F1000Res*. **4**, 1104. Dostupné z: <https://doi.org/10.12688/f1000research.7143.1>
- MIYAWAKI K., P. TARKOWSKI, M. MATSUMOTO-KITANO *et al.*, 2006. Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**(44), 16598-16603. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0603522103>
- MIZUNO T., 2004. Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. *Curr Opin Plant Biol*. **7**(5), 499-505. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.07.015>

- MOK D.W. S a M.C MOK, 1994. *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. Bota Raton: CRC Press. ISBN 9781351071284.
- MOK D. W. S a M. C. MOK, 2001. Cytokinin Metabolism and Action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **52**, 89-118. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.89>
- NAFISI M., S. GOREGAOKER, CH. J. BOTANGA *et al.*, 2007. Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell.* **19**(6), 2039-2052. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051383>
- NEU A., T. LEHMANN, S. ELLEUCHE *et al.*, 2007. Arabidopsis amisase 1, a member of the amidase signature family. *FEBS J.* **274**(13), 3440-3451. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05876.x>
- NGUYEN D. T., D. GUILLARME, S. RUDAZ *et al.*, 2006. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *J Sep Sci.* **29**(12), 1836-1848. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.200600189>
- NISHIMURA CH., Y. OHASHI, S. SATO *et al.*, 2004. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *Plant Cell.* **16**(6), 1365-1377. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.021477>
- NOVÁK O., E. HAUSEROVÁ, P. AMAKOROVÁ *et al.*, 2008. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry.* **69**(11), 2214-2224. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.022>
- NOVÁK O., E. HÉNYKOVÁ, I. SAIRANEN *et al.*, 2012. Tissue-specific profiling of the Arabidopsis thaliana auxin metabolome. *Plant J.* **72**(3), 523-536. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2012.05085.x>
- NOVÁK O., R. NAPIER, K. LJUNG, 2017. Zooming In on Plant Hormones Analysis: Tissue- and Cell- Specific Approaches. *Annu Rev of Plant Biol.* **68**, 323-348. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040812>
- OKRENT R. A., M. D. BROOKS a M. C. WILDERMUTH, 2009. Arabidopsis GH3.12 (PBS3) Conjugates Amino Acids to 4-Substituted Benzoates and Is Inhibited by Salicylate. *J Biol Chem.* **284**(15), 9742-9754. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.M806662200>
- OLATUNJI D., D. GEELEN a I. VERSTRAETEN, 2017. Control of Endogenous Auxin Levels in Plant Root Development. *Int J Mol Sci.* **18**(12), 2587. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390%2Fijms18122587>
- ORMEROD M. G., 2008. *Flow Cytometry - A Basic Introduction*. Los Angeles: De Novo Software [cit. 2024-03-05]. Dostupné z: <http://flowbook.denovosoftware.com>
- ÖSTIN A., M. KOWALYCZK, R. P. BHALERAO *et al.*, 1998. Metabolism of Indole-3-Acetic Acid in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **118**(1), 285-296. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104%2Fpp.118.1.285>
- OVERVOORDE P., H. FUKAKI, T. BEECKMAN *et al.*, 2010. Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**(6), a001537. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101%2Fcspherspect.a001537>
- PACIOREK T. a J. FRIML, 2006. Auxin signaling. *J Cell Sci.* **119**, 1199-1202. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/jcs.02910>
- PAN X. a X. WANG, 2009. Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **877**(26), 2806-2813. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.04.024>
- PĚNČÍK A., J. ROLČÍK, O. NOVÁK *et al.*, 2009. Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta.* **80**(2), 651-655. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.043>
- PĚNČÍK A., B. SIMONOVIK, S. V. PETERSSON *et al.*, 2013. Regulation of Auxin Homeostasis and Gradients in Arabidopsis Roots through the Formation of the Indole-3-Acetic Acid Catabolite 2-Oxindole-3-Acetic Acid. *Plant Cell.* **25**(10), 3858-3870. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105%2Ftpc.113.114421>
- PĚNČÍK A., R. CASANOVA-SÁEZ, V. PILÁŘOVÁ *et al.*, 2018. Ultra, rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in Arabidopsis. *J Exp Bot.* **69**(10), 2569-2579. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jxb/ery084>

- PÉRET B., B. DE RYBEL, I. CASIMIRO *et al.*, 2009. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* **14**(7), 399-408. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.05.002>
- PETERSSON S. V., A. I. JOHANSSON, M. KOWALCZYK *et al.*, 2009. An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell.* **21**(6), 1659-1668. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066480>
- PETRÁŠEK, J. a J. FRIML, 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development.* **136**(16), 2675-2688. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dev.030353>
- POLLMANN S, D. NEU a E. W. WEILER, 2003. Molecular cloning and characterization of an amidase from Arabidopsis thaliana capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry.* **62**(3), 293-300. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00563-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00563-0)
- PORCO S., A. PĚNČÍK, A. RASHED *et al.*, 2016. Dioxygenase-encoding *AtDAO1* gene controls IAA oxidation and homeostasis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **113**(39), 11016-11021. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1604375113>
- PROCHÁZKA S., S. MACHÁČKOVÁ, I. KREKULE *et al.*, 1998. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0586-2.
- PUITE K. J. a W. R. R. T. BROEKE, 1983. DNA staining of fixed and non-fixed plant protoplasts for flow cytometry with hoeschst 33342. *Plant Sci Lett.* **32**(1-2), 79-88. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(83\)90101-3](https://doi.org/10.1016/0304-4211(83)90101-3)
- QI L. a J. FRIML, 2023. Tale of cAMP as a second messenger in auxin signaling and beyond. *New Phytol.* **240**(2), 489-495. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.19123>
- QI L., M. KWIATKOWSKI, H. CHEN *et al.*, 2022. Adenylate cyclase activity of TIR1/AFB auxin receptors in plants. *Nature.* **611**, 133-138. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05369-7>
- RAPPSILBER J., Y. ISHIHAMA a M. MANN, 2003. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem.* **75**(3), 663-670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac026117i>
- RATTAN S. I. A L. SODAGAM, 2005. Gerontomodulatory and youth-preserving effects of zeatin on human skin fibroblasts undergoing aging in vitro. *Rejuvenation Res.* **8**, 46-57. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/rej.2005.8.46>
- RIOV J. a F. BANGERTH, 1992. Metabolism of auxin in tomato fruit tissue: formation of high molecular weight conjugates of oxindole-3-acetic acid via the oxidation of indole-3-acetylaspatic acid. *Plant Physiol.* **100**(3), 1396-1402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.100.3.1396>
- ROBINSON J.P. a G. GRÉGORI, 2007. Principles of Flow Cytometry. In: *Flow Cytometry with Plant Cells*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 19-40. ISBN 978-3-527-31487-4
- SAKAKIBARA H., H. KASAHARA, N. UEDA *et al.*, 2005. Agrobacterium tumefaciens increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**(28), 9972-9977. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0500793102>
- SAKAKIBARA H, 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol.* **57**(1), 431-49. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>
- SEKINE M., K. WATANABE a K. SYONO, 1989. Molecular cloning of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from Bradyrhizobium japonicum. *J Bacteriol.* **171**(2), 1718-1724. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1718-1724.1989>
- SHAPIRO, H. M., 2003. *Practical flow cytometry*. 4th ed. Hoboken: John Wiley & Sons. ISBN 0471411256.
- SCHERES B., P. BENFEY a L. DOLAN, 2002. Root development. *Arabidopsis Book.* **1**, e0101. Dostupné z: <https://doi.org/10.1199/tab.0101>
- SCHMÜLLING T., T. WERNER, M. RIEFLER *et al.*, 2003. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *J Plant Res.* **116**(3), 241-252. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0096-4>

- SPICHAL L., N. Y. RAKOVA, M. RIEFLER *et al.*, 2004. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* **45**(9), 1299-1305. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/pcp/pch132>
- STASWICK P. E. a I. TIRYAKI, 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to osileucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **16**(8), 2117-2127. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023549>
- STASWICK P. E., B. SERBAN, M. ROWE *et al.*, 2005. Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell.* **17**(2), 616-627. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026690>
- STEPANOVA A. N., J. ROBERTSON-HOYT, J. YUN *et al.*, 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell.* **133**(1), 177-191. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.047>
- SU Y., W. LUO, X. CHEN *et al.*, 2017. Auxin Extraction and Purification Based on Recombinant Aux/IAA Proteins. *Biol Proced Online.* **19**(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.1186%2Fs12575-016-0050-1>
- SUGAWARA S., S. HISHIYAMA, Y. JIKUMARU *et al.*, 2009. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**(13), 5430-5435. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0811226106>
- SVAČINOVÁ J., O. NOVÁK., L. PLAČKOVÁ *et al.*, 2012. A new approach for cytokinin isolation from *Arabidopsis* tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods.* **8**(1), 17. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-17>
- Swarup R., E.M. Kramer, P. Perry *et al.*, 2005. Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1057-1065. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ncb1316>
- TAIZ L. a E. ZEIGER, 2010. *Plant Physiol.* 5th ed. Sunderland: Sinauer Associates. ISBN 0878938664.
- TAKEI K., H. SAKAKIBARA a T. SUGIYAMA, 2001. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* **276**(28), 26405-26410. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.m102130200>
- TAKEI K., N. UEDA, K. AOKI *et al.*, 2004. AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **45**(8), 1053-1062. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/pcp/pch119>
- TARKOWSKÁ D., O. NOVÁK, K. FLOKOVÁ *et al.*, 2014. Quo vadis plant hormones analysis? *Planta.* **240**(1), 55-76. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2063-9>
- TARKOWSKI P., L. GE, J. W. H. YONG *et al.*, 2009. Analytical methods for cytokinins. *Trends Anal Chem.* **28**(3), 323-335. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.11.010>
- TIWARI S. B., X. J. WANG, G. HAGEN *et al.*, 2001. AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell.* **13**(12), 2809-2822. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.010289>
- TRDÁ L., M. BAREŠOVÁ, V. ŠAŠEK *et al.*, 2017. Cytokinin Metabolism of Pathogenic Fungus *Leptosphaeria maculans* Involves Isopentenyltransferase, Adenosine Kinase and Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase. *Front Microbiol.* **8**(1374). Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01374>
- TROMAS A., N. BRAUN, P. MULLER *et al.*, 2009. The AUXIN BINDING PROTEIN 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. *PLoS One.* **4**(9), e6648. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006648>
- TROMAS, A., S. PAQUE, V. STLERLÉ *et al.*, 2013. Auxin-binding protein 1 is a negative regulator of the SCF (TIR/AFB) pathway. *Nat Commun.* **4**(1), 2496. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ncomms3496>
- TSURUMI S. a S. WADA, 1985. Identification of 3-(O-beta-Glucosyl)-2-Indolone-3-Acetylaspartic Acid as a New Indole-3-Acetic Acid Metabolite in *Vicia* Seedlings. *Plant Physiol.* **79**(3), 667-671. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.79.3.667>

- VAŇKOVÁ, R. a M. PESSARAKLI, 2010. Plant Hormone Functions in Abiotic and Biotic Stress Responses. In: *Handbook of Plant and Crop Stress*. 3rd ed. CRC Press, 191-21. Dostupné z: <https://www.routledgehandbooks.com/doi/10.1201/b10329-11>
- WANG B., J. CHU, T. YU *et al.*, 2015. Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **112**(15), 4821–4826. Dostupné z: [10.1073/pnas.1503998112](https://doi.org/10.1073/pnas.1503998112)
- WANG J., X. M. MA, M. KOJIMA *et al.*, 2011. N-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. **52**(12), 2200-2213. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr152>
- WANG J., X. M. MA, M. KOJIMA *et al.*, 2013. Glucosyltransferase UGT76C1 finely modulates cytokinin responses via cytokinin N-glucosylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*. **65**, 9-16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.01.012>
- WANG L., CH. DUAN, D. WU *et al.*, 2014. Quantification of endogenous brassinosteroids in sub-gram plant tissues by in-line matrix solid-phase dispersion-tandem solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. **1359**, 44-51. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.037>
- WENT F. W. a K. V. THIMANN, 1937. *Phytohormones*. New York: Macmillan [cit. 2024-03-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.5695>
- KOLLMER, I. BARTRINA *et al.*, 2006. New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol (Stuttg)*. **8**(3), 371-381. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/s-2006-923928>
- WOODWARD A. W. a B. BARTEL, 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot*. **95**(5), 707-735. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>
- WULFF S., 2006. *Guide to Flow Cytometry*. 2nd ed. Carpinteria: Dako. Dostupné z: <https://www.genequantification.de/dako-facs-guide.pdf>
- YANG Y., R. XU, CH. MA *et al.*, 2008. Inactive Methyl Indole-3-Acetic Acid Ester Can Be Hydrolyzed and Activated by Several Esterases Belonging to the AtMES Esterase Family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **147**(3), 1034-1045. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104%2Fpp.108.118224>
- YOKOYAMA A., T. YAMASHINO, Y. I. AMANO *et al.*, 2007. Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. **48**(1), 84-96. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcl040>
- ZAŽÍMALOVÁ E., A.S. MUPRHY, H. YANG *et al.*, 2010. Auxin transporters-why so many? *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **2**(3). Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001552>.
- ZHAO Y., S. K. CHRISTENSEN, C. FANKHAUSER *et al.*, 2001. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*. **291**(5502), 306-309. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.291.5502.306>
- ZHANG J., J. E. LIN, C. HARRIS *et al.*, 2016. DAO1 catalyzes temporal and tissue-specific oxidative inactivation of auxin in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **113**(39), 11010-11015. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1604769113>
- ZHANG J. a W. A. PEER, 2017. Auxin homeostasis: the DAO of catabolism. *J Exp Bot*. **68**(12), 3145-3154. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jxb/erx221>
- ZHANG K., O. NOVÁK, Z. WEI *et al.*, 2014. *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nat Commun*. **5**, 3274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ncomms4274>
- ZHANG Y., Y. LI, Y. HU *et al.*, 2010. Preparation of magnetic indole-3-acetic acid imprinted polymer beads with 4-vinylpyridine and β -cyclodextrin as binary monomer via microwave heating initiated polymerization and their application to trace analysis of auxins in plant tissues. *J Chromatogr A*. **1217**(47), 7337-7344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.059>
- ZHAO Z., Y. ZHANG, X. LIU *et al.*, 2013. A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Dev Cell*. **27**(1), 113-122. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.005>

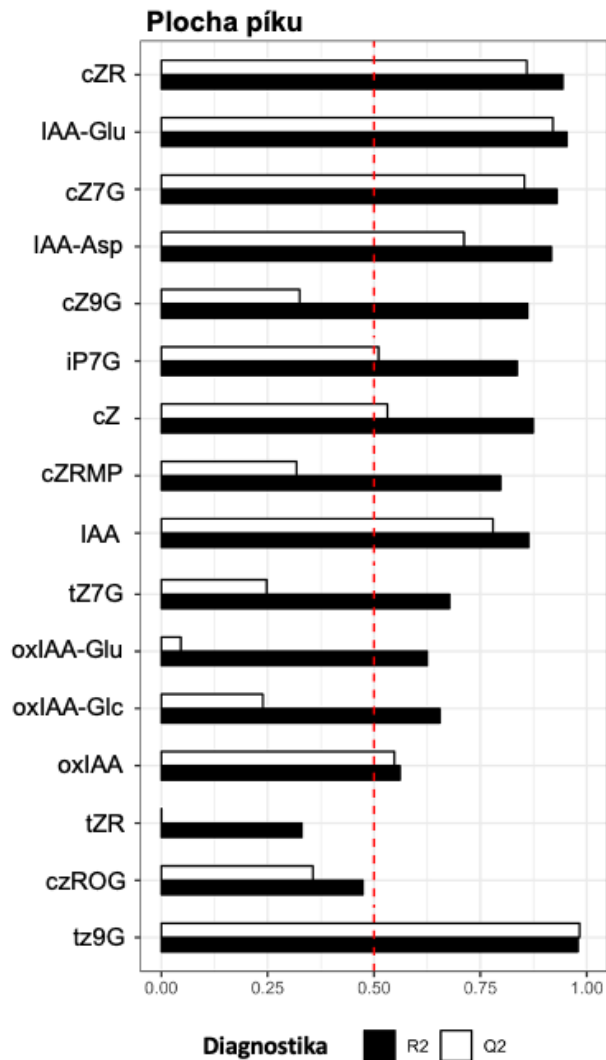
- ZHOU Y., R. DENG, X. XU *et al.*, 2021. Isolation of Mesophyll Protoplasts from Tea (*Camellia sinensis*) and Localization Analysis of Enzymes Involved in the Biosynthesis of Specialized Metabolites. *Beverage Plant Res.* **1**(2). Dostupné z: <https://doi.org/10.48130/BPR-2021-0002>
- ZHOU J.J. a J. LUO J, 2018. The PIN-FORMED auxin efflux carriers in plants. *Int J Mol Sci.* **19**(9), 2759. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390%2Fijms19092759>
- ZUBIETA C., J. R. ROSS, P. KOSCHESKI *et al.*, 2003. Structural basis for substrate recognition in the salicyl acid carboxyl methyltransferase family. *Plant Cell.* **15**(8), 1704-1716. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.014548>
- ZÜRCHER E., J. LIU, M. D. DONATO *et al.*, 2016. Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science.* **353**(6303), 1027-1030. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.aaf7254>
- ZWIEWKA M., V. BILANOVIČOVÁ. Y. SEIFU *et al.*, 2019. The nuts and bolts of PIN auxin efflux carriers. *Front Plant Sci.* **10**(985). Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00985>

8 PŘÍLOHY

Příloha A: Faktoriální návrh experimentu použitého k optimalizaci metody DSPE pomocí pěti faktorů.

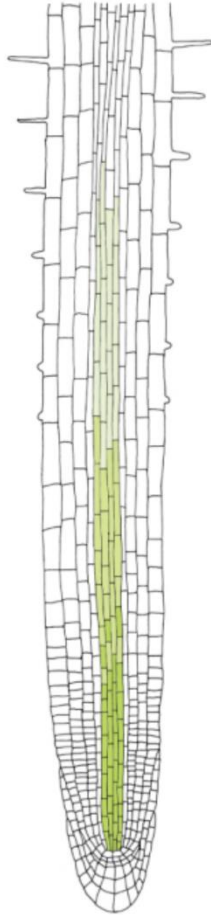
Vzorky	A	B	C	D	E
1	-1	-1	-1	1	1
2	-1	-1	1	1	-1
3	-1	1	-1	-1	1
4	-1	1	1	-1	-1
5	1	-1	-1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	1	1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
Blank 1	0	0	0	0	0
Blank 2	0	0	0	0	0
Blank 3	0	0	0	0	0

Příloha B: Křížová validace znázorňující spolehlivost optimalizace parametrů DSPE metody pomocí faktoriálního designu experimentu. Pro každý metabolit by spočítán koeficient determinace (R2), který vykazuje vyšší míru spolehlivosti, čím více se blíží k hodnotě jedna. Adjustovaný koeficient determinace (Q2) ukazuje spolehlivý výsledek, pokud se nižší hodnoty R2 o více než 0,3.

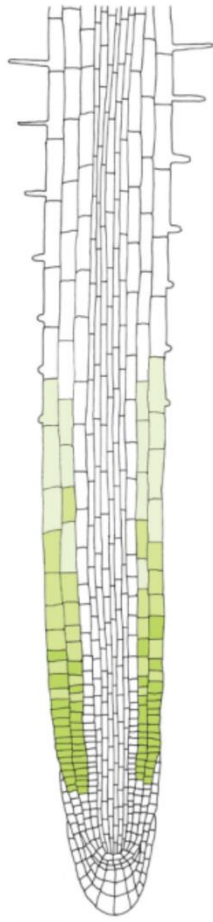


Příloha C: Porovnání vzoru exprese v kořenové špičce u tří GFP linií *A. thaliana* použitých v této studii na základě snímků z konfokálního mikroskopu (Pettersson *et al.*, 2009).

J2501



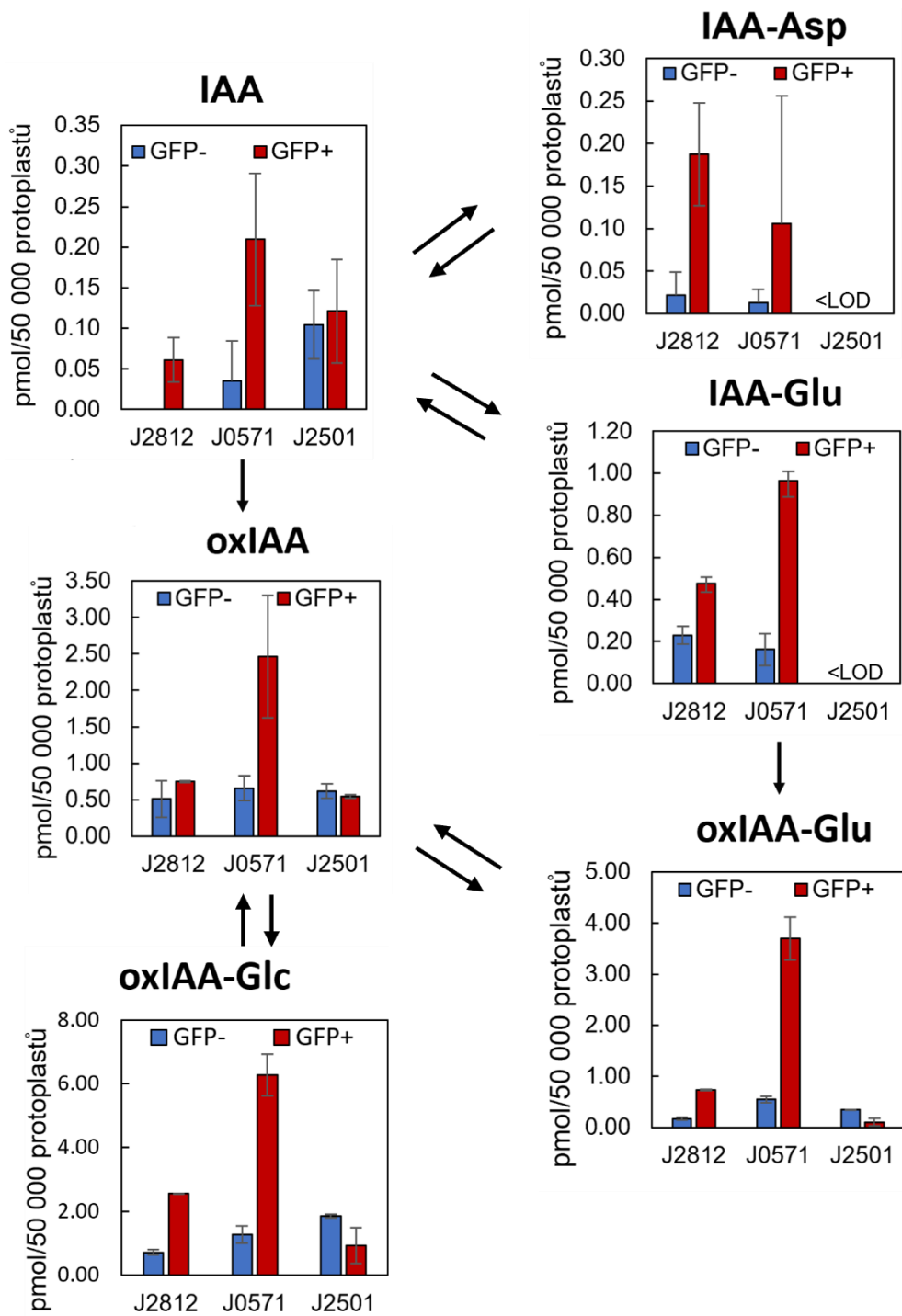
J2812



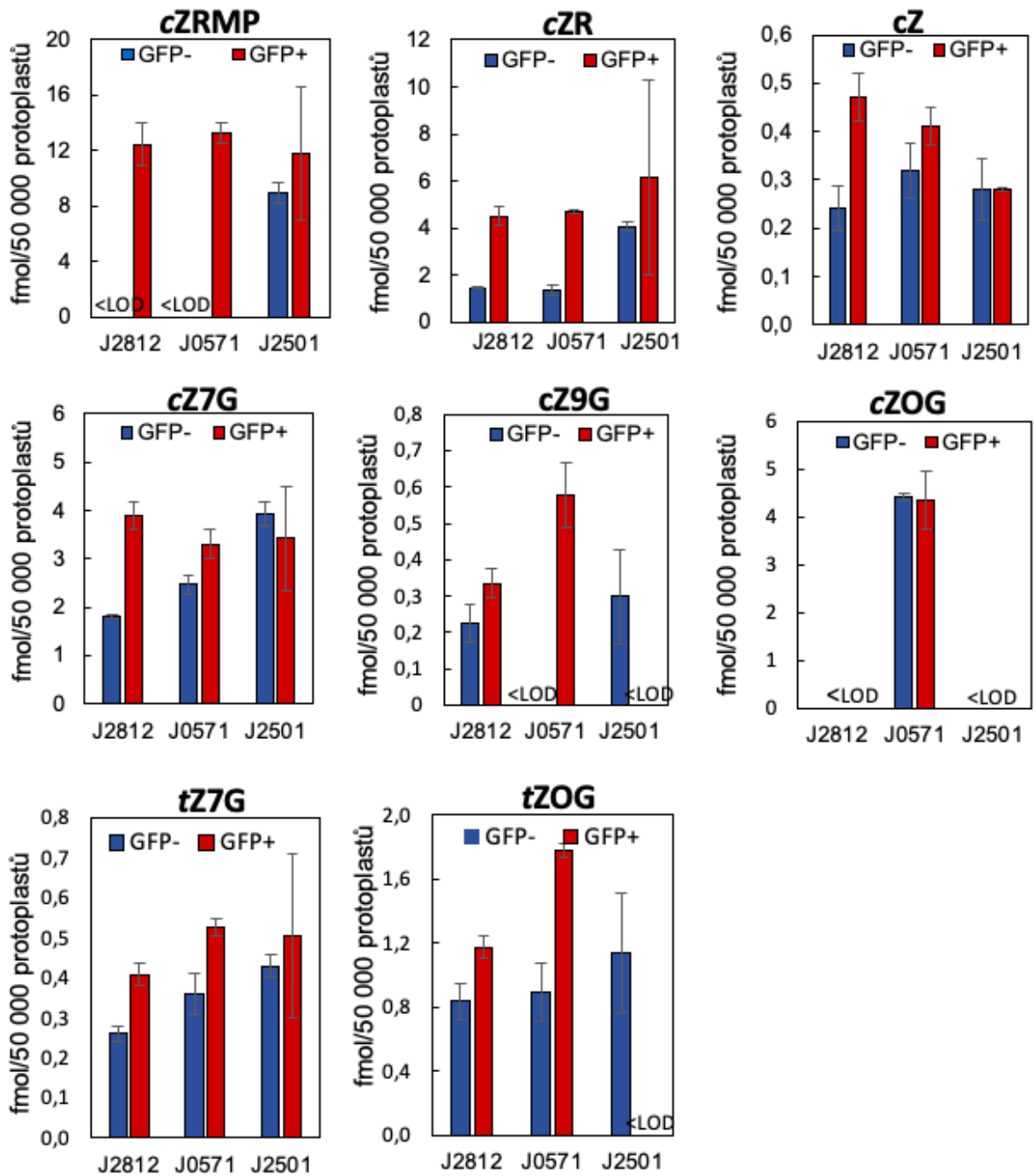
J0571



Příloha D: Endogenní hladiny IAA (pmol/50 000 protoplastů) a příslušných metabolitů získaných z LC-MS/MS analýzy tří mutantních linií (*J2812*, *J0571* a *J2501*). Schéma auxinového metabolismu vychází z Obr. 3, Průměr ± SD, n = 3.



Příloha E: Endogenní hladiny cytokininů (fmol/50 000 protoplastů) získaných z LC-MS/MS analýzy tří mutantních linií (J2812, J0571 a J2501). Průměr ± SD, n = 3.



Příloha E (pokračování): Endogenní hladiny cytokininů (fmol/50 000 protoplastů) získaných z LC-MS/MS analýzy tří mutantních linií (*J2812*, *J0571* a *J2501*). Průměr ± SD, n = 3.

