

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Vplyvy syntetických inhibítorov na homeostázu
rastlinných hormónov**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Dorota Koničková
Študijný program:	B1501 Experimentálná biológia
Študijný obor:	Experimentálna biológia
Forma štúdia:	Prezenčné
Vedúci práce:	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Termín odovzdania práce:	2020

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Dorota Koničková
Názov práce	Vplyvy syntetických inhibítorov na homeostázu rastlinných hormónov
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Laboratoň rústových regulátorů
Vedúci práce	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Rastlinný organizmus, podobne ako živočíšny, obsahuje radu signálnych a metabolických dráh, ktoré mu zaisťujú dostatočný prísun látok potrebných pre svoj rast a vývin, ale aj hormónov, bez ktorých by nebol schopný existencie. Rastliny si vytvorili unikátny spôsob prepravy týchto látok v podobe symplastickej (bunkovej) a apoplastickej (medzibunkovej) cesty. Je dokázané, že v týchto častiach sa zhromažďujú fytohormóny v rôznych koncentráciách, ktoré regulujú metabolické a signálne dráhy. Pochopenie cieleného riadenia fytohormonálnych metabolických dráh – ich zastavenie, spustenie, regulácia – je otázkou dlhodobého výskumu. Cieľom tejto práce bolo izolovať symplast a apoplast z koreňov ale aj nadzemnej časti rastliny a ukázať rozdiel v zastúpení u jedných z hlavných rastlinných hormónov – auxínov a cytokinínov – v ich koncentračných hladinách pomocou metódy kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS-MS). Existuje mnoho výskumov zameraných na metabolické dráhy, reguláciu, rast a vývoj rastlín. Preto ďalším cieľom práce bolo spojenie poznatkov z už dosiahnutých výskumov a rozšírenie o nové výsledky zamerané na špecifické ovplyvňovanie vytypovaných biosyntetických dráh pomocou syntetických inhibítorov. Výsledkami tejto práce sú taktiež auxínové a cytokinínové profily zo syplastu a apoplastu získaných z koreňov a listov a určenie rozdielov v ich distribúcii.</p>
Kľúčové slova	Fytohormóny, homeostáza, symplast, apoplast, bunková suspenzná kultúra, bunkové kompartmenty, LC-MS
Počet strán	64
Počet príloh	4
Jazyk	Slovenský (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Dorota Koničková
Title of thesis	Effects of synthetic inhibitors on plant hormone homeostasis
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>The plant organism, like animals, contains several signaling and metabolic pathways that provide a sufficient supply of substances that are necessary for its growth and development. One of these groups are hormones, without which plants could not exist. Plants have created unique modes of substance transport in the form of symplastic (cellular) and apoplastic (intracellular) pathways. In these parts, plants accumulate phytohormones in different concentration levels, regulating metabolic and signalling pathways. To understand the management of phytohormonal metabolic pathways: 'stop' and 'go' signals and their regulation are a long-term research question. The aim of this work was to isolate symplast and apoplast from roots and shoots and to show the differences in the occurrence of the main phytohormones – auxins and cytokinins – in their concentration levels by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS-MS). There are several studies of metabolic and regulatory pathways combined with an impact on plant growth and development. For this reason, the following aim was to combine knowledge from various scientific researches and add new facts about how synthetic inhibitors specifically affect selected biosynthetic pathways. The results of this work were also auxin and cytokinin profiles from symplast and apoplast isolated from roots and shoots and determination of differences in their distribution.</p>
Keywords	Plant hormones, homeostasis, symplast, apoplast, cell suspension culture, cell compartments LC-MS
Number of pages	64
Number of appendices	4
Language	Slovak (English)

Prehlasujem, že som predloženú diplomovú prácu vypracovala samostatne,
pod vedením doc. Mgr. Ondřeja Nováka, Ph.D. za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci dňa

.....

podpis

POĎAKOVANIE

Chcela by som sa poďakovať svojmu vedúcemu práce doc. Mgr. Ondřejovi Novákovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Vladimírovi Skalickému za odborné vedenie, ochotu, trpezlivosť, ústretovosť a cenné rady pri vypracovávaní tejto práce.

Ďalej by som sa chcela poďakovať pracovníkom Laboratoře růstových regulátorů za pomoc pri práci v laboratóriu a Umeå Plant Science Center vo Švédsku, konkrétne prof. Karin Ljung a Dr. Ioanne Antoniadi za možnosť absolvovania praktickej stáže a ich vedecké poznatky.

Táto diplomová práca bola realizovaná s podporou Internej grantovej agentúry Univerzity Palackého (IGA_PrF_2020_010).

OBSAH

ZOZNAM SKRATIEK.....	8
1 ÚVOD A CIELE PRÁCE	10
2 TEORETICKÁ ČASŤ	11
2.1 Rastlinné hormóny	11
2.1.1 Auxíny.....	11
2.1.1.1 Auxínový signál.....	11
2.1.1.2 Biosyntéza a metabolizmus auxínov.....	13
2.1.1.3 Auxínový transport a distribúcia.....	15
2.1.2 Cytokiníny.....	16
2.1.2.1 Cytokinínový signaling.....	16
2.1.2.2 Biosyntéza a metabolizmus cytokinínov	17
2.1.2.3 Cytokinínový transport	19
2.2 Symplast a apoplast.....	19
2.2.1 Symplastická dráha	19
2.2.2 Apoplastická dráha.....	20
2.2.3 Úloha fytohormónov v apoplaste a symplaste	20
2.3 Syntetické inhibítory	22
2.3.1 Cytokinínové inhibítory	23
2.4 Vizualizácia cytokinínového signalingu	24
3 PRAKTICKÁ ČASŤ.....	27
3.1 Biologický materiál.....	27
3.2 Chemikálie	27
3.3 Pomôcky a prístroje	29
3.4 Metódy a postupy.....	30
3.4.1 Výsev rastlín <i>Arabidopsis</i> na fenotypizáciu	30
3.4.2 Izolácia symplastu a apoplastu (Antoniadi <i>et al.</i> , submitted)	31
3.4.3 Test inhibície rastu primárneho koreňa.....	31
3.4.4 Konfokálna mikroskopia.....	32
3.4.5 Detekcia proteínov	32
3.4.6 Extrakcia a purifikácia pre LC-MS/MS analýzu auxínov a cytokinínov.....	33
3.4.7 UHPLC–MS/MS.....	35
4 VÝSLEDKY	37
4.1 Metóda izolácie symplastu a apoplastu.....	37
4.1.1 Optimalizácia izolácie symplastu a apoplastu	37
4.1.2 Stanovenie čistoty apoplastu.....	40
4.1.3 Izolácia symplastu a apoplastu po zrážaní metanolom	40
4.1.4 Apoplastické a symplastické cytokinínové profily	42
4.2 Efekt syntetických inhibítorov na metabolizmus cytokinínov v koreňoch.....	44
4.2.1 Stanovenie účinnej koncentrácie inhibítorov	44

4.2.2	Štúdium vplyvu inhibítorov na cytokinínový signaling.....	45
4.2.3	Vplyv syntetických inhibítorov na cytokinínové profily	46
4.2.3.1	Rastliny <i>Arabidopsis</i> ošetrované syntetickými inhibítormi.....	46
4.2.3.2	Izolácia symplastu a apoplastu z rastlín ošetrovaných syntetickými inhibítormi	47
5	DISKUSIA	49
6	ZÁVER	53
7	ZOZNAM LITERATÚRY.....	54
8	PRÍLOHY	61
	Príloha A	61
	Príloha B	62
	Príloha C	63
	Príloha D.....	64

ZOZNAM SKRATIEK

1-NAA – kyselina naftyl-1-octová
2,4-D – kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová
4-Cl-IAA – kyselina 4-chlór-indol-3-yloctová
ABA – kyselina abscisová
ABCB – ATP-binding CASSETTE subfamily B glykoproteíny
ABCB/MDR/PGF – MULTIDRUG RESISTANCE/phosphoglycoprotein
ABCG – ATP-väzobné kazetové transportéry
ABP1 – AUXIN BINDING PROTEIN 1
AHKs – ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASEs
AHPs – ARABIDOPSIS HISTIDINE TRANSFERASEs
ARF – AUXIN RESPONSE FACTOR
ARRs – ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS
ASK1 – ARABIDOPSIS SKP1 HOMOLOG1
AtCKX – cytokinín oxidáza/dehydrogenáza u Arabidopsis
Ath-Col-0 – Arabidopsis thaliana ekotyp Columbia-0
Aux – auxín
Aux/IAA – AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID
AUX1/LAX – AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX aminokyselinová permeáza
CK1 – CYTOKININ INDEPENDENT1
CKs – cytokiníny
CKX – cytokinín oxidáza/dehydrogenáza
CUL1 – CULLIN1
cZ – cis-zeatín
DHZ – dihydrozeatín
GFP – green fluorescent protein
GUS – β -glukuronidáza
HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
IAA – kyselina indol-3-yloctová
IAA₁ – N-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-alanín
IAA_{sp} – N-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-asparagová kyselina
IAG_{lu} – N-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-glutamová kyselina
IALeu – N-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-leucín
IAOx- indol-3-ylacetaldoximová
IAPhe – N-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-fenylalanín
IATrp – N-(1H-indol-3-ylacetyl)-L-tryptofán
IAM – indol-3-ylacetamid
IBA – kyselina indol-3-ylmaslová

IBR5 – INDOLE 3-BUTYRIC ACID RESPONSE 5
INCYDE – 2-chloro-6-(3-methoxyfenyl)aminopurín
iP – N6-izopentenyladenín
iPRDP – izopentenyladenozín-5'-difosfát
iP RTP – izopentenyladenozín-5'-trifosfát
IPT – izopentenytransferázy
IPyA – indol-3-ylpyrohroznová kyselina
LC – kvapalinová chromatografia
LC-MS/MS – kvapalinová chromatografia spojená s tandemovou hmotnostnou spektrometriou
LOG – enzým LONELY GUY
MS – hmotnostná spektrometria
MSP – viacstupňová fosforylačná signalizačná kaskáda
NBD – 7-nitrobenzofurán
NPA – kyselina N-1-(naftyl)ftalamová
oxIAA – 2-oxindol-3-yloctová kyselina
oxIAA-Glc – 2-oxoindol-3-acetyl-1-O-β-D-glukóza
PAA – fenyloctová kyselina
PAT – polárny auxínový transport
P-DME – fosfodimetyethanolamín
PIF – PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PILS – PIN LIKES proteíny
PIN – PIN FORMED proteíny
PUP – PURINE PERMEASE
RBX – RING-BOX PROTEIN1
RFP – red fluorescent protein
SAURs – SMALL AUXIN UP RNAs
SCFTIR1/AFB – Skp1-Cullin-F-box
SKP2A – S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A
TIR1/AFB – TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX
TRA – tryptamín
Trp – tryptofán
TSR – targer-site resistance
tZ – trans-zeatín
UGT – UDP-glukottransferáza
UHPLC – ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia
WAT1 – Walls are thin1
YFP – yellow fluorescent protein
YUCCA – flavín monooxygenáza

1 ÚVOD A CIELE PRÁCE

Syntetické inhibítory, známe tiež pod názvom herbicídy, sú látky inhibujúce rast a vývoj rastliny. V poľnohospodárstve sú používané už dlhé roky, no v poslednom čase sa kladie dôraz na ich redukciiu, nakoľko môžu pôsobiť ako zdraviu škodlivé látky. Vzhľadom k tomu sa táto diplomová práca zaoberá účinkami syntetických inhibítorov odvodených od rastlinných hormónov, predovšetkým INCYDE a Roskovitínu. Jedná sa o skupinu látok, ktoré účinkujú ako inhibítory metabolických dráh rastlinných hormónov, pričom ich účinok spočíva v priamom pôsobení na rast a vývoj rastlín, čím sme schopní znížiť riziko doteraz používaných herbicídnych látok.

Je dokázané, že rastlina má iné rozloženie fytohormónov v bunkovom (symplastickom) priestore, než v medzibunkovom (apoplastickom) priestore. Na základe tohto poznatku bol navrhnutý postup izolácii týchto frakcii, ktorý však musel byť optimalizovaný radou postupných krokov.

Táto diplomová práca sa snaží objasniť postupy izolácii bunkových a medzibunkových priestorov, prepojenie biosyntetických dráh fytohormónov, ich inhibíciu a vizualizáciu po účinkoch spomínaných syntetických inhibítorov a taktiež cieľi na dynamické zmeny homeostázy hormónov v rastlinnom modeli *Arabidopsis thaliana*.

Ciele práce:

Cieľom práce bolo štúdium vplyvu inhibítorov biosyntetických a metabolických dráh fytohormónov na dynamické zmeny homeostázy hormónov v rastlinnom modeli *Arabidopsis thaliana*; zoznámenie sa s technikami izolácie symplastu a apoplastu; metabolické profilovanie rastlinných hormónov z ošetrovaných rastlín metódou kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS).

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Rastlinné hormóny

Rastlinné hormóny, odborne fytohormóny, sú prirodzene sa vyskytujúcou skupinou organických látok o nízkych koncentráciách naväzujúcich sa na receptor, ktoré ovplyvňujú fyziologické procesy v rastline. Fytohormóny sú teda substancie, ktoré sú prenášané rastlinným organizmom z jedného miesta na druhé, preto sú hlavným prostriedkom, ktorý v rastline kontroluje fyziologické odpovede, transport a syntézu látok (Davies, 2010).

2.1.1 Auxíny

Auxíny sú jedny z prvých objavených rastlinných hormónov. Nízka molekulová hmotnosť, ktorou auxíny disponujú, im umožňuje zapojenie sa do rôznych procesov ovplyvňujúcich napríklad rast, metabolizmus, embryogenézu, bunkové predlžovanie a iné (Sauer *et al.*, 2013). Medzi hlavných zástupcov endogénne sa vyskytujúcich auxínov zaraďujeme kyselinu indol-3-ylactovú (IAA), kyselinu indol-3-ylmaslovú (IBA), 4-chlórindol-3-ylactovú kyselinu (4-Cl-IAA) a fenylactovú kyselinu (PAA) (Sauer *et al.*, 2013). Keďže vo svojej štruktúre obsahujú indolový aromatický kruh a karboxylovú skupinu, preto ich zaraďujeme medzi organické kyseliny. Karboxylová skupina je protonizovaná na nízke pH, čím znižuje polaritu molekuly ($\text{IAA}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{IAA-H}$). V tejto protonizovanej forme môže difúziou ľahko prenikať cez bunkové membrány (Ljung, 2013).

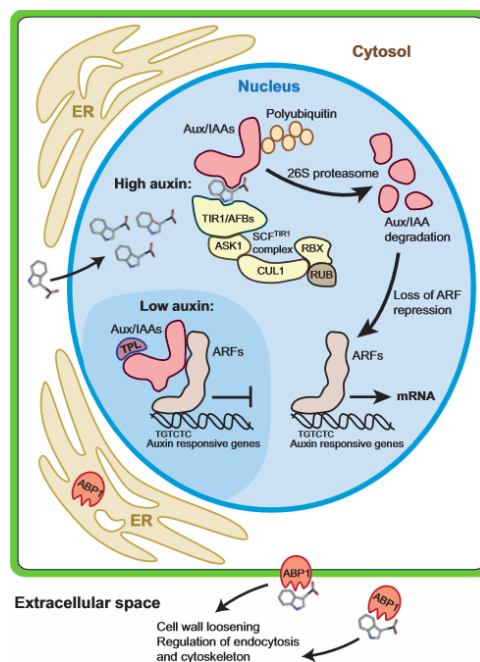
2.1.1.1 Auxínový signál

Auxínová signalizácia reguluje bunkovú odpoveď na rôzne podnety, ktoré sú vytvárané kombináciou auxínového metabolizmu a transportu. Auxín môže modulovať transkripčnú reguláciu, no takisto transkripčne nezávislú odpoveď (Frydrieh, 2018). Pre pochopenie auxínovej signalizácie bol kľúčový objav receptorovej dráhy TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE-AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN (TIR1/AFB) (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski a Leyser, 2005) (*Obr. 1*).

TIR1/AFBs radíme do rodiny F-box proteínov, ktoré spolu s ďalšími pridruženými proteínmi (ARABIDOPSIS SKP1 HOMOLOG1 (ASK1), CULLIN1 (CUL1), RING-BOX PROTEIN1 (RBX)) tvoria ubiquitín proteín-ligázový komplex Skp1-Cullin-F-box (SCF^{TIR1/AFB}). TIR1/AFBs viaže IAA, formuje koreceptorový komplex s AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA) represorovými proteínmi, ktoré negatívne regulujú auxínovú

signalizáciu. Pri nízkych hladinách IAA, proteíny Aux/IAA s korepresorom TPL môžu viazať AUXIN RESPONSE FACTOR (ARFs), skupinu transkripčných faktorov, ktorá reguluje auxín regulujúce gény (*Obr. 1*). Pri vysokých hladinách IAA zoskupenie koreceptorového komplexu (TIR1/AFB)-IAA-(Aux/IAA) cieľi Aux/IAA proteíny k degradácii cez 26S proteazóm a ARFs sa z tohto dôvodu môžu voľne viazať na gény obsahujúce sekvencie TGTCTC v promótoroch vedúce k aktivácii alebo represii transkripcie (*Obr. 1*). Čím väčšie je číslo Aux/IAA génových odpovedí a ARFs, tým je odpoveď komplexnejšia v závislosti na auxínových hladinách, špecifite a sile TIR1-Aux/IAA a Aux/IAA-ARF interakcií (Ljung, 2013).

Zatiaľ čo signálna TIR1/AFB dráha je už na molekulárnej úrovni vysvetlená (Wang a Estelle, 2014), funkcie ostatných faktorov zohrávajúcich rolu v odpovedi na auxínové stimuly neboli doposiaľ úplne pochopené (Powers a Strader, 2016). Jedná sa napríklad o: (1) F-box proteín S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A (SKP2A), ktorý by mohol prepojiť auxíny s reguláciou bunkového delenia; (2) SMALL AUXIN UP RNAs (SAURs) proteíny, ktoré sú pravdepodobne zapojené v predlžovaní buniek; (3) INDOLE 3-BUTYRIC ACID RESPONSE 5 (IBR5), ktorý defosforyluje mitogénom aktivované proteinkinázy a reguluje tak schopnosť reagovať na auxínové podnety; a (4) AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1).

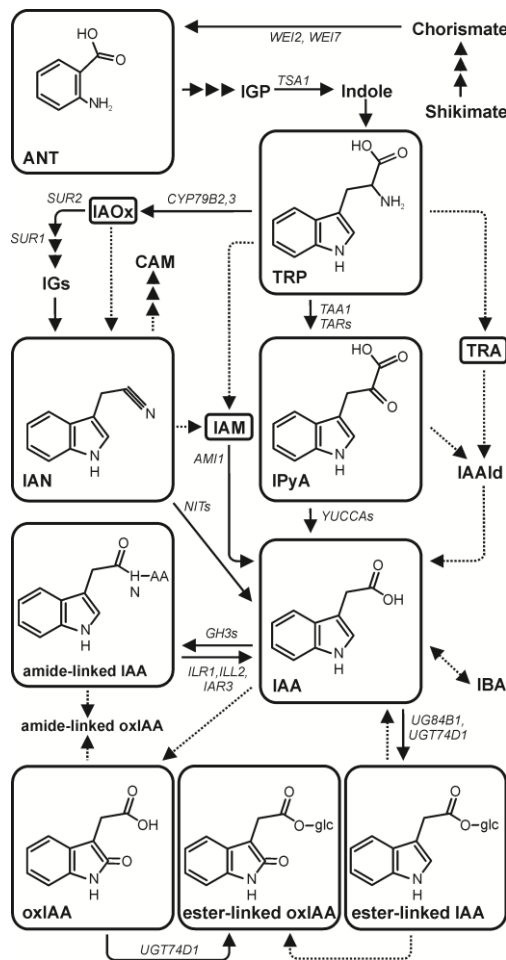


Obr. 1. Hlavné komponenty auxínovej percepcie a signalizácie (prevzaté z Ljung, 2013).

2.1.1.2 Biosyntéza a metabolizmus auxínov

L-Tryptofán (Trp) – dôležitá aminokyselina generovaná šikimátovou dráhou, je hlavným prekursorom pre auxínové biosyntetické dráhy. Biosyntéza IAA (Obr. 2) môže byť uskutočňovaná dvoma dráhami – Trp-závislou dráhou, ktorá zahŕňa indol-3-ylacetaldoximovú (IAox), indol-3-pyrohroznovú kyselinu (IPyA), tryptamínovú (TRA) a indolacetamínovú (IAM) dráhu alebo Trp-nezávislou dráhou. U Trp-nezávislej dráhy sa predpokladá, že pochádza z indolu alebo indol-3-glycerolfosfátu (Korasick *et al.*, 2013; Pěňčík *et al.*, 2018).

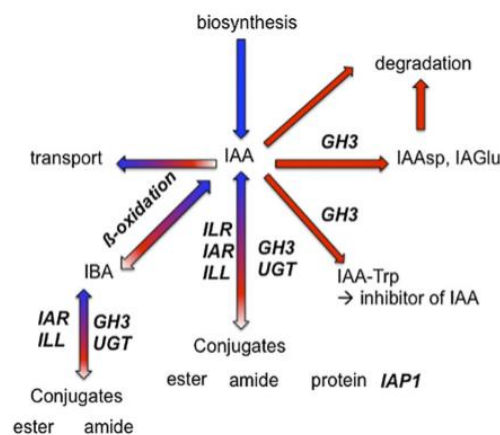
Pre biosyntézu auxínov a taktiež pre vývoj rastlín je dôležité brať do úvahy aj genetický vplyv či už génov alebo celých génových rodín, ktoré môžu aktivovať alebo inaktivovať dráhy dôležité pri biosyntéze a metabolizme. Z rastlín boli izolované gény, ktoré sa podieľajú na premene indol-3-acetamidu (IAM) na IAA, o ktorých sa do nedávna myslelo, že existujú len v bakteriálnom genóme. Táto vyššie popísaná konverzia IAM na IAA je nutná pre správne delenie rastlinných buniek. Nález génu *atami1* u *Arabidopsis*,



Obr. 2. Schéma Trp-závislej dráhy pre biosyntézu IAA (upravené podľa Pěňčík *et al.*, 2018).

ktorý kóduje hydrolázu indol-3-acetamid a proteín o 425 aminoskupinách tak naznačuje existenciu novej cesty biosyntézy v rastlinách (Mano *et al.*, 2010). IPyA a ďalšie popisované biosyntetické dráhy u *Arabidopsis* sú druhovo špecifické. Na IPyA dráhe sa podieľa enzým YUCCA – flavín monooxygenáza (Zhao, 2012). Pri nadprodukcii YUCCA bol zaznamenaný zvýšený nárast auxínov (Zhao, 2012). Genetické a fyziologické analýzy demonštrujú, že YUCCA katalyzuje a zamedzuje opätovnému kroku v Trp-závislej auxínovej biosyntetickej dráhe. U *Arabidopsis* bolo popísaných 11 YUCCA génov, ktoré spôsobujú charakteristické fenotypy nadprodukcie. Inaktivácia samotného *yucca* génu nemá žiaden vplyv na vývojové procesy rastliny, zatiaľ čo vyradenie z funkcie celej génovej rodiny vedie k poruchám embryogenézy, rastu, kvitnutia a tvorbe cievnych vzorov (Zhao, 2012).

Nedávno bolo ukázané, že homeostáza IAA (Obr. 3) je silne regulovaná rozpustnými cukrami (Sairanen *et al.*, 2012), pričom táto regulácia je sprostredkovaná prostredníctvom transkripčného regulátora PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF), ktorý má vplyv na predĺženie hypokotylu počas skorého vývoja semenáčikov (Lilley *et al.*, 2012). V cytoplazme môže byť IAA modulovaná konjugáciou, oxidáciou a zriedka aj metyláciou (Ludwig-Müller, 2011; Zhang, Peer, 2017; Skalický *et al.*, 2018). Po biosyntéze, a často tiež po transporte môžu auxíny podliehať degradácii oxidáciou a následne konjugáciou, čím sa získajú hlavné metabolity 2-oxindol-3-ylactová kyselina (oxIAA) a 2-oxoindol-3-acetyl-1-O- β -D-glukóza (oxIAA-Glc) (Pěňčík *et al.*, 2018). Riadenie voľnej IAA je pravdepodobne spôsobené činnosťami v cytoplazme, syntézou kompartmentov alebo transportom (Skalický *et al.*, 2018). IAA môže byť účinkom UDP-glukózasferázy konvertovaná



Obr. 3. Schéma zásahu auxínových konjugátov do auxínového metabolizmu (prevzaté z Ludwig-Müller, 2011).

na glukosylestery, účinkom aminokyselinových syntetáz na aminokyselinové konjugáty, ktoré buď hydrolyzujú naspäť na voľnú IAA (IAA-leucín, IALeu; IAA-alanín, IAAla; IAA-fenylalanín; IAPhe) alebo sú prekuzormi degradácie (IAA-glutamát, IAGlu; IAA-aspartát, IAAsp). V poslednom prípade môžu byť inhibítormi auxínového pôsobenia (IAA-tryptofán, IATrp) (Ludwig-Müller, 2011).

2.1.1.3 Auxínový transport a distribúcia

Auxíny sprostredkovávajú interakcie medzi bunkami, pletivom a orgánmi buď krátkymi alebo veľmi dlhými interakčnými spojmi. Charakteristickým znakom pre tento transport je jeho polarita. Jej dôležitosť je v priestorovom vývoji rastlinného tela. V dôsledku toho hrá polárny auxínový transport (PAT) kľúčovú úlohu pri iniciácii a udržovaní buniek, no taktiež sleduje axiálnu polarizáciu (Peer, 2011). Priestorová distribúcia auxínu je regulovaná na bunkovej úrovni kontrolou biosyntézy, transportu, reverzibilnej konjugácie, kompartmentalizácie a katabolizmu. Strata niektorého z týchto mechanizmov je často vyvažovaná kompenzačnými homeostatickými reakciami, ktoré však môžu viesť k morfológickým alebo fyziologickým zmenám (Zhang *et al.*, 2016). Transport na dlhé vzdialenosti sa odohráva cez dve fyziologicky priestorovo oddelené dráhy. Prvou je auxín translokovaný tokom s ostatnými metabolitmi do floému. Druhou je následne transportovaný smerom dole ku koreňovým špičkám a z nezrelého tkaniva do vrcholu listu omnoho pomalšie pomocou PAT (Davies, 2010).

Prechod auxínov cez membrány je limitovaná štyrmi rôznymi rodinami transportérov, ktoré zahŕňajú intercelulárny a intracelulárny transport. Prvou skupinou je rodina AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX aminokyselinová permeáza (AUX1/LAX) transportérov, objavená pri izolácii *Aux1* mutanta. Jedná sa o protónové symportéry zodpovedné za prenos auxínu z apoplastu do bunky alebo do endoplazmatického retikula (ER). Druhou je ATP-binding cassette subfamily B (ABCB) zo skupiny membránových proteínov MULTIDRUG RESISTANCE/phosphoglycoprotein (ABCB/MDR/PGP). Je lokalizovaná v plazmatickej membráne a zohráva úlohu pri ATP-riadeného vtoku a výtoku auxínu. Ďalšou je rodina PIN-FORMED (PIN) proteínov, ktorá zohráva úlohu v určovaní auxínového toku v embryonálnom a postembryonálnom vývoji. Poslednou skupinou je proteínová rodina PIN-LIKES (PILS), ktorá reguluje hromadenie auxínov v endoplazmatickom retikule (Ranocha *et al.*, 2013, Skalický *et al.*, 2018). Špecifickým druhom transportéru je exportér

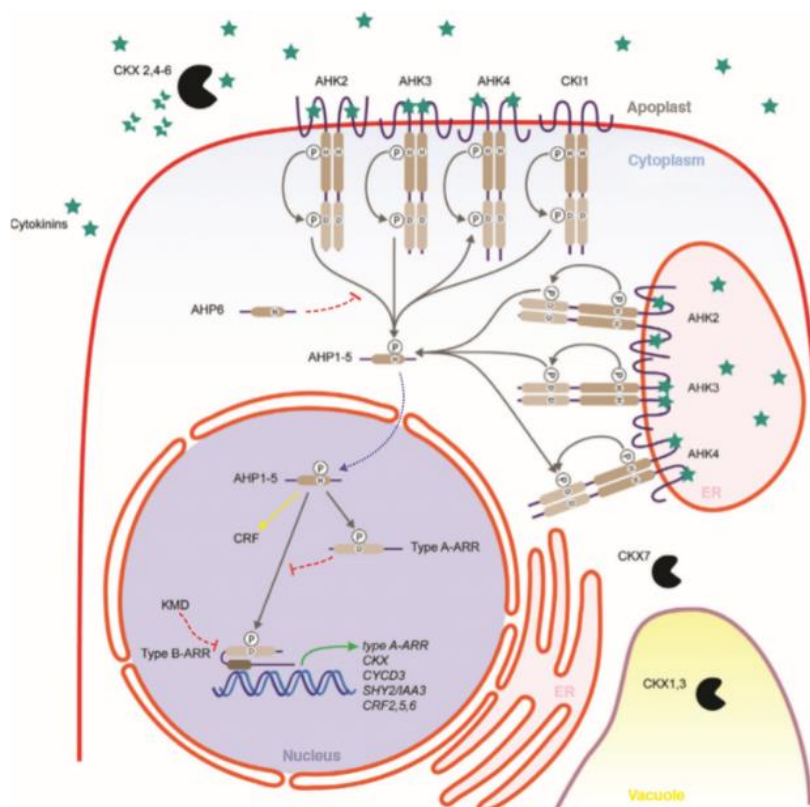
Walls are thin1 (WAT1). Jedná sa o membránový proteín, zaradovaný do rodiny exportérov fosfodimetylethanolamínu (P-DME). Vyskytuje sa všade v rastline, no jeho účinok je spojený predovšetkým s vaskulárnymi tkanivami, a to vrátane xylémových ciev a vlákien pri tvorbe sekundárnej bunkovej steny. Analýza proteínu spojená s fúziou GFP ukázala, že WAT1 je lokalizovaný hlavne do tonoplastu (Ranocha *et al.*, 2010).

2.1.2 Cytokiníny

Cytokiníny sú v dnešnej dobe dobre preskúmanou skupinou rastlinných hormónov. Vo svojej štruktúre majú niekoľko rôznych postranných reťazcov, no hlavnou štruktúrou je adenín modifikovaný v pozícii N^6 (Osugi a Sakakibara, 2015). Prirodzene vyskytujúce sa cytokiníny môžeme rozdeliť podľa vedľajšieho reťazca na izoprenoidné a aromatické. Medzi prirodzene vyskytujúce sa cytokiníny v rastline radíme N^6 -izopentenyladenín (iP), *trans*-zeatín (*tZ*), *cis*-zeatín (*cZ*), dihydrozeatín (DHZ) a topolíny. iP a *tZ* zohrávajú hlavnú rolu v *Arabidopsis* a v mnohých ďalších rastlinných druhoch kvôli svojej vysokej afinite k receptorom. V rastline plnia úlohu vo všetkých vývojových fázach od klíčenia až po senescenciu (Antoniadi, 2014). Koncentrácie cytokinínov sa líšia v závislosti na časti a fáze vývoja rastliny. Najintenzívnejším miestom výskytu sú apikálne meristémy nadzemných častí rastliny a mladé pletivo (Osugi a Sakakibara, 2015).

2.1.2.1 Cytokinínový signaling

Cytokinínová signálna dráha je realizovaná viacstupňovo. Reguluje expresiu génov a taktiež aktivitu proteínov (Davies, 2010). V procese signálnej dráhy (*Obr. 4*) zohrávajú dôležitú úlohu CYTOKININ INDEPENDENT1 (CK1), ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASEs (AHKs), ARABIDOPSIS HISTIDINE TRANSFERASEs (AHPs) a ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARRs). AHKs sú cytokinínové receptory lokalizované transmembránovo. Pozostávajú z troch domén- CHASE, histidín kinázy a prijímača. Cytokiníny sú snímané pomocou transmembránových receptorov AHK, následne sú prenášané cez fosforylovanú skupinu AHP na nukleárne ARR (Zürcher a Müller, 2016). Cytokinín-väzobné testy, fluorescenčné fúzne proteíny a biochemická frakcionácia ukázali, že veľká väčšina cytokinínových receptorov je lokalizovaná v endoplazmatickom retikule, čo naznačuje ústrednú úlohu tohto kompartmentu v cytokinínovej signalizácii (Wulfetange *et al.*, 2011).



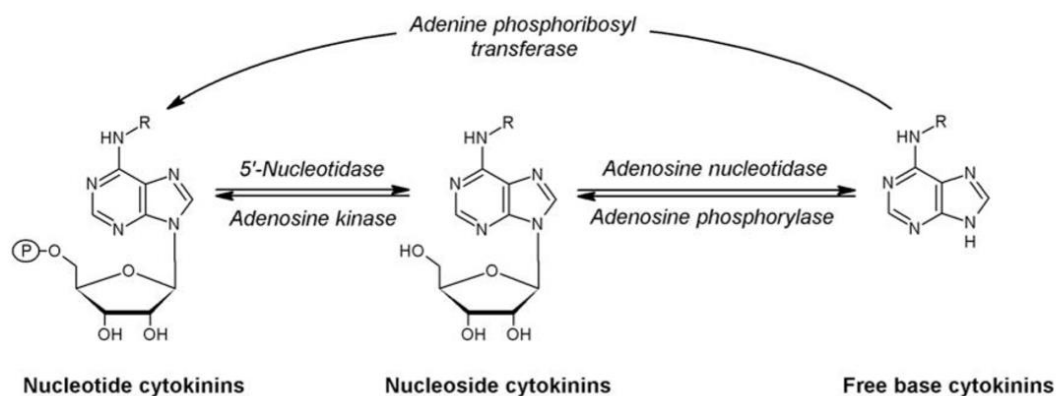
Obr. 4. Schéma cytokinínovej signalizácie (prebrané z Zürcher a Müller, 2016).

2.1.2.2 Biosyntéza a metabolizmus cytokinínov

Všetky prirodzene vyskytujúce sa cytokiníny sa môžu v rastline nachádzať v podobe voľných bází, nukleosidov alebo mono-, di-, tri- nukleotidov (Obr. 5). CK nukleotidy potom môžu pomocou enzýmu „LONELY GUY“ (LOG) fosfohydrolázovať na vysoko aktívne voľné formy (Kurakava *et al.*, 2007). Tieto cytokinínové formy môžu tvoriť reverzibilné alebo ireverzibilné konjugáty s cukrami alebo aminokyselinami (Bajguz a Pietrowska, 2009). Konjugáty môžeme ďalej rozdeliť na konjugáty s adenínovým zvyškom a konjugáty s postranným reťazcom (Bajguz a Pietrowska, 2009).

Kľúčovými enzýmami katalyzujúcimi prvý krok biosyntézy cytokinínov sú izopentenyltransferázy (IPT). IPT sprostredkovávajú konjugáciu izopentenyllovej skupiny adenínribotidu s pozíciou na N^6 za vzniku izopentenyladenozín-5'-di- alebo -trifosfátu (iPRDP alebo iPRTP) (Kakimo, 2001).

Cytokinín oxidáza/dehydrogenáza (CKX) katalyzuje ireverzibilnú degradáciu, a v mnohých rastlinných druhoch je zodpovedná za hlavnú metabolickú inaktiváciu cytokinínov. Enzýmom je flavínadenín-dinukleotid, ktorý selektívne štiepi N^6 postranné



Obr. 5. Schéma možných preskupovaní cytokinínových báz, nukleosidov a nukleotidov (prevzaté z Bajguz a Pietrowska, 2009).

reťazce. Prirodzeným substrátom sú iP a tZ, zahrňujúce aj ich ribozylované formy (Schmülling *et al.*, 2003).

U *Arabidopsis*- AtCKX génová rodina zahrňuje 7 členov, a to AtCKX1-AtCKX7. Zmienené proteíny majú podobnú veľkosť (60 kDA), konzervované väzobné miesto pre kofaktor flavínadenín dinukleotid a malé, vysoko konzervované domény, ktoré zohrávajú hlavnú úlohu pri rozpoznávaní substrátu a prenose elektrónov. Rôzne subcelulárne lokalizácie proteínov AtCKX potom naznačujú jednotlivé N-terminálne signálne peptidy (Werner, 2013). CKX proteíny sa vyskytujú v *Arabidopsis* prevažne vo vakuolách (AtCKX1 a AtCKX3), endoplazmatickom retikule (AtCKX1) alebo v apoplaste (AtCKX2, AtCKX4, AtCKX5 a AtCKX6), s výnimkou AtCKX7, ktorý nedisponuje signálnym peptidom indukujúcim jeho cytozolickú lokalizáciu (Galuszka *et al.*, 2008, Niemann *et al.*, 2018). Klonovanie prvých CKX génov v roku 2001 umožnilo štúdium endogénnych funkcií cytokinínov v rastlinách, vytvorením ich deficiencie prostredníctvom nadprodukcie CKX. Rastliny konštitutívne exprimujúce CKX z promotora 35S, vykazujú znížený obsah cytokinínov, čo vedie k trpasličiemu fenotypu. Ten je charakterizovaný tvorbou pomaly rastúcich zakrpatených stoniek s malými listami, zväčšením koreňového systému, a výraznými zmenami v oblasti hypokotylu (Spíchal, 2012).

Očakáva sa však, že všetky sekretované CKX enzýmy sú posttranskripčne modifikované glykosiláciou (Galuszka *et al.*, 2008). Jedným z takýchto enzýmov je uridíndifosfátglykosyltransferáza (UGT), ktorá tiež reverzibilne deaktivuje molekulu cytokinínu jej konjugáciou s cukrovou skupinou, predovšetkým glukózou v polohe O- alebo N7- a N9-. Spätná aktivácia (deglykosilácia), je katalyzovaná špecifickými

β -glukozidázami na *N7*- a *O*-pozíciách (Zalabák, 2013). U *Arabidopsis* rozoznávame 3 UGT deaktivácie cytokinínov *in vivo* a to UGT76C1, UGT76C2 a UGT85A1. UGT85A1 sa špecificky exprimuje v senescentných listoch, zatiaľ čo UGT76C2 sa aktivuje rýchlo, ako reakcia na exogénne aplikovaný CK (Šmehilová *et al.*, 2016).

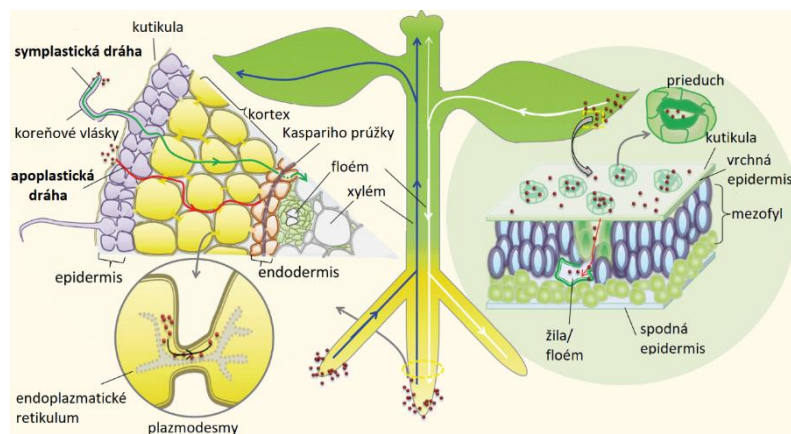
2.1.2.3 Cytokinínový transport

Na konci 20. storočia boli popísané 3 veľké skupiny proteínov zodpovedných za translokačnú aktivitu cytokinínov. Prvým typom sú purínové permeázy (PUP), ktoré sprostredkovávajú vychytávanie CK v plazmatickej membráne. Konkrétnym príkladom je PUP14, ktorý prijíma bioaktívne cytokiníny z apoplastu a inhibuje väzbu cytokinínov na receptory lokalizované v plazmatickej membráne. Druhým typom sú ekvilibračné nukleozidové transportéry (ENT) zodpovedné za vychytávanie adenosínu v plazmatickej membráne a tonoplaste. Posledným je G-podrodina ATP-väzobných kazetových transportérov (ABCG) podieľajúcich sa na prenose CK z koreňov do listov (Skalický *et al.*, 2018).

2.2 Symplast a apoplast

2.2.1 Symplastická dráha

Symplast je vysoko usporiadaný a prepojený priestor v rastlinách tvorený cytoplazmami jednotlivých buniek, ktorý tvorí kompaktnú sieť pozdĺž rastliny ako cez floém, tak prostredníctvom priameho spojenia medzi susediacimi bunkami, ktoré sú obvykle v jenom orgáne (*Obr. 6*). Symplast je na svojom mieste držaný tuhou kostrou – apoplastom (Conoco a Galon, 2011). Tento transport využíva plazmodezmy, špecifické tunelové prepojenia medzi cytoplazmou a bunkami, pričom je regulovaný pomocou syntézy a degradácie kalózy v ústí plazmodesmy (Robert a Friml, 2009). Symplastická konektivita je rozhodujúca pre iniciáciu meristémov laterálnych koreňov. Je regulovaná glukánázami asociovanými s plazmodezmami, v ktorých sa vyskytuje kalóza, ktorá slúži ako simulátor molekulárneho toku. Preto súhrnne možno povedať, že zmeny v symplastickom transporte počas vývoja laterálnych koreňov korelujú so zmenami uloženého vápnika, čo vypovedá o nutnosti prítomnosti tohto iónu pri regulácii symplastického konektivity (Benitez-Alfonzo *et al.*, 2013).



Obr. 6. Schéma popisujúca symplastickú a apoplastickú dráhu v rastline. Upravené podľa (Lv et al., 2019)

2.2.2 Apoplastická dráha

Apoplast, alebo tiež medzibunkový priestor je dôležitou súčasťou rastliny pre rozvádzanie minerálov a živín rozpustených vo vode (Obr. 6). Vo väčšine koreňov je však tento rozvod živín blokovaný kaspriho prúžkami v endodermis (Zhan et al., 2017). Okrem tohto transportu sa apoplast zapája aj pri obrane rastliny voči patogénom, percepcii a transdukcii enviromentálnych signálov (Yu et al., 1999; Witzel et al., 2011). V listovej časti apoplastická tekutina obsahuje organické kyseliny malát, citrát a askorbát. Z anorganických kationov sa v nej vyskytujú prevažne vápenaté, draselné a horečnaté kationy. Zastúpenie tu majú aj anorganické anióny, a to chlóróv, dusičnanový, síranový a hydrogénuhličitanový anión (López-Millán et al., 2001). Proteíny prítomné v apoplaste odrážajú širokú funkčnú rozmanitosť rastlín. Štúdie o dynamickej zmene zloženia apoplastických bielkovín odhaľujú nové poznatky o zásobovaní rastliny živinami pri zranení, nedostatku vody, patogénnej odpovedi a pri zložení xylému. Navzdory ich biologickej významnosti je zabránené skúmaniu apoplastických proteínov vzhľadom k nízkej početnosti v porovnaní s koncentraciami intracelulárnych proteínov (Witzel et al., 2011).

2.2.3 Úloha fytohormónov v apoplaste a symplaste

Fytohormóny zohrávajú dôležitú úlohu ako v apoplaste, tak aj v symplaste. V roku 1971 Achim Hager a Robert Cleland navrhli hypotézu rastu založenú na kyselinách. Táto teória vysvetľuje dynamiku expanzie buniek a orgánov v rastlinách na základe apoplastického posunu pH. Predpokladali, že prirodzene sa vyskytujúci hormón – auxín (konkrétne IAA) indukuje extrakciu protónov do apoplastu pomocou hydrolýzy väzieb a H^+ ióny sa následne uvoľnia do apoplastu ako súčasť faktorov rozvoľňujúcich steny (WLF). Následne toto

apoplektické okyselenie indukuje celý rad enzymatických reakcií, ktoré modifikujú rozťažnosť bunkových stien rastlín (Hager *et al.*, 1971, Cleland, 1971). Signály na transport fytohormónov sú sprostredkované pomocou signalizačných peptidov a proteínov, ako sú transkripčné faktory, mRNA a siRNA, následne pomocou cukrov, rastlinných vírusov, ribonukleoproteínov a nízkomolekulárnych látok. Taktiež využívajú apoplastické, symplastické alebo transcelulárne transportné mechanizmy na pohyb cez tkanivá čím sprostredkovávajú nebunkovú autonómnu signalizáciu (Robert a Friml, 2009).

Niekoľko hormónov, ako sú napríklad auxíny alebo kyselina abscisová (ABA) sú slabými kyselinami, a preto sú čiastočne prítomné v protonovaných formách vo fyziologických podmienkach pH, ktoré sa môžu pomerne ľahko šíriť cez membrány. Preto sa pôvodne predpokladalo, že k transportu auxínu a ABA z apoplastu do buniek dochádza difúziou cez plazmatickú membránu. Dnes už je však potvrdené, že difúzia hrá len čiastočnú úlohu *in vivo* a pre správne dodanie hormónu sú potrebné transportéry (Park *et al.*, 2017). PAT môže integrovať rôzne signály na úrovni jednotlivých transportujúcich buniek a generovať lokálne maximá a gradienty auxínu, ktoré sú nástrojom mnohých fyziologických či vývojových procesov. Tento jedinečný transportný mechanizmus signálnej molekuly do veľkej miery podčiarkuje pozoruhodnú vývojovú plasticitu rastlín, ktorá umožňuje ich rast a schopnosť prispôbiť sa meniacim sa prostrediam (Robert a Friml, 2009).

Reguláciu rastu v apoplaste klasifikujeme do 4 fáz (Sakurai, 1998):

- a) stimulácia rastu degradáciou neceľulózných polysacharidov pôsobením auxínu
- b) stimulácia rastu syntézou polysacharidov bunkovej steny v reakcii na giberelín
- c) priama regulácia celulóзовých mikrofibríl pôsobením giberelínu
- d) zastavenie rastu pomocou vytvárania zosieťovania medzi fenyľpropanoidmy, proteínmi bunkových stien, neceľóznymi polysacharidmi a celulózou.

Najnovšie dôkazy tiež naznačujú, že uzavretie floémovej symplastickéj konektivity modifikuje bazipetálny transport cytokinínu, ktorý ovplyvňuje polárny transport auxínu a vaskulárny vzorec v koreňovom meristéme (Alfonso, 2014). Výskumy z posledných rokov ukazujú, že existuje PUP14, ktorý prijíma z apoplastu bioaktívne cytokiníny znižuje ich dostupnosť a tým sa znižuje taktiež miera signalizácie. To má za následok redukciu pravdepodobnosti väzby cytokinínov na receptory lokalizované v plazmatickej membráne. To naznačuje, že PUP14 je terminátor cytokinínovej transdukcie signálu z apoplastu (Park *et al.*, 2017).

2.3 Syntetické inhibítory

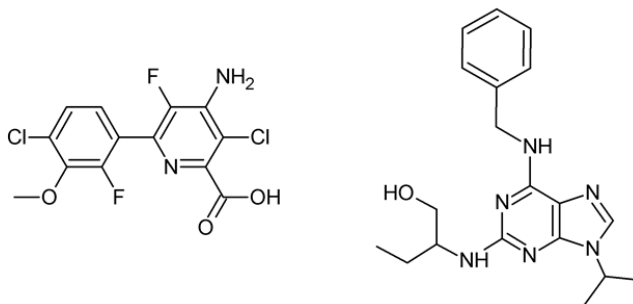
Syntetické inhibítory rastlín, všeobecne známe aj pod názvom herbicídy, sú chemické látky používané najmä v poľnohospodárstve nielen na odstránenie burín, ale aj ako látky, ktoré urýchľujú zrenie či zber plodín. Rozoznávame dve veľké skupiny herbicídov - organické a syntetické herbicídy (Délye et al., 2013; Quareshy et al., 2017). Herbicídy majú celý rad škodlivých účinkov na ľudské zdravie, nakoľko veľa z nich obsahuje toxické až karcinogénne prímiesy. Za určitých okolností môžu tieto látky kontaminovať aj vodné toky, čo má na svedomí ďalekosiahle ekologické disbalancie. Preto sa v súčasnej dobe kladie dôraz na obmedzovanie takýchto látok či už v poľnohospodárstve alebo domácom použití.

Pri dlhodobom používaní herbicídov na rastliny dochádza k vytvoreniu rezistencie voči týmto chemickým látkam. Rozoznávame 2 hlavné mechanizmy, ktorými sa rastliny vysporiadávajú s účinkami herbicídov. Prvý z nich je *target-site resistance* (TSR) – mechanizmus zvyšujúci expresiu cieľového proteínu. Zasahuje do 3D štruktúry cieľového proteínu, čo zamedzí väzbu herbicídu na tento proteín. Druhý, *non-target-site resistance* (NTSR) zasahuje do štrukturálnych zmien väzobného miesta herbicídu. Zahrňuje procesy diferenciálnej absorpcie, translokácie alebo neutralizácie cytotoxického produktu generovaného aplikáciou herbicídu (Délye et al., 2013; Quareshy et al., 2017). Po absorpcii herbicídu musí byť rýchlo translokovaný z miesta absorpcie do miesta účinku. Ak sa tak nestane, herbicídy sú pomocou chemických procesov premenené na netoxické alebo menej toxické metabolity (Coneco a Galon, 2011). V praxi sú používané syntetické inhibítory cytokinínové, ktorým je v tejto práci venovaná samostatná kapitola, tak aj inhibítory auxínové, ktoré boli objavené skôr, avšak v poľnohospodárstve sú využívané vo väčšom množstve. Medzi najznámejšie zaraďujeme kyselinu 2,4-dichlórfenoxyoctovú (2,4-D), kyselinu N-1-(naftyl)ftalamovú (NPA) alebo kyselinu naftyl-1-octovú (1-NAA) (Zhang *et al.*, 1995; Delbarre *et al.*, 1996; Rubery 1990). 2,4-D je pomaly prestupujúcou látkou cez plazmatickú membránu. Je prijímaná vstupným prenášačom, no nie je preukázané, že z bunky aj vystupuje. Jej úloha je predovšetkým v blokovaní transportných dráh bunky (Imhoff *et al.*, 2000). Aplikácia 1-NAA podporuje konverziu cytokinínov zeatínového typu na deriváty adenínu hlavne u rastlín tabaku, pričom bol následne aj preukázaný účinok 1-NAA na nárast aktivity cytokinín oxidázy v podmienkach *in vitro* (Zhang *et al.*, 1995). NPA zaraďujeme do skupiny látok nazývaných fytotropíny. Sú to látky, ktoré inhibujú gravitropické a fototropické reakcie a polárny transport auxínu tým, že blokujú funkciu auxínového výstupného prenášača (Rubery, 1990).

2.3.1 Cytokinínové inhibítory

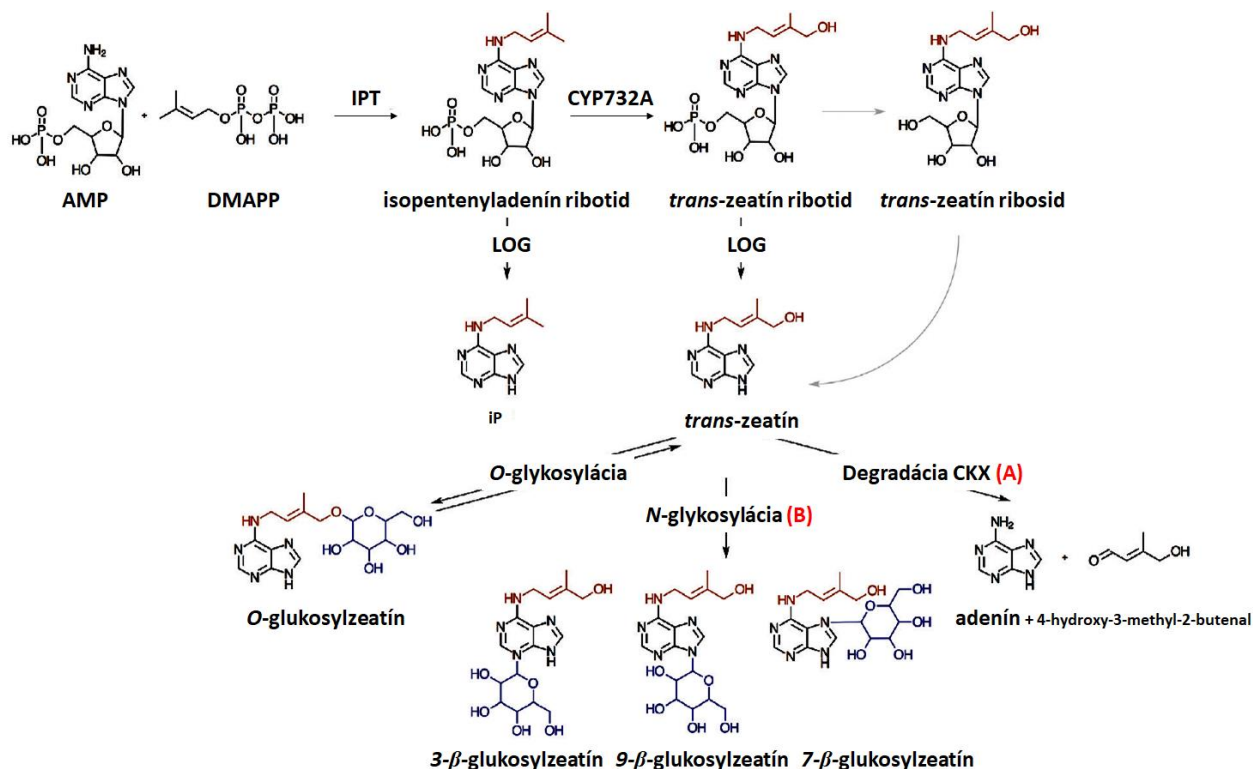
Medzi cytokinínové inhibítory zaradujeme tie, ktoré pôsobia proti prirodzene sa vyskytujúcim degradačným procesom v rastline. Týmito syntetickými inhibítormi môžeme zasahovať ako do metabolizmu, signálnych dráh, tak do transportu. Bolo dokázané, že moduláciou stavu CKs sme schopní ovplyvniť dôležité vlastnosti rastlín, ako veľkosť koreňového systému, generatívny vývoj orgánov, veľkosť a počet semien, abiotickú a biotickú odolnosť voči stresu, celkový výnos a dokonca aj zvýšiť počet reprodukčných orgánov, a tak zvýšiť produkciu rastlín (Koprna *et al.*, 2016).

Jedným z nich je INCYDE (*inhibitor of cytokinin degradation*), po chemickej stránke známy ako 2-chloro-6-(3-methoxyphenyl)aminopurín (Obr. 7). Jedná sa o chemickú látku, ktorá pôsobí ako inhibítor cytokinínovej degradácie na úrovni cytokinín oxidázy/dehydrogenázy (Obr. 8), konkrétne na CKX2 (Zatloukal, 2008). Spíchal *et al.*, (2012) preukázali jeho schopnosť inhibície CKX nielen *in vitro* ale aj *in vivo* a taktiež schopnosť obnoviť prirodzený fenotyp u rastlín so zvýšenou expresiou CKX. Účinnosť tejto látky bola preukázaná tým, že bol pozorovaný pozitívny vplyv na počet kvetov a zníženie hladiny oxidačného stresu malondialdehydu (Aremu *et al.*, 2014).



Obr. 7. Štruktúrne vzorce Incydu (vľavo) a Roskovitínu (vpravo)

Druhým CK inhibítorom je ROSKOVITÍN, z chemického hľadiska 6-benzylamino-2-(R)[1-(hydroxymethyl)propylamino]-9-isopropylpurín (Obr. 7), s výrazným inhibičným účinkom na *N*-glykoziláciu cytokinínov (Obr. 8), čo vedie k zvýšeniu množstva aktívnych cytokinínov. Spolu so svojimi analógmi taktiež vykazuje inhibičné účinky cyklín-dependentných kináz, ktoré sú zapojené do progresu bunkového cyklu (Dwivedi *et al.*, 2010). V priebehu bunkového cyklu reverzibilne blokuje G1/S a G2/M fázu (Planchais *et al.*, 2000).



Obr. 8. Schéma pôsobenia cytokinínových inhibítorov v metabolickej dráhe cytokinínov (upravené podľa Zürcher a Müller, 2016) – A, *INCYDE* (Zatloukal et al., 2008) 2; B, *Roskovitin* (Monanté et al., 2013; Dwivedi, 2010). AMP – adenzínmonofosfát, CYP732A – cytochróm P450 monoxygenáza 735A, DMAPP – dimethylalyl difosfát, IPT – izopentenyltransferáza, LOG – enzým LONELY GUY,

2.4 Vizualizácia cytokinínového signalingu

Homeostáza aktívnych cytokinínov v bunkách rastlín je daná pomerom degradácie, uvoľňovania a konjugácie cytokinínových foriem a báz (Schmülling et al., 2003; Galuszka et al., 2004). Ireverzibilnú degradáciu katalyzuje CKX odštiepením postranného reťazca, zatiaľ čo glykosilácie sú aktivované glykosiltransferázami (Hou et al., 2004). Genóm *Arabidopsis thaliana* kóduje 7 CKX proteínov, ktoré sa líšia v subcelulárnej lokalizácii a substrátovej špecificite. V tejto proteínovej rodine detekujeme gén *ckx7*, ktorý sa stal stredobodom záujmu, ako doposiaľ neznámy a nepopísaný gén. Preto bol naň použitý β-glukuronidáza (GUS) reportérový gén. Pomocou toho bolo zistené, že výskyt pCKX7 je vo vaskulatúre a v embryonálnom vaku, pričom v neskorších vegetatívnych štádiách už detekovaný nie je (Köllmer et al., 2014).

Cytokiníny tiež regulujú viacstupňovú fosforylačnú signalizačnú kaskádu (MSP) väzbou a aktiváciou príbuzných receptorov, hybridných kináz s cyklázami a His-kinázou asociovanou so senzoricou extracelulárnou doménou viažucou ligand. V *Arabidopsis* sú tieto kroky sprostredkované génmi *ahk2*, *ahk3* a *ahk4*, poprípade CKI1. Signál je

následne prenášaný cez ARR, pričom rozoznávame typ A, typ B a typ C (Zürcher *et al.*, 2013). Regulátory odozvy typu B, pôsobiace ako transkripčné aktivátory, sprostredkovávajú konečný krok v MSP (Obr. 4). Na základe týchto poznatkov bol zostrojený dvojzložkový signalizačný senzor TSC:GFP, ktorý je ovplyvňovaný transkripčnou aktivitou regulátorov typu B. Avšak v procese používania sa zistilo, že jeho expresia je slabá napríklad v apikálnom meristéme koreňa, alebo v transgénnych rastlinách je jeho úloha utlmená. Preto bol vyvinutý silnejší druh senzoru, a to TSCn:GFP. Tento typ reportéru vykazuje silné a dynamické rozloženie green fluorescent protein (GFP) signálu, konzistentné s percepciou cytokinínov. Expresia GFP je okrem toho stabilná po generácie, čo umožňuje kríženie s rôznym genetickým pozadím. Okrem GFP je však možnosť použitia aj yellow fluorescent proteínu (YFP) alebo red fluorescent proteínu (RFP).

TSCn predstavuje výrazné zlepšenie pri reportovaní transkripčného výstupu fosforylovaných signalizačných sietí v *Arabidopsis*, kukurici a ďalších rastlinách, ktoré vykazujú špecifické väzbové molekuly DNA, ktoré sa viažu na regulátory odozvy (Zürcher *et al.*, 2013). Preto boli vyvinuté testy na zachovanie jeho špecifickosti zahŕňajúce variácie v počte väzobných miest, fázovania a identity hraničných nukleotidov (Tao *et al.*, 2017). TSCn sa dokáže spájať s viacerými druhmi reportérových proteínov. Z najviac skúmaných sú GFP a GUS. Je dokázané, že syntetický promótor TSCn:GUS je možné aktivovať len pomocou cytokinínov. Auxíny, kyselina gibberelová ani kyselina abscisová tento syntetický promótor aktivovať nedokážu (Tao *et al.*, 2017).

Luciferáza sa ako reportér často používa na monitorovanie rýchlo sa meniacej génovej expresie, napr. pri pozorovaní cirkadiálnych javov. Jej výhodou v porovnaní s proteínmi emitujúcimi fluorescenciu je, že nevyžaduje na excitáciu ožiarenie svetlom. Z tohto dôvodu detekcia luciferázovej aktivity neovplyvňuje fyziologický stav rastlín, ktoré sú zväčša na svetlo citlivé. Ďalšou jej výhodou v porovnaní s ostatnými je, že má kratší polčas rozpadu, z čoho vyplýva, že poskytuje rýchlejšie časové rozlíšenie reakcií. Luciferáza sa teda používa ako bioluminiscenčná sonda na detekciu rýchleho pohybu systémových signálov vyvolaných abiotickým stresom pozdĺž listov a stoniek (Yamamoto *et al.*, 2017).

Na vizualizáciu cytokinínových signálnych dráh sa okrem regulačných, fluorescenčne značených proteínov naskytuje možnosť využitia malých molekúl-prób. Kubiasová *et al.* (2018) navrhli fluorescenčné deriváty iP v kombinácii s fluorescenčnými próbami napojenými cez 2- alebo 6-uhlíkové mostíky na pozíciách C2 alebo N9 purínového skeletu. Medzi tieto próby zaradujeme značku 7-nitrobenzofurán (NBD). Všetky tieto iP deriváty

boli testované vzhľadom ku afinite cytokinínového receptoru CRE1/AHK4. Ukázalo sa, že spojenie iP s fluorescenčnou značkou vo viacerých prípadoch narušilo väzbu na receptor. Jedným z fungujúcich derivátov je kombinácia NBD a iP naviazaná cez N9 a pomocou 2-uhlíkového mostíka. Vytvorená próba má emisné maximum v žlto-zelenej časti spektra pri 528 nm, čo je vhodné na kolokalizáciu s fluorescenčnými markermi emitujúcimi v rozsahu červenej vlnovej dĺžky (Kubiasová *et al.*, 2019).

3 PRAKTICKÁ ČASŤ

3.1 Biologický materiál

Pre nižšie uvedené experimenty boli použité rastliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Columbia-0* (*Ath-Col-0*) a mutantná línia *TSCn:GFP* (Zürcher *et al.*, 2013).

3.2 Chemikálie

Agar – Duchefa Biochemie B. V. (Nizozemsko)

Amoniak (25%) – Merck KGaA (Nemecko)

Anti-rabbit IgG-HRP – Agrisera (Švédsko)

Chemiluminiscenčný substrát AgriseraELC Bright – Agrisera (Švédsko)

Deionizovaná voda – pripravená v Direct-Q® 3 UV

Dimethyl sulfoxid – Acros organics (Belgicko)

Hydroxid sodný p.a. – Lach Ner s.r.o (Česká republika)

Ethanol (96%) – VWR Chemicals (Francúzsko)

Kyselina chlorovodíková (38%) – Lach–Ner s.r.o. (Česká republika)

Kyselina mravčia (98%) – Sigma Aldrich (Nemecko)

Kyselina octová (99,8%)– Sigma Aldrich (Nemecko)

Kyselina dusičná (65%) – Lach–Ner s.r.o. (Česká republika)

MES (kyselina 2-(*N*-morfolino)ethansulfonová) – Carl Roth GmbH (Nemecko)

INCYDE – Laboratoř růstových regulátorů (Česká republika)

Inertné izotopicky značené štandardy cytokinínov pridávané do vzoriek v látkovom množstve: 0,25 pmol CK bázi ($[^{13}\text{C}_5]\text{cZ}$, $[^{13}\text{C}_5]\text{tZ}$, $[^2\text{H}_3]\text{DHZ}$, $[^2\text{H}_6]\text{iP}$), CK ribosidov ($[^2\text{H}_5]\text{tZR}$, $[^2\text{H}_3]\text{DHZR}$, $[^2\text{H}_6]\text{iPR}$) a CK *N*-glukosidov ($[^2\text{H}_5]\text{tZ7G}$, $[^2\text{H}_5]\text{tZ9G}$, $[^2\text{H}_3]\text{DHZ9G}$, $[^2\text{H}_6]\text{iP7G}$, $[^2\text{H}_6]\text{iP9G}$); 0,5 pmol CK *O*-glukosidov ($[^2\text{H}_5]\text{tZOG}$, $[^2\text{H}_7]\text{DHZOG}$, $[^2\text{H}_5]\text{tZROG}$) a CK nukletidov ($[^2\text{H}_5]\text{tZRMP}$, $[^2\text{H}_3]\text{DHZMP}$, $[^2\text{H}_6]\text{iPRMP}$); 5 pmol auxínov ($[^{13}\text{C}_6]\text{IAA}$, $[^{13}\text{C}_6]\text{oxIAA}$, $[^{13}\text{C}_6]\text{IAAasp}$, $[^{13}\text{C}_6]\text{IAGlu}$) – Olchemim (Česká republika)

Marker molekulových hmotností – Precision Plus Protein Dual Color standards (USA)

Methanol (> 99,9%) – Merck KGaA (Nemecko)

Murashige-Skoog médium – Duchefa Biochemie B. V. (Nizozemsko)

NH₄OH – Sigma Aldrich (Nemecko)

Protilátka proti Aktínu – Agrisera (Švédsko)

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

Roskovitín – Laboratoř růstových regulátorů (Česká republika)

trans-Zeatin – Sigma Aldrich (Nemecko)

Tween[®] 20 – Lach-Ner s.r.o. (Česká republika)

Roztoky a pufre:

Vodné roztoky boli pripravované v deionizovanej vode.

0,1% DMSO – Na 250 ml ½ MS média bolo použitých 200 µl DMSO

0,8% DMSO – Na 20 ml ½ MS média bolo použitých 20 µl DMSO

1M HCOOH – Na 250 ml roztoku bolo použitých 9,625ml HCOOH a 240,375ml H₂O.

1M HCl – Na 100 ml roztoku bolo použitých 91,9 ml H₂O a 8,1 ml 37% HCl.

50% HNO₃ – Na 250 ml roztoku bolo použitých 192,25ml HNO₃ a 57,75ml H₂O

5% methanol – K 95 ml H₂O bolo pridaných 5 ml methanolu.

10% methanol – K 90 ml H₂O bolo pridaných 10 ml methanolu

Extraktčný pufor (modifikovaný Bieleški pufor) – 75% methanol, 5% kyselina mravčia

Mobilné fázy:

0,1% kyselina octová v MeOH

0,1% kyselina octová v deionizovanej vode

15mM kyselina mravčia – 566 µl HCOOH doplnené H₂O do 1 l a adjustovaná prídavkom 25% NH₄OH na pH 3,95

½ MS médium pre kultiváciu rastlín: 2,2 g/l Murashige-Skoog soli a vitamíny, 10 g/l sacharóza, pH = 5,7 upravené pomocou MES, popr. 1M KOH, 1,1% agar (pri príprave tekutého ½ MS média nebol agar pridávaný)

MS médium pre kultiváciu rastlín: 4,4 g/l Murashige-Skoog soli a vitamíny, 10 g/l sacharóza, pH = 5,7 upravené pomocou MES, popr. 1M KOH

0.35M NH₄OH – Na 250 ml roztoku bolo použitých 6,25 ml (25% NH₄OH) a 243,75ml H₂O

0.35 M NH₄OH v 60% MeOH – Na 250 ml roztoku bolo použitých 150 ml MeOH, 6,25 ml (25% NH₄OH) a 93,75ml H₂O

LSB – 4x koncentrovaný vzorkovací pufor

Okyselený methanol – methanol s prídavkom 1% kyseliny mravčej

Sterilizačný roztok – 0,01% roztok TWEEN 20.v 70% EtOH

TBS-T – tris pufrovací fyziologický roztok s prídavkom Tweenu[®] 20

3.3 Pomôcky a prístroje

Pomôcky:

100µm sítko Collector Tissue Sieve – Thermo EC (USA)
Elektroforetický set Mini-PROTEAN Tetra cell, PowerPac Basic Power (USA)
Falkónové zkušavky (15 ml)
Injekčné striekačky (3 ml)
Laboratórne sklo – odmerný valec, kadičky, sklenené skúmvky – Fisherbrand (USA)
LC kolóny - UPLC® BEH Shield RP18 (150 x 2,1 mm, veľkosť častíc: 1,7 µm) – Waters (USA); Kinetex C18 100 Å (50 x 2,1 mm, veľkosť častíc 1,7 µm) – Phenomenex (USA)
Micro Spin Filter (Nylon, 0,2 µm) – Chromservis s.r.o. (Česká republika)
Mikroskúmvky – Eppendorf (Nemecko)
Nitrocelulózoová membrána – Sanra Cruz Biotechnology (USA)
Oasis® HLB kolóny, 30 mg/1 ml – Waters (USA)
Oasis® MCX kolóny, 30 mg/1 ml – Waters (USA)
Set pre WB Mini Trans-Blot Cell – Bio-Rad (USA)

Prístroje:

Analytické váhy Satorius Weighing Technology GmbH (Nemecko)
Autokláv Labo MLS-3781L – Sanyo (Japonsko)
Centrifúga Beckman Coulter Alegra 64R – (USA)
Centrifúga Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge – Thermo Scientific (Nemecko)
Direct-Q® 3 UV – Merck KGaA (Nemecko)
Konfokálny mikroskop Zeiss lsm 800 (Nemecko)
Laminárny box Heraguard™ ECO – Thermo Fischer Scientific (USA)
Magnetická miešačka MM7 (Česká republika)
Membránová výveva Mini Laboport Vacuum Pump – KNF Neuberger GmbH (Nemecko)
pH meter Oakton® pH 700 Benchtop Meter, elektróda polyplast Hamilton – Cole-Parmer (USA)
Program ImageJ 1.52a
Rotačná miešačka na mikroskúmvky – Stuart rotator SB3 BioCote (UK)
Sada automatických pipiet – Eppendorf, Brand a k nim prislúchajúce špičky
SPE manifold Visiprep™ - Supelco (USA)
Skener Perfection V550 Photo – Epson (Japonsko)

Stolná centrifúga Microstar 17 – VWR (USA)

System UHPLC-MS/MS – Acquity UPLC I-Class System (Binary solvent manager, Sample manager) – Waters (USA) s hmotnostným detektorom XevoTM TQ-S – Waters MS Technologies (UK)

Ultrazvukový kúpeľ Transsonic 310 – Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co.(Nemecko)

Vákuová komôrka VisiprepTM – Supelco-Sigma Aldrich (Nemecko)

Vákuová rotačná odparka Rotavapor[®] R-200 – Buchi Labortechnik AG (Švajčiarsko)

3.4 Metódy a postupy

3.4.1 Výsev rastlín *Arabidopsis* na fenotypizáciu

Výsev rastlín *Ath-Col-0* a mutantných línií *TSCn:GFP* prebiehal po sterilizácii semien na kultivačné dosky s ½ MS médiom.

A. Sterilizácia semien

Sterilizácia bola zahájená umiestnením dostatočného množstva semien *Arabidopsis* do čistej mikroskúmavky s prídavkom 1 ml sterilizačného roztoku (0,01% Tweenu v 70% ethanolu). Takto pripravená mikroskúmavka bola umiestnená na rotačnú miešačku po dobu 10 minút. Následne bol odpipetovaný sterilizačný roztok a semená premyté 3-4x sterilnou vodou.

B. Príprava MS média

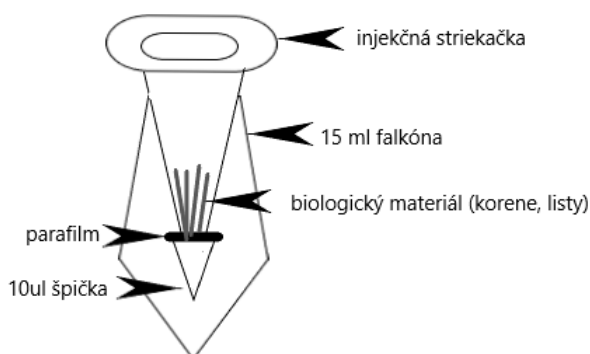
Na výsev semien bolo použité plné a ½ MS. Po navážení a rozpustení všetkých zložiek bol pridaný 1,1% agar. Pripravené médium bolo autoklávované. V prípade média na test inhibície rastu koreňa bolo ½ MS médium po autoklávovaní a schladnutí obohacované prídavkami cytokinínových inhibítorov (INCYDE, Roskovitín, *tZ* a značný *tZ*) vo zvolenej koncentrácii (10nM, 100nM, 1µM, 10µM).

C. Výsev semien

K semenám *Arabidopsis* po sterilizácii bola pridaná sterilná voda. Následne boli semená vysadyované na dosky s ½ MS médiom s 1,1% agarom automatickou pipetou po 100 µl v jednom rade v hornej časti dosky. Vysiate kultivačné dosky boli potom previazané po hranách predýšným leukoplastom a zabalené do hliníkovej fólie a prenesené do 4°C za účelom synchronizácie klíčenia semien. Po dvoch dňoch boli dosky umiestnené do fytotronu vo vertikálnej polohe. Rastliny rástli v podmienkach 23°C, pri fotoperióde 16 hodín svetlo, 8 hodín tma.

3.4.2 Izolácia symplastu a apoplastu (Antoniadi *et al.*, submitted)

Izolácia symplastu a apoplastu bola robená z koreňov a prízemnej ružice listov z 8-dňových rastlín podľa Antoniadi (2014). Rastlinám boli odrezané korene tesne pod listami. Rastlinný materiál bol zvážený na laboratórnych váhach a následne opláchnutý na 100 μ m sitku v deionizovanej vode. Rastlinný materiál bol na filtry osušený v buničitej vate a umiestnený do pripravených 15ml falkón s 3ml injekčnou striekačkou zbvanej piestu (Obr. 9) udržiavaných na ľade. Následne prebehla centrifugácia pri 900 \times g po dobu 20 minút pri 4 °C. Týmto krokom bola vyizolovaná apoplastická frakcia. Striekačka bola premiestnená do novej falkóny, zabalená do 2 vrstiev alobalu a zmrazená v tekutom dusíku. Následne bola ponechaná pri laboratórnej teplote až do úplného rozmrazenia. Po rozmrazení prebehla centrifugácia pri 2500 \times g po dobu 15 minút pri 4 °C. Týmto krokom sa získala symplastická frakcia. Apoplastická aj symplastická frakcia boli prenesené do mikroskúmaviiek a zamrazené najskôr skokovo v tekutom dusíku a následne boli uchovávané v -80 °C. V prípade optimalizačných krokov sa vyizolované frakcie zachytávali buď do metanolu alebo okyseleného metanolu pred krokmi centrifugácie.



Obr. 9. Schéma popisujúca zloženie falkóny na izoláciu symplastu a apoplastu.

3.4.3 Test inhibície rastu primárneho koreňa

Test inhibície rastu koreňa bol realizovaný na 8-dňových rastlinách. Bolo použité $\frac{1}{2}$ MS médium rozdelené na viaceré časti, ktoré boli vyautoklavované, a následne do nich boli pridané syntetické inhibítory (INCYDE, Roskovitín) v jednotlivých koncentráciách od 10 nM po 10 μ M a 0,08% DMSO ako kontrola. Po zatuhnutí média naň boli vysiate semená tak ako bolo popísané vyššie. Rastliny na ošetrovanom médiu syntetickými inhibítormi rástli po dobu 8 dní. Po uplynutí tejto doby boli rastliny naskenované na skenery a presná

dĺžka primárnych koreňov bola zmeraná v programe ImageJ 1.52a. Dáta boli spracované a štatisticky vyhodnotené v Exceli (t-test).

3.4.4 Konfokálna mikroskopia

Konfokálna mikroskopia bola robená na 5-dňových rastlinách mutantnej línie *TSCn:GFP*, ovplyvňovaných syntetickými inhibítormi (INCYDE, Roskovitín) po 16 hodinovej inkubácii v tekutom ½ MS médiu. Tekuté médium bolo pridané do 6-jamkovej kultivačnej dosky, pričom k nemu do každej jamky bol pridaný iný syntetický inhibítor v stanovenej účinnej koncentrácii. U INCYDE bolo pracované so 100nM koncentráciou a u Roskovitínu bolo pracované s 1µM koncentráciou. Ako negatívna kontrola bolo zvolené 0,1% DMSO. Do jamiek s pripraveným médiom bolo pinzetou prenesených 8 semenáčikov 5-dňovej mutantnej línie, ktorá rástla na ½ MS médiu. Semenáčiky boli postupne vyberané na mikroskopické sklíčko, zakvapnuté médiom z jamiek a preložené krycím sklíčkom. Keďže bol použitý konvertovaný konfokálny mikroskop Zeiss lsm 800, sklíčka boli vkladané do mikroskopu krycím sklíčkom nadol a pozorované pri excitačnej vlnovej dĺžke 488 nm.

3.4.5 Detekcia proteínov

Detekcia proteínov vo vzorkách vyizolovaných frakcií symplastu a apoplastu bola prevedená z dôvodu zistenia a možného vylúčenia kontaminácii medzi jednotlivými frakciami.

A. Príprava vzorky

Vzorka bola zmiešaná spolu s 4x koncentrovaným vzorkovacím pufrom (LSB) v pomere 1:3. Následne vložená na 5 minút do termobloku nastaveného na teplotu 95 °C a nakoniec zcentrifugovaná po dobu 5 minút na 10000 rpm.

B. Elektroforéza

Takto pripravená vzorka bola nenesená na vopred pripravený gél, ktorý pozostával zo 4% zaostrovacieho a 12% deliaceho gélu. Na gél bol taktiež napipetovaný marker molekulových hmotností a pozitívna kontrola (celkový proteínový extrakt z rastlín v LSB). Elektroforéza bola na začiatok separácie spustená pri napätí 90V po dobu

30 minút a následne, po prechode vzorky do deliaceho gélu, bolo upravené napätie na 120 V po dobu 100 minút.

C. Western-blott

Po rozdelení proteínov vzoriek symplastu a apoplastu v polyakrylamidovom géli bola zostavená aparátúra *western-blott sandwich* metódu. Proteíny boli prenesené z gélu na nitrocelulóзовú membránu pri prúde 290 mA po dobu 2 hodín.

D. Detekcia

Proteíny na membráne boli následne nešpecificky zafarbené v Ponceau S roztoku pre kontrolu prenosu a odfarbené v Tris pufrovacom fyziologickom roztoku s prídavkom Tweenu® 20 (TBS-T). Ďalším krokom bola blokácia voľných väzbových miest na membráne v 5% mlieku v TBS-T (m/V) po dobu 1 hodiny. K membráne sa po zastabilizovaní pridala primárna králičia protilátka proti Aktínu v 1% mlieku v pomere 1:2500, pričom pôsobenie primárnej protilátky trvalo 1h. Následne bola membrána premytá 3× v TBT-T pufri a bola pridaná sekundárna kozia protilátka konjugovaná s chrenovou peroxidázou na 1 hodinu, taktiež pripravená v 1% mlieku v pomere 1:10000. Opäť nasledovali 3 premývacie kroky a nakoniec bola membrána detekovaná pomocou chemiluminiscenčného substrátu v detekčnom zariadení (Luminiscent image analyzer LAS-4000).

3.4.6 Extrakcia a purifikácia pre LC-MS/MS analýzu auxínov a cytokinínov

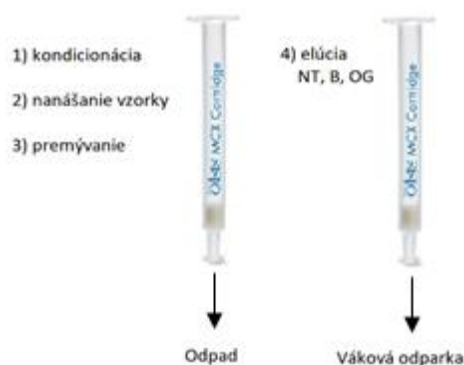
A. Príprava vzoriek- Vzorky na prečisťovanie a analýzu auxínov a cytokinínov boli pripravované dvojakým spôsobom:

I. Z tekutého materiálu – K tekutým vzorkám bolo pridané dvojnásobné množstvo interného štandardu (kapitola 3.2). Následne vzorky boli zcentrifugované na 20000 ×g po dobu 15 minút v 4 °C. Po uplynutí času boli vzorky supernatantu okyselené 1M HCOOH tak, aby sa pH vzoriek bolo 2,7.

II. Z pevného materiálu – Vzorky veľkých navážok pevného materiálu boli zhomogenizované v trecej miske s tlčíkom pod tekutým dusíkom a rozvážené a analytických váhach po 20 mg. Ku vzorkám bolo pridané vhodné množstvo interného štandardu a extrakčný pufor (modifikovaný Bielecki pufor) s 3 keramickými guľôčkami. Vzorky boli umiestnené na guľový mlynček po dobu 5 minút pri 27 Hz

v 4 °C. Následne boli vzorky sonikované 3 minúty v ľadovom kúpeli po dobu 4 minút a umiestnené na otočný kolotoč na 30 minút pri otáčkach 15 rpm v 4 °C. Posledným krokom v príprave vzoriek bola 15 minútová centrifugácia pri 20000 rpm v 4 °C, pričom supernatant bol premiestnený do sklenených skúmaviek s 2,5 ml 1M HCOOH, aby ich výsledné pH bolo $\leq 2,7$.

B. SPE purifikácia pomocou Oasis® MCX kolóny (30 mg/1 ml) pre stanovenie cytokinínov – MCX purifikácia prebiehala v 4 krokoch tak ako ukazuje *Obr. 10*. Prvým krokom bola kondicionácia kolón 1 ml metanolu, 1 ml H₂O, 1 ml 50% HNO₃, 1 ml H₂O a 1 ml 1M HCOOH. Druhým krokom bolo nanášanie okyselenej vzorky (pH $\leq 2,7$). Ďalším krokom bolo premývanie kolón 1 ml 1M HCOOH a následná elúcia analytov. Výstup z tejto časti bol zachytávaný do sklenených skúmaviek. Elúcia prebiehala 1 ml 0,35 M NH₄OH a 2 ml 0,35 M NH₄OH v 60% MeOH. Takto pripravené vzorky boli umiestnené do vákuovej odparky a odparené do sucha.



Obr. 10. Schéma SPE purifikácia pomocou Oasis® MCX (30 mg/ml).

C. SPE purifikácia pomocou Oasis® HLB kolóny (30 mg/1 ml) pre stanovenie auxínov – HLB purifikácia prebiehala v 4 krokoch ako ukazuje *Obr. 11*. Prvým krokom bola kondicionácia kolón 1 ml 100% metanolom, 1 ml H₂O a 0,25ml okyselenou vodou 1M kyselinou chlorovodíkovou (5 μ l/ml). Druhým krokom bolo nanášanie okyselenej vzorky (pH $\leq 2,7$). Premývacia fáza bola urobená 2 ml 5% metanolu. Posledným krokom bola elúcia vzoriek do sklenených skúmaviek pomocou 2 ml 80% metanolu. Takto prečistené vzorky boli odparené do sucha vo vákuovej odparke.



Obr. 11. Schéma SPE purifikácia pomocou Oasis® HLB (30 mg/ml).

D. Príprava vzoriek pre LC-MS/MS analýzu – Odparené vzorky boli rozpustené v 40 μ l 5% methanolu (pre analýzu cytokinínov) a v 50 μ l 10% methanolu (pre analýzu auxínov). Následne boli prepláchnuté na trepačke a umiestnené na 5 minút do sonikačného kúpela a opäť boli premiešané. Vzorky boli filtrované v skúmavkách Micro Spin Filter (0,2 μ m) a centrifúgované po dobu 5 minút pri 7500 rpm. Po tomto kroku boli prenesené do Micro Insert skúmaviek a uzavreté do vialiek. Takto pripravené vzorky boli premerané na hmotnostnom spektrometri.

3.4.7 UHPLC–MS/MS

Detekcia analytov prebiehala na systéme UHPLC-MS/MS ionizáciou látok elektrosprejom v pozitívnom móde ESI(+) za optimalizovaných MS podmienok na prístroji Acquity UPLC® I-Class System coupled to a Xevo™ TQ-S MS (Waters, Milford, USA). Parametre hmotnostného spektrometra boli nastavené nasledovne: teplota zdroja (150 °C), desolvačná teplota (600 °C), prietok desolvačného plynu (dusík) 1000 l/h, napätie v kapiláre 1 kV. Stanovenie endogénnej hladiny fytohormónov v izolovaných vakuolách prebiehalo pomocou viacnásobného monitorovania reakcie (SRM) protonovaného prekurzora a príslušných produkovaných iónov (Novák *et al.*, 2012; Novák *et al.*, 2017). Kvantifikácia metabolitov bola uskutočnená pomocou izotopovej zriedovacej metódy a všetky dáta boli spracované programom MassLynx™ (verzia 4.1, Waters).

A. Stanovenie auxínov (podľa Pěncík *et al.*, 2018) – Pre separáciu auxínov bola použitá chromatografická kolóna KINETEX (C18, 1,7 μ m, 50 \times 2,1mm) vytemperovaná na 30 °C. Mobilnou fázou bol methanol (A) a redestilovaná voda (B), oboje s prídavkom 0,1% kyseliny octovej. Celkový čas každej analýzy bol 15 minút pri prietoku 0,2 ml/ min.

Pred každým meraním bola kolóna kondicionovaná na počiatočné podmienky analýzy (10:90, A:B). Vzorky boli uložené v autosampleri pri 4 °C. Gradientová elúcia prebiehala v tomto poradí: 2x bol gradient metódy (0 min – 10% A, 10 min – 50% A, 11 min – 55% A, 12,5 min – 100% A, 13,5 min – 10% A) spustený bez nástreku vzorky, následne boli aplikované vzorky po 10 µl.

B. Stanovenie cytokinínov (podľa Novák *et al.*, 2017) – Nástrek každej vzorky na reverznú kolónu činil 10 µl (Acquity UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 150 × 2,1 mm). Kolónový termostat bol nastavený na 45 °C. Separácia vzoriek prebiehala 20 minút v gradiente methanolu (A) a 15 mM mravčane amónnom (pH 3,95 , B) pri rýchlosti 0,35 ml/min: 0 min – 10% A:B), 10 min – 23% A, 15 min – 36% A. Na konci elúcie bola kolóna premytá 100% A (2 min) a ekvilibrovaná na počiatočné podmienky (10:90, A:B) po dobu 3 minút.

4 VÝSLEDKY

4.1 Metóda izolácie symplastu a apoplastu

Prvým cieľom tejto práce bolo izolovať symplast a apoplast z rôznych častí rastliny a ukázať rozdiely v zastúpení cytokinínov a auxínov pomocou metódy LC/MS-MS.

4.1.1 Optimalizácia izolácie symplastu a apoplastu

Optimalizácia bola započatá stanovením vhodného rastového média a množstva biologického materiálu potrebného k izolácii symplastu a apoplastu. Pri určovaní vhodného média bolo rozhodované medzi ½ MS médiom a plným MS médiom. Pre experimenty bolo vybrané ½ MS médium, nakoľko rastliny mali 1,4-násobne dlhší primárny koreň (*Tabuľka 1*), a tým množstvo materiálu na izoláciu vzrástlo v porovnaní s použitím plného MS média. Z tohto dôvodu boli ostatné experimenty robené len z koreňov.

Tabuľka 1. Dĺžka primárneho koreňa u 8-dňových rastlín Arabidopsis rastúcich na plnom MS a ½ MS médiu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SD (n=8).

	Dĺžka (mm)
Plné MS médium	8.60 ± 2.00
½ MS médium	12.23 ± 2.76

V ďalšej fázi boli porovnávané zastúpenia cytokinínových, tak aj auxínových metabolitov v symplaste a apoplaste izolovaných z koreňov a stoniek rastlín. Podľa postupu popísaného vyššie boli izoláty podrobené SPE purifikácii a analýze na kvapalinovej chromatografii spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS). Dáta získané touto analýzou boli ďalej vyhodnotené v kontexte normalizácie dát, celkových hormonálnych profilov a zastúpenia jednotlivých CK typov a IAA metabolitov.

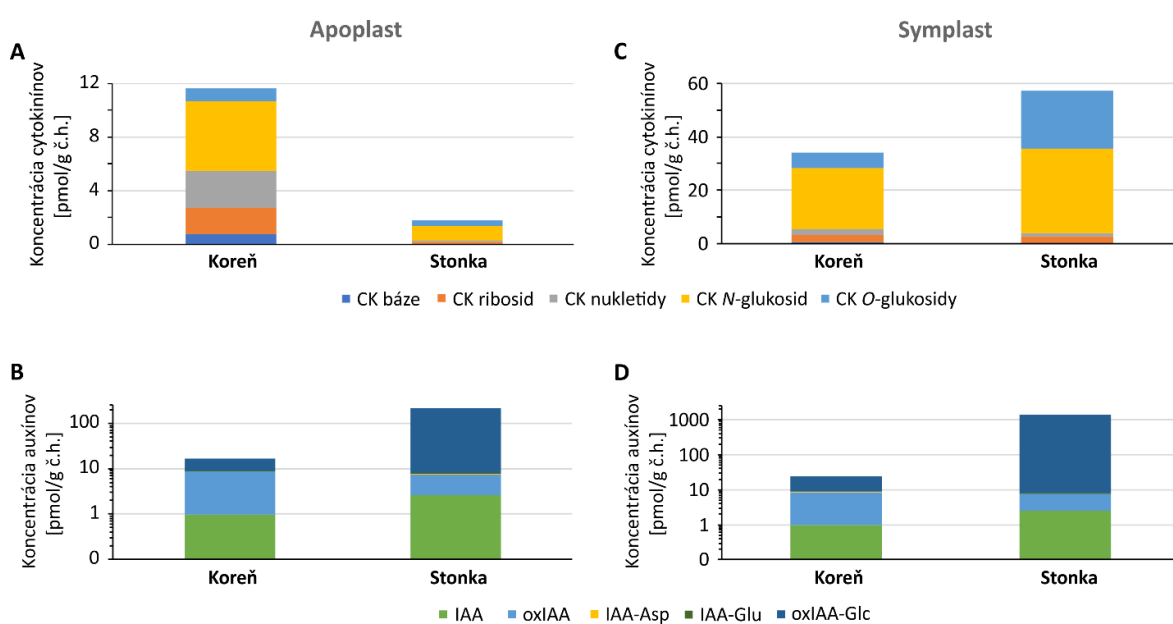
Prvým kritériom postupov izolácií bola normalizácia vypočítaných dát. Ako naznačujú výsledné objemy jednotlivých frakcií (*Tabuľka 2*), výťažnosť izolácie symplastu a apoplastu bola celkom variabilná. K izolácii jednotlivých frakcií bolo navážených 3,0 g koreňov alebo 0,3 g stoniek a bolo získaných 10-400 µl apoplastu alebo 10-100 µl symplastu. Táto vysoká variabilita je v *Tabuľke 2* vyjadrená relatívnou smerodajnou odchýlkou (RSD). Veľké rozdiely vo výťažkoch izolácie negatívne ovplyvňujú výslednú normalizáciu LC-MS/MS dát. Veľké rozdiely vo vyhodnocovaní nastávali v prípade vztiahnutia dát

na objem (pmol/ml). Vzhľadom k značným rozdielom výťažností izolácii boli výsledné fytohormonálne koncentrácie vzťahované na váhu v jednotkách pmol/g čerstvej hmoty (č.h.).

Tabuľka 2. Hmotnosť rastlinných pletív použitých k izolácii a objemy získaných apoplastických a symplastických frakcií. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD ($n=3$).

Rostlinný materiál	Hmotnosť [g č.h.]	RSD [%]	Frakcia	Objem [μ l]	RSD [%]
Koreň	2,96 \pm 0,64	22	Apoplast	103 \pm 95	92
			Symplast	27 \pm 45	169
Stonka	0,31 \pm 0,05	17	Apoplast	300 \pm 100	33
			Symplast	57 \pm 40	71

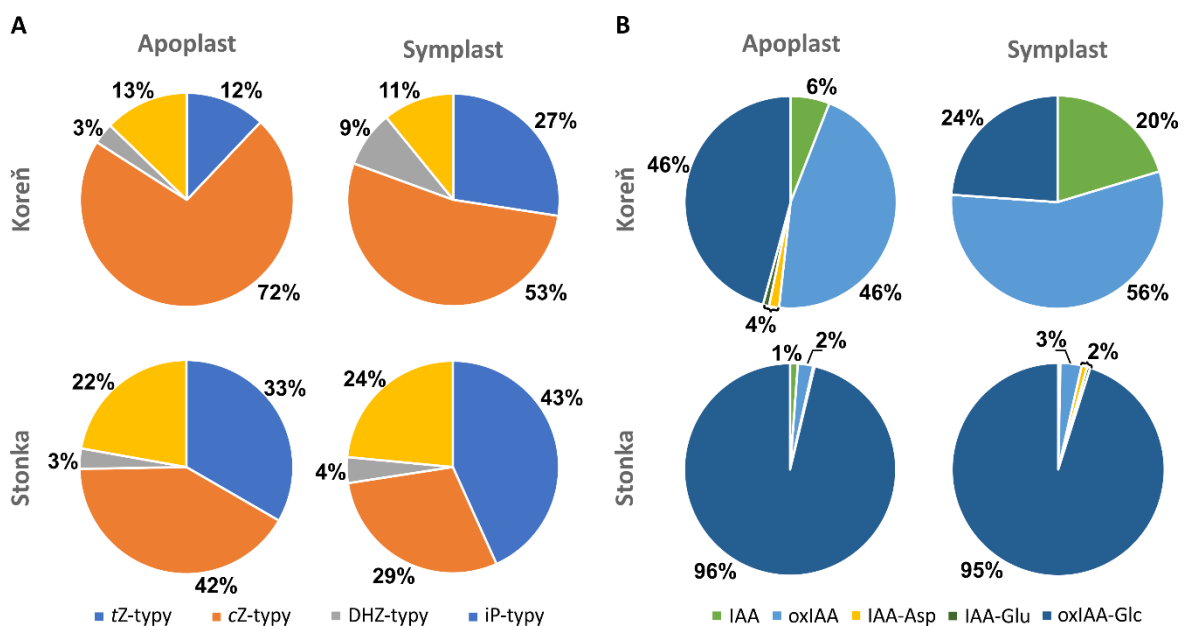
Ako je vidieť podľa uvedených grafov (Obr. 12), najväčšie zastúpenie v cytokinínových profiloch majú *N*-glukosidy a v auxínových profiloch oxIAA v koreňoch a oxIAA-Glc v stonkách. Získané hormonálne profily boli pre jednotlivé izoláty veľmi podobné, líšili sa však v celkových koncentračných hladinách. Väčšie množstvo izolovaných cytokinínov bolo detekované v apoplastickej frakcii izolovanej z koreňov. Pri porovnaní celkových koncentračných hladín CK metabolitov výsledky ukázali až 6,5-násobné zvýšenie. U symplastickej frakcie boli koncentračné hladiny CK metabolitov porovnateľné, len frakcia



Obr. 12. Koncentračné hladiny (pmol/g č.h.) cytokinínových a auxínových metabolitov v symplaste a apoplaste izolovaných z koreňoch a stoniek 8-dňových rastlín *Arabidopsis* rastúcich na $\frac{1}{2}$ MS médiu. A-B, Apoplastická frakcia; C-D, Symplastická frakcia.

izolovaná zo stoniek obsahovala 4x viac CK *O*-glukosidov. Je zaujímavé, že u auxínových profilov je veľká podobnosť v koncentračných hladinách u všetkých IAA metabolitov okrem oxIAA-Glc. Jej endogénne koncentrácie boli v oboch izolovaných frakciách zo stoniek odlišné až o dva koncentračné rády a dosahovala až nanomolárnych hladín.

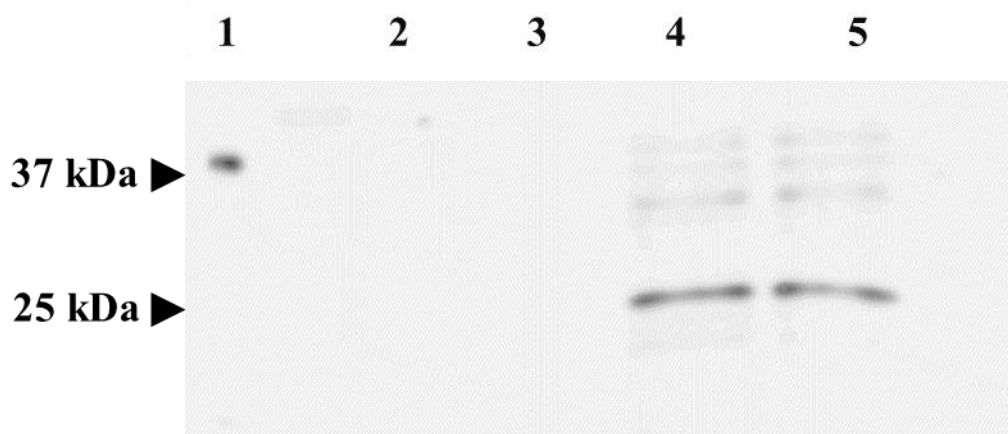
Ďalšou možnosťou posúdenia získaných výsledkov je porovnanie distribúcie CK-typov a IAA metabolitov v apoplastických a symplastických frakciách (Obr. 13). Podobná distribúcia cytokinínov je patrná v oboch izolátoch z koreňov s najvyšším zastúpením *cZ*-typov, ktorá je nasledovaná *tZ*- a *iP*-typmi. U frakcií izolovaných zo stoniek je zrejماً zhoda v CK distribúcii s podobným percentuálnym zastúpením jednotlivých CK typov. U auxínových metabolitov je viditeľná zhoda u izolovaného apoplastu a symplastu zo stoniek s 95-96% zastúpením oxIAA-Glc. Najväčší rozdiel v distribúcii sledovaných fytohormónov ukazujú výsledky IAA metabolitov v apoplastických a symplastických izolátoch z koreňov *Arabidopsis* (Obr. 13B). Podiel auxínov v apoplaste na jeho celkovom metabolickom profile bol v porovnaní s jeho percentuálnym zastúpením v symplaste nižší a kompenzovaný vyšším zastúpením IAA metabolitov, napr. oxIAA a oxIAA-Glc v pomere 1:1. Podobný distribučný vzorec nebol detekovaný v koreňovom symplaste, kde bol objavený vysoký podiel katabolitov oxIAA nasledovaný voľnou IAA (až 20%) a jej glukosylesterom (24%).



Obr.13. Distribúcia (%) celkového obsahu cytokinínových typov (A) a auxínových metabolitov (B) v apoplastických a symplastických frakciách izolovaných z jednotlivých častí rastliny (koreň a stonka).

4.1.2 Stanovenie čistoty apoplastu

Detekcia markerového proteínu bola použitá ku stanoveniu čistoty vyizolovaných koreňových frakcii symplastu a apoplastu 8-dňových rastlín *Ath-Col-0*. Tento experiment bol založený na zisťovaní prítomnosti kontaminácii v apoplaste, poprípade ich vyvrátenie. Bola použitá protilátka proti cytozolárnemu proteínu Aktínu o molekulovej hmotnosti 41,6 kDa (https://www.agrisera.com/shop?funk=visa_artikel&artnr=AS13%202640), ktorá slúži na potvrdenie prítomnosti markerového proteínu v cytoplazme. Bolo predpokladané, že protilátka bude detekovaná len v symplastickej frakcii. Ako ukazuje Obr. 14 táto hypotéza bola potvrdená, avšak výrazný signál zaznamenávame posunutý v rámci molekulovej hmotnosti vzhľadom k pozitívnej kontrole. Apoplastická frakcia bola teda čistá, bez prítomnosti markerového proteínu v cytoplazme.

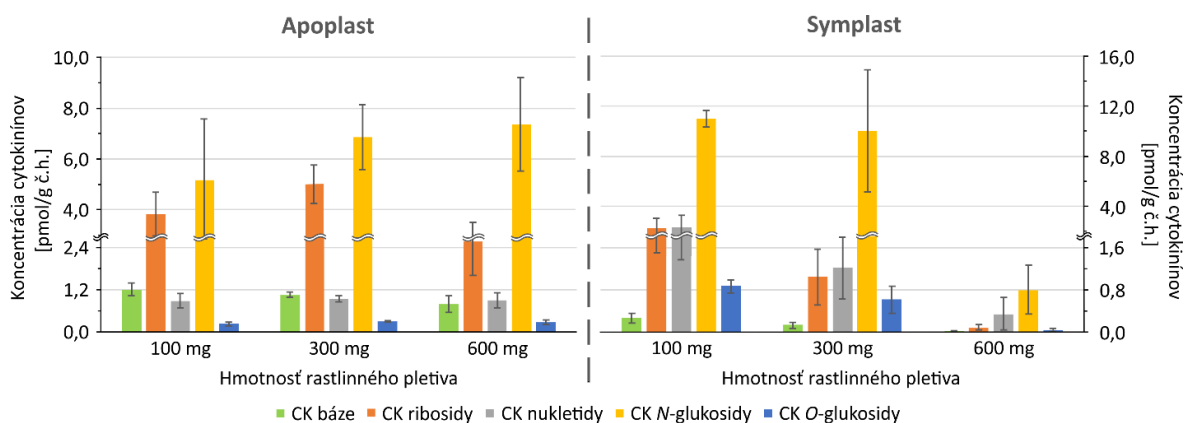


Obr. 14. Detekcia markerového proteínu Aktínu v apoplastickej a symplastickej frakcii. Vľavo na obrázku je znázornená molekulová hmotnosť podľa markera molekulových hmotností. V pravo následne vzorky v poradí 1- pozitívna kontrola, 2-3- apoplastická frakcia, 4-5- symplastická frakcia.

4.1.3 Izolácia symplastu a apoplastu po zrážaní metanolom

Vzhľadom k veľkým odchýlkam získaných objemov z izolácie symplastu a apoplastu (Tabuľka 2) boli urobené experimenty zameriavajúce sa na zníženie variability výsledných fytohomonálnych hladín v koreňoch. Preto bol ďalej optimalizovaný zvolený postup zberu izolovanej frakcie pomocou precipitácie vzorky priamo v izolačnom kroku. Testovaný bol záchyt apoplastických a symplastických frakcií do 98% metanolu alebo okyseleného metanolu, ktorý obsahoval 1% kyseliny mravčie.

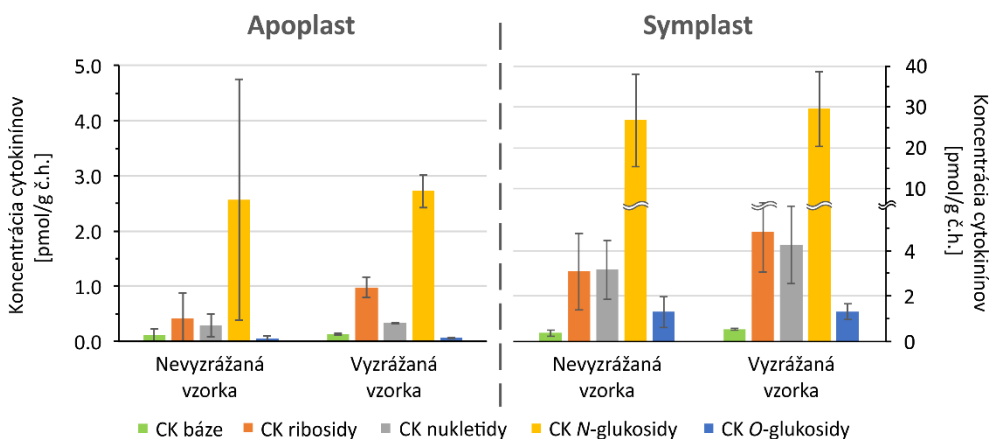
V prvom kroku boli stanovované optimálne navážky biologického materiálu. Izolácie boli robené podľa postupu popísaného v kapitole 3.4.2 so zmenou v centrifugačných krokoch, kde bol do falkón pred centrifugáciou pridaný metanol. Boli testované navážky



Obr. 15. Izolácia apoplastu a symplastu do neokyseleného methanolu pri rôznych navážkach vstupného rastlinného pletiva (100, 300 a 600 mg č.h.). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD ($n=3$).

100, 300 a 600 mg č.h. z 8-dňových rastlín a pre následné stanovenie cytokinínov bola spracovaná polovica izolátu (Obr. 15). Výsledky ukazujú podobné CK profily pri navážke 100 a 300 mg č.h. pre obe izolované frakcie. Vplyv vyššej navážky (600 mg č.h.) na stanovené koncentračné hladiny CKs bol čiastočne zrejmy pre apopalstickú a úplne pre symplastickú frakciu (Obr. 15). Objavené CK hladiny boli pravdepodobne znížené vplyvom matričného efektu spôsobeného vyššou navážkou rastlinného pletiva.

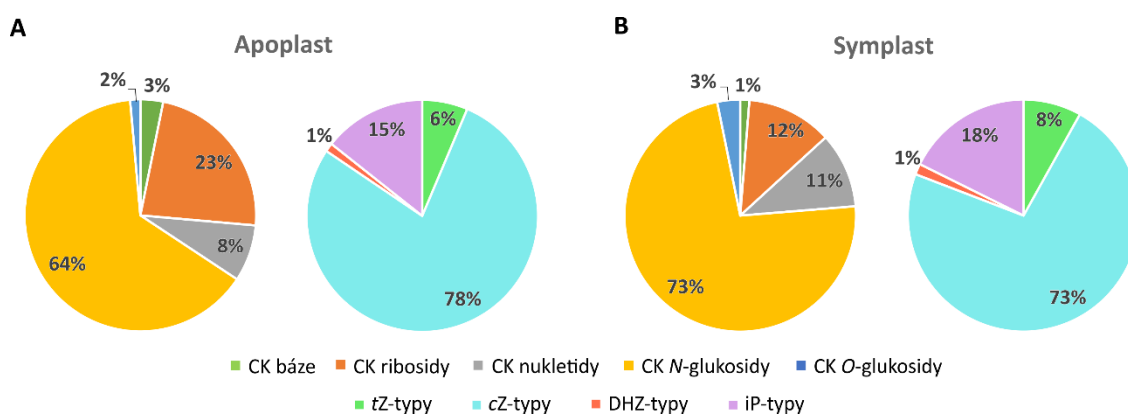
Ďalej bol testovaný vplyv precipitácie vzorky v izolačnom kroku pri použití okyseleného methanolu. Pre zjednodušenie vyhodnotenia nameraných dát boli porovnávané koncentračné hladiny skupín CK metabolitov (Obr. 16). Pri aplikácii zrážania vzorky pomocou organického rozpúšťadla výsledky ukazovali podobné metabolické profily a trendy, avšak neprecipitované vzorky poskytovali väčšiu variabilitu výsledkov. Preto bolo zachytávanie vzoriek do okyseleného methanolu zaradené ako ďalší krok do protokolu izolácie symplastu a apoplastu.



Obr. 16. Izolácia symplastu a apoplastu do methanolu okyseleného 0,1% kys. mravčou v porovnaní so štandardným izolačným protokolom bez precipitácie vzorky. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD ($n=3$).

4.1.4 Apoplastické a symplastické cytokinínové profily

Optimalizovaný protokol izolácie apoplastu a symplastu kombinovaný s precipitáciou izolátu v okyselenom methanole bol nakoniec použitý ku stanoveniu koncentračných hladín isoprenoidných cytokinínov v jednotlivých frakciách. Distribúcia CK metabolických skupín a jednotlivých CK typov je uvedená na Obr. 17. V oboch izolovaných frakciách bol objavený najvyšší podiel CK *N*-glukosidov, ďalej CK ribosidov a nuklotidov. Zastúpenie len v jednotkách percent bolo stanovené u CK báz a *O*-glukosidov. Je zaujímavé, že distribúcia CK metabolitov sa v oboch izolovaných frakciách líši (hlavný rozdiel v CK ribosidoch), zatiaľ čo u CK typov je ich percentuálne zastúpenie veľmi podobné. Z CK typov boli najviac zastúpené *cZ*-typy (až 3/4 podielu) a ďalej *iP*- a *tZ*-typy (15-18% a 6-8%). *DHZ*-typy boli prítomné v menej ako 1,5%.



Obr. 17. Distribúcia (%) cytokinínových metabolických skupín a ich typov v apoplaste (A) a symplaste (B) izolovanom z koreňov 8-dňových rastlín *Ath-Col-0*.

Jednotlivé koncentračné hladiny všetkých detekovaných cytokinínov sú zhrnuté v Tabuľke 3. V oboch izolátoch boli kvantifikované všetky CK typy a ich metabolické formy. Len CK ribosidy *O*-glukosidy neboli detekované v apoplaste. Endogénne hladiny CK báz boli u všetkých CK typov, následne boli detekované CK ribosidy a nukleotidy. Pri porovnaní CK koncentračných hladín bol objavený rádoý rozdiel medzi apoplastickou a symplastickou frakciou. Nárast u CK báz a ribosidov bol 5-násobný, u ďalších CK metabolitov v rozmedzí 10-30x. Percentuálne zastúpenie jednotlivých CK metabolitov je uvedené v Prílohe A. Okrem vysokého podielu CK 7-glukosidov v oboch frakciách (až 76%) bol objavený rozdiel zastúpenia pre *tZR* a *iPR* (nárast v apoplaste) a ich odpovedajúcich nukleotidov (zvýšenie v symplastickej frakcii). Výsledky CK profilovania v apoplaste a symplaste demonštrovali použiteľnosť izolačného protokolu a funkčnosť jeho prepojenia s LC-MS/MS metódou.

Tabuľka 3. Endogénne hladiny cytokinínov (pmol/g č.h.) v apoplaste a symplaste izolovanom z koreňov 8-dňových rastlín *Ath-Col-0*. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD ($n=3$).

Koncentrácia cytokinínov [pmol/g č.h.]		
	<i>Apoplast</i>	<i>Symplast</i>
Báza	0,13 \pm 0,02	0,52 \pm 0,04
Ribosidy	0,98 \pm 0,18	4,83 \pm 1,78
Nukleotidy	0,33 \pm 0,01	4,24 \pm 1,70
<i>N</i> -glukosidy	2,72 \pm 0,30	29,57 \pm 9,14
<i>O</i> -glukosidy	0,060 \pm 0,014	1,30 \pm 0,35
Celkové cytokiníny	4,24 \pm 0,34	40,46 \pm 12,83
<i>tZ</i>	0,0064 \pm 0,0020	0,032 \pm 0,009
<i>tZR</i>	0,074 \pm 0,007	0,24 \pm 0,08
<i>tZR5'MP</i>	0,024 \pm 0,009	0,17 \pm 0,05
<i>tZOG</i>	0,027 \pm 0,004	0,55 \pm 0,16
<i>tZROG</i>	n,d,*	0,032 \pm 0,001
<i>tZ7G</i>	0,12 \pm 0,01	1,41 \pm 0,42
<i>tZ9G</i>	0,024 \pm 0,005	0,85 \pm 0,26
<i>tZ</i> -typy	0,27 \pm 0,01	3,28 \pm 0,99
<i>cZ</i>	0,091 \pm 0,008	0,29 \pm 0,02
<i>cZR</i>	0,77 \pm 0,17	4,04 \pm 1,46
<i>cZR5'MP</i>	0,32 \pm 0,02	3,17 \pm 1,11
<i>cZOG</i>	0,030 \pm 0,006	0,61 \pm 0,14
<i>cZROG</i>	n,d,	0,090 \pm 0,033
<i>cZ7G</i>	2,05 \pm 0,18	20,24 \pm 5,03
<i>cZ9G</i>	0,043 \pm 0,003	0,99 \pm 0,28
<i>cZ</i> -typy	3,31 \pm 0,23	29,42 \pm 7,91
DHZ	0,0014 \pm 0,0000	0,006 \pm 0,001
DHZR	0,0071 \pm 0,0033	0,042 \pm 0,014
DHZR5'MP	n,d,	n,d,
DHZOG	0,0020 \pm 0,0001	0,023 \pm 0,008
DHZROG	n,d,	n,d,
DHZ7G	0,040 \pm 0,011	0,45 \pm 0,13
DHZ9G	0,0020 \pm 0,0000	0,091 \pm 0,037
<i>DHZ</i> -typy	0,051 \pm 0,011	0,61 \pm 0,12
<i>iP</i>	0,036 \pm 0,008	0,19 \pm 0,01
<i>iPR</i>	0,13 \pm 0,05	0,52 \pm 0,14
<i>iPR5'MP</i>	0,029 \pm 0,001	0,90 \pm 0,23
<i>iP7G</i>	0,41 \pm 0,04	4,89 \pm 1,22
<i>iP9G</i>	0,032 \pm 0,008	0,66 \pm 0,17
<i>iP</i> -typy	0,61 \pm 0,11	7,16 \pm 1,48

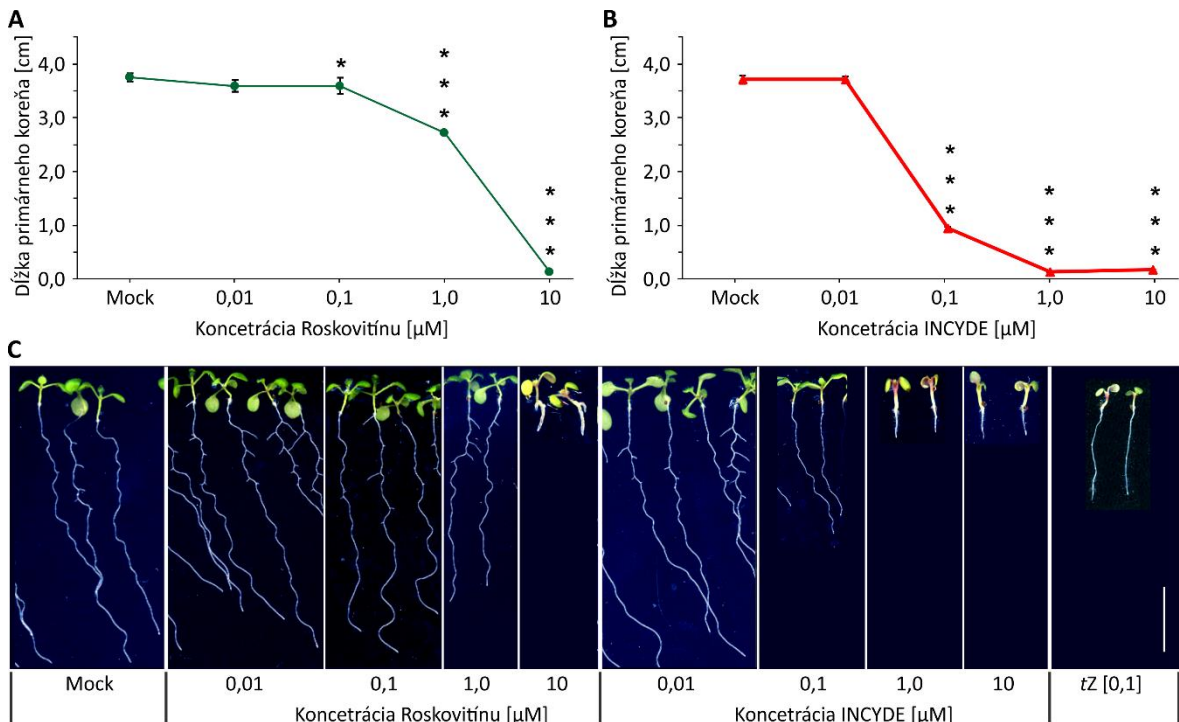
* n.d. – nedetekované

4.2 Efekt syntetických inhibítorov na metabolizmus cytokinínov v koreňoch

Ďalším cieľom práce bol výskum zameraný na špecifické ovplyvňovanie vytypovaných CK biosyntetických dráh pomocou syntetických inhibítorov. Vplyv vybraných CK inhibítorov (INCYDE a Roskovitín) bol testovaný z pohľadu inhibície rastu primárneho koreňa a šírenia CK signálu.

4.2.1 Stanovenie účinnej koncentrácie inhibítorov

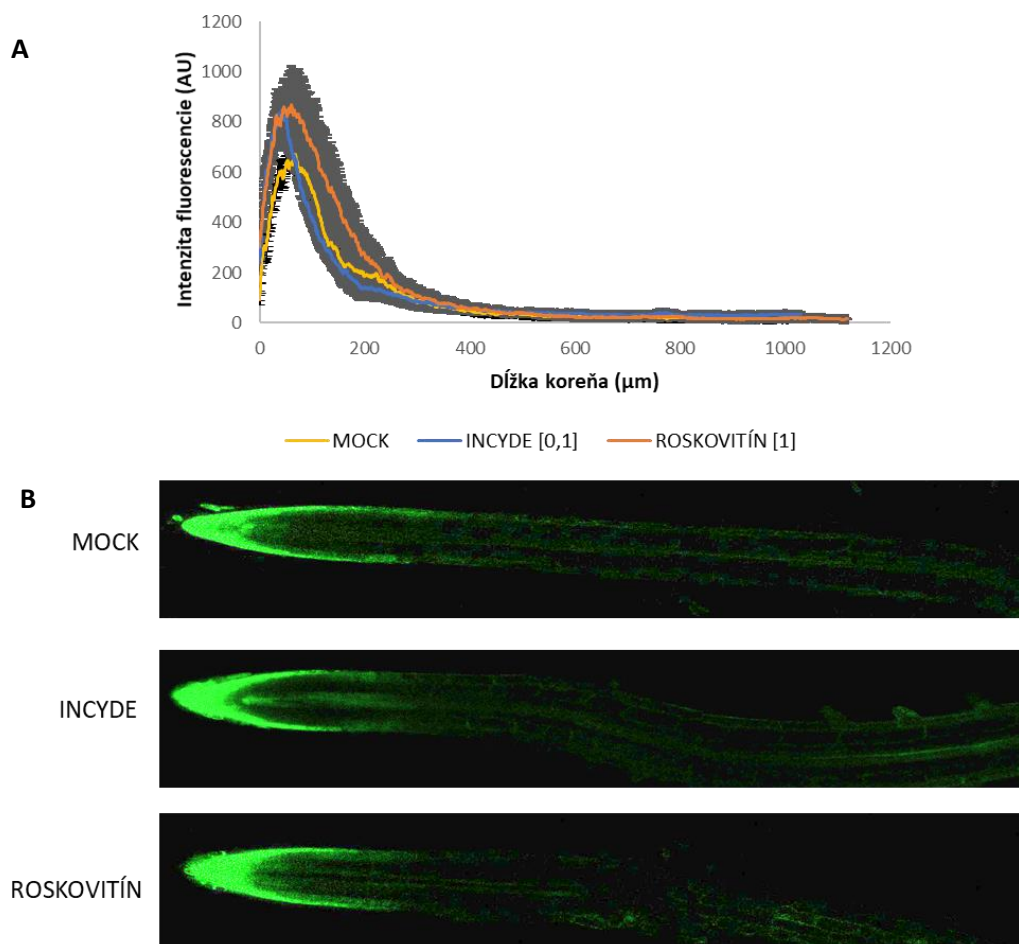
Na začiatku bola stanovená koncentrácia inhibítorov, ktorá negatívne ovplyvnila rast koreňového systému. Inhibícia rastu primárneho koreňa bola robená na koreňoch rastlín *Ath-Col-0*, ktoré rástli na médiu ošetrenom syntetickými inhibítormi po dobu 8 dní. Boli zistené požadované koncentračné hladiny účinku jednotlivých inhibítorov (INCYDE, Roskovitín) na fenotyp ako ukazujú výsledky na *Obr. 18*. Ako kontrola bolo použité ½ MS médium s 0,08% DMSO. *tZ* o koncentrácii 100 nM bol v tomto prípade použitý ako pozitívna kontrola. Bolo zistené, že INCYDE dosahuje účinnosti v 100nM koncentrácii. Účinnosť v tomto prípade je zhodná s *tZ*. V prípade Roskovitínu bol zistený výraznejší inhibičný účinok na dĺžku primárnych koreňov v koncentrácii 1 μ M.



Obr. 18. Zisťovanie účinnej koncentrácie použitého inhibítora. (A-B) Test závislosti dĺžky primárnych koreňov na koncentrácii použitých inhibítorov – Roskovitínu (A) a INCYDE (B). Testovaná koncentračná škála bola 10 nM - 100 μ M - 1 μ M - 10 μ M, kontrola ½ MS médium s 0,08% DMSO a *tZ* o koncentrácii 100 nM. Výsledky fenotypizácie boli spracované a štatisticky vyhodnotené pomocou *t*-testu (* p < 0.05, *** p < 0.001; počet meraných koreňov, n = 18-20) so signifikantným výsledkom. (C) Ukážky výrezov skenov, ktoré poslúžili k vyhodnoteniu presných dĺžok primárnych koreňov v programe ImageJ. Úsečka odpovedá dĺžke koreňa 1 cm.

4.2.2 Štúdium vplyvu inhibítorov na cytokinínový signaling

Účinné koncentrácie inhibítorov, ktoré boli zistené v predchádzajúcom teste, boli použité ku štúdiu vplyvu Roskovitínu a INCYDE na cytokinínový signaling šírený v koreňovej špičke. Konfokálna mikroskopia bola robená na 5-dňových rastlinách mutanta *TSCn:GFP* po 16 hodinovej inkubácii v tekutom MS médiu s pridanými syntetickými inhibítormi (100nM INCYDE alebo 1μM Roskovitínu). Po nasnímaní jednotlivých koreňov bola urobená kvantifikácia fluorescence z poriadenej fotografií v programe ImageJ, a to na ploche koreňa, tak aj v pericykle, nakoľko je dokázané, že intenzity fluorescence sa môžu v týchto oblastiach líšiť. Kvantifikácia bola robená pre *TSCn*, kde zachytávame prevažne cytokinínové signalizácie. Na *Obr. 19*. vidíme závislosť intenzity fluorescence GFP na dĺžke koreňa reprezentujúcu cytokinínovú signalizáciu a výslednú signalizáciu v koreňoch ošetrených INCYDE, Roskovitínom a 0,1% DMSO ako kontrolou. Z *Obr. 19B*



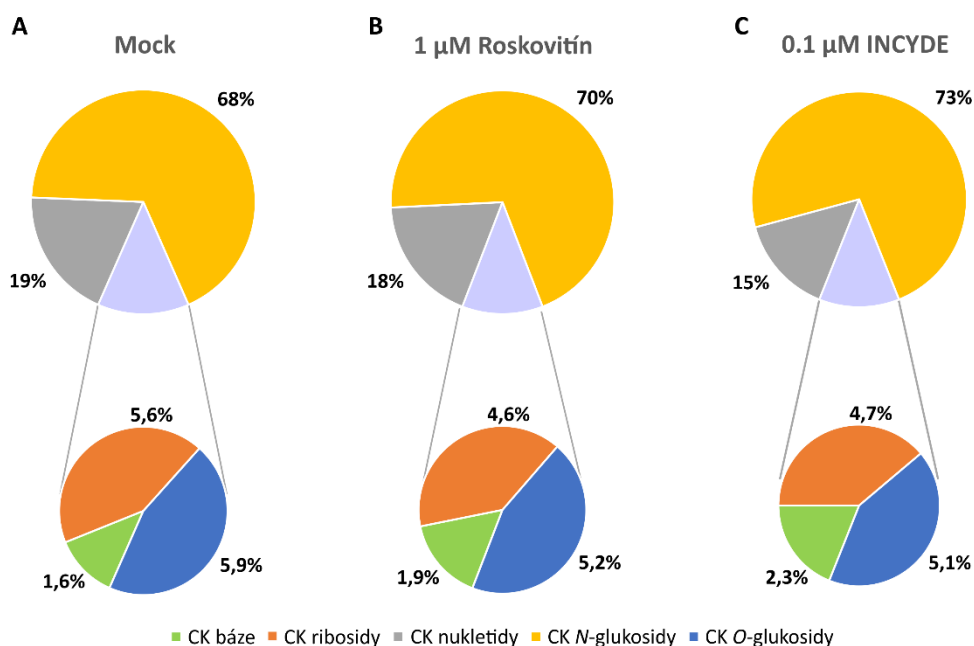
*Obr. 19. Závislosti intenzity fluorescence na dĺžke koreňa po použití *TSCn:GFP* po ošetreniach syntetickými inhibítormi- INCYDE [0,1μM] a Roskovitín [1μM]. Pre potreby tlače bol všetkým fotkám z konfokálneho mikroskopu v rovnakom pomere upravený jas a kontrast.*

je zrejmé, že signalizácia sa po ošetrení jednotlivých syntetických inhibítorov líši v rámci snímania kalyptry, meristematickej a elongačnej zóny pozdĺž prokambia.

4.2.3 Vplyv syntetických inhibítorov na cytokinínové profily

4.2.3.1 Rastliny *Arabidopsis* ošetrené syntetickými inhibítormi

V ďalšom kroku bolo zisťované, ako syntetické inhibítory ovplyvňujú CK metabolismus. Profilovanie bolo robené z celých rastlín *Ath-Col-0*, ktoré rástli po dobu 8-dní na $\frac{1}{2}$ MS médiu ošetrenom syntetickými inhibítormi (INCYDE a Roskovitínom) o rôznych koncentráciách. Koncentračná rada bola zvolená na základe testov inhibície rastu primárneho koreňa (kapitola 4.2.1.) od 10nM do 10 μ M. Na *Obr. 20* je ukázaná CK distribúcia pre vybrané účinné koncentrácie použitých inhibítorov ako je ukázané vo výsledkoch fenotypizácie (*Obr. 18*), v prípade INCYDE sa jednalo o 100nM koncentráciu a u Roskovitínu o 1 μ M koncentráciu. V oboch prípadoch pozorujeme nemennú distribúciu o podobnom rozložení metabolitov, pričom najväčšie zastúpenie vidíme v *N*-glukosidoch a najmenšie v cytokinínových bázach. Až 10-násobné zvýšenie aplikovaných koncentrácií inhibítorov mení metabolické profily CKs. *Príloha B* ukazuje všetky grafy s testovanými koncentraciami INCYDE a Roskovitínu, na ktorých vidíme vplyv na metabolizmus

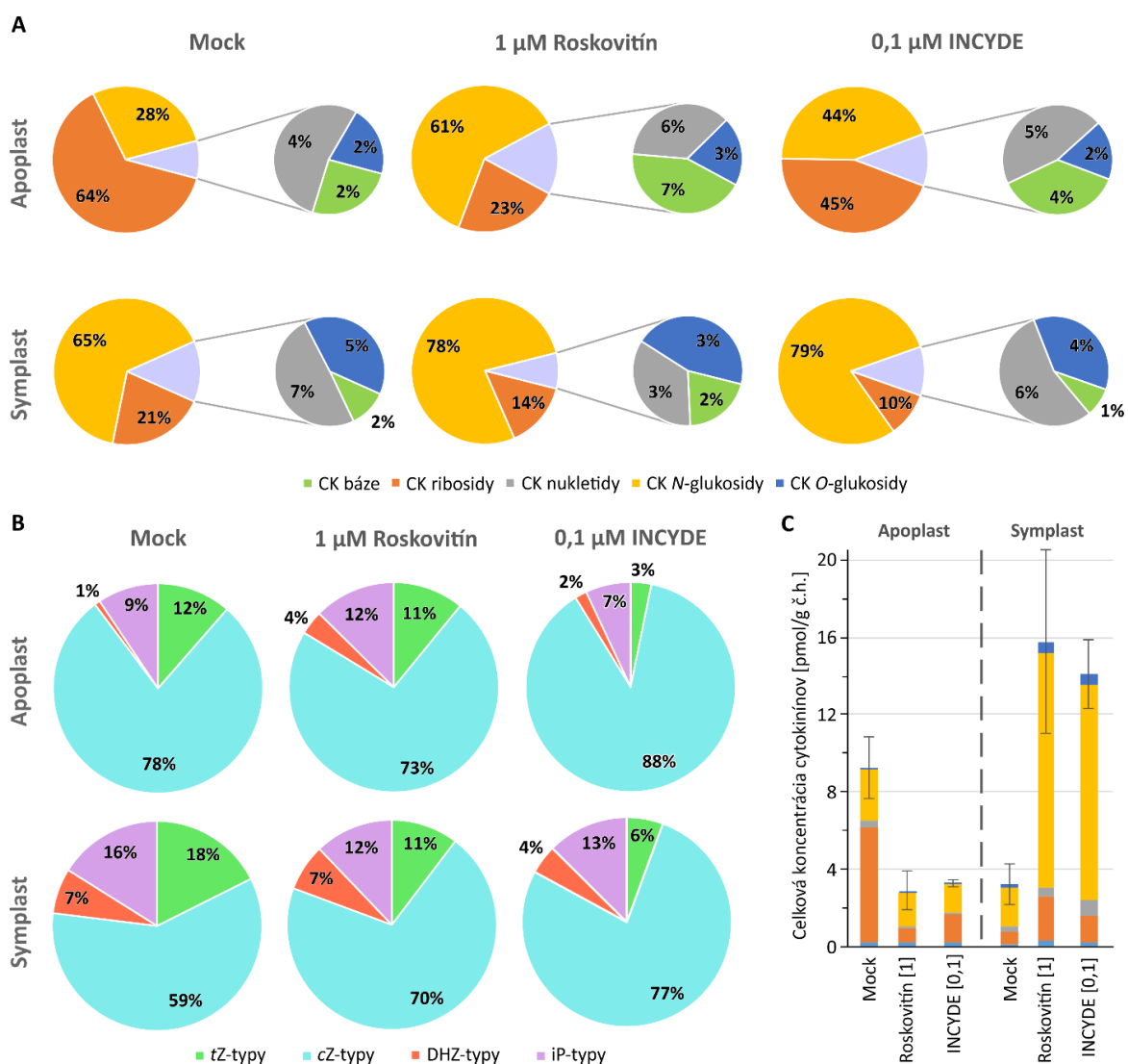


Obr. 20. Distribúcia cytokinínových metabolitov (%) u 8-dňových rastlín po aplikácii syntetických inhibítorov pri ich účinnej koncentrácii 1 μ M Roskovitínu (B) a 100nM INCYDE (C). Ako kontrola bolo CK profilovanie robené z celých rastlín *Ath-Col-0*, ktoré rástli po dobu 8-dní na $\frac{1}{2}$ MS médiu s DMSO (A, Mock).

cytokinínov oproti kontrole. Podobne možno zhrnúť aj profily CK-typov (Príloha C), kedy sa opäť mení ich metabolické zastúpenie až pri najvyšších koncentráciách. Je teda prekvapivé, že testované koncentrácie inhibítorov, ktoré sú účinné v inhibičnom teste rastu primárneho koreňa, nemajú vplyv na celkový CK metabolismus v rastlinách *Ath-Col-0*.

4.2.3.2 Izolácia symplastu a apoplastu z rastlín ošetrovaných syntetickými inhibítormi

Izolácie boli robené z koreňov 8-dňových rastlín *Ath-Col-0*, ktoré rástli na ½ MS médiu ošetrovanom syntetickými inhibítormi (100nM INCYDE, 1µM Roskovitín). Ako kontrola bolo použité ½ MS médium s prídavkom 0,1% DMSO. Z grafov na Obr. 21. je viditeľná



Obr. 21. Distribúcia (%) cytokinínových metabolitov (A) a ich typov (B) a celková koncentrácia endogénnych cytokinínov (C) v izolátoch apoplastu a symplastu po ošetrovaní syntetickými inhibítormi (100nM INCYDE a 1µM Roskovitínom). Ako kontrola bolo použité ½ MS médium s 0,1% DMSO (Mock). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SD (n=3).

značná variabilita medzi apoplastickými a symplastickými frakciami, ale taktiež medzi použitými syntetickými inhibítormi. U apoplastických frakcií pozorujeme v porovnaní s kontrolou zníženie zastúpenia ribosidov u INCYDE i Roskovitínu, ktoré je kompenzované zvýšením CK *N*-glukosidov. Dochádza tiež k 2-4 násobnému nárastu v zastúpení CK báz (*Obr. 21A*). U symplastických frakcií pri ošetrovaní oboma inhibítormi sa zvyšuje obsah CK *N*-glukosidov a CK ribosidov (*Obr. 21C*), ich podiel na celkovom zastúpení sa ale líši (*Obr. 21A*). Po aplikácii INCYDE rozloženie CK báz, *O*-glukosidov a nukleotidov zostáva v symplaste pomerne konštantné. Avšak u symplastu izolovaného z rastlín rastúcich na Roskovitíne je podiel CK nukleotidov 2x znížený.

Zmena v profiloch u CK typov nie je výrazná, ale je tu zrejмый trend nárastu zastúpenia *cZ*-typov hlavne v symplastickej frakcii (*Obr. 21B*). Aj keď CK homostéza na úrovni celých rastlín po ošetrovaní účinnými koncentráciami syntetických inhibítorov nebola ovplyvnená (Kapitola 4.2.3.1), výsledky CK profilov v apoplaste a symplaste ukázali väčšiu dynamickosť a vplyv na CK metabolismus (*Príloha D*). Je zaujímavé, že celkové množstvo cytokinínov po ošetrovaní inhibítormi vykazovalo rozdielne trendy. Zatiaľčo v apoplaste bolo detekované množstvo CKs 3x nižšie, u symplastu došlo až k 5-násobnému nárastu (*Obr. 21C*).

5 DISKUSIA

Účelom tejto diplomovej práce bolo potvrdenie hypotéz o efektívnosti ovplyvnenia rastlín syntetickými inhibítormi a o možnosti izolácie symplastu a apoplastu, ktoré neboli doposiaľ skúmané na úrovni vedeckých publikácií.

Experimenty izolácie symplastu a apoplastu boli robené z 8-dňových rastlín *Ath-Col-0* podľa protokolu uvedeného v dizertačnej práci Antoniadí (2014). Pomocou vyvinutých LC-MS/MS metód boli stanovené koncentračné hladiny a distribúcia cytokinínových a auxínových metabolitov v symplaste a apoplaste izolovaných z koreňov a stonky *Arabidopsis* (Obr. 12 a Obr. 13). Objavené metabolické zastúpenie oboch fytohormonálnych skupín bolo zhodné s publikovanými profilmi cytokinínov (Novák *et al.*, 2008; Svačinová *et al.*, 2012) a auxínov (Novák *et al.*, 2012; Pěňčík *et al.*, 2018).

Bolo však zistené, že protokol je nutné optimalizovať za účelom upresnenia výsledkov profilovania rastlinných hormónov. Optimalizácia bola vzťahovaná na výber vhodného rastového média, biologického materiálu, jeho množstva, purifikáciu a normalizáciu získaných dát.

Pri výbere vhodného média bolo rozhodované medzi ½ MS médiom a plným MS médiom (Murashige and Skoog, 1962). Rastliny v oboch prípadoch vykazovali dobré výsledky. Avšak z výsledkov inhibície rastu primárneho koreňa a následných izolácií, bolo za vhodné rastové médium zvolené ½ MS médium, nakoľko dĺžka primárneho koreňa bola väčšia (Tabuľka 1), čo bolo výhodnejšie pre nasledujúce experimenty vzhľadom k množstvu biologického materiálu a k faktu, že ½ MS médium je základným používaným médiom v rastlinnej fyziológii (Bidarigh a Azarpour, 2013). V otázke vhodnosti biologického materiálu boli zvolené za vhodnejšie korene než listy z dôvodu výraznejšieho fenotypu po aplikácii syntetických inhibítorov (Obr. 18C) a jednoduchšieho metabolického profilovania vďaka absencii fotosyntetických farbív (Tarkovská *et al.*, 2014). Vzhľadom k veľkej variabilite objemov izolovaných apoplastických a symplastických frakcií (Tabuľka 2) boli výsledné CK profily normalizované na váhu vstupného rastlinného materiálu. Bolo tak dosiahnuté nižšej variability výsledkov. Veľké rozdiely v objemoch izolátov mohli byť spôsobené nedokonalým vysušením biologického materiálu po oplachu v destilovanej vode pred samotnou izoláciou. Aj keď boli cytokiníny kvantifikované metódou izotopického zried'ovania (Rittenberg a Foster, 1940) za pomoci stabilne izotopicky značených štandardov (Novák *et al.*, 2008), prídavok týchhto interných štandardov bol možný až v extrakčnom kroku po záchyťe frakcií. Izolácia symplastu

a apoplastu je teda zaťažená chybou. Preto sa naskytuje riešenie v podobe navýšenia biologických opakovaní a zameranie sa na sledovanie výťažnosti, pričom vhodným riešením by mohlo byť stanovenie celkových proteínov vo vzorke pomocou napr. pomocou Bradfordovej metódy.

Veľká variabilita však nebola zistená len pri kroku izolácie symplastu a apoplastu. Endogénne koncentračné hladiny cytokinínov stanovené pomocou LC-MS/MS vykazovali veľké odchýlky medzi vzorkami, preto bolo pristúpené k zrážaciemu kroku. Použitie vhodného extrakčného rozpúšťadla je zásadný pre minimalizáciu možnej enzymatickej degradácie, zníženie hladín interferujúcich látok a efektívnu extrakciu analytov z rastlinných tkanív (Hoyerová et al., 2006). Pre extrakciu cytokinínov z komplexných biologických matric je najviac využívaný methanol v kombinácii s rôznymi aditívami (Tarkowski *et al.*, 2004; Hoyerová et al., 2006). Preto boli izoláty najskôr zrážané do 96% methanolu, pričom boli skúmané 3 rôzne navážky biologického materiálu použitého k izolácii symplastu a apoplastu. Bolo zistené, že s narastajúcou navážkou klesá koncentrácia detekovateľných metabolitov (*Obr. 15*). Väčšie množstvo materiálu spôsobuje zvýšenie negatívneho vplyvu matrice vzorky, čo zapríčiňuje zmenšenie pomeru signálu analytu k šumu pozadia (Šimura *et al.*, 2018). Stanovovaná výsledná koncentrácia analytov je potom nižšia a neodpovedá skutočným endogénnym hladinám (Svačinová *et al.*, 2012). Výhoda prezrážania izolátov v priebehu ich zberu do mikroskúmavky bola preukázaná porovnaním CK profilov vo vzorkách s prídavkom a bez prídavku okyseleného methanolu (*Obr. 16*). Aplikácia tohto kroku viedla pravdepodobne ku zvýšeniu účinnosti extrakcie a zamedzeniu enzymatickej degradácie vzoriek (Ljung *et al.*, 2010). Z tohto dôvodu boli ďalšie experimenty robené s navážkami v rozmedzí 0,1-0,2 g č.h. za použitia okyseleného methanolu ako extrakčného činidla.

Izoláty symplastu a apoplastu boli taktiež podrobené skúmaniu čistoty pomocou Western- blottingu. Bola použitá protilátka proti cytozolárnemu markeru aktínu, ktorá by podľa hypotézy mala byť detekovateľná len v symplastickej frakcii a v apoplastickej frakcii by sa nemala vôbec vyskytovať (osobná komunikácia s firmou Agrisera). Z výsledkov na *Obr. 14* je zrejmé, že táto hypotéza bola potvrdená, a protilátka bola detekovaná len v symplastickej frakcii. To znamená, že apoplast nebol kontaminovaný symplastom. Avšak bolo spozorované, že výrazný signál v symplastickej frakcii je detekovaný posunom o molekulárnu hmotnosť oproti kontrole. Táto odlišnosť mohla byť spôsobená väzbou primárnej protilátky na štiepny produkt cieľového proteínu Aktínu kvôli vysokej proteolytickej aktivite zapríčinenej narušením rastlinného pletiva pri izolácii. Detekcia

čistoty apoplastickéj frakcie však nebola urobená, nakoľko doposiaľ neexistuje vhodná protilátka pre marker vyskytujúci sa unikátne v apoplastickéj tekutine. Existujú však štúdie (Yu *et al.*, 1999), ktoré potvrdzujú 10% kontamináciu symplastom, no doposiaľ nemáme možnosť protilátky, ktorá by to potvrdila. Dá sa len polemizovať o možnosti využitia napr. Bradfordovej metódy na zistenie množstva proteínov vo vzorke.

Výsledné profily CK metabolitov v izolátoch apoplastu a symplastu (*Tabuľka 3*) odpovedajú známym biosyntetickým dráham (Spíchal, 2012). Taktiež distribúcia CK metabolických skupín (*Obr. 17*) a vysoký podiel CK *N*-glukosidov je v súlade s publikovanými profilmi pre celé korene (Svačinová *et al.*, 2012). Je dôležité poznamenať, že detailné CK profily pre symplast a apoplast neboli doposiaľ publikované.

Po vykonaní všetkých optimalizačných krokov bolo prístupné k experimentom so syntetickými inhibítormi. Pre účely tejto diplomovej práce boli vybrané syntetické inhibítory blokujúce metabolizmus cytokinínov. INYCYDE ako blokátor degradácie pomocou CKX (Zatloukal, 2008) a Roskovitín ako inhibítor *N*-glykosilačných dráh v rastline (Dwivedi *et al.*, 2010). Inhibítory v týchto experimentoch boli pridávané priamo do rastového média a rastliny na nich rástli po dobu 8-dní.

Prvým krokom bolo zistenie účinných koncentrácií daných inhibítorov, pri ktorých rastliny vykazovali výrazný fenotyp. Zo štúdie Koukalová (2015) bolo zistené, že INYCYDE dosahuje účinnej inhibičnej koncentrácie v 100 nM a zo štúdie Monanté a Menand (2013) bola zistená účinná koncentrácia 1 μM Roskovitínu. Z tohto dôvodu bola zvolená koncentračná rada od 10nM až po 10 μM koncentrácie. Ako pozitívna kontrola pre tieto experimenty bol zvolený 100nM *tZ*. Literatúra uvádza, že vysoké hladiny cytokinínov môžu spôsobovať oxidačné poškodenie rastlín a navodzovať apoptózu už pri koncentráciách v rádoch desiatok mikromólov (Novák *et al.*, 2013; Carimi *et al.*, 2005). Uskutočneným experimentom (*Obr.18.*) bolo potvrdené, že rastliny pri týchto účinných koncentráciách inhibítorov (100nM INYCYDE a 1 μM Roskovitín) vykazovali zníženú schopnosť rastu, až zakrslosť koreňového systému. Tento fenotypový znak naznačuje, že boli zablokované cytokinínové degradačné dráhy, čo viedlo ku zvýšeniu koncentrácie aktívnych báz, a tým pádom rastlina strácala vitalitu (Deikman a Hammer, 1995).

Ďalej bol skúmaný vplyv inhibítorov na signalizáciu cytokinínov. Pre tieto účely bola využitá konfokálna mikroskopia s použitím mutantných línií *TSCn:GFP*. Pri použití tejto línie pozorujeme signálne dráhy cytokinínov v dĺžke koreňa vrátane peryciklu (Zürcher *et al.*, 2013). Ako ukazujú výsledky na *Obr. 19.*, každý zo skúmaných inhibítorov má inú distribúciu signalizačných dráh. Aktívne signalizačné dráhy po pôsobení INYCYDE

sú rozložené najviac v koreňovej špičke a pericykle, pretože to sú časti koreňa, kde sa najviac vyskytujú metabolicky degradačné cesty kontrolované CKX, na ktoré INCYDE účinkuje (Antoniadi *et al.*, 2015). Prepojenie účinkov Roskovitínu s CK signalizáciou a *N*-glykosiláciou nie je z uvedených výsledkov úplne jasné. Pozorujeme *TSCn:GFP* signalizáciu prevažne v koreňovej špičke a pozdĺž pericyklu. V rovnakých častiach koreňa (napr. v koreňovej špičke) sa predpokladá lokalizácia *N*-glykosilačných dráh, čo by malo súvisieť s koncentračnými maximami cytokinínov a celkovou CK homeostázou (Antoniadi *et al.*, 2015).

Ďalej bol študovaný vplyv syntetických inhibítorov na cytokinínové profily u ošetrovaných rastlín. Prekvapivo sa distribúcia CK nezmenila u rastlín, ktoré vykazovali zníženú schopnosť rastu po aplikácii 100nM INCYDE a 1μM Roskovitínu (*Obr. 20*). Zmeny v CK profiloch boli detekované až u rastlín pestovaných s prídavkom inhibítorov vo vyšších koncentráciách (*Príloha B*). Zaujímavým faktom však je, že INCYDE ako syntetický inhibítor na cytokinínovej báze (Zatloukal, 2008) vykazuje so zvyšujúcimi sa koncentraciami väčší podiel *cZ* typov metabolitov a znižuje sa podiel *iP* a *tZ* typov (*Príloha C*). Tento fakt môže byť spôsobený zvýšeným stresom v rastline (Schäfer *et al.*, 2015). Taktiež sa môže jednať o postupné zastavovanie CK biosyntézy z dôvodu zvýšenej inaktívácie aktívnych cytokinínov pomocou glykosilácie, čo je výsledkom čiastočnej kompenzácie inhibovaných CKX dráh (Werner a Schmülling, 2009). Doposiaľ sú to však len domnienky, nakoľko stále chýbajú v odborných publikáciách detailné informácie o tom, aké množstvo cytokinínov je odbúravané metabolickou CKX cestou. V prípade Roskovitínu sme inhibíciu *N*-glukosilácie na úrovni CK metabolitov nepozorovali tak ako v inej štúdií (Dwivedi, 2010). Fenotyp však môže byť spôsobený toxickou koncentráciou alebo ovplyvnením radom ďalších fyziologických procesov (Planchais *et al.*, 2000).

Popri experimentoch vplyvov syntetických inhibítorov bola urobená izolácia symplastu a apoplastu z rastlín ošetrovaných týmito látkami (*Obr.21*). Bolo skúmané, ako sa menia zastúpenia metabolitov cytokinínov. Bolo zistené, že aj keď homeostáza CK na úrovni celých rastlín po ošetrovaní účinnými koncentraciami syntetických inhibítorov nebola ovplyvnená, výsledky CK profilov v apoplaste a symplaste ukázali väčšiu dynamickosť a vplyv na CK metabolizmus. Toto zistenie tak ako v predchádzajúcom prípade nie je možné jednoznačne definovať, nakoľko je to v rozpore s očakávaním podľa dostupných článkov (Aremu *et al.*, 2015; Monanté a Menand, 2013). Nedokážeme posúdiť, či sa jedná o inhibičný alebo toxický účinok týchto inhibítorov, preto sa ponúka možnosť opakovania tohto experimentu.

6 ZÁVER

Diplomová práca naplnila stanovené experimentálne ciele - štúdium vplyvu syntetických inhibítorov na dynamické zmeny homeostázy v rastlinnom tele, zoznámenie sa s technikami izolácie symplastu a apoplastu a metabolické profilovanie rastlinných hormónov pomocou metódy kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou.

V metódach techník izolácie symplastu a apoplastu bolo uskutočnených niekoľko optimalizačných krokov pre účely presnejšieho fytohormonálneho profilovania. Bolo zistené, že vyhovujúcim médiom pre rast rastlín a následnú izoláciu symplastu a apoplastu je $\frac{1}{2}$ MS médium a vhodným biologickým materiálom je koreňový systém 8-dňových rastlín, pričom izoláty je vhodné zachytávať do okyseleného metanolu s internými štandardami pred samotnou purifikáciou a kvantifikáciou. Taktiež bolo zistené, že vhodným postupom pri vyhodnocovaní je vzťahovanie látkového množstva na váhu rastlinného materiálu a nie na objem izolovanej frakcie.

Izolácie symplastu a apoplastu boli prevedené úspešne. Boli v nich zahrnuté aj kroky štúdia účinkov syntetických inhibítorov. Boli objavené koncentrácie INCYDE a Roskovitínu prejavujúce sa po fenotypovej stránke v účinku na signálne dráhy. Fenotypovo rastliny vykazovali zakrpatený vzrast. Konfokálna mikroskopia, ako nástroj použitý na detekciu signálnych dráh a transportu týchto látok potvrdila ich rozloženie do metabolických miest v tele rastlín. V prípade použitého INCYDE vidíme účinnosť tejto látky ako fenotypovo, tak aj metabolicky, no v prípade Roskovitínu pozorujeme účinky hlavne na úrovni fenotypu. Tento jav môže byť spôsobený tým, že Roskovitín je látka primárne určená na inhibíciu bunkového cyklu, preto nemusí priamo ovplyvňovať metabolizmus cytokinínov. V tomto prípade môžeme čisto len diskutovať o tom, či sa jedná o inhibičnú dávku alebo pre rastlinu toxickú látku. Každopádne, na presné potvrdenie týchto domnienok by bolo potrebné vykonať niekoľko ďalších, nadväzujúcich experimentov.

7 ZOZNAM LITERATÚRY

- Alfonso Y. B. (2014) Symplastic intracellular transport from a developmental perspective. *Journal of Experimental Botany*, 65(7), 1857-1863.
- Antoniadi I. (2014) Cytokinin metabolit distribution at tissue- and cell-specific levels. Dizertačná práca. Imperial College London, London, UK.
- Antoniadi I., Plačková L., Simonovik B., Doležal K., Turnbull C., Ljung K., Novák O. (2015) Cell-type-specific cytokinin distribution within the Arabidopsis primary root apex. *Plant Cell*, 27, 1955-1967.
- Aremu A.O., Masondo N.A., Sunmonu T.O., Kulkarni M.G., Zatloukal M., Spíchal L., Doležal K., Van Staden J. (2014) A novel inhibitor of cytokinin degradation (INCYDE) influences the biochemical parameters and photosynthetic apparatus in NaCl-stressed tomato plants. *Planta*, 240(4), 877-889.
- Aremu A.O., Stirk W.A., Masondo N.A., Plačková L., Novák O., Pěňčík A., Zatloukal M., Nisler J., Spíchal L., Doležal K., Finnie J.F., Van Staden J. (2015) Dissecting the role of two cytokinin analogues (INCYDE and PI-55) on *in vitro* organogenesis, phytohormone accumulation, phytochemical content and antioxidant activity. *Plant Science*, 238, 81-94.
- Bajguz A., Pietrowska A. (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70(8), 957-969.
- Bidarigh S., Azarpour E. (2013) Evaluation of the effect of MS medium levels on rooting in micro cuttings of tea (*Camellia sinensis* L.) under in-vitro culture condition. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 8(1), 24-28.
- Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Lo Schiavo F. (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, 216(3), 413- 421.
- Coneco G., Galon L. (2011) Plasmodesmata: Symplastic transport of herbicides within the plant. In *Theory and Applications* (Soloneski and Larramendy, eds.), IntechOpen, DOI: 10.5772/12956.
- Cleland R. (1971) Cell Wall Extension. *Plant Physiology*, 22(1), 197-222.
- Davies P.J. (2010) *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, pp. 204-710, Springer, New York, USA.
- Deikman J., Hammer P.E. (1995) Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 108(1), 47-57, ISSN1532-2548.

- Delbarre A., Muller P., Imhoff V., Guern J. (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*, 198, 532-541.
- Délye C., Jasieniuk M., Le Corre V. (2013) Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29, 649-658.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435, 441-445.
- Galuszka P., Frébortová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmölling T., Frébort I. (2004) Cytokinin oxidase/ dehydrogenase genes in barley and wheat Cloning and heterologous expression. *European Journal of Biochemistry*, 271, 3990-4002.
- Hager A., Menzel H., Krauss A. (1971) Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth. *Planta*, 100(1), 47-75.
- Hou B., Lim E.K., Higgins G., Bowles D. J. (2004) N-Glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 47822-47832.
- Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P.I., Kocábek T., Solcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006) Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry*, 67, 1151-1159.
- Imhoff V., Muller P., Guern J., Delbarre A. (2000) Inhibitors of the carrier-mediated influx of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*, 210, 580-588.
- Kakimoto, T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiology*, 42, 677-685.
- Kepinski S., Leyser O. (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435, 446-451.
- Köllmer I., Novák O., Strnad M., Schmölling T., Werner T. (2014) Overexpression of cytosolic cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX7) from Arabidopsis cause specific changes in root growth and xylem differentiation. *Plant Journal*, 78, 359-371.
- Koprna R., Diego N.D., Dundaláková L., Spíchal L. (2016) Use of cytokinins as agrochemicals. *Bioorganic and Medical Chemistry*, 24(3), 484-92.
- Korasick D.A., Enders T.A., Strader L.C. (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2541-2555.

- Koukalová V. (2015) Vliv modulace hladin cytokininů na fenom a proteom rostlin. Bakalářská práce, Ústav molekulární biologie a radiobiologie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně.
- Kubiasová K., Mik V., Nisler J., Hönig M., Husičková A., Spíchal L., Pěkná Z., Šamajová O., Doležal K., Plíhal O., Benková E., Strnad M., Plíhalová L. (2018) Design, synthesis and perception of fluorescently labeled isoprenoid cytokinins. *Phytochemistry*, 150, 1-11.
- Kubiasová K., Montesinos J.C., Šamajová O., Nisler J., Mik V., Plíhalová L., Novák O., Mrhavý P., Zalabák D., Berka K., Doležal K., Galuszka P., Šamaj J., Strnad M., Benková E., Plíhal O., Spíchal L. (2019) Cytokinin fluoroprobe and receptor CRE1/AHK4 localize to both plasma membrane and endoplasmic reticulum. DOI: 10.1101/744177.
- Lilley J.L., Gee C.W., Sairanen I., Ljung K., Nemhauser J.L. (2012) An endogenous carbon-sensing pathway trigger increased auxin flux and hypocotyl elongation. *Plant Physiology*, 160(4), 2261-2270.
- Ljung K., Sandberg G., Moritz T. (2010) Methods of plant hormone analysis. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Ed 3 (Davies, ed.), pp. 717-740, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ljung K. (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140(5), 943-950.
- López- Millán A. F., Morales F., Abadía A., Abadía J. (2001) Iron deficiency-associated changes in the composition of the leaf apoplastic fluid from field-grown pear (*Pyrus communis* L.) trees. *Journal of Experimental Botany*, 52(360), 1489-1498.
- Lv J., Christie P., Zhang S. (2019) Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges. *Environmental Science Nano*, 6, 41-59.
- Mano Y., Nemoto K., Suzuki M., Seki H., Fujii I., Muranaka T. (2010) The AMI1 gene family: indol-3-acetamid hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 25-32.
- Monanté M.H., Menand B. (2013) ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *Journal of Experimental Botany*, 64(14), 4361-4374.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15.

- Niemann M. C.E., Weber H., Hluska T., Leonte G., Anderson S.M., Novák O., Senes A., Werner T. (2018) The cytokinin oxidase/dehydrogenase CKX1 is a membrane- bound protein requiring homooligomerization in the endoplasmatic reticulum for its cellular activity. *Plant Physiology*, 176, 2024-2039.
- Novák J., Pavlů J., Novák O., Nožková-Havláčková V., Špundová M., Hlavinka J., Koukalová Š., Skalák J., Černý M., Brzobohatý B. (2013) High cytokinin levels induce a hypersensitive-like response in tobacco. *Annals of Botany*, 112, 41-55.
- Novák O, Hauserová E, Amakorová P, Doležal K, Strnad M (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 69(11), 2214-2224.
- Novák O., Antoniadis I., Ljung K. (2017) High-resolution cell-type specific analysis of cytokinins in sorted root cell populations of *Arabidopsis thaliana*. In *Plant Hormones: Methods and Protocols, Methods in molecular biology*, 1497 (Kleine-Vehn and Sauer, eds.), pp. 231-248, Springer, New York, USA.
- Novák O., Hényková E., Sairanen I., Kowalczyk M., Pospíšil T., Ljung K. (2012) Tissue specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant Journal*, 72, 523-536.
- Osugi A., Sakakibara H. (2015) Q&A :How do plants respond to cytokinins and what is their importance?. *BCM Biology*, 13, 102.
- Park J., Lee Y., Martinoia E., Geisler M. (2017) Plant hormone transporters: what we know and what we would like to know. *BMC Biology*. DOI 10.1186/s12915-017-0443-x.
- Peer W.A., Blakeslee J.J., Yang H., Murphy A.S. (2011) Seven things we know about auxin transport. *Molecular Plant*, 4(3), 487-504.
- Pěňčík A., Casanova-Sáez R., Pilařová V., Žukauskaitė A., Pinto R., Luis Micol J., Ljung K., Novák O. (2018) Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 69, 2569-2579 .
- Powers S.K., Strader L.C. (2016) Up in the air: Untethered Factors of Auxin Response. *F1000Research* 5 (F1000 Faculty Rev), 133.
- Quareshy M., Prusinska J., Li J., Napier R. (2017): A cheminformatics review of auxins as herbicides. *Journal of Experimental Botany*, 69, 265-275.
- Ranocha P., Denancé N., Vanholme R., Freydier A., Martinez Y., Hoffmann L., Köhler L., Pouzet C., Renou J.P., Sundberg B., Boerjan W., Goffner D. (2010) Walls are thin 1 (WAT1), an *Arabidopsis* homolog of *Medicago truncatula* NODULIN21, is a tonoplast

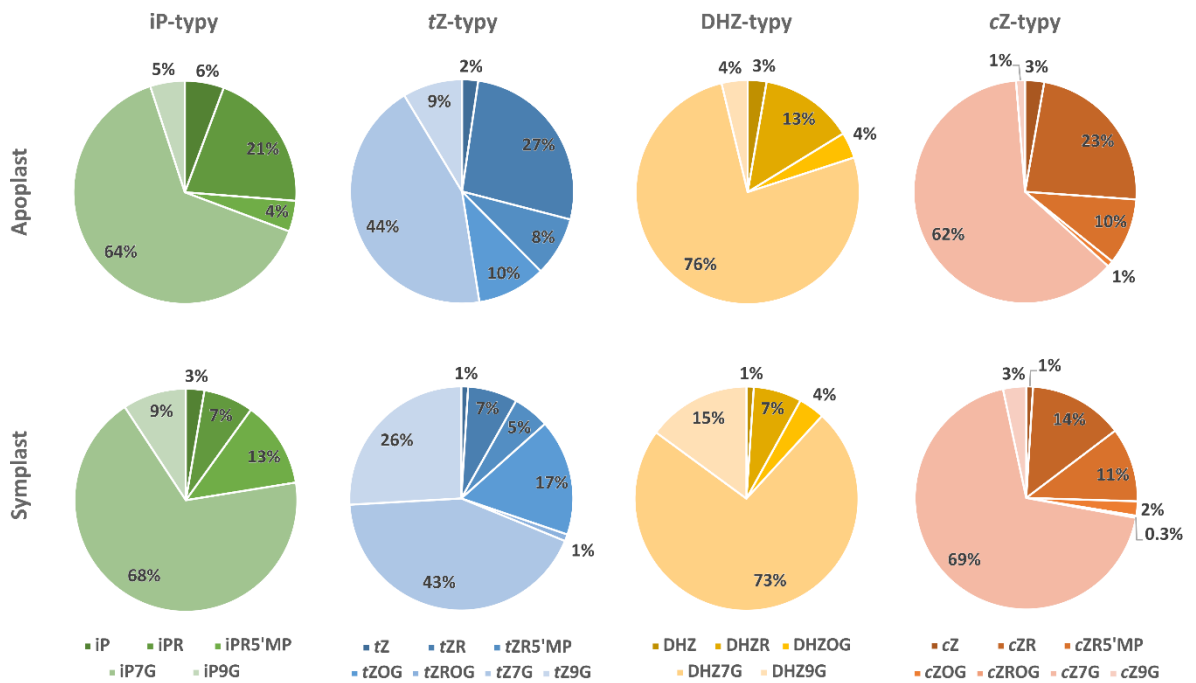
- localized protein required from secondary wall formation in fibres. *Plant Journal*, 63, 469-483.
- Ranocha P., Dima O., Nagy R., Felten J., Corratgé-Faillie C., Novák O., Morreel K., Lacombe B., Martinez Y., Pfrunder S., Jin X., Renou J.P., Thibaud J.B., Ljung K., Fischer U., Martinoia E., Boerjan W., Goffner D. (2013) Arabidopsis WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nature Communications*, 4, 2625.
- Rittenberg D., Foster L. (1940) A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 133, 727–744.
- Robert H.S., Friml J. (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology*, 170.
- Rubery P.H. (1990) Phytotropins: receptors and endogenous ligands. *Symposia of the Society for Experimental Botany*, 44, 119-146.
- Sairanen I., Novák O., Pěňčík A., Ikeda Y., Jones B., Sandberg G., Ljung K (2012) Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF protein in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24(12), 4907-4916.
- Sakurai N. (1998) Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *Journal of Plant Research*, 111, 133-148.
- Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. (2013) Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2565-2577.
- Schäfer M., Brütting C., Meza-Canales I.D., Großkinsky D.K., Vankova R., Baldwin I.T., Meldau S. (2015) The role of *cis*-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions. *Journal of Experimental Botany*, 66(16), 4873-4884.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Manns I. B. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of Plant Research*, 116, 241-252.
- Skalický V., Kubeš M., Napier R., Novák O. (2018) Auxins and cytokinins-the role of subcellular organization on homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3115.
- Spíchal L. (2012) Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*, 39, 267-284.

- Svačinová J., Novák O., Plačková L., Lenobel R., Holík J., Strnad M., Doležal K. (2012) A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods*, 8,17.
- Šimura J., Antoniadou I., Široká J., Tarkowská D., Strnad M., Ljung K., Novák O. (2018) Plant hormonomics: Multiple phytohormone profiling by targeted metabolomics. *Plant Physiology*, 117, 476-489.
- Šmečilová M., Dobrušková J., Novák O., Takáč T., Galuszka P. (2016) Cytokinin-specific glycosyltransferases possess different roles in cytokinin homeostasis maintenance. *Frontier in Plant Science*, 7, 1264.
- Tarkowska D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., Rolčík J., Strnad M. (2014) Quo vadis plant hormones analysis. *Planta*, 240, 55-76.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004) Analytické metody studia cytokininů. *Chemické listy*, 98, 834-841.
- Tao J., Sun H., Gu P., Liang Z., Chen X., Lou J., Xu G., Zhang Y. (2017) A sensitive synthetic reporter for visualizing cytokinin signaling output in rice. *Plant Methods*, 13, 89.
- Wang R., Estelle M. (2014) Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 51-58.
- Werner T., Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 527-538.
- Witzel K., Shahzad M., Matros A., Mock H. P., Mühling K.H. (2011) Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. *Plant Methods*, 7, 48.
- Wulfetange K., Lomin S.N., Romanov G.A., Stolz A., Heyl A., Schmülling T. (2011) The cytokinin receptors of Arabidopsis are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*, 156, 1808-1818.
- Yamahoto K.T., Watahiki M.K., Matsuzaki J., Satoh S., Schimizu H. (2017) Space-time analysis of gravitropism in etiolated Arabidopsis hypocotyls using bioluminescence imaging of the IAA19 promoter fusion with a destabilized luciferase reporter. *Journal of Plant Research*, 130, 765-77.
- Yu Q., Tang C., Chen Z., Kuo J. (1999) Extraction of apoplastic sap from plants roots by centrifugation. *New Phytologist*, 143, 299-304.

- Zalabák D., Pospíšilová H., Šmehilová M., Mrízová K., Frébort I., Galuszka P. (2013) Genetic engineering of cytokinin metabolism: prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnology Advances*, 31, 97-117.
- Zhan X., Zhu M., Shen Y., Yue L., Li J., Gardea- Torresdey J. L., Xu G. (2017) Apoplastic and symplastic uptake of phenanthrene in wheat roots. *Environmental Pollution*, 233, 331-339.
- Zhang R., Zhang X., Wang J., Letham D.S., Mckinney S.A., Higgins T.J.V. (1995) The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an ipt gene. *Planta*, 196, 84-94.
- Zhang J., Peer W.A. (2017) Auxin homeostasis: The DAO of catabolism. *Journal of Experimental Botany*, 68, 3145-3154.
- Zhao Y. (2012) Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular Plant*, 5, 334-338.
- Zürcher E., Tavor- Deslex D., Lituiev D., Enkerli K., Tarr P.T., Müller B (2013) A robust and sensitive sythetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network in planta. *Plant Physiology*, 161, 1066-1075.
- Zürcher E., Müller B. (2016) Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function - Advances and New Insights. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 342, 1-38.

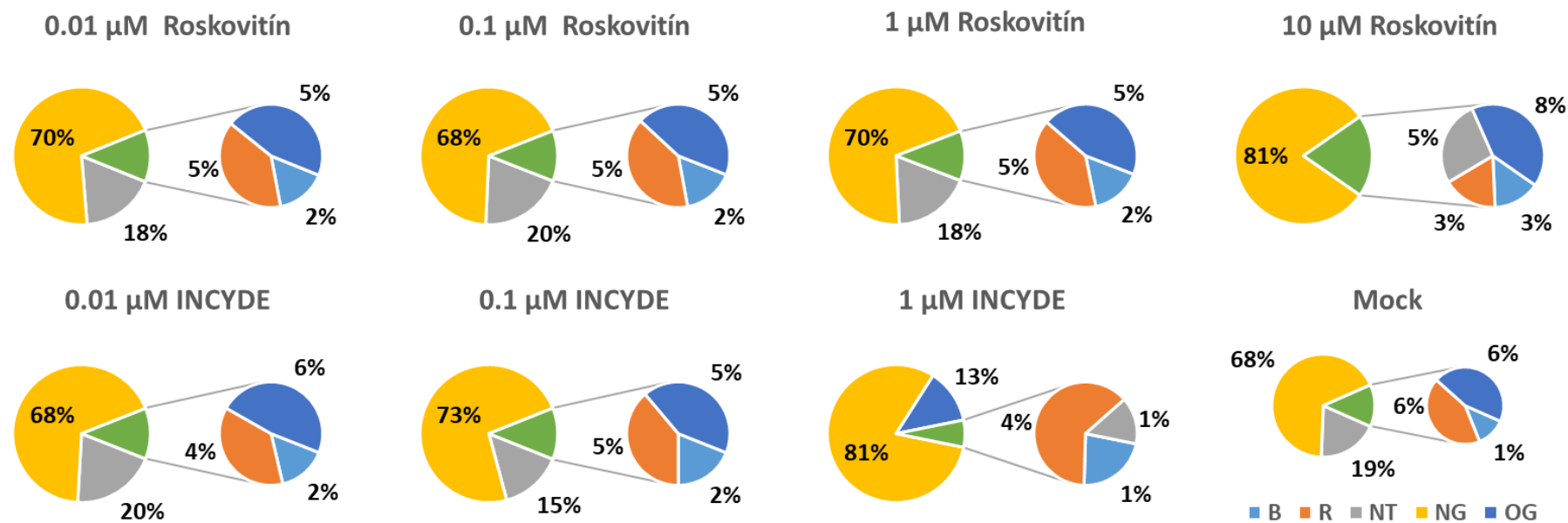
8 PRÍLOHY

Príloha A – Distribúcia (%) cytokinínových metabolitov rozdelených podľa jednotlivých CK typov vo frakciách apoplastu (A) a symplastu (B) izolovaných z koreňov 8-dňových rastlín *Ath-Col-0*. *tZ*, *trans*-zeatín; *cZ*, *cis*-zeatín; DHZ, dihydrozeatín; iP, isopenetnyladenín; R, ribosid; 5'MP, 5'-monofosfát; OG, *O*-glukosid; 7G, 7-glukosid; 9G, 9-glukosid.



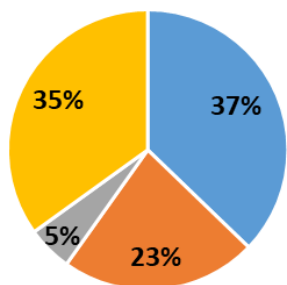
Príloha B – Distribúcia cytokinínových metabolitov (%) u 8-dňových rastlín *Ath-Col-0* po aplikácii syntetických inhibítorov (INCYDE a Roskovitín) v jednotlivých koncentráciách od 10 nM po 10 μ M. Ako kontrola boli rastliny *Ath-Col-0* pestované po dobu 8-dní na $\frac{1}{2}$ MS médium s 0,08% DMSO (Mock). B, CK báze; R, CK ribosidy, NT, CK nukleotidy, NG, CK N-glukosidy; OG, CK O-glukosidy.

62

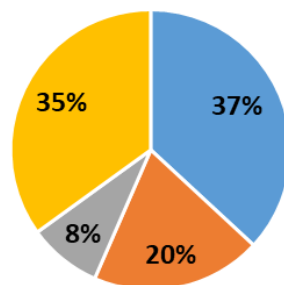


Príloha C – Distribúcia CK-typov (%) u 8-dňových rastlín *Ath-Col-0* po aplikácii syntetických inhibítorov (INCYDE a Roskovitín) v jednotlivých koncentráciách od 10 nM po 10 μ M. Ako kontrola boli rastliny *Ath-Col-0* pestované po dobu 8-dní na $\frac{1}{2}$ MS médium s 0,08% DMSO (Mock). *tZ*, *trans*-zeatín; *cZ*, *cis*-zeatín; DHZ, dihydrozeatín; iP, isopenetnyladenín.

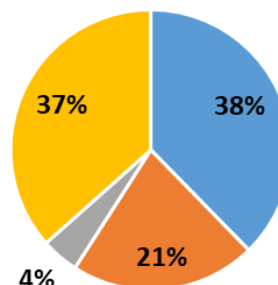
0.01 μ M Roskovitín



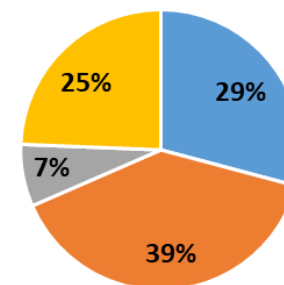
0.1 μ M Roskovitín



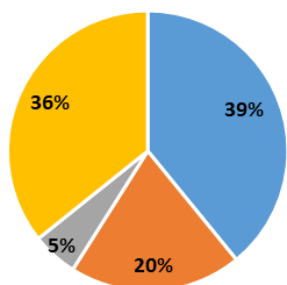
1 μ M Roskovitín



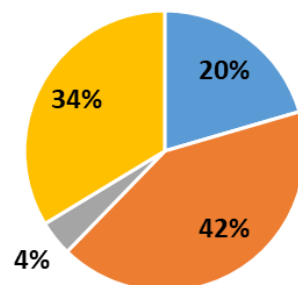
10 μ M Roskovitín



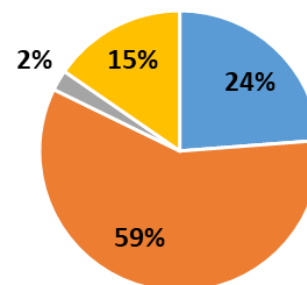
0.01 μ M INCYDE



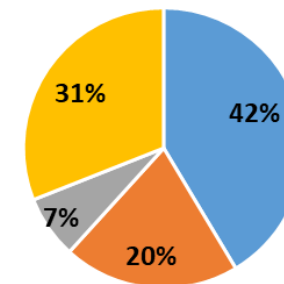
0.1 μ M INCYDE



1 μ M INCYDE



Mock



■ tZ-type ■ cZ-type ■ DHZ-type ■ iP-type

Príloha D – Distribúcia (%) cytokinínových metabolitov rozdelených podľa jednotlivých CK typov vo frakciách apoplastu (A) a symplastu (B) izolovaných z koreňov 8-dňových rastlín *Ath-Col-0* po aplikácii syntetických inhibítorov (INCYDE a Roskovitín) v porovnaní s kontrolou ½ MS médium s 0,08% DMSO (Mock).

