



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Deriváty cytokininů na bázi kinetinu a benzylaminopurinu  
s bioaktivními účinky na rostliny**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Michal Pernička</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2023

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Michal Pernička
Název práce	Deriváty cytokininů na bázi kinetinu a benzylaminopurinu s bioaktivními účinky na rostliny
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	Bakalářská práce je zaměřena na přípravu vybraných cytokininů a testování jejich biologické aktivity. V teoretické části byla zpracována literární rešerše shrnující současné poznatky o cytokininech a jejich klasifikaci, vlivu na rostliny a využití v biotechnologiích a v mikropropagaci rostlin. V experimentální části proběhla příprava kinetinu a tří derivátů 6-benzylaminopurinu s různými substituenty v poloze C <sup>2</sup> . U připravených sloučenin byla provedena charakterizace jejich fyzikálně-chemických vlastností a byla testována jejich biologická aktivita v kořenovém, senescenčním, kalusovém a ARR5::GUS biotestu a kompetičním receptorovém biotestu na receptorech CRE1/AHK4 a AHK3.
Klíčová slova	Aromatické cytokininy, deriváty cytokininů, biologická aktivita
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Michal Pernička
Title of thesis	Cytokinin derivatives based on kinetin and benzylaminopurine with bioactive effects on plants
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	<p>The bachelor thesis is focused on the preparation of selected cytokinins and testing of their biological activity. The theoretical part summarizes current knowledge about cytokinins and their classification, effects on plants and use in biotechnology and micropropagation of plants. In the experimental part, kinetin and three 6-benzylaminopurine derivatives with different substituents in the C<sup>2</sup> position were prepared. The physico-chemical properties of the prepared substances were characterized and their biological activity was tested in root, senescence, callus and ARR5::GUS bioassays and competitive CRE1/AHK4 and AHK3 receptor bioassay.</p>
Keywords	Aromatic cytokinins, cytokinin derivatives, biological activity
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“



Rád bych poděkoval především své vedoucí práce doc. Mgr. Lucii Plíhalové, Ph.D., a konzultantovi své Bc. práce Mgr. Dardanu Klosovi za jejich nekonečnou trpělivost a ochotu při vypracovávání této práce. Můj vděk náleží rovněž Mgr. Haně Vylíčilové a paní Jarmile Balonové za jejich vedení a pomoc během biologického testování a také Mgr. Haně Omámikové, Ing. Janě Kočířové a Mgr. Radimu Simerskému, Ph.D., za provedené chemické analýzy. Také děkuji své rodině a svým blízkým za jejich podporu v mém studijním i soukromém životě.

# Obsah

Cíle práce .....	7
Seznam použitých zkratk .....	8
<b>1 Úvod .....</b>	<b>10</b>
<b>2 Teoretická část .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Objev fytohormonů a cytokininů.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Struktura cytokininů a jejich charakterizace.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Klasifikace cytokininů .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4 Účinky cytokininů na rostliny .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5 Testování biologické aktivity cytokininů .....</b>	<b>21</b>
<b>3 Experimentální část .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Chemikálie .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Přístrojová technika .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3 Syntéza.....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 Biologické testování.....</b>	<b>28</b>
<b>4 Výsledky.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Připravené látky .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Elementární analýza připravených látek.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Biologická aktivita připravených látek .....</b>	<b>33</b>
<b>5 Diskuse .....</b>	<b>37</b>
<b>6 Závěr .....</b>	<b>40</b>
<b>Použitá literatura .....</b>	<b>41</b>

## **Cíle práce**

- 1) Vypracování literární rešerše na téma cytokininů
- 2) Příprava biologicky aktivních purinových derivátů
- 3) Fyzikálně-chemická charakterizace připravených látek
- 4) Biologické testování aktivity připravených látek

## Seznam použitých zkratek

ABA	kyselina abscisová
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
BAP	6-benzylaminopurin
BAP-9-G	6-benzylaminopurin-9-glukosid
BAP-9-THF	6-benzylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
BAP-9-THP	6-benzylamino-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin
CK	cytokinin
CKX	cytokinin oxidasa/dehydrogenasa
CPPU	<i>N</i> -fenyl- <i>N</i> -2-chlor-4-pyridylmočovina, forchlorfenuron
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin, 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin
DHZ	dihydrozeatin, 4-((purin-6-yl)amino)butan-2-ol
DMSO	dimethylsulfoxid
DPU	difenylmočovina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay, enzymová imunoanalýza
GUS	β-glukuronidasa
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
IAA	kyselina indol-3-octová
iP	<i>N</i> <sup>6</sup> -(Δ <sup>2</sup> -isopentenyl)adenin
Kin	kinetin, <i>N</i> <sup>6</sup> -furfuryladenin
MEP	methylerytritolfosfátová dráha
MS	Murashige-Skoog
MUG	4-methylumbelliferyl-β-galactopyranosid
MVA	mevalonátová dráha
PSII	fotosystém II
ROS	reaktivní formy kyslíku
RuBisCo	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa
SAG	geny spojené se senescencí
SDS	dodecylsíran sodný
TDZ	1-fenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)močovina, thidiazuron

<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin, 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin
UHPLC	ultra-high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
2-CIBAP	2-chlor-6-benzylaminopurin
2-FBAP	2-fluor-6-benzylaminopurin
2-MeOBAP	6-(2-methoxybenzylamino)purin
2-NHBAP	2-amino-6-benzylaminopurin
2-OHBAP	6-(2-hydroxybenzylamino)purin
3-MeOBAP	6-(3-methoxybenzylamino)purin
3-MeOBAPR	6-(3-methoxybenzylamino)purin-9- $\beta$ -D-ribosid
3-MeOBAP-9-THF	6-(3-methoxybenzylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
3-MeOBAP-9-THP	6-(3-methoxybenzylamino)-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin
3-OHBAP	6-(3-hydroxybenzylamino)purin

# 1 Úvod

Život a vývoj jednobuněčného rostlinného organismu je kontrolován genetickými, membránovými a enzymatickými mechanismy. U organismů mnohobuněčných je však z důvodu vyšší komplexity nutné, aby jednotlivé buňky byly schopny mezi sebou komunikovat. Jako chemické přenašeče informací mezi živočišnými buňkami fungují živočišné hormony, u rostlin se jedná o fytohormony a růstové regulátory.

Rostliny jsou k fytohormonům velmi citlivé, účinky některých z nich se projevují i v koncentracích pohybujících se v pmol/g čerstvé hmoty (Frébort *et al.*, 2011). Dalším znakem fytohormonů je jejich schopnost interagovat mezi sebou a podílet se na výsledném efektu v rostlině (Mok *et al.*, 2001).

Za regulátory, které růst podporují, jsou považovány auxiny, cytokininy (CK) a gibereliny. Oproti tomu ethylen a kyselina abscisová (ABA) růst inhibují (Brukhin a Morozova, 2011). Dále se mezi fytohormony řadí například brassinosteroidy, jasmonáty či strigolaktony (Vylíčilová *et al.*, 2020).

CK mají vliv na široké spektrum dějů a metabolických procesů v rostlinách, například regulují růst kořene, kvetení, apikální dominanci a účastní se transportu živin v rostlině (Vylíčilová *et al.*, 2020). Dále ovlivňují odolnost rostliny vůči stresu (Janečková *et al.*, 2018), účastní se vývoje chloroplastů a pomáhají regulovat fotosyntézu a s ní spojené enzymy (Frébort *et al.*, 2011; Vlčková *et al.*, 2006).

CK působí také antisenescentně – jsou totiž například schopny obnovovat hladinu chlorofylu a karotenoidů (Vlčková *et al.*, 2006), inhibovat syntézu degradačních enzymů (Nisler *et al.*, 2018) či stabilizovat klíčové komponenty fotosystému II (Janečková *et al.*, 2019). Rovněž vykazují antioxidační aktivitu v rostlinných pletivech, kde dokážou neutralizovat volné radikály a reaktivní formy kyslíku (Vylíčilová *et al.*, 2016).

Cílem této práce je připravit vybrané C<sup>2</sup>-deriváty benzylaminopurinu (BAP), zkoumat jejich fyzikálně-chemické charakteristiky, dále otestovat jejich biologickou aktivitu a porovnat získané výsledky se známými daty.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Objev fytohormonů a cytokininů

S konceptem existence rostlinných hormonů jakožto látek regulujících rostlinný růst v nízkých koncentracích přišel v 19. století Charles Darwin se svým synem Francisem při studiu tropismů (Whippo a Hangarter, 2006). Důkaz existence auxinů podal v roce 1926 Fritz Went, když ve svém slavném experimentu asymetricky přiložil gelové bločky napuštěné látkou izolovanou z odříznutých špiček koleoptilií ovsa setého (*Avena sativa*) na dekapitované koleoptilie. To mělo při jejich růstu za následek ohýbání na opačnou stranu, než byl bloček přiložen. Went následně látku nazval auxin a později byla tato látka identifikována jako kyselina indol-3-octová (IAA) (Enders *et al.*, 2015).

Prvním izolovaným syntetickým CK byl v roce 1955 6-furfurylaminopurin z autoklávované sledí DNA a látka byla následně pojmenována jako kinetin (Kin) pro svou schopnost iniciovat cytokinezi v *in vitro* kulturách (Miller *et al.*, 1955; Barciszewski *et al.*, 2007).

K první izolaci přirozeně se vyskytujícího CK došlo v roce 1963 a jednalo se o isoprenoidní 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin. Izolován byl z obilky kukuřice seté (*Zea mays*), podle které byl následně pojmenován jako *trans*-zeatin (Letham, 1963). Prvním izolovaným přirozeně se vyskytujícím aromatickým CK byl 6-(*o*-hydroxybenzylamino)-9-β-D-ribofuranosylpurin z dospělých listů hybridního topolu (Horgan *et al.*, 1975).

### 2.2 Struktura cytokininů a jejich charakterizace

Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou chemickými deriváty purinu. Každý z nich může existovat ve formě volné báze, korespondujícího nukleotidu, nukleosidu a *O*- či *N*-glykosidu (ribosidu, glukosidu či xylosidu). CK jsou zpravidla biologicky aktivní ve formě volné báze (Kamínek, 1992).

Navázání fosforibosylu na bázi CK snižuje jeho biologickou aktivitu (Sakakibara, 2006; Zhang *et al.*, 2013). Rovněž připojení glukosy na purinový cyklus pomocí glykosyltransferasy většinou daný CK inaktivuje. Glukosa může být napojena k adeninu přes atomy  $N^3$ ,  $N^7$  a  $N^9$ , pak se jedná o *N*-glukosylaci, anebo na hydroxyskupinu na postranním řetězci (Liang *et al.*, 2009), kdy se jedná o *O*-glukosylaci.

*O*-glukosylace je reverzibilní a díky ní je daný CK odolný vůči enzymatickému štěpení postranního řetězce v pozici  $N^6$ . Jelikož tyto konjugáty mohou být konvertovány zpět do aktivní

formy aktivitou  $\beta$ -glukosidas, předpokládá se, že mají roli zásobárny či úložiště CK. Oproti tomu *N*-glukosylace na pozici *N*<sup>7</sup> a *N*<sup>9</sup> nemůže být štěpena pomocí  $\beta$ -glukosidas, je tedy ireverzibilní. Tyto konjugáty se postupně hromadí v rostlině a má se za to, že mají svou roli v detoxikaci rostlinného organismu (Hou *et al.*, 2004).

Vzájemná konverze mezi jednotlivými formami CK je zprostředkovávána enzymy účastnícími se obecného metabolismu purinu, jejich vliv na CK aktivitu, transport a homeostázu však zůstává do značné míry neznámý (Hou *et al.*, 2004).

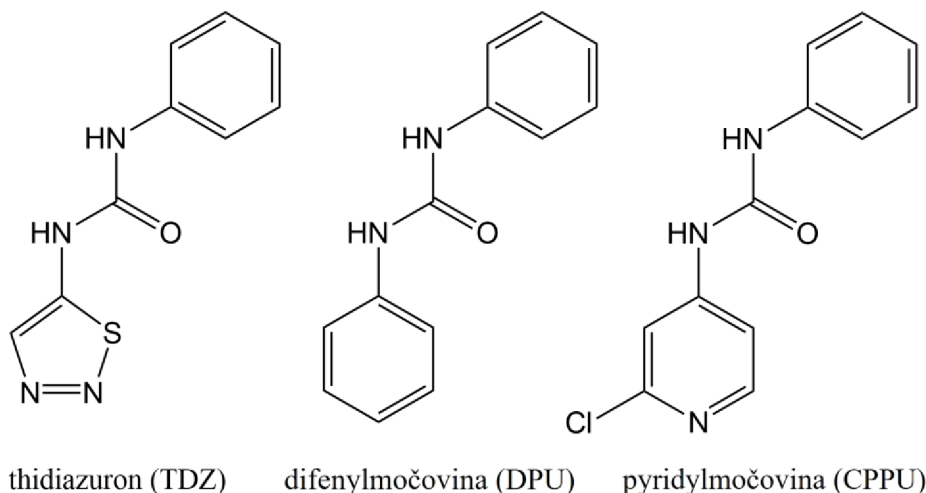
CK mohou být ireverzibilně degradovány enzymem cytokininoxidasou/dehydrogenasou (CKX), která štěpí *N*<sup>6</sup> postranní řetězec (Hutchison *et al.*, 2002). V závislosti na přítomnosti substituentu, násobných vazeb či charakteru postranního řetězce na pozici *N*<sup>6</sup> se cytokininy odlišují ve své biologické aktivitě, rozpustnosti a dalších fyzikálních, chemických i biologických vlastnostech (Kamínek, 1992).

## 2.3 Klasifikace cytokininů

Cytokininy je možné rozdělit na přirozeně se vyskytující a syntetické. U CK syntetických se kromě derivátů odvozených od purinových cytokininů přirozeně se vyskytujících jedná hlavně o deriváty odvozené od močoviny. Přirozeně se vyskytující purinové CK se dělí v závislosti na navázaném postranním řetězci na pozici *N*<sup>6</sup> na isoprenoidní a aromatické.

### 2.3.1 Cytokininy odvozené od močoviny

Patří sem například 1-fenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)močovina (TDZ, thidiazuron), difenylmočovina (DPU) nebo *N*-fenyl-*N*-2-chlor-4-pyridylmočovina (CPPU, forchlorfenuron). Struktury těchto látek lze vidět na obr. 1.



Obr. 1: Strukturní vzorce, názvy a zkratky významných cytokininů odvozených od močoviny

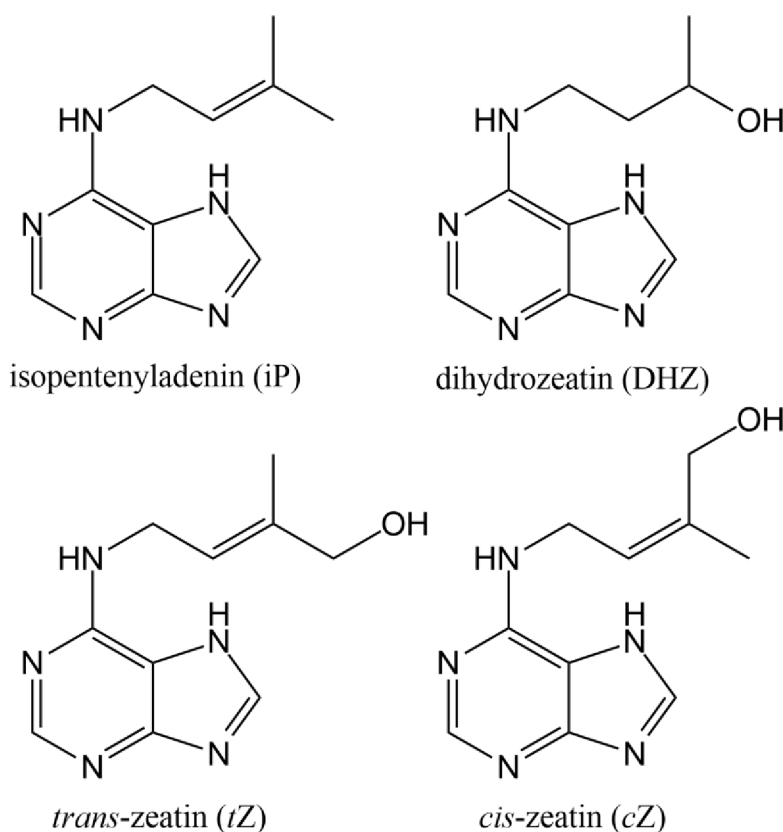


Uplatnění TDZ je velmi rozsáhlé – aplikuje se na ovoce pro oddálení produkce a snížení senzitivity k ethylenu, a tedy ke zpomalení senescence, u řezaných rostlin prodlužuje čerstvost listů i květů a účinkuje jako růstový regulátor v kultivačních médiích. Také brání degradaci karotenoidů a produkci kyseliny abscisové a využívá se k defoliaci bavlníku před jeho mechanickým sběrem (Gupta *et al.*, 2021).

CPPU je velmi efektivní ve zvětšování biomasy ovocných plodů, a proto se využívá především při pěstování vodních melounů a kiwi. Jeho nadměrná aplikace však může snižovat kvalitu plodu či způsobovat abnormality jeho růstu (Koprna *et al.*, 2016).

### 2.3.2 Isoprenoidní purinové cytokininy

Do skupiny isoprenoidních purinových CK se řadí například  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP), *trans*-zeatin (tZ), *cis*-zeatin (cZ) a dihydrozeatin (DHZ). Jejich struktury jsou znázorněny na obr. 2.



Obr. 2: Strukturní vzorce, názvy a zkratky významných isoprenoidních cytokininů

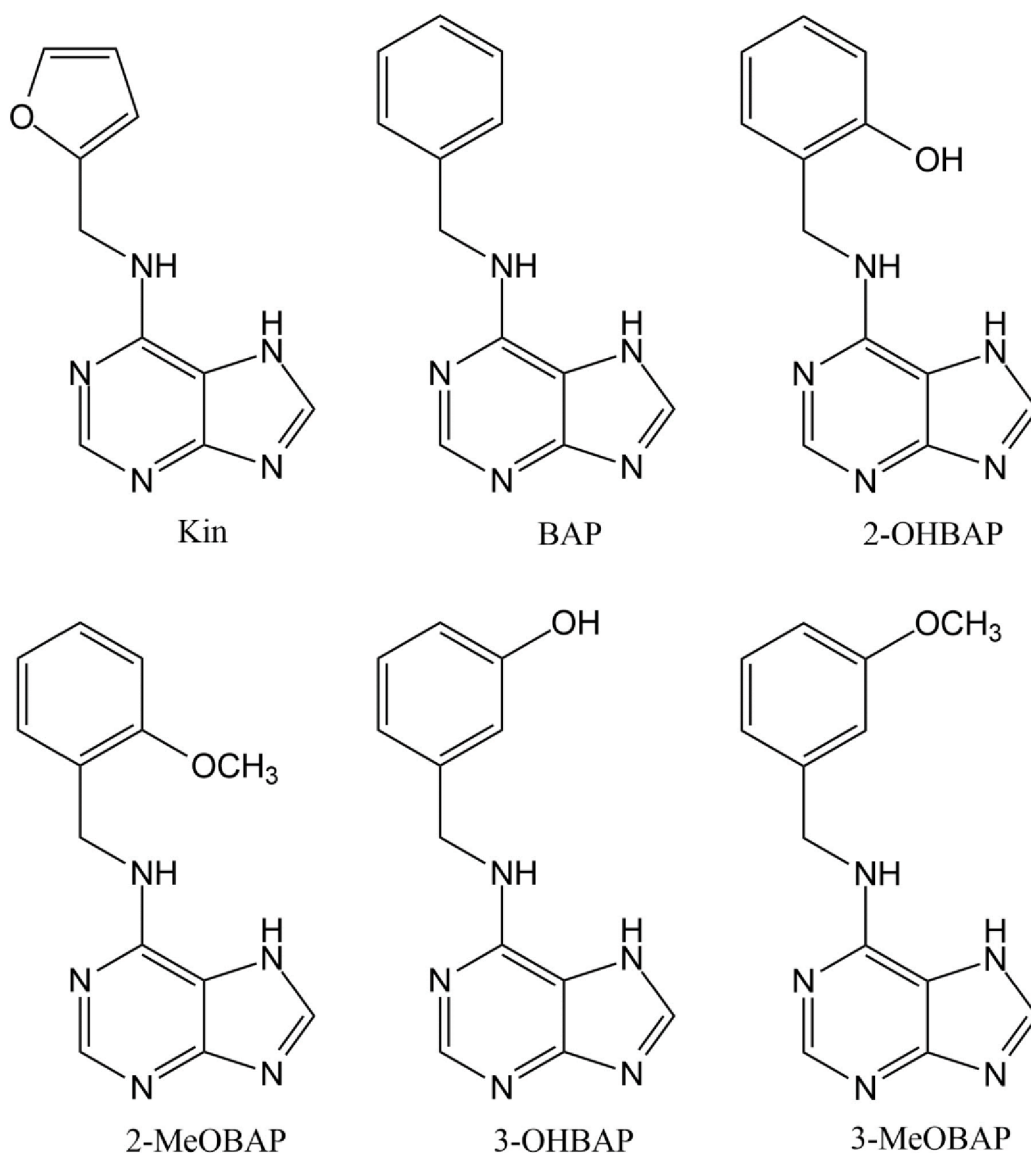
Bylo zjištěno, že *cZ* vykazuje výrazně nižší biologickou aktivitu v porovnání se svým isomerem *tZ*, který například silněji působí proti infekcím a patogenům (Grosskinski *et al.*, 2013), lépe brání chlorofyl proti degradaci a více stimuluje růst kalusu (Gajdošová *et al.*, 2011). Převažující formou zeatinu v rostlinných pletivech je jeho *trans* isomer. V rostlinách se přirozeně vyskytuje enzym s isomerasovou aktivitou, jenž je schopen konvertovat *cZ* na *tZ* a zpět. Tento enzym je ale inaktivní v pletivech rostlin, které byly ponechány růst ve tmě (Kamínek, 1992).

Předpokládá se, že *cZ* hraje hlavní roli v udržování bazální viability listů v limitujících podmínkách, kdy je syntéza hlavních CK potlačena. Tato domněnka je založena na tom, že pokud rostlina čelí stresu, dochází ke zvýšené syntéze *cZ* (Gajdošová *et al.*, 2011). Je to patrně z toho důvodu, že syntéza *cZ*, na rozdíl od ostatních CK, probíhá mimo jiné i mevalonátovou dráhou (MVA). Tato metabolická dráha nepotřebuje jako své prekurzory ATP, ADP ani AMP, na rozdíl od dráhy methyletrytritolfosfátové (MEP, také nazývána nemevalonátová dráha), kterou probíhá syntéza ostatních isoprenoidních CK. Ve stresu například z nedostatku světla je tedy pro rostlinu výhodné využít spíše dostupnější či postradatelnější prekurzory pro MVA než prekurzory pro MEP (Janečková *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2013).

### 2.3.3 Aromatické purinové cytokininy

U aromatických CK se v postranním řetězci nachází aromatické jádro. Poprvé byly izolovány z listů topolu (Horgan *et al.*, 1975) a jejich výskyt byl následně potvrzen také v dalších rostlinách (Nandi *et al.*, 1989). Významnou roli ve výzkumu aromatických CK sehrál i prof. Miroslav Strnad, který se svým týmem přišel s metodou HPLC-ELISA screeningu specificky zaměřenou na deriváty 6-benzylaminopurinu (BAP). Touto metodou objevil skupinu CK soustředěnou kolem vysoce biologicky aktivní látky, 6-(3-hydroxybenzylamino)purinu (3-OHBAP) (Strnad, 1997).

Jelikož tým prof. Strnada tuto sloučeninu objevil ve tkáních topolu, byla pojmenována *meta*-topolin a její isomer 6-(2-hydroxybenzylamino)purin (2-OHBAP) *ortho*-topolin. Biologická aktivita 3-OHBAP se ukázala být srovnatelná s dosud nejvíce aktivním známým CK, kinetinem (Strnad, 1997). Struktury těchto sloučenin jsou znázorněny na obr. 3.



Obr. 3: Strukturální vzorce a zkratky významných aromatických cytokininů

Ačkoliv existence aromatických CK byla potvrzena v řadě rostlinných druhů (například huseníček, topol), není jisté, že se vyskytují u všech rostlin (Strnad, 1997; Tarkowská *et al.*, 2003; Sakakibara, 2006). Aromatické CK mají oproti těm isoprenoidním jednu značnou výhodu – jsou stabilnější a méně náchylné k oxidativní degradaci (Plíhal *et al.*, 2013). To z nich dělá vhodné kandidáty pro průmyslové využití při pěstování rostlin a mikropropagaci.

## 2.4 Účinky cytokininů na rostliny

Rostlinné hormony působí již v koncentracích v rozmezí 1–50 pmol/g čerstvé hmoty (Galuszka *et al.*, 2008) a mohou účinkovat lokálně v meristematických pletivech jako

parakrinní hormony a zároveň i distálně například v signalizaci dostupnosti živin (Frébort *et al.*, 2011).

Účinky cytokininů je vždy nutné chápat v kontextu ostatních hormonů přítomných v médiu, jelikož značnou roli hraje vzájemný poměr koncentrací fytohormonů, a to až do takové míry, že někdy mohou být jejich efekty zcela opačné – s auxiny mohou CK interagovat synergicky nebo i antagonisticky (Mok *et al.*, 2001).

CK obecně mají vliv na buněčné vývojové procesy, tedy koordinují buněčné dělení a podporují proliferaci v rostlinných kulturách. Významnou roli v buněčném dělení hrají sice auxiny, bez spolupráce s CK však nedojde k jeho iniciaci (Svačinová *et al.*, 2012). CK v koordinaci s auxiny rovněž ovládají diferenciaci kořene, prýtu, listu i květu. Mají také antisenescenční účinky a kontrolují klíčení semen (Brukhin a Morozova, 2011). Rovněž hrají roli v apikální dominanci, větvení prýtu i kořenů a v diferenciaci chloroplastů během zrání. Meristematická pletiva si díky CK zachovávají svou dělivou funkci (Frébort *et al.*, 2011).

#### **2.4.1 Interakce cytokininů s dalšími fytohormony**

Cytokiny kooperují s ostatními fytohormony (především s auxiny a ethylenem) a jsou schopny ovlivňovat i jejich biosyntézu (Jones *et al.*, 2010). Bylo prokázáno, že kinetin a další CK se chovají synergicky s kyselinou indol-3-octovou (IAA) a společně s vápenatými ionty stimulují produkci ethylenu (Lieberman, 1979).

U rostlin po exogenním přidání BAP dochází k inhibici růstu hypokotylu a k přehnanému zakřivení apikálního háčku. Tyto znaky náleží mezi trojí odezvu (triple response) typickou pro ethylen. Ethylen totiž může působit jako mediátor pro účinky CK na kořenovou inhibici a hypokotylovou elongaci. To umožňuje částečně blokovat účinky CK pomocí inhibitorů ethylenu nebo pěstováním mutantů méně senzitivních k ethylenu (Cary *et al.*, 1995).

CK signalizace může být regulována na úrovni transkripce účinkem auxinů. Jejich působením může totiž dojít k navýšení transkripce regulačních genů, jejichž produkty následně účinkují jako negativní regulátory CK signálních drah (Müller a Sheen, 2008). To má následně vliv mimo jiné na vznik laterálních kořenů (Fukaki a Tasaka, 2008). Role cross-talku mezi auxiny a CK je patrná i v případech narušení jejich homeostázy, jako je tomu například u otravy rostliny těžkými kovy (Ranjan *et al.*, 2021; Bruno *et al.*, 2017).

Významný je také cross-talk mezi CK, auxiny a reaktivními formami kyslíku (ROS, reactive oxygen species). Vysoká koncentrace ROS sice značí zvýšenou míru stresu a může

být toxická, ROS jsou nicméně v rostlině využívány také jako signální molekuly. Netoxická koncentrace ROS je udržována antioxidačními mechanismy, ale i interakcí s metabolickými drahami fytohormonů (Bielach *et al.*, 2017).

#### 2.4.2 Vliv cytokininů na senescenci

Jak exogenně aplikované cytokininy, tak jejich endogenně zvýšený obsah často působí antisenesescenčně – oddalují senescenci rostlinných pletiv, udržují hladinu a aktivitu fotosyntetických pigmentů a tlumí peroxidaci lipidů. Velmi vysokou antisenesescenční aktivitu vykazují například *tZ* a 3-OHBAP, o něco nižší aktivitu mají BAP a Kin a za CK s velmi nízkou nebo žádnou antisenesescenční aktivitou jsou považovány *cZ* a 2-OHBAP (Hönig *et al.*, 2018; Gajdošová *et al.*, 2011).

Jedním z mechanismů, jakými CK zachovávají fotosyntetickou aktivitu chlorofylu během senescence, je jejich schopnost stimulovat *de novo* syntézu enzymu RuBisCo (ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa) a udržovat jeho aktivitu – tento efekt vykazuje (Vlčková *et al.*, 2006). Vlivem CK jsou rovněž inhibovány geny spojené se senescencí (SAG, senescence associated genes), které kódují degradační enzymy – proteasy, lipasy a RNAsy (Nisler *et al.*, 2018).

Působením CK během senescence také dochází k zachování a ovlivnění funkce fotosystému II (PSII). Předpokládá se, že mechanismus jejich účinku je založen na stabilizování světlosběrných komplexů PSII, reakčních center PSII a kyslík vyvíjejícího komplexu (Janečková *et al.*, 2019; Vylíčilová *et al.*, 2016).

Začátek senescence se většinou pojí ke snížení obsahu aktivních forem CK. Tento pokles může být důsledkem zrychlení degradace či inaktivace CK nebo také inhibice jejich biosyntézy (Janečková *et al.*, 2018). Rychlost senescence je ovlivněna přítomností biotických i abiotických vnějších faktorů a stresorů (Joshi *et al.*, 2019). Jedním z nejvýznamnějších faktorů je světlo, přičemž vliv má hlavně jeho intenzita a délka fotoperiody. Zastiňování listů či zkrácení fotoperiody má za následek urychlení senescence, snížení fotosyntetické aktivity a zvýšení oxidativního stresu. Světlo má totiž přímý vliv na hladinu endogenních CK v rostlině – hraje roli v regulaci jejich biosyntézy, transportu, signalizaci i degradaci (Janečková *et al.*, 2018).

Vyšší světelná expozice rovněž kompenzuje nedostatečnou CK signalizaci u mutantů s inaktivovanými receptory AHK3 a AHK2. Příliš intenzivní expozice světlu však může zvýšit excitaci elektronů, a tím vyvést z rovnováhy elektronový transportní řetězec, což dále může mít za následek nadprodukcí ROS a zvýšení oxidativního stresu (Janečková *et al.*, 2018).

### 2.4.3 Cytokininy v mikropropagaci rostlin

Účinek cytokininů je dobře zmapován pro použití v rostlinných biotechnologiích, zejména v *in vitro* metodách (Ćosić *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2021; Gupta *et al.*, 2021; Nisler *et al.*, 2020; Joshi *et al.*, 2019; Aremu *et al.*, 2012). Konkrétně se jedná o mikropropagaci, kde se CK přidávají do kultivačních médií pro urychlení buněčného dělení a zajištění rovnoměrného vývoje tkání. Mikropropagace v médiích obsahujících CK společně s gibbereliny se hojně využívá v biotechnologiích, mimo jiné při komerčním pěstování ovocných stromů (Plíhal *et al.*, 2013), ale i ve specifitějších případech, jako je třeba zachovávání ohrožených druhů rostlin (Hlatshwayo *et al.*, 2020).

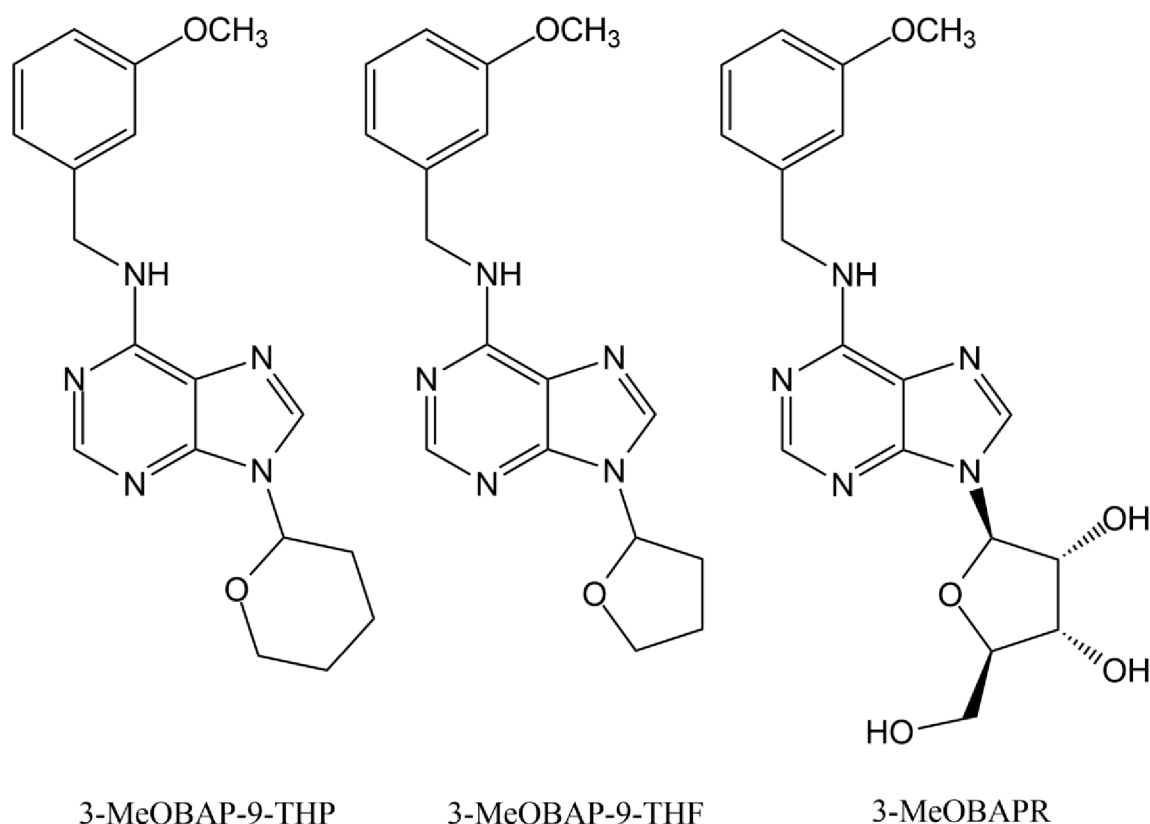
Aktuálně nejvíce používaným CK v mikropropagaci je BAP z důvodu jeho vysoké efektivity a relativně nízkých finančních nákladů. Aplikace BAP má nicméně také své nevýhody – jeho derivát benzylaminopurin-9-glukosid (BAP-9-G) se hromadí v rostlinách a při skleníkovém pěstování se postupně uvolňuje a způsobuje heterogenitu růstu (Werbrouck *et al.*, 1996).

Probíhá tedy snaha o přípravu derivátů BAP, které ponесou jeho výhody a pomocí změny struktury mohou eliminovat nevýhody spojené s nechtěnou tvorbou BAP-9-G. Připravované deriváty substituované na atomu  $N^9$  adeninu jsou slibnými kandidáty. U látky 6-benzylamino-9-(tetrahydropyran-2-yl)purinu (BAP-9-THP), stejně jako u 6-benzylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purinu (BAP-9-THF), se ukázalo, že jejich CK aktivita je vyšší než u BAP (Szüčová *et al.*, 2009; Zhang a Letham, 1989). BAP-9-THP se již dlouhou dobu využívá pro kontrolu kvetení širokého spektra rostlinných druhů. Není však zatím úplně jasné, zda jsou BAP-9-THP a BAP-9-THF účinné samy o sobě, nebo jestli jejich efekt plyne z náchylnosti vazby na  $N^9$  atomu k enzymatickému štěpení, čímž by se tyto deriváty stávaly pouhými zdroji volných bází adeninu (Szüčová *et al.*, 2009).

U BAP-9-THP a BAP-9-THF se pro další zvýšení jejich aktivity často substituují minimálně jeden vodík v benzylovém kruhu hydroxy či methoxy skupinou. Vzniká tak například látka 6-(3-methoxybenzylamino)-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin (3-MeOBAP-9-THP) či sloučenina 6-(3-methoxybenzylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin (3-MeOBAP-9-THF). Tyto deriváty se řadí mezi CK druhé generace, tedy uměle vytvořené CK vykazující vysokou biologickou aktivitu, ale nevyskytující se v rostlinách přirozeně (Vylíčilová *et al.*, 2020; Plíhalová *et al.*, 2016).

V mikropropagaci se také využívají aromatické CK, které mají na postranním aromatickém jádře hydroxy- či methoxyskupinu a zároveň ribosid na pozici  $N^9$ . Jedná se například o 6-(3-methoxybenzylamino)purin-9- $\beta$ -D-ribosid (3-MeOBAPR), který rovněž

vyniká vysokou biologickou aktivitou (Vylíčilová *et al.*, 2020). Struktury těchto derivátů je možné vidět na obr. 4.



Obr. 4: Strukturní vzorce a zkratky zmíněných derivátů aromatických cytokininů

V budoucnu by své využití v komerčním pěstování rostlin mohly najít i CK soli kyseliny methansulfonové, tedy mesyláty. Mesylované soli BAP, 2-OHBAP, 3-OHBAP a 3-MeOBAP se prokázaly být efektivní v ochraně PSII před degradací a jejich výhodou je vysoká rozpustnost v polárních rozpouštědlech. Z důvodu přítomnosti purinového jádra a hydrofobních postranních řetězců jsou běžné aromatické CK špatně rozpustné ve vodě. Standardně se tedy CK aplikují na tkáňové kultury po rozpuštění v dimethylsulfoxidu (DMSO), ethanolu či 1M NaOH a následném zředění vodou na požadovanou koncentraci. Během tohoto procesu však může dojít k vykrystalování CK z roztoku a také k negativnímu ovlivnění rostlin pomocí DMSO. Možnost rozpustit mesyláty CK přímo ve vodě tyto problémy eliminuje (Klos *et al.*, 2022).

#### 2.4.4 Cytokininy v biotechnologiích

Cytokininy mají v rostlinných biotechnologiích velký potenciál. Je třeba díky nim možné ovlivňovat odnožování obilnin a zvýšit tak výnos zrn, a tím i celkovou produktivitu zemědělství. Jejich aplikace jakožto komerčních růstových regulátorů je však komplikována komplexitou jejich efektů, cross-talkem s dalšími fytohormony a odlišnostmi účinků mezi rostlinnými druhy (Koprna *et al.*, 2016).

Jak již bylo částečně zmíněno, správná koncentrace CK je homeostaticky modulována přímou syntézou *in situ* pomocí isopentenyltransferas, komplexním mechanismem akropetálního a bazipetálního transportu isoprenoidních CK, reverzibilní konjugací na glykosidy a ireverzibilní inaktivací enzymem cytokininoxidasa/dehydrogenasa (CKX). Studie prokázaly, že snížená exprese a aktivita CKX v řadě obilnin vedla ke zvýšení výnosu zrn, tolerance k abiotickému stresu a organogenesi (Gupta *et al.*, 2021).

CKX jsou flavoproteiny schopné štěpení  $N^6$  postranního řetězce za vzniku adeninu a nenasyceného aldehydu 3-methyl-2-butenalu. Jelikož CKX rozeznávají dvojnou vazbu isoprenoidního postranního řetězce, DHZ a aromatické CK jsou ke štěpení tímto enzymem rezistentní (Sakakibara, 2006). V případě, že dojde k zablokování CKX vhodným inhibítorem, nebude docházet ke štěpení postranních řetězců, což povede k relativní elevaci koncentrace aktivních forem CK v rostlině (Gupta *et al.*, 2021).

Jako efektivní inhibitory CKX se prokázaly být aminoderiváty CK odvozených od močoviny. Rovněž lze využít molekulárně-biologický přístup pro vyvinutí transgenní rostliny se sníženou expresivitou genů pro CKX. Využití inhibitorů má tu výhodu, že není právně omezeno tak striktně jako využití GMO rostlin. Je nicméně nutné počítat s tím, že na různé rostlinné druhy mohou mít inhibitory odlišné účinky (Gupta *et al.*, 2021).

Při pěstování obilnin a v mikropropagaci rostlin se často používají BAP a Kin, a to buď samostatně, nebo v kombinaci s dalšími regulátory (především ABA a IAA). Aplikují se většinou sprejováním nebo přidáním do závlahové vody. Exogenní aplikace CK na luštěniny během reprodukčního období zvyšuje vitalitu květů a biomasu lusků, čímž rovněž roste jejich výnos. Co se týče zeleniny, aplikováním BAP dochází k urychlení kvetení u rajčat či ke značnému nárůstu biomasy výhonků u špenátu. Schopnost CK posilovat odolnost rostliny vůči biotickému i abiotickému stresu se využívá například při pěstování lilku či řepy v prostředí s vysokou salinitou. Pro zvýšení výnosu sklizně se CK aplikují i na sady ovocných stromů a bavlníková pole (Koprna *et al.*, 2016).



## 2.5 Testování biologické aktivity cytokininů

Efekty daného cytokininového derivátu na rostliny se studují pomocí tzv. biotestů. V následujících odstavcích jsou popsány vybrané CK biotesty, které byly provedeny v rámci experimentální části této kvalifikační práce.

### 2.5.1 Kořenový biotest

Za pomoci kořenového biotestu je možné sledovat vliv cytokininů na délku hlavního kořene a na délku a počet laterálních kořenů v porovnání s rostlinami rostoucími v médiu bez testované látky. Biotest probíhá tak, že do ½ MS média v Petriho miskách jsou v multiplikátu nasazena semena huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) a po uzavření jsou misky umístěny do svislé polohy. Synchronizace klíčení a růstu jednotlivých rostlin je zajištěna vystavením vysazených semen chladové periodě. Poté jsou misky s vysazenými semeny inkubovány a v pravidelných intervalech skenovány, aby následně mohla být vyhodnocena délka a počet kořenů. Čím silnější CK aktivitu testovaná látka vykazuje, tím více bude docházet k inhibici kořenového růstu, hlavní kořen tedy bude kratší a počet laterálních kořenů nižší.

### 2.5.2 Senescenční biotest

Pro určení, do jaké míry je daný cytokinin schopen oddalovat rostlinnou senescenci, se využívá senescenčního biotestu s odstřiženými listy z mladé pšenice (*Triticum aestivum*), které jsou po odstřížení kultivovány v roztoku testovaného CK. Následně je provedena extrakce chlorofylových barviv a za pomoci spektrofotometrického měření absorpčních spekter extrahovaných barviv je stanovena jejich koncentrace, a tedy i míra jejich degradace v důsledku senescence. Čím silnější antisenescenční aktivitu testovaná látka v dané koncentraci vykazuje, tím vyšší bude retence chlorofylu po kultivaci ve tmě. Hlavní výhodou tohoto biotestu je jeho nenáročnost, nevýhodou je nicméně to, že během kultivace odstřižených listů může docházet k metabolizaci studované látky.

### 2.5.3 Kalusový biotest

Kalusový biotest je založen na principu stimulace růstu cytokinin-dependentního kalusu tabáku (*Nicotiana tabacum*) schopného proliferovat pouze za přítomnosti CK v klasickém Murashige-Skoog (MS) médiu. Vykazuje-li látka přidaná do média CK aktivitu, projeví se to koncentračně závislým přírůstkem hmotnosti kalusu, což je zjištěno zvážením kalusu. Hlavní výhodou tohoto biotestu je jeho nenáročnost, stinnou stránkou je však nutnost pěstovat kalus

v přítomnosti studovaného CK po dobu 4 týdnů. Během této doby může docházet k rozkladu daného derivátu.

#### **2.5.4 Receptorový biotest**

U rostlin byly objeveny tři membránové receptory sloužící k přenosu cytokininového signálu do buněčného jádra, kde následně dochází k fosforylaci transkripčních faktorů a expresi cílových genů. Jedná se o receptory CRE1/AHK4, AHK3 a AHK2 – všechny jsou histidin kinázy nacházející se v cytoplasmatické membráně rostlinných buněk (Aoyama a Oka, 2003).

Ke zjištění přesné koncentrace látek, které aktivují CK receptory a aktivují transdukci signálu, je možné použít receptorový biotest. Ten bývá prováděn za využití transgenního kmene bakterie *Escherichia coli* s genem *cps::lacZ*, jehož exprese je závislá na přítomnosti a koncentraci CK v kultivačním médiu. Gen *lacZ* kóduje enzym  $\beta$ -galaktosidasu, jehož aktivitu je poté možné stanovit za použití pomocného fluorogenního substrátu, který je štěpen a jeho produkt fluorimetricky měřen, což umožní určit schopnost testované látky aktivovat CK receptor. Výhodou tohoto testu je to, že v jeho průběhu nedochází k metabolizaci testovaných CK.

#### **2.5.5 ARR5::*GUS* biotest**

Finální komponentou dvoustupňového signálního systému u *A. thaliana* jsou produkty genů typu ARR5 (*Arabidopsis* response regulator 5), jejichž exprese je zvyšována přítomností cytokininů (Brandstatter a Kieber, 1998). Toho je využíváno v průběhu ARR5::*GUS* biotestu, kde se měří enzymatická aktivita  $\beta$ -glukuronidasy (*GUS*) pod kontrolou promotoru ARR5 ve 2–3 dny starých semenáčcích transgenních *A. thaliana*. Semenáčky jsou nejdříve kultivovány 17 hodin s testovanou látkou a po jejich sklizení a homogenizaci je provedeno stanovení aktivity *GUS* za využití pomocného fluorogenního substrátu. Hlavní výhodou tohoto biotestu je krátká doba kultivace semenáčků, z čehož plyne nižší riziko metabolizace a rozpadu testovaných látek, test je však technicky náročnější na provedení.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

Pro přípravu vybraných látek byly použity tyto chemikálie: 2-amino-6-chlorpurin, dimethylsulfoxid (DMSO), 6-chlorpurin, furfurylamin od výrobce Sigma-Aldrich; benzylamin od firmy abcr GmbH; 2,6-dichlorpurin, 2-fluor-6-chlorpurin od firmy OlChemIm, s. r. o.; aceton, chloroform, diethylether, ethanol, ethylacetát, methanol, triethylamin od firmy VWR International.

Během prováděných biotestů byly použity tyto chemikálie: agar, dimethylsulfoxid (DMSO), dusičnan draselný, D-glukosa, L-glutamin, glycin, chloramfenikol, inositol, kaseinový hydrolyzát, kyselina 1-naftyloctová, kyselina nikotinová, kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová,  $\beta$ -merkaptoethanol, 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -galactopyranosid (MUG), pyridoxin, sacharosa, síran hořečnatý, uhličitan sodný od výrobce Sigma-Aldrich; ampicilin od firmy Sigma, s. r. o.; chlorid vápenatý, kyselina sírová od firmy Lach-ner, s. r. o.; dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, heptahydrát síranu železnatého, chelaton 3, kyselina boritá, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), molybdenan amonný, síran manganatý, síran měďnatý od firmy Lachema, a. s.; chlorid amonný, chlorid vápenatý, hydroxid draselný, hydroxid sodný od firmy Penta; 6-benzylaminopurin, *trans*-zeatin od firmy OlChemIm, s. r. o.; dihydrogenfosforečnan amonný od firmy Spolana, s. r. o.; Triton X-100 od výrobce Carl Roth GmbH; dusičnan vápenatý od firmy VWR International.

### 3.2 Přístrojová technika

Navazování chemikálií bylo prováděno na vahách od firmy RADWAG Váhy, s. r. o., syntézy probíhaly na magnetické míchačce s ohřevem od firmy VELP Scientifica a k odpařování rozpouštědel z roztoků připravovaných látek byla využívána rotační vakuová odparka značky Heidolph. Pro určení chemické individuality připravených látek byl použit NMR spektrometr JEOL 500 ECA, kalibrace posunu na zbytkový pík rozpouštědla v  $^1\text{H}$  DMSO-*d*<sub>6</sub> 2,50 ppm.

Čistota připravených látek byla zjištěna na vysokoúčinné kapalinové chromatografii (UHPLC) Waters Acquity UPLC H-Class System na koloně C18 Symmetry (průměr 2,1 mm, délka 150 mm, pórovitost 5  $\mu\text{m}$ ). Vzorek byl rozpuštěn v methanolu a následně byl 22 minut promýván gradientem methanolu (5–99 %) s mravenčanem amonným při pH 4 a průtoku 0,3 ml/min. Absorbance složek byly detekovány při vlnové délce 190–500 nm. Dále byl tento

eluát veden do hmotnostního spektrometru Waters Acquity QDA, jehož iontový zdroj byl zahříván na teplotu 120 °C, desolvatační teplota činila 300 °C. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík. Použité kapilární napětí činilo 3 kV, napětí na vstupní štěrbině 15 V. Měření bylo prováděno v pozitivním FULLSCAN módu v rozsahu m/z 45–1 000. Analýza byla provedena Mgr. Hanou Omámikovou a Mgr. Radimem Simerským, Ph.D.

Elementární analýza C, H, N připravených látek byla stanovena na analyzátoru Fisons EA1112 CHN Analyzer od firmy Thermo Fisher Scientific. Přístroj byl kalibrován pomocí standardu nikotinamidu s navázkou v rozmezí 2–2,80 mg. Analyzované vzorky byly rovněž navažovány v rozmezí 2–2,80 mg. Mikronavážka pevného zhomogenizovaného vzorku byla při analýze katalyticky spalována v proudu kyslíku a helia (nosný plyn) za teploty 950 °C po dobu 480 sekund. Vzniklá plynná směs byla na chromatografické koloně rozdělena na složky CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub> a kvantifikována na tepelně-vodivostním detektoru. Z intenzity signálu každé složky bylo vypočteno procentuální složení analyzovaného pevného vzorku.

Během biotestů byla práce vyžadující sterilní prostředí prováděna v horizontálním flowboxu značky Holten. Navažování všech chemikálií bylo provedeno na analytických vahách AE 240 od výrobce Mettler Toledo a míchání bylo prováděno na elektromagnetickém míchadle MR Hei-Mix S od firmy Heidolph. Při inkubaci bakteriálních pre-kultur v receptorovém testu byl použit termostatovatelný destičkový inkubátor s orbitálním třepáním Thermomixer comfort od firmy Eppendorf. Dále byl v průběhu testů využíván inkubátor KB-240 od firmy Binder. Během kultivace v ARR5::GUS testu byla použita Třepačka Excella E24 od výrobce New Brunswick Scientific Co, s. r. o., při homogenizaci rostlinného materiálu byl použit oscilační vibrační mlýn MM 200 od firmy RETSCH. Na závěr receptorového biotestu byl použit fluorescenční reader Fluoroskan Ascent od výrobce Thermo Labsystems a destičkový spektrofotometr Tecan Sunrise od firmy Tecan. Tento spektrofotometr byl použit i v senescenčním biotestu.

### 3.3 Syntéza

#### 3.3.1 Příprava kinetinu (Kin)

Příprava byla provedena podle Wang *et al.*, 2018, přičemž místo butanolu při přípravě reakční směsi byl použit propanol, reakční čas byl zkrácen na 5 hodin a teplota snížena na 105 °C. V 16 ml propanolu byl rozmíchán 1 g (1 eq) 6-chlorpurinu a bylo přidáno 0,68 μl (0,75 g, 1,2 eq) furfurylaminu a 0,73 μl triethylaminu (0,98 g, 1,5 eq). Směs byla ponechána reagovat za stálého míchání v lázni při teplotě 105 °C po dobu 5 hodin. Reakce proběhla dle schématu 1.

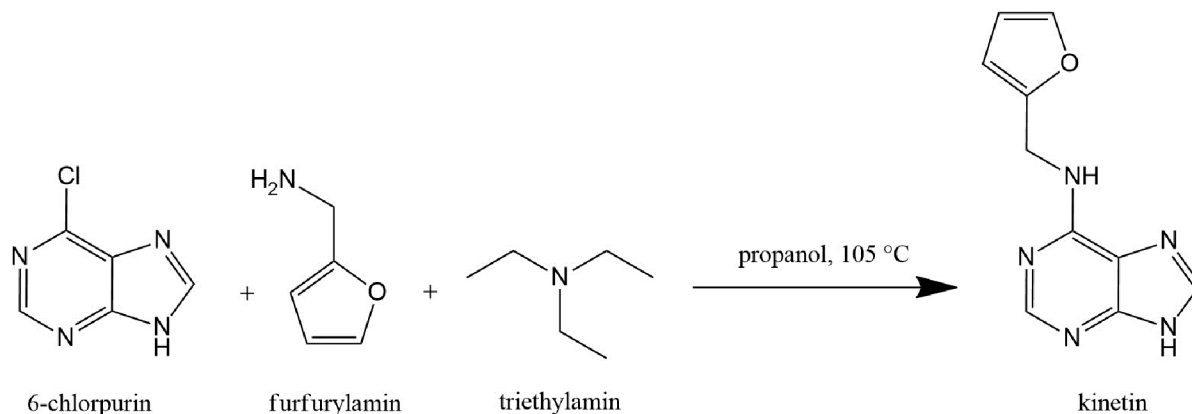


Schéma 1: Příprava kinetinu

Po ukončení reakce byla provedena vakuová filtrace, reakční baňka promyta 30 ml propanolu a produkt umístěn do horkovzdušné sušárny při 50 °C na 24 hodin. Následně byl produkt rozpuštěn ve 100 ml ethanolu a umístěn do lednice na rekrystalizaci. Poté byla opět provedena filtrace, vysušení v sušárně a bylo naváženo 1 100 mg produktu.

Výtěžek: 40 %; HPLC: 98,84 %; Mr = 215,21; MS [M+H<sup>+</sup>] = 216,20.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 8.20 (s, 1H), 8.14–8.04 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 4.75–4.63 (m, 2H).

#### 3.3.2 Příprava 2-amino-6-benzylaminopurinu (2-NHBAP)

Syntéza byla provedena dle Havlíček *et al.*, 1997, proběhla však změna spočívající v nahrazení butanolu při přípravě reakční směsi propanolem, snížení teploty během reakce na 105 °C a prodloužení času reakce na 5 hodin. Do 100 ml propanolu bylo přidáno 1 001 mg 2-amino-6-chlorpurinu s 729,2 μl benzylaminu (697,5 mg, 1,1 eq) a 1 003 μl (716,81 mg, 1,2 eq) triethylaminu a směs byla v lázni při teplotě 105 °C ponechána reagovat dle schématu 2.

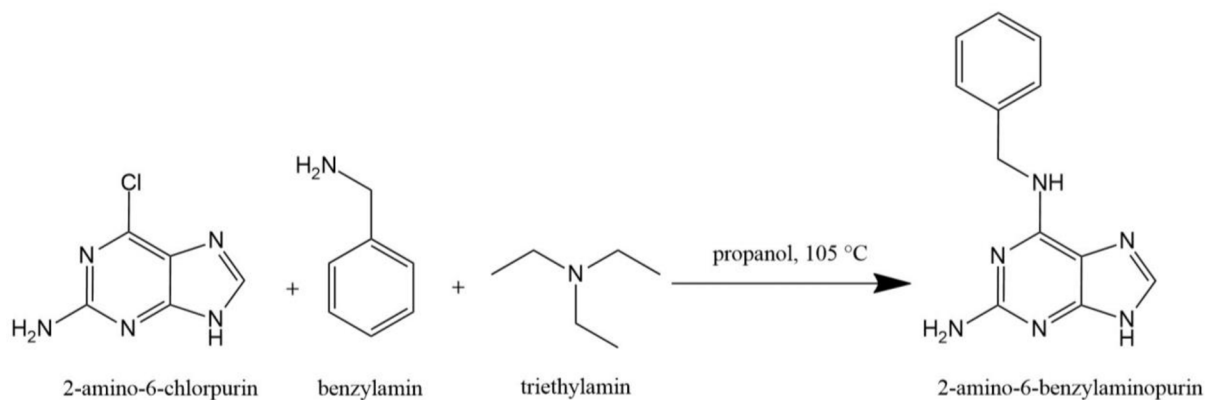


Schéma 2: Příprava 2-amino-6-benzylaminopurinu

Po proběhnutí reakce a ochlazení reakční směsi byla provedena vakuová filtrace, pevný podíl roztoku byl propláchnut propanolem a vysušen v sušárně při 50 °C. Hmotnost produktu po vysušení činila 1 292 mg.

Výtěžek: 53 %; HPLC: 97,97 %; Mr = 240,26; MS [M+H<sup>+</sup>] = 241,17.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 8.09 (s, 1H), 7.65 (s, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.28 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.19 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.70 (s, 2H), 4.64 (s, 2H).

### 3.3.3 Příprava 2-chlor-6-benzylaminopurinu (2-CIBAP)

Obdobně jako u 2-NHBAP byla syntéza provedena dle Havlíček *et al.*, 1997 a proběhla změna spočívající v nahrazení butanolu při přípravě reakční směsi propanolem, snížení teploty během reakce na 105 °C, prodloužení času reakce na 5 hodin a místo 2-amino-6-chlorpurinu byl použit 2,6-dichlorpurin. Do 100 ml propanolu bylo při míchání přidáno 1 005 mg (1 eq) 2,6-dichlorpurinu, 602 μl benzylaminu (591,88 mg, 1,1 eq) a 977 μl (710,26 mg, 1,2 eq) triethylaminu. Směs byla za stálého míchání přivedena k teplotě 105 °C a byla ponechána reagovat 5 hodin. Reakce proběhla podle schématu 3.

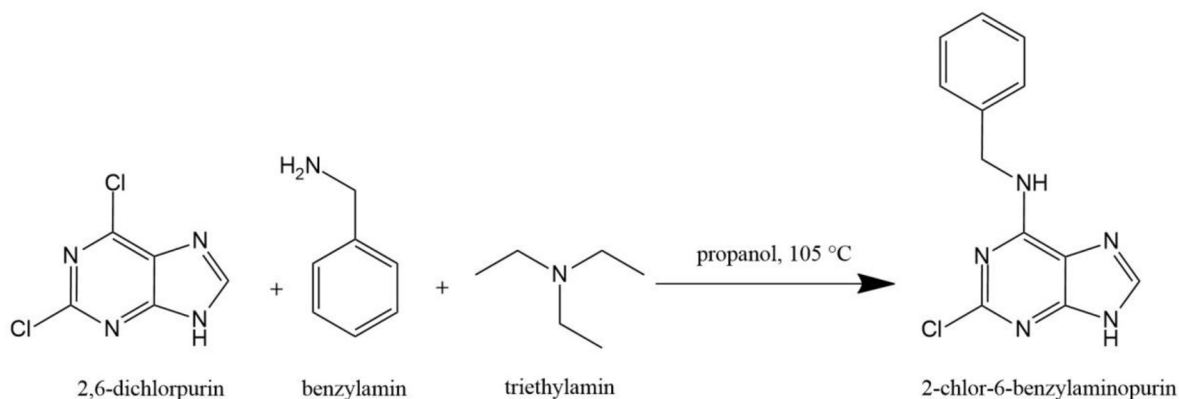


Schéma 3: Příprava 2-chlor-6-benzylaminopurinu

Po proběhnutí reakce a ochlazení reakční směsi byla provedena vakuová filtrace, pevný podíl roztoku byl propláchnut propanolem a vysušen v sušárně při 50 °C. Hmotnost produktu po vysušení činila 1 179 mg.

Výtěžek: 49 %; HPLC: >99%; Mr = 259,69; MS [M+H<sup>+</sup>] = 260,10.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 8.74 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.41–7.28 (m, 4H), 7.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.75–4.50 (m, 2H).

### 3.3.4 Příprava 2-fluor-6-benzylaminopurinu (2-FBAP)

Obdobně jako u 2-NHBAP byla syntéza provedena dle Havlíček *et al.*, 1997 a proběhla změna spočívající v nahrazení butanolu při přípravě reakční směsi propanolem, snížení teploty během reakce na 105 °C, prodloužení času reakce na 5 hodin a místo 2-amino-6-chlorpurinu byl použit 2-fluor-6-chlorpurin. Ve 100 ml propanolu bylo rozpuštěno 1 006 mg 2-fluor-6-chlorpurinu a přidáno 699 μl (687,17 mg, 1,1 eq) benzylaminu a 945 μl (707,95 mg, 1,2 eq) triethylaminu. Reakce proběhla během 5 hodin za míchání při teplotě 105 °C podle schématu 4.

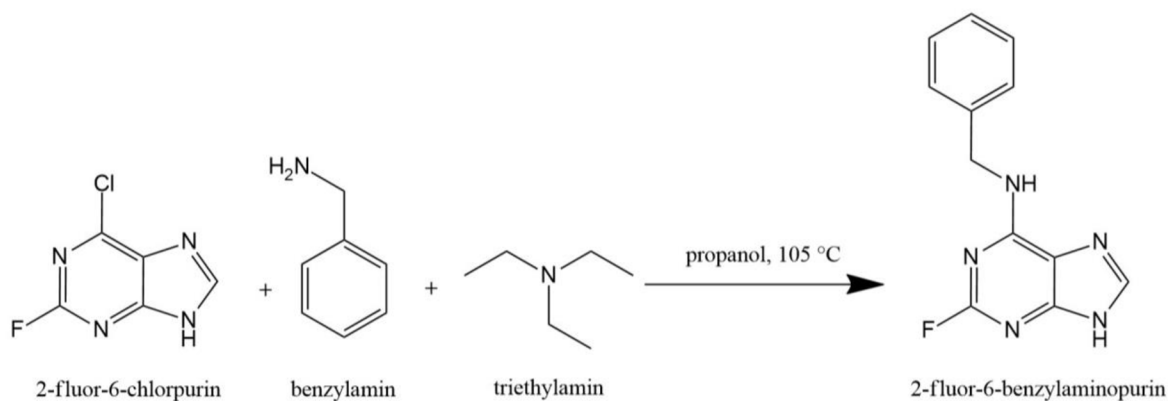


Schéma 4: Příprava 2-fluor-6-benzylaminopurinu

Po proběhnutí reakce a ochlazení reakční směsi byla provedena vakuová filtrace, pevný podíl roztoku byl propláchnut propanolem a vysušen v sušárně při 50 °C. Hmotnost produktu po vysušení činila 640 mg.

Výtěžek: 27 %; HPLC: 97,40 %; Mr = 243,24; MS [M+H<sup>+</sup>] = 244,20.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 8.75 (t, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.39–7.27 (m, 4H), 7.26–7.20 (m, 1H), 4.64 (d, 2H).

### 3.4 Biologické testování

Všechny biotesty byly provedeny pod vedením Mgr. Hany Vyličilové, Ph.D., za asistence paní Jarmily Balonové.

#### 3.4.1 Kořenový biotest

Příprava 1 l ½ MS média byla provedena dle následujícího postupu: v 950 ml destilované vody bylo rozpuštěno 2,15 g MS média, 0,5 g kyseliny 2-(N-morfolino)-ethansulfonové a 10 g sacharosu. Hodnota pH média byla upravena 4M roztokem hydroxidu draselného na rozmezí 5,6–5,8 a objem byl doplněn na 1 l. Před rozlitím média do litrové sklenice bylo naváženo 11 g agaru na její dno.

Po vysterilizování ½ MS média v autoklávu a jeho rozlití do Petriho misek byla na povrch ztuhlého média nasazena ethanolem sterilizovaná semena huseníčku (*A. thaliana*) za pomoci sterilního párátko. Vysazování semen bylo prováděno ve flowboxu, misky byly připraveny ve čtyřnásobném multiplikátu. Po vysazení byly misky uzavřeny, ovázané parafilmem a na dobu 2 dnů vloženy do lednice. Poté byly umístěny do svislých stojanů a vloženy do kultivačního boxu a vždy po pěti, osmi, deseti, dvanácti a patnácti dnech růstu bylo prováděno skenování kultivovaných Petriho misek. Délka hlavního kořene a počet laterálních kořenů byl poté ze skenů stanoven za pomoci programu ImageJ.

#### 3.4.2 Senescenční biotest

Byl připraven zásobní Hoaglandův roztok obsahující v uvedených koncentracích následující látky: dusičnan vápenatý ( $4,0 \cdot 10^{-2}$  M), síran hořečnatý ( $2,1 \cdot 10^{-2}$  M), dusičnan draselný ( $6,5 \cdot 10^{-2}$  M), dihydrogenfosforečnan amonný ( $1,0 \cdot 10^{-2}$  M), kyselina boritá ( $4,5 \cdot 10^{-4}$  M), síran manganatý ( $2,0 \cdot 10^{-4}$  M), síran měďnatý ( $4,0 \cdot 10^{-6}$  M), síran zinečnatý ( $7,6 \cdot 10^{-6}$  M), molybdenan amonný ( $8,1 \cdot 10^{-6}$  M). Dále Hoaglandův zásobní roztok obsahoval 1 ml kyseliny sírové o koncentraci  $4,9 \cdot 10^{-2}$  M.

Semena ozimé pšenice (*T. aestivum* L. cv. Hereward) byla proplachována kohoutkovou vodou po dobu 24 hodin a poté byla vyseta na táč obsahující perlit s Hoaglandovým živným roztokem. Ten byl připraven smícháním 10 ml Hoaglandova zásobního roztoku, přidáním 3 ml 0,1M chloridu vápenatého a 1 ml roztoku FeEDTA (obsahující Chelaton 3 v koncentraci 7,45 g/l a heptahydrát síranu železnatého v koncentraci 5,45 g/l) a upravením pH na hodnotu 6,8 pomocí roztoku hydroxidu sodného. Táč s vysetými semeny byl zakryt černou hliníkovou



fólií a byl vložen do kultivačního boxu (fotoperioda: 12 hodin světlo, 12 hodin tma, 20 °C, 7 000 lx) na dobu 5 dnů. Po prvním dni kultivace byla z tácu odstraněna hliníková fólie.

Do 96jamkové destičky byly napipetovány roztoky testovaných látek tak, aby jejich koncentrace činily  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M a  $10^{-4}$  M, vždy v pěti opakováních. Z vykultivované pšenice byly odstříženy konečné listové segmenty o délce přibližně 3,5 cm. Do každé jamky byla pak bazálními konci zasunuta čtveřice takto ustřížených listů. Čtveřice listů byly před vkládáním do jamek naváženy tak, aby se jejich celková hmotnost pohybovala v rozmezí 0,09–0,11 g. Takto připravená destička byla inkubována 96 hodin ve tmě při teplotě 25 °C za zvýšené vlhkosti. Pět čtveřic listů bylo zamraženo při teplotě -80 °C pro určení počáteční hladiny chlorofylu.

Po ukončení inkubace proběhla extrakce chlorofylových barviv z listů vložím listů z destičky do zkumavek obsahujících 5 ml 80% ethanolu a jejich povařením při 80 °C po dobu 10 minut. Listy poté byly vyjmuty ze zkumavek, objem byl doplněn na 5 ml a do 96jamkové destičky byly takto získané extrakty rozpipetovány a byla změřena jejich absorbance při vlnové délce 665 nm.

### 3.4.3 Kalusový biotest

Příprava klasického MS média byla provedena dle následujícího postupu: v 1 l destilované vody bylo rozpuštěno 4,3 g MS média (basal medium; AE-CH-2136), 200 mg L-glutaminu, 30 g sacharosy a 8 g agaru. Poté bylo přidáno 10 ml roztoku glycinu (ze zásobního roztoku 200 mg/l), 10 ml roztoku inositolu (ze zásobního roztoku 1 g/100 ml), 5 ml roztoku FeEDTA (ze zásobního roztoku připraveného smícháním 3,36 g Chelatonu 3 a 2,785 g heptahydrátu síranu železnatého do 0,5 l deionizované vody), 5 ml roztoku vitamínů (na přípravu 100 ml zásobního roztoku bylo smícháno 10 mg kyseliny nikotinové, 10 mg pyridoxinu a 8 mg thiaminu) a 10 ml roztoku kyseliny 1-naftyloctové (ze zásobního roztoku 10 mg/100 ml). V případě MS média pro udržovací kulturu kalusu bylo přidáno 2,25 ml roztoku BAP (ze zásobního roztoku 10 mg/100 ml).

Do média vysterilizovaného v autoklávu byly přidány testované látky tak, aby bylo dosaženo koncentrací  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M a  $10^{-4}$  M. Z těchto roztoků byly prepipetovány 3 ml do jamek v šestijamkových deskách, po ztuhnutí médií bylo do každé jamky umístěno 0,1 g kalusu tabáku (*N. tabacum* L. cv. Wisconsin 38) a každý kalus byl rozdělen na tři díly. Destičky s kalusem byly inkubovány po dobu 4 týdnů ve tmě při 24 °C. Po skončení inkubace byly zjištěny hmotnosti kalusu ve všech jamkách.

#### 3.4.4 Receptorový biotest

Byly provedeny testy na aktivaci receptorů CRE1/AHK4 a AHK3. Během testu byly použity transgenní kmeny *E. coli* KMI001-pINIII/AHK4 a KMI001-pINIII/AHK3, selektovány byly díky rezistenci k ampicilinu (AHK4) a chloramfenikolu (AHK3). Bylo připraveno M9 médium pro kultivaci bakteriálních pre-kultur obsahující následující látky v uvedených koncentracích: dihydrogenfosforečnan sodný (47,76 mM), dihydrogenfosforečnan draselný (22,2 mM); chlorid sodný (8,6 mM), chlorid amonný (18,7 mM), síran hořečnatý (2,0 mM), D-glukosa (22,2 mM); chlorid vápenatý (0,1 mM), kaseinový hydrolyzát kyselý hydrolyzovaný (Merck, katalogové číslo 1022450500, 0,1%). Po inokulaci proběhla kultivace v thermomixeru po dobu 24 hodin při 25°C a 300 rpm, uchování při 4 °C.

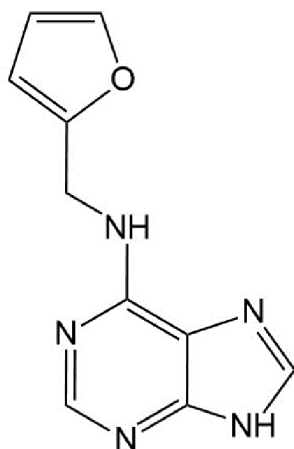
Bakteriální pre-kultury byly zředěny v poměru 1:600 pomocí M9 média a byly rozpipetovány do 96jamkové destičky, kde byly následně v multiplikátu přidány testované látky tak, aby bylo dosaženo koncentrací 0,1, 1, 10 a 50 mM. Následovala kultivace na thermomixeru po dobu 17 hodin při 25°C a 450 rpm. Po ukončení kultivace proběhlo přidání fluorogenního substrátu MUG, inkubace 1 hodinu při 37 °C, zastavení reakce stop pufr (obsahujícím glycin v koncentraci 132 mM a uhličitan sodný v koncentraci 83 mM) a změření fluorescence při vlnové délce 365/460 nm (emise/excitace).

#### 3.4.5 ARR5::GUS biotest

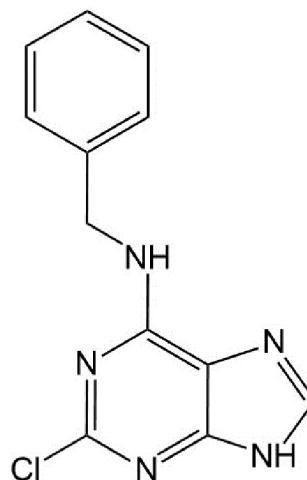
Sterilní semena transgenní *A. thaliana* (ekotyp Col-0) nesoucí fúzní gen pARR5::GUS byla kvůli synchronizaci klíčení kultivována na klasickém ½ MS médiu (příprava byla popsána v kapitole kořenového biotestu) ve tmě po dobu 3 dnů při 4 °C a následně byly přemístěny do fytotronu na třepačku na 4 dny při teplotě 22 °C, světelný režim 16h den/8 h noc. Proběhlo přidání testovaných látek do média tak, aby jejich koncentrace činila 10 µM. Po 17 hodinách byly semenáčky vyjmuty a homogenizovány za pomoci oscilačního vibračního mlýnu (3 minuty, 27 Hz) v extrakčním pufru 1 (50 mM fosfátový pufr, 10 mM EDTA, 10 mM β-merkapt ethanol, deionizovaná voda). Následně byl přidán extrakční pufr 2 (50 mM fosfátový pufr, 10 mM EDTA, 10 mM β-merkapt ethanol, 0,2 % Triton X-100, 0,2 % SDS, deionizovaná voda) a semenáčky byly inkubovány při 4 °C po dobu 30 minut. Nakonec proběhla inkubace při 37°C ve tmě po dobu 60 minut s MUG substrátem o koncentraci 2 mM a změření fluorescence při emisní/excitační vlnové délce 365/460 nm.

## 4 Výsledky

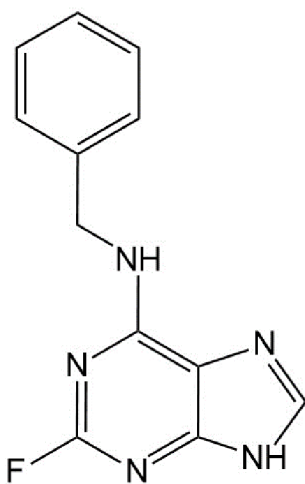
### 4.1 Připravené látky



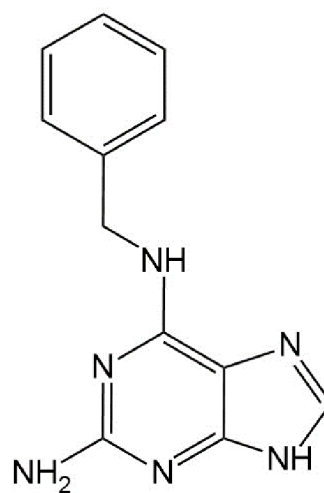
kinetin  
(Kin)



2-chlor-6-benzylaminopurin  
(2-CIBAP)



2-fluor-6-benzylaminopurin  
(2-FBAP)



2-amino-6-benzylaminopurin  
(2-NHBAP)

Obr. 5: Přehled připravených látek

## 4.2 Elementární analýza připravených látek

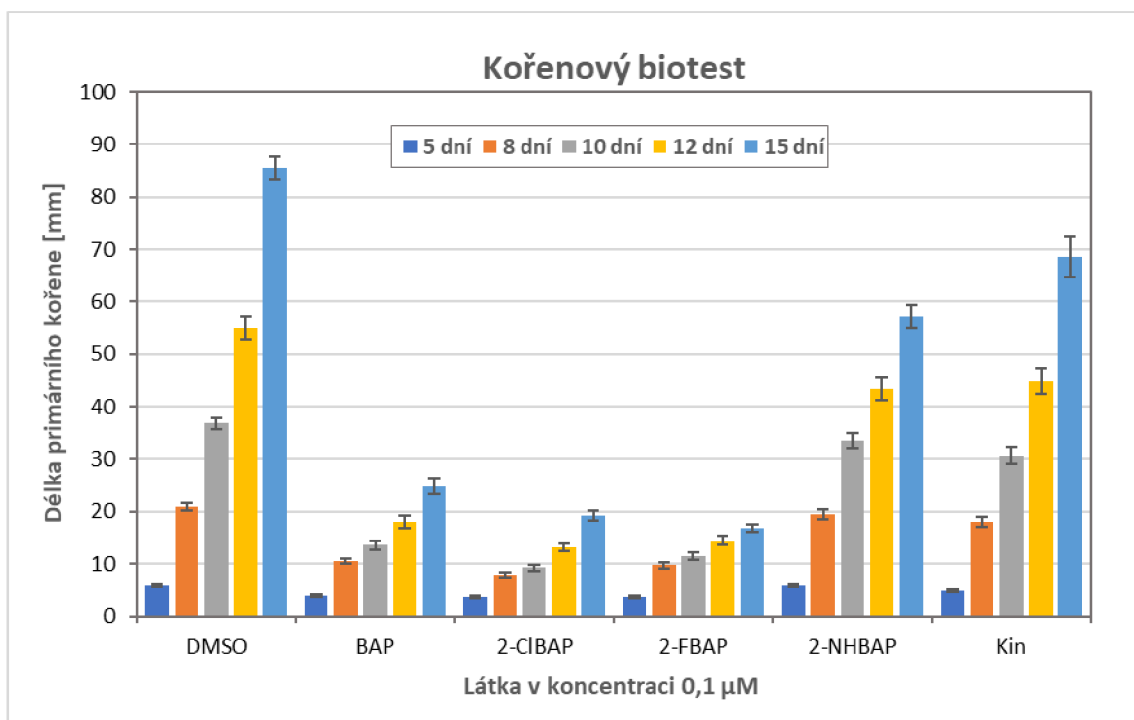
Elementární analýza všech připravených sloučenin byla provedena Ing. Janou Kočířovou, získané hodnoty byly zaneseny do tabulky 1. Zastoupení prvků v testovaných látkách se místy liší od teoretických hodnot, odchylky byly pravděpodobně způsobeny přítomností nečistot z důvodu použití nesprávného standardu či nedokonalým dosušením před provedením analýz. Ostatní parametry jednotlivých látek mimo elementární analýzu jsou pro vyšší přehlednost uvedeny v sekci syntéz vždy u konkrétní látky.

Tab. 1: Hodnoty elementární analýzy testovaných sloučenin

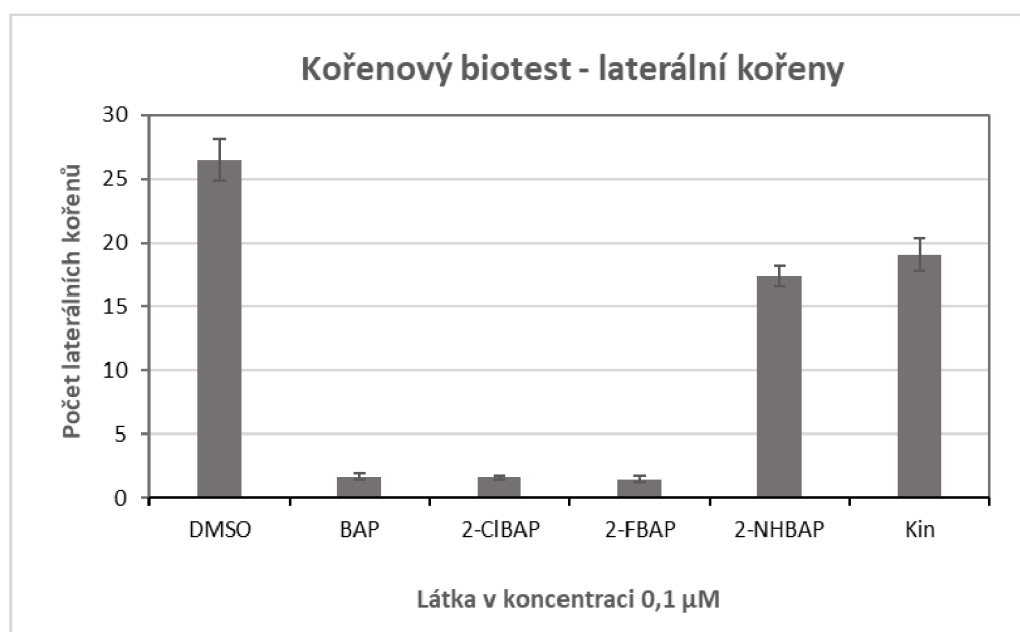
Látka	Teoretické hodnoty			Provedená analýza		
	% N	% C	% H	% N	% C	% H
Kin	32,54	55,81	4,22	31,76	55,18	4,05
2-FBAP	28,79	59,25	4,14	28,04	59,21	4,23
2-CIBAP	26,97	55,50	3,88	26,09	54,35	3,73
2-NHBAP	34,98	59,99	5,03	34,94	58,84	5,01

### 4.3 Biologická aktivita připravených látek

#### 4.3.1 Kořenový biotest

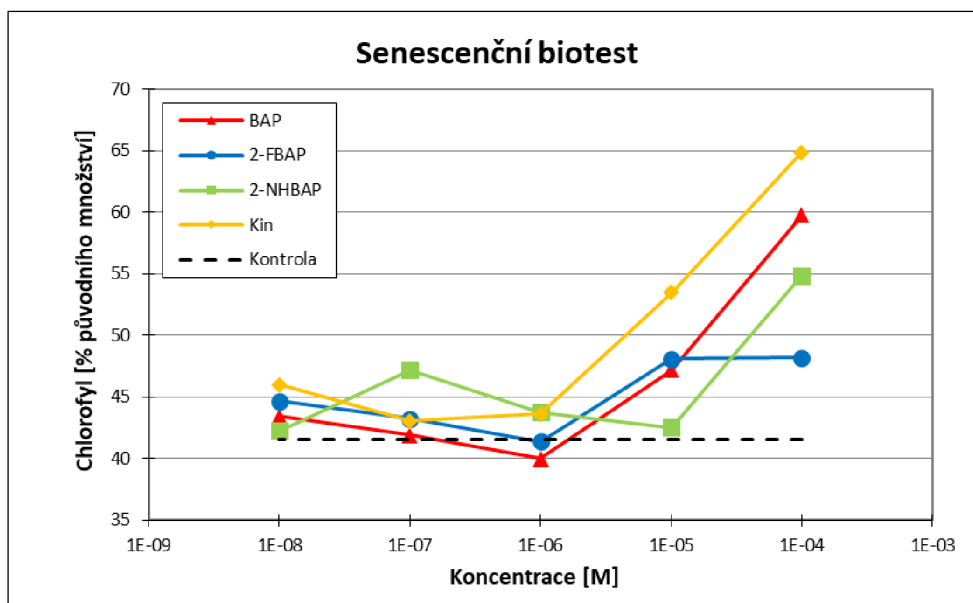


Obr. 6: Závislost délky primárního kořene na aplikaci látek 2-CIBAP, 2-FBAP, 2-NHBAP, Kin a kontrol v koncentraci 0,1 µM. Jako pozitivní kontrola sloužil BAP, jako negativní kontrola bylo použito DMSO



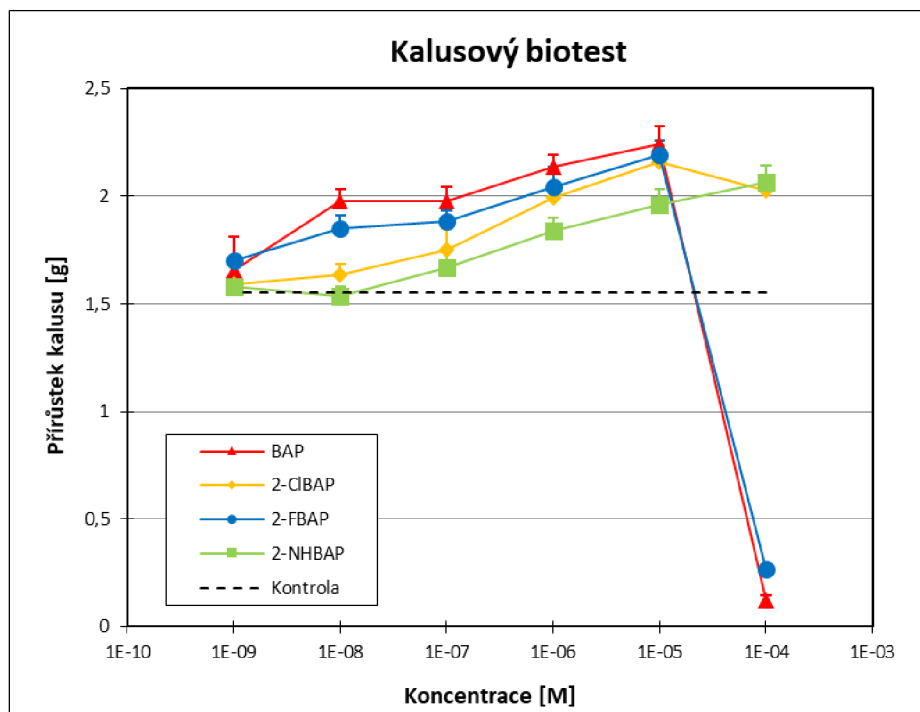
Obr. 7: Závislost množství laterálních kořenů na aplikaci látek 2-CIBAP, 2-FBAP, 2-NHBAP, Kin a kontrol v koncentraci 0,1 µM. Jako pozitivní kontrola sloužil BAP, jako negativní kontrola bylo použito DMSO

### 4.3.2 Senescenční biotest



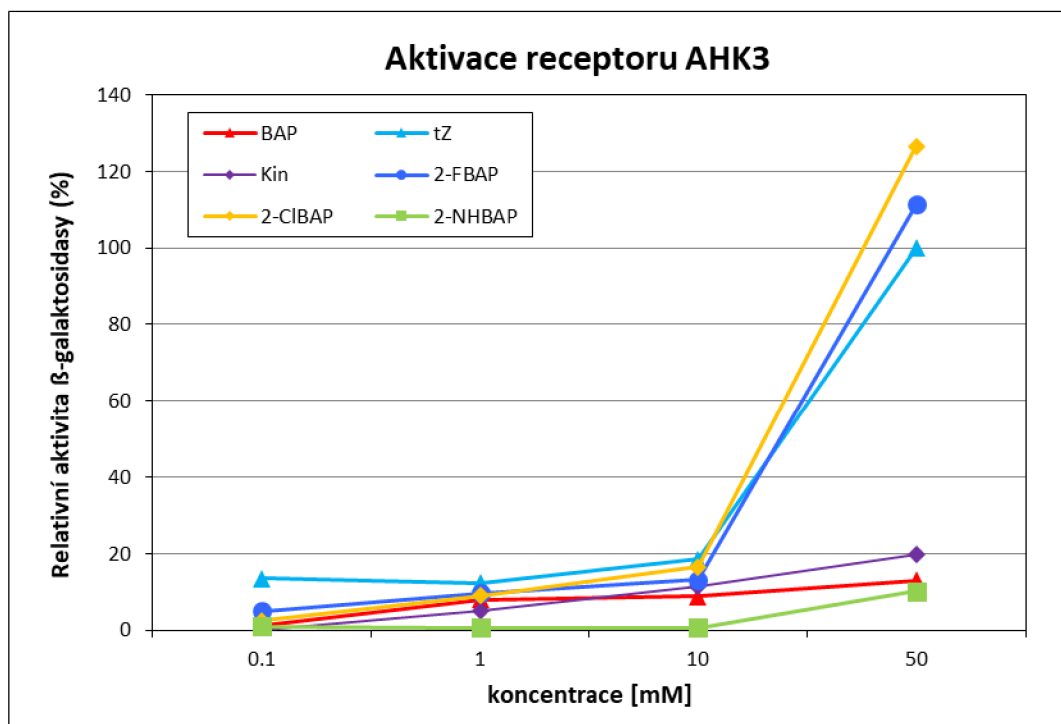
Obr. 8: Závislost retence chlorofylu na koncentraci 2-FBAP, 2-NHBAP a Kin v médiu. Jako pozitivní kontrola sloužil BAP, jako negativní kontrola byla použita voda – v grafu značena přerušovanou linkou. Z důvodu špatné rozpustnosti ve vodě látka 2-CIBAP testována nebyla.

### 4.3.3 Kalusový biotest

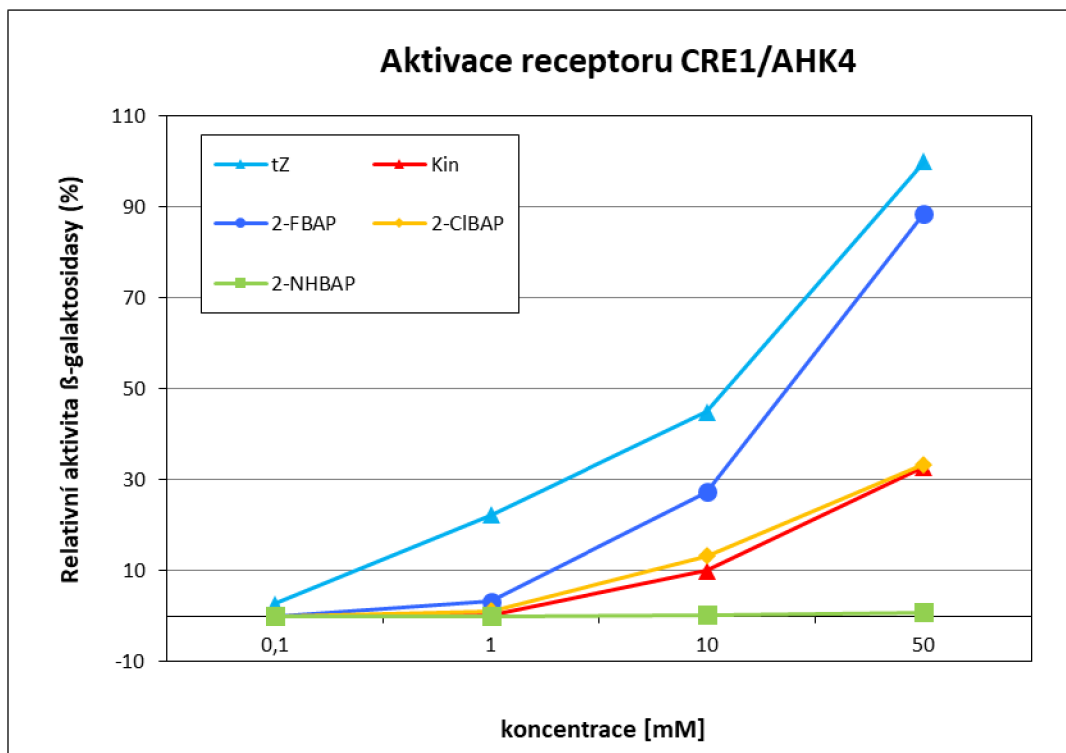


Obr. 9: Závislost hmotnosti přírůstku kalusu na koncentraci 2-CIBAP, 2-FBAP a 2-NHBAP. Jako pozitivní kontrola sloužil BAP, jako negativní kontrola bylo použito DMSO – v grafu značeno přerušovanou linkou

#### 4.3.4 Receptorový biotest

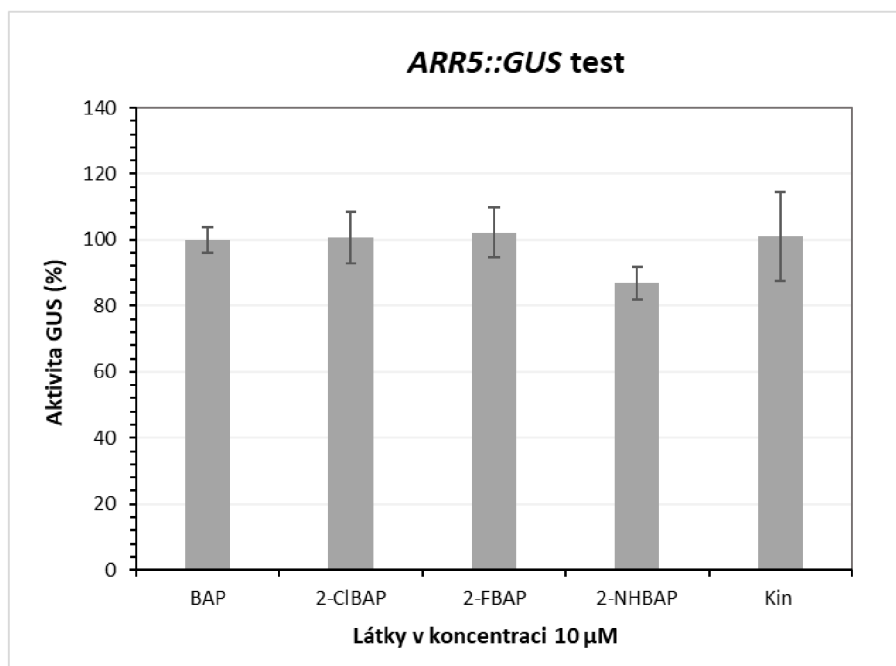


Obr. 10: Závislost relativní aktivity  $\beta$ -galaktosidasy (receptor AHK3) na koncentraci 2-CIBAP, 2-FBAP, 2-NHBAP, Kin a kontrol v médiu. Jako kontroly pro porovnání výsledků byly použity BAP a tZ



Obr. 11: Závislost relativní aktivity  $\beta$ -galaktosidasy (receptor CRE1/AHK4) na koncentraci 2-CIBAP, 2-FBAP, 2-NHBAP, Kin a kontrol v médiu. Jako kontrola byl použit tZ

#### 4.3.5 *ARR5::GUS* test



Obr. 12: Závislost aktivity GUS na přítomnosti 2-CIBAP, 2-FBAP, 2-NHBAP, Kin a kontroly v médiu v koncentraci 10 µM. Jako kontrola byl použit BAP.

Hodnoty testovaných látek jsou vztaženy ke kontrole



## 5 Diskuse

CK negativně regulují růst hlavního kořene i tvorbu laterálních kořenů (Fukaki a Tasaka, 2008). Provedené kořenové biotesty ukázaly, že přítomnost chloru i fluoru v pozici C<sup>2</sup> u připravených derivátů BAP zesiluje jeho inhibiční efekt na kořeny. Látky 2-NHBAP a Kin prokázaly tuto očekávanou CK aktivitu také, ale zdaleka ne tak silnou. To se shoduje s daty z předchozí studie těchto sloučenin, ve které autoři uvedli, že halogenace na pozici C<sup>2</sup> amplifikuje CK aktivitu, zatímco umístění aminoskupiny na tuto pozici aktivitu snižuje (Savelieva *et al.*, 2018).

V senescenčním testu se potvrdila antisenescenční aktivita Kin (Barciszewski *et al.*, 2007) a ukázala se i u 2-FBAP a 2-NHBAP. Data publikovaná Nislerem *et al.*, 2010 ukazují, že optimální koncentrace pro antisenescenční aktivitu strukturně podobného 2-fluor-6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purinu a 2-amino-6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purinu je také 0,1 mM, nicméně derivát s fluorem na C<sup>2</sup> měl o 10 % vyšší aktivitu oproti tomu s aminoskupinou na této pozici.

Látka 2-ClBAP v senescenčním biotestu testována nebyla, jelikož není rozpustná ve vodě a během testu docházelo k její precipitaci i po rozpuštění v DMSO a naředění vodou na testovanou koncentraci. Vylíčilová *et al.*, 2016 však zjistila, že (alespoň v případě ribosou derivovaných CK na pozici N<sup>9</sup>) umístění chloru na pozici C<sup>2</sup> snižuje antisenescenční efekt daného CK. Ve stejné studii bylo také poukázáno na to, že chlor na pozici C<sup>2</sup> snižuje toxicitu testovaných aromatických CK (Vylíčilová *et al.*, 2016; Hönig *et al.*, 2018).

V kalusovém testu stoupala efektivita testovaných látek přímo úměrně s koncentrací, s výjimkou 2-FBAP a standardu BAP v koncentraci 0,1 mM, kde jejich schopnost indukce dělení kalusu klesla na minimum – v této koncentraci se totiž nejspíš začaly projevovat jako toxické pro kalus. Ve všech ostatních testovaných koncentracích však vykazovaly tyto dvě látky vyšší aktivitu než 2-ClBAP a 2-NHBAP.

Získané výsledky korelují s výsledky, které publikoval Nisler *et al.*, 2010, jenž testoval mimo jiné i 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin derivovaný na pozici C<sup>2</sup> fluorem, chlorem či aminem. Autoři uvádí, že optimální koncentrace 2-amino-6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purinu pro růst kalusu byla 0,1 mM, zatímco pro 2-chlor-6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin a také pro 2-fluor-6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin to bylo 0,01 mM. Koncentrace 0,01 mM byla optimální pro kalus i v případě samotného 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purinu.

Inhibiční efekt některých derivátů CK ve vysokých koncentracích na kalus se ukázal i ve studii provedené Matuškovou *et al.*, 2023. Indukce kalusu poklesla mimo jiné ve vysokých koncentracích zeatinu (v *trans* i *cis* isomerii) a u standardů substituovaných D-ribosou na atomu N<sup>9</sup> (jednalo se o *trans*-zeatin-9-D-ribosid, *cis*-zeatin-9-D-ribosid a isopentenyladenin-9-D-ribosid).

Inhibici kalusu ve vyšších koncentracích BAP, Kin, *tZ* a *iP* lze vidět také ve studii, kterou provedla Zahajská *et al.*, 2017. Naopak nejvyšší efekt na indukci kalusu ve vysokých koncentracích měly deriváty *tZ* substituované chlorem a bromem na pozici C<sup>8</sup>.

Podle studie Vylíčilové *et al.*, 2016 mezi aromatické CK, u kterých koncentrace 0,1 mM růst kalusu podporuje, patří deriváty 2-chlor-6-benzylaminopurin-9-ribosidu nesoucí chlor či jod na pozici *para* aromatického postranního řetězce.

Co se týče isoprenoidních CK, u kterých je koncentrace přesahující 0,1 mM optimální pro indukci kalusového růstu, řadí se mezi ně (1<sup>''R</sup>)-1<sup>''</sup>-methyl-*cis*-zeatin-9-ribosid. Zajímavé je, že isomer této látky (1<sup>''S</sup>)-1<sup>''</sup>-methyl-*cis*-zeatin-9-ribosid na dělení kalusu nemá v podstatě žádný vliv (Fujii *et al.*, 1994).

Vysokou schopnost aktivace receptoru AHK3 prokázaly 2-CIBAP a 2-FBAP, které v koncentraci 50 mM dosahovaly aktivity okolo 120 %, což přesahovalo 100% aktivitu standardu *tZ* v této koncentraci. Oproti tomu 2-NHBAP a Kin neaktivovaly receptor AHK3 ani na 20 %, stejně jako tomu bylo u standardu BAP. To souhlasí s výsledky publikovanými Nislerem *et al.*, 2010, které poukazují na to, že substituce halogenu na pozici C<sup>2</sup> aromatického CK zvyšuje jeho schopnost aktivovat jak receptor AHK3, tak i CRE1/AHK4, zatímco aminoskupina na této pozici aktivaci snižuje. To je také v souladu se studií od Savelievy *et al.*, 2018. Ve studii publikované Zahajskou *et al.*, 2017 však Kin vykazoval vysokou míru aktivace AHK3.

Nízká aktivace receptoru AHK3 účinkem BAP se ukázala i ve studii provedené Romanovem *et al.*, 2006. Autoři této studie rovněž uvádí, že z testovaných látek naopak nejvyšší afinitu k receptoru AHK3 i k receptoru CRE1/AHK4 vykazoval *tZ*.

Receptor CRE1/AHK4 byl ve všech koncentracích nejsilněji aktivován standardem *tZ*, ale vysokou míru aktivace vykazoval i 2-FBAP v koncentraci 50 mM, kdy jeho aktivita byla stanovena na téměř 90 %. Jak Kin, tak i 2-CIBAP dosahovaly v nejvyšší koncentraci přibližně 30% aktivity. 2-NHBAP neaktivoval receptor téměř vůbec.

Těchto výsledků bylo dosaženo ve studii od Savelievy *et al.*, 2022, kde byly testovány deriváty N<sup>6</sup>-( $\alpha$ -methylbenzyl)adeninu s chlorem, fluorem či aminoskupinou na pozici C<sup>2</sup>. Autoři této studie uvádí, že především 2-fluor-N<sup>6</sup>-( $\alpha$ -methylbenzyl)adenin, ale také i 2-chlor-

$N^6$ -( $\alpha$ -methylbenzyl)adenin aktivovaly receptory AHK3 i CRE1/AHK4 velmi silně, zatímco 2-amino- $N^6$ -( $\alpha$ -methylbenzyl)adenin oba receptory aktivoval jen minimálně.

V ARR5::GUS testu dosahovala aktivita GUS všech testovaných látek hodnoty 100 %, kromě 2-NHBAP, u které to bylo téměř 90 %. Umístění halogenu na C<sup>2</sup> pozici adeninu tedy nemá vliv na expresi genu ARR5, aminoskupina na této pozici dokonce jeho expresi mírně inhibuje.

Podobných výsledků v ARR5::GUS testu dosáhl i Nisler *et al.*, 2010, kde jím testované deriváty 2-chlor-6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin a 2-fluor-6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin aktivovaly expresi genu ARR5 skoro do stejné míry jako BAP, zatímco aktivita 2-amino-6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purinu byla v tomto testu značně slabší.

## 6 Závěr

V této bakalářské práci byly optimalizovanými postupy připraveny čtyři již známé deriváty cytokininů odvozené od purinu, přičemž tři z těchto látek byly substituovány v pozici C<sup>2</sup>. Vybrané sloučeniny byly zkoumány pro jejich účinky na rostliny a potenciální uplatnění v zemědělství, v mikropropagaci rostlin či v biotechnologiích. Proběhla fyzikálně-chemická charakterizace všech připravených látek, čímž byla prokázána jejich čistota a chemická individualita. Látky byly následně otestovány v kořenovém, senescenčním, receptorovém, kalusovém a ARR5::*GUS* testu na cytokininovou aktivitu.

Ukázalo se, že látky 2-CIBAP a 2-FBAP jsou velmi silnými inhibitory kořenového růstu a také že jejich schopnost aktivace cytokininových receptorů je vysoká. Látka 2-NHBAP se v řadě testů chovala odlišně – například byla výrazně slabším inhibítoem kořenového růstu a jí zprostředkovaná aktivace cytokininových receptorů byla minimální. Zjištěné odlišnosti dávají důvody k provedení rozsáhlejších biologických testování těchto sloučenin, kde by bylo také vhodné plně vyloučit jejich toxicitu pro rostlinná pletiva i živočišné tkáně. V případě odhalení dalších pozitivních vlastností by bylo možné připravené cytokininové deriváty použít pro optimalizaci metod pěstování rostlin a dosáhnout tak zkvalitnění jejich produkce a zvýšení jejich výnosů.

## **Použitá literatura**

Aoyama, T., and A. Oka. „Cytokinin Signal Transduction in Plant Cells“. *Journal of Plant Research* 116, no. 3 (2003).

Aremu, A., M. Bairu, L. Szüčová, J. Finnie, J. Van Staden. „The Role of Meta-Topolins on the Photosynthetic Pigment Profiles and Foliar Structures of Micropropagated ‚Williams‘ Bananas“. *Journal of Plant Physiology* 169, no. 15 (2012).

Barciszewski, J., F. Massino, B. Clark. „Kinetin – a Multiactive Molecule“. *International Journal of Biological Macromolecules* 40, no. 3 (2007).

Bielach, A., M. Hrtyan, V. Tognetti. „Plants under stress: Involvement of Auxin and cytokinin“. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (7), 1427 (2017).

Brandstatter, I., J. Kieber. „Two Genes with Similarity to Bacterial Response Regulators Are Rapidly and Specifically Induced by Cytokinin in Arabidopsis“. *The Plant Cell* 10, no. 6 (1998).

Brukhin, V., N. Morozova. „Plant Growth and Development – Basic Knowledge and Current Views“. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena* 6, no. 2 (2011).

Bruno, L., M. Pacenza, I. Forgione, L. Lamerton, M. Greco, A. Chiappetta, M. Bitonti. „In Arabidopsis Thaliana Cadmium Impact on the Growth of Primary Root by Altering SCR Expression and Auxin-Cytokinin Cross-Talk“. *Frontiers in Plant Science* 8 (2017).

Cary, A., W. Liu, S. Howell. „Cytokinin Action Is Coupled to Ethylene in Its Effects on the Inhibition of Root and Hypocotyl Elongation in Arabidopsis Thaliana Seedlings“. *Plant Physiology* 107, no. 4 (1995).

Chen, L., J. Zhao, J. Song, P. Jameson. „Cytokinin Glucosyl Transferases, Key Regulators of Cytokinin Homeostasis, Have Potential Value for Wheat Improvement“. *Plant Biotechnology Journal* 19, no. 5 (2021).

Ćosić, T., V. Motyka, M. Raspor, S. Sajid, N. Devrnja, P. Dobrev, S. Ninković. „Comprehensive Phytohormone Profiling of Kohlrabi during in Vitro Growth and Regeneration: The Interplay with Cytokinin and Sucrose“. *Life* 12, no. 10 (2022).

Enders, T., L. Strader. „Auxin Activity: Past, Present, and Future“. *American Journal of Botany* 102, no. 2 (2015).

Frébort, I., M. Kowalska, T. Hluska, J. Frébortová, P. Galuszka. „Evolution of Cytokinin Biosynthesis and Degradation“. *Journal of Experimental Botany* 62, no. 8 (2011).

Fujii, T., M. Ohba, H. Kawamura, Y. Nakashio, K. Honda, S. Matsubara. „Purines. LXII. Both Enantiomers of N<sup>6</sup>-(1,3-Dimethyl-2-Butenyl)Adenine and Their 9-β-D-Ribofuranosides: Synthesis and Cytokinin Activity“. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 42, no. 5 (1994).

Fukaki, H., M. Tasaka. „Hormone Interactions during Lateral Root Formation“. *Plant Molecular Biology* 69, no. 4 (2008).

Gajdošová, S., L. Spíchal, M. Kamínek, K. Hoyerová, O. Novák, P. Dobrev, P. Galuszka, et al. „Distribution, Biological Activities, Metabolism, and the Conceivable Function of Cis-Zeatin-Type Cytokinins in Plants“. *Journal of Experimental Botany* 62, no. 8 (2011).

Galuszka, P., L. Spíchal, D. Kopečný, P. Tarkowski, J. Frébortová, M. Šebela, I. Frébort. „Metabolism of Plant Hormones Cytokinins and Their Function in Signaling, Cell Differentiation and Plant Development“. *Bioactive Natural Products (Part N)* (2008).

Grosskinsky, D., K. Edelsbrunner, H. Pfeifhofer, E. Van der Graaff, T. Roitsch. „Cis- and Trans-Zeatin Differentially Modulate Plant Immunity“. *Plant Signaling & Behavior* 8, no. 7 (2013).

Gupta, M., G. Gouda, R. Donde, R. Vadde, L. Behera. „Novel Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase Inhibitors for Enhancing Grain Yield in Crop Plants and Potential Applications in the Biotechnology Industry“. *Journal of Experimental Botany* 72, no. 2 (2021).

Havlíček, L., J. Hanuš, J. Veselý, S. Leclerc, L. Meijer, G. Shaw, M. Strnad. „Cytokinin-Derived Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Synthesis and CDC2 Inhibitory Activity of Olomoucine and Related Compounds“. *Journal of Medicinal Chemistry* 40, no. 4 (1997).

Hlatshwayo, N., S. Amoo, J. Olowoyo, K. Doležal. „Efficient micropropagation protocol for the conservation of the endangered aloe *peglerae*, an ornamental and medicinal species“. *Plants*, 9 (4), 506 (2020).

Hönig, M., L. Plíhalová, A. Husičková, J. Nisler, K. Doležal. „Role of Cytokinins in Senescence, Antioxidant Defence and Photosynthesis“. *International Journal of Molecular Sciences* 19, no. 12 (2018).

Horgan, R., E. Hewett, J. Horgan, J. Purse, P. Wareing. „A New Cytokinin from *Populus X Robusta*“. *Phytochemistry* 14, no. 4 (1975).

Hou, B., E. Lim, G. Higgins, D. Bowles. „N-Glucosylation of Cytokinins by Glycosyltransferases of *Arabidopsis Thaliana*“. *Journal of Biological Chemistry* 279, no. 46 (2004).

Hutchison, C., J. Kieber. „Cytokinin Signaling in *Arabidopsis*“. *The Plant Cell* 14, no. 1 (2002).

Janečková, H., A. Husičková, U. Ferretti, M. Prčina, E. Pilařová, L. Plačková, P. Pospíšil, K. Doležal, M. Špundová. „The Interplay between Cytokinins and Light during Senescence in Detached *Arabidopsis* Leaves“. *Plant, Cell & Environment* 41, no. 8 (2018).

Janečková, H., A. Husičková, D. Lazár, U. Ferretti, P. Pospíšil, M. Špundová. „Exogenous Application of Cytokinin during Dark Senescence Eliminates the Acceleration of Photosystem II Impairment Caused by Chlorophyll b Deficiency in Barley“. *Plant Physiology and Biochemistry* 136 (2019).

Jones, B., S. Gunnerås, S. Petersson, P. Tarkowski, N. Graham, S. May, K. Doležal, G. Sandberg, K. Ljung. „Cytokinin Regulation of Auxin Synthesis in *Arabidopsis* Involves a Homeostatic Feedback Loop Regulated via Auxin and Cytokinin Signal Transduction“. *The Plant Cell* 22, no. 9 (2010).

Joshi, S., A. Choukimath, D. Isenegger, J. Panozzo, G. Spangenberg, S. Kant. „Improved Wheat Growth and Yield by Delayed Leaf Senescence Using Developmentally Regulated Expression of a Cytokinin Biosynthesis Gene“. *Frontiers in Plant Science* 10 (2019).

Kamínek, M. „Progress in Cytokinin Research“. *Trends in Biotechnology* 10 (1992).

Klos, D., M. Dušek, E. Samol'ová, M. Zatloukal, V. Nožková, N. Nesnas, L. Plačková, et al. „New Water-Soluble Cytokinin Derivatives and Their Beneficial Impact on Barley Yield and Photosynthesis“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 70, no. 23 (2022).

Koprna, R., N. De Diego, L. Dundálková, L. Spíchal. „Use of Cytokinins as Agrochemicals“. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24, no. 3 (2016).

Letham, D. „Zeatin, a Factor Inducing Cell Division Isolated from Zea Mays“. *Life Sciences* 2, no. 8 (1963).

Liang, Yuan, M. Zhao, H. Liu. „Research Progress in Cytokinins Analysis“. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 37, no. 8 (2009).

Lieberman, M. „Biosynthesis and Action of Ethylene“. *Annual Review of Plant Physiology* 30, no. 1 (1979).

Matušková, V., M. Zatloukal, T. Pospíšil, J. Voller, H. Vylíčilová, K. Doležal, M. Strnad. „From Synthesis to the Biological Effect of Isoprenoid 2'-Deoxyriboside and 2',3'-Dideoxyriboside Cytokinin Analogues“. *Phytochemistry* 205 (2023).

Miller, C., F. Skoog, M. Von Saltza, F. Strong. „Kinetin, a Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid“. *Journal of the American Chemical Society* 77, no. 5 (1955).

Mok, D., M. Mok. „Cytokinin Metabolism and Action“. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, no. 1 (2001).



Müller, B., J. Sheen. „Cytokinin and Auxin Interaction in Root Stem-Cell Specification during Early Embryogenesis“. *Nature* 453, no. 7198 (2008).

Nandi, S., D. Letham, L. Palni, O. Wong, R. Summons. „6-Benzylaminopurine and Its Glycosides as Naturally Occurring Cytokinins“. *Plant Science* 61, no. 2 (1989).

Nisler, J., M. Zatloukal, I. Popa, K. Doležal, M. Strnad, L. Spíchal. „Cytokinin Receptor Antagonists Derived from 6-Benzylaminopurine“. *Phytochemistry* 71, no. 7 (2010).

Nisler, J., M. Zatloukal, R. Sobotka, J. Pilný, B. Zdvihalová, O. Novák, M. Strnad, L. Spíchal. „New Urea Derivatives Are Effective Anti-Senescence Compounds Acting Most Likely via a Cytokinin-Independent Mechanism“. *Frontiers in Plant Science* 9 (2018).

Nisler, J., D. Kopečný, Z. Pěkná, R. Končítiková, R. Koprna, N. Murvanidze, S. Werbrouck, et al. „Diphenylurea-Derived Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase Inhibitors for Biotechnology and Agriculture“. *Journal of Experimental Botany* 72, no. 2 (2020).

Plíhal, O., L. Szüčová, P. Galuszka. „N9-Substituted Aromatic Cytokinins with Negligible Side Effects on Root Development Are an Emerging Tool for *in Vitro* Culturing“. *Plant Signaling & Behavior* 8, no. 6 (2013).

Plíhalová, L., H. Vylíčilová, K. Doležal, L. Zahajská, M. Zatloukal, M. Strnad. „Synthesis of Aromatic Cytokinins for Plant Biotechnology“. *New Biotechnology* 33, no. 5 (2016).

Ranjan, A., R. Sinha, S. Lal, S. Bishi, A. Singh. „Phytohormone Signalling and Cross-Talk to Alleviate Aluminium Toxicity in Plants“. *Plant Cell Reports* 40, no. 8 (2021).

Romanov, G., S. Lomin, and T. Schmölling. „Biochemical Characteristics and Ligand-Binding Properties of Arabidopsis Cytokinin Receptor AHK3 Compared to CRE1/AHK4 as Revealed by a Direct Binding Assay“. *Journal of Experimental Botany* 57, no. 15 (2006).

Sakakibara, H. „Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation“. *The Annual Review of Plant Biology*, no. 57 (2006).

Savelieva, E., V. Oslovsky, D. Karlov, N. Kurochkin, I. Getman, S. Lomin, G. Sidorov, S. Mikhailov, D. Osolodkin, G. Romanov. „Cytokinin Activity of N6-Benzyladenine Derivatives Assayed by Interaction with the Receptors in Planta, in Vitro, and in Silico“. *Phytochemistry* 149 (2018).

Savelieva, E., A. Zenchenko, M. Drenichev, A. Kozlova, N. Kurochkin, D. Arkhipov, A. Chizhov, V. Oslovsky, G. Romanov. „In Planta, in Vitro and in Silico Studies of Chiral N6-Benzyladenine Derivatives: Discovery of Receptor-Specific S-Enantiomers with Cytokinin or Anticytokinin Activities“. *International Journal of Molecular Sciences* 23, no. 19 (2022).

Strnad, M. „The Aromatic Cytokinins“. *Physiologia Plantarum* 101, no. 4 (1997).

Sun, J., N. Hirose, X. Wang, P. Wen, L. Xue, H. Sakakibara, J. Zuo. „Arabidopsis SOI33/ATENT8 Gene Encodes a Putative Equilibrative Nucleoside Transporter That Is Involved in Cytokinin Transport in Planta“. *Journal of Integrative Plant Biology* 47, no. 5 (2005).

Svačinová, J., O. Novák, L. Plačková, R. Lenobel, J. Holík, M. Strnad, K. Doležal. „A New Approach for Cytokinin Isolation from Arabidopsis Tissues Using Miniaturized Purification: Pipette Tip Solid-Phase Extraction“. *Plant Methods* 8, no. 1 (2012).

Szüčová, L., L. Spíchal, K. Doležal, M. Zatloukal, J. Greplová, P. Galuszka, V. Kryštof. „Synthesis, Characterization and Biological Activity of Ring-Substituted 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl and 9-tetrahydrofuran-2-ylpurine Derivatives“. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, no. 5 (2009).

Tarakhovskaya, E., Yu. Maslov, M. Shishova. „Phytohormones in Algae“. *Russian Journal of Plant Physiology* 54, no. 2 (2007).

Tarkowská, D., K. Doležal, P. Tarkowski, C. Åstot, J. Holub, K. Fuksová, T. Schmülling, G. Sandberg, M. Strnad. „Identification of New Aromatic Cytokinins in Arabidopsis Thaliana and Populus × Canadensis Leaves by LC-(+)ESI-MS and Capillary Liquid Chromatography/Frit-Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry“. *Physiologia Plantarum* 117, no. 4 (2003).

Vesely, J., L. Havlicek, M. Strnad, J. Julian Blow, A. Donella-Deana, L. Pinna, D. Letham, et al. „Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues“. *European Journal of Biochemistry* 224, no. 2 (1994).

Vlčková, A., M. Špundová, E. Kotabová, R. Novotný, K. Doležal, J. Nauš. „Protective Cytokinin Action Switches to Damaging during Senescence of Detached Wheat Leaves in Continuous Light“. *Physiologia Plantarum* 126, no. 2 (2006).

Vylíčilová, H., A. Husičková, L. Spíchal, J. Srovnal, K. Doležal, O. Plíhal, L. Plíhalová. „C2-Substituted Aromatic Cytokinin Sugar Conjugates Delay the Onset of Senescence by Maintaining the Activity of the Photosynthetic Apparatus“. *Phytochemistry* 122 (2016).

Wang, X., C. Han, K. Wu, L. Luo, Y. Wang, X. Du, Q. He, F. Ye. „Design, Synthesis and Ability of Non-Gold Complexed Substituted Purine Derivatives to Inhibit LPS-Induced Inflammatory Response“. *European Journal of Medicinal Chemistry* 149 (2018).

Vylíčilová, H., M. Bryksová, V. Matušková, K. Doležal, L. Plíhalová, M. Strnad. „Naturally occurring and artificial N9-cytokinin conjugates: From synthesis to biological activity and back.“ *Biomolecules* 10(6), 832 (2020).

Werbrouck, S., M. Strnad, H. Van Onckelen, P. Debergh. „Meta-Topolin, an Alternative to Benzyladenine in Tissue Culture?“. *Physiologia Plantarum* 98, no. 2 (1996).

Whippo, C., R. Hangarter. „Phototropism: Bending towards Enlightenment“. *The Plant Cell* 18, no. 5 (2006).

Zahajská, L., J. Nisler, J. Voller, T. Gucký, T. Pospíšil, L. Spíchal, M. Strnad. „Preparation, Characterization and Biological Activity of C8-Substituted Cytokinins“. *Phytochemistry* 135 (2017).

Zhang, X., Y. Chen, X. Lin, X. Hong, Y. Zhu, W. Li, W. He, F. An, H. Guo. „Adenine Phosphoribosyl Transferase 1 Is a Key Enzyme Catalyzing Cytokinin Conversion from Nucleobases to Nucleotides in Arabidopsis“. *Molecular Plant* 6, no. 5 (2013).

Zhang, R., D. Letham. „Cytokinin Biochemistry in Relation to Leaf Senescence. III. the Senescence-Retarding Activity and Metabolism of 9-Substituted 6-Benzylaminopurines in Soybean Leaves“. *Journal of Plant Growth Regulation* 8, no. 3 (1989).

Zhao, L., W. Chang, Y. Xiao, H. Liu, P. Liu. „Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis“. *Annual Review of Biochemistry* 82, no. 1 (2013).