

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Studium vakuolárních a sekrečních isoformů AtCKX, jejich  
vlivu na distribuci cytokininů ve vakuole a na regulaci  
kořenové architektury *Arabidopsis thaliana***

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: **Martina Kostková**  
Studijní program: B1501 Experimentální biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.  
Termín odevzdání práce: 2017

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Martina Kostková
Název práce	Studium vakuolárních a sekrečních isoform AtCKX, jejich vlivu na distribuci cytokininů ve vakuole a na regulaci kořenové architektury <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie
Vedoucí práce	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	<p>Cytokiny jsou rostlinné hormony, které se podílejí na růstu a vývoji rostlin. Hladina cytokininů v rostlinách musí být striktně regulována. Jedním z mechanismů je jejich degradace. Ireverzibilní degradaci cytokininů zajišťují cytokinin dehydrogenázy (CKX). V <i>Arabidopsis thaliana</i> se vyskytuje 7 isoform CKX, které mohou být rozděleny z hlediska rozdílné distribuce na vakuolární (CKX1, CKX3), asociované s ER a apoplastické (CKX2, CKX4, CKX5, CKX6). Pouze jedna izoforma je čistě cytosolická (CKX7). Rostliny s nadprodukcí CKX se obecně vyznačují větším kořenovým systémem, díky kterému mohou mimo jiné efektivněji čelit stresovým faktorům v podobě nedostatku vody a minerálních látek. Dílčím cílem diplomové práce bylo detailně charakterizovat a porovnat kořenový systém linií <i>A. thaliana</i> s nadprodukcí genů <i>CKX1</i> a <i>CKX2</i> s umlčenými liniemi <i>ckx2</i> a <i>ckx3</i> a s kontrolními rostlinami Col-0, především z hlediska délky primárního kořene, počtu laterálních kořenů a úhlů mezi primárními a laterálními kořeny. Výsledky ukázaly, že linií s největší délkou primárního kořene a s největší četností laterálních kořenů je <i>CKX2</i> nadprodukující linie. Výsledky navíc ukázaly, že cytokinin-deficientní rostliny mají vertikálněji orientované laterální kořeny. Linie s umlčenými geny <i>ckx2</i> a <i>ckx3</i> a linie s nadprodukcí genu <i>CKX2</i> a kontrolní rostliny Col-0 byly použity pro stanovení celkového obsahu cytokininů ve vakuolách metodou UHPLC-MS/MS. Nejvyšší obsah celkových cytokininů byl naměřen ve vakuolách nadprodukujících linií <i>CKX2</i> – konkrétně byla pozorována zvýšená hladina O-glukosidů, N-glukosidů, THZ, <i>trans</i> a <i>cis</i>-zeatinu. Výsledky mohou přispět k objasnění mechanismu skladování cytokininů ve vakuolách.</p>
Klíčová slova	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokinin dehydrogenázy, kořenová fenotypizace, vakuoly
Počet stran	76
Počet příloh	0

Jazyk

Český

**Bibliographical identification**

Author's first name and surname

Martina Kostková

Title of thesis

Study of the vacuolar and secreted *Arabidopsis thaliana* cytokinin dehydrogenases, their effect on cytokinin distribution in vacuoles and on the root system architecture of *Arabidopsis thaliana*.

Type of thesis

Master

Department

Department of Molecular Biology

Supervisor

RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.

The year of presentation

2017

Abstract

Cytokinins are plant hormones responsible for regulation of the cell division and development. Cytokinin levels are regulated by metabolic degradation of the hormone, which is catalyzed by cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) enzymes. The *CKX* gene family of *Arabidopsis thaliana* is comprised of seven members, which differ in the subcellular localization of their protein products. CKX2, CKX4, CKX5, and CKX6 are processed by the plant secretory pathway, while CKX1 and CKX3 proteins are targeted to vacuoles and only CKX7 isoform is localized to the cytosol. Enhanced expression of *CKX* genes causes increased root growth phenotype. The enlarged root system may be accountable for better drought tolerance and positively influences the uptake and accumulation of nutrients. Transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *CKX1* or *CKX2* and T-DNA knock-out lines *ckx2* or *ckx3* were used in this work as a tool for studies of associated system root architecture. Specifically, primary root length, number of lateral roots, and gravitropic set-point angles were measured in transgenic and control Col-0 plants. The results showed that *CKX2* overexpressing plants produced the greatest number of lateral roots as well as the largest primary roots. In contrast, the cytokinin-deficient plants have shifted their lateral roots to a near vertical gravitropic setpoint angle (GSA). The total quantities of the vacuolar content of cytokinins from *ckx2* and *ckx3* loss of function mutants, *CKX2* overexpressing line, and Col-0 control were determined. The cytokinin content was measured by ultra-high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) system. The results showed that several cytokinin forms were enriched in vacuoles of the

*CKX2* overexpressor. Specifically, we observed enhanced accumulation of cytokinin *O*-glucosides, *N*-glucosides, DHZ, and *cic* and *trans* zeatin. These results may contribute to better understanding of the mechanism of the cytokinin transport and storage in vacuoles.

Keywords

*Arabidopsis thaliana*, cytokinin dehydrogenase, root architecture, vacuoles

Number of pages

76

Number of appendices

0

Language

Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, s pomocí vedoucího práce a citované literatury.

V Olomouci dne .....

Podpis.....

**Poděkování:**

Ráda bych touto cestou vyjádřila upřímné poděkování vedoucímu diplomové práce RNDr. Ondřeji Plíhalovi, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost, obětavost a poskytnutí cenných rad při konzultacích i praktických experimentech.

Mé poděkování patří také Mgr. Onřeji Novákovi, Ph.D za kompletní práci na UHPLC-MS/MS a vyhodnocení výsledků z této analýzy.

## Obsah:

1. Cíle práce .....	9
2. Úvod.....	10
3. Současný stav problematiky.....	11
<b>3.1 Arabidopsis thaliana.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Cytokininy.....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Struktura cytokininů .....	12
3.2.2 Biosyntéza.....	13
3.2.3 Transport.....	15
<b>3.3 Přenos signálu.....</b>	<b>17</b>
3.3.1 Kompartimentalizace CK.....	17
3.3.2 Význam cytokininů v rostlinách.....	20
<b>3.4 Cytokinin dehydrogenázy.....</b>	<b>21</b>
3.4.1 Lokalizace izoenzymů CKX v <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
3.4.2 Funkce izoenzymů CKX.....	23
3.4.3 Nadprodukující linie <i>Arabidopsis thaliana</i> pro genovou rodinu CKX.....	24
3.4.1 Umlčené linie <i>Arabidopsis thaliana</i> pro genovou rodinu CKX.....	28
<b>3.5 CKX v jiných organismech.....</b>	<b>29</b>
4. Materiál a metody .....	31
<b>4.1 Chemikálie .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Přístroje a vybavení.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Roztoky a chemikálie.....</b>	<b>33</b>
4.3.1 Roztoky pro agarosovou elektroforézu .....	33
4.3.2 Roztoky k izolaci vakuol.....	33
4.3.3 Chemikálie pro přípravu MS média.....	34
4.3.4 Chemikálie pro izolaci DNA.....	34
4.3.5 Složení cytokininového standartu.....	35
<b>4.4 Metody .....</b>	<b>36</b>
4.4.1 Rostlinný materiál .....	36
4.4.2 Sterilizace semen.....	36
4.4.3 Sazení semen.....	36
4.4.4 Analýza GSA .....	36
4.4.5 Fenotypizace kořenové části analyzovaných rostlin .....	37
4.4.6 PCR genotypizace .....	38

4.4.7	Izolace vakuol .....	41
4.4.8	Počítání vakuol pomocí Bürkerovy komůrky.....	43
4.4.9	Příprava vzorků pro LC-MS/MS analýzu .....	44
4.4.10	LC-MS/MS analýza .....	44
5.	Výsledky .....	46
5.1	<b>PCR genotypizace mutantů .....</b>	<b>46</b>
5.2	<b>Fenotypizace kořenové části .....</b>	<b>49</b>
5.2.1	GSA .....	49
5.2.2	Analýza délky primárního kořene a počtu laterálních kořenů .....	51
5.3	<b>Izolace vakuol .....</b>	<b>54</b>
5.4	<b>Stanovení celkových cytokininů metodou LC-MS/MS .....</b>	<b>56</b>
5.5	<b>CKX7 .....</b>	<b>58</b>
6.	Diskuse.....	60
6.1	<b>Délka primárního kořene .....</b>	<b>60</b>
6.2	<b>Laterální kořeny .....</b>	<b>61</b>
6.3	<b>GSA .....</b>	<b>62</b>
6.4	<b>Stanovení cytokininů ve vakuole .....</b>	<b>63</b>
7.	Závěr .....	66
8.	Seznam zkratk.....	67
9.	Seznam použité literatury.....	69



## 1 Cíle práce

- 1) Vypracování literární rešerše na téma cytokininy, zejména kompartmentalizace a metabolismus cytokininů.
- 2) Získání homozygotních linií *Arabidopsis thaliana* s T-DNA inzercí v genech *CKX2* a *CKX3*.
- 3) Izolace vakuol z linií *Arabidopsis thaliana* nadprodukujících sekreční formu *CKX2* a vakuolární formu *CKX3* cytokinin dehydrogenázy.
- 4) Izolace vakuol z umlčených linií *Arabidopsis thaliana*, s T-DNA inzercí v genech pro vakuolární formu *CKX3* a sekreční formu *CKX2* cytokinin dehydrogenázy.
- 5) Fenotypizace kořenové architektury rostlin *Arabidopsis thaliana* s nadprodukcí genů *CKX1*, *CKX2* a *CKX3* a umlčených linií *Arabidopsis thaliana* v genech *CKX2* a *CKX3*.

## 2 Úvod

Cytokinininy jsou rostlinné hormony, které se podílejí na správném vývoji a růstu rostlin. Mezi nejvýznamnější fyziologické účinky cytokininů patří stimulace buněčného dělení, negativní regulace růstu kořenů a pozitivní regulace růstu nadzemních částí rostlin, zvýšení kapacity sinku, zpomalení stárnutí listů či zvýšení tolerance vůči extrémním podmínkám životního prostředí (zasolená půda, sucho). Cytokinin dehydrogenázy (CKX) jsou enzymy, které udržují hladinu cytokininů ve fyziologickém rozmezí tím, že je ireverzibilně degradují. Nadprodukce či umlčení isoform CKX je vhodný přístup pro pochopení významu cytokininů v rostlinách. Při změnách exprese vybraného genu *CKX* se paralelně mění i koncentrace cytokininů v rostlinách. Nedostatek či nadbytek cytokininů se projeví změnami na úrovni morfologie nadzemní a kořenové části rostlin.

V modelové rostlině huseničku rolním (*Arabidopsis thaliana*) se nachází 7 genů kódujících příslušné izoformy CKX. Jednotlivé izoformy jsou velmi rozdílné z hlediska substrátu, který preferenčně degradují, vlastní regulace exprese, a liší se rovněž buněčnou lokalizací, která je determinována signálními peptidy na N-konci proteinu. Isoformy CKX2, CKX4, CKX5 a CKX6, u kterých se signální peptid nalézá, jsou sekretovány do apoplastu. Naproti tomu izoforma CKX7, který nedisponuje žádným signálním peptidem, zůstává v cytosolu. Isoformy CKX3 a CKX1 jsou lokalizovány ve vakuolách na základě degenerované aminokyselinové sekvence, také nazývané NPIR, která se nachází v N-terminální části proteinu (Nakamura a Matsuoka, 1993).

Diplomová práce si klade za cíl statisticky vyhodnotit fenotypový projev nadprodukce („overexpressing line“, OE) *CKX1*, *CKX2* a *CKX3* na kořenovou architekturu *Arabidopsis thaliana*. Kořeny budou hodnoceny z hlediska velikosti úhlů mezi laterálními kořeny a hlavním kořenem, délky primárního kořene a počtu laterálních kořenů. Fenotypizace bude provedena paralelně na umlčených liniích („knock-out line“, KO) *ckx2* a *ckx3*. Cílem fenotypizace bude zjistit, jaký je vliv nadprodukce/umlčení jednotlivých izoform CKX na strukturu kořene.

Dalším cílem diplomové práce je zjistit, jak nadprodukce nebo umlčování vybraných izoform CKX ovlivňuje hladinu cytokininů v buňce, a to zejména ve vakuolách, kde se přirozeně vyskytují izoformy CKX1 a CKX3. U vybraných linií a kontrolních rostlin bude provedena izolace vakuol, které budou použity pro měření obsahu cytokininů ve vakuole a v cytosolu.

### 3 Současný stav problematiky

#### 3.1 *Arabidopsis thaliana*

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je dvouděložná rostlina z čeledi brukvovitých, která je příbuzná některým druhům zeleniny, jako je ředkvička, řepka nebo zelí, nemá však zemědělské využití. Z pohledu molekulární biologie je to však jedna z nejčastěji využívaných modelových rostlin, sloužících k funkční analýze jednotlivých genů. Důvodem, proč si na poli molekulární biologie vydobyla tak vysoké postavení, je především nízký počet chromozomů a malá velikost genetické informace čítající pouhých  $125 \times 10^6$  bází. Tato velikost odpovídá desetinásobku velikosti genomu kvasinky, je srovnatelná s velikostí genomu octomilky, je však přibližně 26x menší než je velikost lidského genomu. Vzhledem k relativně malé velikosti genomu a vzhledem k vědeckému významu této modelové rostliny se *Arabidopsis thaliana* stala historicky první rostlinou s kompletně přečtenou sekvencí genomické DNA, která byla získána již v roce 2000. Důvodem relativně malé velikosti genetické informace je nízké zastoupení repetitivních DNA sekvencí, což přispívá k snadné mutagenězi genomu a rychlé identifikaci genů. Pro genetické studie v *A. thaliana* jsou k dispozici vysoce účinné transformační metody pro přípravu T-DNA mutantů a transgenních linií. Malá velikost genomu však není jedinou podmínkou, kterou musí modelový organismus splňovat. Další vlastností je prostorová nenáročnost *A. thaliana*, díky které lze pěstovat velké množství jedinců na malé ploše. Z časových důvodů je dalším předpokladem krátká generační doba, která se u *A. thaliana* pohybuje kolem šesti až osmi týdnů od vyklíčení. Tak lze získat několik generací v průběhu jednoho roku, přičemž jedna rostlina vyprodukuje až několik tisíc semen (Řepková, 2007). Vysoký počet semen je výhodný pro mutagenězi. Za předpokladu, že jsou semena mutována současně, se totiž významně zvýší pravděpodobnost úspěšné mutageněze (Koornneef a Meinke, 2010). Rostliny *A. thaliana* také neprodukují nektar, a tím jsou neatraktivními pro hmyz. V důsledku této indispozice se u nich evolučně vyvinula samosprašnost (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), (Snusnad a Simmons, 2009).

#### 3.2 Cytokininy

Cytokininy jsou přirozeně se vyskytující rostlinné hormony, nezbytné pro růst a vývoj rostliny. První zmínka o existenci látky regulující růst rostlin byla uvedena v práci Gottlieba Haberlandtera (1913). Všiml si, že pokud nechá působit floémovou mizu na nedělící se buňky parenchymu, nabydou opět schopnosti dělit se. Předpokládal tedy, že

floém obsahuje rozpustnou látku, zodpovědnou za indukci buněčného dělení. Cytokininy, jako hormony buněčného dělení, byly ovšem objeveny a popsány až o 42 let později, díky rozvoji technik rostlinných tkáňových kultur v laboratoři profesora Folke Skooga. Folke Skoog se zabýval především problematikou vlivu externě přidaných chemických látek na iniciaci růstu kalusu a formaci pupenů na řezu stonku tabáku. Zajímavých výsledků dosáhl po přidání adeninu do média s kulturou a hormonem auxinem. Díky přítomnosti adeninu byl potlačen inhibiční efekt auxinu a došlo k intenzivnímu růstu kalusů a tvorbě pupenů (Skoog, 1951). Pozitivní vliv adeninu na formaci pupenů a růst kalusu přispěl k intenzivnímu studiu různých derivátů purinů, jako potenciálních růstových faktorů. Výsledkem studií byl objev 6-furfurylaminopurinu (kinetinu), který byl získán z autoklávovaných vzorků spermatu herinků, a podporoval dělení rostlinných buněk v *in vitro* podmínkách (Miller a kol., 1955). V přirozených podmínkách se nachází jen ve velmi malých koncentracích v DNA živočichů i rostlin.

Na základě získaných poznatků byly cytokininy definovány jako látky, které v přítomnosti auxinů stimulují buněčné dělení. Po objevu kinetinu bylo snahou mnoha výzkumů objevit přirozeně se vyskytující cytokininy. Tento cíl byl velmi ambiciózní zejména kvůli nízké koncentraci cytokininů, která se v rostlině pohybuje řádově v nanomolárních množstvích. Pro objevení cytokininů bylo proto zapotřebí extrahovat a frakcionizovat desítky kilogramů rostlinného materiálu. Historicky první, přirozeně se vyskytující hormon, byl získán v roce 1963 z 60 kg kukuřičných zrn, a to v množství pouhých 0,7 mg. Od této rostliny byl pak odvozen název zeatin (Procházka, 1998), (Letham, 1963), (Kamínek, 2015), (Osugi a Sakibara, 2015).

### 3.2.1 Struktura cytokininů

Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou z hlediska chemické struktury  $N^6$ -substituované deriváty adeninu, které se vyskytují v řadě metabolických forem. Především jako volné báze, ribosidy, nukleotidy a *N*- a *O*-glukosidy. Struktura a konformace postranního řetězce je rozhodující pro míru biologické aktivity. Příkladem může být *trans*-zeatin, který vykazuje signifikantně vyšší aktivitu než jeho *cis*-izomer (Haberer a Kieber 2002). Na základě typu postranního řetězce jsou cytokininy klasifikovány jako isoprenoidní, nebo aromatické, které se v přírodě příliš nevyskytují (Kakimoto, 2003), (Mok a Mok, 2001). Nejvyšší aktivitu vykazují cytokininy s isoprenoidním řetězem v poloze  $N^6$  s dvojnou vazbou na postranním řetězci (Procházka, 1997). Isoprenoidní cytokininy se dělí na dva typy. Prvním z nich jsou

cytokininů s isopentenylovým postranním řetězcem v poloze  $N^6$ . Druhým typem isoprenoidních cytokininů jsou tzv. zeatinové, jejichž isopentenylový řetězec je hydroxylovaný. V závislosti na tom, která ze dvou methylových skupin je hydroxylována, rozlišujeme konfiguraci *cis* nebo *trans*. Aktivita se zvyšuje, pokud je hydroxylace methylové skupiny v poloze *trans* (Kakimoto, 2003).

Aktivita cytokininů je významně ovlivněna modifikacemi, které jsou významné především u  $N^6$  postranního řetězce, protože i malá substituce výrazně ovlivní aktivitu cytokininů. Mezi časté modifikace *trans*-zeatinového typu řetězce patří redukce, za vzniku dihydrozeatinu (DHZ), *O*-acetylace nebo glykosylace, která může probíhat na  $N^3$ ,  $N^7$ ,  $N^9$  poloze purinu za vzniku *N*-glykosidů, nebo na hydroxylovém řetězci za vzniku *O*-glykosidů. Rozdíl mezi *trans*-zeatinem a DHZ spočívá v resistenci DHZ vůči enzymatickému štěpení cytokinin dehydrogenáz (Mok a kol., 2000), (Mok a Mok, 2001). *Trans*-zeatin vzniká z isopentenyladeninu (iP) prostřednictvím *trans*-hydroxylace za účasti cytochromů P450 CYP735A1 and CYP735A2. Při inaktivaci obou enzymů dochází ke zpomalení růstu nadzemních částí rostlin, aniž by byla ovlivněna celková hladina cytokininů. *Cis*-izomer zeatinu vykazuje v *Arabidopsis* a dalších dvouděložných rostlinách nižší aktivitu než jeho *trans*-izomer a je náchylnější k oxidaci (Kiba a kol., 2013).

Metabolické formy cytokininů jsou velmi různorodé. Nejvyšší afinitu k cytokininovým receptorům a tím i nejvyšší biologickou aktivitu vykazují volné báze cytokininů. Aktivita je snížena vazbou ribózy v poloze  $N^9$ , za vzniku ribozidů, právě tak jako vazbou kyseliny fosforečné v poloze  $N^5$  za vzniku ribotidů. K deaktivaci cytokininů přispívá také vazba s cukernou složkou v glykosylační reakci, katalyzované enzymem UDP-glykosyltransferázou. Konjugace je realizována na *N* či *O* pozici cytokininu za vzniku odlišných forem glykosidů, s různými biologickými funkcemi (Zalabák a kol., 2011). *N*-glykosidy jsou charakteristické nízkou biologickou aktivitou ale vysokou stabilitou. Naproti tomu *O*-glykosidy snadno podléhají deglykosylaci a tím se účastní kontroly homeostázy aktivních cytokininů (Binns, 1994). Ke značnému snížení aktivity nebo k její úplné ztrátě vedou změny v počtu uhlíků na postranním řetězci, nebo modifikace adeninového skeletu (Procházka a kol., 1998), (Sakibara, 2006).

### 3.2.2 Biosyntéza

Koncentrace cytokininů se liší v průběhu růstu a vývoje rostliny a také v jednotlivých částech rostlin. Místem nejintenzivnější biosyntézy cytokininů je apikální

meristém nadzemních částí rostlin, kořenová špička a zrající zrna (Osugi a Sakakibara, 2015), (Corbesier a kol., 2003). Biosyntéza cytokininů je řízena vnitřními i vnějšími faktory. Mezi vnitřní faktory patří působení jiných fytohormonů, či fáze buněčného cyklu (Redig a kol., 1996). Mezi vnější faktory řadíme podmínky prostředí, obsah minerálních látek, zejména dusíkatých (Samuelson a kol., 1992), či stresové faktory, například v podobě nedostatku vody (Yang a kol., 2001). Koncentrace cytokininů je regulována především jejich degradací, kterou umožňují cytokinin dehydrogenázy (CKX), a rychlostí biosyntézy, dělí se na biosyntézu přímou a nepřímou (Kakimoto, 2003).

#### 3.2.2.1 Přímá biosyntéza

Klíčovým enzymem biosyntézy cytokininů v rostlinách je enzym izopentenyltransferáza (IPT), jehož enzymatická aktivita byla poprvé zaznamenána v extraktu z hlenky (*Dictyostelium discoideum*). Později byl enzym nalezen také jako součást genetické informace Ti-plazmidu bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, konkrétně genu *tmr*. Tuto skutečnost dokládá experiment, při němž byla genem *tmr* transformována bakterie *Escherichia coli*. Bylo prokázáno, že extrakt z transformované *E. coli* katalyzuje produkci isopentenyladenosin-5-monofosfátu (iPMP) z hydroxymetylbutenyl difosfátu (DMAPP) a adenosin-5-fosfátu (AMP) (Akiyoshi a kol., 1984).

Prvním krokem biosyntézy isoprenoidních cytokininů je vnesení dimethylalyl difosfátu nebo hydroxymetylbutenyl difosfátu na  $N^6$  polohu adenosin-5-fosfátu (AMP, ATP, ADP) za vzniku isopentenyladenosin-5-monofosfátu (iPMP). Tato reakce je katalyzována enzymem IPT (Santner a kol., 2009), (Binns, 1994), (Hirose a kol., 2007). iPMP je prekurzorem všech forem cytokininů. Hydroxylací isopentenylového postranního řetězce a redukcí dvojnásobné vazby vznikají zeatin ribotidy nebo dihydrozeatin. Konverzi ribotidů na aktivní volné báze zajišťuje genová rodina enzymů fosforibohydroláz LOG (lonely guy). V *A. thaliana* se vyskytuje sedm genů kódujících izoformy LOG. Narušení exprese genů vede k těžkým morfologickým defektům jak nadzemní, tak i kořenové části rostlin, a také k narušení apikálního meristému (Kuroha a kol., 2009). Cytokininy s hydroxylovaným postranním řetězcem mohou být glykosylované, za vzniku *O*-glukosidů nebo *O*-xylosidů (Kende a Zeevaart, 1997).

#### 3.2.2.2 Nepřímá biosyntéza

Cytokininy se vyskytují také jako integrální součást některých molekul tRNA, a to vždy vedle 3'-konce antikodonu (Kamínek, 2015). Jsou tedy jedinými fytohormony, které jsou součástí proteosyntetického aparátu rostliny, a mohou být tedy, byť v omezeném

množství, syntetizovány v kterékoli rostlinné buňce (Kincl a Krpeš, 2006), (Procházka a Šebánek, 1997). Tato tRNA vzniká *N*-prenylací skrze vnesení izopentenylového řetězce na adenylový zbytek tRNA za účasti enzymu izopentenyl:tRNA-transferázy. Produktem reakce je izopentenyladenosin, který je obvykle modifikován hydroxylací terminální metylové skupiny za vzniku *cis*-zeatinu (Procházka, 1997).

Nepřímá biosyntéza cytokininů není z fyziologického hlediska příliš významná a zaujímá nanejvýš 40% z celkové biosyntézy (Kakimoto, 2003). Důvodem je nedostatek molekul tRNA, obsahujících cytokinin, ze kterých by nebylo možné vyprodukovat dostatečné množství cytokininů na pokrytí celkové potřeby rostlin (Haberer a Kieber, 2016). Kromě toho vzniká nepřímou biosyntézou především *cis*-zeatin, který má v případě *A. thaliana* velmi nízkou aktivitu ve srovnání s *trans*-zeatinem (Kamínek, 1997).

### 3.2.3 Transport

#### 3.2.3.1 Transport na dlouhou vzdálenost

K tomu, aby mohla rostlina optimálně zareagovat na měnící se podmínky prostředí, například změnou morfologie či fyziologických dějů, je nutná komunikace vzdálených částí rostliny. U člověka probíhá komunikace prostřednictvím elektrických signálů, zatímco u rostlin je zajištěna chemickými signály/posly. Cytokininy jsou primárně syntetizovány v kořenových vrcholech a odtud jsou transportovány do nadzemních částí rostlin, kde vyvolají odpovídající fyziologický účinek podle potřeb rostliny. Experimenty založené na expresní analýze enzymů CYP735A1, CYP735A2 a na pozorování izotopově značených cytokininů potvrzují, že distribuce cytokininů není rovnoměrná (Takei a kol., 2004). *Trans*-zeatinové (tZ) formy cytokininů se vyskytují především v xylému (Hirose a kol., 2008), je tedy pravděpodobné, že slouží k akropetální signalizaci, vedoucí od kořenů směrem k nadzemním částem rostliny. Ve floému jsou lokalizovány zejména cytokininy, založené na isopentenyl-adeninu (iP) a *cis*-zeatinu (cZ) (Corbesier a kol., 2003). Tyto cytokininy zřejmě slouží k systémové signalizaci. Transport cytokininů úzce souvisí s polárním transportem IAA a je fotoperiodicky regulován. Protichůdným transportem cytokininů a auxinů je řízena morfogeneze rostlin (Procházka a kol., 1998).

Poměrně nedávno byl identifikován gen *AtABCG14* (ATP-binding cassette transporter in Arabidopsis), který se významně podílí na akropetálním transportu cytokininů, syntetizovaných v kořenu rostlin. *AtABCG14* je exprimován v buňkách

pericyklu a stelárních buňkách kořene. Ukázalo se, že pokud je gen umlčen, pak je výrazně narušen transport *trans*-zeatinu z kořene do nadzemních částí rostlin, což vede k vývojovým a růstovým vadám rostlin (Zhang a kol., 2014), (Notaguchi a Okamoto, 2015).

### 3.2.3.2 Transport na buněčné úrovni

Transport cytokininů přes plazmatickou membránu buněk umožňují purinové permeázy (PUP). Byly objeveny při experimentech s kvasinkami mutovanými v genu *fty*, zodpovědného za transport purinů. Kvasinky v důsledku této mutace nemohly přijímat adenin z média. Gen *fty* byl nahrazen geny z cDNA knihovny *Arabidopsis thaliana*. Selekcí kvasinek, rostoucích na médiu s obsahem adeninu, a následnou sekvenací jejich genetické informace, byly objeveny dva nezávislé cDNA klony. Sekvenční analýzou bylo zjištěno, že se jedná o klony, kódující stejný genový produkt, v podobě výše uvedených purinových permeáz AtPUP1 a AtPUP2. Transportér AtPUP1 vykazuje vysokou afinitu také k alkaloidům (kofein a nikotin), derivátům purinu (hypoxantin) a fytohomonům (zeatin a kinetin). Tyto substráty jsou zároveň kompetitivními inhibitory transportu cytokininů skrze purinové permeázy PUP (Burkle a kol, 2003). Transport je stimulován acidifikací a probíhá proti směru gradientu, prostřednictvím protonové pumpy. K jeho realizaci je tudíž nezbytná energie (Gillissen a kol., 2000), (Burkle a kol, 2003).

Uvedené permeázy jsou součástí velké rodiny membránově lokalizovaných purinových permeáz AtPUP1-AtPUP15 (Gillissen a kol., 2000). Expresní analýzou všech permeáz *Arabidopsis thaliana* bylo později ukázáno, že nejvyšší podíl na transportu cytokininů přes plazmatickou membránu buněk má permeáza AtPUP14, která vyniká vysokou expresí ve všech rostlinných orgánech v průběhu různých vývojových fází rostliny. Výsledek analýzy potvrdil také fenotyp rostlin, mutantních v genu AtPUP14, který se projevoval narušenou morfologií kořenů, embryí a apikálního meristému nadzemních částí rostlin (SAM) (Zürcher a kol., 2016).

Dalším transportérem je nukleosidový transportér (ENT), který pravděpodobně zajišťuje transport cytokininových nukleosidů. U *A. thaliana* bylo nalezeno osm ENT transportérů, které se vyskytují na membráně tonoplastu. Kromě toho byly nalezeny také u savců, hub a bakterií (Kudo a kol., 2010).



### 3.3 Přenos signálu

Cytokininy ovlivňují fyziologické pochody na úrovni exprese cílových genů. K tomu, aby po navázání cytokininů na receptor došlo k iniciaci exprese cílových genů, je nutný přenos fosfátu v rámci signalizační kaskády (tzv. phosphorelay system), který se u cytokininových receptorů spouští pomocí membránově vázaných receptorových histidin kináz (HK), které fungují na principu dvoukomponentního systému (TSC). V *A. thaliana* se nalézají tři cytokininové HK receptory: AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4, které přenášejí signál na histidin-fosfotransferové proteiny. Signalizační kaskáda končí na regulátorech odpovědi typu B (typ-B ARR = Arabidopsis response regulator), které jsou lokalizované v jádře a přímo aktivují expresi cílových genů (Osugi a Sakakibara, 2015).

Přenos signálu začíná vazbou biologicky aktivního cytokininu na extracelulární doménu CHASE histidinkinázy (AHK), která se nachází na plazmatické membráně buněk. Předpokládá se, že tato interakce vyvolá konformační změnu, následkem které dojde k autofosforylaci intracelulární domény AHK na aminokyselině His. Od His je fosfátová skupina přenesena na přijímací (Receiver) doménu, konkrétně na kyselinu asparagovou. Fosfát je skrze malý protein tzv. AHP dopraven do jádra, kde dochází k fosforylaci jaderných proteinů, s funkcí transkripčních faktorů. Existují dva typy transkripčních proteinů, ARR typu B a ARR typu A. Fosforylaci transkripčního proteinu ARR-typu B dochází k expresi cílových genů, zapojených do primární cytokininové odpovědi. ARR-typu A postrádá vazebnou doménu na DNA, pokud je tedy fosforylován, dochází ke kompetitivní inhibici cytokininové odpovědi. Obdobnou funkci plní také 26s proteazom, který degraduje ARR2 za současné stabilizace ARR1. Mezi další inhibitory patří proteiny KISS ME DEADLY (KMDs), které se podílejí na degradaci ARR1, ARR2 a ARR12. Detailní mechanismus jejich působení však dosud není zcela objasněn (Aoyama a Oka, 2003), (Punwani a kol, 2010), (Kim a kol., 2013), (Kieber a Schaller, 2014).

#### 3.3.1 Kompartimentalizace CK

Veškeré děje, probíhající v živých organismech, se odehrávají v tzv. buněčných kompartmentech neboli buněčných organelách, které jsou vzájemně odděleny semipermeabilními membránami. Kompartimentace umožňuje vytvořit optimální podmínky pro realizaci jednotlivých enzymaticky katalyzovaných reakcí, a také chrání buňku před činností lytických enzymů. Transport látek do buněčných kompartmentů klade vysoké nároky na spotřebu energie, protože je uskutečňován proti směru gradientu.

Kompartimentace se vztahuje také na cytokininy, které tak mohou cíleně regulovat fyziologické děje v buňce.

### 3.3.1.1 Cytokininy v chloroplastu

V chloroplastech se vyskytuje široké spektrum cytokininů (ribotidy, ribosidy, N-glukosidy), které se účastní řady fyziologických dějů. Zabraňují degradaci chlorofylu, podporují proteosyntézu a účastní se přeměny etioplastu na chloroplast za přítomnosti světla. V porovnání s celou buňkou byl v chloroplastech naměřen mírně zvýšený obsah biologicky aktivních volných bází, ribosidů, nukleotidů a vysoký obsah zeatin- $N^9$ -glukosidu. V chloroplastech mladých listů se vyskytuje přibližně o 81% více cytokininů, než u zralých listů (Benková a kol., 1999).

Chloroplasty jsou také místem biosyntézy cytokininů. V chloroplastech modelové rostliny *A. thaliana* se nacházejí čtyři IPT enzymy (IPT1, IPT3, IPT5, IPT8), které katalyzují první krok biosyntézy izopentenyladeninu (iP) a *trans*-zeatinu. Ostatní enzymy se vyskytují v mitochondriích (IPT4) a v cytosolu (IPT8). Kromě enzymů se v plastidech vyskytuje také dimethylallyl difosfát, který je nezbytným substrátem pro biosyntézu výše uvedených cytokininů, a cytokininové metabolity (volné báze, ribosidy, N-glukosidy). Přítomnost metabolitů naznačuje důležitou roli chloroplastů v udržování homeostáze cytokininů (Cortleven a Schmölling, 2015).

### 3.3.1.2 Cytokininy ve vakuole

Vakuoly jsou buněčné orgány, ohraničené membránou označovanou jako tonoplast, a jsou vyplněny roztokem, který se skládá z vody, solí, cukrů a rozpustných proteinů. Vakuoly se podílejí na udržování stálého osmotického tlaku, prostřednictvím akumulace nedisociovaných molekul různých látek a iontů v tonoplastu, jejichž koncentrace značně převyšuje koncentraci v cytoplazmě. Některé vakuoly se podílejí na odbourávání makromolekul a imobilizaci fenolických látek, xenobiotik a enzymů. Proto je lze funkčně přirovnat k lysozymům živočišných buněk. Vakuoly jsou zásobárnou biomolekul, například lytických enzymů a rostlinných barviv (antokyanů), ale také inaktivovaných konjugátů glukosy některých fytohormonů, mezi které patří i cytokininy (Procházka a kol., 1998), (Kiran a kol., 2012).

Ve vakuole se nachází 7% všech cytokininů, zatímco v buňce (kromě vakuoly) jsou zastoupeny pouze 3%. Ostatní cytokininy jsou lokalizovány extracelulárně (Jiskrová a kol., 2016).

Nejčastější formou cytokininů ve vakuolách jsou *N*-glukosidy (*trans*-zeatin-*N*7-glukosid, isopentenyl-*N*7-glukosid), které jsou charakteristické nízkou aktivitou a vysokou stabilitou. Dalším typem cytokininů jsou *O*-glukosidy, které jsou ve vakuole zastoupeny ve formě *trans*-zeatin *O*-glukosidu (tZOG), *cis*-zeatin *O*-glukosidu (cZOG) a *cis*-zeatin ribosid-*O*-glukosidu (cZROG). *O*-glykosidy zeatinu (ZOG) jsou rezistentní vůči CK dehydrogenáze a jsou lehce konvertovatelné do aktivního stavu prostřednictvím reakce, katalyzované enzymem  $\beta$ -glukosidázou. Tato reakce je stěžejní pro regulaci poolu cytokininů ve vakuolách. Funkcí *O*-glykosidů je tedy zásobit buňku aktivními cytokininy a podílet se na udržování jejich homeostáze. Spektrum cytokininů ve vakuole je ve srovnání s buněčnými kompartmenty bohatší o některé formy ribosidů (*cis*-zeatin ribosid-5'-monofosfát, isopentenyladenin ribosid-5-monofosfát), které jsou významnými transportními cytokininy v xylému (Letham a Palni, 1983), (Procházka a Šebánek, 1997), (Binns, 2004), (Kiran a kol., 2012), (Jiskrová a kol., 2016).

### 3.3.1.3 Cytokininy v endoplazmatickém retikulu (ER)

Experimenty ukázaly, že většina cytokininových receptorů je umístěna na povrchu vnitrobuněčných membrán (Wulfetange a kol., 2011), zejména na membránách ER. Lokalizace receptorů na membránách ER přináší řadu výhod, především rychlejší iniciaci exprese cílových genů.

Pokud signál míří z receptoru, lokalizovaného na plazmatické membráně, pak musí urazit mnohem větší vzdálenost, než signál mířící z receptoru endoplazmatického retikula, který nemusí překonávat velké úseky, dané zejména přítomností velké centrální vakuoly. Z hlediska cytokininové signalizace a zahájení exprese cílových genů jsou proto receptory endoplazmatického retikula daleko efektivnější (Geldner a Robatzek, 2008), (Wulfetange a kol., 2011).

Mikroskopická analýza epidermálních buněk tabáku, odvozených od mezofylu, s expresí fluorescenčně značených cytokininových receptorů ukázala, že membránou s největším počtem všech tří receptorů AHK je membrána endoplazmatického retikula. Tento závěr podporuje také hodnota pH, která se v lumen ER pohybuje kolem 6,5. Tato hodnota je optimální pro vytvoření vysoce afinitní vazby cytokinin zeatinu k receptorům AHK3 a AHK4 (Caesar a kol., 2011), (Wulfetange a kol., 2011).

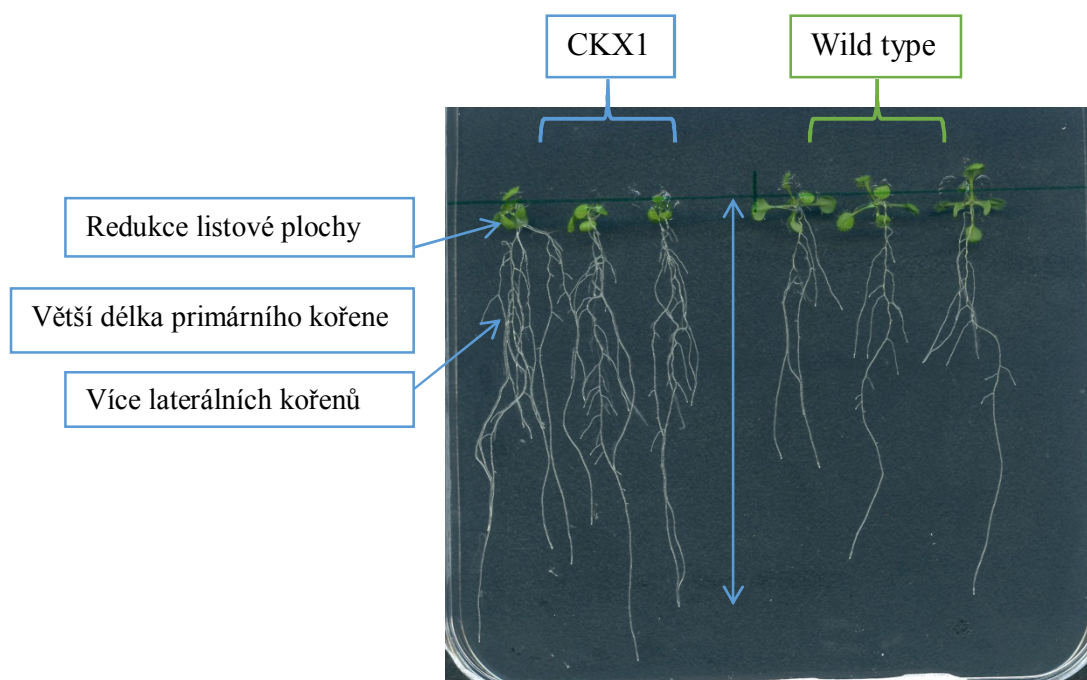
Pokud je nejvíce cytokininových receptorů lokalizovaných na membráně ER, pak si můžeme klást otázku, jakou zde cytokininy plní funkci. Zdáli je tento kompartment prostorem pro uskladnění či degradaci cytokininů, nebo zdáli jsou v něm cytokininy

biologicky aktivní a podílí se na percepci a signalizaci. Jako pravděpodobnější se jeví spíše druhá možnost. Tento předpoklad může být podložen experimentem s mutantními liniemi *A. thaliana* v genech *AHK2* a *AHK3*. Tyto geny byly nahrazeny mutovanými geny *AHK2* resp. *AHK3*, označenými polypeptidovou značkou myc (tzv. c-myc tag). Značené receptory plně nahradily funkci mutantních receptorů, což se ve výsledku projevilo na obnovení přirozeného fenotypu. Zároveň se ukázalo, že místem působení receptorů se značkou myc byla právě membrána ER (Wulfetange a kol., 2011), (Kieber a Schaller, 2014).

Podle výsledků z nedávných výzkumů se v ER nachází složky účastnící se signalizace, distribuce a percepce dalších hormonů, mezi které patří například auxin či etylen. Je tedy pravděpodobné, že ER je buněčným kompartmentem určeným pro komunikaci mezi hormony a propojení signálních drah (tzv. cross-talk) (Friml a Jones, 2010).

### **3.3.2 Význam cytokininů v rostlinách**

Nejdůležitější funkcí cytokininů je stimulace buněčného dělení. Potvrzují to vysoké koncentrace cytokininů ve všech intenzivně rostoucích, meristematických pletivech. Díky měnícím se hladinám cytokininů je regulován také buněčný cyklus. Příkladem může být replikace, která je součástí S-fáze, kdy se činností cytokininů zkracuje délka replikonů (počátků replikace) a tím dochází k výraznému urychlení přepisu DNA (Procházka, 1998). Aplikace cytokininů na určité místo rostliny také ovlivní tok aminokyselin a cukrů, které se začnou do tohoto místa přesunovat. Cytokininy tedy slouží ke zvýšení síly sinku. Fyziologický význam cytokininů spočívá také v inhibici apikální dominance, zpomalení stárnutí, či negativní regulaci kořenového růstu. Kořenová architektura mutantních rostlin *A. thaliana* nadprodukcujících cytokinin dehydrogenázu 1 (AtCKX1) byla ve srovnání s kontrolními rostlinami vyvinutější a robustnější (Obr. 1). Také nadzemní část mutantních rostlin byla poznamenána sníženým množstvím cytokininů. U stonků došlo k silné redukci apikálního meristému, což se v důsledku projevilo zakrslou velikostí rostlin, a k výraznému zpomalení vývoje listů, společně s redukcí listové plochy (Procházka, 1998), (Werner a kol., 2001), (Werner a kol., 2003).



Obr. 1.: Mutantní rostliny *A. thaliana* nadprodukující AtCKX1, ve srovnání s WT, foto: Martina Kostková

Cytokininův ovlivňují fyziologické pochody zejména ve spolupráci s ostatními fytohormony. Společně s auxiny jsou nezbytnou složkou kultivačních médií, určených k regeneraci rostlin *in vitro* nebo k udržení a odvození tkáňových kultur (Procházka a Šebánek, 1997). Poměr cytokininů a auxinů v médiu je rozhodující pro průběh regenerace. Pokud jsou koncentrace obou hormonů vyrovnané, pak dochází k neorganizované proliferaci a vzniku kalusu. Při vyšším poměru cytokininů dochází k regeneraci prýtů, v nadbytku auxinů jsou regenerovány kořeny (Procházka, 1998).

Cytokininův mají praktické využití v zemědělství. Používají se například pro stimulaci větvení okrasných rostlin, nebo ve spolupráci s gibereliny ke tvarování některých odrůd jablek. Aplikace cytokininů v době kvetení vede ke zvýšení počtu zrn v klasech. Cytokininův mimo jiné zvyšují celkovou produkci biomasy tím, že prodlužují období fotosyntetické aktivity rostlin, a zvyšují odolnost rostlin vůči stresovým faktorům (Procházka, 1998).

### 3.4 Cytokinin dehydrogenázy

Cytokinin dehydrogenázy (CKX) jsou enzymy, které katalyzují oxidační štěpení postranních řetězců  $N^6$  cytokininů. Tato reakce vede k ireverzibilní degradaci cytokininů, která hraje významnou roli při regulaci hladiny biologicky aktivních cytokininů v rostlinách. První zmínka o aktivitě CKX pochází z roku 1971, kdy byla popsána

přeměna značeného izopentenyladeninu na adenin v buněčném extraktu tabáku (Pačes a kol., 1971). Totožná enzymatická aktivita byla detekována také u zrn kukuřice seté (*Zea mays*). Podle molekulárního kyslíku, který enzymy potřebují ke své činnosti a podle typu štěpeného substrátu získal tento enzym označení cytokinin oxidáza (Whitty a Hall, 1974), (Schmülling a kol., 2003). Objev CKX strhl pozornost mnoha laboratoří celého světa. Bohužel se tyto enzymy kvůli extrémně malému množství v rostlinném materiálu obtížně získávaly. Proto zůstaly vlastnosti a mechanismy katalytické reakce enzymu dlouhá léta neobjasněny (Galuszka a kol., 2001).

Díky pokročilým chemickým analýzám schopným detekovat enzymovou aktivitu v malém množství vzorku bylo následně zjištěno, že katalytická reakce CKX není podmíněna molekulárním kyslíkem. Dokonce není pravidlem, že se v průběhu reakce tvoří peroxid vodíku. Proto bylo navrženo alternativní a korektnější pojmenování enzymů jako cytokinin dehydrogenáz (Galuszka a kol., 2001).

Cytokinin dehydrogenázy jsou z hlediska chemické struktury flavoproteiny s kovalentně navázanou FAD skupinou, která slouží jako kofaktor. Přírozenými substráty jsou isopentenyladenin a zeatin, včetně jejich ribosylovaných forem. Molekulová velikost CKX se pohybuje v rozmezí 56 až 64.9 kDa. Rozdíly mohou být dané posttranslačními modifikacemi. CKX se vyskytují v glykosylované nebo neglykosylované formě, které se liší pH optimem. Velký rozptyl pH optima mezi oběma formami přispívá k rozdílné distribuci CKX v intracelulárním prostoru (Schmülling a kol., 2003). Všechny enzymy preferenčně štěpí substráty, které se skládají z isoprenoidního řetězce s dvojnou vazbou. Pokud substrátu dvojná vazba chybí, pak se výrazně sníží reakční rychlost. Týká se to především *O*-glykosylovaných derivátů cytokininu, dihydrozeatinu nebo syntetických cytokininů, které mají na postranním řetězci aromatický kruh (Srivastava, 2002), (Galuszka a kol., 2006).

#### **3.4.1 Lokalizace izoenzymů CKX v *Arabidopsis thaliana***

Navzdory nízké homologii CKX je přibližně 1/3 sekvence aminokyselin vysoce konzervovaná. Konzervovaná sekvence se z velké části týká domény, která se váže ke kofaktoru FAD, a z menší části aminokyselin na C a N konci. Sekvence, vyskytující se na N-konci proteinů, obsahuje signální motivy zodpovědné za rozdílnou lokalizaci CKX, a proto je využívána pro odhad lokalizace pomocí počítačových algoritmů (Schmülling a kol., 2003). S použitím programů TargetP a PSORT byl zjištěno, že cytokinin dehydrogenázy AtCKX2, AtCKX4, AtCKX5, AtCKX6 jsou sekrečními enzymy, zatímco

AtCKX1 a AtCKX3 jsou lokalizovány v mitochondriích (Nakai a Horton, 1999), (Emanuelsson a kol., 2000). Tento závěr vyvrátila fluorescenční analýza konstruktů AtCKX1-GFP a AtCKX3-GFP, která zařadila oba izoenzymy do vakuol. Výsledek analýzy potvrzuje také kyselé pH ve vakuolách, které je optimální pro činnost enzymů (Werner a kol., 2003).

Lokalizace AtCKX1 a AtCKX3 ve vakuolách je podmíněna signální sekvencí, kterou se odlišují od CKX určených k sekreci. Signální sekvence se od sebe částečně liší, a tím jsou proteiny dále rozděleny do tří skupin. První skupina proteinů se nachází v lytických vakuolách, a jejich společným rysem je signální sekvence na N-terminálním konci spolu s konsenzuální sekvencí aminokyselin, nazývanou NPIR (Nakamura a Matsuoka, 1993). Další skupina proteinů se vyznačuje signální sekvencí na C-terminálním konci, a vyskytuje se v zásobních vakuolách. Poslední skupinu charakterizuje strukturální doména uvnitř proteinu. Tento motiv se však nevyskytuje u žádného z proteinů AtCKX (Werner a kol., 2003), (Schmülling a kol., 2003).

Apoplastické AtCKX jsou charakteristické krátkou signální sekvencí na N-konci, díky které směřují do endoplazmatického retikula a následně sekreční cestou do apoplastu (Werner a kol., 2003). Zde se mohou podílet na regulaci koncentrace cytokininů, potřebných pro aktivaci cytokininových receptorů, umístěných na plazmatických membránách buněk (Hedden a Thomas, 2008). Proteinem, který nelze zařadit do skupiny vakuolárních ani sekrečních enzymů, je AtCKX7, který se kvůli chybějící signální sekvenci vyskytuje v cytosolu buňky (Kollmer a kol., 2014).

### **3.4.2 Funkce izoenzymů CKX**

Cytokinin dehydrogenázy slouží k regulaci intracelulární hladiny biologicky aktivních cytokininů tím, že je ireverzibilně degradují. Nutno poznamenat, že tento způsob není jediným, a u mnoha rostlinných druhů ani převažujícím způsobem degradace cytokininů. Příkladem může být ředkvička setá (*Raphanus sativus*), u níž je inaktivace uskutečňována glykosylací cytokininů na pozici N7 a N9 za účasti enzymu N-glykosyltransferázy (Entsch a Letham, 1979). Koncentrace CKX se mění v závislosti na vývojových fázích rostliny. Nejmenší koncentrace byla naměřena v průběhu časně fáze klíčení zrn a zrání ovoce (Srivastava, 2002), (Schmülling a kol., 2003).

Řada fyziologických funkcí cytokininů byla objasněna na základě zvýšení koncentrace cytokininů v rostlinách, ať už tradičním obohacením růstového média o

cytokininů (Skoog a Miller, 1957), nebo zvýšením koncentrace cytokininů v rostlinách prostřednictvím metod genového inženýrství (Bartrina a kol., 2011). Tento přístup však nemusí být zcela objektivní. V důsledku zvýšeného množství cytokininů v rostlinách může dojít ke spuštění pochodů, které za normálních okolností nejsou regulovány cytokininů, což v konečném důsledku zkreslí výsledky experimentu. Předpokládá se tedy, že experimenty založené na snížení koncentrace cytokininů v rostlinách budou více informativní. Jednou z metod, jak lze koncentraci cytokininů snížit, je podpořit katabolismus cytokininů prostřednictvím nadprodukce CKX (Werner a kol., 2003).

### **3.4.3 Nadprodukcující linie *Arabidopsis thaliana* pro genovou rodinu CKX**

Nadprodukce enzymů CKX v rostlinách *Arabidopsis thaliana* vede ke snížení hladiny cytokininů projevující se rozmanitými abnormalitami na úrovni všech fází rostlinného růstu a vývoje. Transgenní rostliny AtCKX jsou charakteristické zvýšeným katabolismem cytokininů, a sníženou expresí reportérových genů *ARR5::GUS* ( $\beta$ -glukuronidáza) (Werner a kol., 2003), (Werner a kol., 2010).

#### *3.4.3.1 Kořenová fenotypizace*

Cytokininů jsou negativními regulátory kořenového systému. Kořeny rostlin se zvýšeným katabolismem cytokininů jsou charakteristické větší délkou, rychlejším růstem a zvýšenou tvorbou laterálních kořenů (Obr. 1). Tyto morfologické znaky jim umožňují získávat vodu a minerální látky i z méně úrodných půd. Poznatky o funkcích jednotlivých CKX by tedy mohly mít velké využití v oblasti zemědělství (Eckardt, 2003), (Ioio a kol., 2007), (Werner a kol., 2010).

##### **3.4.3.1.1 Vliv cytokininů na meristém kořene**

Jednou z nejpozoruhodnějších vlastností rostlin je schopnost růst a regenerovat po dobu několika let až staletí. Za tuto vlastnost jsou zodpovědné zárodečné buňky vyskytující se v meristematických pletivech, které jsou aktivní po celý život rostliny (Procházka, 1998). Zárodečné buňky produkují nediferencované buňky, které po diferenciaci vlastní rozmanité funkce, sloužící k regeneraci nebo k postembryonálnímu růstu rostliny. Pro udržení optimální velikosti a dlouhodobé aktivity meristému je nutné zajistit rovnováhu mezi proliferací a diferenciací buněk.

Činnost kořenového meristému (RAM) je regulována koordinovanou činností giberelinů, auxinů a cytokininů. Místem působení cytokininů je transienční zóna, lokalizovaná mezi proximálním meristémem a zónou prodlužovací. Důkazem je



fenotypová analýza rostlin *A. thaliana*, transformovaných genem *CKX1*, se specifickým promotorem ROOT CLAVATA HOMOLOG 2 (*RCH2*). Exprese promotoru je omezena pouze na pletiva transientní zóny kořene. Fenotyp mutantních rostlin byl srovnatelný s rostlinami s pozměněnou biosyntézou cytokininů v důsledku mutace genu *IPT*. Fenotyp se naopak nezměnil u rostlin, transformovaných genem *CKX1* s promotorem *RCH1*, aktivním pouze v meristematických buňkách kořene (Ioio a kol., 2007), (Procházka, 1998).

Zvýšená degradace cytokininů v rostlinách vede k narušení rovnováhy mezi proliferací a diferenciací buněk. Diferenciace buněk je zpomalena a rychlost proliferace je neúměrně zvýšena. Mikroskopická analýza mitotické aktivity buněk RAM, provedená čtvrtý den po germinaci, ukázala, že počet dělicích se buněk u rostlin *AtCKX1* je přibližně 49,7, zatímco u kontrolních rostlin pouze 33,4. Nadměrná proliferace vyúsťuje hromaděním nezralých buněk v meristému, který se v důsledku toho začne rozpínat. Počet meristematických buněk se může zvýšit až čtyřnásobně (Werner a kol., 2003), (Schmülling a kol., 2003).

Kořeny osm dnů starých rostlin *35S:AtCKX1* a *35S:AtCKX3* byly ve srovnání s kontrolními rostlinami až o 20-90% větší. Kromě délky se u rostlin *35S:AtCKX1* a *35S:AtCKX3* sedminásobně zvýšila tvorba laterálních a adventivních kořenů. U rostlin *AtCKX2* a *AtCKX4* pak signifikantně vzrostl počet kořenů adventivních. Celková délka kořenového systému rostlin *35S:AtCKX1* a *35S:AtCKX3* vzrostla třikrát a u rostlin *AtCKX2* a *AtCKX4* jeden a půl krát (Werner a kol., 2001), (Werner a kol., 2003), (Werner a kol., 2010), (Ioio a kol., 2007), (Kieber a Schaller, 2014).

Cytokininů nejsou pouze negativními regulátory růstu kořenů, ale jsou také pozitivními regulátory zrání meristému. Pokud je totiž narušena signalizace cytokininů, například mutací genů *AHP*, pak dochází ke zkrácení primárního kořene, narušení vývoje vodivých pletiv či fertilitě (Hutchison a kol., 2006).

Na regulaci růstu kořene a velikosti meristému mají velký podíl také gibereliny a auxiny. Role auxinů spočívá v regulaci proliferace buněk, lokalizovaných v kořenovém meristému, a činností giberelinů je kontrola elongace buněk. Mechanismus vzájemného působení cytokininů, auxinů a giberelinů spočívá v regulaci množství proteinu SHY2, který potlačuje činnost auxinů. Pět dnů po germinaci je v proximálním meristému zvýšená koncentrace giberelinů, které potlačují expresi proteinu ARR1. Příbuzný

transkripční faktor ARR12, působící v transienční zóně, snižuje koncentrace SHY2. Díky tomu je umožněn polární transport auxinů, zprostředkovaný PIN proteiny. Auxiny působí stimulačně na biosyntézu giberelinů v proximálním meristému. Výsledkem této kaskády je proliferace buněk v proximálním meristému, která převažuje nad buněčnou diferenciací a tím dochází k intenzivnímu růstu meristému. Po pátém dnu germinace se však situace změní. Koncentrace giberelinů klesá, a tím je zahájena exprese genu ARR1. Spoluprací obou proteinů ARR1, ARR12 je iniciována exprese genu SHY2, který potlačuje PIN zprostředkovaný polární transport auxinů, včetně biosyntézy giberelinů. Výsledkem je pokles proliferace a zvýšení diferenciaci buněk tempem, které odpovídá rychlosti buněčného dělení (Ubeda-Tomas a kol., 2008), (Ubeda-Tomas a Bennett, 2010), (Moubayidin a kol., 2010), (Kieber a Schaller, 2014).

#### 3.4.3.1.2 Cytokininy a vliv na laterální kořeny

Cytokininy již v časných vývojových stádiích rostliny řídí růst laterálních kořenů, které jsou obvykle zakládány v pericyklu (Procházka, 1998). Růst je antagonisticky regulován působením auxinu a cytokininu.

Laterální kořeny rostou za normálních okolností akropetálně. Díky tomuto růstovému znaku má kořenový systém charakteristický kuželovitý tvar. Pozice laterálních kořenů u mutantních rostlin AtCKX je náhodná, proto kuželovitý vzhled postrádají. Důvodem může být rozdílná rychlost růstu laterální kořenů, nebo nekoordinovaná iniciace kořenových primordií (Ioio a kol., 2003), (Werner a kol., 2003).

Kvůli stále se zhoršujícím klimatickým podmínkám a potravinové krizi jsou zemědělci nuceni pěstovat zemědělské plodiny na méně kvalitních půdách, za většího výtěžku a nižších nákladů. Splnit tyto požadavky je velmi obtížným úkolem. Zemědělci obvykle sáhnou po hnojivech, která jsou energicky náročná na přípravu a nejsou příliš levnou záležitostí, a k hojnému zavlažování půdy vodou, které je na některých lokalitách velký nedostatek. Pokud by měly rostliny vyvinutější kořenový systém, pak by měly snazší přístup k minerálním látkám a lépe by zvládaly stresové podmínky. Většího kořenového systému lze docílit s využitím poznatků o negativní regulaci kořenů cytokininu. Problémem je, že cytokininy nepatří mezi specificky působícími hormony a ovlivňují kromě kořene řadu jiných orgánů, včetně nadzemních částí. Snížení hladiny cytokininů v rostlinách by se proto odrazilo například na snížené kapacitě sinku. Mladé orgány by tak neměly dostatek aminokyselin a cukrů k adekvátnímu vývoji. Způsobem, jak pozitivně ovlivnit růst kořenů a zároveň minimalizovat inhibiční vliv cytokininů na

nadzemní části rostlin, by mohla být nadprodukce genů *CKX1* a *CKX3*, které jsou aktivní zejména v kořenových částech rostliny. Bylo potvrzeno, že rostliny OE *CKX1* a OE *CKX3* mají daleko vyvinutější kořenový systém, díky kterému jsou tolerantnější k suchu, právě tak jako k nedostatku živin, protože mohou vázat více minerálních látek (Werner a kol., 2010).

#### 3.4.3.2 *Fenotypizace nadzemních částí rostlin*

Cytokininy jsou obecně známými pozitivními regulátory nadzemních částí rostlin. Růstové anomálie u rostlin se zvýšenou degradací cytokininů jsou důsledkem morfologických změn stonkového apikálního meristému (SAM), který je zodpovědný za postembryonální vývoj všech orgánů nadzemních částí rostlin, včetně listů, květů a stonku.

Hlavními proteiny, které se podílejí na organizaci SAM, jsou KNOTTED-LIKE (KNOX) homeoboxové transkripční faktory. Mechanismem jejich působení je regulace hladiny cytokininů a giberelinů. KNOX proteiny snižují množství giberelinu tím, že potlačují exprese genu, kódujícího oxidázu GA20, a zároveň zvyšují hladinu cytokininu tím, že indukují exprese genu IPT7 (Kyoizuka, 2007).

Hladina cytokininů je regulována také ve spolupráci genu LOG, jehož produktem je enzym, konvertující neaktivní cytokininové ribotidy na aktivní volné báze. Prostřednictvím genu LOG, který je lokálně exprimován v SAM, se zvyšuje koncentrace biologicky aktivních cytokininů, nutných pro správnou činnost meristému (Kurakawa a kol., 2007).

Zvýšená degradace cytokininů se projevuje morfologickými změnami v SAM, do kterých je zahrnuto snížené množství meristemických buněk a snížení jejich velikosti. Navzdory pozměněné morfologii není postihnuta struktura ani organizace SAM. Fenotypovým projevem nedostatečné funkce SAM je především zakrslý vzrůst rostlin, pomalejší zakládání nových listů a redukce listové plochy (Obr. 1) (Werner a kol., 2003), (Kurakawa a kol., 2006), (Kieber a Schaller, 2014).

Cytokininy se podílejí na regulaci přechodu buněk nediferencovaných (kmenových), které vznikly činností buněk meristemických, na buňky diferencované, se specializovanými funkcemi. Pokud je hladina cytokininů narušena, dochází k pomalejší diferenciaci buněk a listových primordií v SAM (Werner a kol., 2001), (Werner a kol., 2003).

Kromě abnormalit vegetativních částí rostlin se nadprodukce *CKX* projevuje také na reprodukčním vývoji rostlin. Kvetení rostlin *35S:AtCKX1* a *35S:AtCKX3* bylo ve srovnání s wild-typem přibližně o 5 týdnů opožděno. V ojedinělých případech rostliny nekvetly vůbec, a zůstaly ve vegetativní fázi. Z hlediska struktury a morfologie se květy mutantních rostlin nijak nelišily od wild-typu. Rozdíl byl patrný v množství pylu, které bylo v počátečních fázích kvetení minimální. V pozdějších fázích kvetení začaly rostliny produkovat pyl v množství, dostatečném pro samooplození, ale stále malém ve srovnání s normálními rostlinami. Zajímavostí byla velikost semínek rostlin *35S:AtCKX1* a *35S:AtCKX3*, která přibližně dvakrát převyšovala běžnou velikost zrn wild-typu (Werner a kol., 2003), (Eckardt, 2003).

### **3.4.1 Umlčené linie *Arabidopsis thaliana* pro genovou rodinu CKX**

V genomu *Arabidopsis thaliana* se nachází 7 genů kódujících enzymy CKX. Pokud jsou tyto geny jednotlivě vyřazovány z funkce, tedy když připravujeme tzv. knock-out mutanty, například prostřednictvím T-DNA inzerce, pak se začínají projevovat morfologické změny související s nadbytkem cytokininů v rostlinách. Umlčené linie jsou cennými zdroji informací o funkcích cytokininů. Díky nim bylo například zjištěno, že cytokininy pozitivně regulují aktivitu apikálního meristému stonku (SAM), od které se mimo jiné odvíjí množství úrody.

Transgenní rostliny se zvýšeným obsahem cytokininů charakterizuje zakrslost, odlišný tvar listů, vyšší obsah chlorofylu, a větvenější stonek (Schmülling a kol., 2003), (Werner a kol., 2003). Podobně jako u rostlin, nadprodukcujících CKX, je vývoj a růst umlčených linií výrazně zpomalen (Bartrina a kol., 2011). Důsledkem je špatné zakořeňování rostlin. Uvedené morfologické znaky se projevují v případě, že hladina cytokininů není příliš vysoká. Pokud koncentrace cytokininů 2-4x přesáhne fyziologickou hladinu, obvykle v důsledku mutace více genů CKX, pak se u rostlin projeví morfologické změny, následkem kterých obtížně regenerují, a zároveň nemají dostatek chlorofylu pro další vývoj (Procházka, 1998).

V experimentu Bartriny a kol. (Bartrina a kol., 2011) se ukázalo, že umlčování jednoho izoenzymu CKX není z hlediska fenotypu rostliny nijak výrazné. Viditelná změna morfologie nastává až v okamžiku mutace dvou CKX, přičemž jedním z nich musí být izoenzym CKX1,2 nebo 3. Největší změny fenotypu byly zaznamenány u rostlin s dvojitou mutací v izoenzimech CKX3 a CKX5. Projevovaly se konkrétně větším průměrem stonku, zvětšenou plochou květů a korunních lístků (o 40%), a větším

množstvím květů. Důsledkem morfologických změn reprodukčních orgánů rostlin bylo zvýšení průměrného počtu zrn (z 65 na 110). U mutantů CKX3 CKX5 stoupla úroda v průměru o 55%. Ke stejným závěrům dospěl i Zalewski (Zalewski a kol., 2010), který na základě RNA umlčování enzymů CKX ječmene potvrdil, že se snižující se aktivitou CKX roste množství zrn. Konkrétně o 131 až 142,8%. RNA umlčování je vhodnější alternativou pro snížení exprese genů obilovin, z důvodu velkého genomu a polyploidie.

#### 3.4.1.1 Kořenová fenotypizace

Jak již bylo uvedeno, cytokininy jsou negativními regulátory kořenového růstu a vývoje. Potvrzují to experimenty, založeny jak na snížené koncentraci cytokininů v rostlinách, tak na zvýšené koncentraci, které lze docílit několika způsoby. Ať už tradičně používaným přidáním cytokininů do živného média (Laplaze a kol., 2007), či nadprodukcí genů, zapojených do biosyntézy cytokininů (Medford a kol., 1989), (Kuderová a kol., 2008), nebo umlčování CKX (Bartrina a kol., 2011). Fenotypové projevy zvýšené hladiny cytokininů se výrazně nemění v závislosti na vybrané strategii, a patří mezi ně redukovaná délka primárního kořene, související se sníženým množstvím dělicích se buněk meristému, a pokles tvorby laterálních kořenů (Medford a kol., 1989). U homozygotních mutantů v genu IPT kleslo průměrné množství laterálních kořenů až o 82%. Bylo ukázáno, že tento projev souvisí s poklesem distribuce auxinu během vývoje laterálních kořenů v důsledku narušení exprese genu PIN. Proteiny PIN, jejichž funkcí je transport auxinů, tak změní orientaci na plazmatické membráně buněk. Tato orientace je kritická pro tok auxinů do laterálních kořenů a tvorbu auxinového gradientu, nezbytného pro správnou funkci buněk v jednotlivých zónách kořene, včetně buněk laterálních primordií (Marhavý a kol., 2014), (Laplaze a kol., 2007), (Kieber a Schaller, 2014).

Laterální kořeny jsou ve srovnání s primárním kořenem více citlivé na odchylky hladin cytokininů. K fenotypovým změnám dochází již při koncentraci 0.1  $\mu\text{M}$ , zatímco k redukci primárního kořene je nutná koncentrace nad 1  $\mu\text{M}$  (Laplaze a kol. 2007), (Kuderová a kol., 2008).

### 3.5 CKX v jiných organismech

První zmínka o aktivitě cytokinin dehydrogenáz pochází z roku 1971, kdy Pačes (1971) pozoroval konverzi značeného isopentenyl adeninu na adenin v extraktu tabáku. Vzhledem k velmi malému množství CKX v rostlinných organismech bylo velmi obtížné enzym získat a určit jeho výskyt u různých rostlinných druhů. Významným milníkem ve výzkumu CKX byl rok 1999, kdy byla poprvé vyzolována cDNA CKX z kukuřice (*Zea*

*mays*). Díky tomuto úspěchu bylo možné manipulovat s koncentrací cytokininů v rostlinách a zkoumat, jakou funkci plní CKX při vývoji a růstu rostliny. Izolace cDNA byla tedy bezpochyby velkým přínosem pro rostlinnou biologii a mimo jiné umožnila určit přítomnost CKX u dalších organismů prostřednictvím PCR, bez nutnosti složité izolace a purifikace (Houba-Hérin a kol., 1999). Mezi organismy, u kterých byla zaznamenána přítomnost CKX, patří nejen rostlinné druhy ale také kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) nebo jeden ze zástupců hlenek (*Dictyostelium discoideum*) (Schmuling a kol., 2003). Pomocí analýzy BLAST bylo objeveno 17 genů, kódujících CKX, přičemž v *A. thaliana* se vyskytuje pouze sedm z nich. CKX se u různých rostlinných druhů liší svou velikostí, která se pohybuje v rozmezí 56 až 64.9 kDa a je způsobena posttranslačními modifikacemi. U většiny rostlinných druhů se CKX vyskytují ve formě glykoproteinů. Glykosylace přispívá ke stabilitě proteinů, umožňuje jejich transport a reguluje enzymatickou aktivitu. Glykosylované i neglykosylované formy se výrazně liší pH optimem, které přispívá k odlišné distribuci CKX v buňce. Neglykosylované CKX se vyskytují v tabáku nebo ve fazoli (*Phaseol*)

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Chemikálie

- 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina (MES), (Duchefa, Nizozemí)
- Agar (himedia, Indie)
- Agarosa (Amesco, USA)
- Celulasa z *Trichoderma viride* (Sigma-Aldrich, USA)
- Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát (Penta, ČR)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), (Duchefa, Nizozemí)
- D-mannit (manitol), (Penta, ČR)
- dNTPs (Fermentas, Kanada)
- Dodecylsíran sodný (SDS), (Penta, ČR)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), (Penta, ČR)
- Ethanol (Penta, ČR)
- Ethidium bromid (neolab, Německo)
- Ficoll (Sigma, USA)
- Gotaq G2 Flexi Polymerasa + pufr (Promega, USA)
- Hydroxid sodný (Penta, ČR)
- Chlorid sodný (Lachner, ČR)
- Chloroform (Lachner, ČR)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (Penta, ČR)
- Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina octová (Lachema, ČR)
- Kyselina sírová (Lachner, ČR)
- LB Broth (Sigma-Aldrich, USA)
- Macerozym R-10 z *Rhizopus* sp. (Serva, Německo)
- MiliQ voda (destilovaná, demineralizovaná)
- Murashige a Skoog medium s vitaminy (Duchefa, Nizozemí)
- Neutral red (Sigma)
- Rnase free voda (Qiagen, Německo)
- Sacharosa (Lachner, ČR)
- Tris (Duchefa, Nizozemí)

## 4.2 Přístroje a vybavení

- Analytické váhy 5034/120 (Biometra, Německo)
- Autokláv HST 5-6-8 (Zirbus, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Bürkerova komůrka (Marienfeld, Německo)
- Centrifuga ROTANTA 460R (Hettic, Německo)
- Centrifuga 5417R (Eppendorf, Německo)
- Digitální váhy Traveller TA302 (Ohaus, Švýcarsko)
- Dokumentační systém chemidoc MP (biorad, USA)
- Dokumentační systém Alpha Digi, program Alpha digidoc RT (biorad, USA)
- Elektromagnetická míchačka (Boeco, Německo)
- Elektroforetická komůrka pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)
- Gel-Doc EZ (Bio-Rad, USA)
- Inkubátor 37°C (Medline Scientific, Německo)
- Kapalinová chromatografie Acquity UPLC I-class system (Waters, USA)
- Laboratorní předvážky KRD S3102 (BEL engineering, Itálie)
- Laminární box (Merci, Česká republika)
- Magnetická míchačka RH basic Ikamag (IKA, Německo)
- Mikroskop Olympus CX21FS3 (Olympus, Japonsko)
- MS/MS Xevo TQ-S (Waters, USA)
- Nylonová síťka 70  $\mu\text{m}$  (Falco, USA)
- Oscilační mlýn Retsch MM 400 (Česká republika)
- Ph metr (Eutech Instruments, Singapur)
- SPE kolonky SPE-ed SPE cartridges (USA)
- Spektrofotometr NanoDrop (Thermo Scientific, USA)
- Rotační třepačka Rotator SB3 (Stuart, UK)
- Termocycler T-gradient (Biometra, Německo)
- Třepačka Orbit 1000 (Amerika)
- Ultracentrifuga Hitachi CS 150 NX (Japonsko)
- Vakuový koncentrátor centrivap (Labconco, USA)
- Vortex (Labnet, USA)
- Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)



### 4.3 Roztoky a chemikálie

#### 4.3.1 Roztoky pro agarosovou elektroforézu

TAE pufr:	40 mmol.l-1 Tris-acetát 1 mmol.l-1 EDTA; pH 8
1% agarosový gel	1% agarosa v TAE pufru

#### 4.3.2 Roztoky k izolaci vakuol

Roztoky	Složení	pH	Roztoky k úpravě pH	Podmínky
<b>0,5 M EDTA</b>	9,3 g EDTA v 50 ml H <sub>2</sub> O	8.0	NaOH	
<b>30% Ficoll <i>fresh</i></b>	2,25 g ficollu + 7,5 ml H <sub>2</sub> O			Rozpouštět při 37°C
<b>1M mannitol</b>	72,87 g mannitol v 400 ml H <sub>2</sub> O			
<b>50 mM MES</b>	2,14 MES v 200 ml H <sub>2</sub> O	5.6	1M KOH	
<b>0,1% Neutral Red solution</b>	0,01 g Neutral red			
	20 µl 1% kyseliny octové			
	5 µl chloroform			
	10 ml H <sub>2</sub> O			
<b>0,2 M sodium phosphate</b>	8 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O zásobní roztok (250 ml H <sub>2</sub> O + 7,8 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O)	7.5	NaOH	
	42 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O zásobní roztok (250 ml H <sub>2</sub> O + 17,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12 H <sub>2</sub> O)			
<b>0,2 M sodium phosphate</b>	2,65 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.0	NaOH	
	47,35 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			
<b>Lysis buffer <i>fresh</i></b>	3 ml 1 M mannitol,			Inkubovat při 37°C
	375 µl sodium phosphate	8.0		
	5 ml 30% Ficoll,			
	300 µl EDTA	8.0		
	75 µl Neutral red,			
	6,25 ml H <sub>2</sub> O			
<b>Vacuole buffer <i>fresh</i></b>	4,5 ml 1 M mannitol			

	250 µl 0.2 M sodium phosphate	7.5		Inkubovat na ledu
	40 µl 0,5 M EDTA	8.0		
	5,21 ml H <sub>2</sub> O			
<b>4% Ficoll solution <i>fresh</i></b>	4,5 ml vacuole buffer			Inkubovat při 25°C
	3 ml lysis buffer			
<b>Wash buffer <i>fresh</i></b>	60 ml 1 M mannitol			
	30 ml 50 mM MES	5.6		
	60 ml H <sub>2</sub> O			
<b>Protoplast enzyme solution <i>fresh</i></b>	0,6 U/mg celulase			Rozpouštět při 37°C za občasného vortexování
	3 U/mg maceroenzym			
	0,09 g CaCl (bezvodý)			
	30 ml Wash buffer			

Poznámka: Roztoky, u nichž je uvedeno *fresh*, je nutné připravit v den izolace

#### 4.3.3 Chemikálie pro přípravu MS média

Složky	Množství na 1l (g)
<b>Sacharóza</b>	10
<b>Phytigel</b>	5,7 – 6
<b>MS + vitamíny</b>	4,3
<b>MES</b>	0,5

#### 4.3.4 Chemikálie pro izolaci DNA

Reagencie	Složení	Koncentrace
<b>Extrakční pufr</b>	TRIS-HCl	200 mM
	NaCl	250 Mm
	EDTA	20 mM
	SDS	0,5%
<b>TE</b>	TRIS	10 mM
	EDTA	1 Mm
<b>CIA</b>	ISOAMYLALKOHOL (1)	poměr 1:24
	CHLOROFORM (24)	

#### 4.3.5 Složení cytokininového standartu

	Množství na 1 vzorek (μl)
<b>BR9G</b>	2,5
<b>N-glukosid 7G</b>	2,5
<b>O-glukosid OG</b>	5
<b>N7-glukosid NT</b>	5
<b>Metanol</b>	5
<b>Celkový objem</b>	20

## 4.4 Metody

### 4.4.1 Rostlinný materiál

Za účelem studia cytokinin dehydrogenáz byla použita semena rostlin *Arabidopsis thaliana*, ekotypu Col-0, nadprodukující *CKX1*, *CKX2*, *CKX3* a *CKX7-GFP* pod kontrolou konstitutivního 35S promotoru a dále umlčené T-DNA linie *ckx2\_1* (SALK\_083761), *ckx2\_2* (SALK\_068485), *ckx3\_1* (SALK\_050938), *ckx3\_2* (GK\_157A04-013241) a *ckx3\_3* (GK\_736B02-023555). Linie *CKX1*, *CKX2* a *CKX3* byly získány ve spolupráci se skupinou profesora Wenera z univerzity Freie Universität (FU) v Berlíně (Werner a kol., 2003), semena T-DNA linií *ckx2* a *ckx3* byla objednána z kolekcí T-DNA inzerčních mutantů SALK a GABI KAT. Před zahájením experimentů bylo nutné rostlinný materiál namnožit, především z důvodu nízké klíčivosti, zapříčiněné vysokým stářím semen. U T-DNA inzerčních mutantů bylo nutné získat homozygotní linie, potřebné pro další experimenty.

### 4.4.2 Sterilizace semen

Každé práci se semeny předcházela jejich sterilizace. Semena, určená ke sterilizaci, byla v dostatečném množství vsypána do sterilní zkumavky (1,5 ml). K semenům byl přidán 1 ml 70% etanolu. Semena byla za stálého převrácení zkumavky promývána 1 minutu. Poté byl etanol odebrán. Semena byla dále promývána v 1 ml 96% etanolu analogickým způsobem. Po odpipetování etanolu byla semena ponechána v otevřené zkumavce ve flowboxu až do úplného vysušení.

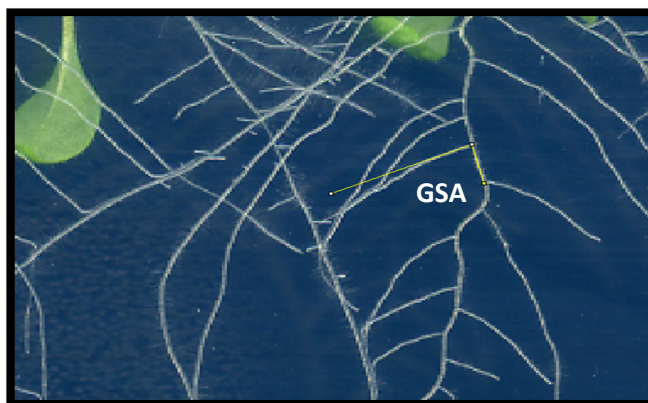
### 4.4.3 Sazení semen

Po sterilizaci byla semena jednotlivě nanášena sterilním párátkem na Petriho misky s živným médiem MS (složení v kap. 4.3 roztoky a chemikálie). Semena byla pokládána tak, aby vzdálenost mezi nimi odpovídala přibližně 1 cm. Tímto způsobem bylo na jedné misce vyseto přibližně 30 semen. Po nanesení semen byla miska uzavřena neprodyšnou páskou a ponechána 2 dny v horizontální poloze za tmy při teplotě 4°C, za účelem synchronizace klíčení. Po uplynutí dvou dnů byly misky se semeny přeneseny do kultivační komory (fytotron) (teplota 23°C, 16h světlo/8h tma).

### 4.4.4 Analýza GSA

Za účelem měření úhlů mezi laterálním a primárním kořenem (GSA, „Gravitropic Set-point Angle“) byly rostliny ponechány ve fytotronu (teplota 23°C, 16h světlo/8h tma)

až do vytvoření dostatečného množství laterálních kořenů pro analýzu (minimálně 15 laterálních kořenů). Poté byly kořeny naskenovány pomocí programu WinRHIZO. Analýza GSA byla provedena s použitím programu ImageJ. Na jednotlivých rostlinách byly měřeny všechny úhly mezi hlavním a laterálním kořenem (Obr. 2). Z naměřených úhlů bylo stanoveno, jaké procento z nich odpovídá hodnotám 0-30°, 31-50°, 51-70°, 71-90°, 91-110° a 111-180°. Hodnoty, náležící jedné linii, byly společně vyneseny do grafu.



Obr. 2.: Příklad stanovení úhlu mezi laterálním a primárním kořenem (zkr. GSA = gravitropic set-point angle) programem ImageJ.

#### 4.4.5 Fenotypizace kořenové části analyzovaných rostlin

Fenotypizace kořene byla provedena u vybraných nadprodukcujících a umlčených linií a porovnána s kontrolními rostlinami Col-0. Semena rostlin byla vysazena na kulaté Petriho misky s 1x MS médiem (složení v kap. 4.3 roztoky a chemikálie). Po třídní vernalizaci při teplotě 4°C byly misky umístěny do fytotronu. Po dvou týdnech růstu byly rostliny přesazeny na čtvercové Petriho misky s 1x MS médiem. Misky byly umístěny horizontálně, aby růst kořene probíhal pouze na povrchu agaru. Na jedné Petriho misce byly umístěny tři rostliny, náležící jedné mutantní linii společně se třemi rostlinami kontrolními (Col-0). Pro každou mutantní linii bylo provedeno 15 opakování. Kořeny byly naskenovány pomocí počítačového skeneru programem WinRHIZO. Snímky byly použity pro analýzu délky primárních kořenů a stanovení počtu laterálních kořenů. Délka primárních kořenů byla měřena prostřednictvím programu ImageJ. Z naměřených hodnot byla vypočítána průměrná hodnota, která byla vynesena do grafu společně s průměrnou hodnotou příslušných kontrolních rostlin.

#### 4.4.6 PCR genotypizace

Pro realizaci experimentů byla objednána semena *Arabidopsis thaliana* s T-DNA inzerčními mutacemi v genech CKX2 a CKX3. *Ckx2\_1* (SALK\_083761), *ckx2\_2* (SALK\_068485) *ckx3\_1* (SALK\_050938) T-DNA inzerční mutanti byly získány z kolekce SALK (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory). Mutantní linie *ckx3\_2* (GK\_157A04-013241) a *ckx3\_3* (GK\_736B02-023555) byly získány z kolekce GABI KAT (Rosso a kol., 2003) (Tab. 1). T-DNA inzerční linie nabízejí funkční charakterizaci genů skrze jejich cílené umlčování. Nevýhodou T-DNA sbírek je ovšem nejednoznačnost v poměru mezi homozygotními a heterozygotními insercemi a je tedy nutno vždy zafixovat linie do homozygotního stavu.

Tab. 1: Použité primery a sekvence nukleotidů

Primery	Sekvence
KO CKX3_1 R	GATTCCTAAACCGAGTTCGAACCG
KO CKX3_1 L	CCTCTAAAAACCGATATTAATTCTTGTGC
KO CKX3_2 R	GCAAAGCCATGCCAGGTGTC
KO CKX3_2 L	CGGGTCAACTGAATTTTTTATT
KO CKX3_3 R	CGAGGCTTTTCCCATAACAATTTAAAC
KO CKX3_3 L	TAAGGGTTTGAATGGTTACGGCG
KO CKX2_1 R	CTTCCACTTTACAACGTACGAGCG
KO CKX2_1 L	TCTTCGTTTAATGATCACTTTAATCACGG
KO CKX2_2 R	CGTAAGTCTTCGAAACACAAAATGCG
KO CKX2_2 L	GCCTACGAGATGTCACTAAAGTGTTG
LbaI	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG

Za účelem ověření počtu insercí v objednaných liniích (homozygotní vs heterozygotní inserce) byla semena T-DNA inzerčních mutantů (tab. 1) vysterilizována, a zasazena na kulaté Petriho misky s MS médiem. Následně byly rostliny přesazeny do zeminy a byla provedena kontrolní PCR (kapitola 1. 1. 5. 2).

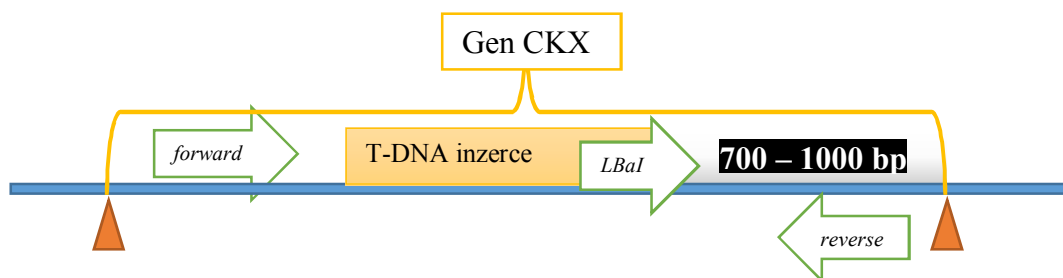
##### 4.4.6.1 Izolace DNA

Pro izolaci genomické DNA *Arabidopsis thaliana* byly odebrány listy o průměru přibližně 4 mm. Rostlinný materiál byl vložen do zkumavky typu eppendorf (1,5 ml), společně s jednou wolfram-karbidovou kuličkou. Kuličky je nutné předem promýt v 70%

etanolu a následně v destilované vodě. Do zkumavky se vzorkem a s kuličkou bylo přidáno 300  $\mu$ l extrakčního pufru a 120  $\mu$ l CIA (chloroform : isoamylalkohol v objemovém poměru 24 : 1). Zkumavky se vzorky byly vloženy do plastových držáků mlýnků Retsch Mixer Mill 200. Držáky byly upevněny do mlýnků a přikryty plastovým krytem. Byl nastaven požadovaný čas a frekvence otáček (20 sekund, 50 ot./s). Rozdrcená listová pletiva byla centrifugována 3 minuty při 14 000 rpm. Supernatan byl odebrán do čisté zkumavky (1,5 ml). Bylo přidáno 750  $\mu$ l 96% etanolu. Poté byly vzorky inkubovány 10 minut při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Po uplynutí této doby byly vzorky centrifugovány 7 minut při 14 000 rpm. Supernatan byl odebrán a pelet byl promyt ve 200  $\mu$ l 70% etanolu. Následovala centrifugace 5 min při 14 000 rpm. Etanol byl odebrán. Zkumavky s peletem byly vloženy do flow-boxu a ponechány až do úplného vysušení zbylého etanolu. Pellet byl rozpuštěn v 50  $\mu$ l TE pufru. Výsledná koncentrace DNA byla stanovena na spektrofotometru NanoDrop.

#### 4.4.6.2 PCR

Počet T-DNA inzercí v použitých CKX liniích byl analyzován pomocí techniky PCR. Podle počtu vzorků a zvoleného objemu reakce byl nejprve připraven premix, který se skládal z  $\text{H}_2\text{O}$  DNA/RNA free,  $\text{MgCl}_2$ , GoTag polymerázy, reakčního pufru a příslušných primerů (tab. 2). Reakční směs byla připravována na ledu. Premix byl rozpipetován do speciálních, tenkostěnných PCR zkumavek po 48  $\mu$ l. Na závěr byl přidán vzorek. PCR směs byla krátce promíchána na vortexu a centrifugována. Zkumavky s PCR reakční směsí byly inkubovány v termocykleru za stanovených podmínek (tab. 3). Pro každým vzorek byly připraveny dvě reakční směsi lišící se použitými primery. První reakční směs se skládala z primerů forward a reverse, které byly genově specifické a lišily se v závislosti na pozici T-DNA inserce (Obr. 3). Amplifikace proběhla pouze v případě absence T-DNA inserce v příslušném genu CKX (pokud je inserce přítomna, PCR amplifikace nemůže proběhnout z důvodu nadměrné velikosti amplikonu). Ke druhé reakci byla použita dvojice primerů LbaI a genově specifického reverse primeru (Obr. 3). Primer LbaI byl komplementární k sekvenci T-DNA, v důsledku čehož mohla amplifikace proběhnout pouze u mutantních rostlin s T-DNA inzercí. Negativní kontrolou byla DNA WT *Arabidopsis thaliana*.



Obr. 3.: Schématické znázornění trojice primerů (forward, LbaI, reverse). Primer LbaI je komplementární k T-DNA inzerci, primery forward a reverse byly specificky navrženy pro každou mutantní linii zvlášť v závislosti na pozici T-DNA inzerce. Při použití primerů reverse a forward dochází k amplifikaci DNA pouze v případě absence T-DNA inzerce, za vzniku ampliconu o velikosti 1000 bp. Pokud sekvence T-DNA inzerce obsahuje, pak se amplifikace neuskuteční, z důvodu nadměrné velikosti ampliconu (8000 bp), který se v rámci jednoho cyklu nestihne nasyntetizovat. Druhá amplifikace s použitím primeru LbaI, komplementárního k T-DNA inzerci, naopak proběhne za tvorby produktu o velikosti 700 – 1000 bp.

Tab. 2: Příprava 50  $\mu$ l reakční směsi

Reakční směs	Množství ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	8,5
5x pufr GoTag Flexi	4
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3
Nukleotidy (10mM)	0,4
Primer forward (LbaI)	1
Primer reverse	1
GoTag polymeráza	0,1
Templátová DNA	2

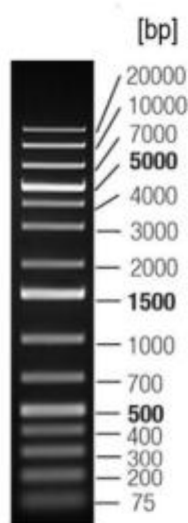


Tab. 3: Podmínky PCR reakce

<b>Počáteční denaturace</b>	<b>95°C</b>	<b>2 minuty</b>	
<b>Denaturace</b>	95°C	30 sekund	36 cyklů
<b>Nasednutí primerů („Annealing“)</b>	56°C	30 sekund	
<b>Prodlužování („Extension“)</b>	72°C	1 minuta	
<b>Dokončení syntézy</b>	72 °C	10 minut	

#### 4.4.6.3 Gelová elektroforéza

Separace produktů PCR byla provedena na 1% agarózovém gelu (0,8 g agarózy/80 ml TAE pufru) s barvivem ethidium bromidem v pracovní koncentraci 0,5 - 1µg/ml. Vzorčky byly nanесeny na gel spolu s DNA markerem o velikosti 1Kb (Obr. 4) a pozitivní kontrolou ve formě genomické DNA *Arabidopsis thaliana*. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V přibližně 20 minut. Vizualizace separovaných molekul nukleových kyselin byla provedena v procházejícím UV světle na UV-transiluminátoru.

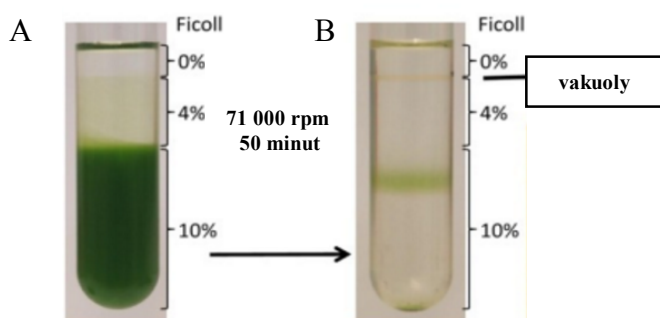


Obr. 4: Použitý velikostní standart – Marker GeneRuler 1kb Plus DNA ladder.

#### 4.4.7 Izolace vakuol

Vakuoly byly izolovány z homozygotních rostlin *ckx2\_1* (SALK\_083761), *ckx3\_1* (SALK\_050938), OE *CKX2*, Col-0 v počátečním stádiu kvetení (přibližně 35 dnů od germinace). Pro izolaci vakuol byly použity 2 gramy listů („mokrý váha“). Listy byly podélně rozřezány skalpelem na proužky o tloušťce 2 milimetrů. Nakrájené listy byly

vloženy do Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml a macerovány v 30 ml roztoku, obsahujícího celulózu a maceroenzym (Protoplast enzym solution – složení v kap. 4.3 roztoky a chemikálie). Pro lepší průnik enzymů do listových pletiv bylo do uzavřené baňky aplikováno vakuum na 20 minut. Poté byl vývod Erlenmeyerovy baňky uzavřen parafilmem. Směs byla macerována na třepačce při 70 rpm a pokojové teplotě až do uvolnění protoplastů (3-4 hodiny). Uvolňující se protoplasty bylo nutné pravidelně kontrolovat pod světelným mikroskopem. Hrubá protoplastová suspenze byla přefiltrována sítím s otvory o velikosti 150  $\mu\text{m}$  do zkumavky o objemu 50 ml. Poté byl filtrát promyt v 5 ml promývacího roztoku a centrifugován 6 minut při 500 rpm a teplotě 25°C. Supernatan byl odstraněn a pelet resuspendován v 30 ml promývacího roztoku. Promývání bylo jedenkrát zopakováno. Následně bylo k peletu přidáno 10 ml lyzačního pufru. Pro dosažení lýze buněk bylo nutné směs několikrát prudce propipetovat. Zlyzovaná směs byla napipetována do ultracentrifugačních zkumavek v množství 2,5 ml. Vzorek byl převrstven 1,5 ml roztoku Vacuole solution (složení v kap. 4.3 roztoky a chemikálie). Třetí vrstvou byl Ficoll solution, který byl přidán v množství 0,5 ml (Obr. 5). Roztoky bylo nutné nanášet velmi pomalu, aby došlo k vytvoření gradientu, klíčového pro separaci vakuol. Doba od přidání lyzačního pufru po vložení vzorků do centrifugy by neměla přesáhnout 10 minut. Směs byla vložena do ultracentrifugy, vychlazené na 10°C, a centrifugována 50 minut při 71 000 rpm. Po ukončení ultracentrifugace byly vakuoly posbírány na rozhraní 0% a 4% ficollu, kde dosahují nejvyšší čistoty, nezbytné pro další analýzu metodou LC-MS/MS (Obr. 5). Vakuoly byly viditelné díky neutrální červení, která je jednou ze složek lyzačního pufru. Neutrální červeně je barvivo s relativně nízkou molekulovou hmotností, které penetruje intaktními protoplasty do nitra buňky a poté je ionizováno nízkým pH uvnitř vakuol. Zde se kumuluje, a poskytuje kontrast vůči protoplastu.



Obr. 5.: A: Ukázka gradientu, vytvořeného na základě různých koncentrací ficollu v roztocích. B: Vyizolované vakuoly jsou červeně zbarveny a objevují se mezi 4% a 0% ficollem (Převzato a upraveno od Trentmann a Haferkamp, 2013).

#### 4.4.8 Počítání vakuol pomocí Bürkerovy komůrky

Množství vyizolovaných vakuol bylo stanoveno na 1 ml suspenze prostřednictvím Bürkerovy komůrky. Počítací síť Bürkerovy komůrky se skládá z 9 velkých čtverců o ploše 1 mm<sup>2</sup>, které se dále dělí na 16 menších čtverců, o ploše 0,04 mm<sup>2</sup> (Obr. 6). Při počítání vyizolovaných vakuol byl nejprve nanesen malý objem vakuolové suspenze mezi podložní a krycí sklo. Připravená počítací komůrka byla vložena do zorného pole světelného mikroskopu. Vakuoly byly počítány ve čtvercích o ploše 0,04 mm<sup>2</sup>. Při počítání vakuol se započítávaly pouze ty, které se nacházely uvnitř čtverců o uvedené ploše nebo ty, které se z vnitřní nebo vnější strany dotýkaly dvou stanovených stran, aby se zabránilo dvojímu počítání částic.

Pro stanovení množství vakuol v 1 ml suspenze byl použit výpočet:

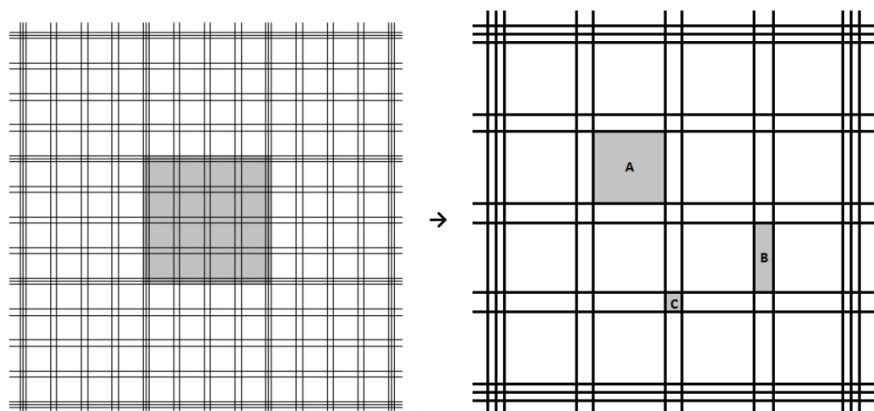
$$X = \frac{a \cdot 1000}{n \cdot V}$$

X...koncentrace vakuol v 1 ml suspenze

a...stanovený počet vakuol

n...počet spočítaných čtverců

V...objem počítaného čtverce (0,004 mm<sup>3</sup>)



Obr. 6: Počítací síť Bürkerovy komůrky. Vakuoly byly počítány ve čtverci A o rozměrech 0,2 x 0,2 mm, ploše 0,04 mm<sup>2</sup>, hloubce 0,1 mm a objemu 0,004 mm<sup>3</sup>.

Spočítané vakuoly byly zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při teplotě -80°C.

#### 4.4.9 Příprava vzorků pro LC-MS/MS analýzu

Pro LC-MS/MS analýzu je nutné vzorky vakuol vyčistit od balastních proteinů, které by mohly negativně ovlivnit výsledek měření. Vzorky byly rozmrazeny na ledu. Poté byly vloženy do kapalného dusíku a opět rozmrazeny. Byl změřen přesný objem vzorků. Vzorky se známým objemem byly rozděleny na triplikáty. Ke vzorkům bylo přidáno 20  $\mu$ l cytokininového standartu a 1 ml Bieleskiho roztoku (směs MeOH / H<sub>2</sub>O / chloroformu v objemovém poměru 15 : 4 : 1). Vzorky byly inkubovány na rotační třepačce 30 min při 4°C a poté centrifugovány při 20 000 rpm, 15 minut. Vysrážené proteiny zůstaly ve formě peletu na dně zkumavky, a supernatan byl odebrán do čisté zkumavky (15 ml), kde byl zředěn 14 ml 1M roztoku HCOOH.

SPE kolonky bylo nutné připravit pro interakci se vzorkem pomocí série tří promytí. Prvním promývacím roztokem bylo organické rozpouštědlo MeOH, které bylo na kolonku aplikováno v objemu 2 ml. Poté byla kolonka promyta 2 ml H<sub>2</sub>O a na závěr 2 ml 1M roztoku HCOOH. Na připravené SPE kolonky byl aplikován vzorek. Poté, co se veškerý analyt sorboval na pevné fázi, byly kolonky promývány 2 ml 1M rozpouštědla HCOOH. Po promytí byl analyt uvolněn z pevné fáze přidáním 3 ml elučního rozpouštědla ve formě 80% MeOH. Vzorky byly odpařeny do sucha na odparce a následně resuspendovány v 50  $\mu$ l 5% MeOH. Vzorky byly krátce zvortexovány a 5 minut sonifikovány. Poté byly napipetovány do zkumavek s mikrospiny a centrifugovány 5 min při 7500-8000 rpm. Purifikované vzorky byly napipetovány do insertu ve vialce a opět centrifugovány 10-15 min.

#### 4.4.10 LC-MS/MS analýza

Purifikované vzorky, rozpuštěné v organickém činidle MeOH byly použity k analýze složení cytokininů metodou ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) ve spojení tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Metoda UHPLC patří mezi nejmodernější typy kapalinové chromatografie, jejíž výhody vyplývají z 2  $\mu$ m částic, tzv. sub-2-mikronových částic, z kterých se skládají kolony a vysokého tlaku, který dosahuje hodnot 150 MPa. Analyzované látky byly dávkovány do chromatogramu Acquity UPLC I-Class System a separovány na reverzní fázi. Reverzní kolona o rozměrech 2,1 x 50 mm se skládá z nepolárních skupin, mobilní fáze je polárnější. Reverzní systém slouží k zadržování převážně nepolárních složek analytů. Celkový run-time, včetně ekvilibrace trval 5 minut.

Byla sledována odezva detektoru vzniklých iontů po ionizaci elektrosprejem v záznamu kladných iontů  $[M+H]^+$ . Podmínky v pozitivním ESI ionizačním módu jsou následující: napětí na kapiláře – 0,35 kV, Desolvační a zdrojová teplota – 600/150 °C, Desolvační a zdrojový průtok plynu (argon) – 1000/150 l hr<sup>-1</sup>, iontová energie 1/2 0,5/1,0 V, vstupní/výstupní napětí 0,5 V, kolizní průtok plynu – 0,2 ml min<sup>-1</sup>, rozlišení LM/HM 2,8/14,75, doba měření přechodu jednotlivého iontu (dwell time) – 0,01 s. Základní parametry nastavení pro každý CK zvlášť jsou uvedeny v tab. 4.

Tab. 4: Parametry nastavení intového zdroje ESI pro každý CK jednotlivě: MRM (Multiple Reaction Monitoring), napětí vkládané na vstupní kužel (cone voltage), kolizní energie (collision energy), retenční čas (retention time), mez detekce (LOD = Limit of Detection), lineární dynamický rozsah (Linear dynamic range).

CKs	MRM	Cone voltage (V)	Collision energy (V)	Retention time <sup>a</sup> (min)	LOD <sup>b</sup> (amol)	Linear dynamic range (fmol)
tZ	220.1 > 136.1	23	18	1.918 ± 0.001	10.0	0.05 – 1000
tZR	352.2 > 220.1	28	19	2.411 ± 0.002	5.0	0.01 – 1000
tZ9G	382.2 > 220.1	30	20	1.661 ± 0.004	5.0	0.01 – 1000
cZ	220.1 > 136.1	23	18	2.147 ± 0.004	5.0	0.01 – 500
cZR	352.2 > 220.1	28	19	2.586 ± 0.002	10.0	0.05 – 1000
cZ9G	382.2 > 220.1	30	20	1.805 ± 0.003	1.0	0.01 – 500
DHZ	222.1 > 136.1	32	20	2.088 ± 0.005	5.0	0.01 – 1000
DHZR	354.2 > 222.1	26	20	2.573 ± 0.002	50.0	0.1 – 1000
DHZ9G	384.2 > 222.1	26	21	1.798 ± 0.006	5.0	0.01 – 500
iP	204.1 > 136.1	22	16	3.823 ± 0.004	10.0	0.05 – 1000
iPR	336.2 > 204.1	28	18	4.077 ± 0.002	5.0	0.01 – 1000
iP9G	366.2 > 204.1	30	20	3.291 ± 0.003	10.0	0.05 – 500
BA	226.1 > 91.0	32	22	3.681 ± 0.005	10.0	0.05 – 500
BAR	358.2 > 226.1	27	20	3.882 ± 0.003	10.0	0.05 – 1000
BA9G	388.2 > 226.1	32	22	3.104 ± 0.004	5.0	0.01 – 1000
oT	242.1 > 136.1	22	26	3.341 ± 0.002	10.0	0.05 – 1000
oTR	374.2 > 242.1	32	19	3.542 ± 0.003	5.0	0.01 – 1000
oT9G	404.2 > 242.1	34	23	2.812 ± 0.002	10.0	0.05 – 1000
mT	242.1 > 107.0	32	22	2.571 ± 0.003	10.0	0.05 – 500
mTR	374.2 > 242.1	32	19	2.912 ± 0.002	5.0	0.01 – 1000
mT9G	404.2 > 242.1	34	23	2.179 ± 0.004	5.0	0.05 – 1000
pT	242.1 > 136.1	22	16	2.323 ± 0.003	1.0	0.01 – 500
pTR	374.2 > 242.1	32	19	2.732 ± 0.003	1.0	0.01 – 1000
pT9G	404.2 > 242.1	34	23	1.985 ± 0.003	5.0	0.05 – 1000

<sup>A</sup> – hodnoty jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou (+/- SD) (n = 10), <sup>B</sup> Limit detekce – poměr signálu k šumu (signal-to-noise ratio) 3:1.

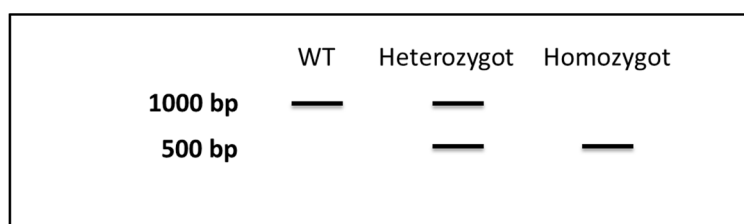
## 5 Výsledky

### 5.1 PCR genotypizace mutantů

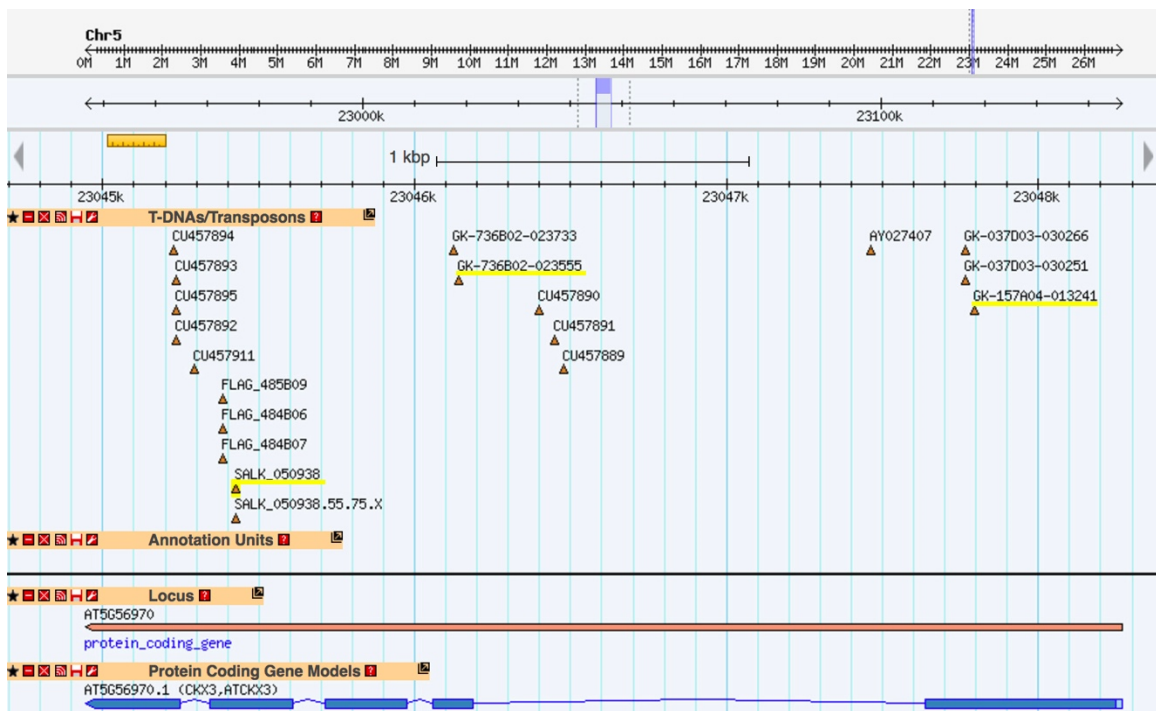
PCR genotypizace byla provedena u dvou až třítýdenních rostlin *Arabidopsis thaliana* s T-DNA inzercí v genech *CKX2* a *CKX3* a dle použitých primerů byly od sebe odlišeny rostliny homozygotní, heterozygotní a případně též wild type netransgenní rostliny (Obr. 7). Genotypizace byla provedena z umlčených linií (Tab. 5). T-DNA inserce se nacházely v kódujících oblastech genu *CKX3*. V případě genu *CKX2* musely být vzhledem k nedostatku jiných dostupných linií použity inserce v nekódující oblasti genu (Obr. 8 a Obr. 9). Předchozí studie ovšem jednoznačně ukázaly, že tyto dvě T-DNA linie jsou funkční (Bartrina et al). Produkty PCR byly následně separovány a vizualizovány na gelu (Obr. 10). Z homozygotních rostlin (Tab. 6) byla odebrána semena, která byla použita k propagaci materiálu. Další generace odvozená od těchto rostlin byla použita ke kořenové fenotypizaci a k izolaci vakuol.

Tab. 5: Použité linie *Arabidopsis thaliana* s T-DNA inzercí v genech *CKX2* a *CKX3*

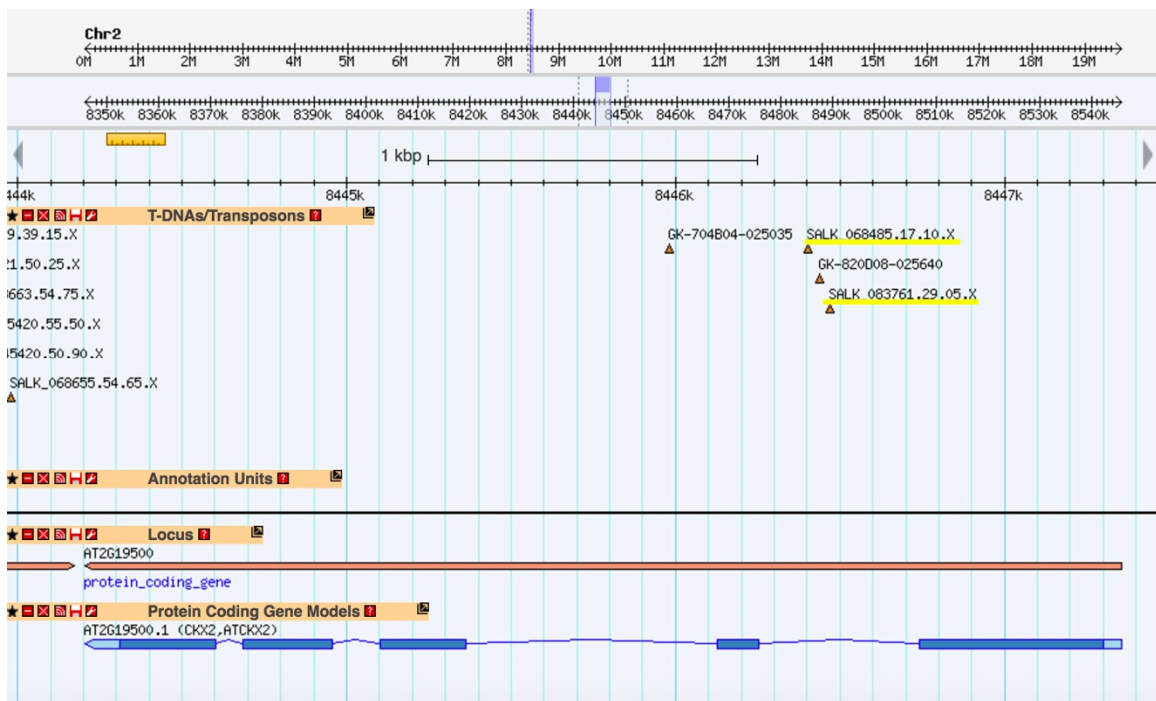
T-DNA inzerční linie	Kolekce_katalogové číslo
<i>ckx3_1</i>	SALK_050938
<i>ckx3_2</i>	GK_157A04-013241
<i>ckx3_3</i>	GK_736B02-023555
<i>ckx2_1</i>	SALK_083761
<i>ckx2_2</i>	SALK_068485



Obr. 7: Schématické znázornění možných výsledků PCR genotypingu při použití genově specifických primerů pro geny *CKX2* a *CKX3* a primeru LBAI (WT = wild-type)



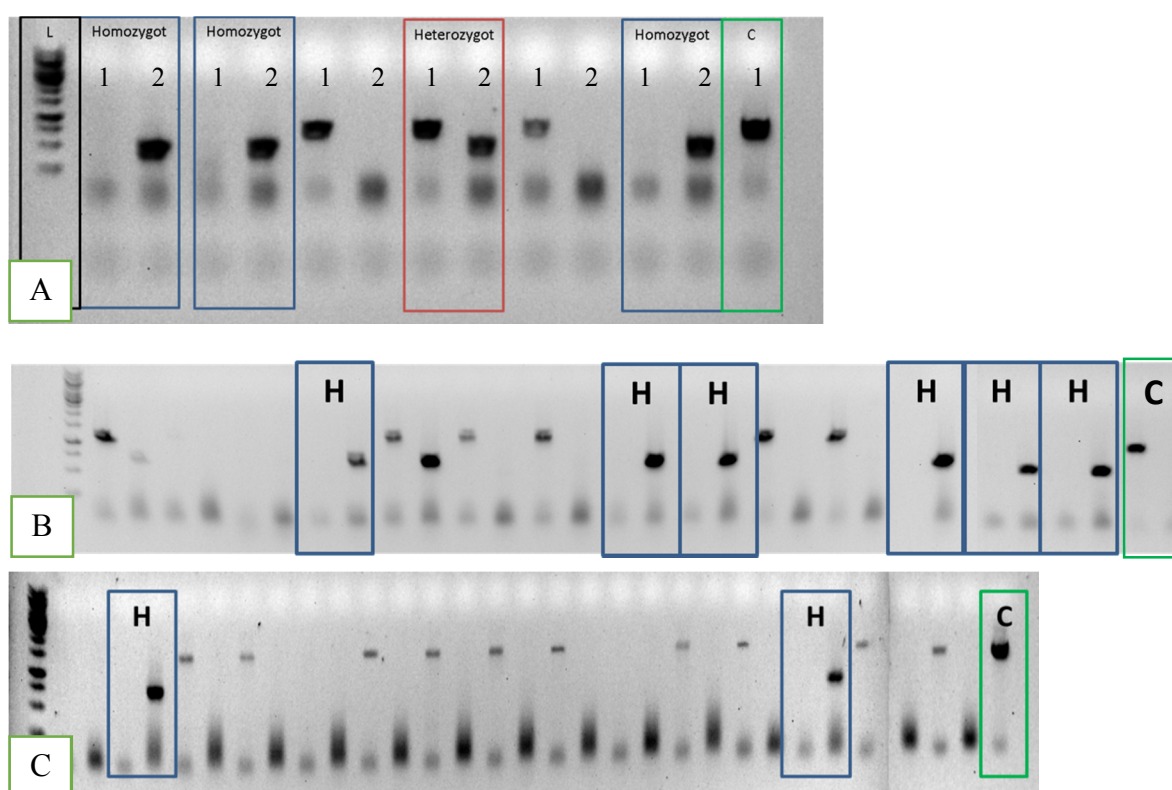
Obr. 8: Schématické znázornění genu *CKX3* (*At5g56970*) a dostupných T-DNA inzerčních linií. V rámci této práce byly testovány umlčené linie SALK\_050938, GK\_157A04-013241 a GK\_736B02-023555.



Obr. 9: Schématické znázornění genu *CKX2* (*At2g19500*) a dostupných T-DNA inzerčních linií. V rámci této práce byly testovány umlčené linie SALK\_083761 a SALK\_068485

Tab. 6: Počet získaných rostlin z T-DNA umlčených linií s insercemi v genech *CKX2* a *CKX3* a počet získaných rostlin v homozygotním stavu

T-DNA inserční linie	Celkový počet rostlin	Homozygotní rostliny
<i>ckx2_1</i>	14	6
<i>ckx2_2</i>	15	2
<i>ckx3_1</i>	6	2
<i>ckx3_2</i>	11	0
<i>ckx3_3</i>	14	0



Obr. 10: Elektroforeogramy – výsledky PCR genotypingu u T-DNA inserčních linií. **A:** T-DNA inserční linie *ckx3\_1* (SALK\_050938), **B:** T-DNA inserční linie *ckx2\_1* (SALK\_083761), **C:** T-DNA inserční linie *ckx2\_2* (SALK\_068485). Primerová směs **1:** Forward + reverse primer, genově specifický. Primerová směs **2:** LbaI FW primer + genově specifický reverse primer. Primerové směsi **1** a **2** se na elektroforeogramech pravidelně střídají pro jednotlivé analyzované rostliny, jak je znázorněno na elektroforeogramu A. **C** = pozitivní kontrola (genomická DNA *Arabidopsis thaliana* Col-0 WT). **L** = ladder 1 kb Plus. **H** = homozygot.



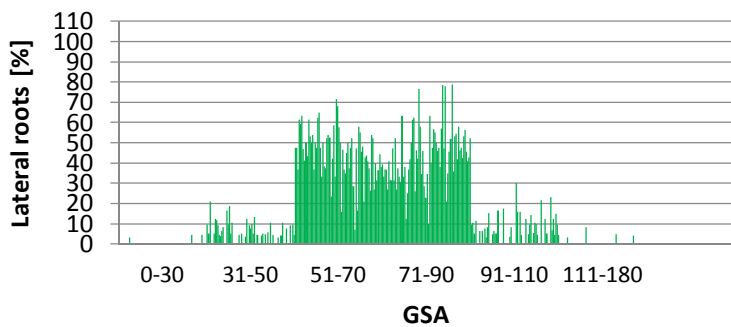
## 5.2 Fenotypizace kořenové části

Cytokininy jsou negativními regulátory kořenového systému. Dílčím cílem diplomové práce bylo zjistit, jakým způsobem budou kořeny reagovat na změnu koncentrace cytokininů, způsobenou nadprodukcí či umlčením vybraných forem *CKX*. Stanovované morfologické znaky se týkaly délky primárního kořene, počtu laterálních kořenů a úhlů mezi laterálními kořeny a primárním kořenem (GSA). Kořenová fenotypizace byla provedena u T-DNA linií *ckx2\_1* (SALK\_083761) a *ckx3\_1* (SALK\_050938), u kterých se podařilo odvodit homozygotní linie. Dále jsem pro fenotypizaci použila naprodukující linie *CKX1* a *CKX2*, kde se rovněž podařilo získat homozygotní rostliny. Kontrolní rostlinou byla *Arabidopsis thaliana* Col-0.

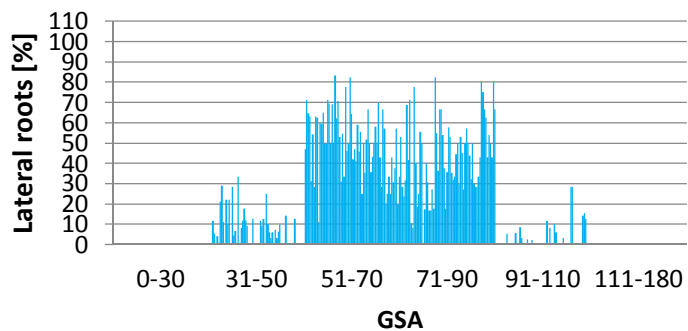
### 5.2.1 GSA

Rostliny byly pěstovány ve fytotronu na čtvercových Petriho miskách s MS médiem ve vertikální poloze. Kořeny měsíc starých rostlin byly snímány skenerem pomocí programu WinRHIZO a poté byly použity pro analýzu úhlů mezi primárním kořenem a laterálními kořeny (zkr. GSA = gravitropic set-point angle) (Obr. 11). Programem, použitým k měření GSA, byl ImageJ. U každé rostliny bylo stanoveno, jaké procento z naměřených úhlů spadá do rozmezí 0-30°, 31-50°, 51-70°, 71-90°, 91-110°, 111-180°. Hodnoty, náležícími příslušné linii, byly vyneseny do grafu (Graf 1). U každé linie byly analyzovány úhly 90 – 100 rost

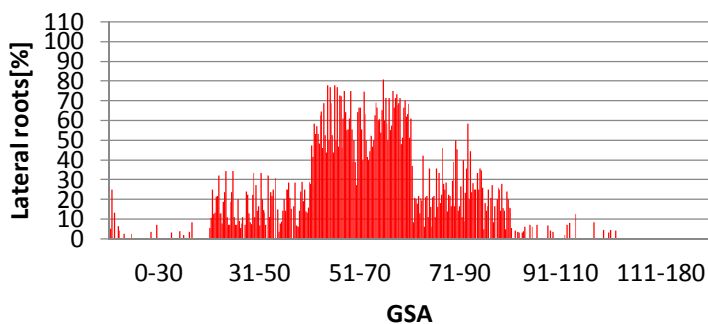
### KO *CKX3\_1*



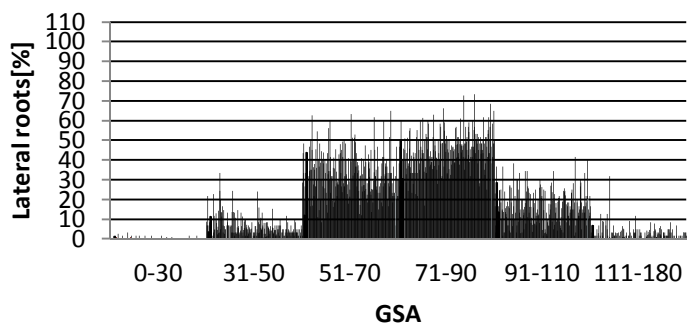
### KO *CKX2\_1*



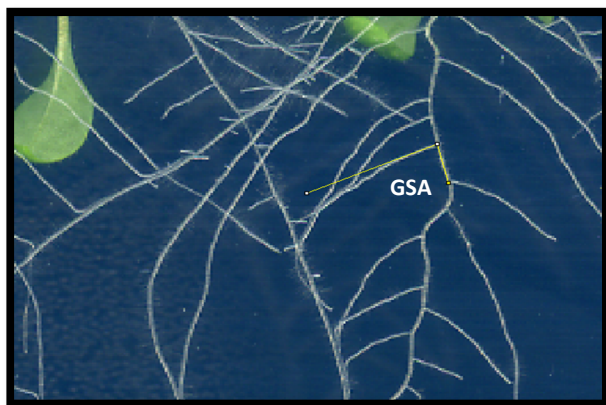
### OE *CKX1*



### WT Col-0



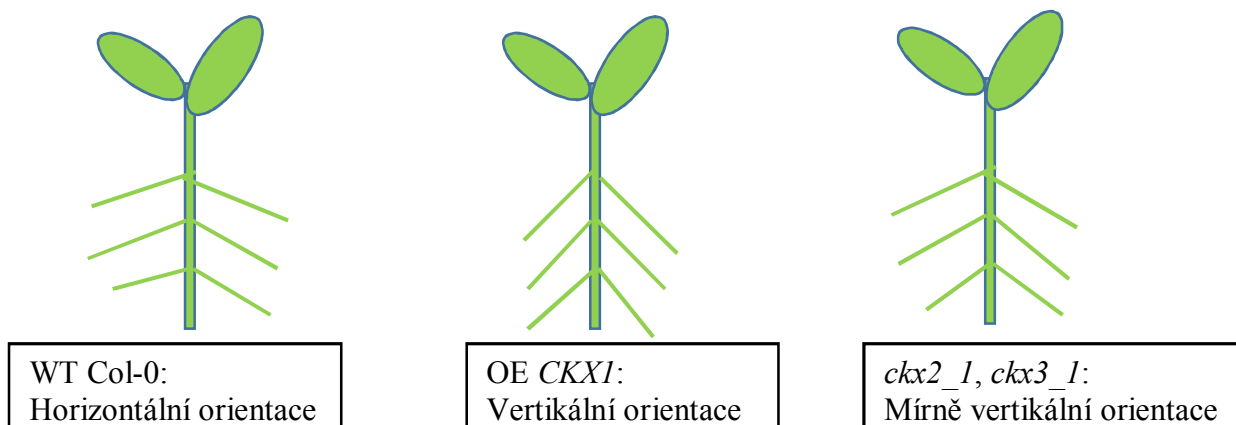
Grafy 1.: Analýza GSA u nadprodukcující linie *CKX1* a u umlčených linií *ckx2\_1* (SALK\_083761) a *ckx3\_1* (SALK\_050938), v porovnání s WT rostlinami Col-0. Na ose X jsou uvedeny úhly, na ose Y jsou vyznačena procenta. Graf ukazuje, jaké procento naměřených úhlů spadá do příslušných úhlových rozmezí



Obr. 11: Příklad vyhodnocení úhlové vzdálenosti mezi laterálním a primárním kořenem (zkr. GSA = gravitropic set-point angle) v programu ImageJ.

Z grafů vyplývá, že u WT jsou laterální kořeny orientovány horizontálněji (71 – 90°) než u linií *ckx2\_1* (SALK\_083761) a *ckx3\_1* (SALK\_050938). Velké množství úhlů rovněž spadá do rozmezí 91 – 110°. U rostlin *CKX1* jsou kořeny orientovány spíše vertikálněji, kdy nejvíce úhlů spadá do rozmezí 51 – 70°. Laterální kořeny rostlin *ckx2\_1*

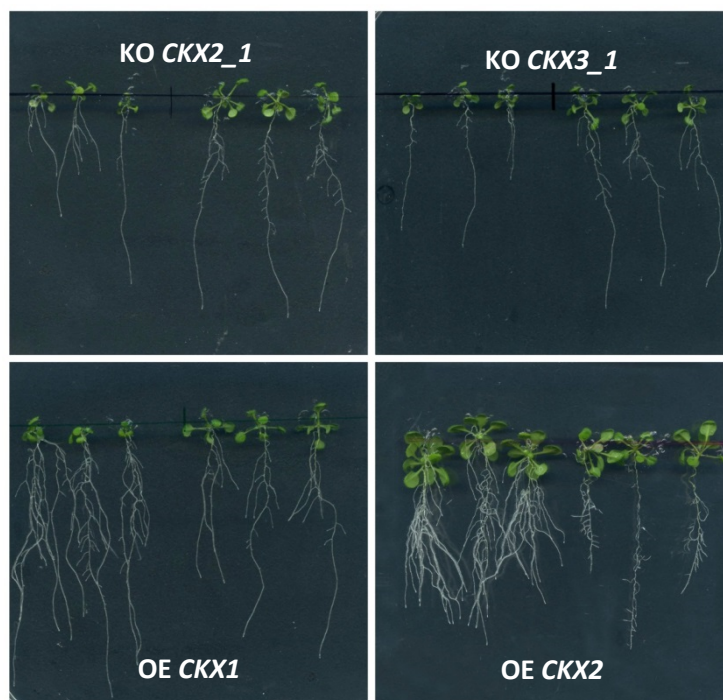
a *ckx3\_1* jsou ve srovnání s Col-0 vertikálněji orientované s maximem úhlů v oblasti 51 – 90° (obr. 12).



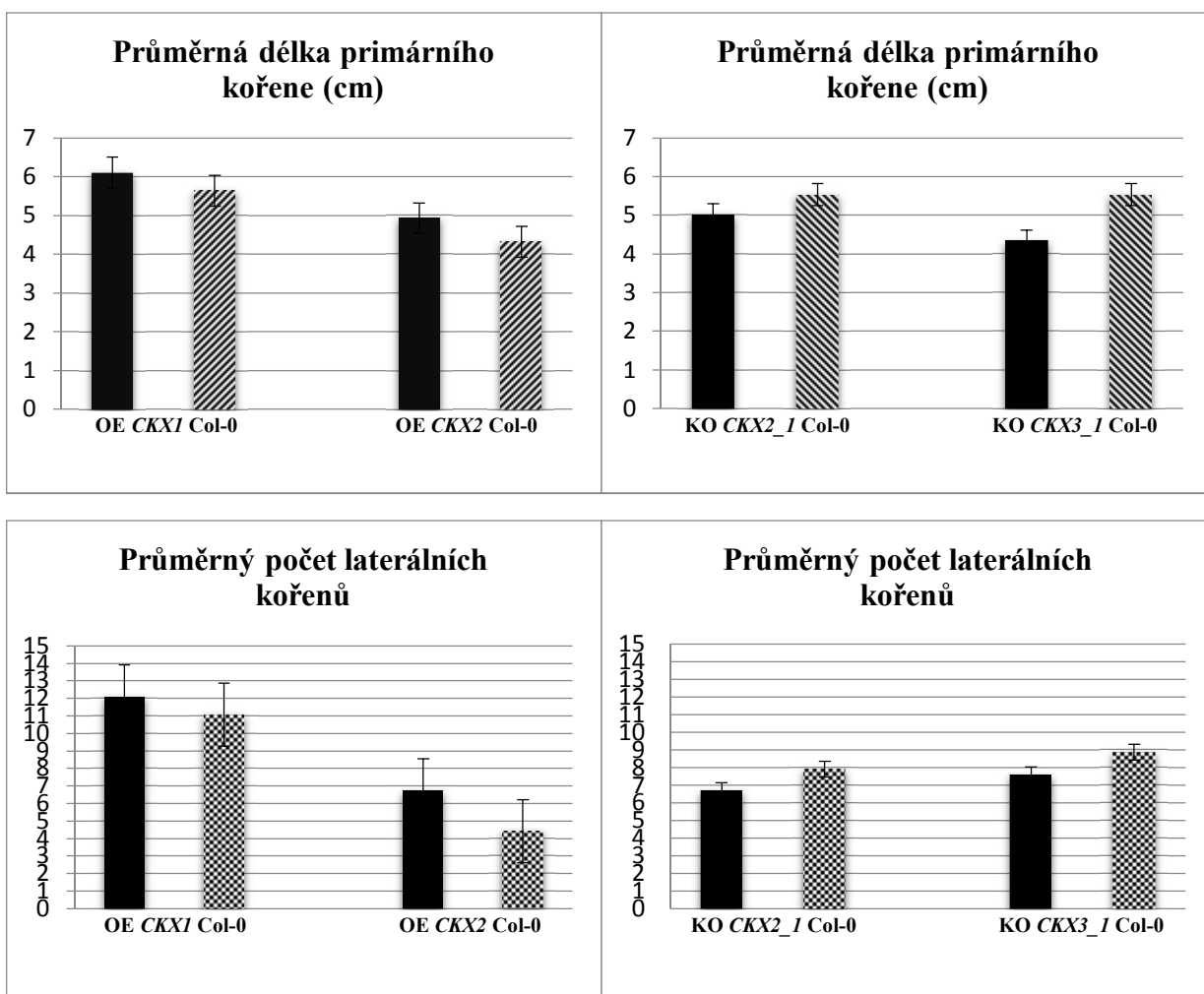
Obr. 12: Schématické znázornění výsledků analýzy GSA, provedené u rostlin *ckx2\_1* (SALK\_083761), *ckx3\_1* (SALK\_050938) a u nadprodukcující linie *CKX1* v porovnání s WT Col-0.

### 5.2.2 Analýza délky primárního kořene a počtu laterálních kořenů

Délka primárního kořene je determinována prodlužováním buněk v zóně prodlužovací a také frekvencí buněčného dělení v meristematické zóně kořene. Na regulaci obou parametrů mají podíl také cytokininy. Naším záměrem tedy bylo zjistit, do jaké míry se změní kořenová architektura u linií se zvýšenou či sníženou hladinou cytokininů v důsledku umlčení genů *CKX2* a *CKX3* či naopak u linií nadprodukcujících *CKX1* a *CKX2*. Kořenová fenotypizace byla provedena u měsíc starých rostlin, kultivovaných na čtvercových Petriho miskách s MS médiem ve vertikální poloze. Na jednu misku byly vždy umístěny tři rostliny mutantní, spolu se třemi rostlinami kontrolními, aby byly zajištěny stejné podmínky růstu (Obr. 13). U každé transgenní linie bylo provedeno 15 opakování. Kořeny byly naskenovány systémem WinRHIZO. Délky primárních kořenů byly měřeny prostřednictvím programu ImageJ. Z hodnot, náležících jedné transgenní linii, byl vypočítán průměr. Průměrná hodnota byla vynesena do grafu spolu s hodnotami příslušných rostlin wild-type (Graf 2).



Obr. 13: Ukázka fenotypizovaných rostlin *Arabidopsis thaliana*. Na každé čtvercové Petriho misce je první trojice rostlin složena z příslušných mutantů – *ckx2\_1* (SALK\_083761), *ckx3\_1* (SALK\_050938), OE *CKX1*, OE *CKX2* a druhá trojice z rostlin kontrolních WT Col-0.



Graf 2.: Analýza délek primárních kořenů a počtu laterálních kořenů u třítydenních rostlin OE *CKX1*, *ckx2\_1* (SALK\_083761), *ckx3\_1* (SALK\_050938) ve srovnání s rostlinami WT Col-0. Na ose X jsou uvedeny transgenní linie spolu s kontrolními rostlinami WT, které byly pěstovány za stejných podmínek, a tudíž mohou být mezi sebou porovnávány. Na ose Y je vyznačena průměrná délka primárních kořenů v jednotkách cm. U tabulek, zobrazujících průměrný počet laterálních kořenů, je na ose Y uveden průměrný počet laterálních kořenů na jedné rostlině.

Výsledky kořenové fenotypizace potvrdily negativní vliv cytokininů na kořenovou architekturu. Následující výčet naměřených hodnot, získaných z průměrných délek primárních kořenů a počtu laterálních kořenů, je uveden vždy ve vztahu k příslušným hodnotám WT Col-0.

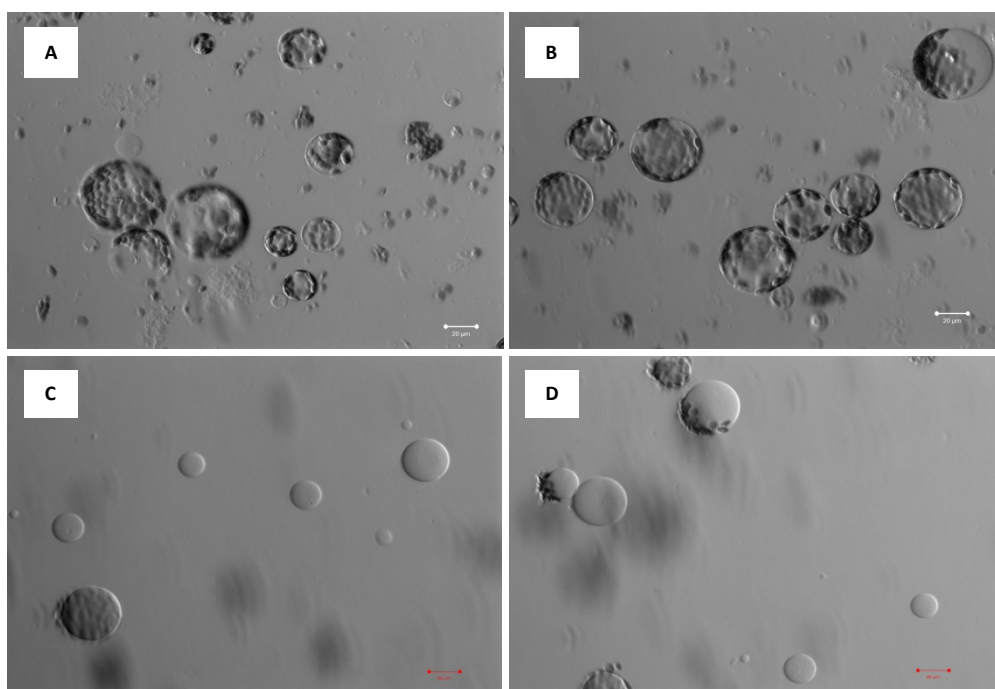
Výsledky ukázaly, že u rostlin s nadprodukcí *CKX1* je primární kořen delší v průměru o 0,5 cm, zatímco u linií OE *CKX2* o 0,61 cm. Primární kořeny u umlčených linií *ckx2\_1* (SALK\_083761) jsou kratší o 0,52 cm a u linií *ckx3\_1* (SALK\_050938) o 1,2 cm. Z analýzy počtu laterálních kořenů (LR) vyplývá, že u rostlin OE *CKX1* je v průměru o jeden laterální kořen více. U linií OE *CKX2* byl počet LR vyšší o 2. U linií *ckx2\_1* byl počet LR menší v průměru o 1,2, a u linií *ckx3\_1* (SALK\_050938) byl počet snížen o 2,3 (graf 5-8).

### 5.3 Izolace vakuol

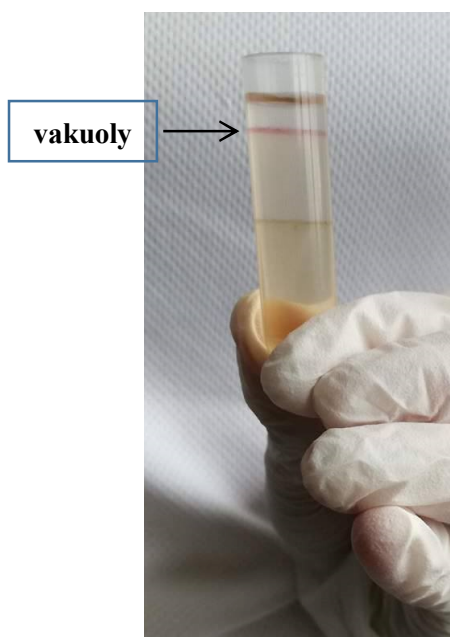
Vakuoly byly izolovány metodou, založenou na osmotickém a tepelném narušení protoplastů *A. thaliana*, odvozených z mezofylu (Robert a kol., 2007). Vakuoly byly zachyceny na pomezí 0 – 4% ficolu (Obr. 15). Vakuoly byly izolovány z transgenních rostlin *ckx2\_1* (SALK\_083761), *ckx3\_1* (SALK\_050938), OE *CKX2*, OE *CKX7*, WT Col-0, v počátečním stádiu kvetení (přibližně 35 dnů od germinace). V průběhu izolace vakuol byly také odebrány protoplasty (Obr. 14). Počet vakuol a protoplastů na 1 ml byl stanoven v Bürkerově komůrce (Tab. 7).

Tab. 7: Počet vyizolovaných vakuol a protoplastů na 1 ml suspenze.

Linie	Počet vakuol/ml	Linie	Počet protoplastů/ml
KO <i>ckx2_1</i>	386 363	KO <i>ckx3_1</i>	576 388
KO <i>ckx3_1</i>	387 916 383 333	OE <i>CKX2</i>	529 166
OE <i>CKX2</i>	200 000 219 000	OE <i>CKX7-GFP</i>	486 111
OE <i>CKX3</i>	203 703	OE <i>CKX3</i>	324 074
OE <i>CKX7-GFP</i>	304 166	WT Col-0	418 981
WT Col-0	225 000		
WT Col-0	252 000		



Obr. 14: Mikroskopické snímky, získané v průběhu izolace vakuol: (A, B) Uvolněné protoplasty, odvozené z mezofylu, po 4 hodinách macerace v roztoku, obsahujícího macerázu a celulázu. (C, D) uvolňující se vakuoly po přidání lyzačního činidla do směsi protoplastů. Měřítko = 20 µm.



Obr. 15: Vyizolované vakuoly jsou zachyceny na hranici 0 – 4% ficollu. Jsou červeně zbarveny díky neutrální červeně, která je složkou lyzačního pufru.

## 5.4 Stanovení celkových cytokininů metodou LC-MS/MS

Celkové složení cytokininů bylo stanoveno z vakuol linií *ckx2\_1* (SALK\_083761), *ckx3\_1* (SALK\_050938), OE *CKX2*, WT Col-0 prostřednictvím ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Vzorky vakuol byly před samotnou analýzou rozděleny na triplikáty a přečištěny přes SPE kolony. Výsledky analýzy jsou uvedeny v tab. 8, grafu 3. Jednotky koncentračních hladin jsou vyjádřeny v jednotkách fmol/100 000 vakuol. Naměřené koncentrace u triplikátů jsou zprůměrovány, a uvedeny spolu se směrodatnou odchylkou (Průměr ± SD). V tabulkách je také uvedena relativní směrodatná odchylka (RSD). Statické vyhodnocení bylo provedeno T-testem (dvoupárový, shodné rozptyly; "\*" - 0.05 > p > 0.01, "\*\*\*" - 0.01 > p > 0.001, "\*\*\*\*" - p < 0.001).

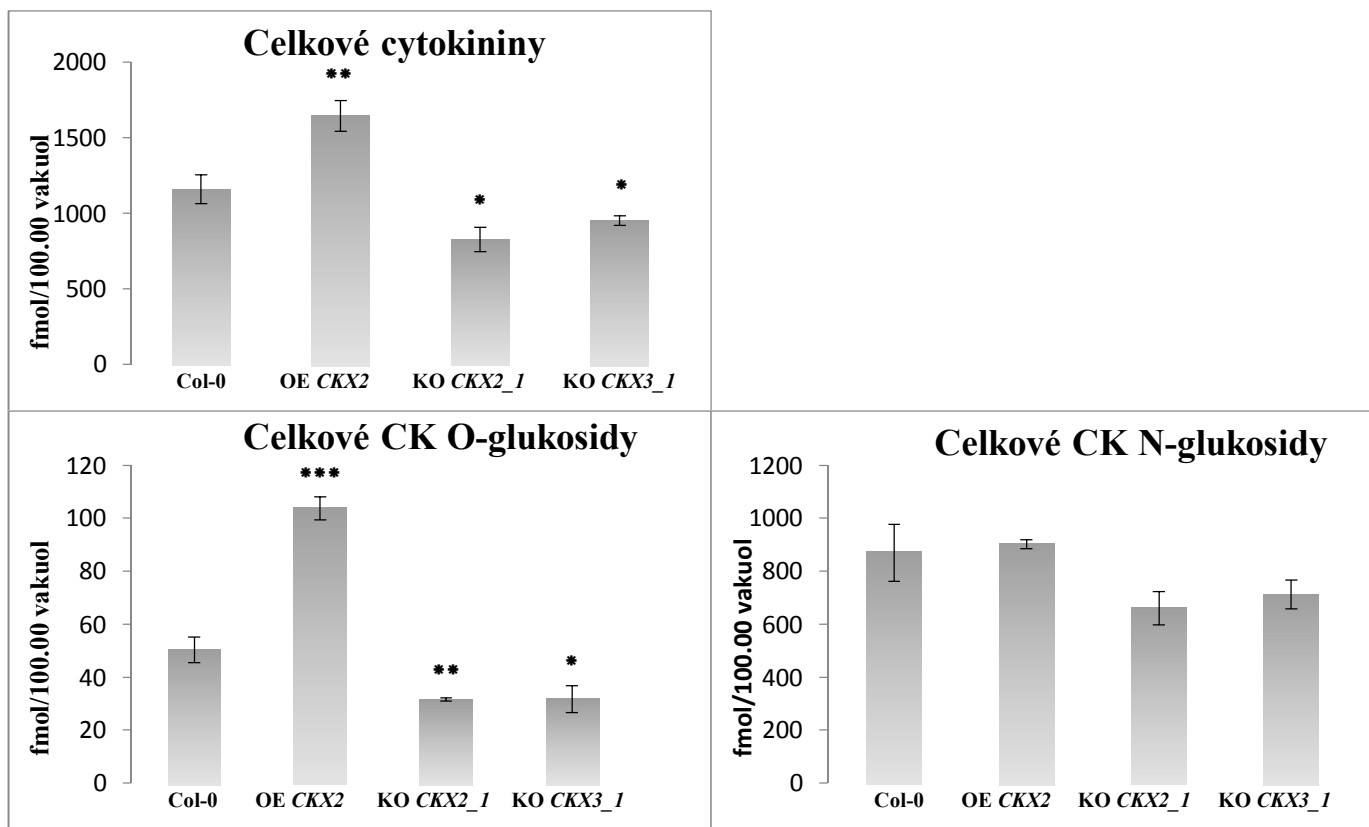
Tab. 8: Stanovení obsahu O-glukosidů, N-glykosidů, tZ, CZ, DHZ, iP a celkových cytokininů ve vakuolách linií *ckx2\_1* (SALK\_083761), *ckx3\_1* (SALK\_050938), OE *CKX2*, WT Col-0. CK = cytokiny, tZ = *trans*-zeatin, cZ = *cis*-zeatin, DHZ = dihydrozeatin, iP = N6-( $\Delta^2$ -isopenytenyl)adenin.

Vzorek	Celkové CK O-glukosidy			Celkové CK N-glukosidy			Celkové cytokiny		
WT:Col-0	47,31	<b>50,31 ± 4,82</b>		826,96	<b>869,66 ± 108,18</b>		1134,73	<b>1158,19 ± 96,19</b>	
WT:Col-0	46,51	RSD 10%		763,78	RSD 12%		1053,87	RSD 8%	
WT:Col-0	57,10			1018,24			1285,97		
OE:CKX2	109,93	<b>103,69 ± 4,43</b>		923,20	<b>902,40 ± 16,49</b>		1701,05	<b>1645,35 ± 101,18</b>	
OE:CKX2	100,06	RSD 4%		882,87	RSD 2%		1503,35	RSD 6%	
OE:CKX2	101,07	*** / 0,0003		901,12	- / 0,6940		1731,64	** / 0,0078	
KO:CKX2	31,37	<b>31,54 ± 0,69</b>		743,93	<b>659,60 ± 63,17</b>		930,98	<b>824,79 ± 81,60</b>	
KO:CKX2	32,45	RSD 2%		642,95	RSD 10%		810,81	RSD 10%	
KO:CKX2	30,78	** / 0,0055		591,92	- / 0,0767		732,56	* / 0,0202	
KO:CKX3	38,18	<b>31,68 ± 5,00</b>		732,69	<b>711,65 ± 53,70</b>		906,35	<b>950,87 ± 33,01</b>	
KO:CKX3	30,84	RSD 16%		764,32	RSD 8%		985,29	RSD 3%	
KO:CKX3	26,01	* / 0,0192		637,93	- / 0,1380		960,96	* / 0,0449	

Vzorek	Celkové tZ-typy		Celkové cZ-typy		Celkové DHZ-typy		Celkové iP-typy	
WT:Col-0	657,87	<b>638,38 ± 22,16</b>	107,41	<b>125,76 ± 14,25</b>	53,54	<b>64,67 ± 11,24</b>	315,91	<b>331,35 ± 62,04</b>
WT:Col-0	607,38	RSD 3%	127,72	RSD 11%	60,40	RSD 17%	264,28	RSD 19%
WT:Col-0	649,89		142,16		80,06		413,86	
OE:CKX2	777,59	<b>744,53 ± 89,35</b>	399,02	<b>392,79 ± 4,49</b>	186,56	<b>197,10 ± 8,60</b>	337,89	<b>310,93 ± 19,39</b>
OE:CKX2	622,39	RSD 12%	390,73	RSD 1%	197,11	RSD 4%	293,13	RSD 6%
OE:CKX2	833,62	- / 0,1783	388,62	*** / 0,0000	207,63	*** / 0,0002	301,76	- / 0,6798
KO:CKX2	545,36	<b>484,32 ± 47,49</b>	126,67	<b>112,25 ± 11,99</b>	123,16	<b>111,87 ± 8,01</b>	135,78	<b>116,35 ± 14,70</b>
KO:CKX2	478,07	RSD 10%	112,76	RSD 11%	106,96	RSD 7%	113,02	RSD 13%
KO:CKX2	429,54	* / 0,0142	97,31	- / 0,3629	105,47	** / 0,0084	100,24	** / 0,0088
KO:CKX3	567,62	<b>625,56 ± 41,44</b>	97,18	<b>89,74 ± 8,69</b>	114,33	<b>112,31 ± 1,62</b>	127,22	<b>123,26 ± 8,91</b>
KO:CKX3	646,93	RSD 7%	94,47	RSD 10%	112,24	RSD 1%	131,64	RSD 7%
KO:CKX3	662,13	- / 0,7192	77,55	* / 0,0379	110,36	** / 0,0040	110,92	** / 0,0093



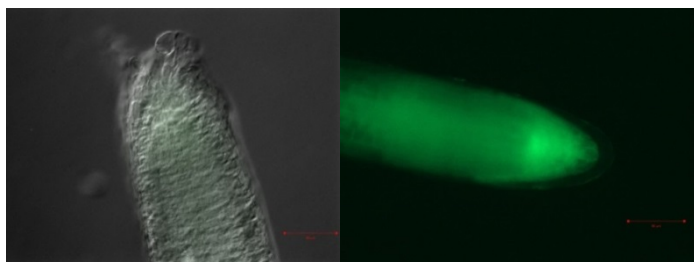
Výsledky ze stanovení složení cytokininů ve vakuolách metodou UHPLC-MS/MS ukazují signifikantně vyšší hodnoty *O*-glukosidů u rostlin s nadprodukcí *CKX2* ve srovnání s WT Col-0 i KO *ckx2\_1* (SALK\_083761) a KO *ckx3\_1* (SALK\_050938). Další rozdíly mezi liniemi jsou patrné v obsahu *cis*-zeatinu a dihydrozeatinu. Obsah obou metabolitů je zvýšen u vakuol linií s nadprodukcí *CKX2*. U této linie byl také naměřen mírně zvýšený obsah N-glukosidů a *trans*-zeatinu (tZ). Hodnoty cytokininů ve vakuolách linií *ckx2\_1* a *ckx3\_1* se výrazně nelišily. Výjimkou byl obsah tZ, který byl mírně zvýšen u linie *ckx3\_1* (SALK\_050938).



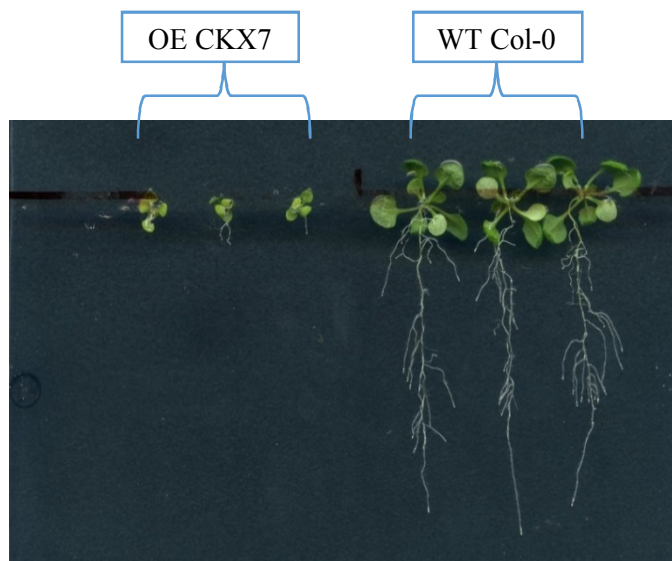
Graf 3: Grafické zobrazení výsledků UHPLC-MS/MS analýzy celkových O-glukosidů, N-glukosidů a celkových cytokininů ve vakuolách linií KO *ckx2\_1* (SALK\_083761), KO *ckx3\_1*, OE *CKX2* a kontroly WT Col-0. Na ose X jsou uvedeny jednotlivé linie, na ose Y je uveden obsah O-glukosidů, N-glukosidů a celkových cytokininů na 100 000 vakuol ve fentomolech.

## 5.5 CKX7-GFP

Před zahájením experimentů bylo nutné ověřit linie s nadprodukcí *CKX7-GFP*, zdali jsou opravdu transgenní. Do rostlin byl vnesen společně s genem *CKX7* také gen pro *GFP*. Protein GFP (green fluorescent protein) je geneticky upravený protein z medúzy (*Aequorea victoria*), a charakterizuje jej zelená fluorescence po vystavení modrému světlu. Prostřednictvím této značky byla analyzována exprese genu *CKX7* v desetidenních rostlinách *A. thaliana*. Zelená fluorescence byla pozorována v kořenových špičkách pod mikroskopem (Obr. 16).



Obr. 16: Mikroskopická analýza kořenové špičky linií OE *CKX7-GFP*. Zelená barva je způsobena fluorescencí proteinu GFP po vystavení modrému světlu.



Obr. 17: Ukázka fenotypu třítydenních rostlin OE *CKX7-GFP* ve srovnání s WT Col-0.

Mikroskopická analýza potvrdila nadprodukcí genu *CKX7* v rostlinách *A. thaliana*, prostřednictvím zelené fluorescence proteinu GFP v kořenových špičkách (Obr. 16). Linie OE *CKX7-GFP* mají velmi výrazný fenotyp, charakterizovaný abnormálně nevyvinutým kořenovým systémem – nebyla proto provedena přesná kvantifikace znaků jako o ostatních použitých liniích (Obr. 17). Z tohoto důvodu byly linie použity pouze pro izolaci vakuol, odvozených z mezofylu.

## 6 Diskuse

Jedním z velmi závažných zemědělských problémů současné doby je degradace půd. Degradací půd rozumíme pokles či úplnou ztrátu půdní úrodnosti. Degradace půd vzniká v důsledku kontaminace půd, úbytku organické půdy, acidifikace, zhutnění půd, salinizace, ztráty biodiverzity apod. Tento problém by mohl být vyřešen posílením kořenového systému rostlin, díky kterému by rostliny měly možnost přijímat minerální látky a vodu i z méně kvalitních zemědělských půd, které v ČR zaujímají přibližně 60%. Diplomová práce byla zaměřena na fenotypizaci rostlin *A. thaliana* nadprodukcujících a umlčujících jednotlivé formy CKX, se zaměřením na kořenovou část. Výsledky ukazují, že nadprodukce a umlčení cytokinin dehydrogenáz má zásadní vliv na délku primárního kořene a množství laterálních kořenů.

### 6.1 Délka primárního kořene

Délka primárního kořene je determinována aktivitou meristému a elongací buněk v zóně prodlužovací. Cytokininy jsou klíčovými regulátory aktivity kořenového meristému. Tvzení dokládá práce Ioio a kol. (2007), kdy bylo zjištěno, že exogenní aplikací cytokininů dochází k redukci kořenového meristému v důsledku snížení počtu meristematických buněk. Cytokininy jsou také negativními regulátory kořenové elongace, což dokládá práce Medforda a kol. (1989), kde bylo prokázáno, že u rostlin *Arabidopsis thaliana* s chimerickým genem pro IPT dochází k 68% snížení rychlosti kořenové elongace. Problematikou se zabýval také Beemster a Baskin (2000), kteří potvrdili negativní vliv exogenně přidaného cytokininu na aktivitu a množství dělicích se buněk kořenového meristému. Výsledky diplomové práce ukázaly, že kořeny třítydenních rostlin, nadprodukcujících *CKX1*, jsou přibližně o jeden centimetr delší než kořeny kontrolních rostlin Col-0. Výsledek koreluje se závěrem Wenera a kol. (2003), kteří zjistili, že elongace kořenů rostlin *A. thaliana*, nadprodukcující *CKX1* pod kontrolou promotoru WRKY6 (zkráceně W6), byla zvýšena až o 50 %. U rostlin OE *CKX1* pod kontrolou konstitutivního promotoru 35S byla elongace zvýšena o 60%. Efekt pozorovaný předkládané diplomové práci byl tedy nižší než v uvedených pracech, což může být vysvětleno rozdílným vývojovým stádiem rostlin. Werner a kol. (2003) se také zabývali celkovou velikostí kořenové soustavy rostlin *A. thaliana* OE *CKX1* v porovnání s kontrolními rostlinami Col-0. Za tímto účelem byly obě linie pěstovány v hydroponii 95 dnů. Zjistilo se, že u rostlin OE *CKX1* bylo množství kořenové hmoty o 40% větší. Větší

kořenový systém byl pozorován také u *ahk2* a *ahk3* mutantů, což souhlasí s uvedenými výsledky (Riefler a kol., 2006). Předmětem zájmu Ioio a kol. (2007) bylo zjistit příčinu většího kořenového systému u rostlin se sníženou koncentrací cytokininů v důsledku nadprodukce *CKX1* pod kontrolou promotoru *ROOT CLAVATA HOMOLOG 2* (*RCH2*). Bylo zjištěno, že příčina tkví ve vyšším množství buněk kořenového meristému, které je způsobeno úbytkem cytokininů v transienční zóně.

Werner a kol. (2003) se dále zabývali tím, zda větší kořenový systém bude představovat benefit pro rostliny z hlediska efektivnějšího příjmu vody. Za tímto účelem nadprodukcující *CKX1* tabakové linie byly po dobu 26 dní vystaveny nedostatku vody společně s kontrolními rostlinami Col-0. Bylo zjištěno, že 42% *CKX1* rostlin dané podmínky přežilo, a po dodání vody začalo opět růst, zatímco u kontrolních rostlin přežilo pouze 25% stresovaných rostlin. Mohutnější kořenový systém také umožňuje rostlinám čerpat více minerálních látek na odlišných typech půd, včetně půd s nedostatkem dusíku, či s nadbytkem kadmia. Koncentrace elementárních prvků, zahrnující zinek, síru a mangan, měřená u listů rostlin tabáku s nadprodukcí *CKX1* a *A. thaliana* s nadprodukcí *CKX3* byla signifikantně vyšší než koncentrace, naměřená u kontrolních rostlin Col-0 (Werner a kol., 2010). Rostliny *CKX1* měly také více chlorofylu na půdách s nedostatkem magnesia. Výsledek se shoduje s prací Rieflera a kol. (2006), která ukazuje snížené množství chlorofylu u rostlin s T-DNA inzercí v genech pro cytokininové receptory. Linie nadprodukcující *CKX1* pod kontrolou promotorů 35S a *WRKY6* jsou odolnější vůči nedostatku vody v souvislosti s poklesem vodního potenciálu a osmotického potencionálu v listech (Macková a kol., 2013).

## 6.2 Laterální kořeny

Růst laterálních kořenů je antagonisticky regulován činností cytokininu a auxinu. Cytokinininy jsou negativními regulátory vývoje laterálních kořenů zejména tím, že inhibují buněčné dělení v kořenovém pericyklu, které je místem vzniku laterálních kořenů (Muraro a kol., 2011), (Wightman a kol., 1980). Experiment, zaměřený na vliv zeatinu a kinetinu na vývoj laterálních kořenů rýže seté (*Oryza sativa*) ukázal, že cytokinininy inhibují tvorbu laterálních kořenů, a zároveň významně stimulují jejich elongaci (Debi a kol., 2005). Výsledky diplomové práce souhlasí s výše uvedenými závěry. Zvýšená degradace cytokininů vlivem nadprodukce *CKX1* se projevila zvýšenou tvorbou laterálních kořenů. Průměrný počet laterálních kořenů třítydenních rostlin *A. thaliana* *CKX1* byl 6,25, zatímco u rostlin Col-0 pouze 4,43. Opačná situace nastala

v případě umlčených linií *A. thaliana ckk2* a *ckk3*, kde dochází k nárůstu koncentrace endogenních cytokininů. Třítýdenní rostliny Col-0 měly v průměru o jeden laterální kořen více v porovnání s liniemi *ckk2* i *ckk3*. Vlivem cytokininů na laterální kořeny se také podrobně zabýval Laplaze a kol. (2007). Bylo zjištěno, že hustota laterálních kořenů (LR) desetidenních rostlin *A. thaliana*, pěstovaných na médiu s  $10^{-7}$   $\mu\text{M}$  kinetinu, dosahuje 0,1 LR/cm v porovnání s 0,5 LR/cm u rostlin, pěstovaných na médiu bez exogenně dodaného cytokininu. Práce Wenera a kol. (2003), zaměřená na kvantifikaci laterálních kořenů ukazuje, že množství LR u *AtCKX1* a *AtCKX3* je 7 x větší ve srovnání s rostlinami kontrolními. Větší množství laterálních kořenů vykazovaly také *ahk2* a *ahk3* mutantní linie, což souhlasí s výsledky obou experimentů (Riefler a kol., 2006).

### 6.3 GSA

Kořenové větvení je kritické pro efektivní příjem minerálních látek a vody. Úhly mezi laterálním a primárním kořenem jsou v odborné literatuře označovány také jako „gravitropic set-point angle“ (GSA). GSA je velmi dynamický a v průběhu vývoje rostliny se mění v závislosti na světle (Digby a Firn, 2002), teplotě či nutričních podmínkách. Laterální kořeny *A. thaliana* jsou vertikálněji orientované v případě nižší koncentrace fosfátu (Bai a kol., 2012) a v případě nedostatku nitrátu jsou naopak orientované horizontálněji. Na orientaci kořenů mají vliv také hormony. Bylo zjištěno, že při nízké hladině auxinů v médiu je orientace kořenů *A. thaliana* spíše vertikálnější, zatímco u fazole převažuje orientace horizontální. Diplomová práce byla zaměřena na studium úhlů rostlin OE *CKX1*, v umlčených liniích *ckk2* a *ckk3* a u kontrolních rostlin Col-0. Úhly kontrolních rostlin se nejčastěji pohybovaly v rozmezí 71 – 90°C. Ve srovnání s ostatními liniemi bylo velké množství úhlů naměřeno také v rozmezí od 90 – 111°. Úhly rostlin *CKX1* byly vertikálněji orientované s největším množstvím úhlů v rozmezí 51 – 70°. Rostliny s umlčenými formami CKX jsou ve srovnání s rostlinami kontrolními orientované vertikálněji.

Bylo zjištěno, že GSA je regulován tokem auxinů (Roychoudhry a kol., 2017). Vzhledem k antagonistickému působení auxinu a cytokininů je pravděpodobné, že u CK deficientních rostlin došlo k narušení poměru auxinů a cytokininů, což přímo vedlo k auxinem-ovlivněné změně orientace úhlů vertikálním směrem. Výsledky jiných experimentů, zaměřených na měření GSA, ukazují, že kořeny rostlin jsou orientovány vertikálněji za zvýšené teploty, po vystavení UV záření, za sníženého obsahu fosfátu či zvýšené koncentrace soli. Mechanismus a účel GSA dosud není zcela objasněn, a je

předmětem výzkumů. Vzhledem k výsledkům však nelze vyloučit souvislost mezi vertikální orientací kořenů a působením stresových faktorů na rostlinu.

#### 6.4 Stanovení cytokininů ve vakuole

Glukosylace je významným mechanismem, který se podílí na homeostázi cytokininů, která musí být striktně regulována. Glukosylace může probíhat na atomu dusíku či kyslíku molekuly purinu za vzniku příslušných konjugátů, lišících se biologickou aktivitou. Enzymem, za jehož přítomnosti glukosylace probíhá, je *O*-glukosyltransferáza (UGT). U modelové rostliny *A. thaliana* byly popsány tři izoformy enzymu: UGT85A1, UGT73C5, UGT73C, jejichž společným substrátem je DHZ a zeatin v obou konfiguracích (Hou a kol., 2004). Vlastností *O*-glukosylovaných derivátů je rezistence vůči izoformám enzymu CKX. Tyto formy mohou být v případě potřeby konvertovány zpět do biologicky aktivních forem prostřednictvím enzymu  $\beta$ -glukosidázy (Brzobohatý a kol., 1993). Bylo zjištěno, že zeatin-*O*-glukosidy (ZOG) jsou spolu s inaktivními konjugáty uskladněny ve vakuolách. Důkazem je práce Kirana a kol. (2012), kteří získali transgenní tabák (*Nicotiana tabacum*) s nadprodukcí genu pro  $\beta$ -glukosidázu, lokalizovanou uvnitř vakuol. Na základě kvantifikace cytokininů v transgenních zrnech, pěstovaných na médiu obohaceného o zeatin, byl stanoven velmi nízký obsah zeatin-*O*-glykosidů, čímž byla prokázána jeho lokalizace uvnitř vakuol.

Cílem diplomové práce bylo lépe pochopit roli cytokininů ve vakuolách. Za tímto účelem byly vakuoly izolovány z listů nadprodukcujících linií *Arabidopsis thaliana* OE *CKX1*, OE *CKX2*, OE *CKX3* a OE *CKX7*-GFP a z umlčených linií *ckx2\_1* (SALK\_083761) a *ckx3\_1* (SALK\_050938) a z kontrolních rostlin Col-0. Dostatečné množství vakuol, vhodné pro stanovení LC-MS/MS se do současné doby podařilo získat z linií OE *CKX2*, *ckx2\_1* (SALK\_083761) a *ckx3\_1* (SALK\_050938), Col-0. Zajímavých výsledků bylo dosaženo při stanovování obsahu *O*-glukosidů. U vakuol linií *CKX2* byl naměřen vyšší obsah *O*-glukosidů ve srovnání s vakuolami ostatních linií. Výsledky lze logicky interpretovat tím, že v případě zvýšené degradace cytokininů je homeostáza udržena prostřednictvím nadprodukce forem, které jsou rezistentní vůči CKX. Naopak u umlčených linií *ckx2\_1* a *ckx3\_1* jsme pozorovali nejnižší hladinu vakuolárních *O*-glukosidů, která byla ještě nižší než v případě kontrolních rostlin Col-0. Na základě výsledků se pool cytokininů ve vakuole zdá být významných pro udržování fyziologické hladiny cytokininů.

*N*-glukosidy jsou formy, které v rostlině převažují v případě vysoké koncentrace cytokininů. *N7* a *N9* glykosidy jsou charakteristické nízkou aktivitou a rezistencí vůči glukosidázám, čímž se odlišují od *O*-glukosidů. Konjugáty *N*-glukosidů se hromadí ve starších pletivech. *N*-glukosylace tak vede k ireverzibilní inaktivaci cytokininů. Předpokládá se tedy, že plní funkci detoxikační v případě, že se koncentrace cytokininů zvýší (Letham a Palni, 1983). Výsledky z LC-MS/MS analýzy ukázaly, že nejvyšší obsah *N*-glukosidů je ve vakuolách linií OE *CKX2*, v kterých byl zároveň stanoven nejvyšší obsah celkových cytokininů. Nejmenší koncentrace byla naopak naměřena u T-DNA inzerčních linií *ckx2\_1* a *ckx3\_1* s nejmenším obsahem celkových cytokininů. Rozdíly mezi WT kontrolou a OE jsou zanedbatelné, a KO nejsou rovněž nijak významně sníženy, celková hladina *N*-glukosidů se tedy ve vakuolách příliš nemění.

Pozoruhodnou skutečností je, že největší obsah celkových vakuolárních cytokininů byl naměřen ve vakuolách linií OE *CKX2*, zatímco u linií *ckx2\_1* a *ckx3\_1*, kde bylo očekáváno největší množství cytokininů, byl obsah nejmenší ze všech stanovovaných vakuol. Werner a kol. (2010) ukázali, že konstitutivní nadprodukce jednotlivých enzymů CKX vedla ke 30 – 70% snížení celkového množství cytokininů, včetně forem, které nebyly substráty nadprodukovaného enzymu. Jednalo se ovšem o celkový pool cytokininů v celé rostlině – tzn v buňce i mimo buňku. Námi získané výsledky jsou zatím specificky získány pouze z vakuol. Naše výsledky tedy naznačují, že v případě nadprodukce *CKX2* izoformy dochází pravděpodobně ke zvýšenému transportu cytokininů do vakuol (zvláště *O*-glukosidů a CKX rezistentních forem), kde jsou tyto formy uskladněny. V případě umlčených linií jsou naopak cytokininy z vakuol zvýšeně odčerpávány.

Další stanovovanou formou cytokininů byl dihydrozeatin (DHZ), který je ve formě dihydrozeatin-*O*-glukosidu (DHZ7G) skladován ve vakuolách. To dokládá experiment Fusselera a Zieglera (1988), kteří naměřili zvýšený obsah dihydrozeatin-*O*-glukosidu (DHZOG) ve vakuolách suspenzní kultury merlíku červeného (*Chenopodium rubrum*) po přidání radioaktivně značeného DHZ do média. DHZ vzniká přeměnou tZ za účasti enzymu zeatin reduktázy. Nasycené cytokininy s *N6* postranním řetězcem, mezi které náleží i DHZ, jsou charakteristické vysokou biologickou aktivitou a rezistencí vůči CKX (Martin a kol., 1989). Zvýšená koncentrace DHZ v rostlinách s nadprodukcí *CKX2* zřejmě souvisí se snahou rostlin o udržení biologické aktivity cytokininů prostřednictvím



zvýšení koncentrace *CKX* rezistentních forem. Hypotéza je také v souladu s nízkými hladinami DHZ ve vakuolách linií s umlčenými *CKX*.

*Trans*-zeatin a isoprenoidní cytokininy jsou charakteristické vysokou biologickou aktivitou, proto jsou důležitými regulátory cytokininové homeostázy. Nacházejí se především intracelulárně. Vysoké koncentrace tZ i iP, získané z měření cytokininů ve vakuolách linií OE *CKX2*, odpovídají výsledkům práce Jiskrové a kol. (2016), v níž byla stanovena čtyřnásobně vyšší koncentrace vakuolárních cytokininů v liniích OE *CKX1* ve srovnání s WT. Vysoká koncentrace tZ u linií nadprodukcujících *CKX*, zřejmě souvisí s nízkou afinitou tZ k těmto enzymům. Tento fakt potvrzuje také experiment Motyky a kol. (2012), kde byla posílena aktivita *CKX* endogenním přidáním cytokininů do média s buněčnou kulturou, z níž bylo následně stanoveno celkové složení cytokininů. Výsledky ukázaly zvýšenou koncentraci tZ, ale také formy DHZ, charakteristické již zmiňovanou rezistencí vůči *CKX*.

## 7 Závěr

Byla provedena kořenová fenotypizace rostlin *A. thaliana* s nadprodukcí genů *CKX1* a *CKX2*, v umlčených liniích *ckx2\_1* (SALK\_083761) a *ckx3\_1* (SALK\_050938) a u rostlin Col-0. Fenotypizace byla zaměřena na délku primárních kořenů, počet laterálních kořenů a úhly mezi primárními a hlavními kořeny (GSA). Ze stanovovaných linií byla hodnota průměrné velikosti primárního kořene a počtu laterálních kořenů největší u linie OE *CKX2*, a tato izoforma CKX tak představuje vhodného kandidáta pro další charakterizaci a genové manipulace.

Dílním cílem diplomové práce byla analýza GSA u linií *ckx2\_1* (SALK\_083761), *ckx3\_1* (SALK\_050938), OE *CKX1* a Col-0. Výsledky ukázaly, že sklon laterálních kořenů linií OE *CKX1* je výrazně vertikální ve srovnání s ostatními liniemi.

V rámci praktické části byla dále provedena izolace vakuol a stanovení jejich cytokininového obsahu z linií OE *CKX2*, *ckx2\_1* (SALK\_083761), *ckx3\_1* (SALK\_050938) a Col-0. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší množství celkových cytokininů, zejména O-glukosidů, N-glukosidů, DHZ, *trans* a *cis* zeatinu, obsahují vakuoly linie OE *CKX2*. Za účelem objasnění role cytokininů va vakulách pokračuje měření koncentrace cytokininů v dalších nadprodukujících a mutantních liniích, ve vakuolách i v celých buňkách.

## 8 Seznam zkratek

- A. tumefaciens* – *Agrobacterium tumefaciens*  
AMP, ATP, ADP – adenosin-5-(mono, di, tri)fosfát  
ARR – arabidopsis response regulator  
ATABCG14 – ATP – binding cassette transporter in *Arabidopsis*  
CE – kolizní energie  
CK – cytokininy  
CKX – cytokinin dehydrogenáza  
Col – columbia (ekotyp)  
CV – napětí na vstupním kuželu  
CYP – cytochrom P450  
*cZ* – *cis*-zeatin  
DHZ – dihydrozeatin  
DNA – deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina  
*E. Coli* – *Escherichia Coli*  
EI – elektronová ionizace  
ER – endoplazmatické retikulum  
ESI – ionizace elektrosprejem  
Fw – primer ve směru 3' → 5' (forward)  
GFP – green fluorescein protein  
HK – histidinkizáza  
iP – isopentenyladenin  
iPMP – isopentenyladeosin-5-monofosfát  
IPT – isopentenyltransferázy  
KMDs – kiss me deadly  
KNOX – knottle like protein  
KO – knock-out line  
LOD – limit detekce  
LOG – lonely guy  
OE – overexpressing line  
PCR – polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce  
PUP – purinové permeázy  
rpm – otáčky za minutu (rotation per minute)  
SAM – shoot apical meristem

RAM – root apical meristem  
RCH2 – root clavata homolog2  
*iZ* – *trans*-zeatin  
UV – ultrafialové záření  
ZOG – *o*-glukosidy zeatinu

## 9 Seznam použité literatury

1. Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gordon M. P.: T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 81, 5994-5997, 1984.
2. Aoyama T., Oka A.: Cytokinin signal transduction in plant cells. *Journal of Plant Research*, vol. 116, 221-231, 2003.
3. Bai H., Murali B., Barber K., Wolverton Ch.: Low Phosphate Alters Lateral Root Setpoint Angle and Gravitropism. *American journal of Botany*, vol. 100, 175-182, 2012.
4. Bartrina I., Otto E., Strnad M., Werner T., Schmulling T.: Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and Thus Seed Yield in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, Vol. 23, 69-80, 2011.
5. Benková E., Witters E., Dongen W. V., Kolář J., Motyka V., Brzobohatý B., Onckelen H. A., Macháčková I.: Cytokinins in Tobacco and Wheat Chloroplasts. Occurrence and Changes Due to Light/Dark Treatment. *Plant Physiology*, vol. 121, 245-251, 1999.
6. Binns A.: Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Plant molecular biology*, vol. 45, 5, 2003.
7. Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K.: Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, vol. 262, 1051-1054, 1993.
8. Burkle, L., Cedzich, A., Dopke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kuhn, C., a Frommer, W. B.: Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant journal*, vol. 34, 13-26, 2003.
9. Caesar K., Thamm A. M. K., Witthoft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen Ch., Horák J., Harter K.: Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, vol. 62, 5571-5580, 2011.
10. Corbesier L., Prinsen E., Jacquard A., Lejeune P, Onckelen H. V., Périlleux C., Bernier G.: Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical

- meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany*, vol. 54, 2511-2517, 2003.
11. Cortleven A., Schmülling T.: Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *Journal of experimental botany*, 2-15, 2015.
  12. Debi B. R., Taketa S., Ichii M.: Cytokinin inhibits lateral root initiation but stimulates lateral root elongation in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology*, vol. 162, 507-515, 2005.
  13. Digby J., Firn R. D.: Light modulation of the gravitropic set-point angle (GSA). *Journal of experimental botany*, vol. 53, 377-381, 2002
  14. Eckardt N. A.: A New Classic of Cytokinin Research: Cytokinin-Deficient *Arabidopsis* Plants Provide New Insights into Cytokinin Biology. *Plant cell*, vol. 15, 2489–2492, 2003.
  15. Entsch B., Letham D. S.: Enzymatic glycosylation of the cytokinin, 6-benzylaminopurine. *Plant science letter*, vol. 14, 205-212, 1979.
  16. Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., Heijne G.: Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *J. Molecular Biology*, vol. 300, 1005-1016, 2000.
  17. Friml J, Jones A. R.: Endoplasmic reticulum: the rising compartment in auxin biology. *Plant Physiology*, vol. 154, 458-462, 2010.
  18. Füsseder A., Ziegler P.: Metabolism and compartmentation of dihydrozeatin exogenously supplied to photoautotrophic suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Planta*, vol. 173, 104-109, 1988.
  19. Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P.: Cytokinin oxidase or dehydrogenase?. *Eur. J. Biochem*, vol. 268, 450-461, 2001.
  20. Geldner N., Robatzek S.: Plant receptors go endosomal: a moving view on signal transduction. *Plant Physiology*, vol. 147, 1565-1574, 2008.
  21. Gillisen Bernd Gillissena, Bürklea L., Andréb B., Kühna Ch., Rentscha D., Brandla B., Wolf B.: A New Family of High-Affinity Transporters for Adenine, Cytosine, and Purine Derivatives in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, vol. 12, 291-300, 2000.
  22. Haberer G., Kieber J.: Cytokinins: New Insights into a Classic Phytohormone. *Plant Physiology*, vol. 128, 354, 2002.

23. Haberlandt G.: Zur Physiologie der Zellteilung. Sitzungsberichte der Koniglich Preussischen Akademie der Wissenschaften, Berlin Phys Math Klasse, 318–345, 1913.
24. Hedden P., Thomas S. G.: Plant hormone signaling. Annual plant reviews, vol. 24, 99-100, 2008.
25. Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H.: Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. Journal of Experimental Botany, vol. 59, 75-83, 2008.
26. Hou B., Lim E. K., Higgins G. S., Bowles D. J.: N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem, vol. 46, 47822-47832, 2004.
27. Hutchison C. E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E., Lewis M. W., Maxwell B. B., Perdue T. D., Schaller E., Alonso J. M., Ecker J. R., Kiebera J. J.: The *Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer Proteins Are Redundant Positive Regulators of Cytokinin Signaling. The Plant Cell, Vol. 18, 3073–3087, 2006.
28. Ioio R. D., Scaglia F, Linhares F. S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P., Sabatini S.: Cytokinins Determine *Arabidopsis* Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. Current biology, vol. 17, 678-682, 2007.
29. Jiskrova E., Novák O., Pospíšilová H., Holubová K., Karády M., Galuszka P., Robert S., Frébort I.: Extra- and intracellular distribution of cytokinins in the leaves of monocots and dicots. New biotechnology, vol. 33, 735-741, 2016.
30. Kakimoto T.: Biosynthesis of cytokinins. J Plant Res, vol. 116, 233, 2003.
31. Kamínek M.: Regulátory rostlinného růstu. 69, 1997, ISBN 80-200-0597-8.
32. Kamínek M.: Tracking the Story of Cytokinin Research. J Plant Growth Regulator, vol. 34, 723-739, 2015.
33. Kende H. a Zeevaart J.: The five classical plant hormones. The plant cell, vol. 9, 1201,
34. Kiba T., Takei K., Kojima M., Sakakibara H.: Side-Chain Modification of Cytokinins Controls Shoot Growth in *Arabidopsis*. Developmental cell, vol. 27, 452-461, 2013.
35. Kieber J. J., Schaller E. G.: Cytokinins. The *Arabidopsis* book, 2014.

36. Kim HJ, Chiang Y-H, Kieber JJ, Schaller GE. scfKMD controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, 10028-10033, 2013.
37. Kinel K, Krpeš V.: *Základy fyziologie rostlin*. 136-137, 2006, ISBN 80-239-8375-X.
38. Kiran N. S., Benková E., Reková A., Dubová J., Malbecke J., Palme K., Brzobohaty B.: Retargeting a maize  $\beta$ -glucosidase to the vacuole--evidence from intact plants that zeatin-O-glucoside is stored in the vacuole. *Phytochemistry*, vol. 79, 67-77, 2012.
39. Kolmer I., Novák O., Strnad M., Schmulling T., Werner T.: Overexpression of the cytosolic cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX7) from *Arabidopsis* causes specific changes in root growth and xylem differentiation. *The Plant Journal*, vol. 78, 359-371, 2014.
40. Koornneef M., Meinke D.: The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, vol. 61, 909-921, 2010.
41. Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J.: Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, vol. 445, 652-655, 2006.
42. Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara, H.: Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, vol. 21, 3152-3169, 2009.
43. Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J.: Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, vol. 445, 652-655, 2007.
44. Kyojuka J.: Control of shoot and root meristem function by cytokinin. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 10, 442-446, 2007.
45. Laplaze L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M. B., Offringa R., Graham N., Doumas P., Friml J., Bogusz D., Beeckman T., Bennete M.: Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. *The Plant Cell*, vol. 19, 3889-3900, 2007.
46. Letham D. S., Palni L. M. S.: The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Plant physiology*, vol. 34, 163-197, 1983.



47. Letham D. S.: Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life science*, 8, 569-573, 1963.
48. Macková H., Hronková M., Dobrá J., Turečková V., Novák O., Lubovská Z., Motyka V., Haisel D., Hájek T., Prášil I. T., Gaudinová A., Štorchová H., Ge E., Werner T., Schmülling T., Vanková R.: Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *Journal of Experimental Botany*, vol. 64, 2805-2815, 2013.
49. Marhavý P., Duclercq J., Weller B., Feraru E., Bielach A., Offringa R., Friml J., Schwechheimer C., Murphy A., Benkova E.: Cytokinin Controls Polarity of PIN1-Dependent Auxin Transport during Lateral Root Organogenesis. *Current Biology*, vol. 24, 1031-1037, 2014.
50. Martin R. C., Mok M. C., Shaw G., Mok D. W. S.: An Enzyme Mediating the Conversion of Zeatin to Dihydrozeatin in *Phaseolus* Embryos<sup>1</sup>. *Plant Physiology*, vol. 90, 1630-1635, 1989.
51. Medford J. I., Horgan R., El-Sawi Z., Klee H. J.: Alterations of Endogenous Cytokinins in Transgenic Plants Using a Chimeric Isopentenyl Transferase, *The Plant Cell*, Vol. 1, 403-413, 1989.
52. Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H., Okumura F. S., Strong F. M.: Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 77, 2662-2663, 1955.
53. Mok M. C., Martin R. C., Mok D. W. S.: Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 36, 102-107, 2000.
54. Mok D. W., Mok M. C.: Cytokinin metabolism and action. *Plant Molecular Biology*, vol. 52, 89-118, 2001.
55. Moubayidin L., Perilli S., Ioio D. R., Mambro R. D., Costantino P., Sabatini S.: The Rate of Cell Differentiation Controls the Arabidopsis Root Meristem Growth Phase. *Current Biology*, vol. 20, 1138-1143, 2010.
56. Muraro D., Byrne H., King J., Voß U., Kieber J., Bennett M.: The influence of cytokinin–auxin cross-regulation on cell-fate determination in *Arabidopsis thaliana* root development. *Journal of Theoretical Biology*, vol. 283, 152-167, 2011.

57. Nakai K., Horton P.: PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 24, 34-35, 1999.
58. Nakamura K., Matsuoka K.: Protein Targeting to the Vacuole in Plant Cells. *Plant Physiology*, vol. 101, 1-5, 1993.
59. Notaguchi M., Okamoto S.: Dynamics of long-distance signaling via plant vascular tissues. *Frontiers in Plant Science*, vol. 6, 1-6, 2015.
60. Osugi A., Sakakibara H.: Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance?. *BMC biology*, vol. 13, 2-10, 2015.
61. Procházka S., Krehule J., Macháčová I., Šebánek J.: *Fyziologie rostlin*. 253, 1998.
62. Procházka S., Šebánek J.: *Regulátory rostlinného růstu*. 63 – 76, 1997, ISBN: 80-200-0597-8.
63. Punwani J. A., Hutchison C. E., Schaller G. E., Kieber J. J.: The subcellular distribution of the Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *The plant journal*, vol. 62, 473-482, 2010.
64. Řepková J.: Huseníček rolní a současný výzkum rostlinného genomu. *Živa*, vol. 1, 5-7, 2007.
65. Samuelson M. E., Eliasson L., Larsson C. M.: Nitrate regulation of zeatin riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. *Plant Science*, vol. 93, 77-84, 1993.
66. Skoog F.: Plant grown substances. *Science*, 114, 263-285, 1951.
67. Skoog F., Miller C. O.: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, vol. 11, 118-130, 1957.
68. Santner A., Calderon-Villalobos L., Estelle M.: Plant hormones are versatile chemical regulators of plants growth. *Nature chemical biology*, vol. 5, 304, 2009.
69. Pačes V., Werstiuk E., Hall R. H.: Conversion of N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -Isopentenyl)adenosine to Adenosine by Enzyme Activity in Tobacco Tissue. *Plant Physiology*, vol. 48, 775-778, 1971.
70. Redig P., Shaul O., Inze D., Montagu M., Onckelen H.: Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters*, vol. 391, 175-180, 1996.

71. Robert S., Zouhar J., Carter C., Raikhe N.: Isolation of intact vacuoles from *Arabidopsis* rosette leaf-derived protoplasts. *Nature protocols*, vol. 2, 259-262, 2007.
72. Rosso M. G., Li Y., Strizhov N., Reiss B., Dekker K., Weisshaar B.: An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology*, vol. 53, 247-259, 2003.
73. Roychoudhry S., Bianco M., Kieffer M., Kepinski S.: Auxin controls gravitropic setpoint angle in higher plant lateral branches. *Current Biology*, vol. 15, 1497-1504, 2013.
74. Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Manns I. B.: Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J Plant Res*, 116, 241–252, 2003.
75. Snusnad P. D., Simmons M. J.: genetika. 2009. ISBN: 978-80-210-4852-2.
76. Srivastava L. M.: *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. 199-201, 2002.
77. Takei K., Yamaya T., Sakakibara H.: *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, 41866–41872, 2004.
78. The *Arabidopsis* Genome Initiative. *Nature*, vol. 408, 796-815, 2000.
79. Ubeda-Tomas S., Bennett M. J.: *Plant Development: Size Matters, and It's All Down to Hormones*. *Current Biology*, vol. 20, 511-513, 2010.
80. Ubeda-Tomás S., Swarup R., Coates J., Swarup K., Laplaze L., Beemster G. T. S., Hedden P., Bhalerao R., Bennet M. J.: Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature Cell Biology*, vol. 10, 625-628, 2008.
81. Werner T., Nehnevajova E., Kollmer I., Novák O., Strnad M., Kramer U., Schmulling T.: Root-Specific Reduction of Cytokinin Causes Enhanced Root Growth, Drought Tolerance, and Leaf Mineral Enrichment in *Arabidopsis* and Tobacco. *The Plant Cell*, 1-16, 2010.
82. Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Onckelen H., Schmülling T.: Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alternation. *The Plant Cell*, vol. 15, 2532-2550, 2003.

83. Whitty C. D., Hall R. H.: A cytokinin oxidase in *Zea mays*. Canadian Journal of Biochemistry. vol. 52, 787-799, 1974.
84. Wightman F., Schneider E. A., Thimann K. V.: Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots. II. Effects of exogenous growth factors on lateral root formation in pea roots. Physiologia Plantarum, vol. 49, 304-314, 1980.
85. Wulfetange K., Lomin S. N., Romanov G. A., Stolz A., Heyl A., Schmulling T.: The Cytokinin Receptors of Arabidopsis Are Located Mainly to the Endoplasmic Reticulum. Plant Physiology, vol. 156, 1808-1818, 2011.
86. Yamada H., Koizumi N., Nakamichi N., Kiba T., Yamashino T., Mizuno T.: Rapid response of *Arabidopsis* T87 cultured cells to cytokinin through His-to-Asp phosphorelay signal transduction. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, vol. 68, 1966-1976, 2004.
87. Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q., Wang W.: Hormonal changes in the grains of rice subjected to water stress during grain filling. Plant Physiology, vol. 127, 315-323, 2001.
88. Zalewski W., Galuszka P., Gasparis S., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A.: Silencing of the HvCKX1 gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. Journal of experimental botany, 1-13, 2010.
89. Zhang K., Novák O., Wei Z., Gou M., Zhang X., Yu Y., Yang H., Cai Y., Strnad M., Liu CH.: Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. Nature communications, 1-11, 2014.
90. Zürcher E., Liu J., Donato M., Geisler M., Müller B.: Plant development regulated by cytokinin sinks. The Plant Cell, vol. 353, 1027-1030, 2016.