

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Optimalizace metody analýzy bakteriálních cytokininů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|---|
| Autor: | Bc. Jana Bartošková |
| Studijní program: | N1406 Biochemie |
| Studijní obor: | Biochemie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D. |
| Termín odevzdání práce: | 23. 4. 2012 |

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 23. 4. 2012

.....

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Petru Tarkowskému za všechny rady a připomínky a odborné vedení mé diplomové práce.

Velké poděkování patří také Doc. RNDr. Jitce Frébortové Ph.D. a Mgr. Kateřině Václavíkové Ph.D. za pomoc s kultivací bakterií.

Děkuji také svým kolegům z laboratoře za ochotu pomoci a příjemnou atmosféru na pracovišti.

V neposlední řadě děkuji rodině a příteli za trpělivost a hlavně podporu v každodenním životě.

Bibliografická identifikace

| | |
|--------------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Jana Bartošková |
| Název práce | Optimalizace metody analýzy bakteriálních cytokininů |
| Typ práce | Magisterská |
| Pracoviště | Katedra biochemie |
| Vedoucí práce | Doc. RNDr. Petr Tarkowski Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2012 |
| Abstrakt | <p>Tato práce se zaměřuje na analýzu 2-methylthio cytokininů v bakteriálních médiích. Hlavními cíly této práce bylo vyvinout dostatečně účinný purifikační protokol pro stanovení hladin těchto derivátů v biologickém materiálu a zrychlení HPLC-MS metody identifikace a kvantifikace 2MeS cytokininů.</p> <p>V této práci byl navržen purifikační protokol využívající klasickou SPE extrakci pro médium a buňky <i>Nostoc</i> a médium <i>Rhodococcus fascians</i>. Jako alternativa k tomuto postupu byla využita také purifikace pomocí monolitických kapilár naplněných kopolymerem 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonové kyseliny a ethylendimethakrylátu (AMPS-co-EDMA).</p> <p>Dále byly identifikovány a kvantifikovány 2MeS cytokininy v médiu <i>Nostoc</i>, <i>Rhodococcus fascians</i> a WT a IPT mutantu <i>Streptomyces turgidiscabies</i> pomocí HPLC/MS/MS.</p> <p>Ke zrychlení HPLC/MS/MS metody byl využit systém reverzních fází a hydrofilní interakční chromatografie. Pokusy urychlit analýzu 2MeS cytokininů ovšem ztroskotali na nemožnosti separovat izomery 2MeScZR a 2MeStZR v systému reverzních fází a na nulové retenci 2MeSiPR při využití HILIC chromatografie.</p> |
| Klíčová slova | 2-methylthio cytokininy, <i>Nostoc</i> , <i>Rhodococcus fascians</i> , <i>Streptomyces turgidiscabies</i> , LC/MS, LC/UV-VIS |
| Počet stran | 98 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------------|---|
| Autor's first name and surname | Bc. Jana Bartošková |
| Type of thesis | Master |
| Department | Department of biochemistry |
| Supervisor | Doc.RNDr. Petr Tarkowski Ph.D. |
| The year of presentation | 2012 |
| Abstract | <p>This work focuses on the analysis of 2-methylthio cytokinins in bacterial media. The main objectives of this work were to develop a sufficiently effective purification protocol for determining the levels of these derivatives in biological material and acceleration of HPLC/MS method for the identification and quantification of 2MeS cytokinins. This work designed purification protocol using conventional SPE extraction for purification of medium <i>Rhodococcus fascians</i> and the cells and medium <i>Nostoc</i>. As an alternative to this procedure was also used purification using monolithic capillaries filled with poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid-co-ethylene dimethacrylate)(AMPS-co-EDMA).</p> <p>We also identified and quantified 2MeS cytokinins in the medium <i>Nostoc</i>, <i>Rhodococcus fascians</i> and WT and IPT mutant of <i>Streptomyces turgidiscabies</i> using HPLC / MS / MS. For acceleration of HPLC-MS method the system of reverse phases and hydrophilic interaction chromatography were used. Attempts to accelerate the analysis of 2MeS cytokinins crashed on the impossibility of separating isomers 2MeScZR and 2MeStZR in the reverse phase system and on zero retention of 2MeSiPR using HILIC chromatography.</p> |
| Keywords | 2-methylthio- cytokinins, <i>Nostoc</i> , <i>Rhodococcus fascians</i> , <i>Streptomyces turgidiscabies</i> , LC/MS, LC/UV-VIS |
| Number of pages | 98 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Cíle práce | 10 |
| 2. Úvod | 11 |
| 3.1. Nostoc | 13 |
| 3.1.1 Heterocysty | 15 |
| 3.1.2 Akinety | 16 |
| 3.1.3 Hormogonia | 17 |
| 3.2 Rhodococcus | 18 |
| 3.2.1 <i>Rhodococcus fascians</i> | 19 |
| 3.3 Streptomyces | 20 |
| 3.3.1 <i>Streptomyces turgidiscabies</i> | 22 |
| 3.4 Cytokininy | 23 |
| 3.4.1 2MeS cytokininy | 23 |
| 3.4.2 Biosyntéza cytokininů | 25 |
| 3.4.2.1 Biosyntéza 2MeS cytokininů v tRNA..... | 26 |
| 3.4.3 Interkonverze | 27 |
| 3.4.4 Degradace a inaktivace..... | 28 |
| 3.4.5 Cytokininy jako signální molekuly..... | 28 |
| 3.4.6 Interakce cytoininů s ostatními fytohormony..... | 29 |
| 3.4.7 Význam cytokininů v patogenezi | 30 |
| 3.4.7.1 Cytokininy produkované <i>Rhodococcus fascians</i> | 31 |
| 3.4.7.2 Patogeneze <i>Rhodococcus fascians</i> | 31 |
| 3.4.7.3 Patogeneze <i>Streptomyces turgidiscabies</i> | 34 |
| 3.5 Metody studia cytokininů | 37 |
| 3.5.1 Extrakce cytokininů | 37 |
| 3.5.2 Purifikace | 38 |
| 3.5.2.1 Mikroextrakce | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.3 Metody koncové analýzy | 45 |
| 3.5.3.1 Chromatografie na reverzní fázi | 45 |
| 3.5.3.2 HILIC chromatografie | 47 |
| 4. Materiál a chemikálie | 50 |
| 4.1 Biologický materiál | 50 |
| 4.2 Chemikálie | 50 |
| 4.3 Materiál | 51 |
| 4.4 Přístrojové vybavení | 52 |
| 5. Metody | 54 |
| 5.1 Příprava bakteriálních kultur | 54 |
| 5.1.1 Kultivace <i>Nostoc</i> | 54 |
| 5.1.2 Kultivace <i>Rhodococcus fascians</i> | 55 |
| 5.1.3 Kultivace <i>Streptomyces turgidiscabies</i> | 56 |
| 5.2. Purifikace 2MeS cytokininů | 56 |
| 5.2.1 Optimalizace purifikačního protokolu – médium <i>Nostoc</i> | 56 |
| 5.2.2 Purifikace média <i>Nostoc</i> pro kvantifikaci a identifikaci 2MeS cytokininů | 57 |
| 5.2.3 Purifikace 2MeS cytokininů <i>Nostoc</i> - buňky | 57 |
| 5.2.4 Optimalizace purifikačního protokolu <i>Rhodococcus fascians</i> - médium | 58 |
| 5.2.5 Purifikace 2MeS CK v médiu <i>Rhodococcus fascians</i> pro kvantifikaci | 58 |
| 5.2.6 Purifikace cytokininů z média <i>Streptomyces turgidiscabies</i> | 59 |
| 5.3 Chromatografické metody | 59 |
| 5.3.1. HPLC/UV-VIS stanovení recovery purifikace 2MeS cytokininů | 59 |
| 5.3.2 UHPLC-MS/MS stanovení klasických cytokininů v médiu <i>Streptomyces turgidiscabies</i> | 59 |
| 5.3.3 HPLC/MS/MS metoda identifikace a kvantifikace 2MeS cytokininů | 60 |
| 5.4 Purifikace 2MeS CK s využitím PMME | 60 |
| 5.4.1 Stanovení návratnosti purifikace s využitím PMME | 61 |
| 5.4.2 Purifikace 2MeS CK v médiu <i>Nostoc</i> pomocí PMME | 61 |

| | |
|--|-----------|
| 5.5 Vývoj UHPLC metody pro analýzu 2MeS cytokininů | 61 |
| 6. Výsledky | 62 |
| 6.1 Optimalizace protokolu pro purifikaci 2MeS cytokininů z bakteriálních médií | 62 |
| 6.1.1. Optimalizace purifikačního protokolu pro izolaci 2MeS CK z kultivačního média <i>Nostoc</i> – HPLC-UV | 62 |
| 6.1.2 návratnost purifikace 2MeS CK v médiu <i>Nostoc</i> – HPLC-MS/MS | 63 |
| 6.1.3 návratnost purifikace 2MeS CK z média <i>R. fascians</i> | 63 |
| 6.1.4 návratnost purifikace 2MeS cytokininů z média <i>Rhodococcus fascians</i> | 64 |
| 6.3 Identifikace a kvantifikace 2MeS cytokininů buňkách a v médiu <i>Nostoc</i> | 65 |
| 6.3.1 Identifikace a kvantifikace 2MeS cytokininů v buňkách <i>Nostoc</i> | 65 |
| 6.3.2 Identifikace a kvantifikace 2MeS cytokininů v médiu <i>Nostoc</i> | 66 |
| 6.4 Kvantifikace 2MeS cytokininů v médiu <i>Rhodococcus fascians</i> | 67 |
| 6.5 Identifikace a kvantifikace klasických a 2MeS cytokininů v médiu WT a IPT mutantu <i>Streptomyces turgidiscabies</i> | 68 |
| 6.5.1 Identifikace a kvantifikace klasických CK..... | 68 |
| 6.5.2 Identifikace a kvantifikace 2MeS cytokininů..... | 69 |
| 6.6 Purifikace 2MeS cytokininů s využitím PMME | 71 |
| 6.6.1 Stanovení návratnosti purifikace | 71 |
| 6.6.2 Purifikace 2MeS cytokininů z kultivačního média <i>Nostoc</i> s využitím PMME... | 72 |
| 6.6.3 Srovnání hladin 2MeS CK stanovených SPE – C18 a PMME – AMPS-co-EDMA | 72 |
| 6.7 Vývoj UPLC metody pro analýzu 2MeS CK..... | 74 |
| 6.7.1 Vývoj metody v systému reverzních fází..... | 74 |
| 6.7.1.1 Kolona BEH 300 C4..... | 74 |
| 6.7.1.2 Kolona CSH C18..... | 76 |
| 6.7.1.3 Kolona ZORBAX BONUS RP..... | 78 |
| 6.7.2 Vývoj metody v HILIC módu | 78 |
| 6.7.2.1 Kolona Kinetex 2,6u HILIC 100A..... | 79 |
| 6.7.2.2 Kolona Ascentis Express HILIC | 79 |
| 6.7.2.3 Kolona Luna 3u CN 100A | 79 |

| | |
|--|-----------|
| 6.7.2.4 Kolona Luna 3u NH ₂ 100A..... | 79 |
| 6.7.2.5 Kolona Luna 5u silica | 80 |
| 7. Diskuse..... | 81 |
| 8. Závěr..... | 84 |
| 9. Literatura | 85 |
| 10. Seznam zkratk | 97 |

1. Cíle práce

Optimalizace protokolu pro purifikaci 2MeS cytokininů v bakteriálních médiích.

Identifikace a kvantifikace 2MeS cytokininů v buňkách a médiu *Nostoc*.

Identifikace a kvantifikace 2MeS cytokininů v médiu *Rhodococcus fascians* a *Streptomyces turgidiscabies*.

Purifikace 2MeS cytokininů v bakteriálních médiích pomocí PMME.

Převedení HPLC metody pro analýzu 2MeS cytokininů na UPLC metodu.

2. Úvod

Cytokinininy jsou rostlinné hormony, které regulují mnoho vývojových procesů jako buněčné dělení, apikální dominanci a stárnutí listů. Důležitou roli hrají v kontrole vývoje i u dalších organismů například u cyanobakterií. U některých patogenních bakterií slouží k potlačení obranných mechanismů napadené rostliny a k progresi infekce. Chemicky jsou cytokinininy deriváty adeninu, které jsou klasifikovány podle substituentu na pozici N⁶ adeninového cyklu jako izoprenoidní a aromatické, přičemž všechny se mohou vyskytovat jako volné báze, ribosidy, O- nebo N-glykosidy. Aktivní formou cytokininů jsou volné báze, ostatní formy slouží jako transportní nebo zásobní (Mok & Mok, 2001).

Vývoj citlivých analytických metod hraje stěžejní roli ve stanovení zastoupení jednotlivých cytokininů, zjištění endogenních hladin a objasnění jejich funkce. Biologický materiál představuje komplexní matici, ve které se ostatní látky vyskytují v mnohem vyšších koncentracích než cytokinininy. Kritickým krokem při analýze cytokininů je proto jejich izolace. Požadavkem je vysoká účinnost extrakčních kroků a vysoká čistota získaných extraktů. Při samotné analýze cytokininů jsou využívány zejména chromatografické techniky. Dominantní roli při studiu cytokininů hraje HPLC, která má oproti GC několik výhod. Odpadá například nutnost derivatizace (cytokinininy nejsou těkavé sloučeniny) a s ní spojené technické problémy. Pro detekci se používá nejčastěji HPLC ve spojení s UV/VIS a HPLC/MS (Tarkowski *et al.*, 2004).

Teoretická část

3.1. Nostoc

Nostoc neboli jednořadka patří do kmenu sinic. Často bývá označován jako blue – green algae, vzhledem k modrozelenému zbarvení a podobnosti kolonií s řasami, ale jedná se o gram-negativní bakterii. Velikost těchto kolonií se pohybuje od mikroskopických po makroskopické rozměry (Dembitský & Řezanka, 2005).



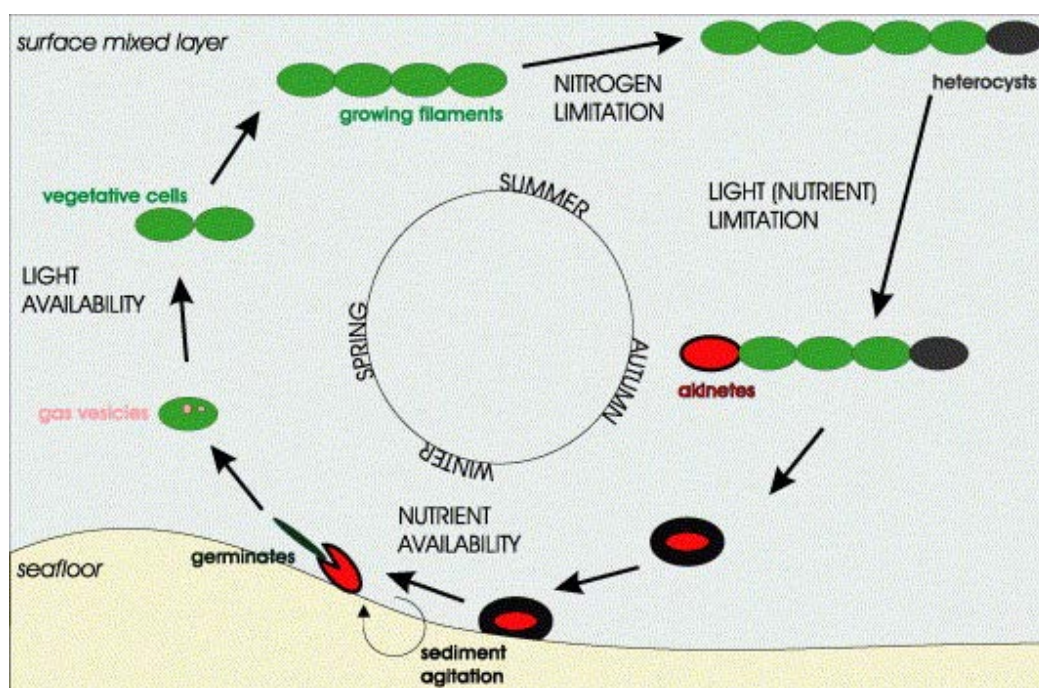
Obr. 1: *Nostoc*, kmen: MA4 UAM 307 (Mateo et al., 2010)

Vyskytuje se na dobře osvětlených stanovištích suchozemského i vodního ekosystému, ve všech podnebných pásmech, od tropického až po polární. Vzhledem ke schopnosti fixovat dusík často žije v symbióze s vyššími rostlinami. S některými houbami vytváří zvláštní druh mutualistického vztahu vedoucí ke vzniku lišejníků, přičemž rod *Nostoc* patří k jednomu z mála druhů, který neztratil schopnost přežít symbioticky i samostatně (Dembitský & Řezanka, 2005).

Tab. 1: Vědecká klasifikace *Nostoc*
(Garrity et. al, 2001)

| | |
|---------------|------------------------|
| Doména | Bakterie (Bacteria) |
| Kmen | Sinice (Cyanobacteria) |
| Třída | Sinice (Cyanobacteria) |
| Čeleď | IV |
| Rod | <i>Nostoc</i> |

Rod *Nostoc* je charakteristický nerozvětvenými, vláknitými koloniemi obalenými slizem, ve kterých mohou vystupovat až čtyři typy diferenciováných buněk, vznikající jako reakce na vnější podmínky. V závislosti na vnějším prostředí mohou vegetativní buňky diferencovat v heterocysty fixující N_2 , hormogonia nebo akinety podobné bakteriálním sporám (Meeks *et al.*, 2002). V porovnání s ostatními bakteriemi má neobvykle velký genom, přibližně 10 Mb (Meeks *et al.*, 2001).



Obr. 2: Životní cyklus Cyanobacterií (Hense & Beckmann, 2006)

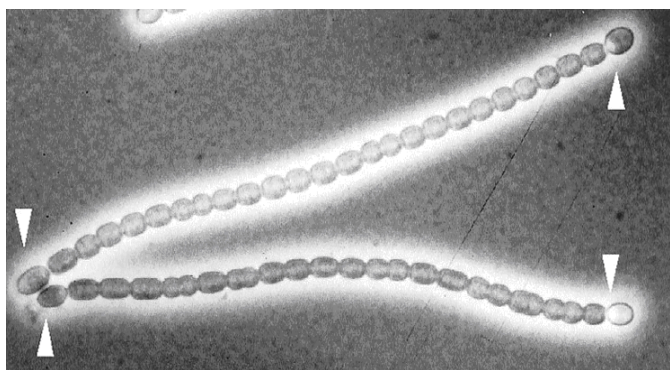
Z hlediska způsobu získávání energie může být charakterizován jako fotoautotrofní, využívající jako zdroj uhlíku CO_2 a provádějící fotosyntézu pro tvorbu ATP a redukčních ekvivalentů a zároveň diazotrofní, fixující dusík ve specializovaných buňkách, přičemž u některých druhů byla pozorována i fakultativně heterotrofní výživa (Meeks *et al.*, 2002) (heterotrofie – získávání uhlíku z organických sloučenin) (Singleton & Sainsbury, 2001).

3.1.1 Heterocysty

Fototrofie a diazotrofie nemohou probíhat současně. Řešením tohoto problému jsou buňky specializované na fixaci dusíku a vznikající jako reakce na jeho nedostatek v prostředí. Odhaduje se, že v diferenciaci heterocyst a fixaci dusíku je zapojeno více než 1000 genů, ale mechanismy indukce tvorby heterocysty dosud nebyly úplně objasněny. Transformace buňky v heterocystu je nevratná a zároveň životnost heterocysty je poměrně krátká. Zjednodušeně řečeno, diferenciaci buňky v heterocystu je primitivní formou programované buněčné smrti (Meeks *et al.*, 2002).

Sinice rodu *Nostoc* mohou využívat pro svůj růst anorganické i organické zdroje dusíku. Anorganické zdroje jsou upřednostňovány v tomto pořadí: $\text{NH}_4^+ > \text{NO}_3^- > \text{N}_2$, přičemž dostatek NH_4^+ v prostředí potlačuje vznik heterocyst (Meeks *et al.*, 2001).

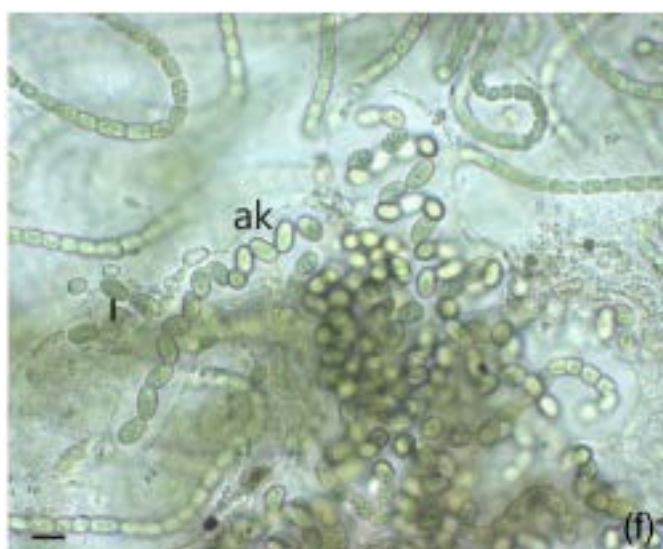
Vznik heterocysty z asimilující buňky je složitý proces. Důležitou podmínkou je odstranění veškerého kyslíku, protože enzym Nitrogenasa zajišťující fixaci dusíku vyžaduje anaerobní prostředí. Nejdříve dochází k zastavení syntézy enzymových komplexů účastnících se fotosyntézy a fixace uhlíku a je indukována syntéza Nitrogenasy. Poté se zvyšuje aktivita dýchacího řetězce a dochází k rychlému vyčerpání veškerého kyslíku. Zároveň je buňka obalena dvouvrstvou polysacharidovou a glykolipidovou membránou, která zabraňuje difúzi plynů a zajišťuje udržení mikrooxického prostředí (Meeks *et al.*, 2002).



Obr. 3: Heterocysty (Meeks *et al.*, 2002)

3.1.2 Akinety

Akinety jsou sporám podobné buňky vznikající jako reakce na nedostatek světla a živin (Meeks *et al.*, 2002). Jsou odolnější vůči chladu a vysychání než vegetativní buňky, ale méně odolné vůči extrémním podmínkám než spory gram-pozitivních bakterií (Adams & Duggan, 1999). Od vegetativních buněk se odlišují větší velikostí, nápadnými granuly obsahujícími vysoké koncentrace glykogenu a cyanophycinu a zásobním polymerem dusíku obsahujícím arginin a aspartát v téměř ekvimolární koncentraci (Wolk *et al.*, 1994). Mnoho fyziologických a genetických podobností přispívá k předpokladu, že akinety jsou evolučním předchůdcem heterocyst.



Obr. 4: Akinety (ak)

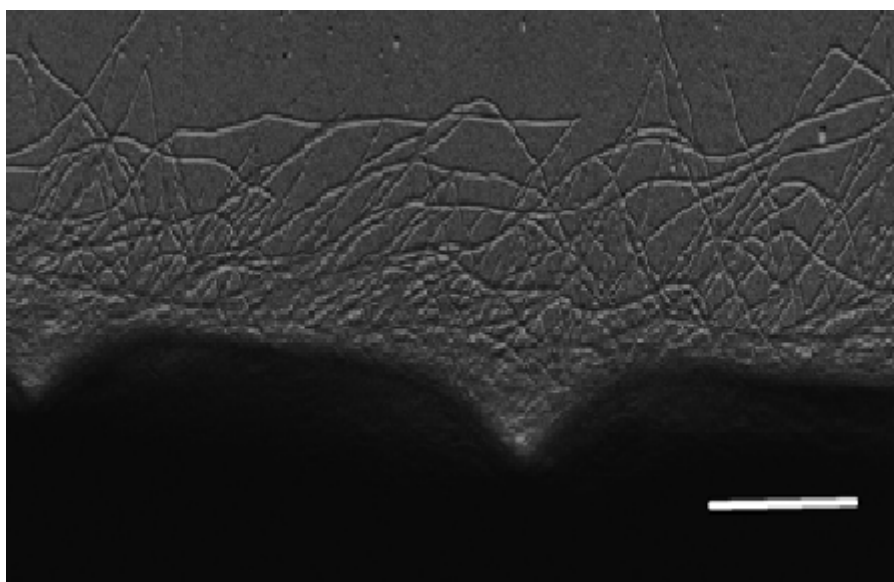
(Mateo *et al.*, 2010)

Akinety mají polysacharidovou vnější membránu, která se nevyskytuje u vegetativních buněk, a obsahují glykolipidy charakteristické pro heterocysty. Tato dvouvrstevná polysacharidová a glykolipidová membrána způsobuje rapidní snížení difúze plynů (Wolk *et al.*, 1994). Protože akinety spotřebovávají malé množství kyslíku, ale zároveň neobsahují membránové póry, jsou komponenty membrány jinak organizovány než u heterocyst (Meeks *et al.*, 2001).

3.1.3 Hormogonia

Hormogonia jsou relativně krátká pohybující se filamenta, která neobsahují heterocysty. Buňky hormogonia jsou menší, jiného tvaru než vegetativní vlákna (Meeks *et al.*, 2002). Jedná se o přechodnou, nerůstovou vývojovou fázi, ve kterou se mohou transformovat všechny buňky bez nutnosti zvětšovat svůj objem. Vzniká jako odpověď na stresové podmínky. Transformace zpět ve vegetativní buňky je možná pouze diferenciací v heterocysty (Meeks *et al.*, 2001).

Pohybující se filamenta vykazují fototaktické i chemotaktické chování. U některých hormogonií byly pozorovány plynové váčky sloužící jako další systém umožňující pohyb. Schopnost pohybovat se slouží ke kolonizaci nových prostředí (Meeks *et al.*, 2001) a umožňuje hormogoniím sloužit jako infekční činitel při vzniku symbiozy (Meeks *et al.*, 2002).



Obr. 5: Hormogonia, vyobrazená škála představuje 1 μm
(Duggan *et al.*, 2007)

3.2 *Rhodococcus*

Rhodococcus je rod aerobních, chemoorganotrofních, nepohyblivých grampozitivních bakterií s vysokým obsahem GC v DNA (63-73%). Jako zdroj uhlíku a energie je schopen využívat široké spektrum organických látek, což umožňuje nejen široký enzymatický aparát, ale i kyselina mykolová obsažená v plazmatické membráně, která umožňuje příjem hydrofobních látek. V roce 2006 byl kompletně sekvenován genom *Rhodococcus sp.* RHA1. Jedná se o jeden z největších genomů v bakteriální říši. Skládá se z 9,702,737 pb (67% G+C) organizovaných na jednom lineárním chromozomu a třech plazmidech.

Tab. 2: Vědecká klasifikace *Rhodococcus*
(Zhi *et al.*, 2009)

| | |
|---------------|---------------------|
| Doména | Bakterie (Bacteria) |
| Kmen | Actinobacteria |
| Řád | Actinomycetales |
| Čeleď | Nocardiaceae |
| Rod | <i>Rhodococcus</i> |

Rod *Rhodococcus* se vyskytuje převážně v půdě, ale i ve vodních ekosystémech a eukaryotických buňkách jako patogen (McLeod *et al.*, 2006). Zbarvení kolonií může být od bezbarvého, přes bílé, žluté, růžové, oranžové až po typické červené, podle kterého dostal tento rod svůj název (Rhodon – růže) (Goodfellow *et al.*, 1998), (Goodfellow & Maldano, 2006). V kulturách se běžně vyskytují jako koky, ale mohou procházet různými morfologickými změnami. Tyto morfologické změny představují jednoduchý životní cyklus, kdy se některé koky mění v tyčky, ze kterých mohou vznikat filamenta, která se dále větví a následně může docházet k jejich rozpadu a opakování celého cyklu.

Vzhledem ke svému komplexnímu metabolismu našel *Rhodococcus* využití v řadě průmyslových aplikací. Příkladem může být desulfurizace fosilních paliv, produkce steroidů nebo akrylamidu a kyseliny akrylové (McLeod *et al.*, 2006).

3.2.1 *Rhodococcus fascians*

Rhodococcus fascians je hojně rozšířen téměř po celém světě (Crespi *et al.*, 1994). V kultuře vypadá jako různě dlouhé, zaoblené nebo kulaté tyčky (Tilfort, 1936). Je původcem nemoci zvané „witches broom“ syndrom, volně přeloženo: nemoc čarodějnického koštěte (Václavíková, 2008). Hlavními příznaky tohoto onemocnění jsou nádory na listech („leafy galls“) a fasciace neboli ztráta apikální dominance a vytváření nefunkčních výhonků v místě infekce (Crespi *et al.*, 1994). U jednoděložných rostlin způsobuje deformaci růstu a tvorbu struktur připomínajících květ kvěťáku (Miller *et al.*, 1980). Dále inhibuje růst tabáku a vývoj jeho kořenového systému (Crespi *et al.*, 1992).

Vzhledem k širokému spektru hostitelů, včetně hospodářsky významných, zejména okrasných rostlin je tato bakterie zodpovědná za poměrně velké hospodářské škody (Depuydt *et al.*, 2008). Příkladem může být výskyt *R. fascians* v Kalifornii v roce 1950, kde působil jako limitující faktor, při produkci okrasných rostlin, zejména kopretin (*Leucanthemum*). O téměř 25 let později byla tato bakterie v oblasti stále přítomna na téměř 100% rostlin (Oduro, 1975). Anglické školky okrasných rostlin vyčíslily ztráty na prodeji, náklady spojené s likvidací napadených rostlin a ztráty na množení rostlinného materiálu, který musel být zlikvidován, aby nedocházelo k dalšímu šíření infekce, na více než 1 milion dolarů za jeden rok (Putnam & Miller, 2007).



Obr. 6: Anténovitý nádor na listu krásnoočka (*Coreopsis*)
(Putnam & Miller, 2007).

3.3 *Streptomyces*

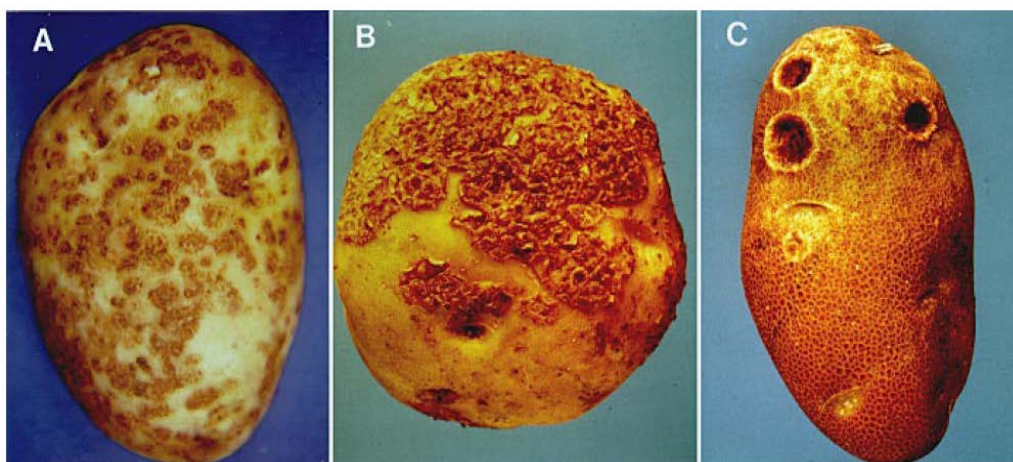
Rod *Streptomyces* zahrnuje více než pět set zástupců (Maczulak, 2011) vyskytujících se převážně v půdě, ale také ve vodě a sedimentech (Bouček-Mechine *et al.*, 2006). Je charakteristický rozvětvenými vláknitými koloniemi podobnými myceliu hub. Velikost buněk se pohybuje od 0,5 do 2 μm . Velikost genomu reprezentativního zástupce *S. coelicolor* je 8 667 507 pb (Bentley *et al.*, 2002). Na lineárním plazmidu nese 7825 genů, což je u bakterií největší dosud objevený počet genů. Většina z nich patří mezi saprofyty (saprofytismus – získávání živin z odumřelých organismů), ale jsou schopny využívat jako zdroj energie širší spektrum organických zdrojů než většina bakterií, například glukózu, laktát, škrob nebo chitin. *Streptomyces* produkuje těkavý netoxický metabolit geosmin, který udává půdě, ve které se vyskytuje, charakteristický zemitý zápach (Maczulak, 2011).

Tab. 3: Vědecká klasifikace *Streptomyces*
(Maczulak, 2011)

| | |
|---------------|---------------------|
| Doména | Bakterie (Bacteria) |
| Kmen | Actinobacteria |
| Řád | Actinomycetales |
| Čeleď | Streptomycetaceae |
| Rod | <i>Streptomyces</i> |

Rod *Streptomyces* se vyznačuje schopností produkovat antibiotika. Dnes je využíváno více než tři desítky antibiotik produkovaných tímto rodem, např. tetracykliny, streptomycin, neomycin, nystatin (Maczulak, 2011).

Pouze několik druhů je patogeny rostlin napadající výhradně jejich podzemní části (Loria *et al.*, 2007). Nejrozšířenější chorobou způsobovanou patogenními zástupci tohoto rodu (např. *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei*) (Bouček-Mechine *et al.*, 2000) je „potato scab“ neboli strupovitost brambor, která se projevuje jako povrchové nebo hluboké léze na hlízách. Strupovitost je závažné onemocnění vyskytující se po celém světě, všude tam, kde se brambory pěstují. Napadá také další hlíznaté okopaniny, včetně ředkvičky, řepy, mrkve, tuřínu a sladké brambory. Symptomy strupovitosti na bramboru se mohou výrazně lišit. Vypadají buď jako povrchové nebo vyvýšené hnědé skvrny na pokožce, nebo jako tmavé jamky zasahující několik milimetrů do bramborové hlízy. Tyto léze mohou být malé a diskrétní, nebo mohou splývat a pokrývat velké plochy povrchu hlízy (Wanner, 2006).



Obr. 7: Strupovitost na hlízách bramboru

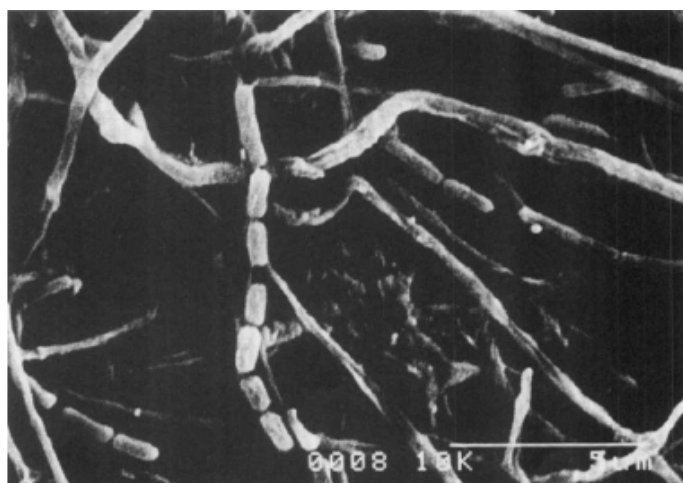
A – povrchové léze, B – vyvýšené léze, C – jamkové léze

(Loria et. al, 2007)

Nejlépe popsáním původcem strupovitosti je *Streptomyces scabies* (synonymum *S. scabiei*, kmen ATCC49173), který se vyskytuje po celém světě. Další dva morfologicky podobné, ale geneticky odlišné druhy streptomycet, *S. europaeiscabiei* a *S. stelliscabiei* byly popsány ve Francii, na východě USA a v Kanadě (Bouček-Mechine et al., 2000; Bukhalid et al., 2002). Dalšími druhy, které způsobují strupovitost jsou *S. acidiscabies*, popsána ve východní části Severní Ameriky, v Japonsku a Koreji (Lambert & Loria, 1989; Park et al., 2003a; Tóth et al., 2001), *S. turgidiscabies* popsané v Japonsku, Koreji, Finsku, a Švédsku (Kreuze et al.; 1999; Lehton et al., 2004; Miyajima et al., 1998; Park et al., 2003b) a *S. aureofaciens* ve Finsku (Kreuze et al., 1999). Další patogenní druh *S. reticuliscabiei* je odpovědný za povrchovou neboli běžnou strupovitost v Evropě (Bouček-Mechine et al., 2000). *S. reticuliscabiei* může být stejný jako původce povrchové strupovitosti v Kanadě a Finsku *S. aureofaciens* (Faucher et. al, 1992; Kreuze et. al, 1999).

3.3.1 *Streptomyces turgidiscabies*

Streptomyces turgidiscabies se odlišuje od ostatních *Streptomyces* způsobujících strupovitost brambor. Vyznačuje se šedivým zbarvením kolonií a hladkými cylindrickými spórami. V buněčné stěně obsahuje LL-diaminopimelovou kyselinu. Obsah guaninu a cytosinu v DNA je 71%. Jako zdroj uhlíku je schopna využívat rafinosu a inulin. Vykazuje citlivost na streptomycin ($20 \mu\text{g/ml}^{-1}$), penicilin G (10 UI/ml^{-1}), polymyxin B ($15 \mu\text{g/ml}^{-1}$) a acetát thalia ($15 \mu\text{g/ml}^{-1}$). Úroveň genetické příbuznosti mezi *S. turgidiscabies* a *S. acidiscabies*, *S. caviscabies*, *S. cabies*, *S. griseus*, *S. Setonii* a *S. tendae* je nízká (Miyajima *et al.*, 1998).



Obr. 8: *Streptomyces turgidiscabies*, kmen SY9113^T
(Miyajima *et al.*, 1998)

3.4 Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné hormony hrající roli v mnoha vývojových procesech. Ovlivňují buněčné dělení, senescenci, apikální dominanci, vývoj chloroplastů a klíčení semen, ale také regulují toleranci ke stresu a přenos nutričních signálů (Mok & Mok, 2001). Vyskytují se nejen u rostlin a nižších organismů jako jsou řasy a bakterie, ale i u parazitického hmyzu a červů (Stirk & van Staden, 2010).

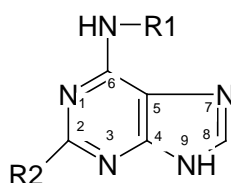
Z chemického hlediska jsou cytokininy deriváty adeninu, které jsou rozdělovány podle substituentu na pozici N^6 adeninového cyklu na isoprenoidní a aromatické. Jednotlivý zástupci obou skupin se liší přítomností či nepřítomností dvojných vazeb, hydroxylových a methylových skupin a jejich pozicí (Mok & Mok, 2001).

Většina cytokininů se také vyskytuje jako cukerné konjugáty, přičemž mezi nejhojnější patří ribosidy vázané v poloze N^9 a glykosidy v polohách N^3 , N^7 a N^9 , ale také jako nukleotidy, nebo konjugáty s aminokyselinami. Další samostatnou skupinu, zahrnující 2MeS CK a nedávno objevené hydroxyderiváty cytokininů, tvoří deriváty substituované na pozici C2 (Tarkowski, 2011). Funkční formou jsou volné báze, ostatní formy slouží jako transportní nebo zásobní (Mok & Mok, 2001).

3.4.1 2MeS cytokininy

2MeS cytokininy patří do skupiny derivátů substituovaných na uhlíku v poloze 2 adeninového cyklu. Tyto deriváty, známé především u iPR a cZR, byly identifikovány převážně u bakterií, ale i některých rostlin (Tarkowski, 2011). 2MeS cytokininy byly také objeveny v blízkosti antikodonů tRNA, které rozpoznávají kodony začínající uracilem, a pravděpodobně ovlivňují přesnost translace. Z chemického hlediska jsou tyto deriváty hydrofobnější a v jejich koncentrace jsou nižší než u běžných CK (Tarkowski et al., 2010).

Tab. 4: Příklady strukturních vzorců cytokininů
(Tarkowski, 2011)



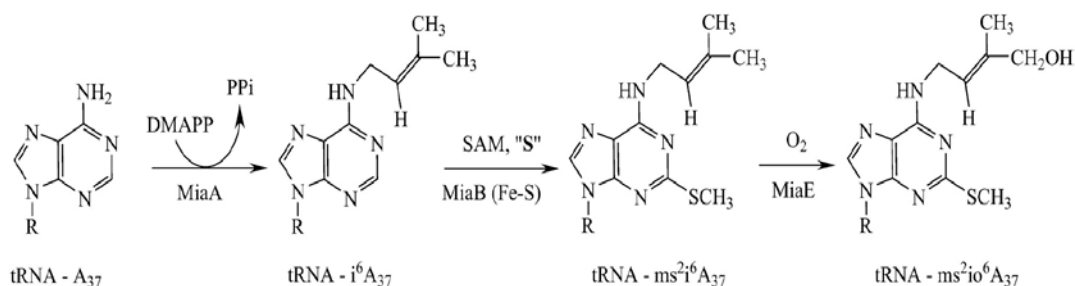
| R_1 | R_2 | Název cytokininu | Zkratka |
|-------|---------------------|------------------------------------|-----------|
| | H | Isopentenyladenin | iP |
| | H | <i>trans</i> -zeatin | <i>tZ</i> |
| | H | Dihydrozeatin | DHZ |
| | CH ₃ -S- | 2-methylthio-isopentenyladenin | 2MeSiP |
| | CH ₃ -S- | 2-methylthio- <i>trans</i> -zeatin | 2MeSiZ |
| | CH ₃ -S- | 2-methylthio- <i>cis</i> -zeatin | 2MeScZ |
| | H | Benzyladenin | BA |
| | H | <i>ortho</i> -topolin | <i>oT</i> |

3.4.2 Biosyntéza cytokininů

Hladiny cytokininů se liší v jednotlivých orgánech rostlin a k významným změnám jejich hladin dochází i v průběhu ontogenetického vývoje rostliny. Zvýšené hladiny nacházíme v proliferujících pletivech, např. v kořenových špičkách, vrcholcích stonků, mladých listech a nezralých semenech (Emery *et al.*, 2000). Hladiny CK jsou také ovlivňovány minerální výživou, zejména příjmem dusíku (Takei *et al.*, 2002), a také v reakci na stres (Vyroubalová *et al.*, 2009). Hlavními způsoby regulace hladin aktivních CK v místě působení jsou biosyntéza, interkonverze, inaktivace, degradace a transport (Tarkowski, 2011).

Prvním krokem biosyntézy CK je prenylace (isopentenylace) exocyklické aminoskupiny adeninu. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy isopentenyltransferasami (IPT) (Kakimoto, 2001; Takei, 2001), které jsou podle substrátové specifity dále děleny na adenylátové IPT a tRNA IPT. Adenylátové IPT (EC 2.5.1.27) katalyzují prenylací adeninu ve formě AMP, ADP a ATP nikoliv však adeninu nebo adenosinu a tRNA IPT (EC 2.5.1.8) pak zajišťují prenylací adeninu v tRNA (Kakimoto, 2001; Morris *et al.*, 1993). Donory isoprenoidního postraního řetězce jsou dimethylalyl difosfát (DMAPP) pocházející z mevalonátové dráhy a (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát (HMBDP) (Krall *et al.*, 2002, Sakakibara *et al.*, 2005). Koncová methylová skupina isopentenylu může být následně hydroxylována cytochrom P450 monooxygenasami (Takei *et al.*, 2004).

Následující krok biosyntézy závisí na dostatku železa, cysteinu a S-adenosylmethioninu (SAM) a zahrnuje dvě reakce. První z nich je thiolace iP na A37 a přenos methylu ze SAM (Goefler, 1969). Thiolaci iP na pozici 37 zajišťuje enzym miaB. Pokud je gen pro tento enzym nefunkční, zůstává adenosin na pozici 37 pouze ve formě iP (Esberg *et al.*, 1999). 2MeSiP A37 může být následně hydroxylován miaE enzymem na 2MeSZ (Pesson & Bjork, 1993).



Obr. 10: Biosyntéza 2MeSiP v tRNA (Mathevon *et al.*, 2007)

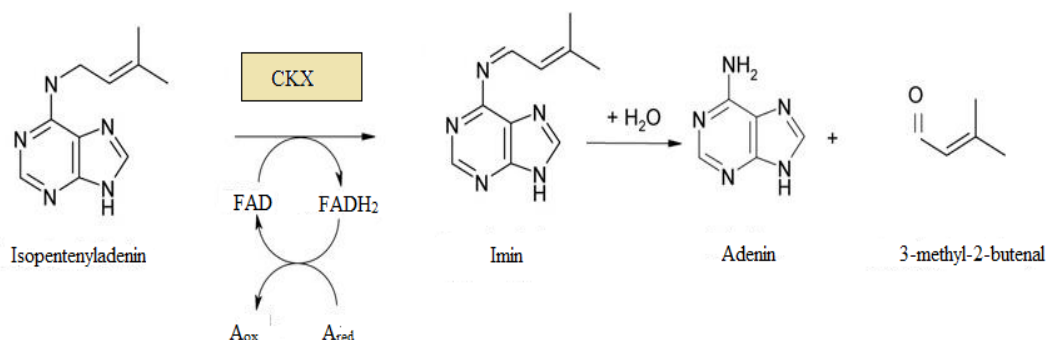
3.4.3 Interkonverze

Metabolické dráhy cytokininů lze rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny patří modifikace adeninového cyklu, druhá skupina pak zahrnuje modifikace postranního isoprenoidního řetězce (Sakakibara, 2006). Předpokládá se, že na vzájemných přeměnách cytokininů se podílí enzymy purinového metabolismu (Chen, 1997). Defosforylaci CK nukleotidů zajišťují 5'-nukleosidasy a alkalické i kyselá fosfatasy a odštěpení ribosy může být katalyzováno adenosin nukleosidasou.

Význam těchto enzymů v metabolismu cytokininů ovšem zůstává sporný vzhledem ke dvěma skutečnostem. Za prvé: afinita těchto enzymů nemusí být dostatečně vysoká vzhledem k nižším koncentracím CK oproti ostatním adeninovým derivátům (Galuszka *et al.*, 2008) a za druhé: jsou tyto enzymy konstitutivně exprimovány, což je v rozporu s potřebou efektivní regulace hladin těchto molekul (Frébort *et al.*, 2011). Toto tvrzení podporuje i objev fosforibosylhydrolasy „Lonely guy“, enzymu specifického vůči cytokininům, který katalyzuje přeměnu cytokininových nukleotidů na aktivní volné báze (Kurakawa, 2007).

3.4.4 Degradace a inaktivace

Důležitým procesem zapojeným do regulace hladin aktivních cytokininů je jejich nevratná degradace tzn. štěpení N^6 postranního řetězce. Tato reakce je katalyzovaná cytokinindehydrogenasou (CKX), (EC 1.5.99.12) náležící do skupiny oxidoreduktas obsahujících FAD. Produktem této reakce je adenin, případně příslušný N^9 substituovaný derivát a aldehyd postranního řetězce. (Frébortová *et al.*, 2004).



Obr. 11: Schéma katalytické degradace isopentenyldeninu

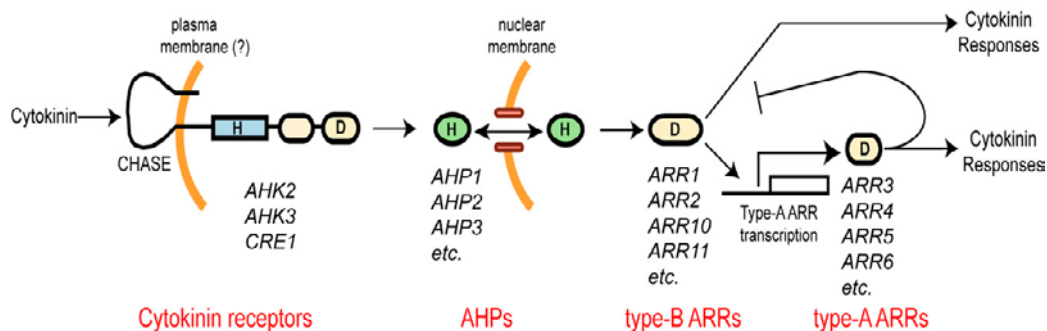
Další možností regulace hladin aktivních cytokininů je inaktivace. Z hlediska biologické aktivity vykazují nejvyšší aktivitu CK ve formě volných bazí, nízkou aktivitu mají ribosidy na pozici N^9 a dále N^9 a N^7 glukosidy jsou zcela neaktivní. Syntézu těchto glukosidů zajišťuje enzym N-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.118) (Entsch *et al.*, 1979). Další možností modifikace CK je O-glykosilace hydroxylů postranního řetězce pomocí glykosyltransferasy (Frébort *et al.*, 2011). O-glykosilované cytokininy slouží jako zásobní a mohou být následně štěpeny β -glukosidasou (Brzobohatý *et al.*, 1993). Vzhledem k nízké rychlosti biosyntézy CK hrají tyto dva enzymy stěžejní roli v regulaci hladiny aktivních cytokininů (Abe *et al.*, 2007).

3.4.5 Cytokininy jako signální molekuly

Cytokininy, stejně jako ostatní rostlinné hormony působí jako signální molekuly ve velmi nízkých koncentracích pohybujících se okolo 1-50 pmol/g FW (Rahman, 2008). Samotný signál je přenášen dvousložkovou kaskádou označovanou jako histidyl-aspartyl (His-Asp) fosfátová signální dráha. Po interakci cytokininu s CHASE doménou receptoru dochází k dimerizaci a autofosforylaci receptoru, který předá fosfát histidin-fosfotransferovému proteinu. Ten následně přeneše signál do jádra na regulátor odezvy (RR) typu B. Přenosem fosfátu na regulátor odezvy B dochází k modulaci jeho transkripční

aktivity, k aktivaci exprese genů primární cytokininové odpovědi a RR typu A, které negativně regulují cytokininovou odpověď (Hwang & Sakakibara, 2006).

Ačkoliv jsou cytokininové receptory intenzivně studovány z hlediska funkce, biochemických vlastností a exprese (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006; Romanov *et al.*, 2006), jejich lokalizace v rámci buňky není dosud přesně definována. Obecně se předpokládá, že cytokininové receptory jsou lokalizovány na plazmatické membráně protoplastů (Kim *et al.*, 2006). Nedávná studie prokázala přítomnost těchto receptorů také na endoplazmatickém retikulu (ER). Zjištěná data napovídají, že CHASE doména není orientována směrem k apoplastu, ale směrem k lumenu ER, zatímco C-koncová doména kinasy, která po aktivaci přenáší fosfát na histidin-fosfotransferový protein, je orientována směrem k cytoplazmě. Toto tvrzení podporuje fakt, že při tomto uspořádání má cytokinin větší afinitu k receptoru, vzhledem k zjištěnému pH optimu pro vazbu (Caesar *et al.*, 2011).



Obr. 12: Schéma cytokininové signální dráhy v Huseníčku (Kieber & Shaller, 2010).

3.4.6 Interakce cytoininů s ostatními fytohormony

Většina vývojových procesů je kromě cytokininů regulována i ostatními fytohormony, zejména auxinem (Galuszka *et al.*, 2008; Prenisová *et al.*, 2009; Pernisová *et al.*, 2011) a etylenem (Růžička *et al.*, 2007; Růžička *et al.*, 2009). K interakci může docházet na několika úrovních: na úrovni metabolismu, signalingu, transportu, exprese genů a stability proteinů (Pernisová *et al.*, 2011).

Zatímco vliv auxinu na expresi cytokin oxidasy/dehydrogenasy je nejasný (Pernisová *et al.*, 2011), exprese genů pro isopentenyltransferázu je účinkem auxinu zvyšována (Miyawaki *et al.*, 2004). Pomocí měření CK profilu a rychlosti biosyntézy bylo prokázáno, že auxin negativně ovlivňuje pool cytokininů negativní regulací biosyntézy (Nordstrom *et al.*, 2004). Měření hladin CK v huseníčku bylo zjištěno, že CK stimuluje biosyntézu auxinu v jeho mladých listech a kořenech. Cytokininy působí jako pozitivní regulátor biosyntézy auxinu, zatímco auxin negativně reguluje biosyntézu cytokininů (Jones *et al.*, 2010).

3.4.7 Význam cytokininů v patogenezi

Rostlinné hormony obecně hrají velmi důležitou roli v odpovědi rostliny jak na abiotický, tak biotický stres. Významného pokroku bylo dosaženo v pochopení úlohy kyseliny salicylové (SA), jasmonátů (JA) a etylenu (ET) v obraných reakcích rostliny. Ostatní hormony (brassinosteroidy, gibbereliny, auxiny, cytokininy a kyselina abscisová) jsou také zapojeny do obranných signálních kaskád, ale konkrétní mechanismy jsou mnohem méně prostudovány (Bari & Jones, 2009).

Role cytokininů v imunitních reakcích rostlin nebyla dosud dostatečně objasněna, ale objevují se náznaky toho, že CK hrají roli v regulaci odpovědi rostliny vůči některým patogenům (Robert-Seilantantz *et al.*, 2007).

Cytokininy hrají důležitou roli například při nádorovém onemocnění způsobeném houbou *Plasmodiophora brassicae* napadající převážně brukvovité rostliny (např. *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*). V rámci studie genové exprese *Arabidopsis thaliana* infikované *P. brassicae* byla pozorována odlišná exprese více než 1000 genů oproti kontrole a zároveň byla silně potlačena exprese genů zapojených do udržování rovnováhy hladin cytokininů (CK syntasa, CK dehydrogenasa). Transgenní rostliny overexprimující geny pro cytokinindehydrogenasu vykazovaly rezistenci vůči infekci *P. brassicae*, což napovídá, že cytokininy jsou klíčovým faktorem při vzniku nádorovitosti (Siemens *et al.*, 2006).

Dalším příkladem úlohy cytokininů v patogenezi může být *Agrobacterium tumefaciens*, který integruje část plazmidové DNA nesoucí gen pro Tmr (tumour morphology root) enzym do genomu rostliny. Tmr enzym je adenosin isopentenyltransferasa, která se podílí na biosyntéze cytokininů. Důsledkem změny hladin cytokininů je tvorba krčkových nádorů na hostitelské rostlině. (Sakakibara *et al.*, 2006).



Obr. 13: Nádorovitost košťálovin (*Plasmodiophora brassicae*)
(Sedlářová, 2004 - nepublikováno)

3.4.7.1 Cytokininy produkované *Rhodococcus fascians*

Inhibice růstu kořenů, oddálená senescence jsou fenotypové znaky rostlin napadených *Rhodococcus fascians*, ale zároveň jsou to znaky, za které jsou ve zdravých rostlinách odpovědné cytokininy (Vereecke *et. al.*, 2000). Tuto skutečnost si poprvé dali do souvislosti Thimann a Sachs v roce 1966. V roce 1996 byly pomocí HPLC a RIA stanoveny hladiny cytokininů v mediu *Rhodococcus fascians*. Bylo zjištěno, že virulentní i nevirulentní kmeny sekretují do media velké množství cytokininů a to *cZ*, *cZR*, *tZ*, *tZR*, *DHZ*, *DHZR*, *iP* a *iPR*. V mediu virulentní bakterie byl navíc identifikován 2MeSiP (Eason *et al.*, 1996).

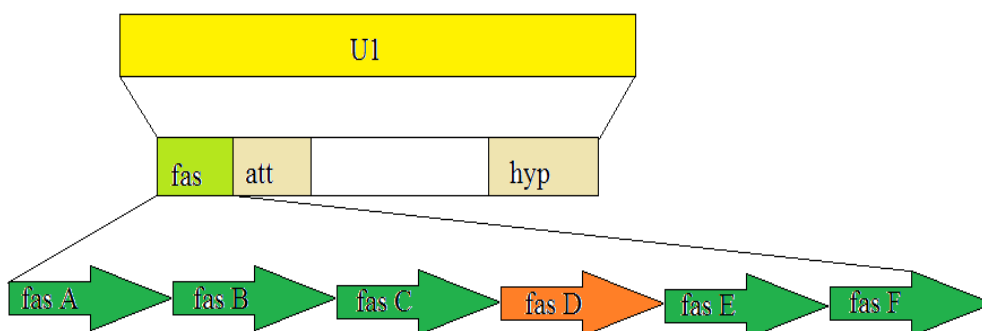
Poslední výsledky naznačují, že hlavní úlohu v patogenezi hrají *iP*, 2MeSiP, *cZ*, 2MeScZ, *tZ* a 2MeStZ. Role ribosidů je vzhledem k jejich nízké biologické aktivitě zanedbatelná (Pertry *et al.*, 2009).

3.4.7.2 Patogeneze *Rhodococcus fascians*

K rozvoji symptomů typických pro infekci bakterií *Rhodococcus fascians* je nezbytné, aby bakterie obsahovala patogenní geny. Tyto geny jsou lokalizovány na 200kb velkém, lineárním konjugativním plazmidu pFiD188. Nositelem tohoto plazmidu je pouze virulentní kmen D188, kmen D188-5 ho neobsahuje (Crespi *et al.*, 1992).

Pomocí insertní mutagenese bylo zjištěno, že tento plazmid obsahuje tři klíčové lokusy nezbytné pro propuknutí infekce a to *att*, *hyp* a *fas*, přičemž klíčovou roli hraje *fas* lokus, jehož inaktivací vzniká nevirulentní vlákno. Lokusy *att* a *hyp* ovlivňují míru projevu infekce. Vyřazením *hyp* dochází ke zvýšení virulence, vyřazením *att* ke snížení (Crespi *et al.*, 1992).

Fas operon obsahuje 6 genů odpovědných za biosyntézu cytokininů a jejich exprese je silně kontrolována jak na úrovni transkripce, tak translace (Temmerman *et al.*, 2000). FasA je homologní s cytochromP450 monoxygenasami. N-konec FasB vykazuje 70% homologii s 4Fe-3Su-typem ferredoxinů *Aktinomycet* a jeho C-konec je homologní s α podjednotkou pyruvát dehydrogenasy. Fas C pak kóduje β podjednotku tohoto enzymu. Oba (Fas B i FasC) obsahují vazebné místo pro kofaktor thiamin pyrofosfát (Crespi *et al.*, 1994). Fas D nese gen pro isopentenyltransferasu (IPT), klíčový enzym pro biosyntézu cytokininů (Crespi *et al.*, 1992). Fas E vykazuje homologii s rostlinnou cytokininoxidasou/dehydrogenasou (CKX) (Smulling *et al.*, 2003) a Fas F vykazuje podobnost s glutation S-transferasou (Goethals *et al.*, 2001).



Fas A – cytochrom P450 monoxygenasa

Fas B – 4Fe-3Su ferredoxin, α podjednotka pyruvát dehydrogenasy

Fas C – β podjednotka pyruvát dehydrogenasy

Fas D – isopentenyltransferasa (IPT)

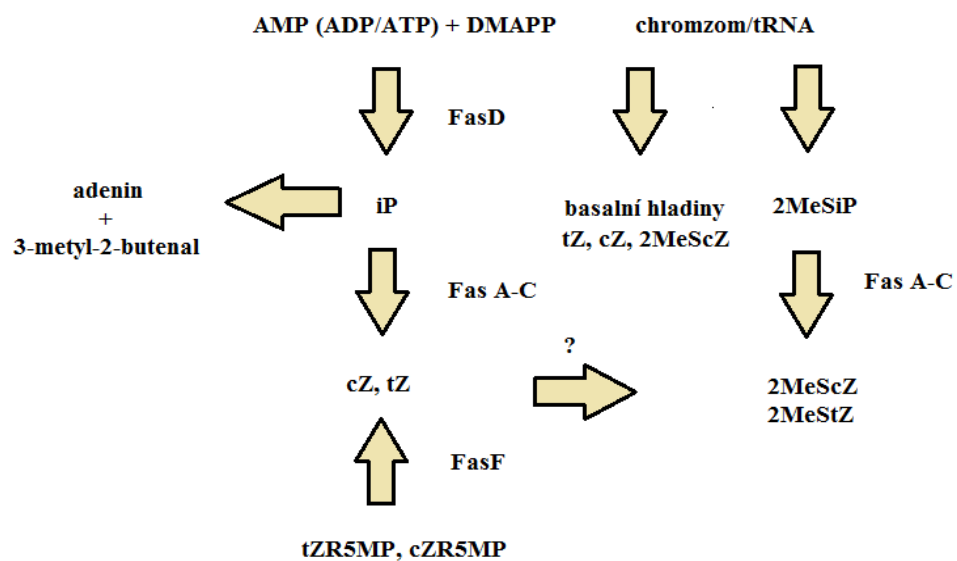
Fas E – cytokinin oxidasa/dehydrogenasa

Fas F – glutation S-transferasa

Obr. 14: Fas operon *Rhodococcus fascians*

Pokusy s mutanty jednotlivých genů (D188-*fas A/F*) prokázali, že mutace způsobuje rozdílné hladiny cytokininů a 2MeStZ je produkován pouze původním kmenem D188. Z toho lze usuzovat, že jednotlivé geny fas operonu hrají roli v různých částech biosyntézy CK a pro syntézu 2MeStZ je nezbytný kompletní fas operon. Klíčovou roli Fas D neboli

isopentenyltransferasy potvrzuje fakt, že hladiny CK v mutantu *fasD* byly nižší než v původním kmenu. Dále bylo potvrzeno, že FasA-FasB-FasC slouží jako systém hydroxylace iP vedoucí k syntéze derivátů zeatinu. Mutací v genu pro CKX došlo ke zdvojnásobení hladiny derivátů iP, což naznačuje, že FasE upřednostňuje tyto deriváty před deriváty zeatinu. U mutantu D188-*fasF* došlo k výraznému snížení hladin cZ a tZ, z čehož lze usuzovat, že FasF při patogenezi zodpovědný za štěpení zeatinových nukleotidů. Jediným CK jehož hladiny byly vyšší u všech mutantů i nevirulentního kmene D188-5 byl 2MeSiP, z čehož vyplývá, že tento derivát může mít chromozomální původ a slouží jako prekurzor ostatních cytokininů produkovaných pomocí *fas* operonu (Pertry *et al.*, 2010).



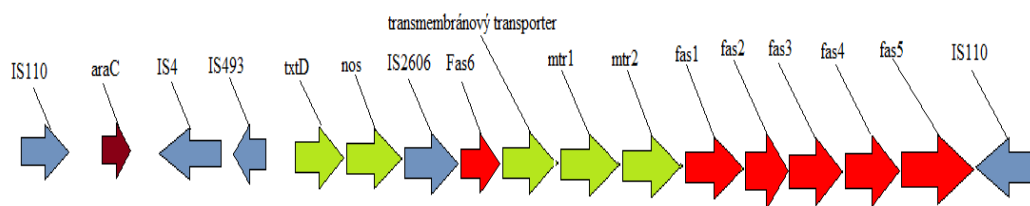
Obr. 15: Produkce cytokininů prostřednictvím *fas* operonu *Rhodococcus fascians*

3.4.7.3 Patogeneze *Streptomyces turgidiscabies*

Ze všech druhů způsobujících strupovitost brambor byla jako první popsána *Streptomyces scabies* (syn. *S. scabei*). Tato bakterie se vyskytuje po celém světě a byla předmětem výzkumu patogeneze více než 100 let. Postupně se však začaly objevovat nové druhy způsobující stejné onemocnění, což vedlo k hypotéze tvrdící, že zástupci rodu *Streptomyces* sdílí genetické determinanty umožňující progresi infekce. Tuto teorii podporovala konzervovanost virulentních genů spojená s přítomností transpozičních elementů (IS – insertion elements) v různých patogenních druzích (Bukhalid *et. al.*, 1998).

Streptomyces turgidiscabies byla identifikována na základě isolátů z lézí strupovitosti brambor v Japonsku. Všechny 21 isolátů bylo identických jak morfologicky, tak fyziologicky, což napovídá, že patogení kmeny *S. turgidiscabies* jsou klony. Populační studie ukázaly, že patogenní *S. turgidiscabies* se vyskytuje ve východní části ostrova Hokkaido, zatímco v západní části se vyskytuje geneticky různorodá populace *S. scabies* (Takeuchi *et. al.*, 1996). Zjištěná data naznačují, že *S. turgidiscabies* vznikla jako důsledek horizontálního transferu virulentních genů z evolučně staršího druhu *S. scabies*. Objevení PAI (mobile pathogenicity island) tuto domněnku potvrdilo (Joshi & Loria, 2007). Na tomto pohyblivém, 660kb velkém, elementu leží několik virulentních genů. Tyto geny, včetně *necl* genu a genů biosyntetické dráhy peptidického fytotoxinu thaxtominu, jsou konzervovány v *S. turgidiscabies* i *S. scabies* (Kers *et al.*, 2005). Tyto dva lokusy jsou vzdáleny přibližně 325kb. Mobilní elementy obsahují otevřené čtecí rámce s různým obsahem GC a představitele několika rodin IS (Kers *et al.*, 2005).

Fas operon *Streptomyces turgidiscabies* leží v těsné blízkosti genů biosyntetické dráhy thaxtominu (Kers *et al.*, 2005). Vzhledem k absenci tohoto operonu v *S. scabies* se předpokládá, že z něj byl vyjmut a vložen do PAI *S. turgidiscabies*. Jednotlivé geny se překrývají nebo jsou odděleny krátkými intergenetickými úseky, tím pádem formují operon stejně jako v *R. fascians*. Vzhledem k podobnosti sekvence, obsahu GC a organizaci genů je pravděpodobné, že *fas* operon *R. fascians* i *S. turgidiscabies* má stejný původ. Pět ze šesti genů *fas* operonu *S. turgidiscabies* je homologních s geny *fas* operonu *R. fascians*. V případě *fas6* pravděpodobně došlo k reorganizaci na chromozomu *S. turgidiscabies*. Kromě homologních genů byly na operonu *S. turgidiscabies* objeveny dvě methyltransferasy (*mtr1*, *mtr2*) a transmembránový přenašeč, které nejsou konzervovány na operonu *R. fascians*. Další odlišností je pozice *fas6* - lysindekarboxylasy a skutečnost, že celý *fas* region je ohraničen dvěma transpozičními elementy z rodiny IS110 (Joshi & Loria, 2007).



IS110, IS4, IS493, IS2606 – transpoziční elementy

araC – regulátor transkripce

txtD – biosyntéza thaxtominu

nos – synthasa oxidu dusnatého

Fas 1 – cytochrom P450 monooxygenasa

Fas 2 – 4Fe-3S_u ferredoxin, α podjednotka pyruvát dehydrogenasy

Fas 3 – β podjednotka pyruvát dehydrogenasy

Fas 4 – isopentenyltransferasa (IPT)

Fas 5 – cytokinin oxidasa/dehydrogenasa

Fas 6 – glutation S-transferasa

mtr1, mtr2 - methyltransferasy

Obr. 16: fas operon *Streptomyces turgidiscabies*

U *Streptomyces* způsobující strupovitost brambor nebyla nikdy popsána schopnost vyvolat tvorbu listových nádorů. Ovšem podobnost fas genů *S. turgidiscabies* a *R. fascians* napovídá, že by tato bakterie mohla mít genetický aparát umožňující tyto symptomy vyvolávat. Ve studii s Δnos mutantem (knockout genu pro fytotoxin), bylo zjištěno, že symptomy vyvolané infekcí *S. turgidiscabies* se podstatně liší v závislosti na druhu rostliny, místě inokulace a stáří rostliny. Infekce klíčících semen tabáku způsobila tvorbu košatého kořenového systému a mírnou inhibici růstu. U dvoutýdenních rostlin tabáku infekce vyvolala tvorbu pupenů v oblastech listového meristému. Inokulace axilárního meristému třítýdenního tabáku způsobila výrazně vyšší tvorbu pupenů mezi 7-10 dnem od inokulace. Po 4 týdnech se tyto pupeny vyvinuly ve struktury podobné nádorům s malými zelenými listy okolo a zároveň došlo k výraznému zpomalení růstu. Při pokusu s dvojitým mutantem $\Delta nos \Delta ipt$ k tvorbě žádných pupenů ani nádorů nedocházelo. Stejná studie byla provedena s *Arabidopsis thaliana*, u které také docházelo k tvorbě pupenů a došlo k výrazné redukci vývoje jak listů, tak kořenů. Je zajímavé, že infikované rostliny vytvářely větší a početnější trichomy, než kontrolní neinfikované rostliny (Joshi & Loria, 2007).

Tab. 5: Geny přítomné na *fas* operonu *S. turgidiscabies*
a jejich srovnání s geny *fas* operonu *R. fascians*
(Joshi & Loria, 2007)

| Gen | Délka (AK) | G+C (%) | Shoda (%) | Podobnost (%) |
|---|---------------|------------|--------------|------------------|
| fas 1 | 400 | 69 | 65 | 77 |
| fas 2 | 295 | 66 | 61 | 71 |
| fas 3 | 310 | 66 | 72 | 84 |
| fas 4 | 257 | 63 | 49 | 68 |
| fas 5 | 445 | 66 | 54 | 67 |
| fas 6 | 207 | 67 | 65 | 76 |
| mtr1 | 284 | 65 | | |
| mtr2 | 280 | 66 | | |
| transmembránový transportér | 489 | 69 | | |
| araC - regulátor transkripce | 212 | 56 | 31 | 53 |

Fas operon dosud nebyl popsán u žádných jiných bakterií. Výlučný výskyt tohoto operonu pouze u gram-pozitivních ale ne u gram-negativních bakterií způsobujících listové nádory (např. *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*) zůstává nevysvětlen. Geny pro IPT jsou u těchto bakterií také lokalizovány na plazmidech, což naznačuje, že geny nutné pro biosyntézu cytokininů jsou mobilizovány poměrně často. V podstatě je schopnost biosyntézy cytokininů charakteristickou vlastností bakterií interagujících s rostlinami (Joshi & Loria, 2007).

3.5 Metody studia cytokininů

Chemická analýza fytohormonů je nezbytnou součástí studia růstu a vývoje rostlin a v neposlední řadě také interakcí rostlin s patogeny. Informace o přítomnosti určitých hormonů a jejich hladinách umožňují objasňování podstaty biologických procesů, které jsou fytohormony ovlivňovány. Rostlinné pletivo, bakteriální buňky či bakteriální médium je složitou směsí nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek, v němž se rostlinné hormony vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, obvykle v řádech femtomolů nebo pikomolů v jednom gramu čerstvé hmoty (či ml média). Společně s fytohormony se v této směsi vyskytují i látky velmi podobných fyzikálně-chemických vlastností nebo podobné struktury. Tyto látky komplikují kvalitativní i kvantitativní analýzu zejména proto, že se ve vzorku vyskytují v řádově vyšších koncentracích (Tarkowski, 2011).

Z hlediska chemických vlastností představují cytokininy velmi různorodou skupinu látek. Nukleotidy jsou polární (iontové) sloučeniny, relativně hydrofobní skupinu představují volné báze a glykosidy a 2MeS-deriváty jsou silně hydrofobní. Cytokininy se také vyskytují ve více izomerních formách (*cis/trans* izomery zeatinu, polohové izomery topolinu a různých glykosidů), které je nutné při analýze dokonale odlišit, protože každý z těchto derivátů vykazuje jinou biologickou aktivitu. Z těchto důvodů musí být analytické metody pro studium cytokininů dostatečně citlivé, selektivní a robustní, aby poskytovaly spolehlivé výsledky bez ohledu na analyzovaný biologický materiál (Galuszka *et al.*, 2008).

3.5.1 Extrakce cytokininů

Biologický materiál pro analýzu by měl být odebírán tak, aby mohl být ihned extrahován nebo okamžitě zmrazen a uchován nejlépe při -80°C . Dále je nutné zabránit tání vzorku při manipulaci (např. navažování, transportu). K homogenizaci materiálu se nejčastěji využívá roztření v třecí misce v tekutém dusíku nebo kulový mlýn (Tarkowski, 2011).

Úkolem extrakce je převedení analytů z biologické matrice do extrakčního činidla, tak aby v průběhu extrakce nedošlo k enzymatické, tepelné, světelné nebo oxidativní degradaci a zároveň bylo dosaženo přijatelného výtěžku. V průběhu extrakce je třeba zabránit konverzi cytokininových nukleotidů na ribosidy a zároveň je nutné zajistit optimální podmínky pro extrakci širokého spektra metabolitů s různou rozpustností (Tarkowski *et al.*, 2004).

Pro extrakci cytokininů z biologického materiálu se využívá kromě methanolu, ethanolu či acetonu hlavně vícesložkových extrakčních směsí. Mezi nejčastěji využívané patří Bielského extrakční pufr označovaný také jako MCF-7 (metanol-chloroform-kyselina mravenčí-voda v poměru 12:5:1:2, v/v), který zabraňuje konverzi nukleotidů na ribosidy inhibicí fosfatů a zároveň se vyznačuje vysokou extrakční účinností. (Bielski, 1964). Pro extrakci cytokininů se také využívá modifikovaný Bielského extrakční pufr, který neobsahuje chloroform. Tato modifikace zachovává schopnost inhibovat fosfatasy a absence chloroformu snižuje obsah lipofilních kontaminantů ve vzorku (Hoyerová *et al.*, 2006).

3.5.2 Purifikace

Přestože se k identifikaci a kvantifikaci cytokininů se nejčastěji jako analytická koncovka využívá HPLC ve spojení s hmotnostní detekcí, je nutné vzorky před analýzou důkladně purifikovat, případně frakcionovat. Dříve se k extrakci a přečištění vzorků využívala extrakce kapalina-kapalina, ale vzhledem k časové náročnosti, pracnosti a nedostatečnému přečištění vzorku tuto metodu nahrazuje extrakce na pevné fázi (SPE) (Tarkowski, 2011).

Pro frakcionaci a purifikaci cytokininů se využívají různé sorbenty, které vážou tyto molekuly na základě různých interakcí (Tarkowski 2011). Vzhledem k tomu, že amino skupina na pozici C6 má $pK_a \approx 4$ mají cytokininy kladný náboj při $pH < 3$. N9 má $pK_a \approx 10$, takže při $pH > 11$ jsou cytokininy nabitý záporně. U cytokininových nukleotidů je fosfátová skupina nabitá dvakrát s $pK_a \approx 1$ a $pK_a \approx 6$. Substituent na pozici N⁶, případně substituce methylthio- skupinou na pozici C2 udává cytokininům hydrofóbní charakter (Dobrev & Kamínek, 2002; Tarkowski, 2011).

Pro prekoncentraci cytokininů se nejčastěji využívá nepolární sorbent C18. Efektivnějším, ale složitějším přístupem je čištění využívající kolon naplněných DEAE celulosou nebo DEAE Sephacemem v prvním kroku, následované C18 kolonou (Tucker & Roberts, 2000). Rychlého a efektivního přečištění cytokininů bylo dosaženo také použitím směsného sorbentu s vlastnostmi jak reverzní fáze (RP), tak iontoměnič (Dobrev & Kamínek, 2002).

3.5.2.1 Mikroextrakce

V posledních letech došlo k velkému rozvoji sorbentů pro přípravu vzorků. Ve snaze dosáhnout sorbentů požadovaných pro jednoduché, cenově dostupné a snadno automatizovatelné metody se zdá být klíčovým faktorem miniaturizace. Miniaturizovaná extrakce na pevné fázi (SPME – solid phase microextraction) se vyznačuje vysokou citlivostí, potřebou malého množství vzorku, malou spotřebou rozpouštědel a jednoduchou automatizací (Risticovic *et al.*, 2009). Velkou pozornost si získaly monolitické materiály s různým chemickým složením, konfigurací a funkcí využitelné v širokém spektru aplikací (Švec, 2010).

Materiály používané v SPME lze rozdělit do dvou skupin: organické polymery (organic polymer based) a materiály na bázi oxidu křemičitého (silica based) (Xu *et al.*, 2010). Syntéza organických monolitů vyžaduje pouze jedнокrokovou polymerizaci. Přes jednoduchost přípravy představují přízřivou porézní strukturu s funkčními skupinami šitými na míru (Buchmeister, 2007). Tyto polymery jsou biokompatibilní a pH stabilní, takže jsou použitelné pro biologické vzorky např. moč nebo krevní sérum.

Tab. 6: Polymerní monolitické materiály využívané v mikroextrakci na pevné fázi, (Xu et. al, 2010)

MAA - kys. methakrylová, EDMA – etylen-dimethakrylát, GMA - glycidylmethakrylát, AA – akrylamid, 4VP- 4-vinilpyridin, Bis – N,N'-metylen-bis-akryamid, LMA – laurylmethakrylát, VDA – 2-vinil-4,4-dimethyl-lakton, HEMA – 2-hydroxyethylmethakrylát, NIPAAm – N-isopropylakrylamid, AOE – oktylmethakrylát, MASE – stearylester kyseliny methakrylové, BMA – butylmethakrylát,

| Polymer | Funkční monomer | Crosslinker |
|---------------------|------------------------|--------------------|
| Poly(MAA-EDMA) | MAA | EDMA |
| Poly(GMA-EDMA) | GMA | EDMA |
| Poly(AA-VP-Bis) | AA/4-VP | Bis |
| Poly(LMA-EDMA) | LMA | EDMA |
| Poly(VDA-HEMA-EDMA) | VDA/HEMA | EDMA |
| Poly(HEMA-EDMA) | HEMA | EDMA |
| Poly(NIPAAm-EDMA) | NIPAAm | EDMA |
| Poly(MAOE-EDMA) | MAOE | EDMA |
| Poly(MASE-EDMA) | MASE | EDMA |
| Poly(BMA-EDMA) | BMA | EDMA |
| Poly(GMA-EDMA-BMA) | GMA/BMA | EDMA |

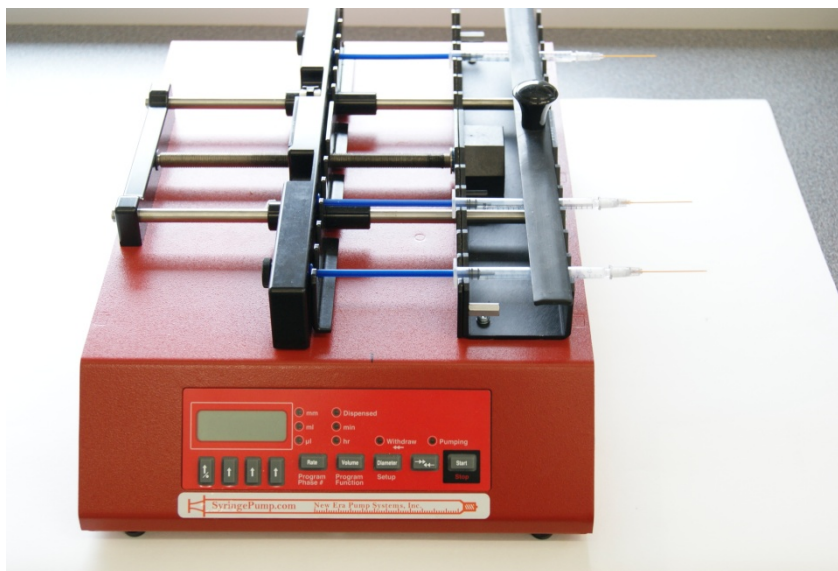
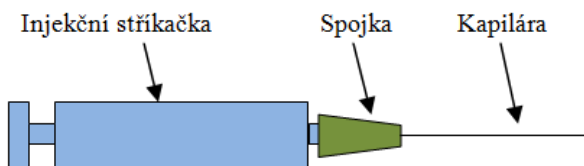
Pro extrakci bazických analytů se nejčastěji využívá Poly(methakrylová kyselina-ethylen dimethakrylát) (poly(MAA-EDMA)), která má polární karboxylové skupiny a zároveň hydrofobní kostru. Dalším často používaným materiálem je Poly(glycidyl methakrylát - ethylen dimetakrylát) (Poly(GMA-EDMA)). Vzhledem k přítomnosti epoxidových skupin je snadno derivatizovatelný. Na bázi tohoto sorbentu byly připraveny imunoafinitní sorbenty s imunoglobulinem G nebo anti-ochratoxinem A. Monolity na bázi oxidu křemičitého mají velký potenciál pro použití v extrémních podmínkách, protože netrpí deformacemi při použití organických rozpouštědel a jejich výhodou je snadná derivatizace. Ve srovnání s organickými polymery se ale využívají mnohem méně často (Xu *et al.*, 2010).

Monolitické materiály se využívají v různých formátech. Původním formátem bylo použití extrakčního vlákna obaleného sorbentem. Toto uspořádání mělo několik nevýhod, například křehkost a malou extrakční kapacitu. Velkého rozvoje dosáhlo „in tube“ neboli uspořádání v trubičce, které řeší problémy s lámáním monolitů i kapacitou kapilár. Dalším uspořádáním, které je na vzestupu zejména v genovém inženýrství je „lab on chip“ neboli laboratoř na čipu. Tento trend, ale postupně zasahuje i do biologických analýz vzhledem ke snížení doby analýzy, ceny, rizika kontaminace, ale zejména díky citlivosti a schopnosti zpracovat i limitované množství vzorku (Xu *et al.*, 2010). Toto uspořádání bylo úspěšně použito například pro přečištění a prekoncentraci imipraminu z lidské moči (Tan *et al.*, 2003). Pro purifikaci a selektivní izolaci zejména proteinů a peptidů proteomice, genomice a metabolomice se používají monolity „tip based“. Tento formát mikroextrakce je založen na pipetovací špičce naplněné monolitickým sorbentem. Celý extrakční proces, v podstatě nasávání a vypouštění roztoků pomocí pipety, je vzhledem ke konvenčnímu SPE mnohem jednodušší a rychlejší. Tyto špičky jsou komerčně dostupné (ZipTip – Millipore (USA), Omix – Varian (USA), NuTipC18, MonoTipC18 – GL Sciences (Japonsko) (Xu *et al.*, 2010). Další možností je uspořádání MEPS (Microextraction in a packed syringe), kdy je stříkačka naplněná sorbentem. Na konci je pevná, porézní ucpávka, která brání jeho vyplavování. Velkou výhodou tohoto uspořádání je snadné spojení s GC a HPLC nevyžadující žádné úpravy chromatografu. Další výhodou MEPS je opakované použití takto připravených stříkaček, zatímco klasické SPE je možné použít pouze jednou (Abdel-Rehim *et al.*, 2008). Dalším uspořádáním využívajícím extrakčních vláken je „Stir-bar-sorptive extraction“ (SBSE). Ve srovnání s klasickou SPME je vrstva sorbentu asi 50-250krát větší, čímž se zvyšuje extrakční kapacita. Problémem je ovšem výroba takto širokých vrstev sorbentu. Magnetická vlákna pro tento typ extrakce, 0,5-1 mm široká, jsou komerčně dostupná jako Twister od firmy Gerstel (Německo). Pro eluci analytů se využívá teplotní desorpce nebo desorpce pomocí rozpouštědel (Xu *et al.*, 2010).

„Microextraction based on monolithic spin column“ využívá k provedení klasických extrakčních kroků (kondicionace, nanesení, promytí a eluce) centrifugu. Příprava této „spin“

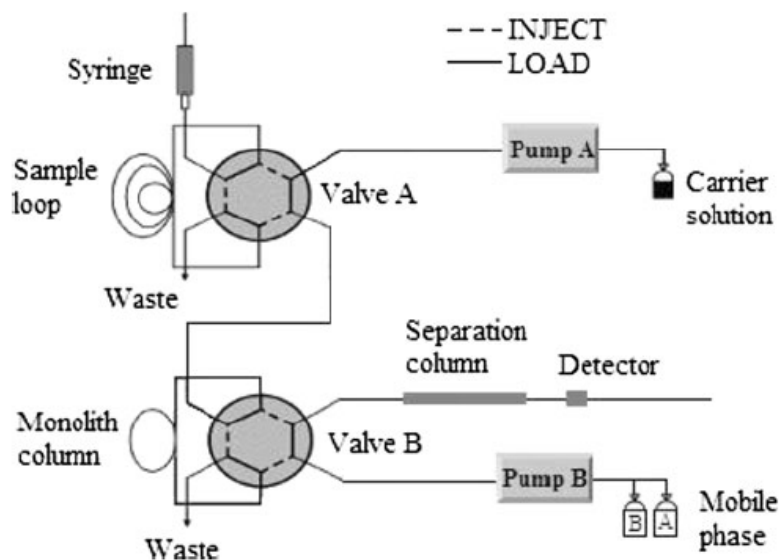
kolony je jednoduchá, monolitický materiál je upevněn v koloně pomocí ultrazvukové adheze a následně vložen do mikrozkuhavky. Toto uspořádání zabraňuje odpařování rozpouštědel v průběhu analýzy. „Spin“ kolony naplněné silným katexem a silným anexem byly použity například pro stanovení bazických, respektive kyselých drog v lidském séru a lidské moči (Xu *et al.*, 2010).

Původní formát SPME je snadno propojitelný s plynovou chromatografií. „In tube“ mikroextrakce bývá online nebo offline spojována s velkým množstvím přístrojů, ale zejména s HPLC (Xu *et al.*, 2010). Pro pohon offline extrakčních procesů se využívá injekční stříkačka. Toto uspořádání, kdy je na stříkačku upevněna monolitická kapilára pomocí plastové spojky, se nazývá „polymer monolith microextraction“. Sorpce a desorpce analytů je prováděna proháněním rozpouštědel pomocí automatické pumpy umožňující nastavit rychlost průtoku. Kromě výhod jako úspora vzorku a rozpouštědel zmiňovaných výše automatická pumpa umožňuje také paralelní extrakci několika vzorků, čímž dochází k výraznému zrychlení zpracování materiálu (Zhang *et al.*, 2006).



Obr. 18: Uspořádání „polymer monolith microextraction“

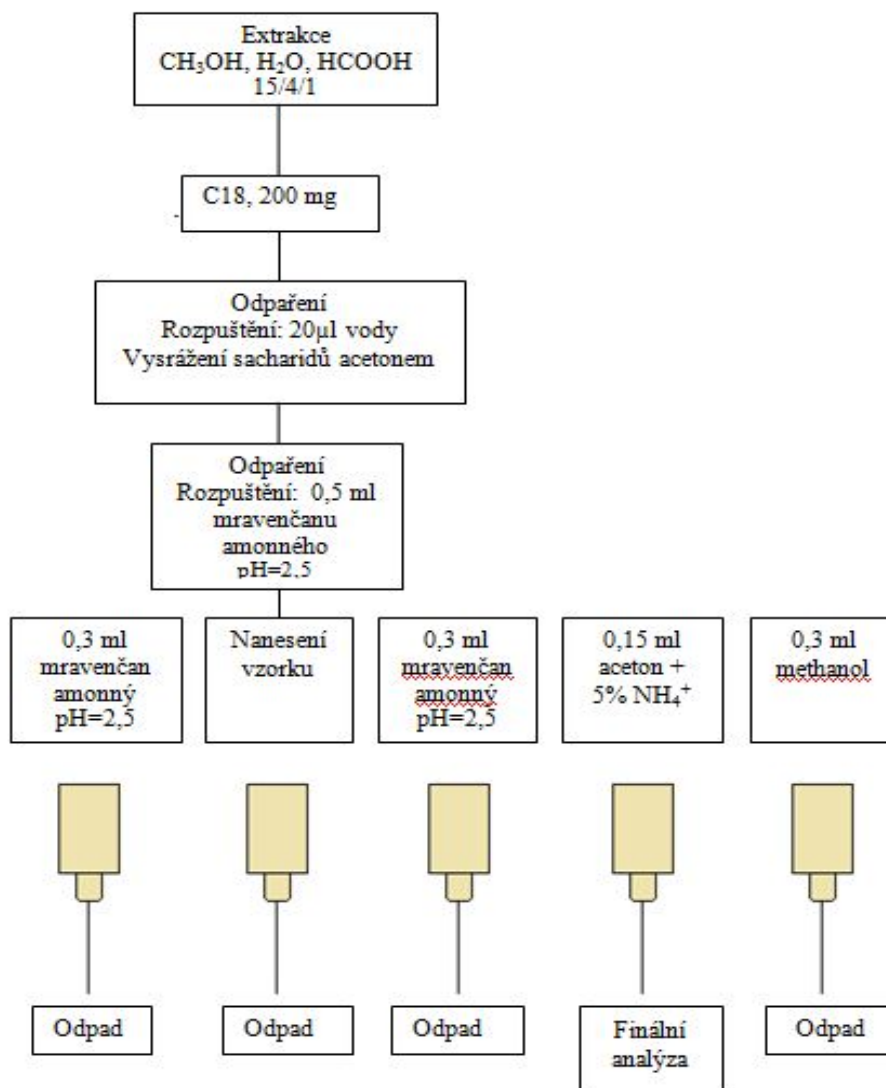
Online spojení PMME a HPLC je poměrně snadno realizovatelné pomocí dvou šesticestných ventilů a pump. Monolitická kolona je umístěna místo jedné smyčky pro nanesení vzorku. Pro vysokou přesnost metody je nutné správné načasování přepnutí ventilu do pozic pro nanesení vzorku, promytí a zejména eluci pro finální analýzu (Xu *et al.*, 2010).



Obr. 19: Online spojení mikroextrakce s HPLC
(Xu *et. al.*, 2010)

Kromě HPLC a GC byla „in-tube“ mikroextrakce úspěšně online spojena také s pCEC (Pressure assisted electrochromatography). Výhodné je také použití instrumentace kapilární elektroforézy, bez ohledu na to zda je k extrakci využíván proud či ne. Nicméně, v tomto režimu in-line detekce nedochází k tak přesvědčivému oddělení analytů, vzhledem k problematice použití roztoků vhodných pro extrakci a zároveň kompatibilních s CE (Xu *et al.*, 2010).

In-tube mikroextrakce pomocí monolitické kapiláry naplněné Poly(AMPS-co-EDMA), což je kopolymer aminopropansulfonové kyseliny a ethylendimethakrylátu, byla úspěšně použita pro analýzu cytokininů. Vzhledem ke kladně nabitým sulfonovým skupinám a hydrofobní kostře dochází k extrakci cytokininů jak na principu iontové výměny, tak hydrofobních interakcí (Liu *et al.*, 2010).



Obr. 20: Purifikace cytokininů pomocí PMME

3.5.3 Metody koncové analýzy

Tradičními technikami pro kvantifikaci cytokininů jsou biotesty a imunotesty. Přestože jsou biotesty stěžejní pro izolaci nových sloučenin, jsou poměrně nepřesné a časově náročné (Tarkowski, 2004). Nejběžnější imunotesty využívané pro studium cytokininů jsou RIA (Radioimmunoassay) a ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Grayling & Hanke, 1992; Maldiney *et al.*, 1986). Výhodou těchto metod je použití vysoce specifických protilátek, které umožňují lokalizaci cytokininů v pletivu a studium distribuce těchto molekul (Casanova *et al.*, 2004). Plynová chromatografie byla používána k analýze cytokininů již v 70. letech. Spojení GC/MS bylo využíváno převážně ke kvantifikaci. Vzhledem k tomu, že cytokininy nejsou téživé molekuly je velkou nevýhodou nutnost derivatizace při použití GC, která komplikuje analýzu CK (Tarkowski *et al.*, 2009).

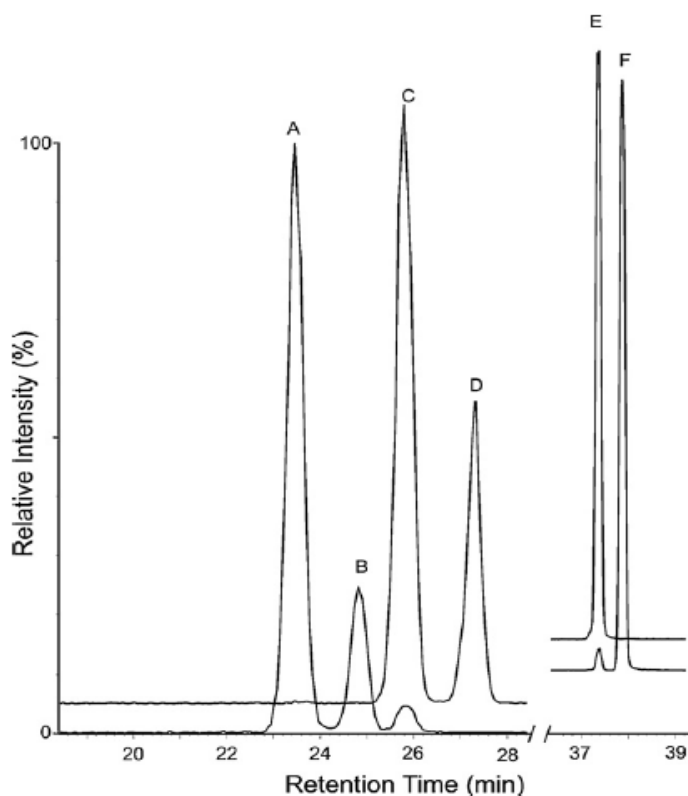
Dnes je nejvyužívanější metodou vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS). Předností LC/MS analýzy je vysoká účinnost chromatografie, citlivost a selektivita hmotnostní detekce. Vysoká účinnost separace je nutná vzhledem k výskytu izomerů cytokininů, které mají identická hmotnostní spektra. LC/MS je neefektivnější metodou také díky využívání interních značených standardů (IS). Tyto autentické analyty, značené stabilními isotopy (např. ^2H , ^{15}N , ^{13}C), mají s původními shodné fyzikální a chemické vlastnosti, ale liší se molekulovou hmotností. Před extrakcí cytokininů se k biologickému materiálu přidá určité množství značeného interního standardu, a přestože dochází v průběhu purifikace ke ztrátám, poměr endogenních cytokininů a interních standardů zůstává stejný. Z výsledků lze stanovit nejen množství endogenních cytokininů ale i návratnost celé metody (Tarkowski, 2011).

3.5.3.1 Chromatografie na reverzní fázi

Většina separací cytokininů probíhá v systému reverzních fází. Mobilní fáze použité v LC/MS musí vyhovovat jak chromatografické separaci, tak hmotnostní detekci. Cytokininy jsou slabé báze, proto se nejlépe separují v okyselených organických rozpouštědlech. Jako druhá složka mobilní fáze se nejčastěji využívají slabé organické kyseliny, nejčastěji kyselina mravenčí nebo octová, případně jejich amonné soli. Aby došlo k dokonalému rozdělení cytokininů, je nutné použít gradientovou eluci. Nejčastěji využívanými sorbenty pro separaci cytokininů jsou C18 nebo C8 pro klasické cytokininy a C4 pro jejich 2MeS deriváty (Tarkowski *et al.*, 2009).

Velkým pokrokem v kapalinové chromatografii bylo zavedení kolon naplněných částicemi o velikosti 1,7 μm . Chromatografie využívajících těchto sorbentů se označuje jako UPLC (ultra performance liquid chromatography) nebo UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography). V tomto chromatografickém módu se pracuje s tlaky až do 1000 bar. UHPLC separace jsou citlivější, účinnější a v neposlední řadě dochází k výraznému zrychlení analýzy (Tarkowski, 2011).

Pro analýzu klasických cytokininů bylo publikováno několik metod. Mezi klasické cytokininy nepatří silně hydrofobní 2MeS deriváty. I přes snahu vyvinout metodu, která by umožňovala analyzovat 2MeS cytokininy spolu s klasickým, tyto pokusy ztroskotaly na nemožnosti separace všech izomerů. Dosud jediná metoda umožňující analýzu šesti 2-methylthio derivátů cytokininů (2-methylthio-cis-zeatin, 2-methylthio-trans-zeatin, 2-methylthio-cis-zeatin ribosid, 2-methylthio-trans-zeatin ribosid, 2-methylthio-isopentenyladenin, 2-methylthioisopentenyladenin ribosid) je tedy realizována samostatně na koloně C4. K separaci cytokininů se jako mobilní fáze využívá 20mM mravenčan amonný o pH 5 a acetonitril. Celková doba analýzy je 56 minut (Tarkowski *et al.*, 2010).

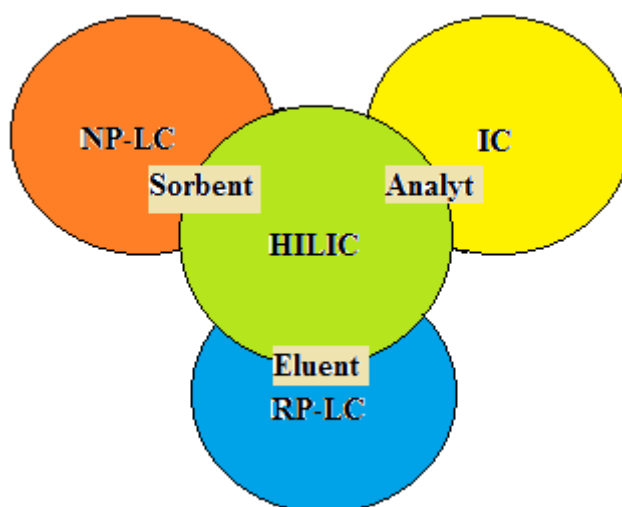


Obr. 21: Separace 2MeS cytokininů

A – 2MeScZ, B – 2MeStZ, C – 2MeScZR, D – 2MeStZR, E – 2MeSiPR, F – 2MeSiP
(Tarkowski *et. al.*, 2010)

3.5.3.2 HILIC chromatografie

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC – hydrophilic interaction liquid chromatography) představuje alternativní přístup k separaci malých polárních molekul. Z historických důvodů se HILIC označuje jako varianta chromatografie na normální fázi, ale mechanismus separace v HILIC módu je složitější. Tento typ chromatografie v podstatě kombinuje charakteristiky tří základních chromatografických technik: iontové chromatografie, chromatografie na normální a reverzní fázi (Buszewski & Noga, 2011).



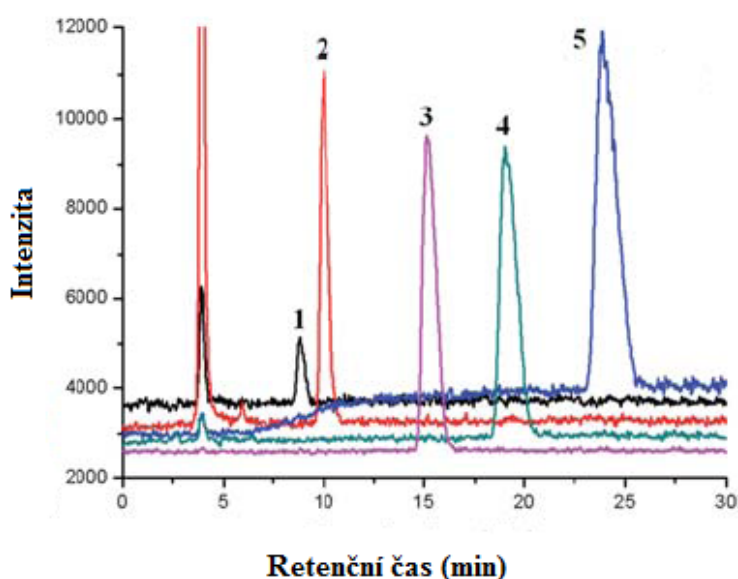
Obr. 22: Kombinace základních technik v HILIC módu separace

Obecně vzato existují tři možné mechanismy separace. Prvním z nich je distribuce analytů mezi mobilní a stacionární fází, druhým je adsorpce analytů na povrch sorbentu. Poslední teorie předpokládá, že nejprve dochází k adsorpci vodné složky mobilní fáze na povrch sorbentu a následné distribuci analytu mezi touto vrstvou a mobilní fází. Retence také závisí na velkém množství intramolekulárních interakcí (např. vodíkové vazby, donor-akceptorové, dipol-dipol a Van der Waalovy interakce).

Jako stacionární fáze může být použit jakýkoliv polární sorbent. Typickou stacionární fází v HILIC chromatografii je klasický silica gel a jeho modifikace mnoha polárními funkčními skupinami (např. NH_2 -, CN -, Ph -). Další možností je použití polymerních sorbentů nebo směsných stacionárních fází obsahujících kromě polární modifikace také C8 nebo C18. Přestože množství komerčně dostupných kolon navržených speciálně pro HILIC separace se zvyšuje, stále neexistuje univerzální sorbent obdobný C18 v systému reverzních fází (Buszewski & Noga, 2011).

Typickou mobilní fází v HILIC separacích je s vodou mísitelné organické rozpouštědlo s malým množstvím vody. Každopádně lze použít jakékoliv aprotické rozpouštědlo, které je mísitelné s vodou nebo alkoholy. Eluční síla rozpouštědel roste v řadě aceton < isopropanol \approx propanol < acetonitril < etanol < dioxan < DMF \approx metanol < voda. HILIC chromatografie jsou prováděny buď isokraticky s vysokým obsahem organické složky mobilní fáze (60-90%) (Liu et. al, 2010) nebo gradientovou elucí, kdy separace začíná vysokým podílem organické složky a končí vysokým podílem vody. Pro kontrolu pH se využívá typicky mravenčan nebo octan amonný. Hlavní úlohou těchto aditiv je zajištění pH při kterém jsou analyty v protonizovaném stavu (Buszewski & Noga, 2011).

HILIC chromatografie byla využita pro identifikaci 5 klasických cytokininů (kinetin, benzylaminopurin, isopentenyladenin, zeatin, dihydrozeatin). Separace probíhala na koloně Luna 5u (250 x 2 mm; 5 μ m). K eluci analytů docházelo isokraticky. Mobilní fáze obsahovala 85% acetonitrilu s 0,01% kyseliny mravenčí a 15 % vody s 0,01% kyseliny mravenčí (Liu et al., 2010).



Obr. 23: Separace cytokininů v HILIC módu

1 - Kinetin, 2- benzylaminopurin, 3 – isopentenyladenin,

4 – zeatin, 5 – dihydrozeatin,

(Liu et. al, 2010)

8. Závěr

Tato práce se zabývá purifikací 2MeS derivátů cytokininů z bakteriálních médií, jejich kvantifikací a vývojem rychlé LC-MS metody koncové analýzy. Purifikační protokol byl optimalizován pro kultivační média *Nostoc* a *Rhodococcus fascians*. Identifikace a kvantifikace byla kromě kultivačních médií těchto dvou bakterií provedena také v médiu *Streptomyces turgidiscabies*.

Podařilo se vyvinout jednoduchou jedнокrokovou purifikaci 2MeS cytokininů z média cyanobakterie *Nostoc*. Tyto deriváty byly následně identifikovány a kvantifikovány pomocí HPLC-MS metody. V případě buněk se identifikace a kvantifikace těchto derivátů nezdařila, neboť v průběhu purifikace došlo ke ztrátě analytů i interních standardů.

Záměnou SPE sorbentu se nepodařilo zvýšit návratnost dvoukrokové purifikace 2MeS CK z média *R. fascians*.

Vůbec poprvé byly identifikovány a kvantifikovány klasické i 2MeS cytokininy v kultivačním médiu další fytopatogenní bakterie *S. turgidiscabies*. Přestože tato bakterie nese obdobný lineární plazmid zajišťující biosyntézu cytokininů jako *R. fascians*, profil cytokininů se výrazně liší.

Jako alternativa ke klasické SPE purifikaci byla pro extrakci 2MeS cytokininů z média *Nostoc* využita purifikace pomocí PMME (porous monolith microextraction). Tato metoda poskytovala uspokojivou návratnost a vyznačovala se poměrně jednoduchým provedením.

Při snaze urychlit LC-MS metodu koncové analýzy 2MeS CK bylo využito několik stacionárních fází v systému reverzních fází a v HILIC módu separace. V systému reverzní fáze jsme se potýkali s nedostatečnou separací kritického páru 2MeScZR a 2MeStZR. V HILIC módu separace byla problematická retence těchto poměrně hydrofobních analytů. Rychlou LC-MS metodu pro analýzu 2MeS derivátů se nepodařilo vyvinout.

9. Literatura

Abe I., Tanaka H., Abe T., Nogushi H. (2007) Enzymatic formation of unnatural cytokinins by adenylate isopentenyl transferase from mulberry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 795-800.

Abdel-Rehim M., Persson C., Altun Z., Blomberg L. (2008) Evaluation of monolithic packed 96-tips and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for extraction and quantification of pindolol and metoprolol in human plasma samples. *J. Chromatogr. A* **1196**, 23-27.

Adams D.G., Duggan P.S. (1999) Heterocyst differentiation and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.* **144**, 3-33.

Bari R., Jones D.G. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* **69**, 473-488.

Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeño-Tárraga A.-M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Keiser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Globe A., hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.-H., Keiser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabbinowitsch E., Rajandream M.-A., Rutheford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B.G., Parkhill J., Hopwood D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.

Bielski R.L. (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues, *Anal. Biochem.* **9**, 431-442.

Bouchek-Mechine K., Gardan L., Normand P., Jouan B. (2000) DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 91-99.

Bouchek-Mechine K., Gardan L., Andrivon D., Normand P. (2006) *Streptomyces turgidiscabies* and *Streptomyces reticuliscabei*: one genomic species, two pathogenic groups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2771-2776.

Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N. (1993) Release of active cytokinin by beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051-1054.

Bukhalid R.A., Chung S.Y., Loria R. (1998) *Nec1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp., and linked to a transposase pseudogene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 960-967.

Bukhalid, R. A., Takeuchi, T., Labeda, D., Loria, R. (2002) Horizontal transfer of the plant virulence gene, *nec1*, and flanking sequences among genetically distinct *Streptomyces* strains in the *Diastatochromogenes* cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 738-744.

Buszewski B., Noga S., (2011) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 231-247.

Casanova E., Valdés A.E, Fernández B., Moysset L., Trillas M.I. (2004) Levels and immunolocalization of endogenous cytokinins in thidiazuron-induced shoot organogenesis in carnation. *J. Plant Physiol.* **161**, 95-104.

Cesar K., Thamm A.M.K., Withoft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Horak J., Harter K. (2011) Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.* **62**, 5571-5580.

Chen C.M. (1997) Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Plant Physiol.* **101**, 665-673.

Connolly D.M., Winkler M.E. (1989) Genetic and physiological relationship among *miaA* gene, 2-methylthio-N⁶-(2-isopentenyl)-adenosin tRNA modification, and spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli* k12. *J. Bacteriol.* **171**, 3233-3246.

Crespi M., Messens E., Caplan A.B., Van Montanu M., Desomer J. (1992) fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon linear plasmid encoding a cytokinin synthetase gene. *Embo J.* **11**, 795-804.

Crespi M., Vereecke D., Temmerman W., van Montagu M., Desomer J. (1994) The fas operon of *Rhodococcus fascians* encodes new genes required for efficient fasciation of host plants. *J. Bacteriol.* **176**, 2492-2501.

Dembitsky V.M., Řezanka T. (2005) Metabolites produced by Nitrogen-Fixing Nostoc species, *Folia Microbiol.* **50**, 363-391.

Depuyd S., Putnam M., Holsters M., Vereecke D. (2008) In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Tixera da Silva J.A. (ed), 480-489, Global Science Books, Velká Británie.

Dobrev P.I., Kaminek M. (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **950**, 21-29.

Duggan P.S., Gotardello P., Adams D.G. (2007) Molecular analysis of genes in *Nostoc punctiforme* involved in pilus biogenesis and plant infection. *J. Bacteriol.* **189**, 4547-4555.

Eason J.R., Morfia R.O., Jameson P.E., (1996) The relationship between virulence and cytokinin production by *Rhodococcus fascians*. *Plant Pathol.* **45**, 323-331.

Emery R.J.N., Ma Q.F., Atkins C.A. (2000) The Forms and Sources of cytokinins in Developing White Lupine Seeds and Fruits. *Plant Physiol.* **123**, 1593-1604.

Entsch B., Parker C.W., Lentham D.S., (1979) Summons R.E., Preparation and characterization, using high-performance liquid chromatography, of an enzymes forming glucosides of cytokinins. *Biochim. Biophys. Acta* **570**, 124-139.

Esberg B., Leung H.C., Tsui H.C., Bjork G.R., Winkler M.E. (1999) Identification of the miaB gene, involved in methylation of isopentenylated A37 derivatives in the tRNA of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 7256-7265.

Faucher, E., Savard, T., Beaulieu, C. (1992) Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can. J. Plant Pathol.* **14**, 197-202.

Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62**, 2431-2452.

Frébortová J., Novák O., Frébort I., Jorda R. (2010) Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *Plant J.* **61**, 467-481.

Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortová J., Šebela M., Frébort I. (2008) Studies in *Natural Plant Products Chemistry Volume 34*, (Atta-ur-Rahman ed.), 203-264, Elsevier, Amsterdam, Nizozemí.

Garrity D.R. (2001) Bergey's manual of systematic bacteriology, Boone D.R., Castenholz R.W. (eds), Volume I, XXI, 575, Springer - Verlag, Německo.

Goefler M.L. (1969) The in vitro synthesis of 2-methylquanosine and 2-methylthio 6N (dimethylallyl)adenosine in transfer RNA of escherichia coli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 435-441.

Goethals K., Vereecke D., Jaziri M., Montanu M., Holsters M. (2001) Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**, 27-52.

Goodfellow M., Alderson G., Chun J. (1998) Rhodococcal systematic: Problems and developments. *Antonie van Leeuwenhoek* **74**, 3-20.

Goodfellow M., Maldano L.A. (2006) The families Dietziaceae, Gordoniaceae, Nocardiaceae and Tsukamurellaceae in: Dworkin F., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrand E. (eds), *The Prokaryotes*, 3, 843-888, Springer, Německo.

Grayling A., Hanke D.E. (1992) Cytokinins in exudates from leaves and roots of red Perilla. *Phytochemistry* **31**, 1863-1868.

Grosjean H., Nicoghossian K., Haumont E., Soil D., Cedergren R. (1985) Nucleotide sequences of two serine tRNAs with GCA antikodon: the structure-function relationship in the serine family of E. coli tRNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **13**, 5697-5706.

Hense I., Beckmann A. (2006) Towards a model of cyanobacteria life cycle - Effects of growing and resting stages on bloom formation of N₂-fixing species. *Ecol. Model.* **195**, 205-218.

Higuchi M., Pischke M.S., Mahonen A.P. (2004) In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8821–8826.

Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P.I., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006) Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**, 1151-1159.

Hwang I., Sakakibara H. (2006) Cytokinin biosynthesis and perception. *Physiol. Plant.* **126**, 528-538.

Kakimoto T. (2001) Biosynthesis of cytokinins. *Plant Cell* **42**, 677-685.

Jones B., Andersson Gunneras S., Petersson S.V., Tarkowski P., Graham N., May S., Dolezal K., Sandberg G., Ljung K. (2010) Cytokinin regulation of auxin synthesis in Arabidopsis involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell* **22**, 2956-2969.

Joshi M.V., Loria R. (2007) *Streptomyces turgidiscabies* possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 751-758.

Kers J.A., Cameron K.D., Joshi M.V., Bukhalid R.A., Morrelo J.A., Wach M.J., Gibson D.M., Loria R. (2005) A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol. Microbiol.* **55**, 1025-1033.

Kieber J.J., Schaller G.E. (2010) The perception of cytokinin: a story 50 years in the making. *Plant Physiol.* **154**, 487-492.

Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 814–819.

Krall L., Raschke M., Zenk M.H., Baron C. (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Lett.* **527**, 315-318.

Kreuze, J. F., Suomalainen, S., Paulin, L., and Valkonen, J. P. T. (1999) Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the nec1 gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland. *Phytopathology* **89**, 462-469.

Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.

Lambert, D. H., Loria, R. (1989) *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 393-396.

Lehtonen, M. J., Rantala, H., Kreuze, J. F., Bang, H., Kuisma, L., Koski, P., Virtanen, E., Vihlman, K., and Valkonen, J. P. T. (2004) Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: Quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant Pathol.* **53**, 280-287.

Leung H.E., Chen Y., Winkler E.M. (1997) Regulation and substrate recognition by the miaM tRNA prenyltransferase modification enzyme of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bioanalytical Chemistry* **272**, 13073-13082.

Liu Z., Wei F., Feng Y.-Q. (2010) Determination of cytokinins in plant samples by polymer monolith microextraction coupled with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* **2**, 1676-1685.

Loria R., Bukhalid R.A., Fry B.A., King R.R. (2007) Plant Pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease* **81**, 836-846.

Maczulak A. (2011) *Encyclopedia of Microbiology*, 739-741, Facts on File Inc, USA.

Maldiney R., Leroux B., Sabbagh I., Sotta B., Sossountzov L., Miginiac E. (1986) A biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones: auxin, abscisic acid and zeatin-riboside. *J. Immunol. Methods* **90**, 151-158.

Mathevon C., Pierrel F., Oddou J.L., Garcia-Serres R., Blondin G., Latour J.M., Ménage S., Gambarelli S., Fontecave M., Atta M. (2007) tRNA-modifying MiaE protein from *Salmonella typhimurium* is a nonheme diiron monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 13295-13300.

Meeks J.C., Campbell E.L., Summers M.L., Wong F.C. (2002) Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Arch. Microbiol.* **178**, 395-403.

Meeks J.C., Elhai J., Thiel T., Potts M., Larimer F., Lamerdin J., Predki P., Atlas R. (2001) An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium. *Photosynth. Res.* **70**, 85-106.

Miyajima K., Tanaka F., Takeuchi T., Kuninaga S. (1998) *Streptomyces turgidiscabies* sp.nov. *Int. J. Syst. Microbiol.* **48**, 495-502.

Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004) Expression of cytokinin expression isopentenyltransferase genes in arabidopsis: tissue specificity and regulativ by auxin, cytokinin and nitrate. *Plant J.* **37**, 128-138.

Mok D.W., Mok M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.

Morris R.O., Blevins D.G., Ditrich J.T., Durley R.C. Gelvin S.B., Grey J., Hommes N.G., Kaminek M., Mathews L.J., Meilan R., Reinbot T.M. (1993) Sayavedrasoto L., Cytokinins in plant pathogenic bacteria and developing cereal grains. *Aust. J. Plant Physiol.* **20**, 621-637.

Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1365–1377.

Nordstrom A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek R., Astot C., Dolezal K., Sandberg G. (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *arabidopsis thaliana*: A factor of potential importace for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 8039-8044.

Oduro K.A. (1975) Factors affecting epidemiology of bacterial fasciation of *Chrysanthemum maximum*. *Phytopatology* **65**, 719-721.

Park, D. H., Yu, Y. M., Kim, J. S., Cho, J. M., Hur, J. H., Lim, C. K. (2003) Characterization of streptomycetes causing potato common scab in Korea. *Plant Disease* **87**, 1290-1296.

Park, D. H., Kim, J. S., Kwon, S. W., Wilson, C., Yu, Y. M., Hur, J. H., Lim C. K., *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea, *International Journal of Systematical Evolutionar Microbiology* **53**, 2049-2054, 2003b

Pernisová M., Klíma P., Horák J., Válková M., Malbeck J., Souček P., Reichmann P., Hoyerová K., Dubová J., Friml J., Zažímalová E., Hejátko J. (2009) Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis via regulation of the auxin efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 3609-3614.

Pernisová M., Kunderová A., Hejátko J. (2011) Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development: Metabolism, Signalling, Transport and Gene Expression. *Current Protein and Peptide Sciences* **12**, 137-147.

Pertry I., Václavíková K., Depuyd S., Galuska P., Spíchal L., Temmerman W., Stes E., Schmulling T., Kakimoto T., van Montagu M.C.E., Strnad M., Holsters M., Tarkowski P., Vereecke D. (2009) Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 929-934.

Pertry I., Václavíková K., Gemrotová M., Spíchal L., Galuska P., Depuyd S., Temmerman W., Stes E., De Keyser A., Riefler M., Biondi S., Novák O., Schmulling T., Strnad M., Tarkowski P., Holsters M., Vereecke D. (2010) *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic Fas-mediated production of cytokinin mix. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**, 1164-1174.

Pesson B., Bjork G.R. (2003) Isolation of the gene (*miaE*) encoding the hydroxylase involved in the synthesis of 2-methylthio-cis-ribozeatin in tRNA of *Salmonella typhimurium* and characterization of mutants. *J. Bacteriol.* **175**, 7776-7785.

Putnam M.L., Miller M.L. (2007) *Rhodococcus fascians* in Herbaceous Perennials. *Plant Disease* **91**, 1064-1076.

Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmulling T. (2006) Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* **18**, 40–54.

Risticevic S., Niri V.H., Vuckovic D., Pawliszyn J. (2009) Recent developments in solid-phase microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 781-795.

Robert-Seilaniantz A., Navarro L., Bari R., Jones J.D. (2007) Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 372-379.

Romanov G.A., Lomin S.N., Schmulling T. (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J. Exp. Bot.* **57**, 4051–4058.

Růžicka K., Ljung K., Vanneste S., Podhorská R., Beeckman T., Friml J., Benková E. (2007) Ethylen regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant cell* **19**, 2197-2212.

Růžicka K., Simasková M., Duclercq J., Petrášek J., Zažímalová E., Simon S., Friml J., van Montagu M.C.E., Benková E. (2009) Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 4284-4289.

Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2006) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 9972-9977.

Sakakibara H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 431-449.

Schmulling T., Werner T., Riefler M., Krupkova E., Bartrina Y., Manns I. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *J. Plant Res.* **116**, 241-252.

Siemens J., Keller I., Sarx J., Kunz S., Schuller A, Nagel W., Schmulling T., Parniske M., Ludwig-Muller J. (2006) Transcriptome analysis of Arabidopsis clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development, . *Mol. Plant-Microbe Interact.* **218**, 480-494.

Singleton P., Sainsbury D. (2001) Dictionary of microbiology and molecular biology, 925, Wiley, USA.

Stirk W.A., van Staden J. (2010) Flow of cytokinins through the environment, *Plant Growth Regul.* **62**, 101-116.

Švec F. (2010) Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. *J. Chromatogr. A.* **1217**, 902-924.

Tan A., Benneton S., Henion J.D. (2003) Chip-based solid-phase extraction pretreatment for direct electrospray mass spectrometry analysis using an array of monolithic columns in a polymeric substrate. *Anal. Chem.* **75**, 5504-5511.

Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme in Arabidopsis thaliana. *Bioanal. Chem.* **276**, 26405-26410.

Takei K., Takahashi T., Sugiyama T., Yamaya T., Sakakibara H. (2002) Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *J. Exp. Bot.* **53**, 971-977.

Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2003) A method for separation and determination of cytokinin nucleotides from plant tissue. *J. Plant Res.* **116**, 265-269.

Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004) Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *J. Bioanal. Chem.* **279**, 41866-41872.

Takeuchi T., Sawada H., Tanaka F., Matsuda I. (1996) Phylogenetic analysis of Streptomyces spp. Causing potato scab based on 16S rRNA sequences, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **46**, 476-479.

Tarkowski P. (2011) Bioanalytické metody studia cytokininů a jejich aplikace, habilitační práce, Univerzita Palackého, Olomouc.

Tarkowski P., Ge L.Y., Young J.W.H., Tan S.,N. (2009) Analytical methods for cytokinins. *Trends Anal. Chem.* **28**, 323-335.

Tarkowski, P., Dolezal, K., Strnad, M. (2004) Analytical methods in cytokinin research. *Chem. Listy* **98**, 834-841.

Tarkowski P., Václavíková K., Pertry I., Novák O., Hanuš J., Whenam R., Vereecke D., Šebela M., Strnad M. (2010) Analysis of 2-methylthio-derivatives of isoprenoid cytokinins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **680**, 86-91.

Temmerman W., Vereecke D., Dreesen R., van Montanu M., Holsters M., Goethals K. (2000) Leafy gall formation is controlled by fasR, an AraC-Type regulatory gene in *Rhodococcus fascians*. *J. Bacteriol.* **182**, 5832-5840.

Tilfort P.E. (1936) Fasciation of sweet peas caused by *Phytomonas fascians*. *Span. J. Agric. Res.* **53**, 383-394.

Tóth, L., Maeda, M., Tanaka, F., Kobayashi, K. (2001) Isolation and identification of pathogenic strains of *Streptomyces acidiscabies* from netted scab lesions of potato tubers in Hokkaido (Japan). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **48**, 575-585.

Tucker G.A., Roberts J.A. (eds) (2000), Plant hormone protocols, Humana Press Inc., USA.

Václavíková K. (2008) Biosyntéza cytokininů, diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc.

Vereecke D., Burrsens S., Simón-Mateo C., Inzé D., van Montagu M., Goethals K., Jaziri M. (2000) The *Rhodococcus fascians* – plant interaction: morphological trans and biotechnological application. *Planta* **210**, 241-251.

Vyroubalová Š., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. (2009) Characterization of new maize genes

putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiol.* **151**, 433-447.

Wanner L.A. (2006) A Survey of Genetic Variation in Streptomyces Isolates Causing Potato Common Scab in the United States, *Phytopatology* **96**, 1363-1371.

Wolk C.P., Ernst E., Elhai J. (1994) Heterocyst metabolism and development, In: Bryant D.A.(ed), *The Molecular biology of Cyanobacteria*, 769-823, Kluwer Academic Publisher, Nizozemí.

Xu L., Shi Z.-G., Feng Y.-Q. (2010) Porous monoliths: sorbents for miniaturized extraction in biological analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 3345-3357.

Zhang M., Wei F., Zhang I.-F., Nie J., Fang Y.-Q. (2006) Novel polymer monolith microextraction using a poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith and its application to simultaneous analysis of several angiotensin II receptor antagonists in human urine by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1102**, 294-301.

Zhao L., Wei F., Feng Y.-Q. (2010) Determination of cytokinins in plant samples by polymer monolith microextraction coupled with hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* **2**, 1676-1685.

Zhi X.Y., Li W.J., Stackebrandt E. (2009) An update of the structure and 16S rRNA gene sequencebased definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 589–608.

10. Seznam zkratek

| | |
|---------------------|---|
| 2MeS CK | 2-methylthio cytokininy |
| 2MeScZ | 2-methylthio- <i>cis</i> -zeatin |
| 2MeScZR | 2-methylthio- <i>cis</i> -zeatin ribosid |
| 2MeStZ | 2-methylthio- <i>trans</i> -zeatin |
| 2MeStZR | 2-methylthio- <i>trans</i> -zeatin ribosid |
| 2MeSiP | 2-methylthio-isopentenyladenin |
| 2MeSiPR | 2-methylthio-isopentenyladenin ribosid |
| A37 | adenosin na pozici 37 v tRNA |
| ADP | adenosindifosfát |
| AHK | histidinkinasa |
| AMP | adenosinmonofosfát |
| araC | regulátor transkripce |
| AHK | histidinkinasa |
| ARR | geny pro růstové regulátory |
| AMPS-co-EDMA | kopolymer 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonové kyseliny a ethylendimethakrylátu |
| ATP | adenosintrifosfát |
| <i>att</i> | lokus na pFiD188 |
| BA | benzyladenin |
| β-GLU | β-glukosidasa |
| C18 | reverzní stacionární fáze |
| C4 | reverzní stacionární fáze |
| CK | cytokinin |
| CKX | cytokinindehydrogenasa |
| CYP 450 | cytochrom P450 monooxygenasa |
| <i>cZ</i> | <i>cis</i> -zeatin |
| <i>cZR</i> | <i>cis</i> -zeatin ribosid |
| DHZ | dihydrozeatin |
| DHZR | dihydrozeatin ribosid |
| DMAPP | dimethylalylidifosfát |
| ELISA | imunotesty založené na enzymech |
| ER | endoplazmatické retikulum |
| ESI | ionizace elektrospřejem |
| <i>Fas</i> | lokus na pFiD188 |

| | |
|-------------------|--|
| FW | čerstvá hmota |
| GC | plynová chromatografie |
| HMBPP | 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyldifosfát |
| HPLC-UV | kapalinová chromatografie s detekcí v UV oblasti |
| HPLC-MS | kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí |
| <i>hyp</i> | lokus na pFiD188 |
| iP | isopentenyladenin |
| iPR | isopentenyladenin ribosid |
| IS | transpoziční element |
| K | kinetin |
| LOG | cytokinin fosforibohydrolasa |
| LAS | synthasa kyseliny lupinové |
| MCF-7 | extrakční pufr |
| mRNA | mediátorová nukleová kyselina |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| mtr | methyltransferasa |
| N-GT | cytokinin glukosyltransferasa |
| pEC | tlaková elektrochromatografie |
| <i>oT</i> | <i>ortho</i> -topolin |
| pFiD188 | lineární plazmid bakterie <i>Rhodococcus fascians</i> |
| PMME | mikroextrakce na pevné fázi s využitím monolitických sorbentů |
| RIA | radioimunoanalýza |
| SAM | S-adenosylmethionin |
| SPME | mikroextrakce na pevné fázi |
| Tmr | adenosin isopentenyltransferasa v <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| tRNA | transferová ribonukleová kyselina |
| tRNA – IPT | tRNA isopentenyltrasferasy |
| <i>tZ</i> | <i>trans</i> -zeatin |
| <i>tZR</i> | <i>trans</i> -zeatin ribosid |
| ZOGT | zeatin-O-glukosidasa |
| Z | zeatin |
| ZI | zeatinisomerasa |
| ZR | zeatinreduktasa |